



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 861**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99926204 .1**
96 Fecha de presentación : **21.06.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1090133**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2001**

54 Título: **Producción de IL-10 en biorreactor de planta de cultivo no alimenticia.**

30 Prioridad: **22.06.1998 US 102050**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2010

73 Titular/es: **HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF CANADA as represented by the Minister of Agriculture and Agri-Food Pest Management Research Centre 1391 Sanford Street London, Ontario N5V 4T3, CA Queen's University, The John P. Robarts Research Institute y London Health Sciences Center**

72 Inventor/es: **Brandle, Jim; Davies, Peter, L.; Kenward, Kimberley, D.; Menassa, Rima; Jevnikar, Tony y Delovitch, Terry**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 336 861 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de IL-10 en biorreactor de planta de cultivo no alimenticia.

5 La presente invención se relaciona con el uso de una planta de cultivo no alimenticia como un Biorreactor. Más específicamente esta invención se relaciona con la expresión de IL-10 para administración oral utilizando plantas de cultivo no alimenticias.

Antecedente de la invención

10 Las citas completas para las referencias aparecen al final de la sección de ejemplos.

15 Numerosas plantas han probado ser susceptibles a transformación con genes heterólogos y durante algún tiempo el tabaco ha sido el sistema modelo para la transformación de plantas. A pesar del hecho que las biotecnologías enfocadas en la protección del cultivo no han encontrado aplicación en la producción de plantas de cultivo no alimenticias, subsiste un papel principal para tales plantas como Biorreactores. Un ejemplo de una planta de cultivo no alimenticia es el tabaco, que es capaz de producir altos niveles de proteína soluble (proteína de fracción 1, FIP; Woodleif *et al* 1981) y se han desarrollado sistemas piloto para purificar esta fracción para uso como un complemento dietario alto en proteína (Montanari *et al* 1993).

20 Se ha reconocido la expresión de genes de mamífero en varias plantas que incluyen tabaco y Arabidopsis como biorreactores no estériles, eficientes, de bajo costo para la producción de proteínas valiosas en la medicina y la industria (Ma y Hein 1995). Recientemente se ha presentado evidencia que demuestra que las cuatro cadenas de la inmunoglobulina secretora se expresan apropiadamente y se ensamblan en plantas y que el anticuerpo es completamente funcional (Ma *et al* 1995). Adicionalmente, los antígenos bacterianos (Haq *et al* 1995), y víricos (Mason *et al* 1996) producidos en tabaco y papa transgénicos inmunizan efectivamente ratones cuando la papa transgénica se administra oralmente. Sin embargo, antes de la administración del tejido de planta obtenido de tabaco transgénico, las proteínas se han purificado parcialmente. Claramente las etapas que involucran procesamiento son indeseables si la facilidad de administración oral se maximiza así como también se minimizan cualesquier costos asociados con la producción.

30 A partir del punto de vista de la seguridad pública y la normatividad las plantas de cultivo no alimenticias son especies ideales para la producción transgénica de proteínas biológicamente activas. Las plantas de cultivo no alimenticias minimizan el riesgo de pérdida accidental de material de planta transgénica que expresa genes para las proteínas biológicamente activas en la cadena alimenticia humana. Otros sistemas de biorreactor de planta con base en canola (Rooijen *et al.* 1995), papa (Manson *et al* 1996), arroz y yuca (Ma y Hein 1995) no ofrecen esta ventaja. Adicionalmente, las plantas de cultivo no alimenticias se pueden seleccionar de tal manera que la producción en áreas donde no existen especies de ocurrencia natural minimiza adicionalmente el riesgo de pérdidas de gen en la flora local, un ejemplo de esto sería hacer crecer tabaco en regiones en donde el tabaco no crece en invierno, tal como Canadá. Con cualquier planta de cultivo no alimenticia, se pueden producir proteínas transgénicas utilizando cualquier tejido u órgano de la planta. Sin embargo si la producción de la proteína se basa en las hojas, no en las semillas o tubérculos, y cuando se acopla con el hecho que las hojas se cosechan antes de florecimiento no existe riesgo virtual de plantas de Biorreactor no controladas que ocurren en futuras estaciones de cultivo.

45 Sin embargo, muchas plantas de cultivo no alimenticias contienen altos niveles de productos de planta secundarios que hacen tejidos de planta obtenidos de estas plantas inadecuadas para administración oral directa. Los estudios más recientes han descrito la administración de proteínas derivadas de tabaco a ratones, sin embargo, las proteínas están en una forma parcialmente purificada. Por ejemplo el estudio por Mason *et al* (1996) involucra la administración oral directa de antígenos víricos que se expresan en el tubérculo de papa y tabaco. Se alimentan directamente ratones con muestras de tubérculo de papa, aún el antígeno, cuando se obtiene del tabaco, se ha purificado parcialmente utilizando gradientes de sacarosa antes de la administración a los ratones.

55 Se ha reportado el cultivo de plantas de tabaco que contienen bajos alcaloides (Chaplin 1977), sin embargo, no se ha sugerido el uso de tal una planta como un Biorreactor. Recientemente, ha sido sugerida la alteración específica de los niveles de nicotina dentro del tabaco, por sobreexpresión (es decir incremento) o expresión anticodificante (reducción) de N-metiltransferasa putrescina, una enzima que limita la velocidad involucrada en la ruta biosintética de la nicotina (U.S. 5,260,205, publicada en Noviembre 9, 1993 y U.S. 5,369,023, publicada en Noviembre 29, 1994; inventores Nakatani y Malik). Sin embargo, estos métodos se dirigen a la alteración de los niveles de nicotina de tal manera que los niveles de otros alcaloides que afectan los sabores y aroma del tabaco no se modifican de ninguna forma. Estas plantas no serían adecuadas para uso como una planta de cultivo no alimenticia como se describe aquí, ya que se han reducido los niveles de solo un grupo seleccionado de alcaloides. No se producen actualmente plantas libres de nicotina, ni se sugiere el uso de estas plantas de tabaco modificadas transgénicamente, como un Biorreactor para la síntesis de las proteínas de interés. Sin embargo, se pueden utilizar tales métodos y aumentar con el fin de producir plantas de cultivo no alimenticias cuando se reduce el nivel de alcaloide total. Puede ser útil tal un método para la producción de plantas baja en alcaloides como un Biorreactor para la síntesis de las proteínas de interés como se contempla por esta invención. La CA 2188 220 describe la producción de IL-4 en tabaco.

65 Así existe una necesidad de proporcionar una planta de cultivo no alimenticia capaz de ser utilizada para preparar proteínas transgénicas de interés adecuadas para administración oral.

Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con la producción de una proteína de interés utilizando una planta de cultivo no alimenticia.

5

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para la preparación de IL-10 adecuado para administración oral dentro de una planta de cultivo no alimenticia que comprende, transformar la planta de cultivo no alimenticia con un vector adecuado que contiene un IL-10 humano que codifica un ácido nucleico y las regiones reguladoras apropiadas para asegurar la expresión del ácido nucleico dentro de la planta de cultivo no alimenticia, de tal manera que la planta de cultivo no alimenticia se caracteriza por ser no tóxica, no adictiva, agradable, y que requiere poco o ningún procesamiento antes de la administración oral, seleccionando plantas de cultivo no alimenticias que expresan IL-10 humano para obtener plantas de cultivo no alimenticias transformadas; hacer crecer y cosechar dichas plantas transformadas y obtener tejido de planta que comprende IL-10 humano de dichas plantas transformadas.

Esta invención se relaciona adicionalmente con el método anterior en donde la planta no alimenticia se caracteriza porque tiene un nivel de alcaloide bajo. Esta invención también incluye métodos que utilizan una planta caracterizado porque tiene un bajo nivel de nicotina.

Esta invención también describe el método anterior en donde la proteína de interés incluye proteínas farmacéuticamente activas, tal como reguladores del crecimiento, insulina, interferón y compuestos relacionados, interleuquinas, hormona de crecimiento, eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF, Factor VIII, Factor IX, tPA, anticuerpos, antígenos y cualesquier combinaciones y derivados de los mismos.

Adicionalmente, esta invención incluye el método anterior en donde un vector adecuado contiene un gen de interés junto con regiones reguladoras apropiadas para asegurar la expresión del IL-10 dentro de tejidos de plantas deseadas.

Esta invención también proporciona composiciones que comprenden un tejido de un cultivo no alimenticio que contiene un IL-10 transgénico.

Otro aspecto de una realización de esta invención es un método para el tratamiento de un alimento médico al administrar una cantidad adecuada de la composición anterior que comprende un tejido de una planta de cultivo no alimenticia que contiene como un componente farmacéuticamente activo un IL-10 transgénico.

Esta invención también se dirige a un método para preparar IL-10 humano dentro de una planta de cultivo no alimenticia que comprende;

- i) seleccionar una planta de tabaco no transformada que comprende de aproximadamente 0.2% a aproximadamente 20% del alcaloide total de Delgold y caracterizada por ser no tóxica, no adictiva, y agradable;
- ii) transformar dicha planta de tabaco no transformada con un vector que comprende gen capaz de codificar dicho IL-10 humano y las regiones reguladoras 5' y 3' para asegurar la expresión del gen dentro de dicha planta de tabaco no transformada para producir una planta transformada; y
- iii) obtener IL-10 humano de dicha planta transformada.

45

Adicionalmente, el método para la preparación de IL-10 puede comprender

- i) transformar una planta con un vector que comprende un gen que codifica IL-10, ligado operativamente con las regiones reguladoras 5' y 3';
- ii) seleccionar plantas transformadas que contienen IL-10;
- iii) hacer crecer y cosechar plantas seleccionadas; y
- iv) extraer IL-10 de dicha plantas seleccionadas.

55

En la presente invención dicho IL-10 es IL-10 humano. Opcionalmente, el vector puede comprender secuencias que mejoran la expresión de dicho IL-10, tal como una señal de retención ER. Adicionalmente, el vector también puede codificar un sitio de división proteolítico, una etiqueta de afinidad, o cualquier combinación de los mismos.

60

Aunque la presente invención se ejemplifica mediante la preparación de proteínas transgénicas de interés utilizando tabaco, en la práctica cualquier planta de cultivo no alimenticia se puede utilizar para la preparación de una proteína de interés siguiendo los métodos como se describe aquí.

65

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos en donde:

Las Figuras 1-4 son para propósito comparativo.

Figura 1 muestra los casetes de oligonucleótido para la integración de la región no traducida TMV 5' y las secuencias de péptido PR-1b transitorias en construcciones de transgen. La Figura 1(A) la secuencia líder TMV. Figura 1 (B) la secuencia de péptido de señal PR-1b. Figura 1 (C) la traducción de aminoácido del péptido de señal codificado. Se indican la identidad, secuencia, y posición de cada oligonucleótido dentro de los casetes. La secuencia de TMV se marca en negrilla. La secuencia del péptido de señal PR-1b en letras planas y la secuencia adicional en cursiva. Los nucleótidos que constituyen todo o parte del codón de inicio están presentes dentro de los cuadros. Los oligonucleótidos #1091 (SEQ ID NO: 1); # 1092 (SEQ ID NO: 4); y # 1093 (SEQ ID NO: 2) representan el conjunto oligo TMV. Los oligonucleótidos #1091, #1092 (SEQ ID NO: 1 y 4), y #4361 a #4365 (SEQ ID NOs: 3, 5, 6, 8 y 9 respectivamente) representan el conjunto oligo TMVpr.

Figura 2 exhibe el mapa de la región T-ADN de pCDX-TL-MAFP11.

Figura 3 exhibe el mapa de la región T-ADN de pMON-TL-MAFP11.

Figura 4 es un Western blot que muestra la acumulación AFP tipo II en plantas de campo. El análisis Western blot extrae proteína soluble total (2.5 µg) de generación R1 de plantas transgénicas AFP tipo II en las que el AFP se objetiva para acumulación en el espacio extracelular. Las muestras se designan por el número para indicar la gráfica de la cual se recolectan y por la letra para indicar la planta progenitora transformada de la que descienden las plantas R1. Los registros en la estación Delhi indican que las plantas A descienden de II4c²-#10 progenitor, las plantas B de II4c²-#1, C de pII3a- #7, y las plantas D son controles tipo natural (4D). El extracto de proteína soluble total de una planta tipo natural que crece en el campo se incluye en el análisis como un control negativo y se mezcla con AFP tipo II maduro (25 ng) purificado de suero de cuervo de mar para generar el control positivo (AFP).

Figura 5 muestra la secuencia de cADN de IL-10 humano. La secuencia de ADN se denota en letras pequeñas, la secuencia de proteína codificada se denota en letras mayúsculas por debajo de la secuencia de nucleótido con una letra del código de aminoácido. La secuencia de péptido de señal se encierra en un cuadro y se sombrea. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar las secuencias hIL-10 o para fusionar otras secuencias al gen hIL-10 se muestran en letras mayúsculas subrayadas mediante una flecha. Los sitios de restricción introducidos por PCR se somborean. Los aminoácidos codificados mostrados anteriormente son la secuencia de oligonucleótido hIL-10-His-KDEL.

Figura 6 muestra una descripción esquemática de tres construcciones IL-10 utilizadas en la transformación de planta como se describe aquí. La Figura 6 (A) muestra 1601 bp de ADN de longitud completa de IL-10. Las plantas transformadas que comprenden esta construcción se designan como plantas "F" en la Figura 7. La Figura 6 (B) muestra una secuencia de IL-10 truncada que comprende nucleótidos 4-732, con solo una porción del 3' UTR (168 bp). Las plantas transformadas que comprenden esta construcción se designan como plantas "E" en la Figura 7. La Figura 6 (C) muestra una construcción IL-10 con la porción 3' UTR removida, y una secuencia de reconocimiento trombina, una etiqueta His y una secuencia KDEL agregada al extremo 3' de la secuencia IL-10. La región que contiene la etiqueta trombina-His y las secuencias KDEL se magnifica para mostrar el orden de aquellas secuencias con respecto al gen hIL-10. Las plantas transformadas que comprenden esta construcción se designan como plantas "G" en la Figura 7. La región que codifica hIL-10 se describe mediante un cuadro sombreado oscuro, el péptido de señal se muestra mediante un cuadro sombreado claro, y el cADN se muestra mediante una línea recta. Los oligonucleótidos se representan por flechas cortas.

Figura 7 muestra los niveles de proteína IL-10 dentro de plantas transgénicas como se determina por ELISA. La concentración de proteína se determina y compara contra una curva estándar hIL-10. Se analizan plantas transformadas individuales. Se transforman plantas denominadas "E" con la construcción hIL-10 que contiene secuencias codificantes y 3' UTR corto; las plantas denominadas "F" se transforman con la construcción hIL-10 que contiene secuencias codificantes y el 3' UTR completo; las plantas denominadas "G" se transforman con la construcción hIL-10 que contiene secuencias codificantes fusionadas a la etiqueta trombina-His de la secuencia KDEL.

Descripción de la realización preferida

Desde un punto de vista de la seguridad pública y la normatividad las plantas de cultivo no alimenticias son especies ideales para la producción transgénica de proteínas biológicamente activas debido a que es insignificante el riesgo de pérdida de material de planta transgénica en la cadena alimenticia humana. Otros sistemas de Biorreactor de planta se basan en cultivos alimenticios que no ofrecen esta ventaja. Aunque las plantas de cultivo no alimenticias son especies ideales para uso como Biorreactores desde un punto de vista de seguridad pública y de normatividad, existen varios obstáculos que se deben superar antes de su uso como Biorreactores.

ES 2 336 861 T3

Un problema principal con el uso de plantas de cultivo no alimenticias, por ejemplo tabaco, como birreactores es que estas plantas pueden contener productos de plantas secundarios indeseables. Los productos de plantas secundarios son constituyentes que son generalmente tóxicos o reducen la apetencia de un tejido de planta o que son adictivos por naturaleza. Esta es una relación significativa ya que uno de los beneficios de preparar las proteínas de interés dentro de una planta es que se pueden requerir grandes cantidades de proteína para administración (Ma y Hein, 1995), por lo tanto cualesquier productos tóxicos, adictivos, o de otra forma indeseables se pueden evitar dentro del tejido de la planta. Por ejemplo, las patatas de tabaco contienen altos niveles de productos de planta secundarios tal como nicotina y alcaloides relacionados, que hacen el tejido de la planta inadecuado para la administración oral directa. Estudios anteriores han descrito la administración de proteínas derivadas de tabaco a ratones, sin embargo, las proteínas están en una forma parcialmente purificada. Por ejemplo, el estudio por Mason *et al* (1996) involucra la administración oral directa de antígenos víricos expresados en un tubérculo de papa y tabaco. Se alimentan directamente ratones con muestras de tubérculo de papa, aún el antígeno, cuando se obtiene del tabaco, se ha purificado parcialmente utilizando gradientes sacarosa antes de la administración a los ratones. Es deseable preparar proteínas transgénicas dentro de plantas de cultivo no alimenticias que permitan el uso directo de tejido de planta para administración oral, o luego de procesamiento mínimo.

“Planta de cultivo no alimenticia” significa una planta que no se ha utilizado tradicionalmente, o que no se cultiva para propósitos alimenticios. Ejemplos de plantas de cultivo no alimenticias incluyen, pero no se limitan a, plantas ornamentales, tabaco, cáñamo, hierba, y similares y árboles. Se contempla que tales plantas de cultivo no alimenticias se pueden utilizar para la producción de una proteína de interés. Con el fin de que la planta de cultivo no alimenticia se utilice como un Biorreactor para la producción de una proteína de interés expresada transgénica adecuada para administración oral directa, o que requiere solo procesamiento mínimo antes de administración oral, tal una planta de cultivo no alimenticia se caracteriza por:

- a) ser no tóxica;
- b) se agradable luego de procesamiento mínimo o no procesamiento; y
- c) tener bajos niveles de productos de planta secundarios no deseables tal como alcaloides, nicotina, o similares.

Sin embargo, se desea que la proteína de interés no se administre oralmente, ya que cualquier planta de cultivo no alimenticia se puede utilizar para la producción de una proteína de interés siguiendo los métodos de la presente invención como se describe aquí. En tales aplicaciones cuando no hay necesidad de administrar oralmente la proteína de interés, la proteína de interés se puede combinar con otras secuencias de ácido nucleico que son útiles para la purificación de la proteína de interés con el fin que la proteína sea adecuada para uso adicional.

El uso de los términos “baja en nicotina” y “baja en alcaloide” con referencia a las plantas, tal como, pero no limitadas a tabaco, significa una planta que contiene una concentración significativamente inferior de alcaloides cuando se compara con una planta similar que comprende el contenido regular de alcaloide. Por ejemplo, lo que no se considera limitante en ninguna forma, una planta de tabaco baja en alcaloide se puede definir como una planta que contiene menos de aproximadamente 0.2% a aproximadamente 70% de alcaloides totales presentes en plantas que comprenden un nivel regular de alcaloides. Más preferiblemente una planta baja en alcaloides es una que contiene aproximadamente 0.2% a aproximadamente 10% de alcaloides totales presentes en plantas que comprenden un nivel regular de alcaloides. Un ejemplo de una planta baja en alcaloides, que comprende aproximadamente 2.8% del nivel de alcaloide total de un tabaco regular, es 81 V-9 (ver Tabla 1, Ejemplo 4). De forma similar, una planta de tabaco baja en nicotina es una que contiene una concentración significativamente inferior de nicotina cuando se compara con una planta similar que comprende contenido de nicotina regular. Por ejemplo, lo que no se considera limitante en ninguna forma, una planta de tabaco baja en nicotina se puede definir como una planta que contiene menos de aproximadamente 0.2% a aproximadamente 70% de la nicotina total presente en plantas que comprenden un nivel regular de nicotina. Más preferiblemente una planta baja en nicotina es una que contiene de aproximadamente 0.2% a aproximadamente 10% de la nicotina total presente en plantas que comprenden un nivel regular de nicotina. Un Ejemplo de una planta baja en nicotina, que comprende aproximadamente 2.6% del nivel de nicotina total de tabaco regular, es 81V-9 (Tabla 1. Ejemplo 4).

Tales plantas bajas en nicotina o bajas en alcaloides se pueden obtener a través de los programas de reproducción convencionales (por ejemplo Chaplin, 1977), a través de la subregulación selectiva de genes indeseados (por ejemplo U.S. 5,260,205, publicada en Noviembre 9, 1993 y U.S. 5,369,023, publicada en Noviembre 29, 1994; inventores Nakatani y Malik), o por cualesquier otros medios por ejemplo mutagenia seguido por la selección de características deseadas. Sin embargo, como se conoce por un experto en la técnica, el último nivel de nicotina o alcaloide puede depender del ambiente bajo el que crece la planta.

“Procesamiento mínimo” significa el procedimiento rápido de proteínas transgénicas producidas dentro de plantas de cultivo no alimenticias. Tal procesamiento rápido puede involucrar, pero no se limita a, métodos como aquellos empleados para la preparación de FIP como se describe en Woodleif *et al* (1981). Esto incluye la extracción acuosa de proteína soluble de hojas de tabaco verdes mediante precipitación con KHSO_4 , luego de la remoción de residuos cloroplásticos. Otros métodos pueden incluir maceración a gran escala y extracción de jugo con el fin de permitir

el uso directo del extracto. Si se extrae mecánicamente en el sitio registrado en la presencia de agua, este extracto se puede procesar adicionalmente antes de administración. Las composiciones de proteína preparadas de tejidos de planta mínimamente procesadas comprenden la proteína transgénica de interés junto con los componentes derivados de planta que incluyen componentes celulares y otros materiales solubles.

5 “Vector adecuado” significa un vector que comprende un gen de interés que es capaz de ser expresado dentro del tejido de la planta. Tal un vector también puede incluir promotores ubicuos o promotores específicos de tejido y otros elementos reguladores 5’ y 3’ como se conocería por un experto en la técnica. Otros elementos que se pueden incluir con este vector incluyen secuencias para objetivar la proteína de interés en la ruta secretora o citosol
10 tal como, pero no limitado a, la secuencia KDEL de terminal CEP 1 090 133 B1, un motivo de retención de retículo endoplásmico (Schouten *et al* 1966). Otras señales de retención, como lo conocería por un experto en la técnica, también se pueden utilizar para este propósito. Adicionalmente, tal un vector puede incluir genes marcadores para la detección de la expresión dentro de la planta transgénica, y otras secuencias que ayudan en la purificación de una proteína de interés codificada por el gen de interés, que incluye división proteolítica, cromatografía de columna y
15 similares. Un ejemplo, que no se considera limitante en ninguna forma, de una secuencia que ayuda en la purificación de una proteína de interés incluye una etiqueta de afinidad, por ejemplo, secuencias que codifican una etiqueta His. Sin embargo, se entiende que otras etiquetas de afinidad, como se conocen dentro de la técnica, también se pueden utilizar para el proceso de purificación. Un ejemplo, que no se considera limitante de ninguna forma de una secuencia que ayuda en la división proteolítica, y se utiliza para separar la proteína de interés de otras secuencias traducidas tal como
20 una secuencia KDEL incluye, por ejemplo, un sitio de división de trombina que codifica una secuencia. De nuevo, se debe entender que otros sitios de división proteolítica también se pueden utilizar como sería evidente para un experto en la técnica.

25 “Proteína de interés” significa cualquier proteína que se expresa en una planta transformada. Tales proteínas pueden incluir, pero no limitadas a, proteínas farmacéuticamente activas, por ejemplo IL-1, IL-2, IL-3, ...IL-12, EPO, CSF, que incluyen G-CSF, GM-CSF, hPGCSF, M-CSF, Factor VIII, Factor IX, tPA, hGH, receptores, agonistas del receptor, anticuerpos, neuropolipéptidos, insulina, vacunas, factores de crecimiento, reguladores del crecimiento, antígenos, sus derivados y similares.

30 “Administración oral” significa la administración de un tejido u órgano de una planta de cultivo no alimenticia, por ejemplo la hoja, raíz, fruto etc. Sin procesamiento o con procesamiento mínimo. Tales tejidos u órganos se pueden proporcionar en la forma de una ensalada o similares con otros ingredientes farmacéuticos, o ingredientes para incrementar la apetencia, si se desea. También se contempla que el procesamiento mínimo del tejido u órgano se puede colocar antes de la administración del extracto. Por ejemplo, las proteínas secretadas dentro del espacio extracelular de
35 los tejidos de la hoja se pueden obtener fácilmente utilizando vacío o extracción por centrifuga, o los tejidos se pueden extraer bajo presión mediante el pasaje a través de rodillos o molido o similares para exprimir o liberar la proteína libre dentro del espacio extracelular. El procesamiento mínimo también puede involucrar la preparación de extractos crudos de proteínas solubles, ya que estas preparaciones tendrían contaminación insignificante de productos de planta secundarios.

40 “Alimento médico” significa una afección médica definida que se puede tratar con un fármaco específico adecuado para el tratamiento de la afección. Ejemplos de tales alimentos médicos y sus fármacos correspondientes adecuados incluyen, pero no se limitan a: diabetes y la administración de IL-4 o insulina o una combinación de los mismos; afecciones relacionadas con coagulación sanguínea y la administración del Factor VIII, Factor IX o tPA
45 o combinaciones de los mismos; afecciones médicas que requieren la estimulación de las células progenitoras con monocitos/macrófagos y la administración de G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF o combinaciones de los mismos; infecciones víricas y la administración de interferones por ejemplo interferón- α , interferón- β , interferón- λ .

50 Se han propuesto varios métodos para la remoción de la nicotina del tabaco. Sin embargo, estos procesos típicamente involucran el tratamiento del tejido postcosechado. Por ejemplo el uso de disolventes (EP 10,665, publicada en Mayo 14, 1980; inventores Kurzhalz y Hubert), o metabisulfito de potasio, sulfato y nitrato de potasio (U.S. 4,183,364, presentada en Enero 8, 1980; inventor Gumushan) se han propuesto como métodos para la remoción de nicotina de las hojas de tabaco. Se diseñan todos estos tratamientos para mantener el sabor y aroma del tabaco, y estos métodos involucran procesamiento postcosecha extensivo y por lo tanto no son adecuados para la preparación de productos
55 como se describe en esta invención.

60 Se ha sugerido la alteración específica de los niveles de nicotina dentro del tabaco, por sobreexpresión (es decir incremento) o expresión anticodificante (reducción) de N-metiltransferasa putrescina, una enzima que limita la velocidad involucrada en la ruta biosintética de nicotina (U.S. 5,260,205, publicada en Noviembre 9, 1993 y U.S. 5,369,023, publicada en Noviembre 29, 1994; inventores Nakatani y Malik). Estos métodos se dirigen a la alteración de los niveles de nicotina de tal manera que los niveles de otros alcaloides que afectan los sabores y aroma del tabaco no se modifican en ninguna forma. No se producen actualmente plantas libres de nicotina, ni se sugiere el uso de estas plantas de tabaco modificadas transgénicamente, como un Biorreactor para la síntesis de las proteínas de interés. Sin embargo, tales métodos, si se modifican para reducir los niveles alcaloides de planta totales, se pueden utilizar con fin
65 de producir plantas de cultivo no alimenticias en donde se reducen los niveles de alcaloide totales.

Con el fin de establecer la eficacia de la expresión de transgen en una planta baja en alcaloide, por ejemplo un tabaco libre de nicotina tal como pero no limitado a 81V-9, y asegura la producción de la proteína soluble, varias

proteínas de interés se expresan dentro de una planta baja en alcaloide. Estas proteínas incluyen IL-4, IL-10, y una proteína anticongelante Tipo II (AFP), sin embargo, se entiende que otras proteínas de interés también se pueden utilizar para transformar una planta baja en alcaloide, o baja en nicotina de acuerdo con los métodos de esta invención.

5 El IL-4 es un factor de crecimiento y de diferenciación para las células T. En particular, el IL-4 promueve el desarrollo del subconjunto de células auxiliares T (Th2) de células T nativas luego de la estimulación del antígeno. El IL-4 produce células Th2 que protegen generalmente contra el inicio de muchas enfermedades autoinmunes específicas de órgano, que incluyen diabetes tipo 1. Así la disponibilidad de una fuente abundante de IL-4 se prueba invaluable para la inmunoterapia de la diabetes. Se pueden utilizar plantas de tabaco bajas en nicotina transgénicas en estudios de alimentación directa para determinar la eficacia de la proteína producida recombinantemente.

15 La enfermedad de Crohn es una enfermedad crónica inflamatoria del intestino con remisiones y exacerbaciones frecuentes, y varias manifestaciones extra-GI. Las lesiones son típicamente discontinuas y pueden ocurrir en cualquier parte dentro del tubo GI. Las ubicaciones más comunes son el íleo y colon, y son comunes la formación de estenosis y fístulas. En contraste, la colitis ulcerativa es contigua y afecta característicamente al colon. Aunque la etiología de estas enfermedades inflamatorias del intestino es desconocida, existen datos que demuestran la participación de células inmunes en estas afecciones. Las citoquinas pueden dirigir la intensidad, grado, y el resultado eventual de las lesiones inflamatorias. De forma interesante, los ratones hechos deficientes para IL-10, mediante la interrupción de gen objetivo, desarrollan inflamación del intestino y lesiones que semejan la enfermedad inflamatoria del intestino, que se pueden mejorar mediante la administración tópica o sistémica de IL-10 (Kuhn *et al.* 1993). El balance entre citoquinas proinflamatorias tal como interleuquina-1, interleuquina-6, y-interferón y factor del tumor de necrosis y citoquinas anti-inflamatorias tal como antagonistas del receptor, IL-10, IL-4, y la transformación del factor beta de crecimiento (TGF β) pueden determinar finalmente el resultado de la enfermedad inflamatoria del intestino (Fiocchi 1993). Por su naturaleza de subregular las citoquinas proinflamatorias, y la sobrerregulación de los antagonistas del receptor interleuquina-1, el IL-10 puede ser una estrategia efectiva para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino. Los actuales tratamientos para la enfermedad inflamatoria del intestino se diseñan empíricamente para reducir la inflamación y dependen en gran medida de los corticosteroides e inmuno-solisolatos (5-ASA).

30 La administración de citoquinas oralmente puede ofrecer una alternativa para la aplicación sistémica o aplicación tópica y puede tener efectos sistémicos y locales. De forma interesante la inactivación del ácido y la digestión de proteasa no parecen inactivar todos los efectos de citoquina, en la experiencia limitada hasta la fecha utilizando un método oral. La bioactividad se puede retener aún en la presencia de tripsina y quimiotripsina, por lo menos para IL-6, lo que sugiere la glucosilación pesada y otros factores que confieren la estabilidad de los ácidos a las citoquinas (Rollwagen y Baqar 1996). Adicionalmente, los interferones pueden suprimir la artritis inducida por colágeno en ratas cuando se les da oralmente una dosis alta. Las citoquinas orales pueden simplificar un método para el suministro y pueden ser útiles en el modelo de infección, VIH, autoinmunidad y rechazo de trasplante.

40 También se ha clonado el IL10 humano, y el cADN de humano y de ratón codifica funcionalmente y estructuralmente proteínas similares (con 178 aminoácidos) que incluyen una secuencia líder hidrófoba y mayor de 70% de homología en secuencias de aminoácido predichas.

45 En adición a la producción por clones CD4+ TH-2, se produce IL-10 por células B, y se activan mastocitos, macrófagos, monocitos y queratinocitos. Existen múltiples papeles para el IL-10 en la regulación de la respuesta inmune, que incluye la inhibición de célula T, función de monocito y macrófago, así como también la inhibición de citoquinas particularmente aquellas del subconjunto celular TH-1 T (gamma interferón) y la inhibición de la proliferación de células B. La inhibición de citoquinas tal como gamma interferón. El GM-CSF y TNF luego de lectina o activación anti-CD3 es transcripcional y transduccional. Existe también actividad inhibidora en la expresión del antígeno MHC clase I, que es una proteína central para el reconocimiento de las células que presentan antígeno mediante célula T. El IL-10 también inhibe la producción de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico luego de la activación de interferón-gama. Por lo tanto existe una fuerte base para el concepto que IL-10 ocurre naturalmente para proporcionar regulación negativa en las respuestas inmunes.

55 Se transforman construcciones de gen en cepas de tabaco *N. tabacum* cv. Xanthi y 81 V9-4 (disponibles de Agriculture and Agri-Food Canada, Pest Management Research Center, Delhi Farm. Genetics Section). El 81 V9-4 es una línea de tabaco curado en atmósfera artificial que contiene solo cantidades traza de alcaloides y es un componente ideal para aplicaciones de cosechas moleculares basadas en tabaco. Las construcciones de gen se construyen para la producción de proformas y formas maduras de una proteína anticongelante tipo II (AFP) o IL-4, para ser acumulado en el espacio extracelular y citosol celular. Varias construcciones diferentes que comprenden IL-10 con el fin de optimizar la expresión del gene dentro de una planta de cultivo no alimenticia también se examinan.

60 La expresión de IgG en plantas presta apoyo a la idea que el pasaje a través del retículo endoplásmico puede mejorar la acumulación de proteína. En plantas cultivadas para expresar simultáneamente las proteínas de cadena liviana y pesada IgG de ratón objetivadas en el espacio extracelular, la cantidad de cada proteína incrementa hasta 60 veces sobre lo que se ve cuando se expresa individualmente en el mismo compartimiento (Hiatt *et al* 1989). La expresión de ambos componentes de proteína en el citosol, sin embargo, no afecta su nivel de acumulación. El procesamiento y ensamblaje IgG en los linfocitos ocurre a través de la acción de proteínas de unión de cadena pesada presentes en el retículo endoplásmico (ER). El incremento observado en la producción cuando ambas proteínas se objetivan en el espacio extracelular se ha atribuido a una estabilidad mejorada contingente en el ensamble de IgG. Consistente

con esta hipótesis, los complejos de anticuerpo activos se observan cuando las proteínas se objetivan en el espacio extracelular pero no cuando se objetivan en el citosol.

Para maximizar adicionalmente los niveles de expresión y la producción de la proteína transgen del gen que codifica la proteína de interés, se debe determinar el uso del codón dentro de la planta que no es de cultivo de interés. También, se ha mostrado que las señales de retención del retículo endoplásmico pueden incrementar dramáticamente los niveles de proteína transgen, por ejemplo el motivo KDEL (Schouten *et al* 1996). Reemplazar cualquier secuencia de señal secretora con una señal secretora de planta también asegurará el objetivo para el retículo endoplásmico (Denecke *et al* 1990).

Ejemplos

Los Ejemplos 1 y 2 son para propósito comparativo.

Construcción de Gen

Para maximizar la producción de AFP potencial en el nivel de traducción, la región no traducida 5' natural del cADN se reemplaza con la región líder no traducida 5' del virus de mosaico de tabaco (TMV) (Richards *et al* 1977 & 1978, Sleat *et al* 1988). También se reemplaza la secuencia de péptido de señal de pescado con aquella de la proteína relacionada con patogenicidad de tabaco 1b (PR-1b) (Cornelissen *et al* 1986, Sijmons *et al* 1990, Denecke *et al* 1990). Se diseñan los casetes de oligonucleótido: tres oligonucleótidos, #1091, (SEQ ID NO: 1); # 1092 (SEQ ID NO: 4); y # 1309 (SEQ ID NO: 2), que se hibridarían para generar la secuencia líder TMV completas (Casete TMV: Figura 1A); y cinco oligonucleótidos #4361-#4365 (SEQ ID NOS: 3, 5, 6, 8 y 9, respectivamente) que de acuerdo con los oligonucleótidos #1091 y #1092 (SEQ ID NO: 1 y 4) se podrían hibridar para generar un líder TMV ligado y secuencia de ADN de péptido de señal PR-1b (Casete TMVPR: Figura 1B). El extremo 5' de estos casetes corresponde a un sitio de restricción de extremo cohesivo. El extremo 3' del casete TMV es truncado y se incorpora un nucleótido de adenina adicional destinado a formar el primer nucleótido del codón de partida mientras que el extremo 3' del casete TMV-PR es compatible con ADN Nde I-cut pero no sería capaz de regenerar el sitio de restricción seguido por ligación.

Para facilitar la adición de los casetes TMV y TMV-PR, cADN AFP Tipo II de cuervo marino se muta específicamente el sitio de acuerdo con el método descrito por Kunkel (1985) para incorporar un sitio de restricción Nde I en bp 157 o 207. Estas mutaciones también se introducen apropiadamente en codones de partida de metionina de marco en las uniones entre las secuencias que codifican porciones pre y pro, o porciones pro y maduras del AFP. Para construir la construcción de gen por acumulación de AFP en el citosol, los plásmidos que contienen los cADN AFP Tipo II mutados se cortan inicialmente con NdeI y se hacen extremos romos con nucleasa de frijol mungo. Se liberan los fragmentos de cADN mediante división con Sal I, se aíslan y se ligan direccionalmente en un vector BamH I/Sal I-cut pTZ 18 junto con oligonucleótidos TMV híbridos #1091, #1092 y #1309. Luego se las construcciones TMVproAFP y TMV-mAFP con BamH I y Hinc II, y los fragmentos de gen AFP aislados ligados de forma separada en pMON 893. Para las construcciones de gen que objetivan AFP al espacio extracelular, se subclonan inicialmente los cADN AFP Tipo II mutados a partir de sus vectores pTZ 19 en vectores Hind III/Sal I-cut pBluescript para posicionar un sitio de restricción BamH I 5' a la secuencia que codifica AFP. Se cortan los clones pBluescript-AFP con enzimas de restricción BamH I y Nde I para remover la secuencia de péptido de señal de cuervo marino o péptido de señal o ADN pro-región. Las porciones del plásmido de estas digestiones se aíslan y se ligan con oligonucleótidos híbridos #1091, #1092, y #4361 a #=136. Luego se cortan las construcciones de gen con Xba I y Kpn I, y se clonan de forma separada en pCDX-1.

La clonación de las construcciones de gen AFP Tipo II en pMON 893 o pCDX-1 orientando el casete de gen en el vector entre el promotor CaMV 35S doble (Kay *et al* 1987) y la secuencia de poliadenilación NOS. El AFP codificado por las construcciones de transgen son idénticos a las formas AFP pro y maduras presentes en el pescado con la excepción de una metionina adicional en el extremo del terminal N de las proteínas. La porción T-ADN de las construcciones finales se representan en las Figuras 2 y 3. Se predice la división de los componentes de péptido de señal de los AFP expresados (von Heijne 1986) para producir inmediatamente antes a la metionina agregada en las construcciones de gen AFP pro y maduras o de tal manera que la acumulación AFP en el citosol y el espacio extracelular deben ser idénticos.

Se transforman las construcciones de gen en cepas de *N. tabacum* cv. Xanthi y tabaco 81 V9-4 de acuerdo con el método descrito por Horsch *et al* (1988). Los intentos para generar plantas que llevan transgenes para acumulación citosólica del AFP se hacen intermitentemente durante un periodo de varios años. Los discos infectados con *A. tumefaciens* que llevan estas construcciones de genes muestran poca tendencia para forma callos y parecía más sujeto a infección bacteriana que los discos tratados comparablemente transformados con otras construcciones de transgen. Eventualmente se regeneran seis plantas transgénicas: un transgénico proAFP en cada cepa de tabaco, tres transgénicos AFP maduros en Xanthi y un transgénico AFP maduro en 81 V9-4. En contraste, dentro de seis meses, se regeneran ocho plantas transgénicas que llevan construcciones de gen para la acumulación AFP en el espacio extracelular: dos transgénicos proAFP en cada cepa y cuatro transgénicos AFP maduros en 81 V-9. Se seleccionan inicialmente las plantas transformadas y regeneradas para resistencia a canamicina. Se determina posteriormente la etapa transgénica mediante detección PCR directa para el transgen AFP utilizando los cebadores #3339 5'-TATTTTTTACAACAAT TACCAACAAC-3' (SEQ ID NO: 10) y #4708 5'-CAGCAGTCATCTGCATACAGCAC-3' (SEQ ID NO: 11) que

ES 2 336 861 T3

hibridan el líder TMV y en el extremo 3' de la secuencia que codifica AFP de cuervo marino, respectivamente. Se amplifican las construcciones de gen AFP Tipo II en 30 ciclos de desnaturalización durante 1 minuto a 95°C, hibridación durante 1 min a 55°C, y elongación durante 2 min a 72°C. Estos productos de amplificación generados de 440 y 388 bp de las construcciones de gen para acumulación citosólica de los AFP pro y maduros, y fragmentos 532 y 480 bp de las construcciones de gen diseñadas para la acumulación de los mismos AFP en el espacio extracelular.

Análisis de Expresión de Transgen

Se remueven las plantas de la cámara de crecimiento y se mantienen a temperatura ambiente bajo una luz creciente durante un mínimo de 48 h antes de extracción de ARN o proteína. Se prepara el ARN mediante precipitación selectiva de acuerdo con el método de Palmiter (1974). Se analiza el ARN total (40 Pg) mediante inmunotransferencias de acuerdo con el método de Lehrach *et al* (1977) y se sondan con secuencia de cADN AFP de cuervo marino etiquetada [α -³²P].

Se preparan los extractos de proteína solubles totales de tres a cuatro hojas tomadas de la superficie media de una planta saludable de acuerdo con el método descrito por Gensenheimer (1990). Se dializan los extractos a 4°C contra 0.1%, 0.01% y 0.001% de ácido ascórbico en un tubo de diálisis SpectraPor® #3 (MWCO 3.5 kDa) y se centrifugan durante 15 min a 12.000 xg para remover el precipitado formado durante la diálisis antes de liofilización. Se resuspenden las muestras en agua filtrada en Millipore® y se determinan sus concentraciones de proteína mediante ensayo Bradford (16) con relación a un estándar BSA.

Para extraer la presente proteína en el apoplasto mediante infiltración en vacío (Sijmones *et al* 1990), se cortan las hojas longitudinalmente en tiras de 4 cm x 0.8 cm, y se enrollan en forma longitudinal en tiras de 5 cm x 1.8 cm de Parafilm® de tal manera que la parte inferior de la hoja se expone a la vista. Se expone la tira de hoja a vacío derivado de un aspirador de agua dos veces durante 2 min o hasta que la superficie de la hoja expuesta sea verde oscuro. Cada tira de hoja tratada proporciona 10-2.5 ul del extracto. Las muestras de volumen más grande se diluyen bastante para uso y se descargan. Las muestras que contienen glóbulos verdes también se descargan para reducir la posibilidad de contaminación de proteína citosólica. Se agrupan todos los extractos restantes de una planta dada y se determina la cantidad de proteína presente mediante ensayo de proteína Bradford (1976) con relación a un estándar BSA. Las concentraciones de extracto están generalmente entre 0.1-0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Análisis Western

Se resuspende directamente la proteína liofilizada en amortiguador de carga (60 mM de Tris-HCl, pH 6.8/10% de glicerol/5% β -mercaptoetanol/2% (w/v) de SDS/1.3 x 10⁻³% (w/v) de bromofenol azul), y se les hace electroforesis con 17% de una poli(acrilamida)fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.8/Urea 4 M/0.1% de gel SDS utilizando fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.8/0.1% de amortiguador de serie SDS. Se conduce la electroforesis a 50 V durante 3-4 h hasta que el marcador preteñido de 6 kDa está en el fondo del gel. Se preparan las inmunotransferencias de acuerdo con el método descrito por Burnette *et al* (1981) y se sondan con anticuerpo policlonal con el AFP de cuervo marino maduro. Se utiliza un equipo de detección quimioluminiscente (Amersham) para sondeo de Western blot para detectar el primer anticuerpo unido. Se llevan a cabo todas las reacciones de acuerdo con las direcciones del fabricante.

Ejemplo 1

Expresión Gen AFP

50 Acumulación de Proteína

El análisis de inmunotransferencia de proteína soluble total extraída de las plantas que llevan genes para expresión AFP citosólica no encuentra evidencia de acumulación de AFP pre o madura aún cuando se analiza hasta 80 μg de extracto de proteína. En contraste, una proteína que comigra con el AFP maduro de cuervo marino y reacciona en forma cruzada con el anticuerpo para el AFP de Tipo II se detecta en tan poco como 2.5 μg de extracto de proteína soluble total de plantas en las que el AFP se objetiva al espacio extracelular (Figura 4). Esta proteína es única a las plantas transgénicas y está ausente en los extractos de una planta tipo natural y una planta, el pII3a-#9, que se ha transformado y regenerado pero se determina que no es transgénico mediante PCR. Se obtiene resolución insuficiente con estos extractos para diferenciar las diferencias de tamaño entre los AFP producidos por las plantas que llevan transgenes para la producción de AFP pro o maduros. Esto se debe probablemente a la viscosidad de los extractos de proteína soluble total que a menudo causan distorsión de las muestras durante la utilización de los geles. Por esta razón, se mezcla el AFP Tipo II de control positivo con extracto de proteína soluble total de una planta natural que se hace crecer en el laboratorio para generar un estándar de tamaño adecuado. El extracto de proteína natural no se mezcla con los marcadores de peso molecular, de tal manera que el tamaño del AFP producido por la planta no se podrá estimar exactamente de estos extractos. La acumulación de AFP varía entre plantas y parece ligeramente mayor en plantas II4c2-#1 y 10 que llevan genes para producción de AFP madura. Con base en las comparaciones de inmunotransferencia con una cantidad conocida de AFP de Tipo II, la cantidad de AFP producida por las plantas se ha estimado por ser aproximadamente 0.5-1% de la proteína soluble total.

ES 2 336 861 T3

Transcripción de mRNA de Transgenes para Acumulación AFP Citosólica

Los extractos de ARN de las plantas transgénicas con construcciones de gen para acumulación AFP citosólica se analizan mediante inmunotransferencia para determinar si se transcribe el transgen AFP. Dos plantas, Xanthi TmSR # 1 y 8 1 V9-4 TmSR #1, que llevan transgenes para acumulación AFP en el citosol celular se encuentran por producir una transcripción de ARN de 0.96 kb que se hibrida con el cADN AFP utilizado como una sonda: en exposición mayor de las transferencias, también se ve la misma transcripción de ARN en el extracto de Xanthi TmSR #2 y se detecta una ligeramente mayor de aproximadamente 1.02 kb en el extracto de 81V9-4 TpSR #3. Se espera que las transcripciones de las construcciones de transgen AFP pro y maduro difieren por 51 nucleótidos. Ambas transcripciones de gen producidas por plantas son considerablemente más grandes que una muestra de control generada por PCR estimada por ser 0.36 kb y representan el tamaño del transgen maduro entre el líder TMV y el extremo 3' de la secuencia de codificación. Esto es consistente con la diferencia de tamaño esperada con base en la secuencia de codificación adicional y la región no traducida 3' (155 nucleótidos totales) presente en la construcción del transgen, y con el uso de la secuencia de poliadenilación NOS para obtener las transcripciones poliadeniladas. Ambas transcripciones son más pequeñas que una transcripción de gen equivalente de 1.06 kb producida en una planta que lleva el transgen para acumulación de AFP madura acumulada en el espacio extracelular. Esta diferencia de tamaño es consistente con la adición de la secuencia que codifica el péptido de señal de 90 nucleótidos a la construcción de transgen para la secreción del AFP. Con base en el ténido EtBr, se carga más ARN en el gel de la planta que produce AFP para acumulación en el espacio extracelular en comparación con la cantidad de ARN de las plantas que objetivan en AFP del citosol. No se puede hacer comparación con respecto a las cantidades relativas de mRNA AFP transcrito de estas construcciones. Son embargo, se logran cargas similares entre las plantas que objetivan el AFP al citosol. La diferencia en la cantidad de transcripción observada, por lo tanto, sugiere que esta construcción de transgen se expresa en niveles variables en las diferentes plantas.

FP Presente en el Apoplasto

Se preparan extractos de infiltración de vacío de plantas que producen AFP para determinar si el AFP expresado está presente en el espacio extracelular. Estos extractos no se someten a la viscosidad y la distorsión de muestra asociada con los extractos de proteína soluble, se considera también más adecuada para estimar los tamaños de los AFP de planta. El análisis de inmunotransferencia confirma la presencia de AFP. Se detecta el AFP en las plantas pII3a-#7 y II4c2-#1 que llevan transgenes AFP maduros y pro respectivamente, como una banda difusa de aproximadamente 14.7 kDa que migran en una velocidad similar al AFP maduro aislado del suero de pescado. Se observa una pequeña diferencia de movilidad entre los AFP producidos por las dos plantas, sin embargo, el proAFP aislado de suero de pescado es distintamente más grande que el AFP producido por planta.

Habiendo establecido la presencia de AFP en extractos de infiltración de vacío de aquellas plantas que llevan transgenes para acumulación AFP extracelular, se concentran los extractos diez veces y se prueban para actividad y efectos de histéresis térmica en morfología de cristal de hielo utilizando el osmómetro de nanolitro. Los extractos de las plantas que expresan construcciones de gen para el AFP pro o maduro muestran evidencia de la actividad AFP. Los cristales de hielo que crecen en estas plantas se ven como las características bipiramidales con forma de ojo producidas en la presencia de AFP Tipo II natural. Se mide la actividad de histéresis térmica y se basa en la comparación con una curva de actividad estándar, se estima la cantidad de AFP activo presente en el espacio extracelular como el 2% de la proteína total presente en el compartimento.

El análisis de ARN de las plantas transgénicas ha mostrado que ellas son capaces de transcribir las construcciones de transgen integradas, y que el tamaño del mRNA AFP de la planta de ambos tipos de construcción es consistente con aquel esperado para una transcripción poliadenilada, de longitud completa. El mRNA producido del transgen para la acumulación AFP en el espacio extracelular es obviamente traducible.

La presencia de los AFP producidos por la planta en extractos de infiltración de vacío indican que la planta reconoce que el componente de péptido de señal PR-1b y objetiva correctamente los AFP adheridos al espacio extracelular. El tamaño predicho de los AFP para exportar al espacio extracelular es 18.7 o 17 kDa con el componente de péptido de señal adherido y 15.8 o 14.1 kDa sin el péptido de señal para los AFP pro y maduros, respectivamente. El análisis de inmunotransferencia de los extractos de infiltración de vacío de la planta muestran que los AFP producidos de las construcciones de transgen AFP maduro y proAFP y presentes en el espacio extracelular comigran con AFP Tipo II maduro y son de aproximadamente 14.7 kDa. Esto sugiere que no solo la planta es capaz de dividir el péptido de señal del AFP expresado sino que puede remover más o toda la proregión del AFP.

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que una planta de bajo alcaloide es capaz de expresar una proteína detectable inmunológicamente de interés que retiene su actividad natural.

Ejemplo 2

Expresión de Interleuquina-4

5 El cADN IL-4 de murino de longitud completa es de 585 de pares base de longitud (Lee *et al* 1988) y codifica para una preproteína de 140 aminoácidos con una señal secretora de 40 aminoácidos (Otsuka *et al* 1987). Esta secuencia de gen que codifica la señal secretora de 40 aminoácidos se reemplaza con una señal secretora de planta obtenida de la señal secretora PR1-b de tabaco (Denecke *et al* 1990) para asegurar la objetivación al retículo endoplásmico. Se introduce el vector resultante en plantas de tabaco bajas en nicotina utilizando los métodos descritos anteriormente.

10 Con el fin de determinar la actividad biológica del IL-4 recombinante de planta 4, *in vitro*, se determina la estimulación del crecimiento de IL-4 de murino dependiente de estirpe celular CT.4S (Rapoport *et al* 1993). Se agregan diluciones apropiadas de IL-4 recombinante de planta purificado a los cultivos que contienen 5×10^3 células CT.4S en placas de 96 pozos de fondo plano en un volumen final de 1 mCi/pozo de [³H]timidina 18 hr antes de la terminación del cultivo, y se determina la incorporación de [³H] timidina mediante conteo de centelleo de líquido.

15 Se determina la inmunoreactividad del IL-4 recombinante de planta mediante emparejado ELISA de fase sólida (Abrams *et al* 1992). Brevemente, se utiliza el mAB anti-IL-4 BVD4-1D11 como un anticuerpo de captura y se empareja con el mAB antiIL-4 BVD6-24G2 biotinilado como el anticuerpo de detección. Se utiliza un estándar de rIL-4 de ratón (Pharmingen).

20 Se determina la actividad *in vivo* del IL-4 producido por la planta en ratones NOD. Ratones hembras NOD y de cepa de control (libres de insulinitis- y diabetes) (20 ratones/grupo) se alimentan con hojas de tabaco bajas en nicotina transgénicas que expresan el IL-4 producido recombinantemente. En varios momentos durante las 4 semanas de tratamiento, se analizan los niveles de suero circulantes de ratones NOD y de control alimentados con IL-4 recombinante de planta y no alimentados mediante ELISA como se describió anteriormente. Se monitorean los ratones NOD y de control para cualesquier efectos tóxicos potenciales que elevan la alimentación con IL-4 recombinante de planta, y sus concentraciones de suero de IgE e IgG cuantificado por ELISA. El incremento en los niveles de IgE en el suero indica que los ratones receptores son más susceptibles a respuestas alérgicas.

30 También se determina la alimentación de IL-4 recombinante de planta para proteger contra el inicio de insulinitis y/o diabetes Tipo 1 en ratones NOD. Los ratones NOD hembra neonatos (2-3 semanas de edad) alimentados o no alimentados con IL-4 recombinante de planta se mantienen en una instalación para animales libres de patógeno específicos. Se monitorean los ratones semanalmente para sus niveles de glucosa en la sangre (BGL), y los ratones que son hiperglicémicos (es decir BGL > 11.1 mmol/L) durante dos semanas constitutivas se diagnostican como diabéticos Tipo I. Se monitorea el inicio de la insulinitis mediante análisis inmunohistoquímico de tejido pancreático al sacrificar los ratones varias veces (2 semanas a 2 meses) después que se inicia alimentación con IL-4 recombinante de planta.

Ejemplo 3

40 *Expresión de Interleuquina-10 (IL-10)*

El mRNA de longitud completa de IL-10 humano (hIL-10) es de 1601 nucleótidos de largo, con un UTR 5' corto de 30 nucleótidos (nt) y un UTR 3' largo de 1037 nt. La secuencia que codifica el hIL-10 es de 534 pares base de larga y codifica para una preproteína de 178 aminoácidos con una señal secretora de 18 aminoácidos (Vieira *et al.*, 1991). El cADN The IL10 humano de longitud completa se aísla de poliA RNA mediante RT-PCR y se secuencia completamente para asegurar la fidelidad. Con el fin de maximizar los niveles de expresión y la producción de proteína de transgen, se examina el cADN IL-10 para patrones de uso de codón y se optimiza si es necesario (Perlak *et al.* 1991).

50 Debido a que las señales de retención ER pueden incrementar la concentración de disulfuro unido a proteínas de transgen, por lo tanto se puede agregar el motivo de retención ER KDEL al cADN IL-10 utilizando mutagenia dirigida a sitio. Para propósitos comparativos se prepara u gen sintético idéntico, sin la señal KDEL, y se utiliza en los estudios de transformación (SEQ ID NO: 12).

55 El sistema de expresión adopta un mejorador-promotor 35tS duplicado más secuencia líder AMV (Kay *et al.* 1987; Jobbing and Gehrke 1987). Sin embargo también se pueden emplear otros promotores constitutivos, por ejemplo, el promotor constitutivo Canadas T1276 agrícola o de agroalimentos de tabaco (ver solicitud copendiente solicitud US serie No. 08/593,121). Se clona el gen IL-10 en un vector de T-ADN entre las secuencias de borde T-ADN utilizando el Bin19 derivado del vector de expresión de planta pCamTerX. Se transforma el gen IL-10 sintético para tabaco utilizando transformación mediada por Agrobacterium (Horsch *et al.* 1989). La cepa de Agrobacterium utilizada es EHA 101 que lleva el plásmido pEHA 104 Ti desarmado. El marcador seleccionable de planta es fosfotransferasa neomicina.

65 Para maximizar la expresión de transgen y asegurar desarrollo de campo estable un gran número de transformantes primarios necesitan ser generados, seleccionados para niveles de expresión, detectados por número de copia y las líneas que expresan la única copia alta se evalúan para desempeño de campo. Se utilizan métodos estándar (por ejemplo transferencia Northern y Western) para evaluar los niveles de expresión (Sambrook *et al.* 1989). Se utiliza ELISA para cuantificar los rendimientos de proteína de transgen.

ES 2 336 861 T3

Una secuencia que contiene el marco de lectura abierto hIL-10 y un UTR 3' truncado (nucleótidos 4-732) se amplifica por PCR utilizando oligonucleótidos hIL-10-5'-BanxHI y hIL-10-3'-EcoRI (Figura 5 (B): las plantas transformadas que comprenden esta construcción se denominan "E" en la Figura 7). Se designa el oligonucleótido 5' con un sitio BamHI en el extremo 5', y se designa el oligonucleótido 3' con un sitio EcoRI en el extremo 5'. Estos sitios de restricción permiten la fácil clonación direccional de la construcción en el pBluescript fagémido (Stratagene) y en el vector pCaMter X binario derivado de Bin 19 (Frisch *et al.*, 1995). Para determinar el efecto del UTR 3' en la expresión de hIL-10 en plantas, también se clona el cADN completo (4-1601; Figura 5(A); plantas transformadas que comprenden esta construcción se denominan "F" en la Figura 7) en pBluescript y pCaMter X.

Para maximizar la acumulación de proteína en la célula de planta, la señal de retención del retículo endoplásmico (ER). Se agrega KDEL (Schouten *et al.*, 1996), el extremo 3' de la secuencia que codifica hIL-10; las plantas transformadas que comprenden esta construcción se denominan "G" en la Figura 7). También se agrega una etiqueta His antes de la señal de KDEL para facilitar la purificación de la proteína transgénica (ver Figura 5 (C), y SEQ ID NO: 12, nucleótidos 544-630). Se inserta una secuencia de reconocimiento de trombina que precede inmediatamente la etiqueta His que permite la división de la etiqueta His y los péptidos KDEL. Esta tercera construcción codifica una preproteína de 197 aminoácidos. Se utiliza un oligonucleótido único para fusionar estas secuencias al extremo del marco de lectura hIL-10 (ver Figuras 5 y 6). Se utiliza este oligonucleótido en conjunto con el oligonucleótido hIL-10-5'-BamHI en un PCR para generar el fragmento que luego se clona en pBluescript y en pCaMter X.

La clonación de las construcciones de gen IL-10 gene en pCaMter X orienta el gen entre el promotor 35S doble CaMS (Kay *et al.*, 1987) y la secuencia de poliadenilación NOS (sintasa Nopalina) (Frisch *et al.*, 1995). El IL-10 recombinante de planta (prIL-10) codificado por las construcciones de transgen naturales es idéntico al IL-10 humano natural. Después de purificación y división de trombina, el prIL-10 codificado por la construcción etiquetada difiere en solo sus dos aminoácidos terminales del hIL-10 natural.

Se transforman las construcciones de gen en cepas de tabaco de bajo alcaloide *N. tabacum* cv. 81 V9-4 de acuerdo con el método descrito por Miki *et al.* (1998). Se seleccionan inicialmente las plantas transformadas y regeneradas para resistencia a canamicina. Se analizan las plantas regeneradas para expresión de la proteína IL10 mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima de emparejado de fase sólida (ELISA). Brevemente, se utiliza el mAB anti-IL-10 JES3-9D7 (PharMingen) como un anticuerpo de captura y se empareja con el mAB anti-IL-10 JES3-12G8 biotilado (PharMingen) como el anticuerpo de detección. Se utiliza el IL-10 humano recombinante (PharMingen) como estándar.

Se preparan los extractos de proteína soluble de 1 gramo de tejido de hoja joven al homogenizar el tejido en 1 ml de un amortiguador que contiene solución salina-Tween amortizada con fosfato (PBS-T), 2% de polivinilpolipirrolidona (PVPP), 1 mM de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), 1 mM de fluoruro de sulfonilo fenilmetilo (PMSF) y 1 μ /ml de Leupeptina. Luego se recolecta el homogenato en un tubo y se centrifuga 10,000 g durante 15 min en una centrifuga refrigerada. Se recolecta el sobrenadante y se utiliza directamente en el ELISA. Los resultados se presentan en la Figura 7.

Se regeneran ocho plantas transgénicas de la construcción natural que contiene solo un tramo corto de UTR 3' (denominada E6 y E 15 en la Figura 7), y se regeneran diecinueve plantas de la construcción nativa que contiene el UTR 3' completo (denominado F10 en la Figura 7). Todas aquellas y las dos primeras plantas regeneradas de la construcción que contiene la etiqueta His y la señal de retención ER KDEL (denominada G7 en la Figura 7) se prueban para la presencia de proteína IL-10 mediante ELISA.

Se observa un nivel variable del IL-10 recombinante de planta (prIL-10) en las plantas regeneradas. No existen diferencias marcadas entre las plantas transformadas con el cADN hIL-10 de longitud completa y aquellas transformadas con cADN truncado 3'. Sin embargo, se obtiene el mayor nivel de prIL-10 en una de las dos plantas transformadas con la construcción que contiene la señal de retención ER G7-2.

Luego de la detección de las transcripciones IL-10 la proteína en los extractos de proteína crudos de plantas transgénicas que contienen prIL-10 se determina la demostración de bioactividad del IL-10 humano *in vitro* mediante su efecto en la proliferación de célula T en respuesta a lectinas (PHA) así como también en respuestas de linfocito mezcladas estándar (MLR). Se agrega el extracto de planta o IL-10 purificado del extracto de planta al medio que contiene linfocitos humanos, en una concentración que varía de 1-100 ngm/ml. Se determina la proliferación en cultivos PHA y la reacción de linfocito mezclada se cultiva en los días 3-6 mediante ensayos proliferación de incorporación de ³H-timidina.

Se determina la expresión de superficie de las proteínas de clase II MHC en linfocitos humanos activados por PHA o ConA en la presencia de concentraciones incrementadas de IL-10, y se compara con extractos de planta de control.

Se estimulan los linfocitos de sangre periférica con LPS (1-10 μ /ml) durante 24-48 horas, y los niveles de citoquinas determinadas por ELISA o bioensayo. También se determina la inhibición, en el nivel ARN, mediante análisis de transferencia Northern.

El IL-10 es benéfico en la prevención de endotoxemia letal. Siguiendo las aprobaciones apropiadas se prueba el efecto del IL-10 purificado de extracto de planta en lesión endotóxica en ratones BALB/c. Se administra *E. coli*

interperitonealmente o intravenosamente en la presencia de varias cantidades de IL 10 de murino recombinante. Se da el extracto de planta a ratones oralmente en adición a IL-10 purificado de plantas dado intravenosamente. Se determinan los resultados para la supervivencia de los ratones, que es esencialmente cero por ciento en ratones no tratados. Los controles apropiados incluyen ratones tratados con PBS así como también ratones a los que se les da concentrado para animales estándar.

Los ratones deficientes de IL-10 desarrollan inflamación de intestino y lesiones que se parecen a la enfermedad del intestino inflamatoria, que se mejora mediante IL-10 sistémico. Para probar si el IL-10 de planta oral puede prevenir la enfermedad del intestino en un modelo de ratón deficiente en IL-10 de IBD, se administra material de planta transgénica a ratones nulos IL-10 diariamente de 4 semanas de edad y se evalúan los ratones para la presencia de lesiones del intestino de 8 a 30 semanas de edad mediante ganancia de peso e histología de tejido.

Ejemplo 4

15 Niveles de alcaloide en tejido de hoja del Biorreactor no alimenticio

Con el fin de establecer las concentraciones de alcaloide en el tabaco en plantas de Biorreactores normales y no cargadas se condujo un ensayo de campo durante el verano del 1997. Los trasplantes de Delgold, un cultivo de tabaco con concentraciones de alcaloide y 81 V-9 normales, el genotipo de Biorreactor no alimenticio utilizado en esta presente invención se inicia a mediados de abril en un invernadero de estructura fría localizado en la Estación de Investigación Delhi en Ontario Canadá. Se trasplantan los dos cultivos en macetas de 1.2 x 2 m a una densidad de aproximadamente 133,000 plantas por hectárea. El ensayo emplea un diseño completo aleatorio con cuatro réplicas y se fertiliza con 60 kg de nitrógeno por hectárea. Se cultiva el ensayo 40 días después de plantar, se corta en pedazos el tejido, se congela rápido en nitrógeno líquido y se mantiene a -70°C hasta que está listo para análisis. Luego se liofiliza el tejido y se determinan las concentraciones de alcaloide en el tabaco mediante cromatografía de gas. Para este análisis 1 gramo de tejido de tabaco liofilizado se muele para pasar por un tamiz de malla 20 y luego se extrae con diclorometano e hidróxido de sodio acuoso al agitar durante 10 min en un agitador de acción de muñeca. Se filtra la capa de diclorometano y se recolecta para análisis de alcaloide. Se utiliza el método estándar interno con anetole que es el estándar. Se desarrollan todos los análisis cromatográficos de gas en un Hewlett Packard 5890 serie II utilizando una columna DB5 60m x. 25mm i.d. inyección sin división y un volumen de muestra de 2 µl. Se encuentran las concentraciones de alcaloide de tabaco totales por ser 35 veces más bajas en el biorreactor no cargado que los cultivos de tabaco normales, la concentración de nicotina tiene un patrón similar al total y representaron entre 92 y 99% del total (Tabla 1). Los niveles de abasina son similares en las dos líneas y aquellos de anatabina más altos en el Biorreactor no alimenticio que Delgold

TABLA 1

Concentración (mg/g) de los varios alcaloides de tabaco encontrados en las hojas de tabaco normal y en el Biorreactor no alimenticio

Cultivo	Nicotina	Miosmina	Anabasina	Anatabina	Total	% de nicotina total	% de alcaloide total
Delgold	7.892a*	0.000a	0.013a	0.000a	7.923a	100	100
81 V-9	0.209b	0.000a	0.018a	0.020b	0.227b	2.6	0.28

* medios seguidos por una letra diferente son significativamente diferentes uno del otro en P=0.05

Se ha descrito la presente invención con respecto a las realizaciones preferidas. Sin embargo, será obvio a las personas expertas en la técnica que se puede hacer un número de variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención como se describe en las siguientes reivindicaciones.

Referencias

Abrams. J.S., M.G. Roncarolo, H. Yasel, U. Anderson, G. Gleich. J. Silver (1992) Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development. *Immunol. Rev.* 127, 5-24.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Burnette W.H. (1981) Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radio-graphic detections with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.

- Chaplin J.F.** (1977) Breeding for varying levels of nicotine in tobacco. *In: Proc Amer Chem Soc*, 173rd meeting. New Orleans.
- Cornelissen B.J.C., R.A.M Hooft van Huijsduijnen, L.D.Van Loon & J.F. Bol** (1986) Molecular characterization of messenger mRNAs for "pathogenesis-related" proteins 1a, 1b and 1c, induced by TMV infection of tobacco. *EMBO J.* 5, 37-40.
- Denecke J., J. Botterman & R. Deblaere** (1990) Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell* 2, 51-59.
- Fourney R.M., J. Miyakoshi, R.S. Day III & M.C. Paterson** (1988) Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10: 1, 5-7.
- Fiocchi C.** (1993) Cytokines and animal models: a combined path to inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 104: 1202-1219.
- Frisch, D. A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H., and Hall, T.C.** (1995). Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Mol. Biol.* 27, 405-409.
- Gengenheimer P** (1990) Preparation of Extracts from Plants. *Methods of Enzymology* 182, 184-185.
- Haq T.A., H.S. Mason, J.D. Clements, C.J. Artzen** (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in plants. *Science* 268, 714-716.
- Hiatt A., R. Cafferkey & K. Bowdish** (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342. 76-78.
- Horsch R.B., J. Fry, N. Hofmann, J. Neidermeyer, S.G. Rogers & R.T. Fraley,** (1988) Leaf disc transformation. *Plant Molecular Biology Manual* A5. 1-9. Ed. S.B.Gelvin. R.A.Schilperoort, D.P.S.Verma. *Kluwer Academic Publishers.* Dordrecht/Boston/London.
- Kay R., A. Chan, M. Daly & J. McPherson** (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a Sorong enhancer for plant genes. *Science* 236, 1299-1302.
- Kuhn R. LohlerJ, Rennick D, Rajewsky K, Muller W** (1993) Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-274.
- Kunkel T.A.** (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488-492.
- Lehrach H., D. Diamond, J.M. Wozney & H. Boedtker.** (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis underdenaturing conditions: a critical reexamination. *Biochemistry* 16,4743.
- Ma J.K.C., M. Hein** (1995) Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. *TibTech* 13, 522-527.
- Mason H.S., J.M. Ball, J-J. Shi, X. Jiang, M.K. Estes, C.J. Arntzen** (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93, 5335-5340.
- Miki, B.L.A., McHugh, S.G., Labbe, H., Ouellet, T., Tolman, J.H., and Brandle, J.E.** (1998) Transgenic tobacco: gene expression and applications. *Biotechnology in Agriculture and Forestry (in press)*
- Montanari L., P. Fantozzi, S. Pedone** (1993) Tobacco fraction 1 (F1P) utilization of oral feeding and enteral feeding of patients. 1 Heavy Metal evaluation. *Food Sci. Tech.* 26, 259-263:
- Otsuka T., D. Vallaret, T. Yokota, Y. Talcebe, F. Lee, N. Arai, K. Arai** (1987) Structural analysis of the Mouse chromosomal gene encoding interleukin-4 which expresses B cell, T cell and mast cell stimulating activities. *Nucl. Acid Res.* 15, 333-334
- Palmiter R.D.** (1974) Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes: Expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* 13, 3606-3615.
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA** (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci* 88: 3324-3328.
- Rapoport M.J., D. Zipris, A.H. Lazarus, A. Jaramillo, D.V. Serreze, E.H. Leiter, P. Cyopick, J.S. Danska, T.L. Delovitch** (1993) IL-4 reverses thymic T cell proliferative unresponsiveness and prevents diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* 178. 87-99.

ES 2 336 861 T3

Richards K., H. Guilley, G. Jonard & G. Keith (1977) Leader sequence of 71 nucleotides devoid of G in tobacco mosaic virus RNA. *Nature* 267, 548-550.

5 **Richards K., H. Guilley, G. Jonard & L. Hirth (1978)** Nucleotide sequence at the 5' extremity of tobacco mosaic virus RNA. *Eur. J. Biochem.* 84, 513-519.

10 **Schouten A et al. (1966)** The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Molec. Biol.* 30, 781-793.

Sleat D.E., R. Jull, P.C. Turner & T.M.A. Wilson (1988) On the mechanism of translational enhancement by the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Eur. J. Biochem.* 175, 75-86.

15 **Sijmons P.C., B.M.M. Dekker, B. Schrammeijer, T.C. Verwoerd, P.J.M. van den Elzen & A. Hoekema (1990)** Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology* 8, 217-221.

20 **Vieira, P., de Waal-Maleyfyt, R., Dang, M.N., Johnson, K.E., Kastelein, R., Fiorentino, D.F., de Vries, J.E., Roncarolo, M.G., Mosmann, T.R., and Moore, K.W. (1991)** Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1172-1176.

von **Heijne G. (1986)** A new method for predicting signal cleavage sites. *Nucl. Acids Res.* 14,4683-4690.

25 **Woodleif W.G., J.F. Chaplin, C.R. Campbell, D.W. DeJong (1981)** Effect of variety and harvest treatments on protein yield of close grown tobacco *Tobacco Sci.* 25, 83-86.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de IL-10 para administración oral, que comprende;

- 5
- i) transformar una planta de cultivo no alimenticia, **caracterizada** porque no es tóxica, no adictiva y agradable, con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica IL-10 humano ligado operablemente con regiones reguladoras 5' y 3';
- 10
- ii) seleccionar las plantas de cultivo no alimenticias que expresan IL-10 humano para obtener plantas de cultivo no alimenticias transformadas;
- iii) hacer crecer y cosechar dichas plantas de cultivo no alimenticias transformadas; y
- 15
- iv) obtener tejido de planta que comprende IL-10 humano de dichas plantas de cultivo no alimenticias transformadas.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico se optimiza para utilización de codón.

3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2 en donde dicha planta no alimenticia se **caracteriza** porque tiene bajo nivel de alcaloides.

4. El método de la reivindicación 3 en donde dicha planta de cultivo no alimenticia es una planta de tabaco **caracterizada** porque tiene un bajo nivel de nicotina.

5. El método de la reivindicación 4 en donde, en dicha etapa de transformación, dicha región reguladora 5' se selecciona del grupo que consiste de promotores ubicuos y específicos de tejido.

6. El método de la reivindicación 5 en donde, en dicha etapa de transformación, dicho ácido nucleico incluye un motivo de retención de retículo endoplásmico.

7. El método de la reivindicación 6 en donde dicho ácido nucleico incluye una secuencia de señal de planta.

8. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde dicho tejido de planta que comprende IL-10 obtenido en dicha etapa de obtención (etapa iv) es para administración oral a un animal.

9. Un método para la preparación de IL-10 que comprende extraer IL-10 de dichas plantas de cultivo no alimenticias transformadas de la reivindicación 1 o reivindicación 2.

10. Una composición de proteína preparada por el método de la reivindicación 1 o reivindicación 2 que comprende IL-10 y componentes de planta.

11. La composición de proteína de la reivindicación 10 en donde el cultivo no alimenticio es tabaco.

12. La composición de proteína de la reivindicación 10 en donde el tejido de planta es de hoja.

13. Una composición de proteína preparada por el método de la reivindicación 9 que comprende IL-10 y componentes de planta solubles.

14. El método de la reivindicación 1 en donde, en dicha etapa de transformación, dicho vector también comprenden secuencias que mejoran la expresión de dicho IL-10.

15. El método de la reivindicación 1 en donde, en dicha etapa de transformación, dicho vector codifica una etiqueta de afinidad.

16. El método de la reivindicación 1 en donde dicho vector también codifica un sitio de división proteolítica.

17. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de obtención comprende extraer IL-10 de dicha planta transformada para producir un extracto crudo.

18. El método de la reivindicación 17, en donde dicha etapa de obtención comprende extraer IL-10 de dicha planta transformada y purificar parcialmente dicho IL-10.

19. El método de la reivindicación 4, en donde dicha planta de tabaco comprende de 0.2% a 20% del alcaloide total de Delgold.

ES 2 336 861 T3

20. Uso de una composición de proteína de la reivindicación 10 o reivindicación 13 en la preparación de un medicamento para tratamiento de una insuficiencia médica en un paciente, en donde la insuficiencia médica es enfermedad de Crohn, artritis inducida por colágeno, diabetes, afecciones relacionadas con coagulación sanguínea, afecciones médicas que requieren la estimulación de citoblastos a monocitos/macrófagos, infecciones víricas o regulación de respuestas inmunes.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

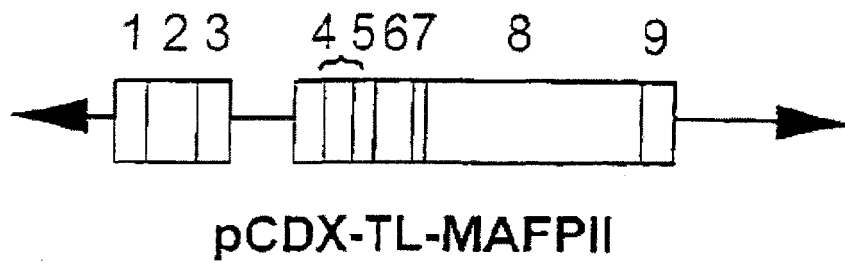


Figura 2

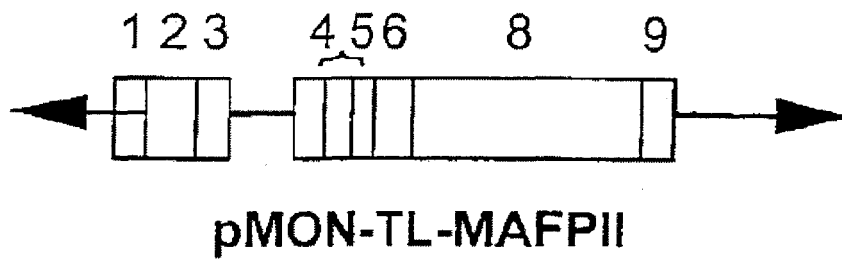


Figura 3

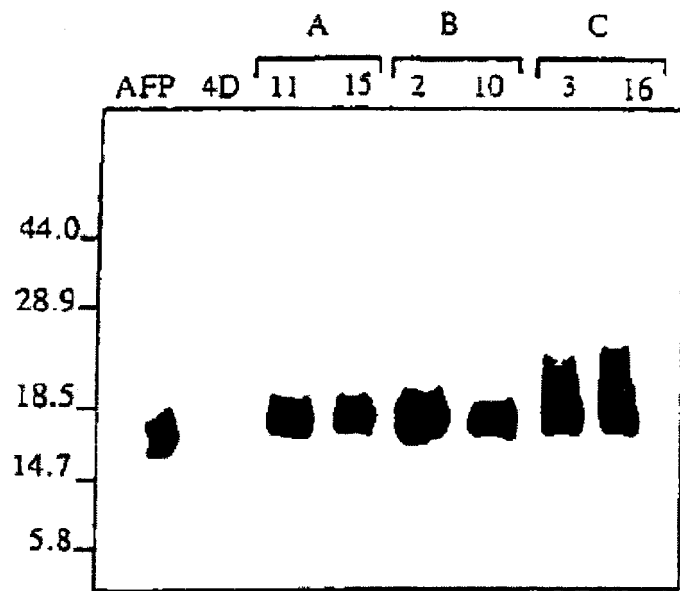


Figura 4

nIL10-5'-BamHI

GGATCCACAGACAGACTTGCABBAAGG Señal de Péptido
 1 aaaccacaagacaqacacttgcacaaagagggcattgcaagctcagcactgtctgttgcctg
 M H S S A L L C C L

61 gtctctccgaactggggggaggggocagcccagggcagggcaccaccagtctgagaatagctgc
 V L L T C V R A S P G Q G T Q S E N S C
 121 acccacttcccaggaacacctgacctaaatgcttccagatctccagatgcccttccagcaga
 T H F P G N L P N N L R D L R D A F S R
 181 gtgaagactttcttcaactgaaggatccgcctggacaacttctgtttaaaggagtcctctg
 Y K T F F Q M K D Q L D N L L L K E S L
 241 ctggaggacttcaagggttacctgqgttgcacagccttgcctgagatgatccagtttcc
 L E D F K G Y L G C Q A L S E M I Q F Y
 301 ctggaggaggtgatgcccaagctgagaaccaagcccccagcattcaaggcgcattgtgaac
 L E E V M P Q A E N Q D P D I K A H V N
 361 tccctgggggagaaacctgagaccctcagcctgaggctacggcgctgtcacccgatttctt
 S L G E N L R T L R L R L R R C H R E L
 421 ccctgtgaaaaaacagagccagggccgtggagcaggtgaaqaatgcccttkaataagctccaa
 P C E N K S K A V E Q V K N A F N K L Q
 481 gagaaggcatttacaaggccatgagtgagtttgacatcttcatcaactacatagaagcc
 E K G I Y K A M S E F D I F I N Y E E A

nIL-10-His-KDEL

M T M K I R N L V P R G S S S G H H H
TACTGTTACTTCTATGCATTCCGACCGGTCCGCCAAGAGACACCCAGTACTA
 541 tacatgacaatgagatcacgaaactgagacatcagggtggcgactctatagactctagga
 Y M T M K I R N *

H H H K D E L *

GTAGTAGGTTTCTGCTCGAGACTTAAGGG
 601 cataaattagaggctctccaaaatcggatct ggggctctgg gatacctgac ccagccctt
 661 gagaacctt attgtacctc tcttatagaa tatttattac ccttgatacc caaacccca
CC AGTTGGGGCT
 721 tttctattta tttactgagc ttctctgtga acgatttaga aagaagcccc atattataat
AAAGTAAAT AACTTAAGG

nIL10-3'-EcoRI

781 ttttttcaat atttattatt ttcacctgtt tttaaqctgt ttcocataggg tgacacacta
 841 tgggtatttga gtgttttaag ataaattata agttacataa gggaggaaaa aaatgttct
 901 ttggggagcc aacagaagct tccattccaa gcttgaccac gctttctage tgttgagctg
 961 ttttccctga cctccctcta atttatcttg tctctgggct tggggcttcc taactgctac
 1021 aaatactctt aggaagagaa accagggagc cctcttgatg attaattcac cctccagctg
 1081 ctoggaggga ttccctaac ctattccc aaccacttca ttcttgaag ctgtggccag
 1141 ctgtttattt ataacaacct aaatttgggt ctaggccggg cgtggtggct cagcctgtt
 1201 atcccagcac ttggggagc tgaggcgggt ggaatcacttg aggtcaggag ttcttaacca
 1261 gctctgtcaa catgggtgaa ccccgctctc actaaaaata caaaaattag ccgggcatcg
 1321 tggcggcac ctgtaatecc agctacttgg gaggctgagg caagagaatt gcttgaaccc
 1381 agggatgga agttgcagtg agctgatatc atcccctgt actccagcct gggcgacaqa
 1441 gcaagactct gtcacaaaa aataaaaaa aaataaaat tggttctaat agaactcag
 1501 ttttaactga atttattcaa tctctctggg aatgttacct tgtttgtctg tcttcatacc
 1561 agattttcat cttgaataaa taactgtatc ttttccat c

Figura 5

PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIÓN IL10 PARA TRANSFORMACIÓN DE PLANTA

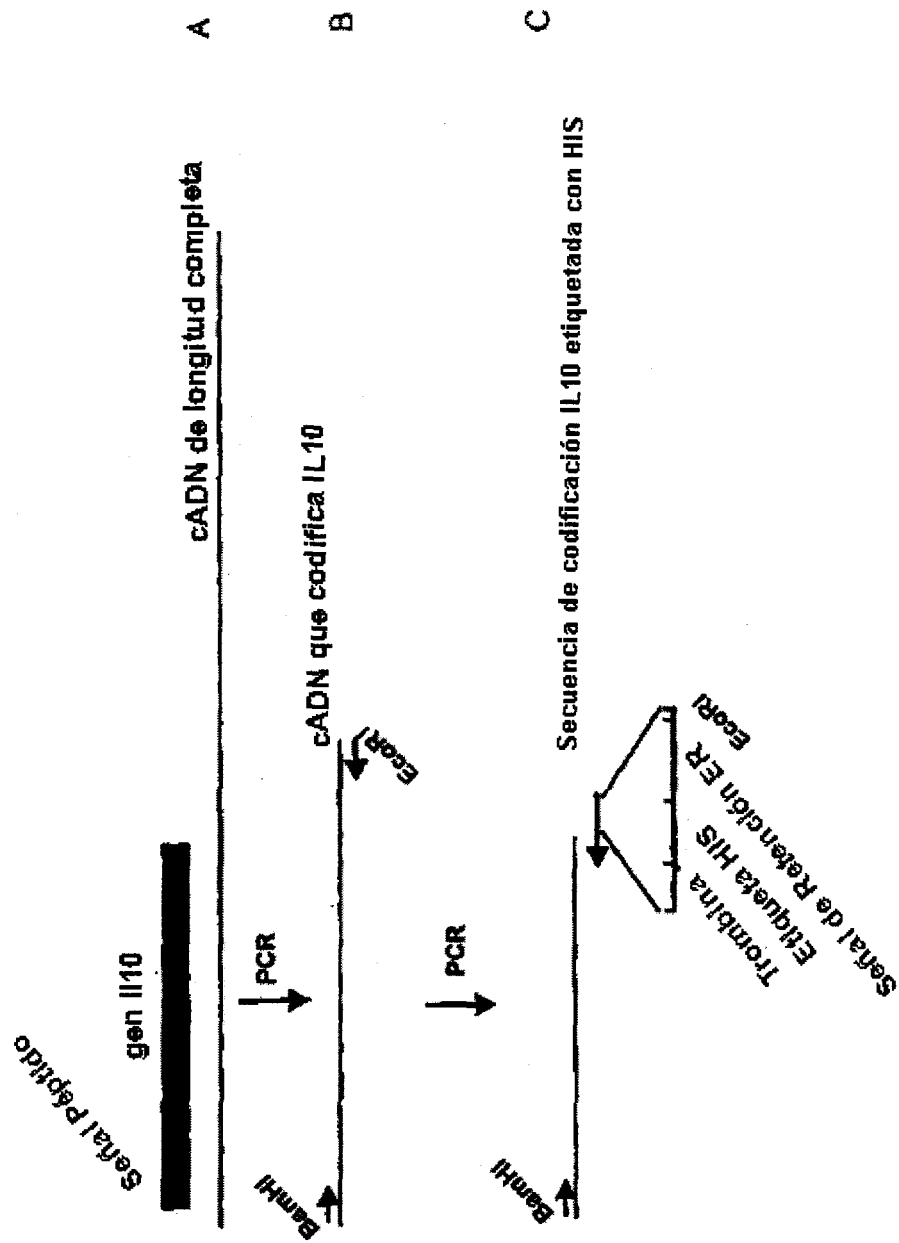


FIGURA 6

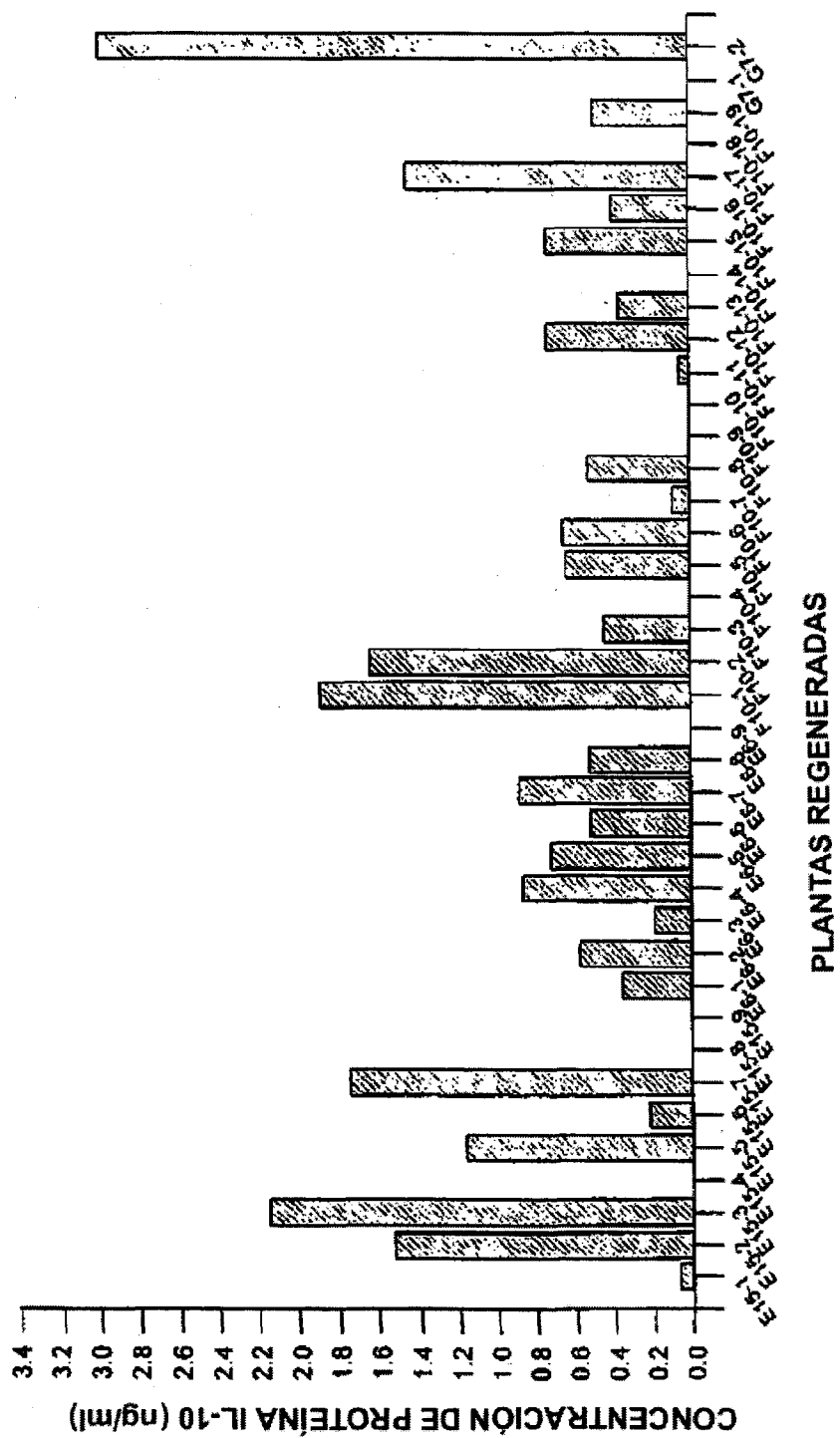


Figura 7

ES 2 336 861 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Jim Brandle
 - (A) NOMBRE Peter Davis
 - 10 (A) NOMBRE: Kimberly Kenward
 - (A) NOMBRE: Rima Mensassa
 - (A) NOMBRE: Tony Jevmikar
 - (A) NOMBRE: Terry Delovitch
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Biorreactor de Plantas de Cultivo no alimenticias
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 12
- 20 (iv) FORMA LEÍBLE POR COMPUTADOR:
- (A) TIPO MEDIO: Unidad de Disco
 - (B) COMPUTADOR: IBM PC compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - 25 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 20 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENAS: sencilla
 - 35 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"
- 40 (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: Virus mosaico de tabaco
- 45 (vii) FUENTE INMEDIATA:
- (B) CLON: 1091
- (viii) POSICIÓN EN GENOMA:
- 50 (C) UNIDADES: bp
- (x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:
- 55 (A) AUTORES: Richards, K
Guilley, H
Jonard, G
Keith, G
 - (B) TÍTULO: Secuencia líder de 71 nucleótidos carece de G en ARN de virus de mosaico de tabaco
 - 60 (C) PUBLICACIÓN: Natural
 - (D) VOLUMEN: 267
 - (F) PÁGINAS: 548-550
 - 65 (G) FECHA: 1977

ES 2 336 861 T3

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: Richards, K
Guilley, H
Jonard, G
Hirth, L

(B) TÍTULO: Secuencia de Nucleótido en la extremidad 5' del ARN de virus de mosaico de tabaco

(C) PUBLICACIÓN: Eur. J. Biochem.

(D) VOLUMEN: 84

(F) PÁGINAS: 513-519

(G) FECHA: 1978

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

GATCCTCGAG TATTTTACA

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 58 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: 1309

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

ACAATTACCA ACAACAACAA ACAACAAACA ACATTACAAT TACTATTTAC AATTACAA

58

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 49 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: 4361

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

ACAATTACCA ACAACAACAA ACAACAAACA ACATTACAAT TACTATTTA

49

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 74 pares base

ES 2 336 861 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"

(vii) FUENTE INMEDIATA:

10

(B) CLON: 1092

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

15

TTGTAATTGT AAATAGTAAT TGTAATGTTG TTTGTTGTTT GTTGTGTGTG GTAATTGTTG 60

TAAAAATACT CGAG 74

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51 pares base

25

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"

(vii) FUENTE INMEDIATA:

35

(B) CLON: 4362

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

CAATTACAAT GGGATTTTTT CTCTTTTCAC AAATGCCAAG CTTTTTCTT G 51

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares base

45

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"

(vii) FUENTE INMEDIATA:

55

(B) CLON: 4363

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

60

TCAGTACTCT TCTCTTATTC CTGATCATAT CTCACTCTTC GCATGC 46

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 aminoácidos

65

(B) TIPO: aminoácido

ES 2 336 861 T3

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLONE: casete de péptido de señal PR

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

Met Gly Phe Phe Leu Phe Ser Gln Met Pro Ser Phe Phe Leu Val Ser
1 5 10 15

Thr Leu Leu Leu Phe Leu Ile Ile Ser His Ser Ser His Ala
20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 56 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: 4364

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

GAGAAGAGTA CTGACAAGAA AAAAGCTTGG CATTGTGAA AAGAGAAAAA ATCCCA 56

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: 4365

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

TAGCATGCCA AGAGTGAGAT ATGATCAGGA ATAA 34

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENAS: sencilla

ES 2 336 861 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"

5

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) COLECCIÓN: 3339

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

10

TATTTTTTAC AACAATTACC AACAAC

26

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

25

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "oligonucleótido"

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: 4708

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

CAGCAGTCAT CTGCATACAG CAC

23

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1645 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

40

(C) CADENAS: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

45

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLONE: hIL-10-His-KDEL

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

55

60

65

ES 2 336 861 T3

	AAACCACAAG ACAGACTTGC AAAAGAAGGC ATGCACAGCT CAGCACTGCT CTGTTGCCTG	60
	GTCCTCCTGA CTGGGGTGAG GGCCAGCCCA GGCCAGGGCA CCCAGTCTGA GAACAGCTGC	120
5	ACCCACTTCC CAGGCAACCT GCCTAACATG CTTTCGAGATC TCCGAGATGC CTTCAGCAGA	180
	GTGAAGACTT TCTTFCAAAT GAAGGATCAG CTGGACAAC TGTGTGTTAAA GGAGTCCTTG	240
10	CTGGAGGACT TTAAGGGTTA CCTGGGTTGC CAAGCCTTGT CTGAGATGAT CCAGTTTTAC	300
	CTGGAGGAGG TGATGCCCCA AGCTGAGAAC CAAGACCCAG ACATCAAGGC GCATGTGAAC	360
15	TCCCTGGGGG AGAACCTGAA GACCCTCAGG CTGAGGCTAC GGCGCTGTCA TCGATTTCTT	420
	CCCTGTGAAA ACAAGAGCAA GGCCGTGGAG CAGGTGAAGA ATGCCITTTAA TAAGCTCCAA	480
20	GAGAAAGGCA TCTACAAAGC CATGAGTGAG TTTGACATCT TCATCAACTA CATAGAAGCC	540
	TACATGACAA TGAAGATACG AAAGTGAAGC ATCAGGGTGG CGACTCTATA GACTCTAGGA	600
	CATAAATTAG AGGTCTCCAA AATCGGATCT GGGGCTCTGG GATAGCTGAC CCAGCCCTT	660
25	GAGAAACCTT ATTGTACCTC TCTTATAGAA TATTTATTAC CTCTGATACC TCAACCCCA	720
	TTTCTATTTA TTTACTGAGC TTCTCTGTGA ACGATTTAGA AAGAAGCCCA ATATTATAAT	780
30	TTTTTTCAAT ATTTATTATT TTCACCTGTT TTTAAGCTGT TTCCATAGGG TGACACACTA	840
	TGTTATTTGA GTGTTTTAAG ATAAATTATA AGTTACATAA GGGAGGAAAA AAAATGTTCT	900
	TTGGGGAGCC AACAGAAGCT TCCATTCCAA GCCTGACCAC GCTTTCTAGC TGTGAGCTG	960
35	TTTTCCCTGA CCTCCCTCTA ATTTATCTTG TCTCTGGGCT TGGGGCTTCC TAACTGCTAC	1020
	AAATACTCTT AGGAAGAGAA ACCAGGGAGC CCCTTTGATG ATTAATTCAC CTTCCAGTGT	1080
40	CTCGGAGGGA TTCCCTAAC CTCATCCCC AACCCTTCA TTCTTGAAAG CTGTGGCCAG	1140
	CTTGTTATTT ATAACAACCT AAATTTGGTT CTAGGCCGGG CCGGGTGGCT CACGCCTGTA	1200
45	ATCCCAGCAC TTTGGGAGGC TGAGGCGGGT GGATCACTTG AGGTCAGGAG TTCCTAACCA	1260
	GCCTGGTCAA CATGGTGAAG CCCCCTCTCT ACTAAAAATA CAAAAATTAG CCGG3CATGG	1320
	TGGCGCGCAC CTGTAATCCC AGCTACTTGG GAGGCTGAGG CAAGAGAATT GCTTGAACCC	1380
50	AGGAGATGGA AGTTGCAGTG AGCTGATATC ATGCCCTGT ACTCCAGCCT GGGTGACAGA	1440
	GCAAGACTCT GTCTCAAAAA AATAAAAAATA AAAATAAATT TGGTTCTAAT AGAACTCAGT	1500
55	TTTAACTAGA ATTTATTCAA TTCCTCTGGG AATGTTACAT TGTTTGTCTG TCTTCATAGC	1560
	AGATTTTAAT TTTGAATAAA TAAATGTATC TTATTACAT CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1620
60	CTCGAGGGGG GGCCGGTACC CAATG	1645

65