



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0617607-0 B1



(22) Data do Depósito: 26/09/2006

(45) Data de Concessão: 10/08/2021

(54) Título: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA EXÓGENA BIOLOGICAMENTE ATIVA EM UMA PLANTA DE ALOE E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PLANTA DE ALOE TRANSGÊNICA QUE EXPRESSA UMA PROTEÍNA BIOLOGICAMENTE ATIVA EXÓGENA À PLANTA

(51) Int.Cl.: C12N 15/82.

(30) Prioridade Unionista: 26/09/2005 US 60/720,540.

(73) Titular(es): THEGREENCELL, INC..

(72) Inventor(es): WILLIAM J. LOWTHER; WEN-SHUI YEOW; KEVIN LORICK; MARISOL PAGES; NICOLA J. LOWTER.

(86) Pedido PCT: PCT US2006037756 de 26/09/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/035966 de 29/03/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/03/2008

(57) Resumo: PLANTA ALOE TRANSGÊNICA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO EM UMA PLANTA DE UMA PROTEÍNA BIOLOGICAMENTE ATIVA EXÓGENA À PLANTA E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PLANTA DE ALOE TRANSGÊNICA A presente invenção apresenta plantas de alce transgênicas e construtos recombinantes para a transformação de plantas de alce, cujos aspectos podem ser aplicados a outras monocotiledôneas. Os construtos recombinantes podem incluir uma ou mais seqüências de DNA que codificam as proteínas de mamífero e pelo menos um promotor capaz de dirigir a expressão de proteínas recombinantes em uma planta de aloe. A presente invenção também apresenta métodos para a construção e reprodução de uma planta de aloe transgênica. A presente invenção inclui métodos para a transfecção de uma planta de aloe com diversos genes de interesse simultaneamente. Os métodos de produção de plantas de aloe da invenção podem propiciar um potencial para a produção em massa barata e com mais segurança de alguns compostos biologicamente ativos incluindo compostos biofarmacêuticos para a terapia, o diagnóstico e a prevenção de doenças, e são mais acessíveis aos países menos afluentes. Os métodos de produção de plantas de aloe também podem produzir proteínas para cosméticos.

**MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA EXÓGENA
BIOLOGICAMENTE ATIVA EM UMA PLANTA DE ALOE E MÉTODO PARA A
PRODUÇÃO DE UMA PLANTA DE ALOE TRANSGÊNICA QUE EXPRESSA UMA
PROTEÍNA BIOLOGICAMENTE ATIVA EXÓGENA À PLANTA**

REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS CORRELATOS

[001] O presente pedido de patente reivindica a prioridade e os benefícios do Pedido de Patente Norte-americano Provisório intitulado TRANSGENIC ALOE PLANTS FOR PRODUCTION OF PROTEINS AND RELATED METHODS depositado em 26 de setembro de 2005 e ao qual foi atribuído o Nº. de Série 60/720.540, que é aqui incorporado em sua totalidade a título de referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Sumário da Invenção

[002] A presente invenção refere-se a plantas transgênicas monocotiledôneas e, mais particularmente, a plantas de aloe transgênicas, e aos métodos e às composições para a produção de uma planta de aloe transgênica e aos métodos para a extração de proteínas das plantas de aloe transgênicas.

Descrição da Técnica Relacionada

[003] Continua havendo um mercado crescente para as proteínas biologicamente ativas, muitas das quais são utilizadas para finalidades terapêuticas. Atualmente, são disponíveis mais de 160 medicamentos à base de proteínas. Cinquenta medicamentos adicionais ou mais estão aguardando a sua aprovação nos próximos anos. A demanda atual pela produção de proteína terapêutica já ultrapassa a capacidade da indústria. Foi previsto que a indústria irá precisar aumentar a sua capacidade em quatro a cinco vezes para superar esse obstáculo. No entanto, as instalações para a produção de proteínas terapêuticas são dispendiosas e tipicamente levam muito tempo para serem

construídas. Consequentemente, existe a necessidade de métodos de produção que sejam mais baratos e possam reduzir o tempo requerido para acelerar a produção.

[004] Alguns métodos de produção de proteínas à base de animais são utilizados. No entanto, estes normalmente introduzem riscos à saúde por causa das doenças. Tais riscos podem surgir da contaminação cruzada com doenças que podem afetar o animal e o usuário final tal como um paciente humano. Consequentemente, existe a necessidade de um método de produção que elimine a possibilidade de contaminação cruzada entre o organismo de produção e o usuário final.

[005] Além disso, muitos métodos de produção atuais requerem processamento extensivo a fim de extrair a proteína terapêutica do animal ou de outro organismo hospedeiro em que ela foi produzida e colocar o composto em uma condição onde ele possa ser utilizado por um paciente. Depois da purificação, a proteína pode ser combinada com um adjuvante ou um outro material carreador para estabilizar a proteína e permitir a utilização por um paciente. No entanto, os processos de extração, purificação, ressuspensão entre outros envolvidos com o processamento de uma proteína terapêutica são complexos e incômodos e podem não conduzir à utilização em países subdesenvolvidos geralmente com necessidade de terapêutica. Consequentemente, existe a necessidade de métodos de produção simplificados que possam eliminar ou reduzir o processamento pós-extração de proteínas terapêuticas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[006] As composições e os métodos de acordo com a presente invenção podem satisfazer muitas das necessidades e deficiências discutidas acima e irão

propiciar melhorias e vantagens adicionais tal como será reconhecido por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição.

[007] Em um aspecto, a presente invenção pode apresentar uma planta de aloe transgênica que incorpora estavelmente um gene de interesse. Em outros aspectos, novos vetores e construtos podem ser providos para integrar as sequências de DNA de interesse no genoma de uma planta de aloe. A sequência de interesse pode codificar para uma proteína biologicamente ativa. A proteína biologicamente ativa pode consistir em interferons, imunoglobulinas, linfocinas, fatores do crescimento, hormônios, fatores sanguíneos, antígenos de histocompatibilidade, enzimas, proteínas cosméticas e outras proteínas de mamíferos ou outras proteínas de interesse. Em alguns aspectos, as proteínas de interesse são proteínas humanas. As plantas de aloe de acordo com a presente invenção podem transcrever e traduzir o gene de interesse na proteína de interesse. Em um aspecto, pelo menos parte da proteína de interesse migra para uma porção central da folha de aloe. Em outros aspectos, a proteína de interesse pode incluir uma sequência de sinal para facilitar a sua translocação para a porção central da folha de aloe. Em outros aspectos, podem ser providas novas metodologias para o isolamento de células individuais a partir de uma planta de aloe. Contudo, em outros aspectos, a presente invenção pode apresentar novos métodos para a integração dos vetores em uma planta de aloe e em uma reprodução de tais plantas de aloe transgênicas.

[008] As plantas de aloe transgênicas que produzem proteínas de mamíferos de acordo com a presente invenção podem propiciar uma alternativa mais economicamente viável para a produção das proteínas de interesse tais como, por exemplo, várias proteínas biologicamente ativas e cosméticas. Em um aspecto, as proteínas de interesse podem ser localizadas

e/ou concentradas dentro do gel da folha de aloe. Essa localização das proteínas de interesse pode simplificar a remoção da proteína da planta. Nesse aspecto, a proteína de interesse pode ser co-extraída juntamente com a extração do gel nativo dentro da porção central da folha de aloe. Consequentemente, a presente invenção pode apresentar uma planta transgênica a partir da qual as proteínas de interesse são geralmente mais facilmente acessíveis do que aquelas da maioria das plantas transgênicas tais como, por exemplo, o tabaco e o milho. Além disso, a presente invenção pode apresentar um método eficiente para o isolamento de proteínas. Contudo, em outros aspectos, as proteínas de interesse podem não estar particularmente localizadas dentro da planta de aloe. No entanto, a anatomia e a fisiologia da planta de aloe podem ainda conferir determinadas vantagens adicionais para a produção da proteína de interesse tal como será reconhecido por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição.

[009] As plantas de aloe podem propiciar várias vantagens em relação aos métodos convencionais de produção das proteínas de interesse em bactérias e leveduras. As vantagens das plantas de aloe podem incluir a capacidade de processamento de proteínas de maneiras que as bactérias e leveduras unicelulares simples não são muito adequadas e que podem ser necessárias para produzir as proteínas na forma desejada. Esse processamento pode incluir a modificação química, tal como através da glicosilação e do desdobramento de algumas proteínas, por exemplo. Além disso, em comparação com outros métodos de produção de proteína à base de células animais, a produção de plantas de aloe pode oferecer custos-benefícios significativos, vantagens de escalabilidade e um risco reduzido de contaminação que pode ser prejudicial aos seres humanos.

[010] Um gel modificado por proteína da porção central da folha de aloe de uma planta de aloe transgênica de acordo com a presente invenção pode ser utilizado diretamente da planta de aloe. Isto pode evitar a necessidade de extração relativamente complexa e dispendiosa das proteínas de interesse dos materiais de planta nativa. Em alguns aspectos, o gel extraído da folha pode ser utilizado diretamente sem a necessidade de extração ou processamento da proteína. O gel pode estar na forma de seiva extraída mecanicamente de uma extremidade aberta de uma folha quebrada de uma planta de aloe transgênica.

[011] A presente invenção pode apresentar alternativas economicamente viáveis para a produção de proteínas de seres humanos e outros mamíferos que sejam biologicamente ativas e/ou tenham aplicações cosméticas.

[012] No momento da revisão da presente descrição, um técnico no assunto irá reconhecer melhorias e vantagens adicionais da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[013] A Figura 1 ilustra um exemplo da anatomia em seção transversal de uma folha de aloe;

a Figura 2 ilustra exemplos de métodos para a geração do tecido de calo;

a Figura 3 esboça diagramaticamente várias etapas para a geração de uma planta de aloe transgênica;

a Figura 4 ilustra diagramaticamente componentes de um vetor de plasmídeo incluindo as informações sobre sequência (sequência de DNA revelada como SEQ ID NO:45 e sequência de proteína revelada como SEQ ID NO: 46);

a Figura 5 lista as informações sobre sequência para o promotor de ubiquitina do milho e destaca regiões do promotor de ubiquitina (SEQ ID NO: 44);

as Figuras 6A e 6B ilustram a construção de um sistema de vetor de

plasmídeo de acordo com os aspectos da presente invenção;

as Figuras 7A a 7C ilustram a construção de um outro sistema de vetor de plasmídeo de acordo com os aspectos da presente invenção;

a Figura 8 ilustra a construção de um sistema de vetor de plasmídeo adicional de acordo com os aspectos da presente invenção; e

a Figura 9 ilustra a construção de sistemas de integração de acordo com os aspectos da presente invenção.

[014] Todas as Figuras são ilustradas apenas para fins de facilitar a explanação dos ensinamentos básicos da presente invenção; as extensões das Figuras com respeito ao número, à posição, à sequência, à relação e às composições das várias realizações serão explicadas ou estarão dentro da habilidade da técnica após a revisão da seguinte descrição. Além disso, os vários protocolos, ferramentas e composições para a prática das invenções descritas estarão dentro da habilidade da técnica após a revisão da descrição seguinte.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[015] Conforme utilizado no relatório descritivo, "um" ou "uma" pode significar um ou mais. Conforme utilizado nas reivindicações, quando utilizadas conjuntamente com a palavra "que compreende", as palavras "um" ou "uma" podem significar um ou mais de um. Conforme utilizado na presente invenção, "um outro" pode significar pelo menos um segundo ou mais.

[016] Conforme utilizado na presente invenção, uma "célula de aloe transformada" significa uma célula de planta que é transformada com o DNA recombinante estavelmente integrado, não-natural, por exemplo, pela transformação mediada por *Agrobacterium* ou pelo bombardeamento utilizando micropartículas revestidas com o DNA recombinante ou outros meios. Uma célula de Aloe transformada da invenção pode ser uma célula de

planta originalmente transformada que existe como um microorganismo ou como uma célula de planta de progênie que é regenerada como um tecido diferenciado, por exemplo, em uma planta de Aloe transgênica 10 com DNA recombinante estavelmente integrado, não-natural, ou semente ou pólen derivado de uma planta de Aloe transgênica de progênie 10.

[017] Conforme utilizado na presente invenção, uma "planta de aloe transgênica" significa uma planta de aloe cujo genoma é alterado pela integração estável do DNA recombinante. Uma planta de aloe transgênica 10 inclui uma planta de aloe regenerada de uma célula de aloe originalmente transformada e as plantas de aloe transgênicas de progênie de gerações ou de cruzamentos posteriores de uma planta aloe transformada 10.

[018] Conforme utilizado na presente invenção, um "DNA recombinante" significa um DNA que foi desenhado geneticamente e construído fora de uma célula incluindo o DNA que contém o DNA que ocorre naturalmente, cDNA, o DNA sintético e/ou outro DNA.

[019] Conforme utilizado na presente invenção, o "promotor" significa o DNA regulador para a inicialização da transcrição. Um "promotor de planta" é um promotor com capacidade de iniciar a transcrição em células de aloe quer a sua origem seja uma célula de aloe ou não, por exemplo, é bem sabido que os promotores de Agrobacterium são funcionais em células de aloe. Desse modo, os promotores de planta incluem o DNA do promotor obtido das plantas, dos vírus e das bactérias das plantas tais como as bactérias Agrobacterium e Bradyrhizobium. Os exemplos de promotores sob o controle de desenvolvimento incluem os promotores que iniciam preferencialmente a transcrição em determinados tecidos, tais como as folhas, as raízes ou as sementes. Tais promotores são denominados como "preferidos de tecido". Os promotores que iniciam a transcrição somente em determinados tecidos são

denominados como "específicos de tecido". Um promotor específico de um "tipo de célula" dirige principalmente a expressão em determinados tipos de células dentro de um ou mais órgãos, por exemplo, células vasculares nas raízes ou nas folhas. Um promotor "indutível" ou "repressível" é um promotor que está sob o controle ambiental. Os exemplos de condições ambientais que podem afetar a transcrição por promotores indutíveis incluem as condições anaeróbicas ou determinados químicos, ou a presença de luz. Os promotores específicos de tecido, preferidos de tecido, específicos de tipos de células e os promotores indutíveis constituem a classe de promotores "não-constitutivos". Um promotor "constitutivo" é um promotor que é ativo sob a maior parte das condições. O promotor pode incluir intensificadores ou outros elementos que afetem a iniciação da transcrição, o sítio de início da transcrição, os níveis da transcrição, o sítio de fim da transcrição ou qualquer pós-processamento do ácido ribonucléico resultante.

[020] O termo "construto genético", conforme utilizado na presente invenção, é definido como uma sequência de DNA que compreende um arranjo sintético de pelo menos dois segmentos de DNA para a finalidade de criar uma planta de aloe transgênica. Em uma realização específica, um segmento é uma sequência reguladora e um outro segmento codifica um produto do gene.

[021] Conforme utilizado na presente invenção, "ligados de modo operável" significa a associação de dois ou mais fragmentos de DNA em um construto de DNA de modo que a função, por exemplo, de um DNA de codificação de proteína, seja controlada pelo outro, por exemplo, um promotor, uma sequência de terminação, etc.

[022] O termo "transcrição", conforme utilizado na presente invenção, é definido como a geração de uma molécula de RNA a partir de um molde de DNA.

[023] O termo "tradução", conforme utilizado na presente invenção, é definido como a geração de um polipeptídeo de um molde de RNA.

[024] Conforme utilizado na presente invenção, "expresso" significa produzido, por exemplo, uma proteína é expressa em uma célula de planta quando o seu DNA cognato é transcrito para o mRNA que é traduzido para a proteína.

[025] A presente invenção pode apresentar novas plantas de aloe transgênicas 10 que expressam várias proteínas de interesse, pode apresentar métodos e composições para a produção de plantas de aloe transgênicas 10, pode apresentar métodos para a extração de proteínas das plantas de aloe transgênicas 10 e pode apresentar novas composições das proteínas de interesse e componentes da planta de aloe transgênica 10. As proteínas de interesse produzidas de acordo com a presente invenção podem incluir um sinal secretório para facilitar a sua acumulação na seiva 18 ou na seiva de uma folha de aloe 12. Em um aspecto, essa acumulação pode ocorrer, pelo menos em parte, dentro das células musalegenosas da folha de uma planta de aloe transgênica 10.

[026] A seiva 18 ou a polpa de uma folha de aloe 12 inclui os componentes da folha que, pelo menos em parte, são denominados geralmente como "gel" quando extraídos da folha de aloe 12. Conforme utilizado na presente invenção, o "gel" irá se referir à seiva extraída 18 e a outros materiais associados que acompanham a seiva 18 enquanto ela é extraída da folha de aloe 12, independentemente do grau de processamento subsequente. De acordo com um ou mais aspectos da presente invenção, o gel da folha de aloe 12 pode ter uma composição modificada. Em um aspecto particular, a composição do gel pode ser modificada de modo a incluir pelo menos um componente de proteína exógeno que é denominado como um "gel

modificado por proteína”. A extração de um gel modificado por proteína com a(s) proteína(s) associada(s) de interesse pode propiciar proteínas facilmente acessíveis e/ou métodos eficientes para o isolamento de proteínas. O gel modificado por proteína produzido e/ou extraído de acordo com a presente invenção pode ser utilizado diretamente sem a necessidade de extração da proteína.

[027] Os aspectos da presente invenção são ilustrados de maneira geral nas Figuras 1 a 8 para finalidades exemplificadoras. A presente invenção apresenta plantas transgênicas, composições e metodologias que são geralmente aplicáveis ao gênero aloe da família Liliaceae. Tipicamente, a presente invenção descrita com referência à aplicação na espécie é selecionada do grupo Aloe vera (barbadensis miller), Aloe ferox e Aloe arborescence para finalidades exemplificadoras. O gênero Aloe inclui geralmente um grupo de plantas monocotiledôneas grandes, suculentas de roseta sem caule. Essas plantas são geralmente denominadas plantas de aloe 10 para as finalidades da presente descrição.

[028] Vários compostos produzidos por plantas de aloe foram utilizados para finalidades medicinais. Esses compostos, quando presentes em um gel modificado por proteína, podem complementar as propriedades medicinais das proteínas biologicamente ativas de uma planta de aloe transgênica 10 de acordo com a presente invenção. A Figura 1 ilustra uma seção transversal através de uma folha 12 de uma planta de aloe transgênica 10. As folhas da planta de aloe transgênica 10 incluem uma mistura gelatinosa, facilmente extraível, de proteínas, carboidratos e água, e incluída no gel que é derivado principalmente da seiva 18. Essa mistura gelatinosa fica situada principalmente na porção central de uma folha de aloe 12. Foi demonstrado que vários compostos no gel têm uma série de propriedades e de utilizações medicinais.

Em um aspecto, o gel e/ou a seiva 18 estabiliza uma proteína transgênica produzida por uma planta de aloe transgênica 10 e localizada no gel e/ou na seiva 18.

[029] A Figura 1 ilustra particularmente a epiderme 14, o córtex ou o mesófilo 16 e a seiva ou a polpa 18. A epiderme 14 forma a camada externa de células da folha. Em um aspecto da presente invenção, uma planta de aloe transgênica pode incluir células de aloe em um ou em mais desses tecidos que incorporam transiente ou estavelmente um construto genético que é expressado pela célula de aloe. O córtex 16 inclui as células ricas em cloroplastos bem como os feixes vasculares, o xilema e o floema. A seiva 18 é o parênquima esponjoso composto quase que exclusivamente de células do córtex grandes e, pelo menos em parte, representa o gel onde pode ser vantajosa a incorporação ou a acumulação de uma ou mais proteínas transgênicas de interesse.

[030] A epiderme 14 consiste tipicamente em uma única camada externa de células. Imediatamente abaixo da epiderme 14, fica o córtex 16 incluindo a rede de feixes vasculares. O suporte externo dos feixes vasculares é formado geralmente pelas células de revestimento. Os feixes vasculares são compostos por três tipos gerais de estruturas tubulares: o xilema, o floema e os túbulos pericíclicos grandes associados. O xilema transporta a água e os minerais das raízes à folha da planta. O floema transporta os amidos e outros materiais sintetizados por toda a planta. Os túbulos pericíclicos contêm um látex ou uma seiva que é muito rica em antraquinonas laxantes, especialmente a aloina. As antraquinonas absorvem os raios ultravioletas do sol e impedem o superaquecimento da porção central da folha de aloe 12 que funciona geralmente como o órgão de armazenagem de água da planta de aloe. A porção pericíclica dos feixes vasculares é aderente à epiderme 14, sendo que o

restante dos feixes vasculares se projeta na seiva 18. A porção mais interna e principal da folha de aloe 12 é a seiva 18 que, pelo menos em parte, constitui o gel. Para finalidades de extração de gel, a epiderme 14 e o córtex 16 podem geralmente ser considerados como compreendendo o revestimento que contém o gel. O gel extraído, que compreende substancialmente a seiva 18, é uma substância tipicamente espessa e viscosa que tem sido historicamente aplicada topicamente na pele para finalidades medicinais, por exemplo, tal como uma terapia para queimaduras e feridas.

[031] O gel funciona geralmente como um reservatório de materiais para a planta de aloe. O córtex 16 sintetiza tipicamente muitos dos carboidratos e das glicoproteínas que são necessárias para a planta de aloe. Os carboidratos sintetizados em excesso são transportados tipicamente a seiva 18 para armazenagem em conjunto com a água e alguns minerais. Os carboidratos são transportados pelos vasos do floema aos grandes vacúolos dentro das células do córtex 16 da seiva 18. A água é então atraída osmoticamente aos carboidratos, permitindo que a seiva 18 funcione como um órgão de armazenagem de água da planta de aloe.

[032] O gel é extraído de um modo relativamente fácil ao rasgar uma folha de aloe 12 ao longo de seu eixo longitudinal e ao esmagar a folha para forçar o gel do revestimento circunvizinho em direção ao rasgo. Materiais adicionais podem ser extraídos dos tecidos da folha junto com o gel.

Visão Geral do Processo

[033] As plantas de aloe transgênicas 10 de acordo com uma ou mais das presentes invenções incluem geralmente um ou mais construtos de DNA incorporados estavelmente dentro da planta para expressar uma ou mais proteínas de interesse. A geração de uma planta de aloe transgênica 10 de acordo com uma ou mais das presentes invenções pode envolver uma

variedade de novas composições e métodos. Tipicamente, um ou mais construtos de DNA são desenvolvidos para expressar uma ou mais proteínas na planta de aloe transgênica 10. Em um aspecto, um único construto pode expressar um único mRNA. Em outros aspectos, um único construto pode expressar um mRNA múltiplo. Contudo, em outros aspectos, múltiplos construtos podem produzir um mRNA múltiplo. Cada mRNA pode produzir um ou mais polipeptídeos.

[034] Para introduzir os construtos nas plantas de aloe, as células de aloe ou o tecido de calo não-diferenciado são utilizados tipicamente tal como ilustrado geralmente na Figura 2. As células de aloe e o tecido de calo são derivados tipicamente dos tecidos do meristema da raiz ou da folha ou de uma semente de uma planta de aloe. Os construtos de DNA são introduzidos nas células de aloe utilizando uma variedade de técnicas e/ou construtos, tal como ilustrado diagramaticamente na Figura 3. Algumas técnicas serão reconhecidas por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição. As células de aloe ou o tecido de calo que incorpora os construtos desejados são selecionados utilizando várias técnicas. Tipicamente, o construto de DNA deve incluir um marcador selecionável. Uma vez que o construto desejado tenha sido introduzido estavelmente nas células de aloe ou no tecido do calo, as plântulas de aloe são geradas tipicamente a partir das células de aloe ou do tecido do calo. As plântulas de aloe que se tornam as plantas de aloe transgênicas 10 viáveis que contêm os construtos de DNA podem produzir constitutivamente ou produzir indutivamente a(s) proteína(s) desejada(s) de interesse. A proteína de interesse pode ser localizada na planta de aloe transgênica 10 ou pode ser encontrada geralmente por toda a planta de aloe transgênica 10, dependendo da proteína particular que está sendo produzida e/ou da presença ou ausência de uma sequência de sinal associada com a

proteína. Dependendo do construto e/ou das proteínas associadas particulares de interesse, a planta de aloe transgênica 10 pode ser então vegetativa ou sexualmente propagada. As proteínas podem ser isoladas das plantas de aloe transgênicas 10 utilizando uma ampla faixa de técnicas. As proteínas podem ser então adicionalmente isoladas e/ou adicionalmente processadas. Tal processamento pode incluir a modificação enzimática, a modificação química, a incorporação em um adjuvante apropriado, entre outros processamentos que serão reconhecidos por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição. Em um aspecto, as proteínas podem ser processadas a partir de uma forma inativa (precursor) em uma forma ativa para as aplicações específicas da proteína particular.

Isolamento de células

[035] Conforme mostrado na sequência exemplificadora ilustrada na Figura 2, as células de aloe ou os grupos de células de aloe são isolados tipicamente de uma planta de aloe antes da incorporação do construto desejado. Os tipos de células de aloe escolhidos geralmente para a incorporação de construtos de DNA são escolhidos geralmente com base em seu potencial regenerativo. As células meristemáticas do meristema do broto ou do meristema da raiz de uma planta de aloe ou de células de aloe embrionárias de uma semente de aloe podem ser utilizadas. No entanto, muitas partes da planta de aloe retêm o potencial de crescer novamente ou de formar tecido de calo e também podem ser utilizadas. As células são isoladas ao empregar tipicamente uma gama de técnicas que serão reconhecidas por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição. Tipicamente, as células são isoladas mecanicamente da planta de aloe utilizando um bisturi. Alternativamente, outras técnicas mecânicas ou diferentes destas podem ser utilizadas para isolar as células necessárias, tal

como será reconhecido por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição. Uma vez que uma célula de aloe ou um grupo apropriado de células de aloe é isolado, as células de aloe crescem tipicamente na cultura para formar o tecido de calo. Embora determinadas técnicas possam não requerer que as células de aloe sejam primeiramente cultivadas no tecido de calo, o tecido de calo fornece uma fonte de um conjunto de células de aloe não-diferenciadas que retém o potencial para gerar uma planta de aloe transgênica 10. O tecido de calo cresce tipicamente em um meio sólido. No entanto, o tecido de calo também pode ser colocado em um meio de cultura líquido e pode crescer em suspensão.

[036] As células meristemáticas podem ser isoladas das pontas das raízes ou da folha de uma planta de aloe. As células de aloe meristemáticas também podem ser isoladas do meristema apical. Tipicamente, a planta de aloe a partir da qual os tecidos são isolados é uma planta de aloe jovem e saudável. A planta de aloe é selecionada tipicamente para que seja menor do que oito (8) polegadas com seis (6) brotos primários ou menos. Uma ferida é formada tipicamente em um broto de uma planta de aloe ao cortar a mesma em segmentos. A superfície ferida pode incentivar as células de aloe a crescer. Tipicamente, é principalmente na superfície de corte que o calo irá começar a crescer. Para isolar as células de aloe de uma folha de aloe 12, os segmentos são cortados tipicamente a partir da extremidade distal de um broto jovem em crescimento. As porções do segmento são então chapeadas em um meio de crescimento. O tecido do meristema apical do broto é derivado de um corte de uma polegada da base de uma planta de aloe jovem. As folhas de aloe 12 são removidas do corte e o segmento é chapeado. As células de aloe do meristema são encontradas dentro do "corte". Elas são "selecionadas" ou "isoladas" por sua capacidade de continuar a crescer na placa de cultura - formando tecido de

calo ou brotos que se regeneram. As células de aloe meristemáticas isoladas uma vez são então cultivadas em um meio apropriado e sob condições que promovam a formação de tecido de calo.

[037] O isolamento de células de aloe embrionárias das sementes envolve geralmente a remoção do revestimento da semente para expor o embrião e a remoção mecânica das células de aloe desejadas do embrião. As sementes de aloe são tipicamente esterilizadas e as cascas secas externas da semente são removidas. Para remover mecanicamente as células de aloe de uma planta de aloe ou de um embrião de aloe, um bisturi é tipicamente utilizado. As células de aloe embrionárias, uma vez isoladas do revestimento da semente, são então cultivadas em um meio apropriado e sob condições que promovam a formação do tecido de calo.

[038] Quando o tecido de calo é desejado, as células de aloe isoladas crescem tipicamente sob condições que favorecem a formação do tecido de calo, tal como será reconhecido por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição. Tipicamente, as células de aloe isoladas são chapeadas e crescem em um meio nutriente sólido apropriado para a formação de tecido de calo, com um tamanho de aproximadamente 1 cm de diâmetro antes da transformação. As células de aloe crescem tipicamente entre 23 e 26 graus Celsius. Os meios apropriados incluem um sólido ou líquido base que inclui tipicamente nutrientes inorgânicos suplementares - ambos macroelementos (tais como nitrogênio, enxofre, fósforo, cálcio, magnésio e potássio) e microelementos (tais como ferro, boro, cobalto, cobre, iodo, manganês, molibdênio e zinco); nutrientes orgânicos incluindo açúcares (sacarose ou maltose) e vitaminas e cofatores (tiamina, niacina, biotina, piridoxina, mio-inositol entre outros); aminoácidos (tais como o hidrolisado de prolina e de caseína); bem como reguladores do crescimento principalmente

uma fonte de auxina (tipicamente ácido 1-naftalenoacético (NAA), indol-3-ácido acético (IAA), ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)) e uma fonte de citocinina (tipicamente 6-benzil amino purina (BAP)). Esses meios e vitaminas estão tipicamente comercialmente disponíveis em composições pré-formuladas com concentrações variáveis de nutrientes e de vitaminas inorgânicas e são conhecidos, entre outros, como meio de MS (Murashige-Skoog), meio Gamborg ou meio Chu N6. Adicionalmente, as células que cresceram nas placas de Petri requerem tipicamente que um suporte de matriz sólida, tal como o agar, seja adicionado aos meios de crescimento.

Formação de Construtos de DNA

[039] Os construtos de DNA apropriados são introduzidos tipicamente no tecido de calo derivado das células de aloe isoladas para permitir a produção da(s) proteína(s) de interesse pela planta de aloe transgênica 10 resultante. Os construtos de DNA também podem ser introduzidos nas células de aloe isoladas ou nas plantas de aloe maduras, tal como pode ser reconhecido por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição. Os construtos de DNA são incorporados tipicamente em um vetor tal como um plasmídeo ou um vírus para a propagação do construto e para a introdução nas células de aloe. Um vetor de plasmídeo exemplificador pode incluir o plasmídeo introduzido no mercado sob o nome comercial pZErO pela Invitrogen (Carlsbad, Califórnia), ilustrado diagramaticamente na Figura 4 para finalidades exemplificadoras e pode incluir uma ou mais das unidades funcionais, por exemplo, desse plasmídeo.

[040] Os construtos de DNA de acordo com a presente invenção podem incluir uma sequência de promotor que pode funcionar em uma célula de aloe, uma sequência que codifica uma proteína de interesse, uma sequência de terminal e um sítio de início e de fim translacional que podem funcionar em

uma célula de aloe. Esses componentes, quando configurados e combinados corretamente, podem iniciar a transcrição do DNA e a tradução do mRNA e de sua terminação respectiva em uma célula de aloe. O construto de DNA também pode incluir um sinal de secreção. Alternativamente, algumas proteínas de interesse, tais como, por exemplo, interferon, podem incluir um domínio, natural ou sintético, que alveja o interferon para a secreção. O sinal de secreção é tipicamente clivado à medida que a proteína sai da célula ou, em alguns casos, pode ser retido pela proteína sem afetar substancialmente a função da proteína. Os sinais secretórios podem ser adicionados a uma variedade de proteínas que podem requerer sinais secretórios para a translocação. Esses sinais secretórios podem ser derivados de várias sequências de secreção de planta. O construto de DNA ou um vetor associado também pode incluir pelo menos um marcador selecionável. Em um aspecto, o construto de DNA pode incluir um primeiro marcador selecionável para a propagação do vetor nas bactérias e um marcador selecionável para o crescimento em células de aloe. Além disso, o construto de DNA pode incluir outros elementos reguladores para a expressão em células de aloe específicas na planta de aloe 10. Outros componentes do construto podem incluir elementos reguladores adicionais, tais como os líderes 5' e os íntrons para intensificar a transcrição, as regiões 3' não-traduzidas (tais como os sinais e sítios de poliadenilação), DNA para peptídeos em trânsito. A amplificação de uma sequência de DNA desejada, tal como uma sequência que codifica uma proteína terapêutica desejada, pode ser executada pela reação em cadeia de polimerase (vide as Patentes U.S. Nº. 4.683.202 e 5.928.906, cada uma das quais é aqui incorporada a título de referência). No momento da revisão da presente descrição, um técnico no assunto irá reconhecer que os construtos de DNA, incluindo as sequências de promotor, as sequências reguladoras, as

sequências de estabilização, as sequências de alvejamento e/ou as sequências de terminação podem ser modificados para afetar a sua função utilizando os métodos conhecidos por um técnico no assunto.

[041] Conforme observado acima, tipicamente é utilizado um promotor que é operável em uma célula de aloe. O promotor contém tipicamente os elementos genéticos aos quais as proteínas e as moléculas reguladoras podem se ligar. Essas proteínas incluem tipicamente a RNA polimerase e outros fatores da transcrição. O promotor é ligado de modo operável em uma posição e/ou orientação funcional a uma sequência de ácido nucléico para controlar a iniciação e/ou a expressão transcricional dessa sequência. O promotor pode ou não ser utilizado conjuntamente com um "intensificador", que se refere a uma sequência reguladora com atuação em *cis* envolvida na ativação transcricional de uma sequência de ácido nucléico.

[042] Naturalmente, será importante empregar um promotor e/ou um intensificador que dirija eficazmente a expressão do segmento de DNA em pelo menos um tipo de célula de uma planta de aloe 10 em que a expressão é desejada. Um técnico no assunto de biologia molecular geralmente conhece a utilização dos promotores, intensificadores e as combinações de tipos de células para a expressão da proteína, por exemplo, vide Sambrook et al. (1989), incorporado na presente invenção a título de referência. Os promotores empregados podem ser constitutivos, específicos de tecido, indutíveis e/ou úteis sob condições apropriadas para dirigir a expressão de nível elevado do segmento introduzido do DNA, tal como é vantajoso na produção em grande escala de peptídeos e/ou proteínas recombinantes. O promotor pode ser heterólogo ou endógeno. Os construtos de DNA requerem tipicamente os sinais reguladores de iniciação e terminações transcricional e translacional capazes de funcionar nas células de aloe. Uma ampla variedade de sequências

que regulam a iniciação transcricional pode ser utilizada. As sequências de DNA que controlam a iniciação da transcrição podem advir de *Agrobacterium*, vírus ou plantas. A região de iniciação da transcrição viral 35S do vírus de mosaico da couve-flor (35S-CaMV) pode ser utilizada para as plantas de aloe 10. Os promotores de plantas que podem ser utilizados na planta de aloe 10 também podem incluir o promotor de subunidade pequeno de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (RUBISCO) de várias plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas ou o promotor de ubiquitina do milho. Outros promotores apropriados podem ser utilizados e podem ser reconhecidos por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição. Se a regulação indutível for desejada, os domínios podem ser obtidos a partir de diferentes fontes, de modo que uma região reguladora de uma fonte seja combinada com um domínio de ligação de polimerase de RNA de uma outra fonte. A regulação da expressão pode ser um estágio particular do desenvolvimento de uma planta de aloe transgênica 10 em uma parte específica da planta de aloe transgênica 10 tais como as raízes, as folhas, as sementes, as flores, a seiva ou em uma combinação de partes da planta e de estágios desenvolvimentais. A regulação da expressão a um estágio particular do desenvolvimento ou do tecido pode requerer elementos adicionais do DNA, tal como será reconhecido por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição.

[043] Numerosos outros promotores que são ativos em células de planta foram descritos na literatura e podem ser úteis nas células de aloe. Estes incluem os promotores presentes nos genomas de plantas, bem como os promotores de outras fontes, incluindo: os promotores da sintase de nopalina (NOS) e os promotores da sintase de octopina (OCS) carregados nos plasmídeos indutores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*; e promotores de caulimovírus tais como o vírus de mosaico da couve-flor. Além disso, vários

outros promotores também foram identificados em várias referências, incluindo, mas sem ficar a eles limitadas, as Patentes U.S. Nº. 5.858.742 e 5.322.938, que descrevem versões do promotor constitutivo derivado do vírus de mosaico da couve-flor (CaMV35S); a Patente U.S. Nº. 5.641.876, que descreve um promotor de actina do arroz; a Publicação do Pedido de Patente 2002/0192813A1, que descreve os elementos 5', 3' íntron úteis no projeto de vetores eficazes da expressão de plantas; o Pedido de Patente U.S. Nº. de Série 09/757.089, que descreve um promotor de aldolase de cloroplastos do milho; o Pedido de Patente U.S. Nº. de Série 08/706.946, que descreve um promotor de glutelina do arroz; o Pedido de Patente U.S. Nº. de Série 09/757.089, que descreve um promotor de aldolase do milho (FDA); e o Pedido de Patente U.S. Nº. de Série 60/310.370, que descreve um promotor da sintase de nicotianamina do milho, os quais são incorporados na presente invenção a título de referência. Estes e numerosos outros promotores que funcionam em células de plantas podem ser operáveis em uma planta de aloe transgênica para a expressão de proteínas terapêuticas desejadas.

[044] Como um exemplo particular, o promotor de ubiquitina (SEQ ID NO: 44) do milho pode ser utilizado. O promotor de ubiquitina do milho é um elemento grande, com quase 2 kb de comprimento, composto por pelo menos três regiões gerais. A sua sequência é relacionada na Figura 5 com as características particularmente relevantes etiquetadas. A primeira seção do promotor de ubiquitina que fica situada na extremidade superior 5' contém as regiões de fixação da matriz (MARs) que são os elementos que interagem com os históicos e outras proteínas nucleares e servem para "formar laços" nas sequências de flanqueamento, tornando as mesmas mais facilmente acessíveis à maquinaria transcricional da célula. Eles também ajudam a isolar as unidades transcricionais umas das outras, o que é importante para impedir que a

transcrição iniciada em um lugar "seja lida" em uma segunda sequência. Isto pode ajudar a reduzir o risco da criação de mensagens anti-sentido.

[045] A segunda seção contém os elementos do intensificador e o promotor real. Os elementos do intensificador ligam os fatores da transcrição que são responsáveis por dirigir a maquinaria transcricional, o complexo pol II, para se ligar ao promotor e iniciar a transcrição. Embora o "promotor" se refira especificamente aos elementos essenciais do DNA necessários para interagir com a maquinaria de iniciação da transcrição do núcleo, o termo promotor é utilizado de maneira mais genérica de modo a englobar todos os elementos do DNA envolvidos com a iniciação da transcrição e, neste caso, o "promotor de ubiquitina" é utilizado livremente para significar qualquer região de 2kb ou as modificações de 5' para o gene clonado de interesse.

[046] A terceira seção contém um íntron de aproximadamente 1 kb. Os íntrons são as regiões de um gene transcrito que são removidas da mensagem traduzida final, o mRNA, através do processo de encaixe. Também foi verificado que os íntrons influenciam diretamente a expressão de genes, fornecendo elementos do intensificador alternativos, bem como ao aumentar a tradução da proteína, facilitando a translocação de mensagens do RNA do núcleo ao citoplasma - um processo ligado em parte à montagem de genes. No entanto, a presença dos íntrons em sistemas transgênicos nem sempre resulta em aumentos na expressão do RNA ou nos níveis de proteína traduzida. Em determinados aspectos, o íntron de ubiquitina pode ser modificado de modo a reduzir o tamanho total dos vetores e para avaliar o seu efeito na expressão transgênica de genes na aloe.

[047] Em outros aspectos da presente invenção, pode ser desejada a expressão preferencial em tecidos verdes da planta de aloe. Os promotores de interesse para tais utilizações podem incluir aqueles de genes tais como a

subunidade pequena de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (Rubisco) de *Arabidopsis thaliana* (Fischhoff et al. (1992) *Plant Mol Biol.* 20:81-93) aldolase e ortofosfato piruvato dicinase (PPDK) (Taniguchi et al. (2000) *Plant Cell Physiol.* 41(1):42-48).

[048] Conforme observado acima, os promotores podem ser alterados de modo a conterem "sequências de intensificador" múltiplas para ajudar na elevação da expressão de genes. Tais intensificadores são conhecidos no estado da técnica. Ao incluir uma sequência de intensificador com tais construtos, a expressão da proteína selecionada pode ser intensificada. Esses intensificadores são frequentemente encontrados em 5' para o início da transcrição em um promotor que funciona em células eucarióticas, mas podem ser frequentemente introduzidos a montante (5') ou a jusante (3') da sequência de codificação. Em alguns casos, estes elementos intensificadores 5' são íntrons. Os íntrons 5' do gene da actina 1 do arroz são particularmente úteis como intensificadores (vide a Patente U.S. Nº. 5.641.876) e da actina 2 do arroz, o íntron do gene de desidrogenase do álcool do milho, o íntron do gene da proteína de choque térmico 70 do milho (Patente U.S. Nº. 5.593.874) e o gene encolhido 1 do milho.

[049] Os construtos de acordo com os aspectos da presente invenção podem incluir um elemento 3' que contém tipicamente um sinal e um sítio de poliadenilação. Os elementos 3' bem conhecidos incluem aqueles dos genes de *Agrobacterium tumefaciens* tais como os nº. 3', tml 3', tmr 3', tms 3', ocs 3', tr7 3', descritos, por exemplo, na Patente U.S. Nº. 6. 090. 627, incorporada na presente invenção a título de referência; os elementos 3' dos genes de plantas tais como a proteína de choque térmico 17 (Hsp17 3') do trigo (*Triticum aestivum*), um gene de ubiquitina do trigo, um gene da frutose-1,6-bifosfatase do trigo, um gene de glutelina do arroz, um gene de lactato desidrogenase do

arroz e um gene de beta-tubulina do arroz, sendo que todos são descritos no Pedido de Patente U.S. 2002/0192813A1, incorporado na presente invenção a título de referência; e o gene de bifosfato ribulose carboxilase (rbs 3') da ervilha (*Pisum sativum*) e os elementos 3' dos genes dentro da planta hospedeira.

[050] Uma proteína de interesse pode ser codificada por um gene estrutural incorporado no construto de DNA. O gene estrutural pode ser um gene de mamífero ou partes de um gene de mamífero. Os genes estruturais de interesse podem codificar interferons, imunoglobulinas, linfocinas, fatores do crescimento, hormônios, fatores sanguíneos, antígenos de histocompatibilidade, enzimas ou outras proteínas. A sequência para interferon alfa 2 é relacionada para exemplos de finalidades como a SEQ ID NO: 33. Os genes estruturais também podem codificar proteínas de marcadores tais como a proteína verde fluorescente (GFP) de águas-vivas. A sequência de DNA dos genes estruturais pode ser modificada para permitir a expressão de nível elevado em uma planta de aloe 10. A polarização de códon para a planta de aloe 10 pode diferir da polarização de códon na espécie original da qual o gene estrutural foi isolado. O gene estrutural nativo pode ser desenhado para otimizar a produção da proteína codificada na planta de aloe 10. Além disso, a sequência de DNA do gene estrutural pode ser desenhada de modo a propiciar a glicosilação apropriada nas plantas de aloe 10 que não interfere na estrutura da proteína.

[051] A terminação da transcrição e da tradução pode ser provida por uma variedade de sequências de terminação transcricionais e translacionais que podem funcionar em uma planta de aloe 10. Em um aspecto, as sequências de terminação podem incluir a sequência de genes da nopalina sintase (NOS) de *Agrobacterium*. Em outro aspecto, a sequência de terminação pode ser

derivada das sequências de terminação de genes e de proteínas de aloe nativos.

[052] Um gene do marcador será integrado frequentemente no construto de DNA. O gene do marcador pode permitir que as células que contêm o gene estrutural de interesse sejam selecionadas da população de todas as células que não contêm o gene do marcador. Os genes do marcador podem incluir enzimas ou outras proteínas que conferem resistência à canamicina, cloranfenicol, G418 e gentamicina, entre outros. Ainda outras sequências específicas do DNA podem ser necessárias se, por exemplo, o *Agrobacterium* for utilizado como um vetor. Outras regiões podem estar presentes se o DNA for alvejado a um tipo específico de célula.

[053] Conforme mencionado acima, os construtos de DNA também podem incluir um sinal de secreção. Os construtos também podem incluir uma sequência de translocação que codifica um peptídeo de sinal que pode alvejar a proteína terapêutica para a remoção da célula em que a proteína foi formada. Várias sequências de sinal foram identificadas na literatura, as quais são funcionais nas plantas e, mais particularmente, funcionais nas plantas monocotiledôneas tais como as plantas de aloe. Estas podem ser integradas de modo operável nos construtos ou dentro dos genes de interesse. Em um aspecto, a sequência secretória de alfa amilase (SEQ. ID Nº. 29) do arroz (*Oryza sativa*) pode ser utilizada. Essa sequência de sinal é caracterizada em "The alpha-amylase genes in *Oryza sativa*" Mol Gen Genet., abril de 1990; 221(2):235-44, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade. Alternativamente, alguns genes de interesse, tais como, por exemplo, o interferon, podem incluir um domínio, natural ou sintético, que alveja o interferon para a secreção. O sinal de secreção é tipicamente clivado à medida que a proteína sai da célula ou, em alguns casos, pode ser retido pela

proteína sem afetar substancialmente a função da proteína. Os sinais secretórios podem ser adicionados a uma variedade de proteínas que podem requerer sinais secretórios para a translocação. Essas sequências secretórias podem ser derivadas de várias sequências de secreção de plantas.

[054] As Figuras 6A e 6B ilustram um conjunto de exemplos de construtos para a produção de uma proteína de interesse a partir de uma planta Aloe. Os construtos de plasmídeo são etiquetados como pzUI (TGC9). TGC9 inclui o promotor de ubiquitina de comprimento total que dirige a expressão do interferon alfa 2 humano, e pzUEK (TGC12) (SEQ ID NO: 38), o promotor de ubiquitina de comprimento total que dirige a expressão de uma proteína de fusão que contém eGFP (proteína verde fluorescente intensificada) (SEQ ID NO: 31) e a proteína de resistência à canamicina. A proteína de fusão combina as propriedades de seleção de ambas as proteínas (seleção e visualização) em uma.

[055] Conforme ilustrado, o plasmídeo pzl (TGC8) foi criado pela amplificação de PCR do gene de interferon alfa 2 humano utilizando os primers de PCR, cada um dos quais contendo dois sítios de enzima de restrição distintos (vide a Tabela I para a sequência de primer). O gene de interferon amplificado (IFN) tem os sítios de flanqueamento 5' *Pst*I e *Bam*HI e *Sac*I e *Xho*I 3'. O IFN gerado por PCR foi então clonado como um fragmento de *Pst*I/*Xho*I no vetor de pZErO para criar o construto pzl (TGC8) e para introduzir os sítios *Bam*HI e *Sac*I para a clonagem subsequente. Esse construto contém o gene IFN alfa de comprimento total e a sua sequência de sinal, responsável por dirigir a secreção da proteína de IFN da célula. Isto é ilustrado no Slide 3. Esses clones gerados por PCR foram arranjados em sequência para confirmar a ausência de quaisquer mutações de DNA.

[056] Conforme ilustrado, o vetor de plasmídeo pzUI (TGC9) foi criado pela clonagem a jusante do gene de IFN alfa 2 do promotor de ubiquitina de comprimento total. O fragmento *de PstI/XhoI* de IFN foi liberado de pzl (TGC8) e ligado em pzU (TGC1) para criar o construto pzUI (TGC9). Isto é ilustrado no Slide 3.

[057] Conforme ilustrado, o gene de eGFP foi amplificado por PCR utilizando um conjunto de primers contendo os sítios de restrição de *BamHI* (extremidade 5') e de *XhoI* (extremidade 3') (vide a Tabela I para a sequência de primer). Esse gene de eGFP gerado por PCR foi criado sem um códon de interrupção (para permitir finalmente a expressão de uma proteína de fusão eGFP-kan). Desse modo, a tradução não termina no final da sequência de eGFP. O fragmento amplificado por PCR foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI* e ligado nos sítios de *BamHI* e *XhoI* de pZErO, criando o pzEnostop (TGC10). Isso é ilustrado no Slide 3. Os clones gerados por PCR foram arranjados em sequência para confirmar a ausência de quaisquer mutações de DNA.

[058] Conforme ilustrado, pzEK (TGC11) gera um construto de fusão entre o gene eGFP e o gene resistente à canamicina. eGFP foi liberado como um fragmento de *BamHI/XhoI* de pzEnostop (TGC10) e ligado em pzK (TGC4) para criar o construto pzEK (TGC11). O gene de eGFP é clonado no quadro e de 5' a kan/nos (SEQ ID NO: 35).

[059] Conforme ilustrado, um fragmento de *BamHI/XbaI* de pzEK (TGC11) que contém o cassete de eGFP/kan/nos, foi clonado nos sítios *BamHI* e *XbaI* de pzUI (TGC9) a fim de permitir a expressão do gene da fusão de eGFP/kan. A sequência de IFN é desse modo removida. Esse novo construto, pzUEK (TGC12), expressa a proteína de fusão de eGFP/kan do promotor de ubiquitina de comprimento total (ilustrado no Slide 4). Essa proteína de fusão retém as

características de cada uma das proteínas individuais e tem, desse modo, o benefício óbvio de funcionar como um marcador visual e como um agente seletivo.

[060] As Figuras 7A a 7C ilustram um outro conjunto de exemplos de construtos para a produção de uma proteína de interesse a partir de uma planta Aloe. Os vetores ilustrados permitem a expressão de dois genes, como um único transcrito, sendo ainda ao mesmo tempo traduzidos em duas proteínas distintas. Para realizar isto, os dois genes são separados um do outro por um elemento da IRES de intervenção (sequência interna de entrada de ribossomo) (SEQ ID NO: 34). O elemento da IRES forma um segundo sítio interno, para a fixação do ribossomo e a tradução. Esse segundo sítio permite que os transcritos clonados 3' ao elemento da IRES sejam traduzidos separadamente. Esses vetores, a saber, pzUSEIrK (TGC18) (SEQ ID NO: 43) e pzUIIrK (TGC19) (SEQ ID NO: 39), foram construídos em estágios, permitindo finalmente a expressão de eGFP ou de IFN (respectivamente) juntamente com o marcador de resistência à canamicina.

[061] Conforme ilustrado, o vetor de pzEnostart (TGC13) foi criado primeiramente através da amplificação de eGFP por PCR (vide a Tabela I para as sequências de primer) utilizando os primers que contêm os sítios da enzima de restrição de *Bam*HI (extremidade 5') e *Sac*I (extremidade 3'). Esse produto de PCR foi clonado como um fragmento de *Bam*HI/*Sac*I em pZErO. O gene de eGFP nesse construto não tem um sítio de começo da tradução de ATG, uma vez que essa proteína é expressa como uma fusão com a sequência de sinal de alfa amilase (vide a construção de pzSE, TGC14). Isso é ilustrado no Slide 5. Esses clones gerados por PCR foram arranjados em sequência para confirmar a ausência de quaisquer mutações de DNA.

[062] Conforme ilustrado, o cordão único da sequência de sinal do gene de alfa amilase foi sintetizado e o seu cordão foi então dobrado por preenchimento utilizando PCR (vide a Tabela I para as sequências de primer). A sequência de sinal foi então digerida com as enzimas de restrição *Pst*I e *Bam*HI e clonada em pZEnostart (TGC13). Isso é ilustrado no Slide 5. A sequência de sinal foi clonada em quadro, 5' para eGFP, e forma o sítio de iniciação da tradução para a fusão do eGFP da sequência de sinal. Os clones de pZSE resultantes (TGC14) foram arranjados em sequência para confirmar a ausência de quaisquer mutações de DNA.

[063] Conforme ilustrado, o vetor de pZUSE (TGC15) foi construído para ligar a fusão da sequência de sinal alfa amilase de (ss)-eGFP com o promotor de ubiquitina. O cassete do gene que contém o ss-eGFP de pZSE (TGC14) foi clonado como um fragmento de *Pst*I/*Sac*I em pZUI (TGC9). Isto substitui o cassete do gene de IFN (liberado de pZUI (TGC9) ao digerir com as enzimas de restrição *Pst*I e *Sac*I) criando o pZUSE (TGC15). Isso é ilustrado no Slide 5.

[064] Conforme ilustrado, o elemento da IRES foi amplificado por PCR (vide a Tabela I para as sequências de primer) de pIRES2-EGFP (Clontech, BD Biosciences) com os primers que contêm os sítios de restrição *Sac*I (extremidade 5') e *Xho*I (extremidade 3'). O elemento da IRES amplificado foi clonado como um fragmento de *Sac*I/*Xho*I em pZErO para criar o pZIr (TGC16). Isso é ilustrado no Slide 6. Esses clones gerados por PCR foram arranjados em sequência para confirmar a ausência de quaisquer mutações de DNA.

[065] Conforme ilustrado, o elemento da IRES de pZIr (TGC16) foi então clonado como um fragmento de *Sac*I/*Xho*I no pZK (TGC4) para criar o pZIrK (TGC17) posicionando, desse modo, o IRES a montante do cassete do gene de kan/nos.

[066] Conforme ilustrado, o cassete do gene de IRES-kan/nos clonado como um fragmento de *SacI/XbaI* em pZUSE (TGC15) para criar o pZUSEIrK (TGC18). Isso é ilustrado no Slide 6. Este construto expressa o eGFP como uma fusão com a sequência de sinal de alfa amilase, alvejando o eGFP para a secreção da célula. Isto torna possível monitorar visualmente o trânsito e a acumulação de proteínas dentro da planta transformada. Esse vetor também expressa a proteína de resistência à canamicina (traduzida do elemento interno de IRES) e permite a seleção em plantas transgênicas.

[067] Conforme ilustrado, o cassete do gene de IRES-kan/nos também foi clonado como um fragmento de *SacI/XbaI* em pZUI (TGC9) para criar o pZUIIrK (TGC19). Isso é ilustrado no Slide 7. Esse construto expressa o IFN alfa 2 com uma sequência de sinal para a secreção. Esse vetor também expressa a proteína de resistência à canamicina (traduzida do elemento interno de IRES) e permite a seleção em plantas transgênicas. Ambos TGC18 e TGC19 expressam dois genes como um transcrito único, eliminando a necessidade de um segundo promotor e reduzindo desse modo o tamanho total de cada vetor. Isto é importante, uma vez que a diminuição do tamanho total dos construtos transfectados aumenta a eficiência com que estes elementos podem se translocar ao núcleo, conduzindo a uma integração estável e à seleção de plantas transgênicas. Um sistema de promotor único também reduz o risco de rompimento da expressão do gene de flaqueamento ou outras situações que possam finalmente afetar a expressão de transgenes.

[068] Os plasmídeos acima relacionados podem substituir outras sequências de codificação de interesse para alfa interferon. Tal como será reconhecido por um técnico no assunto, estes podem ser substituídos no mesmo locus ou em outras posições nos plasmídeos.

[069] Uma sequência de codificação de protrombina (SEQ ID NO: 36) também pode ser integrada em um vetor de plasmídeo de acordo com os aspectos da presente invenção, tal como ilustrado diagramaticamente na Figura 8. A protrombina é a proteína precursora para a trombina. Ela é clivada em dois sítios pelo Fator X ativado para liberar a trombina ativada, uma proteína de coagulação que converte o fibrinogênio solúvel em cordões de fibrina insolúveis. O cassete do gene de protrombina (1874 pares bases) foi amplificado utilizando os primers de PCR (vide a Tabela I para a sequência de primer). O cassete do gene de eGFP foi liberado do vetor de pzUSEIrK (TGC18) pela enzima de restrição *Bam*HI. As saliências 5' resultantes foram removidas subsequentemente com a nuclease de Mung Bean para criar extremidades sem corte. As extremidades sem corte foram desfosforiladas utilizando a fosfatase intestinal de vitela (CIP) por meio de incubação a 50 graus Celsius por duas horas, antes da ligação até a manhã seguinte com o cassete do gene de protrombina a 15 graus Celsius. Isso criou o pzUSTIrK (TGC20) (SEQ ID NO: 42). Os clones gerados por PCR foram arranjados em sequência para confirmar a ausência de quaisquer mutações de DNA.

[070] Uma sequência de codificação de Dermicidina (DCD) (SEQ. ID Nº.30) também pode ser integrada em um vetor de plasmídeo de acordo com os aspectos da presente invenção, conforme também ilustrado diagramaticamente na Figura 8. A dermicidina era um peptídeo antimicrobiano de amplo espectro relatado recentemente encontrado expresso constitutivamente nas glândulas sudoríparas. Essa proteína é secretada no suor e é transportada até a superfície da epiderme. O cassete do gene de DCD amplificado por PCR tem os sítios de flanqueamento da enzima de restrição de *Bam*HI (vide a Tabela I para a sequência de primer). O cassete do gene de DCD digerido por *Bam*HI foi ligado ao sítio do vetor *Bam*HI de pzUSEIrK (TGC18) que

costumava ser ocupado pelo eGFP, criando o vetor de pzUSEIrK (TGC21) (SEQ ID NO:40). Os clones gerados por PCR foram arranjados em sequência para confirmar a ausência de quaisquer mutações de DNA.

[071] Uma sequência de codificação do Hormônio do Crescimento humano (hGH) (SEQ ID NO:32) também pode ser integrada em um vetor de plasmídeo de acordo com os aspectos da presente invenção, conforme também ilustrado diagramaticamente na Figura 8. O cassete do gene de hGH foi criado pela amplificação de PCR com o flanqueamento dos sítios da enzima de restrição de *Bam*HI (vide a Tabela I para a sequência de primer). Então, o cassete do gene de hGH digerido por *Bam*HI foi ligado ao sítio de *Bam*HI do vetor de pzUSEIrK (TGC18) que costumava ser ocupado pelo eGFP, criando o vetor de pzUSHIrK (TGC22) (SEQ ID NO:41). Os clones gerados por PCR foram arranjados em sequência para confirmar a ausência de quaisquer mutações de DNA.

[072] Uma sequência de codificação de interferon gama humano (hIFNg) também pode ser integrada em um vetor de plasmídeo de acordo com os aspectos da presente invenção, conforme também ilustrado diagramaticamente na Figura 8. O cassete do gene de hIFNg foi criado pela amplificação de PCR com flanqueamento dos sítios da enzima de restrição de *Bam*HI (vide a Tabela I para a sequência de primer). O cassete do gene de hIFNg digerido por *Bam*HI foi então ligado ao sítio de *Bam*HI do vetor de pzUSEIrK (TGC18) que costumava ser ocupado pelo eGFP, criando o vetor de pzUSIfgIrK (TGC23) (SEQ ID NO: 37). Os clones gerados por PCR foram arranjados em sequência para confirmar a ausência de quaisquer mutações de DNA.

Tabela I - Lista das sequências de primer utilizadas para criar outros genes expressos

Nome do Primer	Sequência do Primer	I.D. de Sequência
prothrombinF	AAACCATGGCGCACGTCCGAGGC	SEQ. ID. NO. 1
prothrombinR	CTACTCTCCAAACTGATCAATGA	SEQ. ID. NO. 2
dermcidinF	GGGGGATCCACCATGAGGTTTCATGACTCTC	SEQ. ID. NO. 3
dermcidinR	GGCGGATCCCTATAGTACTGAGTCAAGG	SEQ. ID. NO. 4
hghF	GGGGGATCCACCATGGCTACAGGCTCCCGG	SEQ. ID. NO. 5
hghR	GGCGGATCCCTAGAAAGCCACAGCTGCCC	SEQ. ID. NO. 6
hifngF	GGGGGATCCACCATGAAATATACAAGTTAT	SEQ. ID. NO. 7
hifngR	TCCGGATCCTTAATAAATAGATTTAGA	SEQ. ID. NO. 8
IFN pst-bam	CAACTGCAGGATCCAACAATGGCCTTGACCTTGCTTTAC	SEQ. ID. NO. 9
IFN sac-xho	CAACTCGAGCTCATTCCTTACTTCTAAACTTTCTTG	SEQ. ID. NO. 10
eGFP bam [no start codon]	ATAGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC	SEQ. ID. NO. 11
eGFP sac[no start codon]	TATGAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	SEQ. ID. NO. 12
eGFP f bam[no stop codon]	CAGGGATCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG	SEQ. ID. NO. 13
eGFP r xho [no stop codon]	AGTCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGC	SEQ. ID. NO. 14
Signal sequence AA pst bam	TATCTGCAGACCATGGTGAACAAACACTTCTTGTCCTTTTCGGTCCTCATCGTCCTCCTTGGCCTCTCCTCCAACCTTGACAGCCGGGGGATCC	SEQ. ID. NO. 15
Signal sequence AA ss-pcr	GTGAATTCGGATCCCCCGGCTGTCAA	SEQ. ID. NO. 16
IRES sac	ATTGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAG	SEQ. ID. NO. 17
IRES xho	ATACTCGAGGTGGCCATATTATCATCGTGTTTTTC	SEQ. ID. NO. 18
kan xho	ATACTCGAGACCATGATTGAACAAGATGGATTGCAC	SEQ. ID. NO. 19
Kan xba	ATTTCTAGACCAGAGCCGCCGCCAGCATTGACAGG	SEQ. ID. NO. 20
prothrombinF	AAACCATGGCGCACGTCCGAGGC	SEQ. ID. NO. 21
prothrombinR	CTACTCTCCAAACTGATCAATGA	SEQ. ID. NO. 22
dermcidinF	GGGGGATCCACCATGAGGTTTCATGACTCTC	SEQ. ID. NO. 23
dermcidinR	GGCGGATCCCTATAGTACTGAGTCAAGG	SEQ. ID. NO. 24
hhghF	GGGGGATCCACCATGGCTACAGGCTCCCGG	SEQ. ID. NO. 25
hghR	GGCGGATCCCTAGAAAGCCACAGCTGCCC	SEQ. ID. NO. 26
hifngF	GGGGGATCCACCATGAAATATACAAGTTAT	SEQ. ID. NO. 27
hifngR	TCCGGATCCTTAATAAATAGATTTAGA	SEQ. ID. NO. 28

[073] Essas sequências podem conter a sua própria sequência de sinal. Similarmente à sequência em alfa interferon que foi demonstrada como operável em uma planta de aloe, também foi demonstrado que as sequências

de sinal nativas dentro da protrombina, Dermicidina (DCD), Hormônio do Crescimento humano (hGH) e interferon gama humano (hIFNg) podem ser funcionais em uma planta de aloe. De qualquer maneira, essas sequências de codificação da proteína podem ser clonadas em um vetor que contém a sequência de sinal de alfa amilase tal como nos exemplos ilustrados da Figura 8.

[074] No desenvolvimento dos construtos referidos acima, todos os vetores utilizados para a transformação cresceram em 250 mL de LB, 50 ug/L de zeocina e foram isolados utilizando o método de CsCl. Os vetores foram então utilizados em estudos de transfecção transientes para assegurar a expressão apropriada de cada construto. A transfecção que utiliza o injetor de gene foi executada no milho, no tabaco e no aloe, e a expressão foi monitorada visualmente para a expressão de eGFP ou por rt-PCR para a expressão de IFN ou de kan.

Transformação

[075] Depois que os construtos de DNA incluindo o gene de interesse e funcional de várias unidades de função incorporadas em vetores são gerados, os construtos de DNA são introduzidos nas células de aloe ao utilizar uma série de técnicas que serão reconhecidas por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição. Esses construtos de DNA são geralmente desenhados para promover a formação de plantas de aloe estavelmente transformadas 10. Numerosos métodos para transformar as células de planta com DNA recombinante são conhecidos no estado da técnica e podem ser utilizados na presente invenção. Alguns métodos para a incorporação dos construtos de DNA contidos nos vetores em células ou em tecidos de aloe para a criação de transformantes de aloe estáveis podem incluir a infecção com *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes*, a infecção com os vírus deficientes na

replicação, a transformação biolística, a transformação de protoplastos, a transferência do gene no pólen, a injeção em órgãos reprodutores, a injeção em embriões imaturos, ou métodos similares. Atualmente, dois dos métodos mais geralmente utilizados para a transformação de plantas são a transformação mediada por *Agrobacterium* e a transformação biolística. As células de aloe ou os tecidos de calo transformados crescem tipicamente no meio nutriente apropriado para a seleção de células transformadas. Normalmente, um meio de seleção inclui uma toxina ou outro fator de seleção que mata as células não-transformadas. Várias mudanças de meio irão permitir a produção de plantas de aloe 10 que contenham o gene de interesse, conforme será reconhecido por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição.

[076] Na prática da transformação, o DNA é introduzido tipicamente somente em uma pequena porcentagem de células de planta alvo em qualquer experiência de transformação. Os genes do marcador são utilizados para prover um sistema eficiente para a identificação das células que são transformadas estavelmente ao receber e integrar um construto de DNA transgênico em seus genomas. Os genes do marcador preferidos fornecem os marcadores seletivos que conferem resistência a um agente seletivo, tal como um antibiótico ou um herbicida. Qualquer um dos herbicidas aos quais as plantas da presente invenção podem ser resistentes são agentes úteis para marcadores seletivos. As células potencialmente transformadas são expostas ao agente seletivo. Na população de células sobreviventes, estarão as células em que, geralmente, o gene que confere resistência é integrado e expresso em níveis suficientes para permitir a sobrevivência das células. As células podem ser testadas adicionalmente para confirmar a integração estável do DNA exógeno. Os genes do marcador seletivos comumente utilizados incluem

aqueles que conferem resistência a antibióticos, tais como a canamicina e a paromomicina (nptII), higromicina B (aph IV) e gentamicina (aac3 e aacC4), ou resistência a herbicidas, tais como o glufosinato (bar orpat) e glifosato (aroA ou EPSPS). Os exemplos de tais marcadores selecionáveis são ilustrados nas Patentes U.S. Nº. 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708 e 6.118.047, as quais são incorporadas na presente invenção a título de referência. Os marcadores selecionáveis que propiciam a capacidade de identificar visualmente os transformantes também podem ser empregados, por exemplo, um gene que expressa uma proteína colorida ou fluorescente tal como uma luciferase ou proteína verde fluorescente (GFP), ou um gene que expressa um beta-glicuronidase ou um gene de uidA (GUS) para o qual vários substratos cromogênicos são conhecidos.

[077] Em geral, é útil introduzir aleatoriamente o DNA recombinante, isto é, em uma posição não-específica, no genoma de uma linhagem de planta alvo. Em casos especiais, pode ser útil alvejar a inserção de DNA recombinante a fim de atingir a integração específica de sítio, por exemplo, para substituir um gene existente no genoma, para utilizar um promotor existente no genoma da planta ou para introduzir um polinucleotídeo recombinante em um sítio predeterminado conhecido como sendo ativo para a expressão do gene. Existem diversos sistemas de recombinação específicos de sítio, os quais são conhecidos para executar implantes, incluem cre-lox como descrito na Patente U.S. Nº. 4.959.317 e FLP-FRT como descrito na Patente U.S. Nº. 5.527.695, sendo que ambos são incorporados na presente invenção a título de referência e são discutidos mais detalhadamente abaixo.

[078] Para o sistema de transformação de planta à base de *Agrobacterium*, os elementos adicionais presentes em construtos de transformação irão incluir sequências de limite esquerdo e direito de T-DNA

para facilitar a incorporação do polinucleotídeo recombinante no genoma da planta. Com a infecção com *Agrobacterium* (*A. tumefaciens*), o tecido de calo de aloe é incubado por uma hora à temperatura ambiente com uma cultura até a manhã seguinte de *Agrobacterium* incluindo o vetor que incorpora o construto de DNA. O *Agrobacterium* cresce no meio de seleção apropriado. O meio de seleção inclui tipicamente estreptomicina e canamicina. O meio de seleção também pode conter acetosiringona. A acetosiringona a uma concentração de 50 uM a 250 uM aumenta tipicamente a eficiência de infectividade da monocotiledônea. Após o crescimento nos meios de seleção, o tecido de aloe infectado pode ser transferido ao meio em placas de Petri sem nenhuma seleção por dois (2) dias no escuro a 25 graus Celsius. Um meio exemplificador apropriado pode ser o meio de MS com acetosiringona. A cefotaxima pode ser então adicionada por dois (2) dias para matar o *Agrobacterium*. As células são novamente chapeadas no meio contendo 50 mg/L de canamicina para selecionar as células de aloe transformadas e para induzir os fatores de crescimento de brotos (0,2 mg/L de NAA, 2 mg/L de BAP) por quatro (4) semanas, dezesseis horas na luz. Os brotos regenerados podem ser então transferidos ao meio de enraizamento (1/2 MS com 0,2 mg/L de NAA) para desenvolver raízes (após aproximadamente quatro a seis semanas) antes de serem transferidos ao solo.

[079] Com a transformação biolística, as células de aloe ou o tecido de calo são bombardeados diretamente com o construto do vetor. Várias realizações e aspectos da transformação biolística são descritos nas Patentes U.S. Nº. 5.015.580 (soja); 5.550.318 (milho); 5.538.880 (milho); 5.914.451 (soja); 6.160,208 (milho); 6.399.861 (milho) e 6.153.812 (trigo) e a transformação mediada por *Agrobacterium* é descrita nas Patentes U.S. Nº. 5.159.135 (algodão); 5.824.877 (soja); 5.591.616 (milho); e 6.384.301 (soja), as

quais são incorporadas na presente invenção a título de referência. Além disso, uma variedade do aparelho de transformação biolística pode ser utilizada tal como, por exemplo, um sistema de aplicação de partículas Biolistic PDS-1000/He junto à Bio-Rad, Inc. Nesta abordagem, o vetor e o construto de DNA associado podem ser ligados ao ouro ou às outras partículas e ser acionados diretamente nas células de aloe. As células de aloe bombardeadas crescem sem seleção por quatro dias no escuro antes de serem transferidas ao meio de seleção. Outra vez, o meio de seleção pode incluir 50 mg/L de canamicina. Os transformantes começam a ser tipicamente formados dentro de oito a doze semanas e podem ser transferidos aos meios de brotamento e enraizamento por oito a doze semanas adicionais. Uma vez que as raízes começam a se formar, as plântulas podem ser transferidas ao solo.

[080] A transformação também pode ser conseguida ao utilizar uma variedade de outras técnicas. Tais técnicas incluem a infecção viral que utiliza sistemas de vetor viral comprometidos com a replicação, a eletroporação, particularmente das células do calo ou dos protoplastos que cresceram em cultura líquida, e transferência mediada por PRG ou lipídeos nos protoplastos. A seleção para os transformantes pode então seguir as mesmas etapas básicas que aquela esboçada para a transformação biolística.

[081] Uma vez introduzidos nos tecidos de calo de aloe, os construtos podem ser incorporados no material genético da planta, tal como ilustrado de maneira geral na Figura 3. Em outros aspectos, os construtos podem ser estavelmente integrados na célula fora do material genético das plantas de aloe IO. Dependendo do construto, a proteína de interesse principal pode não ser expressa ausente de alguma forma de indução da transcrição. Em um aspecto, os construtos, uma vez introduzidos nas células de aloe, podem dirigir a síntese de proteínas ou transportar aos tecidos específicos da planta de aloe

10. Tipicamente, isto ocorre quando uma sequência de sinal de alvejamento é incluída na proteína de interesse.

Integração Específica de Sítio (Cre-Lox)

[082] Em um aspecto, a presente invenção pode utilizar a integração específica de sítio ou a excisão dos construtos de DNA introduzidos em uma planta de aloe. Uma vantagem da integração ou da excisão específica de sítio é que ela pode ser utilizada para superar os problemas associados com as técnicas de transformação convencionais, em que os construtos de transformação se integram tipicamente aleatoriamente em um genoma hospedeiro em cópias múltiplas. Essa inserção aleatória do DNA introduzido no genoma das células hospedeiras pode ser letal se um DNA estranho for inserido em um gene essencial. Além disso, a expressão de um transgene pode ser influenciada pelos "efeitos da posição" causados pelo DNA genômico circunvizinho. Adicionalmente, por causa das dificuldades associadas com as plantas que possuem cópias múltiplas do transgene, incluindo o silenciamento de genes, a recombinação e a herança imprevisível, é tipicamente desejável o controle do número da cópia dos construtos de DNA introduzidos no genoma da planta de aloe transgênica 10, desejando frequentemente somente a inserção de uma única cópia do construto de DNA.

[083] A integração específica de sítio ou a excisão de transgenes ou de partes dos transgenes pode ser conseguida nas plantas por meio da recombinação homóloga (vide, por exemplo, a Patente U.S. Nº. 5.527.695, incorporada especificamente na presente invenção a título de referência em sua totalidade). A recombinação homóloga é uma reação entre qualquer par de sequências de DNA que têm uma sequência de nucleotídeos similar, onde as duas sequências interagem (recombinam) para a formação de uma nova espécie de DNA recombinante nova. A frequência da recombinação homóloga

aumenta à medida que o comprimento das sequências de DNA do nucleotídeo compartilhadas aumenta, e é maior com as moléculas de plasmídeo linearizadas do que com as moléculas de plasmídeo circularizadas. A recombinação homóloga pode ocorrer entre duas sequências de DNA que são menos do que idênticas, mas a frequência da recombinação declina à medida que a divergência entre as duas sequências aumenta.

[084] As sequências de DNA introduzidas podem ser alvejadas através da recombinação homóloga, ao ligar uma molécula de DNA de interesse às sequências que compartilham de homologia com as sequências endógenas da célula hospedeira. Uma vez que o DNA penetra na célula de aloe, as duas sequências homólogas podem interagir para introduzir o DNA introduzido no sítio onde as sequências de DNA genômicas homólogas foram encontradas. Portanto, a escolha das sequências homólogas contidas no DNA introduzido irá determinar o sítio onde o DNA introduzido é integrado através da recombinação homóloga. Por exemplo, se a sequência de DNA de interesse for ligada a sequências de DNA que compartilham de homologia a um gene de cópia única de uma célula de aloe hospedeira, a sequência de DNA de interesse será introduzida através da recombinação homóloga somente nesse único sítio específico. No entanto, se a sequência de DNA de interesse for ligada às sequências de DNA que compartilham de homologia a um gene de cópias múltiplas da célula eucariótica hospedeira, então a sequência de DNA de interesse pode ser introduzida através da recombinação homóloga em cada um dos sítios específicos onde uma cópia do gene é encontrada.

[085] O DNA pode ser introduzido no genoma hospedeiro por meio de uma reação de recombinação homóloga que envolve uma única recombinação recíproca (tendo por resultado a inserção do comprimento inteiro do DNA introduzido) ou através de uma recombinação recíproca dupla (tendo por

resultado a inserção somente do DNA situado entre os dois eventos de recombinação). Por exemplo, se for pretendida a introdução de um gene estranho no sítio genômico onde um gene selecionado está localizado, o DNA introduzido deverá conter as sequências homólogas ao gene selecionado. Um único evento de recombinação homóloga deve resultar então na introdução da sequência de DNA introduzida inteira no gene selecionado. Alternativamente, um evento de recombinação dupla pode ser conseguido ao flanquear cada extremidade da sequência de DNA de interesse (a sequência que deve ser introduzida no genoma) com as sequências de DNA homólogas ao gene selecionado. Um evento de recombinação homóloga que envolve cada uma das regiões de flanqueamentos homólogos irá resultar na inserção do DNA estranho. Desse modo, apenas as sequências de DNA situadas entre as duas regiões que compartilham de homologia genômica se tornam integradas no genoma.

[086] Embora as sequências de DNA introduzidas possam ser alvejadas para a inserção em um sítio genômico específico através da recombinação homóloga, nos eucariotas superiores, a recombinação homóloga é um evento relativamente raro em comparação aos eventos de inserção aleatória. Nas células de aloe, as moléculas de DNA estranhas encontram as sequências homólogas no genoma da planta de aloe e se recombina em uma frequência de aproximadamente $0,5-4,2 \times 10^{-4}$. Desse modo, qualquer célula transformada que contiver uma sequência de DNA introduzida integrada através da recombinação homóloga também irá provavelmente conter numerosas cópias das sequências de DNA introduzidas aleatoriamente integradas. Um modo de evitar essas inserções aleatórias é a utilização de um sistema de recombinase específica de sítio. Em geral, um sistema de recombinase específica de sítio consiste em três elementos: dois pares da

sequência de DNA (as sequências de recombinação específicas de sítio) e uma enzima específica (a recombinase específica de sítio). A recombinase específica de sítio irá catalisar uma reação de recombinação somente entre duas sequências de recombinação específicas de sítio.

[087] Uma série de sistemas de recombinase específicos de sítio diferente poderia ser empregada de acordo com a presente invenção, incluindo, mas sem ficar a eles limitada, o sistema de Cre/lox de bacteriófago P1 (Patente U.S. Nº. 5.658. 772, incorporada especificamente na presente invenção a título de referência em sua totalidade), o sistema de FLP/FRT de levedura (Golic e Lindquist, 1989), a recombinase de Gin do fago Um (Maeser e Kahmann, 1991), a recombinase de Pin de E. coli (Enomoto et al., 1983) e o sistema de R/RS do plasmídeo pSR1 (Araki et al., 1992). O bacteriófago Cre/lox P1 e os sistemas FLP/FRT de levedura constituem dois sistemas particularmente úteis para a integração específica de sítio ou a excisão dos transgenes. Nesses sistemas, uma recombinase (Cre ou FLP) irá interagir especificamente com a sua sequência de recombinação específica de sítio respectiva (lox ou FRT, respectivamente) para inverter ou excisar as sequências de intervenção. A sequência para cada um desses dois sistemas é relativamente curta (34 bp para lox e 47 bp para FRT) e, portanto, conveniente para a utilização com vetores de transformação.

[088] A Figura 8 ilustra um protocolo exemplificador particular que utiliza um sistema de recombinase de Flp/Frt e Cre/Loxp. Em tal sistema, as recombinases específicas de sítio do bacteriófago e das leveduras podem ser utilizadas como ferramentas para manipular o DNA no tubo de teste e em organismos vivos. As combinações do sítio de recombinases/recombinação incluem Cre-Lox, FLP-FRT e R-RS, onde Cre, FLP e R são as recombinases e Lox, FRT e RS são os sítios de recombinação. Para utilizar esse sistema, é gerada

uma planta transgênica contendo os sítios específicos para a recombinação. Uma planta de aloe transgênica 10 paterna é criada ao transfectar um vetor, que expressa um marcador selecionável e é projetada para conter os sítios de Frt e de Lox em tandem. Os sítios de Frt e de Lox consistem em três elementos, uma sequência de espaçador com oito (8) nucleotídeos entre duas (2) repetições invertidas de treze (13) nucleotídeos cada uma. As repetições invertidas servem como o domínio de ligação do DNA para a recombinase específica, sendo que o elemento do espaçador é variável, mas essencial para a recombinação homóloga. Ao alterar o elemento do espaçador dos sítios de LoxP ou de FRT, múltiplos sítios distintos para a recombinação podem ser criados. Ao alternar os sítios de Frt e de Lox, um sistema que permite integrações dirigidas por múltiplos sítios pode ser criado (tal como esboçado na Figura 8). Esse sistema pode ter uma série de vantagens. O rompimento de genes endógenos é minimizado após a geração da planta inicial paterna. A eficiência da transformação é aumentada pela expressão das recombinases específicas de sítio. A utilização dos sítios de lox e frt em tandem permite a remoção seletiva dos marcadores de seleção ao reter o gene de interesse. E uma vez que uma planta paterna tenha sido criada, a propagação celular e o potencial regenerativo são intensificados. A planta paterna, no entanto, é a primeira etapa e é criada ao seguir os métodos de transformação padrão (biolísticos ou *Agrobacterium*). As plantas transgênicas subsequentes são criadas pela co-transfecção de um vetor que contém um sítio de LoxP e de Frt bem como o gene de interesse e um marcador selecionável, juntamente com um vetor que expressa a recombinase de Cre. A expressão da recombinase de Cre induz a recombinação homóloga através dos sítios de LoxP do vetor e da planta paterna. Os transformantes são selecionados pela expressão de marcadores selecionáveis e são induzidos à regeneração. A transformação

subsequente com um vetor que expressa a recombinase de Flp pode remover o marcador selecionável e permitir uma integração subsequente em outros sítios de Loxp.

Produção de plantas viáveis

[089] Depois da transformação das células de Aloe ou dos tecidos de Aloe, as células de Aloe ou os tecidos de Aloe transformados podem crescer como plântulas. As células de aloe que sobrevivem à exposição ao agente seletivo ou as células de aloe com uma marcação positiva em um ensaio de seleção podem ser cultivadas em um meio de regeneração e colocadas para maturar como plantas de aloe transgênicas 10. As plântulas de aloe em desenvolvimento regeneradas das células de aloe transformadas podem ser transferidas à mistura de crescimento de plantas e podem ser fortalecidas, por exemplo, em uma câmara ambientalmente controlada a aproximadamente 85% de umidade relativa, 600 ppm de CO₂ e 25-250 microeinstein m⁻²s⁻¹ de luz, antes da transferência a uma estufa ou câmara de crescimento para a maturação. As plantas de aloe transformadas 10 são regeneradas de aproximadamente seis semanas a dez meses depois que um transformante é identificado, dependendo do tecido inicial. A planta de aloe transformada regenerada 10 ou a sua semente ou plantas de progênie podem ser tipicamente testadas quanto à expressão do DNA recombinante.

[090] A regeneração de uma planta de aloe transgênica 10 do tecido de calo ou tecido de meristema não-diferenciado transformado envolve principalmente a manipulação dos fatores de crescimento auxina e cinetina. A primeira etapa consiste na promoção do crescimento do broto. O meio que induz a formação de broto contém tipicamente uma baixa concentração de auxina (0,2 mg/L de NAA) e uma concentração relativamente elevada de citocinina (2 mg/L de BAP). A concentração de açúcar reduzida para 2% de

sacarose (que afeta a pressão osmótica) também pode ajudar na regeneração da planta. As células no meio de formação de broto são colocadas em incubadoras a 25°C com um ciclo de doze horas/dia de luz. Os brotos que começam a se formar são excisados do calo primário depois que atingem um comprimento de aproximadamente 2 cm e são colocados no meio de enraizamento. Esses brotos também podem ser mantidos no meio de formação de broto para incentivar o desenvolvimento de brotos adicionais. O meio de enraizamento promove o desenvolvimento da raiz e contém tipicamente ½ meio de MS e uma concentração relativamente baixa de auxina (0,2 mg/L de NAA). Depois que as raízes começam a se desenvolver (1 a 2 cm), as plântulas podem ser transferidas ao solo e aclimatadas, ao reduzir gradualmente a umidade relativa. Uma vez geradas, as plantas de aloe transgênicas 10 podem ser propagadas pelos métodos de propagação clonal de semente ou de outra maneira, conforme será reconhecido por um técnico no assunto no momento da revisão da presente descrição.

Extração e Purificação de Proteínas a Partir de Plantas ou Células de Plantas

[091] As proteínas ou as enzimas estruturais introduzidas através dos vetores nas células de plantas e nas plantas podem ser encontradas em vários tecidos da planta de aloe 10, incluindo raízes, tubérculos, folhas, sementes, flores, seiva ou em uma combinação de partes da planta e estágios de desenvolvimento. Em um aspecto, a proteína ou as proteínas de interesse estão concentradas na matriz gelatinosa na porção central da folha. Em um outro aspecto, a proteína ou as proteínas de interesse são biologicamente ativas e propiciam algum grau de efeito medicinal quando extraídas da folha de aloe 12. Em um outro aspecto, a proteína ou as proteínas de interesse e pelo menos uma proteína de aloe nativa, carboidrato e/ou outro composto

encontrado na matriz gelatinosa age sinergisticamente para propiciar um tratamento desejado para um paciente. A extração da proteína pode ser feita a partir da biomassa total ou de um tecido particular. A extração da proteína das células de planta pode incluir métodos físicos e químicos. A extração da proteína das folhas ou da seiva pode envolver a filtração, a ultracentrifugação, a extração química e a cromatografia por afinidade.

[092] Em um aspecto, a proteína de interesse pode se acumular dentro do gel da folha da planta de aloe transformada 10. Essa região é constituída principalmente de água, aproximadamente 99%, e é livre de proteases prejudiciais. A extração do gel é uma técnica estabelecida que é compreendida por um técnico no assunto. Algumas das proteínas, particularmente as cosméticas, podem ser utilizadas para suplementar diretamente o gel de aloe e podem nunca ter que serem isoladas individualmente do gel.

EXEMPLOS

Metodologias para a Isolamento de Células de Plantas

[093] Em um primeiro exemplo, o tecido do meristema do broto para a utilização direta ou para a iniciação do calo é isolado do talo de aloe, Aloe vera, Aloe ferox ou Aloe arborescence. As seções da folha são removidas e o talo é cortado lateralmente através do eixo longitudinal da folha de aloe. O tecido é esterilizado com uma mistura de Tween 20 (0,05%) e hipoclorito (5%) por dez minutos, seguido por trinta segundos em etanol, enxágue por três vezes em água estéril. As seções são então chapeadas com a superfície exposta voltada para as laterais da placa em meio de MS com ágar (0,8 a 1%) contendo várias concentrações dos fatores de crescimento, auxina e citocinina e 2 a 3% de sacarose. As condições de crescimento variam dependendo do processo desejado. A cultura do calo sem desenvolvimento do broto é iniciada tipicamente ao provocar o crescimento dessas seções em NAA (2-5 mg/L) sem

BAP ou com baixa concentração de BAP (0,2 mg/L). As células não-diferenciadas começam a crescer ao longo das áreas do talo de corte e podem ser subcultivadas e mantidas em pratos separados. A indução de broto pode ser iniciada diretamente ao colocar tais fragmentos no meio de formação de broto - meio de MS contendo 0,2 mg/L de NAA (ou 0,2 mg/L de IAA) e 2 mg/L de BAP. Tanto o NAA quanto o IAA trabalham como uma fonte de auxina e há uma faixa de concentrações de auxinas e citocininas que produzem efeito. As células de calo dos embriões imaturos são desenvolvidas a partir das sementes comercialmente disponíveis. As sementes são primeiramente esterilizadas (etanol por trinta segundos, 5% de hipoclorito mais 0,05% de Tween 20 por quinze minutos e enxágue por três vezes em água estéril). As sementes esterilizadas são então deixadas até a manhã seguinte a 4 graus Celsius em água. O embrião imaturo é isolado ao remover o revestimento da semente. Um pequeno corte é feito em um canto da semente com formato triangular e o embrião é espremido para fora. Isto é então chapeado no meio de MS que contém apenas a auxina (2-5 mg/L de NAA) para induzir o calo, ou auxina e citocinina (0,2 mg/L de NAA, 2 mg/L de BAP) para induzir a propagação do calo e do broto. A concentração de açúcar é tipicamente de 2 a 3%.

[094] As células de calo do meristema apical do broto são desenvolvidas a partir de um corte de segmento de um a dois centímetros da base da nova planta de aloe 10 com todas as folhas removidas. A superfície do fragmento é esterilizada e novamente chapeada em 1% de ágar com o meio de MS e auxina e citocinina (2 mg/L de NAA, 0,2 mg/L de BAP).

[095] A indução das células de calo se inicia dentro de uma a duas semanas. As células podem então ser isoladas dessas culturas e ser utilizadas como o material de partida para a transformação.

Construtos de DNA

i. Vetor de Interferon de Ubiquitina pBI121 (pBI-UI).

[096] O vetor binário do *Agrobacterium* pBI121 foi utilizado como a cadeia principal para a criação de pBI-UI. O gene de interferon alfa 2 humano com sequência de sinal foi amplificado a partir das células de ser humano 293 utilizando os primers específicos do gene que contêm sítios de restrição de 5' PstI e de 3' SacI/XhoI. O 587 pelo produto de PCR de interferon foi clonado em pZErO e arranjado em sequência. O 1962 pelo elemento do promotor de ubiquitina (Ubi) do milho também foi clonado em pZErO pela amplificação da região do vetor de pUBI-GFP e a clonagem nos sítios de restrição de 5' HindIII e de 3' PstI. O fragmento de Ubi foi então subclonado no vetor de interferon de pZero utilizando HindIII/PstI (pZErO UI). O cassete de interferon de Ubi intacto foi então subclonado em pBI121 utilizando HindIII/SacI e removendo o promotor de CaMV 35S e o gene de GUS, resultando no pBI UI. Esse vetor retém as regiões de limite direito e esquerdo do elemento T necessárias para a infecção e a transformação mediadas por *Agrobacterium* e expressa o gene de resistência à canamicina (NPTII) sob o controle do promotor de Nos.

ii. Canamicina de IRES do Interferon de Ubiquitina de pZErO (pZ UIIK)

[097] Esse vetor foi criado pela clonagem do promotor de Ubi no vetor de clonagem de pZErO. Atrás desse fragmento, foi clonado um cassete contendo interferon alfa 2 humano junto com uma IRES (sequência de entrada ribossômica interna) e o gene de resistência à canamicina. Essa unidade é expressa como um único transcrito, mas é traduzida como duas proteínas distintas (devido ao segundo sítio de iniciação translacional fornecido pela IRES). Isto permite que o marcador selecionável e o interferon sejam expressos sob o controle do promotor de Ubi.

iii. O sistema de plasmídeo duplo que emprega as recombinases de Cre e de Flp.

[098] Uma planta paterna é gerada primeiramente, a qual expressa o marcador selecionável que tem os sítios de cre e de flp para a integração alvejada. Uma transfecção secundária que introduz os vetores com os genes de interesse é alvejada aos sítios de cre. O material genético não desejado é então removido utilizando o flp.

Introdução de Construtos de DNA em Células de Plantas Isoladas

i. Transferência de genes mediada por Agrobacterium

[099] A cepa LB4404 de Agrobacterium (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi sujeita à eletroporação com o vetor de pBI UI e os clones positivos foram selecionados nas placas de ágar LB que contêm 50 ug/mL de canamicina e 100 ug/mL de estreptomicina. Os clones individuais cresceram até a manhã seguinte a 30 graus Celsius em meio LB contendo 250 uM de acetosiringona. A infecção ocorre através da submersão dos fragmentos ou calos de planta nas culturas até a manhã seguinte, transferência a seco em papel filtro estéril e chapeamento em placas de ágar de MS contendo 250 uM de acetosiringona a 25 graus Celsius no escuro. Dois dias após a infecção, o tecido foi transferido às placas de ágar de MS contendo 200 uM de cefotaxima para matar o Agrobacterium. O tecido é então transferido às placas de ágar de MS contendo 50 mg/L de canamicina e 0,2 mg/L de NAA e 2 mg/L de BAP para selecionar os transformantes e induzir a regeneração do broto. O tecido cresce em doze horas de luz a 25 graus Celsius. Os brotos adventícios crescem até alcançarem aproximadamente 2 cm de comprimento antes de serem excisados e replantados em meios de enraizamento com seleção continuada. As plântulas que expressam os genes de interesse são testadas quanto aos níveis de expressão e são transferidas ao solo.

ii. Transferência de genes biolística

[0100] Partículas de ouro (0,6 a 1 µm) são revestidas com o vetor que inclui o construto de DNA. As partículas de ouro são lavadas quinze minutos em etanol a 70% por turbilhonamento e encharcamento, seguido por três lavagens em água estéril. As partículas de ouro são então novamente suspensas em glicerol a 50% a uma concentração de 60 mg/mL. Para revestir o DNA do vetor nas partículas lavadas, 3 mg de partículas são adicionados a um tubo de microfuga de 1,5 mL. A isto são adicionados 5 µL de DNA a uma concentração de 1 µg/µL, 50 µL de 2,5 M de CaCl_2 e 20 µL de espermidina 0,1 M de espermidina, e turbilhonados por dois a três minutos. Isto é colocado em repouso, girado por um a dois segundos, e o líquido é removido. A isto são adicionados 140 µL de etanol a 70%, girados, e o líquido é descartado. A isto, são adicionados 140 µL de etanol a 100%, girados, e o líquido é descartado. Ao material precipitado, são adicionados 48 µL de etanol a 100%, e eles são novamente suspensos suavemente. O aparelho injetor de genes (PDS 1000/He, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) é esterilizado utilizando etanol a 70%. O aparelho injetor de genes foi montado utilizando a distância de abertura mais curta entre o suporte macrocarregador e a tela de interrupção (ajuste recomendado). As partículas revestidas de ouro (8 µL) são introduzidas com pipeta no centro dos macrocarregadores. A distância alvo foi ajustada dependendo do tecido alvo (tecido de 6 cm, calo de 9 cm) com um disco de ruptura de 600 a 1100 psi ($4,14 \times 10^6$ a $7,58 \times 10^6$ Pa).

[0101] Em um primeiro exemplo, seguindo o bombardeamento, as células foram chapeadas em placas de ágar de MS contendo 2 mg/L de NAA sem seleção por uma semana no escuro a 25 graus Celsius. As células foram então transferidas às placas de ágar de MS contendo 50 mg/L de canamicina para a seleção e auxina (2 mg/L de NAA) e citocinina (0,2 mg/L de 6-

benzilaminopurina) por quatro a cinco semanas adicionais. As células crescem por doze horas na luz a 25 graus Celsius.

[0102] Em um segundo exemplo, o bombardeamento de microprojétil foi executado em uma placa de MS (4 g/L de sais de MS, 1 mg/L (1000X) de carga de vitamina de MS, 2 mg/L de NAA, 100 mg/L de mio-inositol, 2,76 g/L de prolina, 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de hidrolisado de caseína, 36,4 g/L de sorbitol, 36,4 g/L de manitol, 2,5 g/L de gelrita, pH 5,8). O calo bombardeado foi deixado em MSOSM por uma hora após o bombardeamento e foi então transferido ao meio de iniciação de MS (4 g/L de sais de MS, 1 mg/L (1000X) de carga de vitamina de MS, 2 mg/L de NAA, 100 mg/L de mio-inositol, 2 g/L de prolina, 30 g/L de sacarose, 100 mg/L de hidrolisado de caseína, 2,5 g/L de gelrita, pH 5,8). Após sete a dez dias em MS, o calo bombardeado foi transferido ao meio de seleção de MSS (4 g/L de sais de MS, 1 mg/L (1000X) de carga de vitamina de MS, 2 mg/L de NAA, 100 mg/L de mio-inositol, 30 g/L de sacarose, 2,5 g/L de gelrita, pH 5,8) com 50 mg/L de canamicina para a seleção de células transformadas. Após três semanas, as partes do calo individuais foram transferidas ao meio de MSS fresco. Dentro de seis a oito semanas do bombardeamento, os clones resistentes à canamicina emergiram das partes do calo selecionadas.

iii. Protoplasto

[0103] Os protoplastos são células de planta que não têm a sua parede celular externa. A vantagem da criação dessas células é o aumento da eficiência da transfecção, e tais células podem se fundir umas às outras para a formação de um híbrido de célula somático. Os híbridos de célula somáticos podem misturar genes das plantas diferentes, chegando potencialmente em algo completamente novo.

[0104] A técnica para utilizar os protoplastos de acordo com a presente invenção pode incluir o crescimento das células em cultura líquida (dois a três dias na fase de crescimento logarítmica). As células são então giradas (gravidade de 1000 vezes por cinco minutos). As células são novamente suspensas em uma solução que contém celulase, macerozima e pectoliase. São agitadas até a manhã seguinte a 25 graus Celsius no escuro. São centrifugadas (gravidade de 600 vezes por cinco minutos) e é removido o sobrenadante. Os protoplastos são novamente suspensos no meio de cultura e são girados mais uma vez para remover resquícios de enzimas. Os protoplastos não podem ser armazenados ou propagados e devem ser utilizados para a transfecção ou a fusão de células somáticas relativamente rápida.

Produção de Plantas Viáveis que Contêm Construtos de DNA

[0105] Em um primeiro exemplo, transformantes bem sucedidos são selecionados inicialmente por sua resistência a toxinas celulares, por exemplo, a canamicina. As células estavelmente transfectadas devem expressar o marcador da resistência e o gene de interesse, tal como, por exemplo, um interferon que codifica o gene, bem como poder regenerar a planta intacta. 50 mg/L de canamicina são adicionados às placas de ágar de MS para iniciar a seleção. O curso da seleção depende em parte da velocidade com que as células se replicam, mas isto pode levar entre seis a dez semanas. Durante este tempo, o tecido transformado é induzido a regenerar pela adição de 0,2 mg/L de NAA e 2 mg/L de BAP às placas de ágar de MS e pelo incentivo ao desenvolvimento de broto com um ciclo de doze horas/dia de luz (com pressão da seleção continuada). À medida que os brotos adventícios começam a se desenvolver, eles podem ser testados quanto à expressão de genes a aproximadamente 2 cm de comprimento. Os brotos que expressam produtos de gene desejados (tal como testado por RT-PCR, por transferência Western e

pelo ensaio biológico) são transferidos subsequentemente às placas de ágar de MS para induzir a formação da raiz (1/2 de MS mais 0,2 mg/L de NAA).

[0106] Em um segundo exemplo, a regeneração do calo transgênico é realizada ao transferir aproximadamente 15 partes pequenas (aproximadamente 4 mm) ao Meio de Regeneração I (4,3 g/L de sais de MS, 1 mL/L (1000X) de carga de vitamina de MS, 100 mg/L de mio-inositol, 60 g/L de sacarose, 3 g/L de gelrita, pH 5,8) com adição de canamicina esterilizada por filtro (50 mg/L) e incubação por duas a três semanas a 25 graus Celsius no escuro. Os embriões somáticos amadurecidos são transferidos à luz no Meio de Regeneração II para germinação (4,3 g/L de sais de MS, 1 mL/L (1000X) de carga de vitamina de MS, 100 mg/L de mio-inositol, 30 g/L de sacarose, 3 g/L de gelrita, pH 5,8) com adição de canamicina esterilizada por filtro (50 mg/L).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de uma proteína exógena biologicamente ativa em uma planta de aloe, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a provisão de uma planta de aloe transgênica que compreende um construto de DNA recombinante que compreende um promotor, uma sequência que codifica a proteína exógena, uma sequência de terminação e uma sequência de translocação que codifica um peptídeo de sinal de secreção;

em que a proteína exógena é uma proteína de mamífero selecionada de interferons, imunoglobulinas, fatores de crescimento de mamífero, hormônios de mamífero, fatores do sangue, e antígenos de histocompatibilidade;

o cultivo da planta de modo que a proteína exógena do construto de DNA seja expressa, em que pelo menos uma porção da proteína exógena é translocada de uma célula de aloe para o gel de uma folha da planta transgênica;

em que o promotor é um promotor de ubiquitina do milho que apresenta a SEQ ID NO: 44; e o construto de DNA contém pelo menos um gene marcador selecionável;

em que a sequência de translocação compreende a sequência secretória de alfa amilase do arroz que apresenta a SEQ. ID NO: 29; e

a extração da proteína exógena do gel da folha da planta transgênica.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a sequência que codifica a proteína exógena é selecionada de SEQ ID NO: 33 (que codifica α -interferon); SEQ ID NO: 36 (que codifica protrombina); SEQ ID NO: 30 (que codifica dermicidina); e SEQ ID NO: 32 (que codifica hormônio do crescimento humano).

3. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de

que a planta de aloe transgênica é gerada por um processo compreendendo:

o isolamento de células de aloe de uma semente, meristema ou planta de aloe;

o crescimento das células de aloe em cultura em um meio nutriente contendo uma auxina e uma citocinina para formar um calo;

a transformação do calo com o construto de DNA recombinante;

a seleção para as células de aloe transformadas que contêm o construto de DNA recombinante enquanto o calo é cultivado em um meio de brotamento e seleção que compreende 0,2 mg/L de ácido 1-naftalenoacético (NAA) ou ácido indol-3-acético (IAA) e 2 mg/mL de 6-benzilaminopurina (BAP);

o crescimento de um broto regenerado no meio de brotamento e seleção em um meio de enraizamento que compreende 0,2 mg/L de NAA; e

uma vez que as raízes tenham começado a se formar, a transferência da plântula ao solo.

4. Método para a produção de uma planta de aloe transgênica que expressa uma proteína biologicamente ativa exógena à planta, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende:

o cultivo de calo não-diferenciado de células de aloe em um meio nutriente que contém ácido 1-naftalenoacético (NAA) ou ácido indol-3-acético (IAA) e 6-benzilaminopurina (BAP);

a introdução no calo de um construto de DNA recombinante que compreende um promotor, uma sequência que codifica a proteína exógena, uma sequência de terminação e uma sequência de translocação que codifica um peptídeo de sinal de secreção;

em que o dito promotor compreende a SEQ ID NO: 44;

em que a sequência de translocação compreende a sequência secretória de alfa amilase do arroz que apresenta a SEQ. ID NO: 29;

em que a proteína exógena é uma proteína de mamífero selecionada de interferons, imunoglobulinas, fatores de crescimento de mamífero, hormônios de mamífero, fatores do sangue, e antígenos de histocompatibilidade;

a proteína exógena é expressa do construto de DNA recombinante; e
pelo menos uma porção da proteína exógena é translocada de uma célula de aloe para o gel de uma folha de aloe da planta de aloe transgênica;

o crescimento do calo em um meio de brotamento e seleção que compreende 0,2 mg/L de NAA ou IAA e 2 mg/mL de BAP;

o crescimento em um meio de enraizamento que compreende 0,2 mg/L de NAA de um broto regenerado no meio de brotamento e seleção; e

uma vez que as raízes tenham começado a se formar, a transferência da plântula ao solo.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a sequência que codifica a proteína exógena é selecionada de SEQ ID NO: 33 (que codifica α -interferon); SEQ ID NO: 36 (que codifica protrombina); SEQ ID NO: 30 (que codifica dermicitina); e SEQ ID NO: 32 (que codifica hormônio do crescimento humano).

6. Método de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o calo é de semente de aloe.

7. Método de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o tecido do calo é bombardeado diretamente com o construto de DNA recombinante.

5

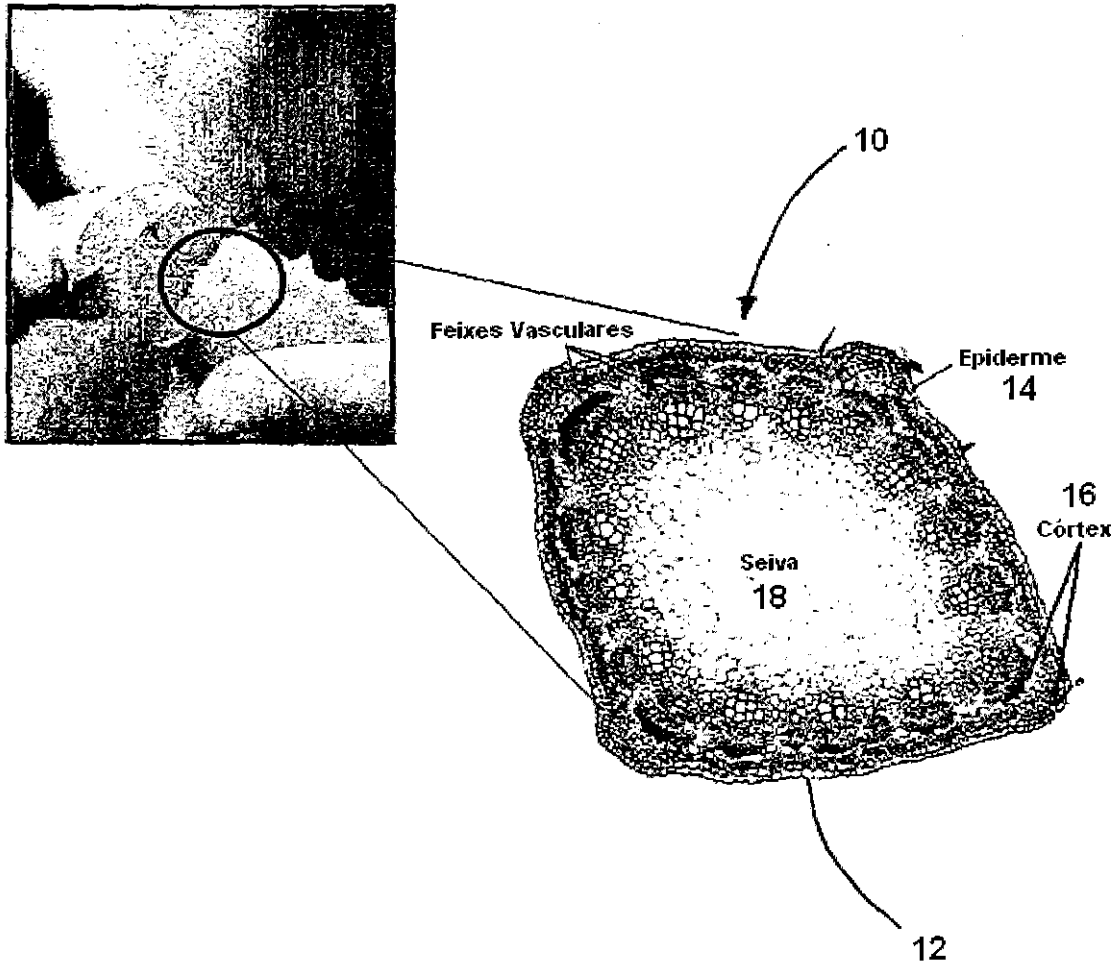


FIG. 1

10

5

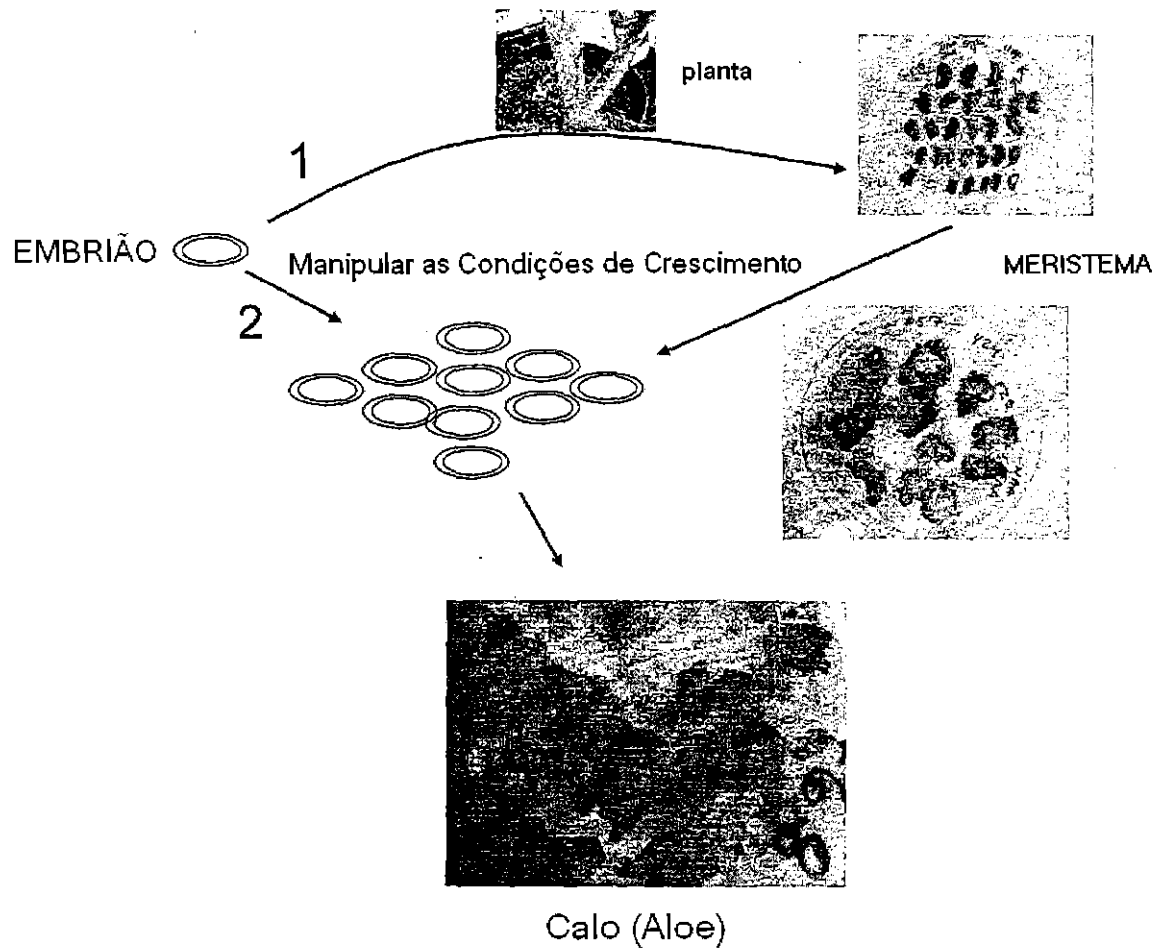


FIG. 2

10

5

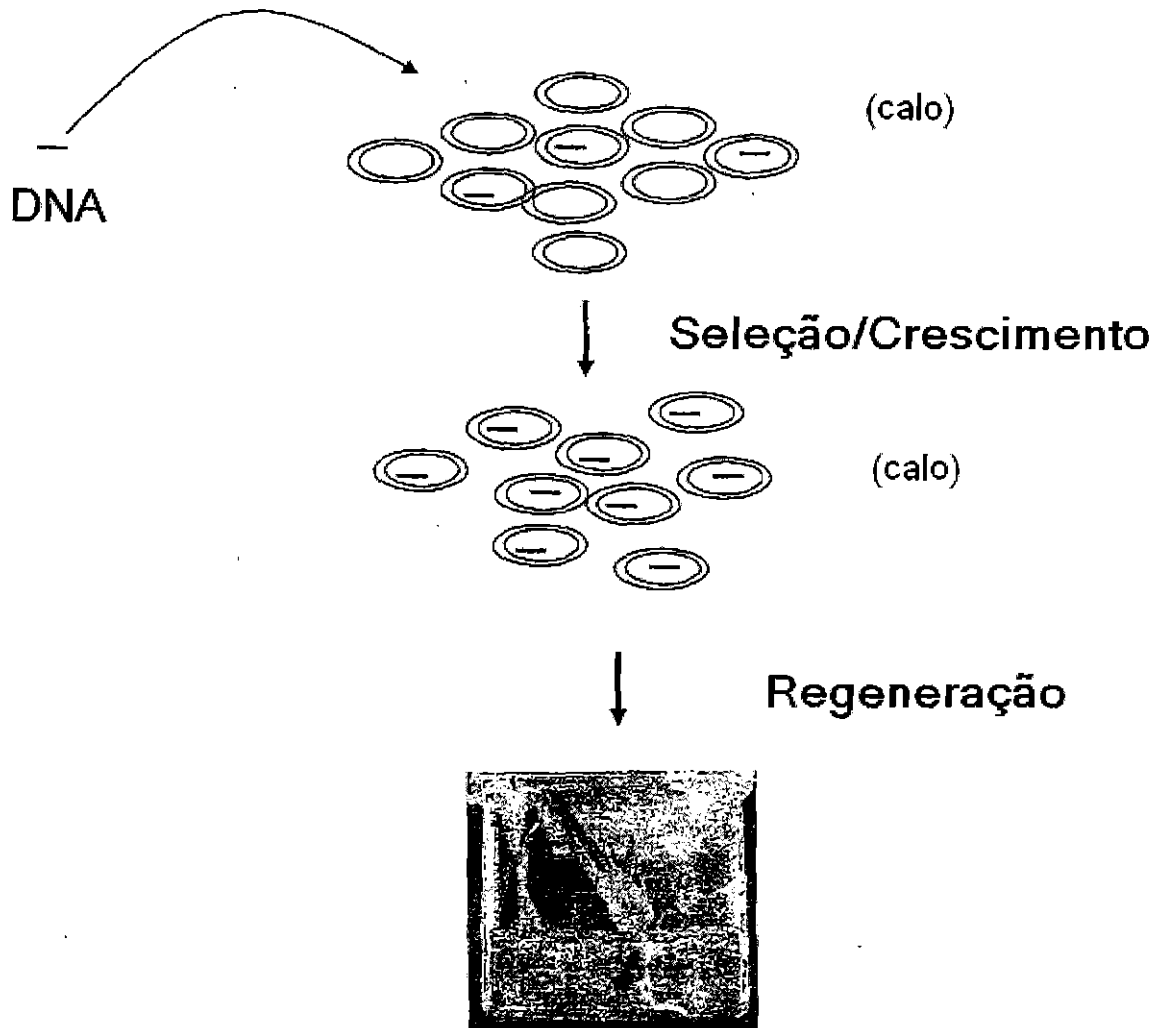
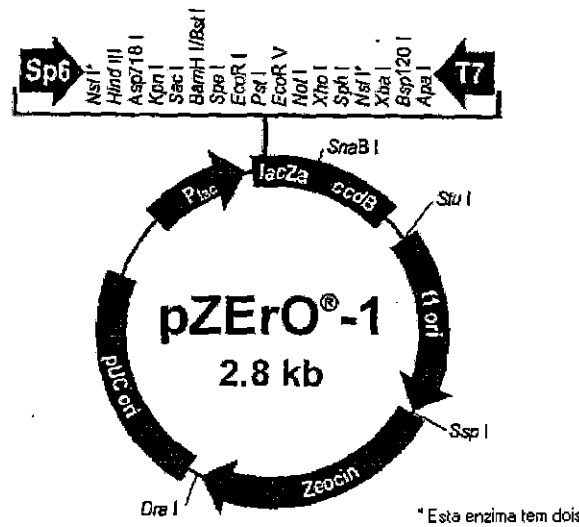


FIG. 3

10



		Primer Reverso M13	
155	CGTTCCGGGT GGTATGTTGT GTGCAATTGT GAGCGAATAT CAATTTCACA CAGGAGACAG CT ATC		
		Promotor Spi/Sítio de Sequência de Primer	Mat. Nal*
223	AGC ATG ATT AGC CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA CAA TAC TCA AGC TAT GCA		
		HisII Asp718I KpnI SpeI XbaI SphI NsiI XhoI PstI	
274	TCA AGC TIG GTA CCG AGC TCG CAT CCA CTA GTA AGC GCG GCG AGT GTC CTC GAA		
		SpeI EcoRV NsiI XhoI PstI SphI NsiI XhoI PstI	
326	ITC TCG AGA TAT CCA TCA CAC TCG CCG CCG CTC GAG CAT GCA TCT AGA GCG CCG		
		PstI EcoRV NsiI XhoI PstI SphI NsiI XhoI PstI	
		Promotor TP/Sítio de Sequência de Primer	Sítio de Sequência de Primer de Avanço M13(-20)
382	AAT TCG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAC AAT TCA CTC GCG CTC GTT TTA CAA CCG		
		Asn Ser Pro Tyr Ser Glu Ser Tyr Tyr Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Glu Arg	

FIG. 4

A Seqüência de Promotor de Ubiquitina

TGATCCCCTAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTGTCACACTTGTTTGAAGTGC
 AGTTTATCTATCTTTATACATATATTTAACTTCACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTG
 TTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTACTTTGACAACAGGACTCTACA
 GTTTTATCTCTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTTTA
 TTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTT
 AGCCTCTAAATTAAGAAAACTAAACTCTATTTTAGTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATAGAATAAAATAAA
 GTGACTAAAAATTAACAAATACCCCTTTAAGAAATTAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAA
 TGCCAGCCTGTTAAACGCCG**GTGACG**AGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCA
 AGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGGCCCT**CTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGAC**
 TTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCC
 TCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGC
 TATA box — **CGTAATAAATAGAC**ACCCCTCCACACCTCTTTCCCAACCTCGTGTGTTGTCGGAGCGCACACACACAACC
 BglII **AGATCT**CCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG

 XbaI **GTACG**CCGCTCGTCCTCCCCCCCCCTCTCTACCTTCT**CTAGAT**CGGCGTTCCGGTCCATGGTTAGGGCCCCG
 GTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTAGATCCGTGTTTGTGATAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCTGACACGG
 ATGCGACCTGTACGTACAGACAGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTC
 TAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTGCCCTTTTCCT
 TTATTTCAATATATGCCGTGCACATTGTTTGTGCGGTTCATCTTTTCATGTTTTTTTTGGCTTGGTTGTGATGATGT
 XbaI **GGTCT**GTTGGGCGGTGCT**CTAGAT**CGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTTGGA
 TCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTA
 TACATGTTGATGCGGGTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTGTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTG
 XbaI **GTTGGG**CGGTGCTTCATT**CTAGAT**CGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTAACTGGTGGATTTATTAATTTGG
 ATCTGTATGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTAAGATGATGGATGGAAGTATCGATCTAGGATAGGT
 ATACATGTTGATGTGGGTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTA**Ac**CTTG
 AGTACCTATCTATTATAATAAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGATCTTGATACTTGGATGATGGCATATGCAG
 CAGCTATATGTGGATTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTGTGATGCTC
 PstI ACCCTGTTGTTTGGTGTACTT**CTGCAG**

Região MAR

Primer R para MAR
XhoI

5' UTR
Iniciação de Transcrição

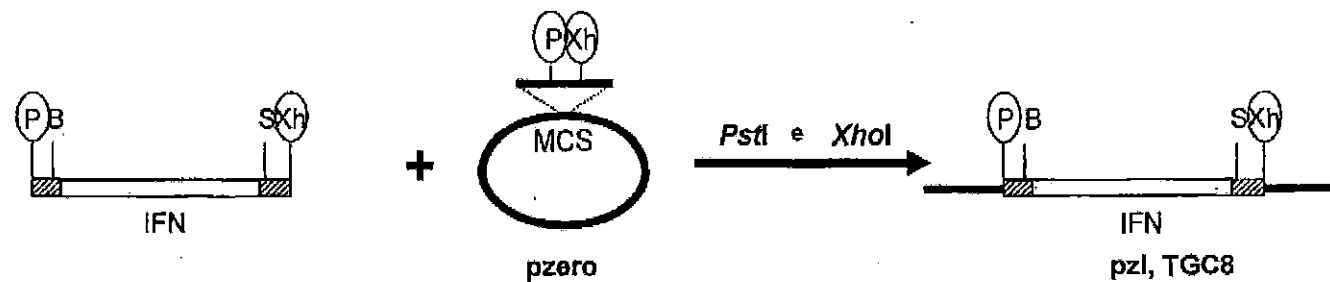
1º Intron
EcoRI

FIG. 5

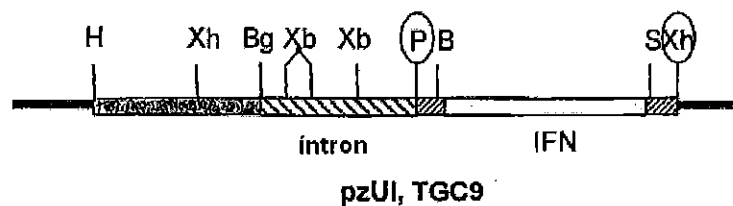
5/12

139

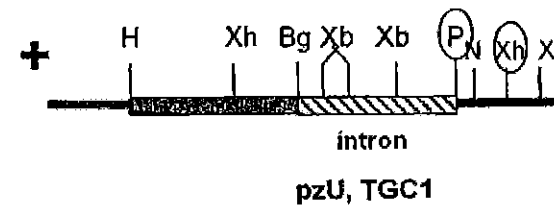
pzl, TGC8



pzUI, TGC9



PstI e XhoI



pzEnostop, TGC10

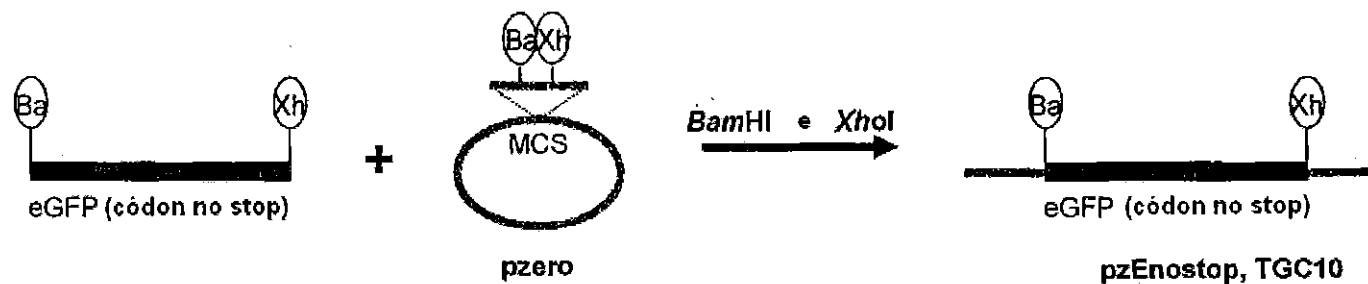
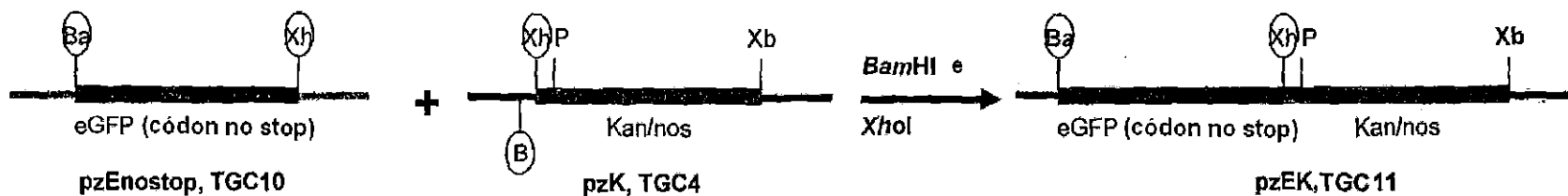
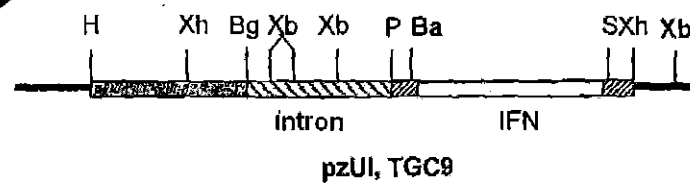


FIG. 6A

pzEK, TGC11



*BamHI e
XbaI*



pzUEK, TGC12

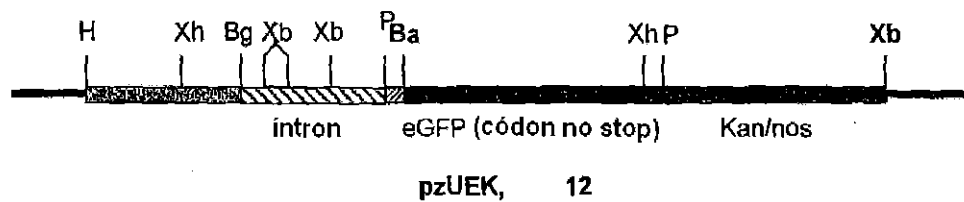
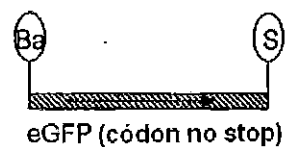
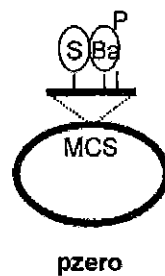


FIG. 6B

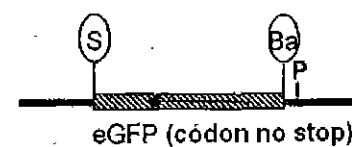
pzEnostart, TGC13



+

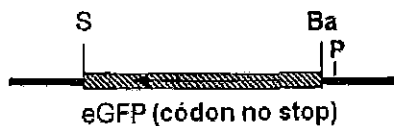


*Bam*HI e *Sal*I



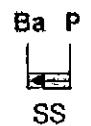
pzEnostart, TGC13

pzSE, TGC14

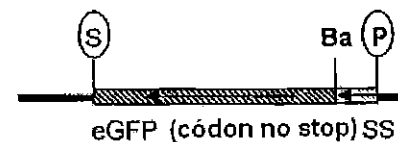


pzEnostart, TGC13

+



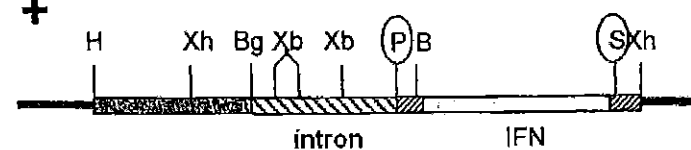
*Bam*HI e *Pst*I



pzSE, TGC14

*Sal*I e *Pst*I

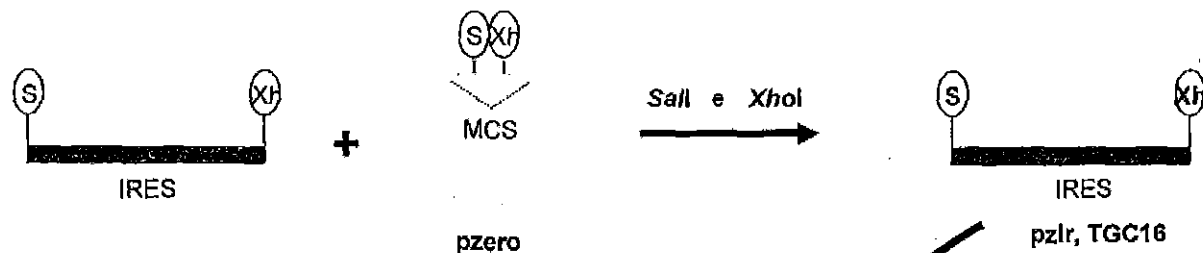
+



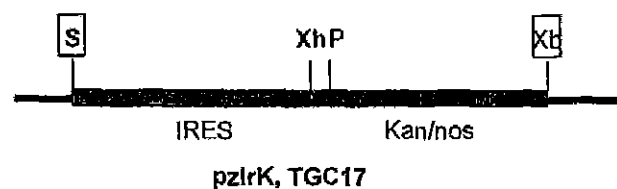
pzUI, TGC9

FIG. 7A

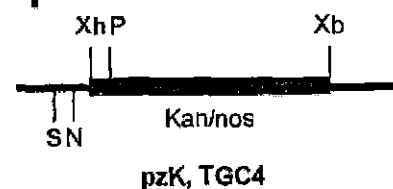
pzlr, TGC16



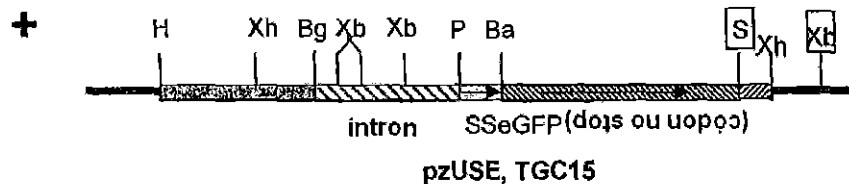
pzlrK, TGC17



SalI e XhoI



SalI e XbaI



pzUSElrK, TGC18

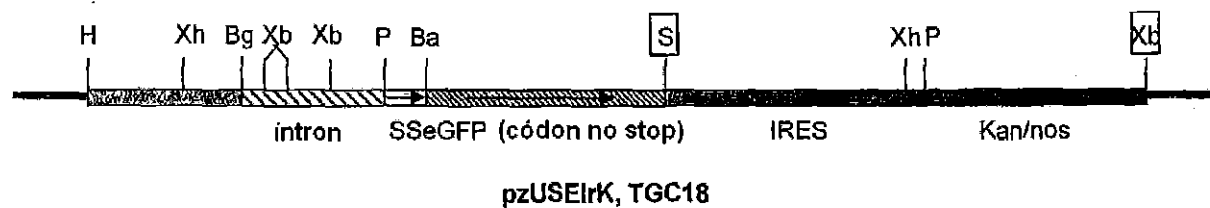


FIG. 7B

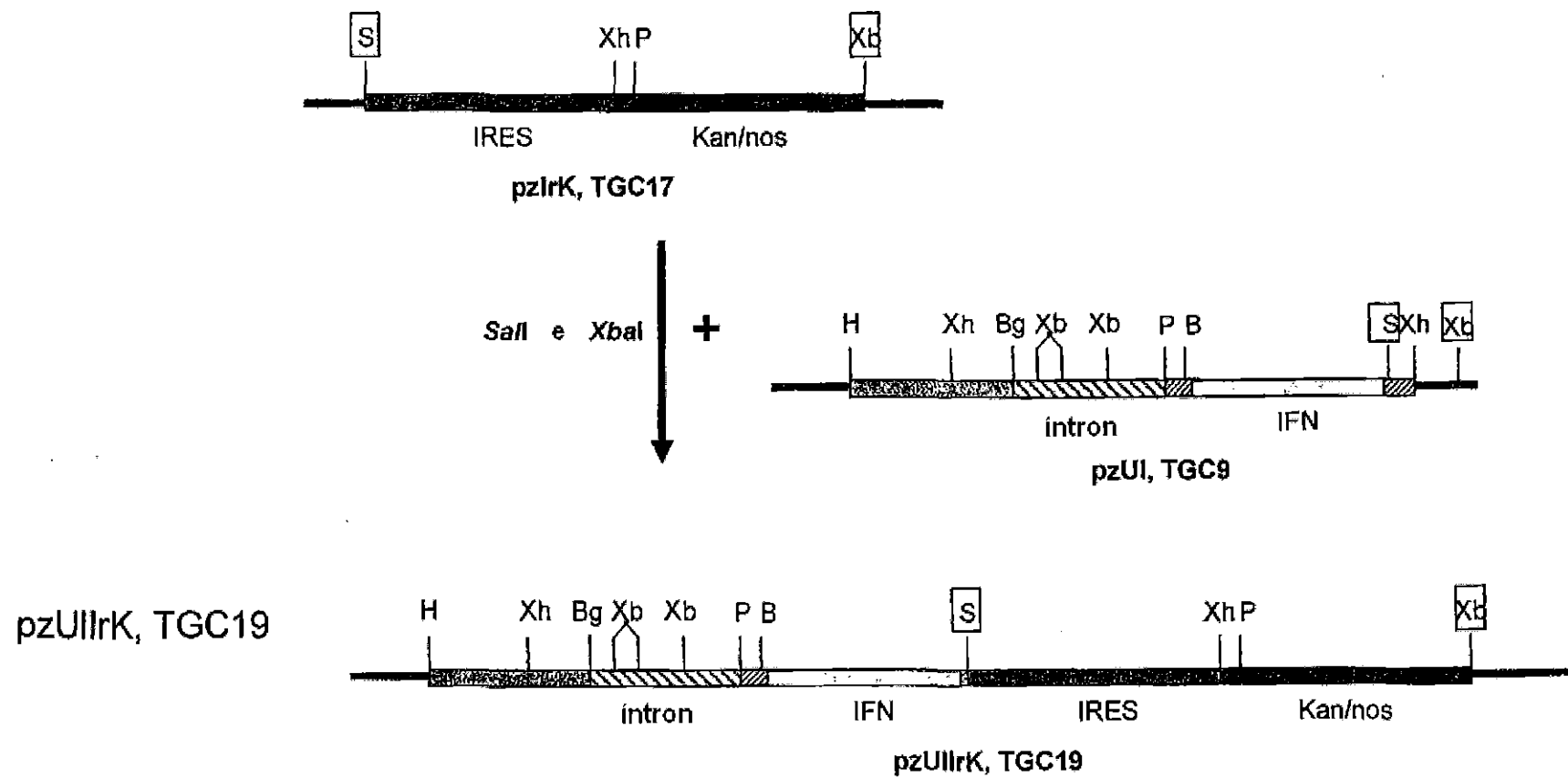
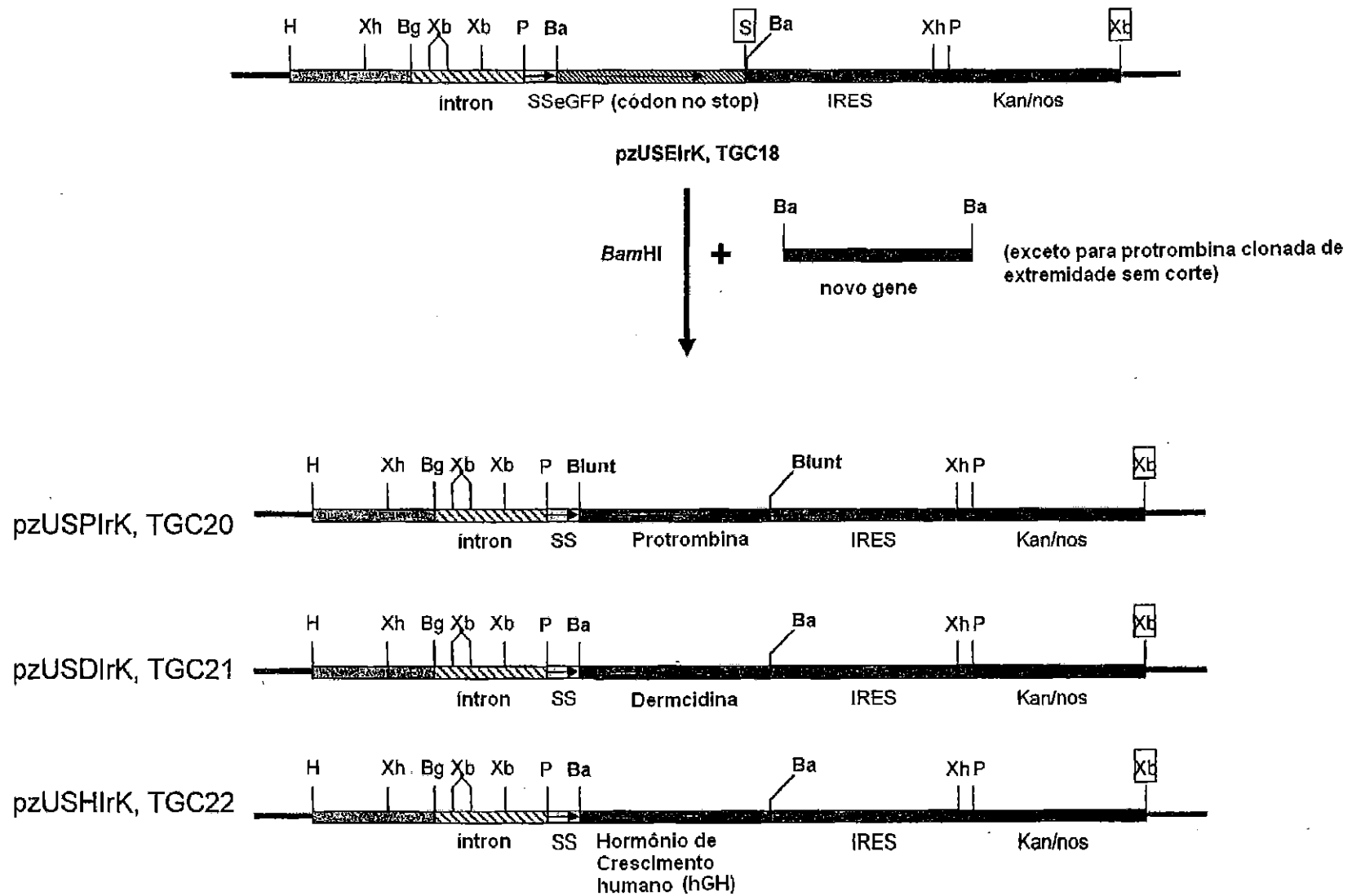


FIG. 7C

Outros Genes Expressados



5

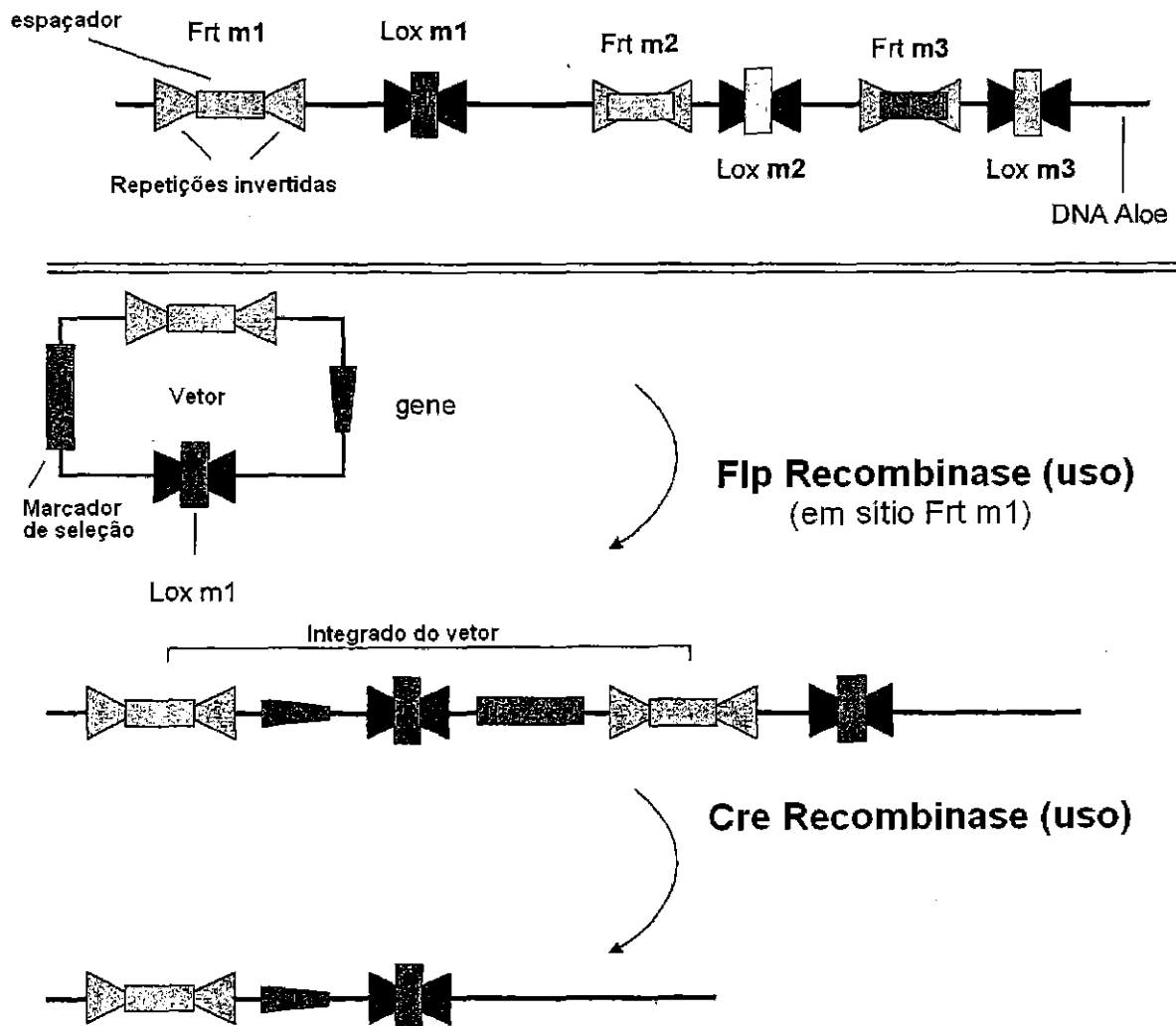


FIG. 9