



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 882**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00980083 .0**

86 Fecha de presentación : **26.10.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1228231**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.2002**

54 Título: **Glicosilación de tipo mamífero en plantas.**

30 Prioridad: **26.10.1999 EP 99203524**
26.10.1999 EP 99203523

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es: **Plant Research International B.V.**
Droevendaalsesteeg 1
6708 PB Wageningen, NL

72 Inventor/es:
Bakker, Hendrikus, Antonius, Cornelis y
Bosch, Hendrik, Jan

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Glicosilación de tipo mamífero en plantas.

5 La presente invención se refiere al campo del procesamiento de glicoproteínas en plantas transgénicas utilizadas como fábricas con un coste eficaz y libres de contaminación para la producción de sustancias proteináceas, tales como proteínas biofarmacéuticas recombinantes o composiciones (farmacéuticas) que los comprenden.

La creación de proteínas recombinantes como, por ejemplo, medicamentos o composiciones farmacéuticas mediante agricultura fármaco-molecular constituye una de las principales atracciones de las plantas transgénicas; es también el dominio en el que su utilización está mejor aceptada por la opinión pública. Además del rendimiento y el coste favorable que se pueden esperar desde el campo de la producción de proteínas recombinantes, las plantas transgénicas presentan ciertas ventajas sobre otros sistemas de producción, tales como bacterias, levaduras y células animales. De hecho, están desprovistas de virus que podrían ser peligrosos para los humanos y pueden acumular las proteínas de interés en sus "órganos de almacenamiento", tales como semillas o tubérculos. Esto facilita su manipulación, su transporte y su almacenamiento a temperatura ambiente, a la vez que permite la posibilidad de una posterior extracción según las necesidades. Además, la planta transgénica, o algunas de sus partes, se pueden utilizar como vector de medicamentos o de vacunas. En 1996, el equipo de Charles Arntzen (Instituto Boyce Thompson para Investigación de Plantas, Universidad de Cornell, Nueva York) probó la producción de una vacuna recombinante contra la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* por la patata. Su eficacia se ha demostrado en ratones y a través de pruebas clínicas llevadas a cabo en voluntarios que habían consumido de 50 a 100 gramos de patatas crudas transgénicas durante un periodo de seis meses. Otro equipo, en Loma Linda, California, ha probado con éxito en ratones una vacuna contra el cólera formado en la patata. La vacunación tradicional contra gérmenes responsable de enteropatías se considera como "demasiado costosa" para implantarse de forma general en los países desarrollados. Sin embargo, la producción de vacunas orales, por ejemplo, no permitirían en la patata, pero sí en la banana, a un precio muy bajo, una implementación general de la vacunación contra diarreas de origen bacteriano, que provoca la muerte de tres millones de niños cada año. En los países desarrollados, se puede imaginar que los niños preferirían ciertamente una vacuna de banana o fresa a la aguja del doctor. De forma más general, el estudio de fármacos a nivel molecular podría permitir que los países desarrollados produjeran, a bajo coste, cantidades sustanciales de proteínas terapéuticas utilizando la capacidad de su agricultura sin necesidad de invertir en industrias farmacéuticas. A pesar de que las ventajas de las plantas como fábricas de sustancias proteináceas se explican mayoritariamente según los biofarmacéuticos, las plantas también son útiles para la producción de otras proteínas, por ejemplo, enzimas industriales y otros, debido a su capacidad de glicosilación que conduce, por ejemplo, a una mayor estabilidad. Actualmente, la utilización de plantas para la producción de proteínas o glicoproteínas para uso terapéutico ha llegado más allá del dominio de la ciencia ficción ya que la soja, el tabaco, la patata, el arroz o la colza son objeto de investigaciones para la producción de vacunas, proteínas o péptidos de mamíferos, tales como: anticuerpos monoclonales, antígenos de vacuna, enzimas, tales como lipasa gástrica canina, citoquinas, tales como factor de crecimiento epidérmico, interleuquinas 2 y 4, eritropoyetina, encefalinas, interferón y albúmina de suero, en la mayor parte de origen humano. Algunas de estas proteínas ya han demostrado su eficacia en voluntarios humanos, aunque su inmunogenicidad potencial y su posible carácter alérgico aún limita su desarrollo. Varias proteínas heterólogas se han producido de manera satisfactoria en plantas. Entre estas proteínas se incluyen anticuerpos monoclonales, hormonas, antígenos de vacuna, enzimas y proteínas de la sangre (Dieryck *et al.*, 1997; Florack *et al.*, 1995; Ma *et al.* 1995; Matsumoto *et al.* 1993; Saito *et al.*, 1991; Thanavala *et al.*, 1995). Una limitación importante de las plantas, compartida con otros sistemas de expresión heterólogos, tal como bacterias, levadura y células de insectos, es su diferente perfil de glicosilación en comparación con los mamíferos. A diferencia de las bacterias, que no tienen glicanos unidos por N, y la levadura, que sólo tiene glicanos con alto contenido en manosa, las plantas son capaces de producir proteínas con glicanos unidos por N complejos. Las glicoproteínas de plantas tienen glicanos complejos unidos por N que contienen residuos de fucosa en el núcleo unidos por $\alpha 1,3$ y residuos de xilosa unidos por $\beta 1,2$ que no se hallan en mamíferos (Lerouge *et al.*, 1998) (figura 1). El núcleo de los N-glicanos de plantas se pueden sustituir, como en los mamíferos, por 2 residuos GlcNAc¹, que son transferidos por N-acetilglucosaminiltransferasa I y II (Schachter, 1991) a pesar de que varía su apariencia (Rayon *et al.*, 1999). Los N-glicanos de algunas glicoproteínas de plantas contienen además un epítipo Lewis A (Fuc $\alpha 1,4$ (Gal $\beta 1,3$)GlcNAc) (Fitchette Laine *et al.*, 1997; Melo *et al.*, 1997). Sin embargo, las glicoproteínas de las plantas carecen de la galactosa característica (NeuAca2,6Gal $\beta 1,4$) que contiene N-glicanos complejos hallados en mamíferos, mientras que el núcleo de fucosa unida por $\alpha 1,6$ no se halla nunca (figura 1; Schachter, 1991). Un anticuerpo monoclonal de ratón producido en las plantas del tabaco (Ma *et al.*, 1995) tiene una N-glicosilación de plantas típica: 40% de glicanos con alto contenido en manosa y un 60% de glicanos complejos que contienen xilosa, fucosa y 0, 1 ó 2 residuos GlcNAc terminales (Cabanès Macheteau *et al.* 1999).

Brevemente, los análisis de las glicoproteínas de las plantas han indicado que hay diversas etapas en los mecanismos de glicosilación de plantas y mamíferos que son muy similares, si no son idénticos. Sin embargo, existen también claras diferencias, particularmente en la síntesis de glicanos complejos. Los glicanos complejos de las plantas son en general mucho más pequeños y contienen residuos de beta-1,2 xilosa o alfa-1,3 fucosa unidos al núcleo Man3 (GlcNAc)₂. Se sabe que dichos residuos sobre la glicoproteína son altamente inmunogénicos. Esto provocará problemas para ciertas aplicaciones de proteínas recombinantes que transportan estos azúcares. Además, aunque es común y frecuentemente esencial en las glicoproteínas de los mamíferos, el ácido siálico nunca se ha encontrado en glicanos de las plantas. Esto es particularmente relevante ya que algunos experimentos han demostrado que la ausencia de ácido siálico terminal en cadenas laterales glicosídicas puede disminuir drásticamente la actividad biológica *in vivo*. Más probablemente, los receptores asialo-glicoproteína en el hígado se pueden unir a asialo-glicoproteína y provocan por lo tanto un aclaramiento

de la glicoproteína de la circulación, que se refleja en una vida media metabólica reducida y una baja bioactividad *in vivo*.

La presente invención proporciona una planta que comprende una enzima de mamífero funcional que proporciona una biosíntesis de N-glicanos que normalmente no está presente en plantas en las que la enzima es una β -1,4-galactosiltransferasa; y una segunda proteína de mamífero; en la que la segunda proteína de mamífero comprende un glicano galactosilado unido por N y se expresa a partir de un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera de anticuerpo o un fragmento funcional del mismo. Especialmente es el carácter de la “planta” de los glicanos lo que hace que las glicoproteínas producidas en plantas sean menos adecuadas para su uso farmacéutico. Este carácter de la “planta” transmite características antigénicas e inmunogénicas no deseadas a la glicoproteína en cuestión, que necesitaría una estrategia dirigida a la prevención de inmunogenicidad de glicoproteínas producidas por plantas transgénicas. El objetivo de la estrategia es modificar el genoma de células vegetales de manera que maduren sus proteínas al igual que lo harían las células humanas. Se han clonado ya numerosos genes de glicosil transferasas de mamíferos, lo cual no es el caso de las plantas. A la vista de la facilidad de transformación de los sistemas vegetales, es fuerte la tentación de “complementar” el aparato de Golgi de las plantas por glicosil transferasas de mamíferos con el fin de “humanizar” o “mamiferizar” los glicanos de las glicoproteínas que producen. Sin embargo, el éxito de dicha estrategia no es evidente. En particular, la galactosilación y posterior sialilación de glicoproteínas recombinantes en una célula vegetal dependen no sólo de la transferencia y la expresión del gen de la galactosil y la sialil transferasa: estas enzimas exógenas también deben estar activas en células vegetales, sin efectos perjudiciales para la célula vegetal, y por último, pero no menos importante, sin efectos perjudiciales a la planta transgénica global.

Para mamiferizar la glicosilación de la planta para la producción de glicoproteínas hechas a medida para las plantas, se pueden extraer una xiloliltransferasa y fucosiltransferasa y debe expresarse por lo menos una de las diversas glicosiltransferasas de mamíferos. La extracción de la xiloliltransferasa y fucosiltransferasa y por lo tanto la reducción de la potencial glicosilación no deseada de las plantas es una opción factible ya que, por ejemplo, un mutante de *Arabidopsis thaliana* mutado en el gen que codifica N-acetilglucosaminiltransferasa I era completamente viable (Von Schaeuwen *et al.* 1993). Dado que la N-acetilglucosaminiltransferasa I es la enzima que inicia la formación de glicanos complejos (Schachter, 1991), esta planta carece completamente de glicanos complejos que contienen xilosa y fucosa.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una planta que comprende una proteína funcional de mamífero que proporciona una biosíntesis de N-glicanos en la que la proteína es una β -1,4-galactosiltransferasa que comprende adicionalmente por lo menos una segunda proteína de mamífero, en la que la segunda proteína de mamífero comprende un glicano galactosilado unido por N y se expresa a partir de un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera de anticuerpo o un fragmento funcional de la misma. En la presente invención también se proporciona la producción en plantas de una glicoproteína deseada que tiene un patrón de glicosilación de tipo mamífero, por lo menos en que dicha glicoproteína está galactosilada.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una planta según la presente invención en la que dicha enzima mamífera funcional proporciona una biosíntesis de N-glicanos que normalmente no está presente en plantas que comprende β 1,4-galactosiltransferasa. Una enzima de mamífero importante que está ausente en las plantas es esta β 1,4-galactosiltransferasa. Los ADNc que codifican esta enzima se han clonado a partir de varias especies de mamíferos (Masri *et al.*, 1988; Schaper *et al.* 1986). La enzima transfiere galactosa desde el dador de azúcares activado UDP-Gal en la unión β 1,4 hacia residuos GlcNAc en glicanos unidos por N y otros glicanos (figura 1). Se ha observado que estos residuos de galactosa juegan un papel importante en la funcionalidad, por ejemplo, de anticuerpos (Boyd *et al.*, 1995). La β 1,4-galactosiltransferasa se ha introducido recientemente en cultivos de células de insectos (Hollister *et al.*, 1998; Jarvis y Finn, 1996) para ampliar el mecanismo de N-glicosilación de células de insectos Sf9 en cultivos celulares, permitiendo la infección de estos cultivos con un vector de expresión de baculovirus que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga. Se observó que los glicanos unidos por N a proteína heteróloga se procesaban en cierto grado más ampliamente permitiendo la producción de glicoproteínas recombinantes galactosiladas en dichos cultivos de células de insectos. Además, la introducción de la enzima en un cultivo de suspensión de células del tabaco dio lugar a la producción glicanos galactosilados unidos por N (Palacpac *et al.*, 1999) de proteínas endógenas. Sin embargo, no se produjeron proteínas heterólogas en estos cultivos de células vegetales, y mucho menos dichas proteínas heterólogas se galactosidaron en el cultivo celular. Además, hasta ahora no se han descrito en la técnica plantas transgénicas que comprendan patrones de glicosilación de mamíferos. Existen muchos mutantes de glicosilación en líneas de células mamíferas (Stanley y Loffe, 1995; Stanley *et al.*, 1996). Sin embargo, mutaciones similares en organismos completos provocan una disfunción más o menos seria de este organismo (Asano *et al.*, 1997; Herman y Horvitz, 1999; Loffe y Stanley, 1994). Por lo tanto, en general, incluso se espera que la expresión de la β 1,4-galactosiltransferasa en un conjunto más amplio que las células individuales (tal como en un tejido cohesivo u organismo total) también conducirá a dicha disfunción, por ejemplo durante la embriogénesis y/u organogénesis. De hecho, hasta ahora no se ha descrito un organismo no mamífero totalmente desarrollado, tal como un insecto o una planta, que tenga la capacidad de extender un glicano unido por N, al menos no mediante la adición de una galactosa. A partir de muchos organismos multicelulares eucariotas, se han generado líneas celulares inmortalizadas, tales como líneas celulares CHO, Sf9 y de hibridoma. Estas líneas celulares se han cultivado durante muchas generaciones, pueden transportar muchas mutaciones o carecer o haber perdido muchas características que son esenciales para el funcionamiento de los organismos intactos de los que se derivan. Para ilustrar esto último, el hecho de que estas líneas celulares inmortalizadas no se puedan regenerar en organismos completos muestra que en estas líneas celulares inmortalizadas faltan mecanismos de señalización importantes y componentes implicados en la comunicación célula-célula. A partir de la literatura se sabe que la maquinaria de glicosilación unida por N de líneas células

eucariotas inmortalizadas, tales como líneas de células CHO (Stanley y Loffe, 1995; Stanley *et al.*, 1996) o células de insectos Sf (Jarvis y Finn, 1996; Hollister *et al.*, 1998), se puede modificar sin tener efectos negativos obvios sobre la viabilidad de estas líneas celulares, mientras que, en cambio, mutaciones similares en organismos completos provocan una disfunción más o menos seria del organismo (Asano *et al.*, 1997; Herman y Horvitz, 1999; Loffe y Stanley, 1994).

De hecho, no se ha descrito la extensión de glicosilación unida por N, de manera que se formen glicanos unidos por N que no aparecen de forma natural en células eucariotas que tienen la potencia para regenerarse en organismos viables. Aparentemente, en comparación con células normales, las líneas celulares inmortalizadas son flexibles y tolerantes a la glicosilación unida por N nueva, de tipos no normales, pero carecen de la capacidad de desarrollarse en organismos intactos.

También se ha descrito la modificación de la maquinaria de la N-glicosilación de células de tabaco BY2 inmortalizadas. La introducción de GalT en esta línea celular da lugar a la producción de glicanos galactosilados unidos por N de proteínas endógenas (Palacpac *et al.*, 1999). Sin embargo, las células de esta línea celular BY2 no se pueden regenerar en plantas de tabaco viables. Además y tal como se describe en otras partes de la presente solicitud de patente, la mayor población era un glicano de tipo híbrido anormal (GlcNAc2Man5GlcNAcGal) sugiriendo una acción prematura de la galactosiltransferasa introducida y una morfología de Golgi y localización de la galactosiltransferasa en la línea de células BY2 anormales. Esto proporciona una evidencia adicional de que estas líneas celulares son significativamente diferentes de las células normales de la planta del tabaco. Hasta ahora no se ha descrito un organismo no mamífero totalmente desarrollado, tal como un insecto o una planta, que tenga la capacidad de extender un glicano unido por N, al menos no mediante la adición de una galactosa. Sorprendentemente, la presente invención proporciona ahora dicho organismo no mamífero, una planta a la que se ha proporcionado una enzima funcional de mamífero que proporciona la biosíntesis de N-glicanos que normalmente no está presente en plantas en las que la enzima es la β -1,4-galactosiltransferasa mamífera; y una segunda proteína de mamífero, en la que la segunda proteína de mamífero se expresa a partir de un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera del anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, por ejemplo, proporcionando de este modo la capacidad para extender un glicano unido por N mediante la adición de una galactosa. En una realización preferida, la presente invención proporciona dicha planta en la que dicha enzima muestra una expresión estable. Se proporciona incluso que más allá de dicha segunda proteína de mamífero, se expresa una tercera proteína de mamífero mediante una proteína proporcionada por la presente invención. La parte experimental proporciona dicha planta que comprende un ácido nucleico que codifica tanto una cadena pesada como ligera de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo. Naturalmente, no es necesario que se exprese una proteína completa, la presente invención también proporciona una planta según la presente invención que expresa sólo un fragmento funcional de dicha segunda glicoproteína de mamífero, teniendo dicho fragmento por lo menos una actividad de la proteína completa y además estando caracterizada mediante, por ejemplo, una cadena de polipéptido truncada, o un glicano no totalmente extendido, por ejemplo sólo extendido con galactosa.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una planta según la presente invención en la que dicha segunda proteína de mamífero o fragmento funcional de la misma comprenden un glicano extendido por unión a N que no tiene xilosa y/o fucosa. Tal como se puede observar en la figura 3, las glicoproteínas galactosiladas derivadas de plantas aún pueden contener residuos de xilosa y fucosa.

Esto es a diferencia de glicoproteínas galactosiladas derivadas de cultivos de células vegetales (Palacpac *et al.*, 1999), donde estas glicoproteínas carecen esencialmente de residuos de xilosa y fucosa. En los cultivos de células vegetales esto es resultado de la acción de la β -1,4-galactosiltransferasa sobre glicanos unidos por N inmaduros, dando lugar a glicanos galactosilados unidos por N de "tipo híbrido" no naturales en los que la Golgi-manosidasa II y N-acetilglucosaminiltransferasa II no pueden realizar más su función. En una realización preferida, la β -1,4-galactosiltransferasa se expresa por tanto en plantas de manera que la enzima actúa en el aparato de Golgi sobre sustratos naturales (figura 5). Esto significa, después de la acción de la N-acetilglucosaminiltransferasa I, Golgi-manosidasa II y N-acetilglucosaminiltransferasa II (y en plantas, con la condición de que estas enzimas no estén inhibidas de otra manera, después o durante la acción de xilosiltransferasa y fucosiltransferasa). La presente invención proporciona una planta en la que la galactosidación es esencialmente natural tal como pasa en los mamíferos.

Si se deseara separar además las glicoproteínas que comprenden glicano unido por N extendido que carece de xilosa y/o de fucosa, o para producir éstas de una manera más purificada, se abren varias posibilidades. Para una, existen varios tipos de técnicas de separación, tales como purificación por (inmuno)afinidad o cromatografía por exclusión de tamaño o electroforesis, para regular la purificación requerida. Además, otra opción es utilizar como material de partida plantas en las que se extraen los genes responsables para la adición de xilosa y/o fucosa.

Una planta según la presente invención puede comprender genes que codifican sialil transferasas, enzimas que catalizan la adición de ácido siálico sobre el glicano, en sistemas vegetales, lo cual conduce a glicoproteínas incluso más estables durante una utilización *in vivo* y, por lo tanto, mejor adaptadas a una posible terapia.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona una planta según la presente invención en la que dicho glicano enlazador por N que comprende galactosa comprende además o se extiende con ácido glucorónico, glucoronil, sulfato, sulfato, fucosa u otro compuesto capaz de extender la galactosa con uniones a dicha galactosa. Esto es particularmente relevante, ya que los experimentos han mostrado que la ausencia de ácido siálico terminal en las cadenas laterales glicosídicas en general puede disminuir drásticamente la actividad biológica *in vivo*. Más probablemente, los receptores de asialo-glicoproteína en el hígado pueden unirse a asialo-glicoproteína, y provocar un aclarado de la glicoproteína de la circulación, que se refleja en una vida media metabólica reducida y una bioactividad *in vivo*.

baja. La presencia de, por ejemplo, GlcA u otro grupo de extensión, excepto ácido siálico, tiene el mismo efecto que la presencia de ácido siálico, dificulta la unión de una proteína modificada de esta manera al receptor de asialo-glicoproteína de, por ejemplo, células hepáticas, aumentando de este modo de manera eficaz la vida media y así el tiempo de aclaramiento, de dichas proteínas cuando se utilizan como sustancia terapéutica, es decir como composición farmacéutica.

La presente invención proporciona plantas que tienen la capacidad de producir glicanos unidos por N que contienen GlcA en sus proteínas. Para establecer esto, se expresa un gen que codifica, por ejemplo, glucuroniltransferasa (Tera-
yama *et al.*, PNAS 94:6093-6098, 1997) en plantas según la presente invención utilizando procedimientos conocidos en la técnica o descritos en la presente invención. La figura 6 muestra que las plantas del tabaco que expresan β 1,4-galactosiltransferasa humana y β 1,3-glucuroniltransferasa de rata a partir de la estructura deseada GlcA β 1, Gal en sus glicoproteínas tal como se muestra claramente mediante la unión de un anticuerpo específico (anticuerpo monoclonal 412 de ratón) a la estructura GlcA β 1, Gal.

La extensión de la galactosa con otros compuestos diferentes de ácido siálico también puede tener ventajas para la producción de proteínas recombinantes en plantas. Puede hacer que la glicoproteína o glicano de la glicoproteína sea más estable evitando que las galactosidasas y/u otras glicosidasas degraden el N-glicano. Mediante esta acción, se puede aumentar la galactosilación. También se puede utilizar en un procedimiento de purificación, por ejemplo, facilitando la purificación por afinidad mediante anticuerpos específicos, lectinas u otros compuestos. Si se desea el compuesto mediante el cual se extiende la galactosa o lo comprende adicionalmente se puede eliminar, después de la purificación de la glicoproteína recombinante, mediante, por ejemplo, una glicosidasa, sulfatasa, fosfatasa específica u otra enzima adecuada.

En general, la presente invención proporciona un procedimiento para una planta completa que exprese una β 1,4-galactosiltransferasa de mamífero y una glicoproteína funcional de mamífero que se expresa a partir de un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera del anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

La generación de plantas transformadas de forma estable que producen glicoproteínas a medida con un interés comercial se puede establecer mediante la inoculación de células o tejidos vegetales con cepas de *Agrobacterium* que contienen un vector (binario) que comprende tanto secuencias de nucleótidos que codifican una β 1,4-galactosiltransferasa de mamífero como genes que codifican una cadena pesada y ligera del anticuerpo o un fragmento funcional del mismo. Alternativamente, las plantas transformadas de forma estable que producen glicoproteínas a medida con interés comercial se pueden generar mediante inoculación simultánea (cotransformación) de dos o más cepas de *Agrobacterium*, transportando cada una un vector que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una β 1,4-galactosiltransferasa de mamífero o secuencias de nucleótidos que codifican una cadena pesada y ligera del anticuerpo o un fragmento funcional del mismo. En todos estos procedimientos, el vector también puede comprender una secuencia de nucleótidos que confiere resistencia contra un agente de selección. Con el fin de obtener de forma satisfactoria la expresión de las proteínas implicadas en la N-glicosilación y de las glicoproteínas o polipéptidos de interés comercial, las secuencias de nucleótidos se pueden adaptar a la transcripción y maquinaria de traducción específicas de la planta huésped tal como se conoce por los expertos en la materia. Por ejemplo, las mutaciones silenciosas en las regiones de codificación se pueden introducir para mejorar la utilización de codones y se pueden utilizar promotores específicos para dirigir la expresión de dichos genes en los tejidos vegetales pertinentes. Los promotores que se regulan mediante el desarrollo o que se pueden inducir a voluntad, se pueden utilizar para asegurar la expresión en el tiempo apropiado, por ejemplo, sólo después de que los tejidos vegetales hayan sido recolectados del campo y llevados a condiciones controladas. En todos estos casos, la elección de casetes de expresión de la β 1,4-galactosiltransferasa de mamífero y de la cadena pesada y ligera del anticuerpo o un fragmento funcional del mismo debería ser de manera que se expresen en las mismas células para permitir modificaciones posteriores a la traducción a dicha glicoproteína.

En la descripción detallada, la presente invención proporciona una planta tal como se define se ha definido anteriormente en la presente invención que comprende una planta del tabaco, o por lo menos una planta relacionada con el género *Nicotiana*, aunque también se proporciona particularmente la utilización para la presente invención de otras plantas relativamente fáciles de transformar, tales como *Arabidopsis thaliana*, o *Zea mays*, o plantas relacionadas con las mismas. Para la producción de glicoproteínas recombinantes, la utilización de lentejas de agua ofrece ventajas específicas. Las plantas son en general pequeñas y se reproducen asexualmente a través de un brote vegetativo. Sin embargo, la mayoría de especies de lentejas de agua tienen todos los tejidos y órganos de plantas mucho más grandes incluyendo raíces, tallos, flores, semillas y hojas. Las lentejas de agua se pueden desarrollar de manera barata y muy rápidamente como una planta de libre flotación en la superficie de soluciones líquidas simples desde las que se pueden recoger fácilmente. También se pueden desarrollar sobre aguas residuales ricas en nutrientes, produciendo productos valiosos a la vez que se limpian simultáneamente las aguas residuales para reutilizar de nuevo. De especial relevancia para aplicaciones farmacéuticas, la lenteja de agua se puede desarrollar en interior en condiciones contenidas y controladas. La lenteja de agua transformada de forma estable se puede regenerar, por ejemplo, a partir de tejidos o células después de la (co)-inoculación con cepas de *Agrobacterium* que contienen cada una un vector (binario) que comprende una o más secuencias de nucleótidos de interés que codifican enzimas modificadoras de la N-glicosilación y/o genes que codifican glicoproteínas heterólogas de interés comercial. La planta de lenteja de agua puede comprender, por ejemplo, el género *Spirodella*, el género *Wolffia*, el género *Wolffiella*, o el género *Lemna*, *Lemna* menor, *Lemna* minúscula y *Lemna gibba*.

La expresión en frutos de tomate también ofrece ventajas específicas. Los tomates también se pueden desarrollar fácilmente en invernaderos en condiciones contenidas y controladas y la biomasa del fruto de tomate se puede recoger de forma continua a lo largo del año en cantidades enormes. La fracción acuosa que contiene las glicoproteínas de

interés se puede separar fácilmente del resto del fruto de tomate, lo cual permite una purificación más sencilla de la glicoproteína. La expresión en órganos de almacenamiento de otras cosechas que incluyen, pero sin limitarse a, granos de maíz, los tubérculos de la patata y las semillas de colza o girasol también son alternativas atractivas que proporcionan una biomasa enorme en órganos para los que tiene lugar la tecnología de recolección y procesado.

La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para obtener un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que comprende, por ejemplo, un glicano unido por N extendido que comprende, por lo menos, galactosa, que comprende el cultivo de una planta según la presente invención hasta que dicha planta hay alcanzado una etapa de recolección, por ejemplo, cuando ha crecido suficiente biomasa para permitir una recolección provechosa, seguido de la recolección de dicha planta con técnicas establecidas conocidas en la técnica y el fraccionamiento de dicha planta con técnicas establecidas conocidas en la técnica para obtener el material de la planta fraccionado y por lo menos el aislamiento parcial de dicha cadena pesada y ligera de anticuerpo o fragmento funcional del mismo de dicho material de planta fraccionado. En la descripción detallada (ver, por ejemplo, la figura 4) se explica con detalle que se proporciona un anticuerpo al que se ha provisto de un glicano extendido unido por N que comprende por lo menos galactosa.

Los anticuerpos se pueden producir en plantas y se pueden disponer con patrones de glicosilación esencialmente de mamíferos. La expresión de dichas proteínas se puede llevar a cabo mediante la utilización de un procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, mediante la expresión estable mediante transformación, electroporación o bombardeo de partículas mediada por *Agrobacterium*, pero también mediante - la expresión transitoria utilizando un vector de virus como PVX u otro procedimiento, glicosiltransferasas u otra proteína que extiende la biosíntesis de glicanos, y/o dicha glicoproteína podría expresarse bajo el control de un promotor específico para facilitar la expresión en ciertos tejidos u órganos. La presente invención se explica con detalle en la descripción detallada sin limitarse a la misma.

Descripción detallada

Una enzima importante implicada en la biosíntesis de N-glicanos de mamíferos que no está presente en plantas es la β 1,4-galactosiltransferasa. En la presente, para una, se describe la expresión estable de β 1,4-galactosiltransferasa en plantas del tabaco. La fisiología de estas plantas no se cambia obviamente por la introducción de β 1,4-galactosiltransferasa y la característica es heredable. Los cruzamientos de una planta del tabaco que expresa β 1,4-galactosiltransferasa con una planta que expresa la cadena pesada y ligera de un anticuerpo de ratón producen un anticuerpo que tiene galactosa terminal en cantidades similares a anticuerpos producidos por hibridomas. En la presente invención, se muestra de esta manera que la enzima exógena se puede introducir de manera satisfactoria en plantas. Se observa un claro aumento en las glicoproteínas que contienen galactosa. Además, esta característica es heredable y no existe una diferencia fenotípica visible entre las plantas con galactosiltransferasa y las naturales. Un anticuerpo monoclonal de ratón producido en estas plantas tiene un grado de galactosas terminales comparable con el anticuerpo producido por el hibridoma. Esto demuestra que no sólo las proteínas endógenas se galactosilan, sino también una proteína de mamífero expresada de forma recombinante.

Materiales y procedimientos

Plásmidos y transformación de plantas

Se construyó vector de transformación de plantas que contiene β 1,4-galactosiltransferasa humana de la siguiente manera: se ligó un fragmento BamHI/XbaI de 1,4 kb de pcDNAI-GaIT (Aoki *et al.*, 1992; Yamaguchi y Fukuda, 1995) en los correspondientes sitios de pUC19. Posteriormente, este fragmento se aisló de nuevo utilizando sitios KpnI y HincII de alrededor y se clonó en el sitio KpnI y SmaI de pRAP33 (denominado pRAP33-HgaIT). Utilizando sitios AscI y PacI se clonó el cassette de promotor CaMV35S - ADNc - terminador Nos de pRAP33-HgaIT en el vector binario pBINPLUS (van Engelen *et al.*, 1995). Las modificaciones al protocolo publicado son: después de la incubación con *A. tum.*, se incubaron discos de hojas durante tres días en medio que contenía 1 mg/ml de NAA y 0,2 mg/ml de BAP y la utilización de 0,25 mg/ml de cefotaxima y vancomicina para inhibir el crecimiento bacteriano en el callo y medio inductor de brote. 25 brotes de raíz se transformaron de medio *in vitro* a tierra y, después de varias semanas, se analizó el material de hoja de estas plantas.

Transferencia Northern

El nivel de ARN de β 1,4-galactosiltransferasa en las plantas transgénicas se analizó mediante transferencia Northern (Sambrook *et al.*, 1989). Se aisló el ARN de las hojas de plantas transgénicas y de control tal como se ha descrito (De Vries *et al.*, 1991). Se utilizaron diez μ g de ARN total por muestra. La transferencia se sondó con un fragmento SstI/XhoI marcado con [32 P]dATP que contenía el ADNc de GaIT total, aislado de pBINPLUS-HgaIT.

Análisis de glicoproteínas

Los extractos totales de proteína del tabaco se prepararon moliendo hojas en nitrógeno líquido. El material molido se diluyó 10 veces en tampón de carga SDS-PAGE (20 mM de Tris-HCl, pH 6,8, glicerol al 6%, SDS al 0,4%, 20 mM de DTT, 2,5 μ g/ml de azul de bromofenol). Después de la incubación a 100°C durante 5 minutos, el material insoluble se granuló. Los sobrenadantes (12,5 μ l/muestra) se dejaron correr en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a nitrocelulosa. Las transferencias se bloquearon durante toda la noche en Tween-20 al 0,5% en TBS y se incubaron

durante 2 horas con RCA₁₂₀ (Ricinus Communis Agglutinin, Sigma) (1 µg/ml) conjugada con peroxidasa en TBS-0,1% de tween-20. Las transferencias se lavaron 4 veces durante 10 minutos en TBS-0,1% de tween-20 y se incubaron con sustrato de transferencia Western Lumi-light (Roche) y se analizaron en un analizador de luminiscencia (Roche). Un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra peroxidasa de rábano picante (HRP, Rockland Immunochemicals) se dividió en la reactividad contra la xilosa y fucosa de los glicanos complejos de la planta mediante cromatografía de afinidad con fosfolipasa de veneno de abeja según Faye *et al.*, 1993. Se preparó un anticuerpo anti Lewis A de conejo tal como se ha descrito (Fitchette Laine *et al.*, 1997). Las transferencias se bloquearon con polvo de leche al 2% en TBS y se incubó en el mismo tampón con anti-HRP, anti-xilosa, anti-fucosa o anti-Lewis-A. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con HRP alcalino y la detección se realizó tal como se ha descrito anteriormente.

Entrecruzamientos de plantas

Mgr48 (Smant *et al.*, 1997) es una IgG monoclonal de ratón que se ha expresado en plantas del tabaco. La construcción utilizada para la transformación era idéntica al anticuerpo monoclonal 21C5 expresado en el tabaco (van Engelen *et al.*, 1994). Las flores de plantas de tabaco seleccionadas con una expresión elevada de β1,4-galactosiltransferasa se polinizaron con plantas que expresan el anticuerpo Mgr48. La generación F1 se sembró y se criaron las plantas para la expresión en las hojas del anticuerpo mediante transferencias western sondadas con anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con HRP y para la expresión de galactosiltransferasa mediante RCA tal y como se ha descrito anteriormente.

Purificación de IgG de tabaco

Se molieron en nitrógeno líquido hojas de tabaco recién recolectadas. A 50 g de material de planta en polvo, se añadieron 250 ml de PBS que contiene 10 mM de Na₂S₂O₅, 0,5 mM de EDTA, 0,5 mM de PMSF y 5 g de polivinilpolipirrolidona. Después de remojarlo durante 1 hora (girando a 4°C), se extrajo el material insoluble mediante centrifugación (15 minutos, 15.000 g, 4°C). El sobrenadante se incubó durante toda la noche girando a 4°C con 1 ml de partículas de proteína G-agarosa. Las partículas se recogieron en una columna y se lavaron con 10 volúmenes de PBS. La proteína unida se eluyó con glicina 0,1 mM a pH 2,7 e inmediatamente se llevó a pH neutro mediante el mezclado con 1 M de Tris pH 9,0 (50 µl por ml de eluato). El anticuerpo purificado se cuantificó mediante la comparación de la unión de anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con HRP a la cadena pesada en una transferencia western con Mgr48 de concentración conocida purificado del medio de hibridoma (Smant *et al.*, 1997).

El Mgr48 de hibridoma y Mgr48 producido por la planta se dejaron correr en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron tal y como se ha descrito anteriormente. La detección con RCA fue tal y como se ha descrito anteriormente. Para la detección de anticuerpos, las transferencias se sondaron con anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con HRP y se detectaron con sustrato de transferencia Western Lumi-light tal y como se ha descrito anteriormente.

Resultados

La β1,4-galactosiltransferasa humana galactosila proteínas endógenas en Nicotiana tobacum

Se introdujo la β1,4-galactosiltransferasa humana (Masri *et al.*, 1988) en plantas de tabaco mediante la transformación de discos de hojas mediada por Agrobacterium del plásmido pBINPLUS-HgalT que contenía un ADNc que incluye una secuencia de codificación completa. Se analizaron los niveles de ARNm de veinticinco plantas seleccionadas por la resistencia a kanamicina mediante hibridación northern (figura 2A). Las mismas plantas se analizaron mediante la unión de lectina RCA₁₂₀ (*Ricinus Communis Agglutinin*) a galactosa. El RCA se une al producto de reacción de β1,4-GalT (Galβ1, 4GlcNAc), pero también a otros residuos de galactosa unidos por el extremo terminal β. El RCA se une a una o más proteínas de peso molecular elevado aisladas de plantas del tabaco transgénicas de control (B). Probablemente, éstas son proteínas de Arabinogalactano o similares. Se sabe que el RCA se une a proteínas de Arabinogalactano (Schindler *et al.*, 1995). Además, en una serie de plantas transformadas con β1,4-galactosiltransferasa se observa la unión de RCA a una extensión de proteínas. Esto indica que en estas plantas muchas proteínas contienen residuos de galactosa unidos por el extremo terminal β. Existe una buena correlación entre el nivel de expresión de ARN de β-galactosiltransferasa y la reactividad de RCA de las plantas transgénicas. La β1,4-galactosiltransferasa humana expresada en plantas transgénicas es capaz por lo tanto de galactosilar glicoproteínas endógenas en plantas del tabaco.

Como se sabe que los N-glicanos galactosilados son aceptores pobres para xilosil- y fucosiltransferasa de plantas (Jonson y Chrispeels, 1987), se investigó la influencia de la expresión de la β1,4-galactosiltransferasa en la aparición del epítipo de xilosa y fucosa mediante anticuerpos específicos. Un anticuerpo policlonal de conejo anti-HRP que reacciona con el epítipo tanto de xilosa como de fucosa muestra una clara diferencia en la unión a proteína aislada de las plantas tanto de control como transgénicas (figura 3).

El anticuerpo producido de forma recombinante se galactosila de forma eficaz

Se investigó el efecto de la expresión de β1,4-galactosiltransferasa en una proteína expresada de forma recombinante. Se seleccionaron tres plantas de tabaco que expresan β1,4-galactosiltransferasa (no. GalT6, GalT8 y GalT15 de la figura 2) para cruzarse con una planta del tabaco que expresa un anticuerpo monoclonal de ratón. Esta planta,

que expresa mgr48 monoclonal (Smant *et al.*, 1997), se generó previamente en nuestro laboratorio. Se polinizaron flores de las tres plantas con mgr48. De la generación F1 se analizó en 12 plantas por progenie de cada cruzamiento la expresión de tanto el anticuerpo como la β 1,4-galactosiltransferasa mediante el procedimiento descrito en materiales y procedimientos. De los cruzamientos GalT6xmgr48 y GalT15xmgr48 no se encontraron plantas con la expresión de mgr48 y GalT. Se encontraron varias en el cruzamiento GalT8xmgr48. Se seleccionaron dos de estas plantas (no. 11 y 12) para un análisis posterior.

Utilizando la afinidad de proteína G, el anticuerpo se aisló de las plantas del tabaco que expresaban mgr48 y de las dos plantas seleccionadas que expresaban tanto mgr48 como β 1,4-galactosiltransferasa. Se dejaron correr cantidades iguales de anticuerpo aislado en un gel de proteínas y se transfirieron. Se comparó la unión de IgG de oveja anti-ratón y RCA a mgr48 de células de hibridoma, tabaco y entrecruzamientos GalT8xmgr48-11 y 12 (figura 4). La IgG de oveja anti-ratón se unió a la cadena tanto pesada como ligera de los cuatro anticuerpos aislados. El RCA, en cambio, se unió a anticuerpo producido por hibridoma y planta GalT, pero no al anticuerpo producido en plantas que expresan sólo mgr48. Cuando la unión de IgG de oveja anti-ratón y RCA a la cadena pesada del anticuerpo se cuantifica, la reacción relativa de RCA (unión de RCA/unión de IgG de oveja anti-ratón) a GalT8xmgr48-11 y 12 es respectivamente 1,27 y 1,63 veces más elevada que la proporción de anticuerpo producido por el hibridoma. Esto muestra que la unión de RCA a los glicanos del anticuerpo producido en plantas GalT es incluso más elevada que el anticuerpo producido por el hibridoma. Aunque la mgr48 de galactosilación del hibridoma no se cuantifica, esto una firme indicación de que la galactosilación del anticuerpo producido en estas plantas es muy eficiente.

Construcción de vectores de expresión de plantas con ADNc que codifica una 2,6-sialil transferasa, β -1,3-glucuronil-transferasa y β 1,4-galactosiltransferasa

El vector de β 1,4-galactosiltransferasa disponible no estaba en el formato adecuado para combinarse fácilmente con clones de α 2,6-sialiltransferasa y β 1,3-glucuroniltransferasa. Por lo tanto, utilizando PCR, se ha clonado la región codificante del ADNc de β 1,4-galactosiltransferasa, ADNc de α 2,6-sialiltransferasa y ADNc de β 1,3-glucuroniltransferasa en vectores de expresión de plantas. Las construcciones se realizan de forma que la galactosiltransferasa se combina con sialiltransferasa o bien glucuroniltransferasa en un vector con el fin de permitir la expresión simultánea de las enzimas en plantas transgénicas después de sólo una transformación. La expresión de la galactosiltransferasa está controlada por el promotor 35S, mientras que la expresión de sialiltransferasa y glucuroniltransferasa está controlada por el promotor 2'.

Existe la necesidad de una fuente accesible y normalizada de FSH para fines terapéuticos y de diagnóstico, que garantice que está libre de actividad de LH.

Las preparaciones de FSH se derivan normalmente de pituitarias ovinas o porcinas, que siempre supone la presencia de (trazas de) LH, y el riesgo de contaminación con proteínas de tipo prión. La sustitución de FSH derivado de cerebro por FSH recombinante producido por plantas puede ser un buen procedimiento de eliminación de estos problemas. Sin embargo, la producción de glicoproteínas animales bioactivas en plantas, especialmente con fines terapéuticos, requiere la modificación de cadenas laterales de azúcares específicas de plantas en glicanos de tipo mamífero. La presente invención proporciona bFSH recombinante mediante la infección de plantas del tabaco transformadas de forma estable capaces de formar glicanos de tipo mamífero con el Virus del Mosaico del Tabaco TMV recombinante que contiene los genes para bFSH o bFSHR.

Construcción de bFSH de cadena única (sc) en vector bluescript pKS(+), construcción de sc-bFSH-TMV y sc-bFSH-HIS-TMV

Con el fin de superar la necesidad de la expresión simultánea de los dos genes separados de subunidades bFSH-alfa y bFSH-beta en plantas, se decidió construir un gen de fusión bFSH.

Mediante PCR con solapamiento se fusionó el extremo carboxilo de la subunidad beta al extremo amino de la subunidad alfa (sin enlazador). Además, se construyó una segunda versión de sc-bFSH que portaba una etiqueta 6x HIS en el extremo C-terminal de la subunidad alfa, que permitirá purificar la proteína recombinante de la planta. Se subclonaron las construcciones sc-bFHS y sc-bFSH-HIS en el vector de clonación bluescript pKS(+). La corrección de los clones se confirmó mediante el análisis de secuencia.

Se subclonó sc-bFSH en el vector de TMV. Se eligieron dos clones positivos para realizar transcritos *in vitro* e inocular plantas *N. Bentahmiana*. Después de unos días, las plantas mostraron síntomas típicos de infección vírica, que sugerían la capacidad infectiva de los clones de TMV recombinantes. Con el fin de ensayar si el ARN de sc-bFSH se expresa de forma estable en hojas infectadas de forma sistémica, 8 días después de la inoculación, se aisló el ARN de las hojas de *N. Bentahmiana* infectadas y se realizaron reacciones en cadena de la transcriptasa inversa-polimerasa utilizando cebadores específicos de bFSH. En todos los casos se obtuvo un fragmento de PCR del tamaño esperado, indicando la estabilidad de la construcción Sc-bFSH-TMV. Los extractos de plantas infectadas se utilizan para análisis de transferencia Western y ELISA para determinar si sc-bFSH se expresa y se plega de forma adecuada.

Abreviaturas utilizadas

GlcNAc, N-Acetilglucosamina; Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalT, β 1,4-galactosiltransferasa; RCA, *Ricinus Communis* Agglutinin;

Tablas

TABLA 1

Enzimas del mecanismo de biosíntesis de ácido siálico

No	Enzima	Reacción catalizada	localización	origen
1	GlcNAc-2 epimerasa	GlcNAc $\leftrightarrow$ ManNAc	Citoplasma	Cerdo
2	NeuAc sintasa	ManNAc + PEP $\leftrightarrow$ NeuAc	Citoplasma	Clostridium
3	CMP-NeuAc sintetasa	NeuAc + CMP $\rightarrow$ CMP-NeuAc	Núcleo	Ratón
4	CMP-NeuAc transportador	Citoplasma $\rightarrow$ lumen de Golgi	Membrana de Golgi	Ratón
5	NeuAc transferasa	CMP-NeuAc + Gal-R $\rightarrow$ NeuAc-Gal-R + CMP	Golgi	Humano
	Gal transferasa	UDP-Gal + GlcNAc-R $\rightarrow$ Gal-GlcNAc-R + UDP	Golgi	humano

Leyendas de las figuras

Figura 1

Principales diferencias entre glicanos complejos unidos por N de mamíferos y plantas. Se encuentran dibujados glicanos unidos por N típicos. Aparecen numerosas variaciones, tanto por extensión como truncamiento, en mamíferos y plantas.

Figura 2

Comparación de los niveles de ARN y el producto de β 1,4-galactosiltransferasa. Parte superior: transferencia Northern del ARN total aislado de 25 plantas transgénicas, incluyendo una planta de control no transformada (0), detectada con una sonda de β 1,4-galactosiltransferasa humana. Parte inferior: transferencia western de la misma planta sondada con RCA para detectar residuos de galactosa terminales en glicoproteínas. M. indica el marcador de peso molecular.

Figura 3

Transferencia western que muestra la unión de lectina y anticuerpo a proteína aislada de una planta natural (WT) y con β 1,4-galactosiltransferasa (no. 8 de la figura 2). A: RCA como en la figura 2, B: anticuerpo anti HRP (que detecta tanto xilosa como fucosa), C: anticuerpo anti xilosa, D: anticuerpo anti fucosa.

Figura 4

Transferencia western que muestra la unión de RCA e IgG de oveja anti-ratón a anticuerpo purificado producido en un cultivo de hibridomas (Hyb), plantas del tabaco (planta) y plantas del tabaco que coexpresan β 1,4-galactosiltransferasa (GalT11 y GalT12). H.C.: cadena pesada, L.C.: cadena ligera.

Figura 5

Cultivos de células del tabaco que expresan galactosiltransferasa producen N-glicanos híbridos no naturales, mientras que las plantas del tabaco que expresan galactosiltransferasa tienen una galactosilación natural de tipo mamífero. Para obtener una galactosilación natural, la galactosiltransferasa debería actuar después de la manosidasa II y la GlcNAc Transferasa II.

Figura 6

Transferencia western que muestra la expresión de la estructura GlcA β 1,3Gal en tabaco transgénico mediante la unión de un anticuerpo (412) dirigido contra la estructura ácido glucurónico-galactosa (GlcA β 1,3Gal) a la proteína aislada de 8 plantas que expresan la β 1,4-galactosiltransferasa humana y la β 1,3-glucuroniltransferasa de rata y una planta de control natural (-).

Referencias

- 10 **Aoki, D., Lee, N., Yamaguchi, N., Dubois, C., y Fukuda, M. N. (1992).** Golgi retention of a trans-Golgi membrane protein, galactosyltransferase, requires cysteine and histidine residues within the membrane-anchoring domain. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 89, 4319-4323.
- 15 **Asano, M., Furukawa, K., Kido, M., Matsumoto, S., Umesaki, Y., Kochibe, N., y Iwakura, Y. (1997).** Growth retardation and early death of beta- 1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *Embo j* 16, 1850-7.
- 20 **Boyd, P.N., Lines A.C., y Patel A.K. (1995).** The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Mol immunol* 32, 1311-8.
- 25 **Cabanes Macheteau, M., Fichette Laine, A.C., Loutelier Bourhis, C., Lange, C., Vine, N.D., Ma, J.K., Lerouge, P., y Faye, L. (1999).** N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology* 9, 365-72.
- 30 **De Vries, S., Hoge, H., y Bisseling, T. (1991).** Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In *Plant Molecular Biology Manual*, B. Gelvin, R.A. Schilperoort and D.P.S. Verma, eds. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), páginas B6/1-13.
- 35 **Dieryck, W., Pagnier J., Poyart, C., Marden, M.C., Gruber, V., Bournat, P., Baudino, S., y Merot, B. (1997).** Human haemoglobin from transgenic tobacco [letter] *Nature* 386, 29-30.
- 40 **Faye, L., Gomord, V., Fichette Laine, A.C. y Chrispeels, M.J. (1993).** Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing alpha 1 $\rightarrow$ 3 fucose or beta 1 $\rightarrow$ 2 xylose. *Anal Biochem* 209, 104-8.
- 45 **Fichette Laine, A.C., Gomord, V., Cabanes, M., Michalski, J.C., Saint Macary, M., Foucher, B., Cavellier, B., Hawes, C., Lerouge, P., y Faye, L. (1997).** N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. *Plant J* 12, 1411-7.
- 50 **Florack, D., Allefs, S., Bollen, R., Bosch, D., Visser, B., y Stiekema, W. (1995).** Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco. *Transgenic Research* 4, 132-141.
- 55 **Herman, T., y Horvitz, H.R. (1999).** Three proteins involved in *Caenorhabditis elegans* vulval invagination are similar to components of a glycosylation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 979-9.
- 60 **Hollister, J.R., Shaper, J.H. y Jarvis, D.L. (1998).** Stable expression of mammalian beta, 1,4-galactosyltransferase extends the N-glycosylation pathway in insect cells. *Glycobiology* 8, 473-80.
- 65 **Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., y Fraley, R.T. (1985).** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science, USA* 227, 1229-1231.
- Ioffe, E., y Stanley, P. (1994).** Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 728-32.
- Jarvis, D.L., y Finn, E.E. (1996).** Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. *Nat Biotechnol* 14, 1288-92.
- Jenkins, N. Parekh, R.B., y James D.C. (1996).** Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* 14, 975-81.
- Johnson, K.D., y Chrispeels, M.J. (1987).** Substrate specificities of N-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledons. *Plant Physiology* 84, 1301-1308.
- Lerouge, P., Cabanes Macheteau, M., Rayon, C., Fichette Laine, A.C., Gomord, V. y Faye, L. (1998).** N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol* 38, 31-48.
- Ma, J.K., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N.D., Wang, F., Stabila, P., van Dolleweerd, C., Mostov, K. y Lehner, T. (1995).** Generation and assembly of secretory antibodies in plants [ver comentarios.] *Science* 268, 716-9.

- Masri, K.A., Appert, H.E., y Fukuda, M.N. (1988).** Identification of the full-length coding sequence for human galactosyltransferase (beta-N-acetylglucosaminide: beta 1,4-galactosyltransferase). *Biochem Biophys Res Commun* 157, 657-63.
- 5 **Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M., y Sasaki, R. (1163).** Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Molecular Biology* 27, 1163-1172.
- Melo, N.S., Nimtz, M., Conradt, H.S., Fevereiro, P.S., y Costa, J. (1997).** Identification of the human Lewis (a) carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium myrtillus* L.). *FEBS Lett* 10 415, 186-91.
- Palacpac, N.Q., Kimura, Y., Fuijyama, K., Yoshida, T., y Seki, T. (1999).** Structures of N-linked oligosaccharides of glycoproteins from tobacco BY2 suspension cultured cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 35-9.
- 15 **Palacpac, N.Q., Yoshida, S., Sakai, H., Kimura, Y., Fuijyama, K., Yoshida, T., y Seki, T. (1999).** Stable expression of human beta 1,4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 4692-7.
- Rayon, C., Cabanes Macheteau, M., Loutelier Bourhis, C., Salliot Maire, I., Lemoine, J., Reiter, W.D. Lerouge, P., y Faye, L. (1999).** Characterization of N-glycans from Arabidopsis. Application to a fucose-deficient mutant. *Plant Physiol* 119, 725-34.
- 20 **Saito, K., Noji, M. Ohmori, S., Imai, Y., y Murakoshi, I. (1991).** Integration and expression of a rabbit liver cytochrome P-450 gene in transgenic *Nicotiana tabacum*. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 88, 7041-7045.
- 25 **Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press).
- 30 **Schachter, H. (1991).** The "yellow brick road" to branched complex N-glycans. *Glycobiology* 1, 453-61.
- Schindler, T., Bergfeld, R., y Schopfer, P. (1995).** Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *Plant JU* 7, 25-36.
- 35 **Schaper, N.L., Shaper, J.H., Meuth, J.L., Fox, J.L., Chang, H., Kirsch, I.R. y Hollis, G.F. (1986).** Bovine galactosyltransferase: identification of a clone by direct immunological screening of a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 1573-7.
- 40 **Smant, G., Goverse, A., Stokkermans, J.P.W.G., De Boer, J.M., Pomp, H., Zilverentant, J.F. Overmars, H.A. Helder, J., Schots, A. y Baaker, J. (1997)** Potato root diffusate-induced secretion of soluble, basic proteins originating from the subventral esophageal glands of potato cyst nematodes. *Phytopathology* 87, 839-845.
- Stanley, P., y Ioffe, E. (199).** Glycosyltransferase mutants: key to new insights in glycobiology. *Faseb j* 9, 1436-44.
- 45 **Stanley, P., Raju, T.S., y Bhaumik, M. (1996).** CHO cells provide access to novel N-glycans and developmentally regulated glycosyltransferases. *Glycobiology* 6, 695-9.
- Thanavala, Y., Yang, Y.F., Lyons, P., Mason, H.S., y Arntzen, C. (1995).** Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 3358-3361.
- 50 **van Engelen, F.A., Molthoff, J.W., Conner, A.J., Nap, J.P., Pereira, A., y Stiekema, W.J. (1995).** pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Res* 4, 288-90.
- 55 **van Engelen, F.A., Schouten, A., Molthoff, J.W., Roosein, J. Salinas, J., Dirkse, W.G., Schots, A., Bakker, J., Gommers, F.J., Jongsmma, M.A., y et al. (1994).** Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. *Plant Mol Biol.* 26, 1701-10.
- 60 **von Schaewen, A., Sturm, A., O'Neill, J., y Chrispeels, M.J. (1993)** Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks N-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans. *Plant Physiol* 102, 1109-18.
- Yamaguchi, N., y Fukuda, M.N. (1995).** Golgi retention mechanism of beta-1,4-galactosyltransferase. Membrane-spanning domain-dependent homodimerization and association with alpha- and beta-tubulins. *J Biol Chem* 270, 12170-6.
- 65

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes descarta cualquier responsabilidad al respecto.

Referencias que no son patentes citadas en la descripción

- 10 • **TERAYAMA** *et al.* *PNAS*, 1997, vol. 94, 6093-6098 [0013]
- Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, vol. 89, 4319-4323
- *Embo j*, vol. 16, 1850-7 [0046]
- 15 • *Mol immunol*, vol. 32, 1311-8 [0046]
- *Glycobiology*, vol. 9, 365-72 [0046]
- 20 • *Nature*, vol. 386, 29-30 [0046]
- *Anal Biochem*, vol. 209, 104-8 [0046]
- *Plant J*, vol. 12, 1411-7 [0046]
- 25 • *Transgenic Research*, vol. 4, 132-141 [0046]
- *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 96, 979-9 [0046]
- 30 • *Glycobiology*, vol. 8, 473-80 [0046]
- *Science*, vol. 227, 1229-1231 [0046]
- *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 91, 728-32 [0046]
- 35 • *Nat Biotechnol*, vol. 14, 1288-92 [0046]
- *Nat Biotechnol*, vol. 14, 975-81 [0046]
- 40 • *Plant Physiology*, vol. 84, 1301-1308 [0046]
- *Plant Mol Biol*, vol. 38, 31-48 [0046]
- *Science*, vol. 268, 716-9 [0046]
- 45 • *Biochem*, vol. 157, 657-63 [0046]
- *Plant Molecular Biology*, vol. 27, 1163-1172 [0046]
- 50 • *FEBS Lett*, vol. 415, 186-91 [0046]
- *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 63, 35-9 [0046]
- *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 96, 4692-7 [0046]
- 55 • *Plant Physiol*, vol. 119, 725-34 [0046]
- **SAITO, K.; NOJI, M.; HMORI, S.; IMAI, Y.; MURAKOSHI, I.** Integration and expression of a rabbit liver cytochrome P-450 gene in transgenic *Nicotiana tabacum*. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 1991, vol. 88, 7041-7045 [0046]
- 60 • **SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Lab. Press*, 1989 [0046]
- 65 • **SCHACHTER, H.** The "yellow brick road" to branched complex N-glycans. *Glycobiology*, 1991, vol. 1, 453-61

• **SCHINDLER, T.; BERGFELD, R.; SCHOPFER, P.** Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *Plant JU*, 1995, vol. 7, 25-36 [0046]

5 • **SCHAPER, N.L.; SHAPER, J.H.; MEUTH, J.L.; FOX, J.L.; CHANG, H.; KIRSCH, I.R.; HOLLIS, G.F.** Bovine galactosyltransferase: identification of a clone by direct immunological screening of a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, vol. 83, 1573-7 [0046]

10 • **SMANT, G.; GOVERSE, A.; STOKKERMANS, J.P.W.G.; DE BOER, J.M.; POMP, H.; ZILVERENTANT, J.F.; OVERMARS, H.A.; HELDER, J.; SCHOTS, A.; BAAKER, J.** Potato root diffusate-induced secretion of soluble, basic proteins originating from the subventral esophageal glands of potato cyst nematodes. *Phytopathology*, 1997, vol. 87, 839-845 [0046]

15 • **STANLEY, P.; LOFFE, E.** Glycosyltransferase mutants: key to new insights in glycobiology. *Faseb j*, 1995, vol. 9, 1436-44 [0046]

• **STANLEY, P.; RAJU, T.S.; BHAUMIK, M.** CHO cells provide access to novel N-glycans and developmentally regulated glycosyltransferases. *Glycobiology*, 1996, vol. 6, 695-9 [0046]

20 • **THANAVALA, Y.; YANG, Y.F.; LYONS, P.; MASON, H.S.; ARNTZEN, C.** Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, vol. 92, 3358-3361 [0046]

25 • **VAN ENGELEN, F.A.; MOLTHOFF, J.W.; CONNER, A.J.; NAP, J.P.; PEREIRA, A.; STIEKEMA, W.J.** pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Res*, 1995, vol. 4, 288-90 [0046]

30 • **VAN ENGELEN, F.A.; SCHOUTEN, A.; MOLTHOFF, J.W.; ROOSEIN, J.; SALINAS, J.; DIRKSE, W.G.; SCHOTS, A.; BAKKER, J.; GOMMERS, F.J.; JONGSMA, M.A. et al.** Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. *Plant Mol Biol.*, 1994, vol. 26, 1701-10

35 • **VON SCHAEWEN, A.; STURM, A.; O'NEILL, J.; CHRISPEELS, M.J.** Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks N-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans. *Plant Physiol*, 1993, vol. 102, 1109-18 [0046]

• **YAMAGUCHI, N.; FUKUDA, M.N.** Golgi retention mechanism of beta-1,4-galactosyltransferase. Membrane-spanning domain-dependent homodimerization and association with alpha- and beta-tubulins. *J Biol Chem*, 1995, vol. 270, 12170-6 [0046]

REIVINDICACIONES

1. Planta que comprende

- (a) una proteína funcional que proporciona la biosíntesis de N-glicanos, en la que la proteína es una β 1,4-galactosiltransferasa de mamífero; y
- (b) una segunda proteína de mamífero; en la que la segunda proteína de mamífero comprende un glicano galactosilado unido por N y se expresa a partir de un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera de anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

2. Planta según la reivindicación 1, en la que el glicano galactosilado unido por N sólo se extiende con galactosa.

3. Planta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el glicano galactosilado unido por N carece esencialmente de residuos de xilosa.

4. Planta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el glicano galactosilado unido por N carece esencialmente de residuos de fucosa.

5. Planta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una sialil transferasa.

6. Planta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el glicano galactosilado unido por N comprende ácido glucorónico o glucoronilo.

7. Célula vegetal que expresa una β 1,4-galactosiltransferasa de mamífero y un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera de anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, en la que la célula vegetal es capaz de generar una planta completa transformada de forma estable.

8. Célula según la reivindicación 7, que comprende además una sialil transferasa.

9. Célula según la reivindicación 7, que comprende además una glucoronil transferasa.

10. Planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que la β 1,4-galactosiltransferasa de mamífero es una β 1,4-galactosiltransferasa humana.

11. Planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que el gen responsable para la adición de xilosa está extraído.

12. Planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que el gen responsable para la adición de fucosa está extraído.

13. Planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la planta pertenece o bien la célula deriva de una planta que pertenece a la especie seleccionada del grupo que consiste en *Nicotiana*, *Spirodella*, *Wolffia*, *Wolffiella* y *Lemna*.

14. Planta o célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la planta pertenece o bien la célula deriva de una planta que pertenece a la especie seleccionada del grupo que consiste en tabaco, *Arabidopsis thaliana*, maíz, lenteja de agua, patata y tomate.

15. Procedimiento para la producción de una planta completa que expresa una β 1,4-galactosiltransferasa de mamífero y una glicoproteína de mamífero funcional que comprende la etapa de inocular células o tejidos vegetales con:

- (a) una cepa de *Agrobacterium* que contiene un vector que comprende tanto secuencias de nucleótidos que codifican una β 1,4-galactosiltransferasa como un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera de anticuerpo o un fragmento funcional del mismo; o bien,
- (b) una primera cepa de *Agrobacterium* que contiene un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una β 1,4-galactosiltransferasa y una segunda cepa de *Agrobacterium* que contiene un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera de anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

16. Procedimiento para obtener un anticuerpo que comprende un glicano galactosilado unido por N, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) recolectar las plantas tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 ó 10-14, que producen un anticuerpo que comprende un glicano galactosilado unido por N.

ES 2 288 882 T3

(b) fraccionamiento del material recolectado; y

(c) aislamiento de cadena pesada y ligera de anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que comprende el glicano galactosilado unido por N.

5

17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la planta es una planta de tabaco.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

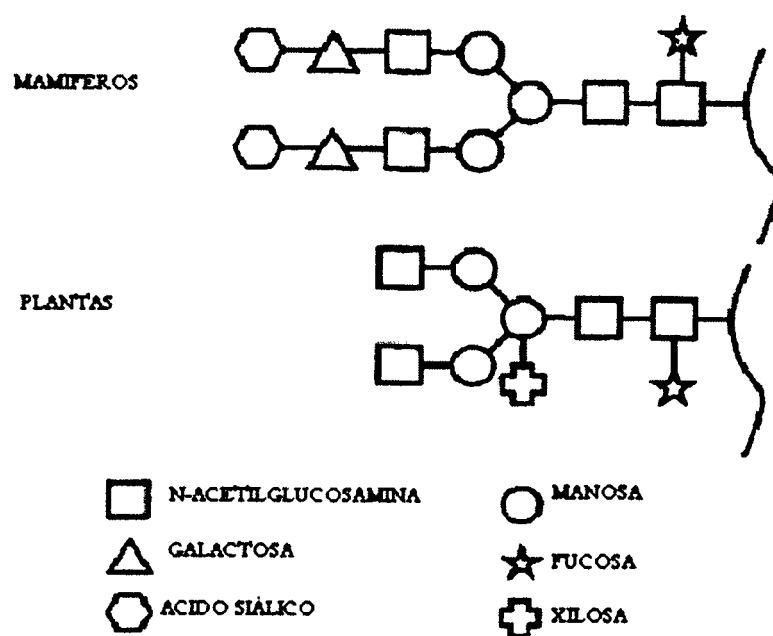


Fig. 1

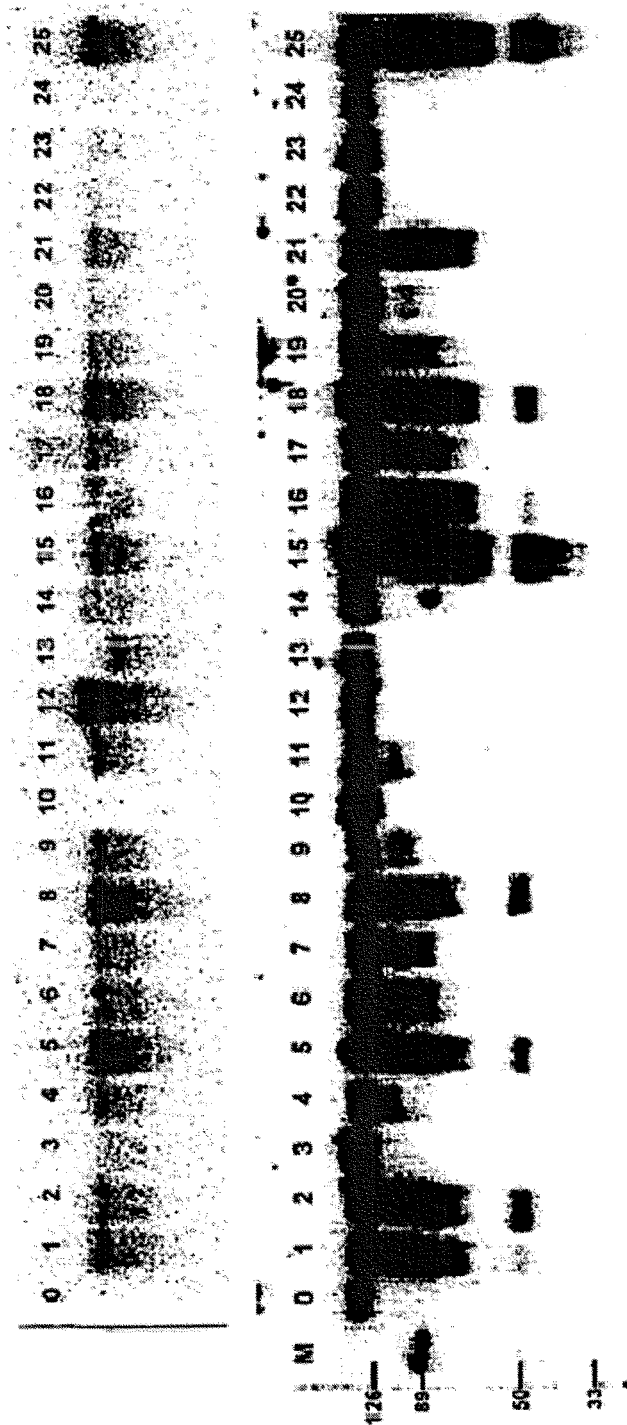


Figura 2. Comparación de los niveles de ARN y el producto de B1, 4-galactosiltransferasa. Parte superior: Transfencia Northern del ARN total aislado de 25 plantas transgénicas, incluyendo una planta de control no transformada (0), detectada con una sonda de B1, 4-galactosiltransferasa humana. Parte inferior: Transfencia Western de las mismas plantas sonadas con RCA para detectar residuos de galactosa terminales en glicoproteínas. M indica el marcador de peso molecular.

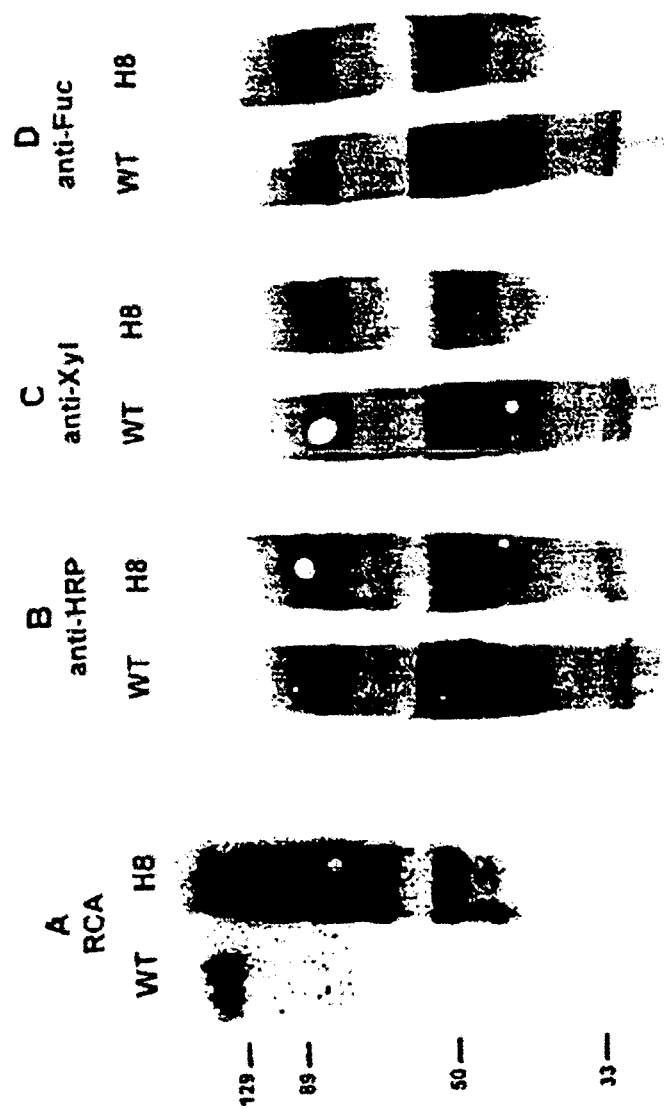


FIGURA 3. TRANSFERENCIA WESTERN QUE MUESTRA LA UNIÓN DE LECTINA Y ANTICUERPO A PROTEÍNA AISLADA DE UNA PLANTA NATURAL (WT) Y CON B1,4-GALACTOSILTRANSFERASA (NO. 8 DE LA FIGURA 2). A. RCA COMO EN LA FIGURA 2. B. ANTICUERPO ANTI-HRP (QUE DETECTA XILOSA Y FUCOSA). C. ANTICUERPO ANTI XILOSA. D. ANTICUERPO ANTI FUCOSA

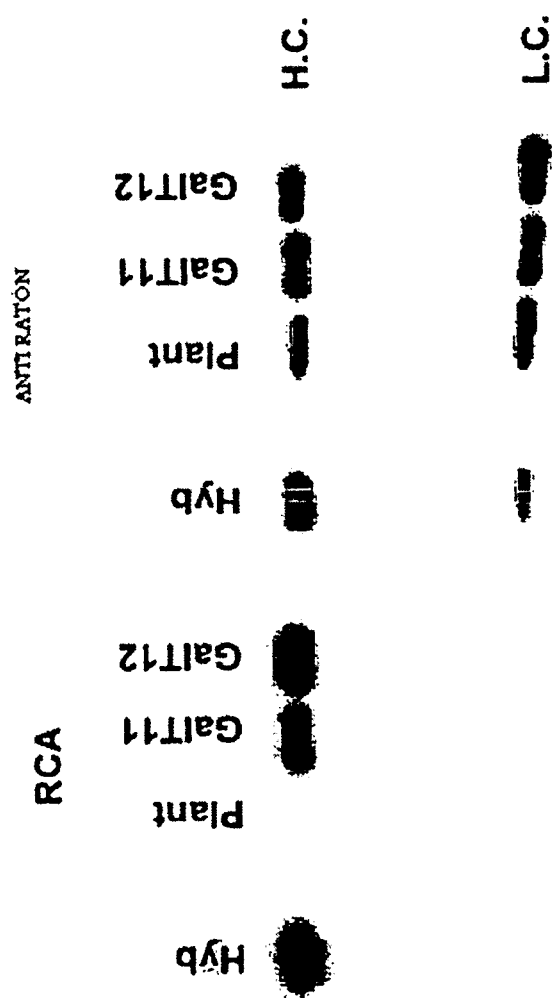


FIGURA 4. TRANSFERENCIA WESTERN QUE MUESTRA LA UNIÓN DE RCA E IgG DE OVEJA ANTI-RATÓN A ANTICUERPO PURIFICADO PRODUCIDO EN UN CULTIVO DE HIBRIDOMAS (Hyb), PLANTAS DEL TABACO (PLANTA) Y PLANTAS DEL TABACO QUE CO-EXPRESAN LA B1, 4-GALACTOSILTRANSFERASA (GaIT11 y GaIT12). H.C., CADENA PESADA, L.C. CADENA LIGERA

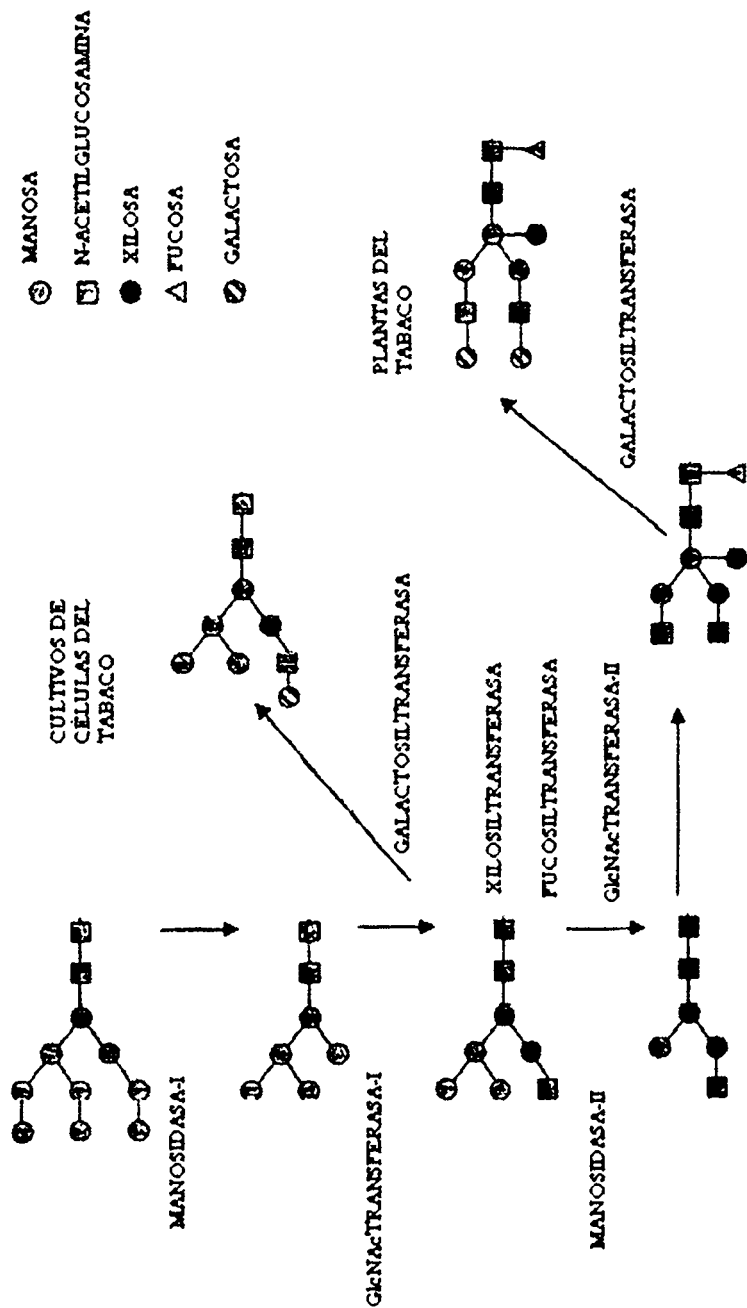


FIGURA 1. LOS CULTIVOS DE CÉLULAS DEL TABACO QUE EXPRESAN GALACTOSILTRANSFERASA PRODUCEN N-GLICANOS HÍBRIDOS NO NATURALES MIENTRAS QUE PLANTAS DEL TABACO QUE EXPRESAN GALACTOSILTRANSFERASA TIENEN UNA GALACTOSILACIÓN NATURAL DE TIPO MAMÍFERO. PARA OBTENER UNA GALACTOSILACIÓN NATURAL, LA GALACTOSILTRANSFERASA DEBERÍA ACTUAR DESPUÉS DE LA MANOSIDASA II Y LA GENACTRANSFERASA II.

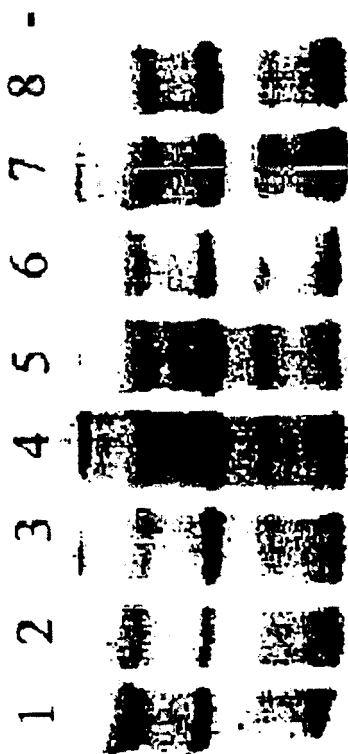


FIGURA 6. TRANSFERENCIA WESTERN QUE MUESTRA LA EXPRESIÓN DE LA ESTRUCTURA GcAB1, 3GcI EN TABACO TRANSGENICO MEDIANTE LA UNIÓN DE UN ANTICUERPO (412) DIRIGIDO CONTRA LA ESTRUCTURA ÁCIDO GLUCURÓNICO-GALACTOSA (GcAB1, 3GcI) A PROTEINA AISLADA DE 8 PLANTAS QUE EXPRESAN LA B1, 4 GALACTOSILTRANSFERASA HUMANA Y LA B1, 3 GLUCURONILTRANSFERASA DE RATA Y UNA PLANTA DE CONTROL NATURAL (3)