



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 063**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99959703 .2**
96 Fecha de presentación : **08.12.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1137789**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2001**

54 Título: **Método para fabricación de glicoproteínas que tienen glicosilación de tipo humano.**

30 Prioridad: **09.12.1998 JP 10-350584**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.01.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.01.2011

73 Titular/es: **PHYTON HOLDINGS, L.L.C.**
3909 Hulen Street
Fort Worth, Texas 76107, US

72 Inventor/es: **Seki, Tatsuji y**
Fujiyama, Kazuhito

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 350 063 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para fabricación de glicoproteínas que tienen glicosilación de tipo humano.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la expresión de glicoproteínas exógenas por las plantas.

Técnica anterior

10

Muchas de las proteínas funcionales en los organismos vivos son glicoproteínas. Ha quedado esclarecido que la diversidad de las cadenas de azúcar en las glicoproteínas juega varios papeles fisiológicamente importantes (Lain, R.A., *Glycobiology*, 4, 759-767, 1994).

15

En los últimos años, ha quedado claro también que la acción de las cadenas de azúcar puede dividirse en dos categorías. En el primer caso, las cadenas de azúcar tienen una función directa como ligandos para la unión de células, o como receptores para bacterias y virus, en el aclaramiento de las glicoproteínas de la sangre, el direccionamiento a los lisosomas de enzimas lisosómicas y el direccionamiento por las glicoproteínas hacia tejidos y órganos específicos. Por ejemplo, se ha demostrado la contribución de las cadenas de azúcar de las glicoproteínas en la infección de las células diana por el virus del SIDA (HIV) (Rahebi, L. *et al.*, *Glycoconj. J.*, 12, 7-16, 1995). La superficie del HIV está cubierta con la proteína de la envoltura gp120. La fijación de las cadenas de azúcar gp120 al CD4 de las células diana es el comienzo de la infección por el virus HIV. En el segundo caso, la cadena de azúcar propiamente dicha no es la molécula funcional pero contribuye indirectamente a la formación de la estructura de orden superior de las proteínas, solubilidad de las proteínas, resistencia de las proteínas a las proteasas, inhibición de la antigenicidad, modificación de la función de las proteínas, ajuste de la tasa de regeneración de las proteínas, y ajuste de la cantidad de proteínas expresada en capas de células. Por ejemplo, las cadenas de azúcar son instrumentales en el ajuste de la adhesión de las moléculas de adhesión de las células nerviosas que están distribuidas ampliamente en el sistema nervioso (Edelman, G.M., *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 135-169, 1985).

30

En los eucariotas, las cadenas de azúcar de las glicoproteínas se sintetizan en los lípidos del retículo endoplasmático como cadenas de azúcar precursoras. La porción de la cadena de azúcar se transfiere a la proteína, y a continuación algunos de los residuos de azúcar en la proteína son eliminados en el retículo endoplasmático, después de lo cual la glicoproteína se transporta a los cuerpos de Golgi. En los cuerpos de Golgi, después que se han eliminado los residuos excesivos de azúcar, se añaden residuos de azúcar ulteriores (v.g. manosa) y se extiende la cadena de azúcar (Narimatsu, H., *Microbiol. Immunol.*, 38, 489-504, 1994).

35

Más específicamente, por ejemplo, se transfiere Glc3Man9GlcNAc2 sobre anclas de dolichol a la proteína en la membrana del ER (Moremen K.W., Trimble, R.B. and Herscovics A., *Glycobiology* 1994 Apr;4(2):113-25, Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway; y Sturm, A. 1995 N-Glycosylation of plant proteins. *En: New Comprehensive Biochemistry. Glycoproteins*, Vol.29a., Montreuil, J., Schachter, H. y Vliegthart, J.F.G.(eds). Elsevier Science Publishers B.V., Países Bajos, pp. 521-541). ER-glucosidase I and II removes three glucose units (Sturm, A. 1995, *supra*; y Kaushal G.P. y Elbein A.D., 1989, Glycoprotein processing enzymes in plants. *En Methods Enzymology* 179, Complex Carbohydrates Part F. Ginsburg V. (ed), Academic Press, Inc. NY, pp.452-475). La estructura rica en manosa resultante (Man9GlcNAc2) es ajustada por ER-manosidasa (Moremen K.W. *et al.*, *supra*; y Kornfeld, R. y Kornfeld, S., *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 631-664, 1985; Assembly of asparagine-linked oligosaccharides). El número de residuos manosa eliminados varía de acuerdo con las diferencias en la accesibilidad a las enzimas de procesamiento. Los isómeros Man8-, Man7-, Man6- y Man5GlcNAc2 se producen durante el procesamiento por la manosidasa del ER y la manosidasa I (Kornfeld, R. y Kornfeld, S., *supra*). Cuando se eliminan completamente 4 residuos manosa por la manosidasa I (Man I), el producto es Man5GlcNAc2. La N-acetilglucosaminil-transferasa I (GlcNAc I) transfiere N-acetilglucosamina (GlcNAc) desde UDP-GlcNAc a Man5GlcNAc2, dando como resultado GlcNAcMan5GlcNAc2 (Schachter, H., Narasimhan, S., Gleeson, P., y Vella, G., Glycosyltransferases involved in elongation of N-glycosidically linked oligosaccharides of the complex or N-acetylgalactosamine type. *En: Methods Enzymol* 98: Biomembranes Part L. Fleischer, S., y Fleischer, B. (ed), Academic Press, Inc. NY, pp.98-134 pp. 98-134, 1983). La manosidasa II (Man II) elimina dos residuos manosa de GlcNAcMan5GlcNAc2, produciendo GlcNAcMan3GlcNAc2 (Kaushal, G.P. y Elbein, A.D., *supra*; y Kornfeld, R. y Kornfeld, S., *supra*). El oligosacárido GlcNAcMan4GlcNAc2 se utiliza como sustrato de la N-acetilglucosaminil-transferasa II (GlcNAc II) (Moremen K.W. *et al.*, *supra*; Kaushal, G.P. y Elbein, A.D., *supra*; y Kornfeld, R. y Kornfeld, S., *supra*). Fig 19 resume las estructuras arriba descritas de glucanos unidos por N y enzimas implicadas en el camino de modificación de las cadenas azúcar en el retículo endoplasmático y los cuerpos de Golgi. En Fig 19, ◇ denota glucosa. □ denota GlcNAc, ○ denota manosa, ● denota galactosa, y ■ denota ácido esteárico, respectivamente.

60

La adición de azúcar en los cuerpos de Golgi se denomina síntesis terminal de las cadenas de azúcar. El proceso difiere ampliamente entre los organismos vivos. La síntesis de las cadenas de azúcar depende del tipo de eucariota. La estructura de las cadenas de azúcar resultante es específica de la especie, y refleja la evolución de la transferasa de adición de azúcar y los cuerpos de Golgi (Narimatsu, H., *Cellular Biology*, 15, 802-810, 1996).

65

En relación con las cadenas de azúcar analizadas por asparagina (unidas por N); en los animales, existen cadenas de azúcar de tipo rico en manosa, cadenas de azúcar de tipo complejo y cadenas de azúcar de tipo híbrido. Estas

estructuras se muestran en Fig 1. Las cadenas de azúcar de tipo complejo en las plantas tienen α -1.3 fucosa y β -1.2-xilosa, que son residuos azúcar que no se encuentran en los animales (Johnson, K.D. y Chrispeels, M.J., Plant Physiol., 84, 1301-1308, 1987, Kimura, Y. *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem., 56, 215-222, 1992). En el caso de las cadenas de azúcar unidas por N, se ha encontrado ácido siálico en las cadenas de azúcar animales, pero no se ha encontrado en las cadenas de azúcar de las plantas. En lo que respecta a la galactosa, que se encuentra generalmente en las cadenas de azúcar de los animales, aunque la presencia de las mismas se ha encontrado en algunas cadenas de azúcar de plantas (Takahashi, N. y Hotta, T., Biochemistry, 25, 388-395, 1986), los ejemplos de esto son pocos. El tipo de enlace de las mismas es un enlace β -1,3 (FEBS Lett 1997 Sep 29, 415(2), 186-191, Identification of the human Lewis(a) carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium mytilus* L.), Melo NS, Nimtz M, Contradt HS, Fevèreiro PS, Costa J; Plant J. 1997 Dec. 12(6),1411-1417, N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells., Fitchette-Laine AC, Gomord V, Cabanes M, Michalski JC, Saint Macary M, Foucher B, Cavelier B, Hawes C, Lerouge P, Faye L). Este enlace es diferente de los encontrados en los animales.

Las glicoproteínas derivadas de humanos incluyen eritropoyetina humana (EPO). Con objeto de producir glicoproteínas con estructuras de cadenas de azúcar similares a las humanas, estas glicoproteínas se producen en células hospedadoras animales. Sin embargo, la EPO producida en las células animales tiene una estructura de cadenas de azúcar que es diferente de la estructura de cadena de azúcar humana natural. Como resultado, la actividad in vivo de EPO es reducida (Takeuchi, M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7819-7822, 1989). Esta estructura de las cadenas de azúcar en otras proteínas derivadas de humanos, tales como hormonas e interferón, se ha analizado y fabricado también con las mismas limitaciones de glicosilación.

Los métodos utilizados para introducir genes exógenos en las plantas incluyen el método de *Agrobacterium* (Weising, K. *et al.*, Annu. Rev. Genet., 22, 421, 1988), el método de electroporación (Toriyama, K. *et al.*, Bio/Technology, 6, 1072, 1988), y el método de las partículas de oro (Gasser, C.G. y Fraley, R.T., Science, 244, 1293, 1989). WO 97/04122 describe la expresión de polipéptidos de mamífero en células de plantas. Han sido producidos en plantas albúmina (Sijmons, P.C. *et al.*, Bio/Technology, 8, 217, 1990), encefalina (Vandekerckhove, J. *et al.*, Bio/Technology, 7, 929, 1989), y anticuerpos monoclonales (Benvenuto, E. *et al.*, Plant Mol. Biol., 17, 865, 1991 y Hiatt, A. *et al.*, Nature, 342, 76, 1989). Los antígenos de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) (Mason, H.S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 11745, 1992) e IgA de tipo secreción (Hiatt, A. y Ma, J.S.K., FEBS Lett., 307, 71, 1992) han sido producidos también en células de plantas. WO 99/38987 describe la expresión de I-antitripsina en plantas. Sin embargo, cuando se expresan en plantas glicoproteínas derivadas de humanos, las cadenas de azúcar en las glicoproteínas fabricadas tienen estructuras diferentes que las cadenas de azúcar en las glicoproteínas producidas en humanos, debido a que el mecanismo de adición de azúcar en las plantas es diferente del mecanismo de adición de azúcar en los animales. Como resultado, las glicoproteínas no tienen la actividad fisiológica original y pueden ser inmunógenas en humanos (Wilson, I.B.H. *et al.*, Glycobiol., vol. 8, no. 7, pp. 651-661, 1998).

Descripción de la invención

El propósito de la presente invención es resolver los problemas asociados con la técnica anterior proporcionando glicoproteínas recombinantes producidas en plantas con cadenas de azúcar de mamífero, v.g. de tipo humano.

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, consiste en particular en un método de fabricación de una glicoproteína que tiene una cadena de azúcar de tipo humano que comprende un paso en el cual se obtiene una célula de planta transformada por introducción en una célula de planta del gen en una enzima capaz de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor y el gen de una glicoproteína exógena, y un paso en el cual se cultiva la célula de planta transformada obtenida.

En la presente invención, la glicoproteína con una cadena de azúcar de tipo humana puede comprender una cadena de azúcar interior y una cadena de azúcar exterior, estando constituida esencialmente la cadena de azúcar interior por una pluralidad de manosa y acetilglucosamina, y conteniendo la cadena de azúcar exterior una porción de cadena de azúcar terminal con una galactosa terminal no reductora.

En la presente invención, la cadena de azúcar exterior puede tener una configuración de cadena lineal o una configuración ramificada. En la presente invención, la porción de cadena de azúcar ramificada puede tener una configuración mono-, bi-, tri- o tetra-. En la presente invención, la glicoproteína no puede contener fucosa ni xilosa.

La presente invención es también una célula de planta que tiene un mecanismo de adición de las cadenas de azúcar que puede conducir a una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor, en donde el mecanismo de adición de las cadenas de azúcar actúa sobre una cadena de azúcar que contiene una cadena de azúcar interior y una cadena de azúcar exterior, en donde la cadena de azúcar interior está constituida esencialmente por una pluralidad de manosa y acetilglucosamina, y en donde la cadena de azúcar exterior contiene una porción de cadena de azúcar terminal con una galactosa terminal no reductora.

En la presente invención, se obtiene una glicoproteína con una cadena de azúcar de tipo humana utilizando este método.

Breve descripción de los dibujos

Fig 1. Un dibujo esquemático de configuraciones de cadena de azúcar unidas por N típicas.

Fig 2. Dibujos esquemáticos del método de clonación para hGT.

Fig 3. Dibujos esquemáticos del método utilizado para construir el vector pGAhGT para expresión de hGT.

Fig 4. Una fotografía que muestra que un análisis de transferencia Southern de un genoma de células de tabaco cultivadas transformadas. Fig 4 (A) muestra la electroforesis después que el DNA genómico (40 μ g) ha sido digerido por EcoRI y HindIII. Los números a la izquierda indican la posición del marcador de peso molecular de DNA. Fig 4 (B). Muestra un dibujo esquemático de un fragmento de 2,2 kb, que contiene un promotor, hGT y un terminador, que se integra en la célula transformada.

Fig 5 es una fotografía de la transferencia Western de proteína inmunorreactiva de células del tabaco transformadas BY2 (WT) y células de tabaco de tipo salvaje BY2 (WT). La proteína se desnaturizó, se sometió a electroforesis sobre SDS-PAGE al 10%, y se transfirió luego eléctricamente a una película de nitrocelulosa. Las muestras eran como sigue: Pista 1 = extracto de células GT1; Pista 2 = extracto de células GT6; Pista 3 = extracto de células GT8; Pista 4 = extracto de células GT9; Pista 5 = extracto de células de tipo salvaje; Pista 6 = fragmento de microsomas GT1; Pista 7 = fragmento de microsomas GT6; Pista 8 = fragmento de microsomas GT8; Pista 9 = fragmento de microsomas GT 9; Pista 10 = fragmento de microsomas de tipo salvaje.

Fig 6. Una fotografía de electroforesis que muestra la detección de glicoproteína galactosilada utilizando cromatografía de afinidad de *Ricinus communis* (RCA₁₂₀). El gel sometido a electroforesis se visualizó por tinción con plata. Las pistas 1 y 2 muestran la proteína de las células BY2 de tipo salvaje, mientras que las pistas 3 y 4 muestran la proteína de las células GT6 transformadas. El peso molecular se expresa en unidades KDa.

Fig 7. Una fotografía de transferencia Western que muestra la detección de glicoproteína galactosilada utilizando cromatografía de afinidad de *Ricinus communis* (RCA₁₂₀). Después que el gel sometido a electroforesis se había transferido a una membrana de nitrocelulosa, esta membrana se visualizó por tinción con lectina (RCA₁₂₀). Las pistas 1 y 2 muestran la proteína de una célula BY2 de tipo salvaje, mientras que las pistas 3 y 4 muestran la proteína de las células GT6 transformadas. El peso molecular se expresa en unidades KDa.

Fig 8. Una fotografía de una transferencia en la cual la glicoproteína galactosilada procedente de la cromatografía de afinidad de *Ricinus communis* (RCA₁₂₀) se sondó con un antisuero específico para xilosa en glucanos de plantas de tipo complejo. Las pistas 1 y 2 muestran los extractos de proteínas totales de BY2 y GT6, respectivamente, y la Pista 3 muestra la glicoproteína de GT6 después de cromatografía de afinidad de RCA₁₂₀. El peso molecular se expresa en unidades KDa.

Fig 9. Un dibujo esquemático de un plásmido pBIHm-HRP que es un vector binario con un gen de resistencia a la kanamicina y un gen de resistencia a higromicina, y tiene un HRP cDNA.

Fig 10. Fotografías de enfoque isoelectrico y transferencia Western que muestran la producción de HRP en un cultivo en suspensión de células transgénicas. Fig 10 (A) muestra los resultados del enfoque isoelectrico y Fig 10 (B) muestra los resultados de la transferencia Western. Las abreviaturas son como sigue: WT = tipo salvaje; BY2-HRP 1, 5 y 7 = los números de clon para las células BY2 transformadas con un gen HRP; y GT-6-HRP4, 5 y 6 = los números de clon para las células GT6 transformadas con un gen HRP.

Fig 11. Un gráfico que muestra el patrón HPLC de fase inversa de una cadena de azúcar PA eluida en gradiente lineal 0-15% de acetonitrilo en 0,02% de TFA a lo largo de 60 minutos y con un caudal de 1,2 ml/min. I-XI muestra las fracciones eluidas y purificadas a partir de HPLC de fraccionamiento por tamaños. La longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión eran 310 nm y 380 nm, respectivamente.

Fig 12. Gráficos que muestran el patrón HPLC de fraccionamiento por tamaños de la cadena de azúcar PA en Fig 11. La elución se realizó en un gradiente 30-50% de agua en la mezcla agua-acetonitrilo a lo largo de 40 minutos y con un caudal de 0,8 ml/min. La longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión eran 310 nm y 380 nm, respectivamente.

Fig 13. Un gráfico que muestra la posición de elución del pico K2 en la HPLC de fase inversa en donde se comparan dos productos estándar de cadena de azúcar A y B con el pico K2. Las condiciones de elución eran las mismas que en Fig 11. Es decir, la elución se realizó en gradiente lineal 0-15% de acetonitrilo en 0,02% de TFA a lo largo de 60 minutos y con un caudal de 1,2 ml/min.

Fig 14. Gráficos que muestran los perfiles SF-HPLC de cadenas azúcar PA galactosiladas obtenidas después de digestión con exoglicosidasa. La elución se realizó en un gradiente 30-50% de agua en la mezcla agua-acetonitrilo a lo largo de 25 minutos y con un caudal de 0,8 ml/min. (A) cadena de azúcar PA K-2: I es la posición de elución de la cadena de azúcar PA galactosilada utilizada; II son materiales digeridos con β -galactosidasa de I; III es un material digerido con N-acetil- β -D-glucosaminidasa de II; IV es un material digerido con α -manosidasa de frijol machete de

III. (B) cadena L de azúcar PA: I es la posición de elución de la cadena de azúcar PA galactosilada utilizada; II es un material digerido con β -galactosidasa de I; III es un material digerido con N-acetil- β -D-glucosaminidasa de II; IV es un material digerido con α 1,2-manosidasa de III; V es un material digerido α -manosidasa de frijol machete de III.

5 Fig 15. Estructuras estimadas de los glucanos unidos por N obtenidos a partir de las células transformadas. Los números entre paréntesis indican la relación molar.

Fig 16. Fotografías de cromatografía de afinidad con aglutinina de *Ricinus communis* 120 (RCA₁₂₀) que muestran la detección de HLP glicosilada. Fig 16 (A) muestra los resultados de la tinción con plata, y Fig 16 (B) muestra los resultados de la tinción con lectina RCA₁₂₀. El filtro teñido con lectina se cortó en tiras y se sondó luego utilizando lectina RCA₁₂₀ preincubada con tampón solo (I y II) o incubada en tampón con exceso de galactosa (III). En (II), se trató HRP con β -galactosidasa de *Diplococcus pneumoniae* antes de la SDS-PAGE. La Pista 1 es una fracción recogida que contenía BY2-HRP y la Pista 2 es una fracción recogida que contenía GT6-HRP. Los números a la izquierda hacen referencia a la localización y el tamaño (KDa) de la proteína estándar.

15 Fig 17. Un gráfico que muestra los resultados de la HPLC de fase inversa de las cadenas de azúcar PA procedentes de HRP purificada después de cromatografía de afinidad sobre RCA₁₂₀.

Fig 18. Fotografías de transferencia Western que muestran la detección inmune de glucanos de tipo complejo específicos de plantas. La HRP purificada se fracciona por SDS-PAGE, se transfiere a nitrocelulosa, y se confirma con anti-HRP de conejo (A) y un antisuero que es específico para glucanos de tipo complejo de plantas (B). Pista 1 = HRP galactosilada de GT6-HRP después de cromatografía de afinidad sobre RCA₁₂₀; Pista 2 = HRP purificada de BY2-HRP. La posición del marcador de tamaño molecular se muestra a la izquierda en KDa. El N-glucano galactosilado en HRP derivado de las células transformantes GT6-HRP no reaccionaba con un antisuero que se ha demostrado reacciona específicamente con el residuo β -1,2-xilosa indicativo de N-glucanos de plantas.

Fig 19. Estructuras de glucanos unidos por N y enzimas implicadas en el camino de modificación de las cadenas de azúcar en el retículo endoplasmático y los cuerpos de Golgi. Por $\diamond$ denotan glucosa, un $\square$ denota GlcNAc, un $\circ$ denota manosa, un $\bullet$ denota galactosa, y $\blacksquare$ denota ácido siálico, respectivamente.

30 Fig 20. Estructuras de glucanos unidos por N y la relación de cada glucano unido por N en la línea de células GT6 junto con las de la línea de células BY2 de tipo salvaje determinadas análogamente. $\square$ denota GlcNAc, un $\circ$ denota manosa, un $\bullet$ denota galactosa, y $\blacksquare$ denota ácido siálico, respectivamente.

35 Fig 21 ilustra una de las realizaciones de la presente invención. En la línea de células GT6, se observaron los isómeros Man7-, Man6-, y Man5GlcNAc2. Dado que dichos oligosacáridos de tipo rico en manosa serán convertidos por algunas enzimas procesadoras de glucanos de modo que se conviertan en sustratos para β -1,4-galactosiltransferasa (GalT), la introducción de cDNAs de GlcNAc I, Man I y Man II podría conducir más eficientemente el oligosacárido Man7-5GlcNAc2 a GlcNAc Man3GlcNAc2, que puede ser un sustrato de GalT.

40 Fig 22 ilustra también otra de las realizaciones de la presente invención. 1,4-galactosiltransferasa (GalT) utiliza UDP-galactosa como sustrato donante y GlcNAc2Man3GlcNAc2 como sustrato aceptor. El suministro eficiente de UDP-galactosa mejorará la relación con la enzima GalT y se producirá más cantidad de oligosacárido galactosilado.

45 Modo óptimo de realización de la invención

A continuación, se describirá la presente invención con mayor detalle. En la realización de la presente invención, a no ser que se indique otra cosa, puede utilizarse cualquier técnica convencional. Éstas incluyen métodos para aislamiento y análisis de proteínas, y métodos inmunológicos. Estos métodos pueden realizarse utilizando kits, anticuerpos y marcadores comerciales.

El método de la presente invención se refiere a un método de fabricación de glicoproteínas con cadenas de azúcar de tipo humano. En esta memoria descriptiva, "cadena de azúcar de tipo humano" se refiere a una cadena de azúcar con un residuo galactosa enlazado a un residuo de n-acetilglucosamina. El residuo galactosa en la cadena de azúcar de tipo humano puede ser la cadena de azúcar terminal o puede estar enlazado un residuo de ácido siálico al exterior del residuo galactosa. Preferiblemente, la glicoproteína de la presente invención no tiene al menos xilosa o fucosa alguna enlazada a una o más de las porciones siguientes: la porción de la cadena de azúcar interior, la porción de la cadena de azúcar ramificada, o la porción de la cadena de azúcar terminal de la cadena de azúcar de tipo humano. Más preferiblemente, no deben estar enlazadas xilosa ni fucosa a porción alguna de la cadena de azúcar de tipo humano, e idealmente no debería estar contenida en absoluto cantidad alguna de xilosa o fucosa en la cadena de azúcar de tipo humano.

65 Las células de planta pueden ser cualesquiera células de planta deseadas. Las células de planta pueden ser células cultivadas, células en tejido cultivado u órganos cultivados, o células en una planta. Preferiblemente, las células de planta deberían ser células cultivadas, o células en tejido cultivado u órganos cultivados. Muy preferiblemente, las células de plantas deberían ser células en plantas enteras, o porciones de las mismas, que produzcan glicoproteínas con cadenas de azúcar de tipo humano. El tipo de planta utilizado en el método de fabricación de la presente invención

puede ser cualquier tipo de planta que se utilice en transferencia génica. Ejemplos de tipos de plantas que pueden utilizarse en el método de fabricación de la presente invención incluyen plantas de las familias de *Solanáceas*, *Poáceas*, *Brassicáceas*, *Rosáceas*, *Leguminosas*, *Cucurbitáceas*, *Lamiáceas*, *Liliáceas*, *Quenopodiáceas* y *Umbelíferas*.

5 Ejemplos de plantas en la familia *Solanáceas* incluyen plantas de los géneros *Nicotiana*, *Solanum*, *Datura*, *Lycopersicon* y *Petunia*. Ejemplos específicos incluyen tabaco, berenjena, patata, tomate, guindilla, y petunia.

10 Ejemplos de plantas en la familia *Poáceas* incluyen plantas de los géneros *Oryza*, *Hordenum*, *Secale*, *Saccharum*, *Echinochloa* y *Zea*. Ejemplos específicos incluyen arroz, cebada, centeno, *Echinochloa crus-galli*, sorgo, y maíz.

10 Ejemplos de plantas en la familia *Brassicáceas* incluyen plantas de los géneros *Raphanus*, *Brassica*, *Arabidopsis*, *Wasabia*, y *Capsella*. Ejemplos específicos incluyen el rábano blanco japonés, la colza, *Arabidopsis thaliana*, el rábano picante japonés, y *Capsella bursa-pastoris*.

15 Ejemplos de plantas en la familia *Rosáceas* incluyen plantas de los géneros *Orunus*, *Manus*, *Pynus*, *Fragaria*, y *Rosa*. Ejemplos específicos incluyen ciruela, melocotón, manzana, pera, fresa holandesa, y rosa.

20 Ejemplos de plantas en la familia *Leguminosas* incluyen plantas de los géneros *Glycine*, *Vigna*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Vicia*, *Arachis*, *Trifolium*, *Alfalfa*, y *Medicago*. Ejemplos específicos incluyen soja, haba adzuki, judías, guisantes, habas comunes, cacahuetes, trébol, y alfalfa.

Ejemplos de plantas en la familia *Cucurbitáceas* incluyen plantas de los géneros *Luffa*, *Cucurbita*, y *Cucumis*. Ejemplos específicos incluyen güiro, calabaza, pepino, y melón.

25 Ejemplos de plantas en la familia *Lamiáceas* incluyen plantas de los géneros *Lavandula*, *Mentha*, y *Perilla*. Ejemplos específicos incluyen lavanda, menta común, y la planta bistec.

Ejemplos de plantas en la familia *Liliáceas* incluyen plantas de los géneros *Allium*, *Lilium*, y *Tulipa*. Ejemplos específicos incluyen cebolla, ajo, lirio y tulipán.

30 Ejemplos de plantas en la familia *Quenopodiáceas* incluyen plantas del género *Spinacia*. Un ejemplo específico es la espinaca.

35 Ejemplos de plantas en la familia *Umbelíferas* incluyen plantas de los géneros *Angelica*, *Daucus*, *Cryptotaemia*, y *Apitum*. Ejemplos específicos incluyen el udo japonés, zanahoria, perejil silvestre y apio.

40 Preferiblemente, las plantas utilizadas en el método de fabricación de la presente invención serían tabaco, tomate, patata, arroz, maíz, rábano, soja, guisantes, alfalfa o espinaca. Idealmente, las plantas utilizadas en el método de fabricación de la presente invención serían tabaco, tomate, patata, maíz o soja.

45 En esta memoria descriptiva, “una enzima capaz de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor” hace referencia a una enzima capaz de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductora producido cuando se añade una cadena de azúcar después de la síntesis de la porción proteínica de la glicoproteína en la célula de la planta. Ejemplos específicos de estas enzimas incluyen galactosiltransferasa, galactosidasa, y β -galactosidasa. Estas enzimas pueden derivarse de cualquier animal deseado. Preferiblemente, estas enzimas se derivarían de un mamífero, e idealmente estas enzimas se derivarían de un humano.

50 En esta memoria descriptiva, “el gen de una enzima capaz de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor” puede ser un gen que puede aislarse de una célula animal utilizando una secuencia de nucleótidos de una enzima codificada bien conocida en la técnica, o genes disponibles comercialmente alterados para expresión en plantas.

55 En esta memoria descriptiva, “gen” hace referencia usualmente a la porción estructural de un gen. Una secuencia de control tal como un promotor, operador y terminador puede estar unida al gen a fin de expresar adecuadamente el gen en una planta.

60 En esta memoria descriptiva, “glicoproteínas exógenas” se refiere a glicoproteínas cuya expresión en plantas es el resultado de metodologías de ingeniería genética. Ejemplos de estas glicoproteínas exógenas incluyen enzimas, hormonas, citoquinas, anticuerpos, vacunas, receptores y proteínas séricas. Ejemplos de enzimas incluyen peroxidasa de rábano picante, quinasa, glucocerebrosidasa, α -galactosidasa, activador del plasminógeno tipo tisular (TPA), y HMG-CoA-reductasa. Ejemplos de hormonas y citoquinas incluyen encefalina, interferón alfa, GM-CSF, G-CSF, hormona estimulante coriónica, interleuquina-2, interferón-beta, interferón-gamma, eritropoyetina, factor de crecimiento endotelial vascular, gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del tiroides (TSH), prolactina, y hormona estimulante del ovario. Ejemplos de anticuerpos incluyen IgG y scFv. Ejemplos de vacunas incluyen antígenos tales como el antígeno de superficie de la Hepatitis B, antígeno de rotavirus, enterotoxina de *Escherichia coli*, antígeno de la malaria, proteína del virus G de la rabia, y glicoproteína del virus HIV (v.g., gp120). Ejemplos de receptores y proteínas de matriz incluyen receptores EGF, fibronectina, a1-antitripsina, y factor de coa-

gulación VIII. Ejemplos de proteínas séricas incluyen albúmina, proteínas del complemento, plasminógeno, globulina de fijación de corticosteroides, globulina de fijación de tiroxina, y proteína C.

En esta memoria descriptiva, "genes de glicoproteínas exógenas" hace referencia a un gen, que puede aislarse una célula utilizando una secuencia de nucleótidos de una proteína codificada bien conocida en la técnica, o genes disponibles comercialmente alterados para expresión en plantas.

El gen de las enzimas capaces de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor y los genes de glicoproteínas exógenas pueden introducirse en las células de las plantas utilizando un método bien conocido en la técnica. Estos genes pueden introducirse por separado o simultáneamente. Ejemplos de métodos para la introducción de genes en células de plantas incluyen el método de *Agrobacterium*, el método de electroporación y el método de bombardeo con partículas.

Utilizando cualquier método bien conocido en la técnica, las células de plantas con genes introducidos pueden testarse para tener la seguridad de que los genes introducidos se expresan. Ejemplos de tales métodos incluyen tinción o aumento con plata, transferencia Western, hibridación Northern, y detección de la actividad enzimática. Las células que expresan los genes introducidos se conocen como células transformadas.

Las células transformadas, que expresan enzimas capaces de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor y glicoproteínas exógenas, expresan las glicoproteínas exógenas con cadenas de azúcar de tipo humano. Dicho de otro modo, las células transformadas tienen mecanismos de adición de cadenas de azúcar de tipo humano. Por cultivo de estas células transformadas, pueden producirse en gran escala glicoproteínas con cadenas de azúcar de tipo humano. Las glicoproteínas de tipo humano contienen cadenas de azúcar interior y cadenas de azúcar exteriores. Las cadenas de azúcar interior están constituidas esencialmente por una pluralidad de manosa o acetilglucosamina. Las cadenas de azúcar exteriores en estas glicoproteínas contienen porciones de cadena de azúcar terminal no reductoras. Las cadenas de azúcar exteriores pueden tener una configuración de cadena lineal o una configuración de cadena ramificada. La porción de cadena de azúcar ramificada tiene una configuración mono-, bi-, tri- o tetra-. Las glicoproteínas fabricadas utilizando estas células transformadas no contienen idealmente residuo alguno de fucosa o xilosa.

Estas células de plantas transformadas pueden mantenerse en estado de cultivo o pueden diferenciarse en tejidos u órganos específicos. Alternativamente, las mismas pueden generarse también en plantas. En este caso, las células de planta transformadas pueden estar presentes en la planta entera o en porciones específicas de la planta, tales como semilla, fruto, almendra, hoja, raíz, tallo o flor de la planta.

Las glicoproteínas con cadenas de azúcar de tipo humano pueden ser fabricadas por las células de planta transformadas y aislarse o extraerse luego de las células de la planta. El método para aislar las glicoproteínas puede ser cualquier método bien conocido en la técnica. Las glicoproteínas pueden utilizarse en productos alimenticios mientras se mantienen en las células transformadas, o las glicoproteínas de la presente invención pueden administrarse a animales con inclusión de humanos sin antigenicidad debido a las cadenas de azúcar de tipo humano añadidas.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle mediante ejemplos ilustrativos, pero no restrictivos.

Ejemplo 1

Clonación de Genes de β -1,4-galactosa-transferasa Humana

Se han clonado ya genes de β -1,4-galactosiltransferasa (hGT) (EC2.4.1.38). Se ha descubierto una configuración primaria constituida por 400 aminoácidos (Masri, K.A. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 657-663, 1988).

(1) Preparación de Iniciadores y DNA Molde

Se prepararon los iniciadores siguientes con referencia al informe de Masri *et al.*

hGT-5Eco: 5'-AAAGAATTCGCGATGCCAGGCGCGCTCCCT-3' (Secuencia ID:1)

hGT-2Sal: 3'-TCGATCGCAAACCATGTGCAGCTGATG-5' (Secuencia I.D:2)

hGT-7Spe: 3'-ACGGGACTCCTCAGGGGCGATGATCATAA-5' (Secuencia I.D:3)

hGT6Spe: 5'-AAGACTAGTGGGCCCCATGCTGATTGA-3' (Secuencia I.D:4)

Como el DNA molde se utilizaron DNA genómico humano, cDNA de placenta humana, y cDNA de riñón humano, adquiridos de Clontech.

(2) Clonación del cDNA del gen hGT

(i) Se utilizó DNA genómico humano como el molde y se utilizaron hGT-5Eco y hGT-7Spe como los iniciadores; (ii) se utilizó cDNA de placenta humana como el molde y se utilizaron como los iniciadores hGT-2Sal y hGT6Spe. Se combinaron ambos y se llevó a cabo una reacción PCR en las condiciones siguientes. Se obtuvieron luego fragmentos de 0,4 kb y fragmentos de 0,8 kb que contenían áreas codificadas de hGT.

(Mezcla de reacción PCR) 1 μ l de DNA molde, 5 μ ml de solución tampón 10 xPCR, 4 μ l dNTPs (200 mM), los iniciadores (10 pmol), y 0,5 μ l (Takara Shuzo Co., Ltd.) de polimerasa Tag (o 0,2 μ l de polimerasa Tub), y se añadió agua para completar hasta 50 μ l.

(Condiciones de la reacción PCR) (primera etapa): 1 ciclo, desnaturalización (94°C) 5 minutos, reasociación (55°C) 1 minuto, extensión (72°C) 2 minutos. Segunda etapa: 30 ciclos, desnaturalización (94°C) 1 minuto, reasociación (55°C) 1 minuto, extensión (72°C) 2 minutos. Tercera etapa: 1 ciclo, desnaturalización (94°C), 1 minuto, reasociación (55°C) 2 minutos, extensión (72°C) 5 minutos.

Se combinaron los dos fragmentos para formar cDNA del gen hGT y se clonaron en pBluescript II SK+ (SK). El pBluescript II SK+ (SK) se adquirió de Stratagene Co., Ltd. Fig 2 muestra la estructura de un plásmido que contenía cDNA del gen hGT. Éste exhibe la secuencia No. 5 en la secuencia de nucleótidos del gen hGT y la secuencia No. 6 en la secuencia de aminoácidos estimada. Esta secuencia de nucleótidos difería de la secuencia de hGT publicada por Masri *et al.* (véase anteriormente) en los aspectos siguientes: a) los nucleótidos son diferentes en el sentido de que A en la Posición No. 528 es G, C en la Posición No. 562 es T y A en la Posición No. 1047 es G; sin embargo, en la secuencia de aminoácidos codificada no cambia; b) faltan nueve nucleótidos en las posiciones desde la Posición No. 622 a la Posición No. 630; c) G en la Posición No. 405 es A y T en la Posición No. 408 es A. Estos cambios de nucleótidos se hicieron durante la preparación de los iniciadores de tal modo que el fragmento de 0,4 kb y el fragmento 0,8 kb están conectados. Existen dos codones de partida (ATG) en el cDNA del gen hGT. En este experimento, sin embargo, el gen está diseñado de tal modo que la traducción comienza desde el segundo codón inicial (Posición No. 37).

Ejemplo 2

Introducción del Gen hGT en una Célula Cultivada de Tabaco

(1) Se ha consignado que hGT se expresa en forma activa en *Escherichia coli* (Aoki, D. *et al.*, EMBO J., 9, 3171, 1990 y Nakazawa, K. *et al.*, J. Biochem, 113, 747, 1993). A fin de que una célula cultivada de tabaco expresara hGT, el vector de expresión pGAhGT tuvo que estructurarse como se muestra en Fig 3. Se utilizó como el promotor un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (promotor CaMV 35S), que dirige constitutivamente la expresión del gen en células de planta. Se utilizó como marcador de selección un gen de resistencia a la kanamicina. El pGAhGT se introdujo en la célula cultivada de tabaco por el método de *Agrobacterium*.

El método de *Agrobacterium* se llevó a cabo utilizando el método de apareamiento triparental de Bevan *et al.* (Bevan, M., Nucleic Acids Res., 12, 8711, 1984). *Escherichia coli* DH5 α (suE44, DlacU169, (ϕ 80lacZDM15), hsdR17) (Bethesda Research Laboratories Inc.: Focus 8 (2), 9, 1986) con plásmidos de tipo pGA (An. G., Methods Enzymol. 153, 292, 1987) y *Escherichia coli* HB101 con el plásmido adyuvante pRK2013 (Bevan, M., Nucleic Acid Res., 12, 8711, 1984) se dejaron en reposo durante una noche a 37°C en un medio 2 x YT que contenía 12,5 mg/l de tetraciclina y 50 mg/l de kanamicina, y *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 se dejó en reposo durante dos noches a 28°C en un medio 2 x YT que contenía 50 mg/l de kanamicina y 25 mg/l de cloranfenicol. A continuación, se retiraron 1,5 ml de cada medio cultivado y se pusieron en un tubo Eppendorf. Después que se hubieron recogido las células de cada cepa, se lavaron 3 veces las células en un medio LB. Las células obtenidas de este modo se suspendieron luego en 100 μ l de un medio 2 x YT, se mezclaron con 3 tipos de bacterias, se aplicaron a un medio de agar 2 x YT, y se cultivaron a 28°C, con lo cual los plásmidos de tipo pGA sufrieron luego una transferencia conyugal de *E. coli* a *Agrobacterium*. Dos días más tarde, se retiraron algunas de las colonias que aparecían en la placa de agar 2 x YT utilizando un asa de siembra de platino, y se aplicaron a una placa de agar LB que contenía 50 mg/l de kanamicina, 12,5 mg/l de tetraciclina, y 25 mg/l de cloranfenicol. Después de cultivar el contenido durante 2 días a 28°C, se seleccionó una colonia simple.

La transformación de las células de tabaco cultivadas se realizó utilizando el método descrito en An, G., Plant Mol. Bio. Manual, A3, 1. En primer lugar, 100 μ l de *Agrobacterium* EHA101 con plásmidos de tipo pGA cultivados durante 36 horas a 28°C en un medio LB que contenía 12,5 mg/l de tetraciclina y 4 ml de una suspensión de células cultivadas de tabaco *Nicotiana tabacum* L. cv. amarillo brillante 2 (Cepa No. BY-2 obtenida utilizando el Catálogo No. RPC1 del Grupo de Desarrollo de Células de Plantas del Gene Bank en el Life Science Tsukuba Research Center), en su cuarto día de cultivo, se mezclaron juntos concienzudamente en una cápsula y se dejaron en reposo en un sitio oscuro a 25°C. Dos días más tarde, se retiró de la cápsula parte de la solución y se separó el sobrenadante utilizando una centrifuga (1000 rpm, 5 minutos). El sedimento de células se introdujo en un medio nuevo y se centrifugó una vez más. Las células se inocularon en una placa de agar LS modificada con 150-200 mg/l de kanamicina y 250 mg/l de carbenicilina. Se dejó el todo en reposo en la oscuridad a 25°C. Después de 2 a 3 semanas, las células que habían crecido hasta la etapa de callo se transfirieron a una nueva placa y se seleccionaron clones. Al cabo de 2 a 3 semanas, se transfirieron los clones a un medio LS modificado de 30 ml con kanamicina y carbenicilina. Este proceso de selección

se repitió a lo largo de aproximadamente un mes. Se seleccionaron aleatoriamente 6 cepas resistentes de las cepas resistentes obtenidas de este modo (GT 1, 4, 5, 6, 8 y 9).

(2) Verificación de los Genes hGT Introducidos

En las cepas resistentes, se confirmó un fragmento de 2,2 kb que contenía un promotor CaMV35S y un terminador cDNA-NOS del gen hGT en el T-DNA en el DNA genómico de las células de tabaco cultivadas utilizando un análisis de transferencia Southern. El método Southern se llevó a cabo después que se había preparado el DNA genómico a partir de las cepas resistentes arriba mencionadas y se había digerido con EcoRI y HindIII.

La preparación del DNA cromosómico a partir de las células de tabaco cultivadas se realizó utilizando el método de Watanabe (Watanabe, K., Cloning and Sequence, Plant Biotechnology Experiment Manual, Nouseon Bunka Co., Ltd.). En primer lugar, se congelaron 10 ml de las células de tabaco cultivadas utilizando nitrógeno líquido, y se redujeron luego a polvo por trituración utilizando un almirez. Se pusieron aproximadamente 5 gramos del polvo en un tubo de centrífuga (40 ml) rápidamente a fin de que el polvo triturado no se fundiera y se mezclaron con 5 ml de una solución de 2 x CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) precalentada a 60°C. Se mezcló bien el todo lentamente durante 10 minutos, y se dejó luego en reposo a 60°C. A continuación, se añadieron 5 ml de una solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y la mezcla se agitó y se emulsionó. Se centrifugó luego la mezcla (2800 rpm, 15 minutos, temperatura ambiente). La capa superficial se transfirió después a un nuevo tubo de centrífuga de 40 ml y se repitió el proceso de extracción utilizando la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Después que la capa de la superficie se hubo mezclado con un volumen 1/10 de 10% CTAB, se centrifugó la misma (2800 rpm, 15 minutos, temperatura ambiente). La capa de la superficie se transfirió a un nuevo tubo de centrífuga y se mezcló después con un volumen igual de isopropanol frío. La mezcla disolvente así obtenida se centrifugó luego (4500 rpm, 20 minutos, temperatura ambiente). Después que se hubo retirado el sobrenadante utilizando un aspirador, se añadió el mismo a 5 ml de una solución tampón TE que contenía cloruro de sodio 1 M. Se disolvió el todo completamente a 55-60°C. Se mezcló esto concienzudamente con 5 ml de isopropanol congelado y se observó el DNA. Se puso el mismo en la punta de un chip, se transfirió a un tubo Eppendorf (que contenía etanol al 80% congelado), y se lavó después. El DNA se lavó luego en etanol al 70% y se secó. El pellet seco se disolvió en la cantidad apropiada de la solución tampón TE. A continuación, se añadieron 5 ml de RNasa A (10 mg/ml), y se dejaron reaccionar durante una hora a 37°C; Composición de la Solución 2 x CTAB: 2% CTAB, Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), cloruro de sodio 1,4 M, 1% polivinilpirrolidona (PVP), composición de la solución 10% CTAB: 10% CTAB, cloruro de sodio 0,7 M.

El método de transferencia Southern se realizó de la manera siguiente:

(i) Electroforesis y Desnaturalización con Álcali del DNA: Después que se hubieron digerido completamente 40 µg del DNA cromosómico por la enzima de restricción, se utilizó el método estándar, y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (50 V). Se tiñó luego con bromuro de etidio y se fotografió. Se sacudió luego el gel durante 20 minutos en 400 ml de HCl 0,25 M, se retiró el líquido, y se permeó el gel con 400 ml de una solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M, sacudiendo lentamente durante 45 minutos. A continuación, se retiró el líquido, se añadieron 400 ml de solución neutra (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M de pH 7,4), y se sacudió lentamente la solución durante 15 minutos. A continuación, se añadieron una vez más 400 ml de la solución neutra, y se suspendió lentamente de nuevo la solución durante 15 minutos. (ii) Transferencia: Después de la electroforesis, se transfirió el DNA a una membrana de nailon (Hybond-N Amersham) utilizando 20 x SSC. La transferencia llevó más de 12 horas. Después de dejar secar la membrana transferida a la temperatura ambiente durante una hora, se realizó la fijación UV durante 5 minutos. Composición de 20 x SSC: NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M. (iii) Preparación de la Sonda de DNA: La preparación de la sonda de DNA se realizó utilizando un kit Random Prime Labeling (Takara Shuzo Co., Ltd.). A continuación, se preparó la solución de reacción en un tubo Eppendorf. Después de calentar el tubo durante 3 minutos a 95°C, se enfrió el mismo rápidamente en hielo. Seguidamente, se añadieron 25 ng del DNA molde y 2 µl del Iniciador Aleatorio para completar 5 µl. Seguidamente, se añadieron 2,5 µl de solución tampón 10 x, 2,5 µl de dNTPs, y 5 µl [α -³²P] dCTP (1,85 MBq, 50 mCi), y se añadió agua para llevar el volumen de la mezcla de reacción a 24 µl. Se añadió a continuación 1 µl de un fragmento Klenow y la solución se dejó en reposo durante 10 minutos a 37°C. Se pasó luego la misma a través de una columna NAP10 (Pharmacia Co., Ltd.) para preparar el DNA purificado. Después de calentar durante 3 minutos a 95°C, se enfrió rápidamente en hielo, y se utilizó como sonda de hibridación. (iv) Hibridación: Se añadió 0,5% (p/v) de SDS a la Solución de Pre-hibridación siguiente, se sumergió la membrana de (ii) en la solución, y se realizó la pre-hibridación durante más de 2 horas a 42°C. Después de ello, se añadió la sonda de DNA preparada en (iii), y se realizó la hibridación durante más de 12 horas a 42°C. Composición de la Solución de Pre-hibridación: 5 x SSC, fosfato de sodio 50 mM, 50% (p/v) formamida, 5 x solución de Denhardt (preparada por dilución de la solución de Denhardt 100x), 0,1% (p/v) SDS. Composición de la solución de Denhardt 100x: 2% (p/v) BSA, 2% (p/v) Ficoll 400, 2% (p/v) polivinilpirrolidona (PVP). (v) Autorradiografía: Después de lavar de la manera descrita más adelante, la autorradiografía se realizó utilizando el método estándar. Se llevó a cabo la misma 2 veces durante 15 minutos a 65°C en 2 x SSC y 0,1% SDS, y una sola vez durante 15 minutos a 65°C en 0,1 x SSC y 0,1% SDS.

Los resultados del análisis de la transferencia Southern del DNA genómico preparado a partir de las cepas resistentes se muestran en Fig 4. Como se muestra en Fig 4, se comprobó la presencia del gen hGT en 4 cepas (GT1, 6, 8 y 9).

Ejemplo 3

Análisis del Transformante de Galactosiltransferasa

Se cosecharon las células de los transformantes (GT-1, 6, 8 y 9) y BY-2 de tipo salvaje en el cultivo de los días quinto a séptimo, y se suspendieron luego en solución tampón de extracción (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4; sacarosa 0,25 M, MgCl₂ 1 mM, KCl 50 mM). Se disgregaron las células utilizando procesamiento por ultrasonidos (200 W; Kaijo Denki Co., Ltd. Japón) o se homogeneizaron. Se prepararon luego la solución de extracto celular y las fracciones de microsomas de acuerdo con el método de Schwientek, T. *et al.* (Schwientek, T. y Ernst, J.F., Gene 145, 299-303, 1994).

La expresión de las proteínas hGT se detectó utilizando transferencia Western y anticuerpos monoclonales de galactosiltransferasa (GT) anti-humana (Mab 8628; 1:5000) (Uejima, T. *et al.*, Cancer Res., 52, 6158-6163, 1992; Uemura, M. *et al.*, Cancer Res., 52, 6153-6157, 1992) (proporcionados por el Professor Narimatsu Hisashi de Universidad de Soka). A continuación, se incubaron las transferencias con IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (5% leche desnatada 1:1000; EY Laboratories, Inc., CA), y se llevó a cabo una reacción colorimétrica utilizando peroxidasa de rábano picante con empleo del kit de Inmunotransferencia POD (Wako Chemicals, Osaka).

Se realizó un análisis de inmunotransferencia de los glucanos complejos exclusivos de plantas utilizando antisuero policlonal contra β -fructosidasa en las paredes de las células de zanahorias y anticuerpos IgG anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (5% leche desnatada 1:1000; Sigma) (Lauriere, M. *et al.*, Plant Physiol. 90, 1182-1188, 1989).

Se ensayó la actividad de β -1,4-galactosiltransferasa como sustrato utilizando UDP-galactosa y una GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ marcada con piridilamino (PA-) (GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-PA) (Morita, N. *et al.*, J. Biochem. 103, 332-335, 1988). La solución de la reacción enzimática contenía 1-120 μ g de proteína, cacodilato de sodio 25 mM (pH 7,4), MnCl₂ 10 mM, UDP-galactosa 200 mM, y GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-PA 100 nM. Se realizó un análisis HPLC sobre el producto de reacción utilizando columnas PALPAK tipo R y PALPAK tipo N (Takara Shuzo Co., Ltd.) y el método recomendado por el fabricante. Se utilizó la GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-PA utilizada como el marcador estándar junto con Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-PA y dos isómeros de GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂-PA adquiridos de Takara Shuzo Co., Ltd. Y Honen Co., Ltd.

Las inmunotransferencias para las proteínas derivadas del transformante y las células de tipo salvaje se muestran en Fig 5. Como se muestra en Fig 5, se observaron señales positivas de un peso molecular de 50 kDa. Este valor es mayor que el peso molecular estimado de la secuencia de aminoácidos (40 kDa) y es aproximadamente equivalente a la galactosiltransferasa bovina purificada de ascitis y expresada en levadura (Uemura, M. *et al.*, Cancer Res., 52, 6153-6157, 1992; Schwientek, T. *et al.*, J. Biol. Chem., 271 (7), 3398-3405, 1996). En la fracción de microsomas, se observaron bandas inmunorreactivas (Fig 5, pistas 1, 4) más fuertes que las de los lisados de células (Fig 5, pistas 6-8). Esto significa que hGT está localizada preferentemente en la célula. No se detectó banda inmunorreactiva alguna en las células de tipo salvaje.

Las proteínas de las fracciones de microsomas del transformante GT6 y de BY-2 de tipo salvaje se fijaron en una columna de agarosa RCA₁₂₀ (Wako Chemicals, Osaka), y se lavaron luego con 15 volúmenes de acetato de amonio 10 mM de pH 6,0. A continuación, las proteínas fijadas se eluyeron utilizando lactosa 0,2 M. Después de separación utilizando SDS-PAGE, se tiñeron las proteínas utilizando tinción con plata (Wako Silver Staining Kit) (Fig 6) o lectina (Fig 7). En la tinción con lectina, las transferencias de membrana se lavaron en una solución tampón TTBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; NaCl 0,15 M; 0,5% Tween 20) y se incubaron con RCA₁₂₀ marcada con peroxidasa de rábano picante (Honen Co., Ltd.). Se observó luego el glucano galactosilado utilizando un kit de inmunotransferencia (Wako Chemicals, Osaka) (Fig 7). Como se muestra en Fig 7, no se observaba fijación de RCA₁₂₀ en las células BY2 de tipo salvaje, y las GT6 tenían una glicoproteína con galactosa en el término no reductor de la porción de glucano.

El extracto proteínico de las células BY2 de tipo salvaje y las células GT6, así como las proteínas GT6 eluidas de la cromatografía de afinidad sobre RCA₁₂₀ se sondaron utilizando anticuerpos policlonales exclusivos del complejo de glucanos (Fig 8). El antisuero se fija predominantemente al residuo β -1,2-xilosa en la glicoproteína de plantas (Lauriere, M. *et al.*, Plant Physiol. 90, 1182-1188, 1989). Como se muestra en Fig 8, las células BY2 de tipo salvaje (Pista 1) contienen glicoproteínas que reaccionaban con el antisuero policlonal. GT6 contiene muy pocas glicoproteínas que reaccionarán con el anticuerpo policlonal (Pista 2). Las glicoproteínas GT6 eluidas de la cromatografía de afinidad sobre RCA₁₂₀ no se fijaban al antisuero policlonal, lo que indicaba que el glucano galactosilado no contiene residuo alguno de β -1,2-xilosa (Pista 3).

Ejemplo 4

Introducción del Gen de Peroxidasa de Rábano Picante (HRP) en las Células de Tabaco Cultivadas Introducidas por hGT

Se introdujo el gen de peroxidasa de rábano picante en la línea de células GT6 resultante. Entre los diferentes tipos de peroxidasa de plantas, la peroxidasa de rábano picante, especialmente la HRP isozima C, HRP (EC1.11.1.7) ha sido objeto de investigación extensa. HRP puede utilizarse en diversas reacciones enzimáticas debido a su excelente estabilidad y a un amplio espectro de especificidad de sustancias. Por ejemplo, se ha utilizado en inmunología enzimática para fijación con un anticuerpo secundario en transferencia Western. En la actualidad se han clonado ya varios genes

de isozima peroxidasa de rábano picante (Fujiyama, K. *et al.*, Eur. J. Biochem., 173, 681-687, 1988 y Fujiyama, K. *et al.*, Gene, 89, 163-169, 1990). La ClaPeroxidasa (ClaPRX) que es codificada por prxCla se traduce primeramente como una proteína constituida por 353 aminoácidos que contienen un péptido adicional constituido por 30 aminoácidos en el término N y 15 aminoácidos en el término C. A continuación, se procesa ésta para formar una enzima madura con 308 aminoácidos (Fujiyama, K. *et al.*, Eur. J. Biochem., 173, 681-687, 1988). El peso molecular de ClaPRX está comprendido entre 42.200 y 44.000. De este peso molecular, las cadenas de azúcar dan cuenta del 22-27%, y existen ocho cadenas de azúcar unidas por N (Welinder, K. G., Eur. J. Biochem., 96, 483-502, 1979). La introducción del gen ClaPRX se realizó utilizando el vector binario pBIHm-HRP para expresión de HRP que se muestra en Fig 9.

El pBIHm-HRP se preparó de la manera siguiente. En primer lugar, se preparó un fragmento HindIII-SacI de 1,9 kpb a partir de un vector 35S-prxCla para expresión en plantas, que lleva un HRP cDNA (Kawaoka, A. *et al.*, J. Ferment. Bioeng., 78, 49-53, 1994). El fragmento HindIII-SacI contiene un prxCla cDNA de 1,1 kpb de longitud total después de un promotor CaMV35S de 0,8 kpb. El fragmento HindIII-SacI de 1,9 kpb se insertó en el sitio HindIII-SacI del vector binario pBI101HmB (Akama, K. *et al.*, Plant Cell Rep., 12, 7-11, 1992). El sitio BamHI en 3' del gen resistente a la higromicina (gen HPT) se había destruido.

Dado que la cepa GT6 es resistente a la kanamicina, se utilizó el gen hpt resistente a higromicina como el marcador de selección (Griz, L. y Davies J., Gene, 25, 179-188, 1983). La transformación de la cepa GT6 por el gen HRP se realizó utilizando el método descrito en Rempel, D.H. y Nelson, L.M. (Rempel, D.H. y Nelson, L.M., Transgenic Res. 4: 199-207, 1995). Con objeto de obtener el transformante HRP como control, se introdujo un gen HRP en una célula de tipo salvaje BY2 para obtener una cepa BY2-HRP. Se obtuvo el transformante doble GT6-HRP con hGT y HRP, en el cual tiene lugar un proceso de transformación ordinario.

Ejemplo 5

Comprobación de la Expresión de HRP en las Células de Tabaco Transformantes Dobles Cultivadas

El transformante doble GT6-HRP, BY2-HRP de control y la línea de células de tipo salvaje (WT) se examinaron en cuanto a la expresión de actividad de HRP utilizando el método siguiente. Como se ve en la Tabla 1, el transformante introducido por el gen HRP tenía una actividad de peroxidasa aproximadamente 5 veces mayor que la línea de células de tipo salvaje.

TABLA 1

Número de Clon	Actividad Especifica [U/mg proteína]
WT-HRP-1	10,3
WT-HRP-5	11,3
WT-HRP-7	12,6
GT-HRP-4	11,1
GT-HRP-5	9,35
GT-HRP-8	9,47
Tipo salvaje	2,49

El clon BY2-HRP obtenido por introducción del gen HRP en el tipo salvaje expresaba el mismo grado de actividad de peroxidasa que el transformante doble GT6-HRP con hGT y HRP.

Medida de la Actividad de Peroxidasa

Las hojas de tabaco cultivadas se pusieron en un tubo Eppendorf que contenía solución D y se disgregaron utilizando un homogeneizador (Homogenizer S-203, Ikeda Rika Co., Ltd.). Se recogió el sobrenadante después de centrifugación (12.000 rpm, 20 minutos, 4°C) y se utilizó luego como la solución enzimática bruta. A continuación, se mezclaron 1 ml de Solución A, 1 ml de Solución B y 2 ml de Solución C, y la mezcla se incubó durante 5 minutos a 25°C. Se añadió a la mezcla la solución enzimática bruta diluida adecuadamente con Solución D, y se dejó reaccionar durante 3 minutos a 25°C. La reacción se paró por la adición de 0,5 ml de HCl 1N, y se midió la absorbancia a 460 nm. Como control, se utilizó una solución con HCl 1N añadida antes de la introducción de la enzima.

ES 2 350 063 T3

Solución A: o-aminofenol 1 mM

Solución B: H₂O₂ 4 mM

5 Solución C: tampón de fosfato de sodio 200 mM (pH 7,0)

Solución D: tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0)

10 A continuación, para determinar si el aumento en la actividad de peroxidasa era debido o no a la expresión de HRP, se realizó una tinción de actividad después de separación por enfoque isoeléctrico en gel. El enfoque isoeléctrico se realizó utilizando una celda Mini-IEF BIO-RAD Modelo 111. La superficie hidrófoba de la película de soporte del gel PAGE se fijó a una placa de vidrio, y se dispuso luego sobre una bandeja de colada. La solución de gel preparada se vertió entre la película de soporte y la bandeja de colada y se fotopolimerizó luego durante 45 minutos bajo una lámpara fluorescente. Se aplicó la muestra al gel, y se posicionó el gel de tal modo que estaba en contacto con ambos
15 electrodos de grafito mojados con agua destilada en el baño electroforético. Se realizó luego la electroforesis durante 15 minutos a 100 V, 15 minutos a 200 V y 60 minutos a 450 V. Composición de la Solución de Gel (para 1 hoja de gel): agua destilada 2,75 ml, acrilamida (25% T, 3% C) 1,0 ml, glicerol al 25% 1,0 ml, Bio-Lite (40%, pH 3-10) 0,25 ml, persulfato de amonio al 10% 7,5 µl, riboflavina-5'-fosfato de sodio al 0,1% 25 µl, TEMED 1,5 µl.

20 La tinción de actividad de peroxidasa se realizó de acuerdo con el método de Sekine *et al.*, (Sekine *et al.*, Plant Cell Technology, 6, 71-75, 1994). Como se muestra en Fig 10, se detectó una banda significativa no encontrada en la línea de células de tipo salvaje en la posición pI 7,8 en la línea de células BY2-HRP y la cepa GT6-HRP. Los resultados de un análisis Western utilizando anticuerpos anti-HRP confirmaron la detección de una señal en la posición correspondiente a pI 7,8 y la expresión de HRP en el transformante doble GT6-HRP con hGT y HRP.

25 Ejemplo 6

Análisis Estructural de las Cadenas de Azúcar Unidas por N en las Células Transformantes GT6

30 *Método Utilizado para Analizar la Estructura de las Cadenas de Azúcar*

Las cadenas de azúcar unidas por N en las células transformantes GT6 se analizaron por combinación de HPLC de fase inversa y HPLC de fraccionamiento por tamaños, realización del mapeado bidimensional de las cadenas de azúcar PA, realización de digestión con exoglicosidasa, y realización final de espectrometría de masas en tándem con pulverización iónica (IS-MS/MS) (Perkin Elmer Co., Ltd.). En primer lugar, la solución del extracto de células se
35 deslipidó con acetona, se trató con hidrazina durante 12 horas a 100°C, y se desprendió la porción de cadenas de azúcar. El hidrazinolizado se acetiló en N, se desaló utilizando Dowex 50X2 y Dowex 1X2 (The Dow Chemical Co., Ltd. y su representante en Japón, Muromachi Chemical Industry Co., Ltd.), se fraccionó luego utilizando amoníaco 0,1 N y la columna de filtración con gel Sephadex G-25 (1,8 x 180 cm) (Pharmacia Co., Ltd.). Se realizó luego la piridilaminación como se ha descrito arriba. Las cadenas de azúcar piridilaminadas (cadenas de azúcar PA) se
40 separaron luego utilizando un dispositivo HPLC Jasco 880-PU con un Espectrofotómetro Inteligente Jasco 821-FP (Japan Spectroscopic Co., Ltd.) y columnas Cosmosil 5C18-P y Asahipak NH2P-50. Las posiciones de elución se compararon con un estándar producido por la solicitante o adquirido (de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Y Takara Shuzo Co., Ltd.).

45 Se realizó la digestión con glicosilasa utilizando N-acetil-β-D-glucosaminidasa (*Diplococcus pneumoniae*, Boehringer Mannheim) o manosidasas (frijol machete, Sigma) sobre aproximadamente 1 nmol de las cadenas de azúcar PA en las mismas condiciones del método descrito en Kimura, Y. *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem. 56 (2), 215-222, 1992. Se realizó la digestión utilizando β-galactosidasa (*Diplococcus pneumoniae*, Boehringer Mannheim) o α-1,2-manosidasa derivada de *Aspergillus saitoi* (proporcionada por el Dr. Takashi Yoshida en la Universidad de Tohoku) por adición de 1 nmol de cadenas de azúcar PA y 200 mU de β-galactosidasa o 60 µg de α-1,2-manosidasa a 50 mM de tampón de acetato de sodio (pH 5,5) e incubación a 37°C. Después de hervir la solución de reacción resultante y detener la reacción enzimática, se analizó una porción del producto digerido utilizando HPLC de fraccionamiento por tamaños. Se analizó el peso molecular del producto digerido utilizando espectrometría de masas en tándem con
50 pulverización iónica (IS-MS/MS) y/o se comparó con la cadena de azúcar estándar tal como se describe en Palacpac, N.Q. *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem. 63(1) 35-39, 1999 y Kimura, Y. *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem. 56 (2), 215-222, 1992. El experimento IS-MS/MS se llevó a cabo utilizando un instrumento Perkin Elmer Sciex API-III. Dicho experimento se realizó en modo positivo con un voltaje de pulverización iónica de 4200 V. Se realizó escaneo para cada 0,5 Da, y se registró la relación m/z a partir de 200.

60 *Análisis de las Cadenas de Azúcar en las Células GT6*

Las cadenas de azúcar PA preparadas a partir de las células GT6 se purificaron y analizaron utilizando una combinación de HPLC de fase inversa y HPLC de fraccionamiento por tamaños. En la Fracción I para las posiciones de 10-
65 20 minutos en la HPLC de fraccionamiento por tamaños (Fig 11), no se eluía cadena alguna de azúcar unida por N. Esto sugiere que la Fracción I es una porción no absorbible que contiene subproductos de hidrazinólisis. En el análisis MS/MS, no se detectó ion fragmentario alguno con valores m/z de 300, lo que corresponde a PA-GlcNAc. Análogamente, la fracción XI en las posiciones de 50-60 minutos no exhibía pico alguno que indicara elución en la HPLC de

fraccionamiento por tamaños. Por tanto, está claro que no había cadena alguna de azúcar unida por N. Los 17 picos con inclusión de A-Q representados en Fig 12 se recogieron todos y se purificaron después que se hubo completado el análisis desde la Fracción II a la Fracción X en la HPLC de fraccionamiento por tamaños (Fig 11).

- 5 El análisis IS-MS/MS encontró que 7 de estos picos eran cadenas de azúcar unidas por N. Lo que sigue es el resultado del análisis de estos picos.

Las posiciones de elución y los pesos moleculares de los oligosacáridos -A, -E, -H, -I, -M, -O, -P y -Q (Fig 12) no correspondían a los de los estándares de las cadenas de azúcar PA. En el análisis MS/MS, se detectaron los valores m/z de 300 y 503, que corresponden respectivamente a PA-GlcNAc y PA-GlcNAc₂. Sin embargo, no se detectaban los iones de los fragmentos correspondientes a ManGlcNAc₂ (M1), o la cadena de azúcar interior de trimanosa Man₃GlcNAc₂ (M3) que se encuentran generalmente en las cadenas de azúcar unida por N (datos no presentados). Incluso los oligosacáridos -B, -D y -N en los otros picos carecían de iones de fragmentos detectados con un valor m/z de 300. Por tanto, éstas no eran cadenas de azúcar unidas por N. Se examinaron luego las 7 cadenas de azúcar unidas por N restantes.

15 Las posiciones de elución y los pesos moleculares del pico-C (m/z 1637,5; proporción molar 9,3%), pico-F ([M+2H]²⁺ + m/z 819,5, [M+H]⁺ + m/z 1639; proporción molar 15,9%), y el pico-G (m/z 1475,5; proporción molar 19,5%) indicaban cadenas de azúcar de tipo rico en manosa Man₇GlcNAc₂ (Isómeros M7A y M7B) y Man₆GlcNAc₂ (M6B) respectivamente. Cuando se digirieron por medio de α -manosidasa de frijol machete, se vio que las cadenas de azúcar unidas por N están degradadas a ManGlcNAc (M1) por análisis HPLC de fraccionamiento por tamaños (datos no presentados). En un experimento IS-MS sobre el producto de digestión, se detectó el ion con un valor m/z de 665,5 correspondiente a un valor calculado de 664,66 para M1, lo que indicaba que estas cadenas de azúcar unidas por N tienen la misma estructura que el estándar de cadenas de azúcar PA respectivo correspondiente.

25 El pico-J (6,6%) tenía un peso molecular de 1121,5, que es casi el mismo que el valor del peso molecular calculado de m/z 1121,05 de Man₃Xyl₁GlcNAc₂-PA (M3X). Las posiciones de los iones fragmentarios eran 989,5, 827,5, 665,5, 503,3 y 300. Esto no contradice los descubrimientos de que Xyl, Man, Man, Man y GlcNAc se liberaban en orden sucesivo a partir de Man₃Xyl₁GlcNAc₂-PA. Cuando se digirieron utilizando α -manosidasa de frijol machete los residuos manosa en el término no reductor podían separarse, y el mapeado bidimensional reveló las mismas posiciones de elución que las de Man₁Xyl₁GlcNAc₂-PA (datos no presentados).

Los resultados del análisis del experimento IS-MS sobre la fracción del pico-K (13,2%) revelaron que esta fracción contiene dos tipos de cadenas de azúcar unidas por N, uno de los cuales tiene un peso molecular de 1314,0 (1,4%), teniendo otro un peso molecular de 1354,5 (11,8%). Esta fracción se sometió a HPLC de fase inversa, se purificó y se analizó. El pico K-1 de cadena de azúcar con un peso molecular de 1314,0 tenía el mismo mapeado bidimensional y el mismo valor m/z medido que el del estándar de cadena de azúcar Man₅GlcNAc₂-PA (M5). Cuando se trató utilizando α -manosidasa de frijol machete, las posiciones de elución del producto degradado se habían desplazado a posiciones similares a las de M1 en el mapeado bidimensional. Esto indica la eliminación de 4 residuos manosa.

40 Cadenas de Azúcar de Tipo Unido por N Adicionadas de Galactosa en las Células GT6

El valor m/z determinado de 1354,5 para el pico K-2 de la cadena de azúcar es casi el mismo que el valor m/z del peso molecular de 1354,3 predicho para Gal₁GlcNAc₁Man₃GlcNAc₂-PA (GalGNM3). El resultado de la espectrometría de masas indicaba que los iones fragmentarios se derivaban de las moléculas parentales. El valor m/z de 1193,5 indicaba GlcNAc₁Man₃GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 989,5 indicaba Man₃GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 827,5 indicaba Man₂GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 665 indicaba ManGlcNAc₂-PA, el valor m/z de 503 indicaba GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 336 indicaba ManGlcNAc, el valor m/z de 300 indicaba GlcNAc-PA, y el valor m/z de 204 indicaba GlcNAc. A partir de la estructura de la cadena de azúcar unida por N supuesta, se considera que es cualquiera de dos isómeros GalGNM3 (Fig 13). Se trata de Gal- β -4GlcNAc- β -2Man- α -6 (Man- α -3)Man- β -4GlcNAc- β -4GlcNAc-PA o Man- α -6 (Gal- β -4GlcNAc- β -2Man- α -3)Man- β -4GlcNAc- β -4GlcNAc-PA. Las cadenas de azúcar PA purificadas tenían posiciones de elución en la HPLC de fase inversa que eran las mismas que el estándar de cadena de azúcar Man- α -6 (Gal- β -4GlcNAc- β -2Man- α -3)Man- β -4GlcNAc- β -4GlcNAc-PA (Fig 13B).

La cadena de azúcar se trató con exoglicosidasa y se comprobó la estructura de la cadena de azúcar. La β -galactosidasa de *D. pneumoniae* es una enzima específica del enlace Gal- β -1,4GlcNAc. El producto de la cadena de azúcar digerido por la enzima se eluía en la misma posición que el de la GlcNAc₁Man₃GlcNAc₂-PA en la HPLC de fraccionamiento por tamaños (Fig 14A-II). Se obtuvo una m/z de 1192,0 a partir del análisis IS-MS/MS. Estos resultados indican que un residuo de α -galactosa se ha desprendido de la GlcNAc en el término no reductor con el enlace β -1,4. Cuando el producto se digirió con una N-acetil- β -D-glucosaminidasa derivada de *Diplococcus pneumoniae*, que es específica del enlace β -1,2-GlcNAc (Yamashita, K. et al., J. Biochem. 93, 135-147, 1983), el producto digerido se eluía en la misma posición que el del estándar Man₃GlcNAc₂-PA en la HPLC de fraccionamiento por tamaños (Fig 14A-III). Cuando el producto digerido se trató con α -manosidasa de frijol machete, se eluía en la misma posición que la del estándar ManGlcNAc₂-PA en la HPLC de fraccionamiento por tamaños (Fig 14A-IV). La estructura de la cadena de azúcar se muestra en K-2 de Fig 15.

65 El análisis por espectroscopia de masas del Pico L (35,5%) dio [M+ 2H]²⁺ de 840, [M+H]⁺ de 1680,0, que coincidía muy aproximadamente con el valor de peso molecular m/z de 1678,55 esperado para Gal₁GlcNAc₁Man₅GlcNAc₂-PA (GalGMM5). El resultado de la espectrometría de masas indicaba iones fragmentarios derivados de las moléculas

parentales. El valor m/z de 1313,5 indicaba Man₅GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 1152 indicaba Man₄GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 989,5 indicaba Man₃GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 827,5 indicaba Man₂GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 665 indicaba ManGlcNAc₂-PA, el valor m/z de 503 indicaba GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 336 indicaba ManGlcNAc, el valor m/z de 300 indicaba GlcNAc-PA, y el valor m/z de 204 indicaba GlcNAc. El producto digerido con β -galactosidasa de *D. pneumoniae* se eluía en la misma posición que la de GlcNAc₁Man₅GlcNAc₂-PA en la HPLC de fraccionamiento por tamaños (Fig 14B-II). Los resultados indican que un residuo galactosa está unido a la GlcNAc en el término no reductor con el enlace β -1,4. La eliminación de la galactosa se confirmó por los pesos moleculares obtenidos a partir del análisis IS-MS/MS. [M+2H]²⁺ era 759 y [M+H]⁺ era 1518,0. La espectrometría de masas indicaba iones fragmentarios derivados de GlcNAc₁Man₅GlcNAc₂-PA con una señal parental de m/z 1518,0. El valor m/z de 1314 indicaba Man₅GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 1152 indicaba Man₄GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 990 indicaba Man₃GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 827,5 indicaba Man₂GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 665,5 indicaba Man₁GlcNAc₂-PA, el valor m/z de 503 indicaba GlcNAc₂-PA, y el valor m/z de 300 indicaba GlcNAc-PA. Cuando se digirió la GlcNAc₁Man₅GlcNAc₂-PA se digirió con una N-acetil- β -D-glucosaminidasa derivada de *Diplococcus pneumoniae*, el producto digerido se eluía en la misma posición que la del estándar Man₅GlcNAc₂-PA en la HPLC de fraccionamiento por tamaños (Fig 14B-III). Incluso cuando se trató con α -1,2-manosidasa derivada de *Aspergillus saitoi*, la posición de elución no cambiaba (Fig 14B-IV). Sin embargo, cuando se trató con α -manosidasa de frijol machete, el mismo se eluía en la misma posición que la del estándar Man₁GlcNAc₂-PA en la HPLC de fraccionamiento por tamaños (Fig 14B-V). Esto indica la eliminación de 4 residuos manosa en el término no reductor. Estos resultados indican que en la cadena de azúcar PA, ninguno de los 5 residuos manosa está enlazado en α -1,2 a los residuos manosa que están enlazados en α -1,3. La digestión con exoglicosidasa, el mapeado bidimensional de las cadenas de azúcar, y el análisis IS-MS/MS indican una estructura de las cadenas de azúcar de GalGNM5 como la representada por L en Fig 15.

Fig 20 es un resumen de los resultados anteriores en lo que respecta a la estructura de los glucanos unidos por N y la relación de cada glucano unido por N en la línea de células GT6 junto con las correspondientes en la línea de células de tipo salvaje BY2 determinadas análogamente. En Fig 20, □ denota GlcNAc, ○ denota manosa, ● denota lactosa, □ con líneas de sombreado en su interior denota xilosa y ○ con puntos en su interior denota fucosa, respectivamente.

En la línea de células GT6, se observaron los isómeros Man7-, Man6- y Man5GlcNAc2. Dado que dichos oligosacáridos de tipo rico en manosa serán sustratos para β -1,4-galactosiltransferasa (GalT), la introducción de cDNAs de GlcNAc I, Man I y Man II puede conducir más eficientemente el oligosacárido Man7-5GlcNAc2 a GlcNAc-Man3GlcNAc2, que puede ser un sustrato de GalT (Fig 21).

El mutante *A. thaliana cglI*, que carece de gnT I, no puede sintetizar N-glucanos de tipo complejo (von Schaewen, A., Sturm, A., O'Neill, J., y Chrispeels, M.J., Plant Physiol., 1993 Aug;102(4):1109-1118, Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks N-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans). La complementación con la GnT I humana en el mutante *cglI* indicaba que la enzima de mamífero podría contribuir al camino de N-glicosilación de las plantas (Gómez, L. y Chrispeels, M.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994 March 1;91(5):1829-1833, Complementation of an Arabidopsis thaliana mutant that lacks complex asparagine-linked glycans with the human cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase I.) Adicionalmente, el cDNA de GnT I aislado de *A. thaliana* complementaba la deficiencia en N-acetilglucosaminiltransferasa I de las células Lec1 de CHO (Bakker, H., Lommen, A., Jordi, W., Stiekema, W., y Bosch, D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999 Aug 11;261(3):829-32, An Arabidopsis thaliana cDNA complements the N-acetylglucosaminyltransferase I deficiency of CHO Lec1 cells). Se aislaron y secuenciaron cDNAs que codificaban Man I y Man II humanas (Bause, E., Bieberich, E., Rolfs, A., Volker, C. y Schmidt, B., Eur J Biochem 1993 Oct 15;217(2):535-40, Molecular cloning and primary structure of Man9-mannosidase from human kidney; Tremblay, L.O., Campbell, Dyke, N. y Herscovics, A., Glycobiology 1998 Jun;8(6):585-95, Molecular cloning, chromosomal mapping and tissue-specific expression of a novel human alpha 1,2-mannosidase gene involved in N-glycan maturation; y Misago, M., Liao, Y.F., Kudo, S., Eto, S., Mattei, M.G., Moremen, K.W., Fukuda, M.N., Molecular cloning and expression of cDNAs encoding human alpha-mannosidase II and a previously unrecognized alpha-mannosidase IIx isozyme). Man I humana tiene dos isozimas, Man IA y Man IB, y se mostró la estructura de nucleótidos del cDNA de las isozimas (Bause, E., et al., y Tremblay, L.O., supra).

Por transformación de estos cDNAs en la línea de células BY, puede obtenerse una línea de células productora eficiente de glicoproteína de tipo humano. La β -1,4-galactosiltransferasa (GalT) utiliza UDP-galactosa como sustrato donante y GlcNAc2Man3GlcNAc2 como sustrato aceptor. El suministro eficiente de UDP-galactosa mejorará la reacción de la enzima GalT, y se producirá más oligosacárido galactosilado (Fig 22).

Ejemplo 7

60 Análisis Estructural de las Cadenas de Azúcar en la HRP en las Células Transformantes Dobles GT6-HRP

Se obtuvo un lisado de células bruto a partir del homogeneizado de 50 g de células GT6-HRP cultivadas o células BY2-HRP de control que se habían desarrollado durante 7 días, respectivamente. Esta solución de lisado de células bruto se aplicó a una columna de CM Sepharose FF (1 x 10 cm) (Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada con 10 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 6,0). Después de lavar la columna, se midió la peroxidasa eluida a una absorbancia de 403 nm. La fracción agrupada se concentró utilizando un ultrafiltro (punto de corte por peso molecular: 10.000, Advantec Co., Ltd.), se dializó contra 50 mM de un tampón de fosfato de sodio (pH 7,0), y se aplicó luego a una columna de afinidad ácido benzhidroxamínico-agarosa equilibrada (1 x 10 cm) (KemEn Tech, Dinamarca). Después

de lavar la columna en 15 volúmenes de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0), se eluyó la HRP absorbida utilizando ácido bórico 0,5 M preparado en el mismo tampón. La fracción activa de peroxidasa obtenida se agrupó luego, se dializó, y se concentró.

- 5 La HRP purificada preparada a partir de las células transformantes dobles GT6-HRP o las células BY2-HRP se aplicó a una columna de agarosa RCA₁₂₀ de 1 x 10 cm. La columna se lavó luego con 15 volúmenes de acetato de amonio la HRP (pH 6,0). Las proteínas absorbidas se eluyeron luego y se ensayaron utilizando métodos convencionales.
- 10 Se realizó luego la tinción con lectina sobre la HRP purificada eluida de la cromatografía de afinidad RCA₁₂₀ cuya especificidad es específica para la galactosa con enlace β -1,4. La lectina RCA₁₂₀ se fijaba sólo a la HRP producida por la célula transformada GT6-HRP. Dado que la fijación de la lectina se reducía espectacularmente por preincubación con la galactosa que puede competir con la lectina (Fig 16b-III), la fijación es específica para carbohidratos. Incluso cuando la HRP purificada se somete a pretratamiento con β -galactosidasa de *D. pneumoniae*, la fijación de RCA₁₂₀ se inhibía. Estos resultados indican que RCA se fijaba específicamente a la galactosa con enlace β -1,4 en el extremo no reductor del glucano unido por N en la HRP. La ausencia de glicoproteínas unidas a RCA en las células BY2-HRP indica que estas células no pueden transferir el residuo galactosa enlazado en β -1,4 al término no reductor del glucano HRP.
- 20 La HRP de fase inversa de los derivados PA que se derivaban de HRP purificada utilizando RCA₁₂₀ indicaba que las cadenas de azúcar en las proteínas HRP purificadas a partir de GT6-HRP aparecen como un solo pico (Fig 17). En la HPLC de fase inversa, se utilizó una columna Cosmosil 5C18-P o una columna Asahipak NH2P en un dispositivo Jasco 880-PU HPLC con un Espectrofluorómetro Inteligente Jasco 821-FP. No se observaron proteínas combinadas ni picos detectables en las fracciones HRP purificadas de BY2-HRP. El pico obtenido de la GT6-HRP en la cromatografía de fraccionamiento por tamaños era homogéneo. El análisis por mapeado bidimensional del pico y la cromatografía del pico al mismo tiempo con la cadena de azúcar estándar indicaban que el oligosacárido contenido en el pico era Gal₁GlcNAc₁Man₅GlcNAc₂-PA. La confirmación de esta estructura se consiguió utilizando digestión continua con exoglicosidasa. Las cadenas de azúcar estándar utilizadas eran cadenas de azúcar preparadas previamente (Kimura, Y. *et al.*, Biosci. Biotech. Biochem. 56 (2), 215-222, 1992) o adquiridas (Wako Pure Chemical, Industries, Ltd. Osaka y Takara Shuzo Co., Ltd.).

- La cadena de azúcar PA digerida con β -galactosidasa (*D. pneumoniae*) coincidía con la posición de elución del estándar GlcNAc₁Man₅GlcNAc₂-PA, lo que indicaba la eliminación de un residuo galactosa enlazado en β -1,4 a una GlcNAc terminal no reductora. La digestión ulterior con N-acetil- β -D-glucosaminidasa de *D. pneumoniae* de los productos digeridos con β -galactosidasa producía una cadena de azúcar equivalente que se eluye en la misma posición de elución de Man₅GlcNAc₂-PA, lo que indica la eliminación de un residuo GlcNAc enlazado en β -1,2 a un residuo manosa terminal no reductor. Se cree que el residuo GlcNAc eliminado está enlazado a α -1,3-manosa enlazada a un residuo manosa β -1,4 teniendo en cuenta la ruta de procesamiento de tipo unido por N de la planta. Con objeto de confirmar la posición de enlace del residuo GlcNAc, se incubó Man₅GlcNAc₂-PA (M5) con α -1,2-manosidasa derivada de *Aspergillus saitoi*. Como era de esperar, no se detectó cambio en la posición de elución, lo que confirmaba que M5 tiene la estructura Man α -1-6 (Man α 1,3), Man α -1-6 (Man α -1,3), Man β -1,4GlcNAc β -1,4GlcNAc de acuerdo con la predicción. Cuando la cadena de azúcar se digirió utilizando α -manosidasa de frijol machete, se eluía en las mismas posiciones de elución que la Man₁GlcMan₂PA conocida. Por consiguiente, la estructura de la cadena de azúcar correspondía a Man α 1-6 (Man α 1,3)Man α 1-6 (Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1, 3)Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc (Gal₁GlcNAc₁Man₅GlcNA₂). Estos resultados indican que la cadena de azúcar en la célula GT6 tiene la estructura representada en Fig 15, y que la estructura de la cadena de azúcar en una proteína HRP derivada del transformante doble GT6-HRP es Man α -1-6 (Man α -1,3)Man α -1-6 (Gal β -1,4 GlcNAc β -1,2 Man α -1,3)Man β -1,4 GlcNAc β -1,4 GlcNAc (Gal₁GlcNAc₁Man₅GlcNA₂).

- 50 Análogamente, el N-glucano galactosilado en HRP derivada de las células transformantes GT6-HRP no reaccionaba con un antisuero que, según se ha demostrado, reacciona específicamente con el residuo β -1,2-xilosa, que es indicativo de los N-glucanos de plantas. Esto indica que uno de los residuos azúcar que se ha demostrado son antigénicos en los glucanos complejos de plantas, es decir, el residuo xilosa, no está presente (García-Casado, G. *et al.*, Glycobiology 6 (4): 471-477, 1996) (Fig 18).

55 **Aplicabilidad industrial**

- La presente invención proporciona un método para fabricación de una glicoproteína con una cadena de azúcar de tipo humano. La misma proporciona también células de plantas que tienen un mecanismo de adición de cadenas de azúcar capaz de efectuar una reacción en la que un residuo galactosa se transfiere a un residuo acetilglucosamina en el terminal no reductor, en donde el mecanismo de adición de la cadena de azúcar es capaz de unir una cadena de azúcar que contiene una cadena de azúcar interior y una cadena de azúcar exterior, en donde la cadena de azúcar interior está constituida esencialmente por una pluralidad de manosa y acetilglucosamina, y la cadena de azúcar exterior contiene una porción de cadena de azúcar terminal que contiene una galactosa en el terminal no reductor. La presente invención proporciona adicionalmente una glicoproteína con una cadena de azúcar de tipo humano obtenida por la presente invención. Una glicoproteína con una cadena de azúcar de tipo mamífero, v.g. de tipo humano, no es antigénica debido a que la glicosilación es de tipo humano. Por consiguiente, la misma puede ser útil para administración a animales con inclusión de humanos.

REIVINDICACIONES

1. Un método de expresar una glicosiltransferasa y una glicoproteína exógena que tienen una cadena de azúcar de tipo humano en una célula de planta transformada, que comprende un paso en el que se obtiene una célula de planta transformada por introducción en una célula de planta del gen de una glicosiltransferasa y el gen de una glicoproteína exógena, y un paso en el cual se cultiva la célula de planta transformada obtenida.
2. Un método de fabricación de una glicoproteína que tiene una cadena de azúcar de tipo humano, que comprende un paso de expresión de una glicosiltransferasa y una glicoproteína exógena de acuerdo con el método de la reivindicación 1, y un paso en el que la glicoproteína exógena se aísla de la célula de planta transformada.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la glicosiltransferasa es una enzima capaz de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la glicoproteína con una cadena de azúcar de tipo humano comprende una cadena de azúcar interior y una cadena de azúcar exterior, en donde la cadena de azúcar interior comprende una pluralidad de manosa y acetilglucosamina, y en donde la cadena de azúcar exterior contiene una porción de cadena de azúcar terminal con una galactosa terminal no reductora.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la cadena de azúcar exterior tiene una configuración de cadena lineal.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la cadena de azúcar exterior tiene una configuración ramificada.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la porción de la cadena de azúcar ramificada tiene una configuración mono-, bi-, tri- o tetra.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 a la reivindicación 7, en el que la glicoproteína no contiene fucosa ni xilosa.
9. Una célula de planta que tiene un mecanismo de adición de cadenas de azúcar que comprende:
el gen de una primera enzima, en donde la primera enzima es una glicosiltransferasa capaz de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor; y
el gen de una segunda enzima que puede intensificar la primera enzima, en donde la segunda enzima es Manosidasa I (Man I), Manosidasa II (Man II), β -1,4-galactosiltransferasa (GalT) y N-acetilglucosaminiltransferasa I (GlcNAc I), en donde el mecanismo de adición de cadenas de azúcar añade una cadena de azúcar que contiene una cadena de azúcar interior y una cadena de azúcar exterior, en donde la cadena de azúcar interior comprende una pluralidad de manosa y acetilglucosamina, y en donde la cadena de azúcar exterior contiene una porción de cadena de azúcar terminal con una galactosa terminal no reductora.
10. Una planta recombinante, o porción de la misma, que comprende:
el gen de una primera enzima el gen de una primera enzima, en donde la primera enzima es una glicosiltransferasa capaz de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor; y
el gen de una segunda enzima que puede intensificar la primera enzima, en donde la segunda enzima es Manosidasa I (Man I), Manosidasa II (Man II), β -1,4-galactosiltransferasa (GalT) y N-acetilglucosaminiltransferasa I (GlcNAc I), y
en donde la planta recombinante, o porción de la misma, produce glicoproteínas de tipo mamífero, que no comprenden fucosa ni xilosa.
11. Una planta transgénica que comprende:
el gen de una primera enzima el gen de una primera enzima, en donde la primera enzima es una glicosiltransferasa capaz de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor; y
el gen de una segunda enzima que puede intensificar la primera enzima, en donde la segunda enzima es Manosidasa I (Man I), Manosidasa II (Man II), β -1,4-galactosiltransferasa (GalT) y N-acetilglucosaminiltransferasa I (GlcNAc I), en donde la planta transgénica produce glicoproteínas de tipo mamífero que no comprenden fucosa ni xilosa, y

ES 2 350 063 T3

en donde la planta transgénica se regenera a partir de una célula de planta que tiene un mecanismo de adición de cadenas de azúcar que comprende:

5 el gen de una primera enzima, en donde la primera enzima es una glicosiltransferasa capaz de conducir una reacción de transferencia de un residuo galactosa a un residuo acetilglucosamina terminal no reductor; y

10 el gen de una segunda enzima que puede intensificar la primera enzima, en donde la segunda enzima es Manosidasa I (Man I), Manosidasa II (Man II), β -1,4-galactosiltransferasa (GalT) y N-acetilglucosaminiltransferasa I (GlcNAc I), en donde el mecanismo de adición de cadenas de azúcar añade una cadena de azúcar que contiene una cadena de azúcar interior y una cadena de azúcar exterior, en donde la cadena de azúcar interior comprende una pluralidad de manosa y acetilglucosamina, y en donde la cadena de azúcar exterior contiene una porción de cadena de azúcar terminal con una galactosa terminal no reductora.

15

20

25

30

35

40

45

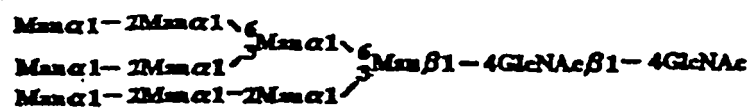
50

55

60

65

1) Tipo rico en manosa



2) Tipo complejo



3) Tipo híbrido

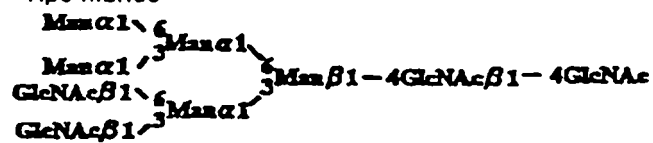


FIG 1

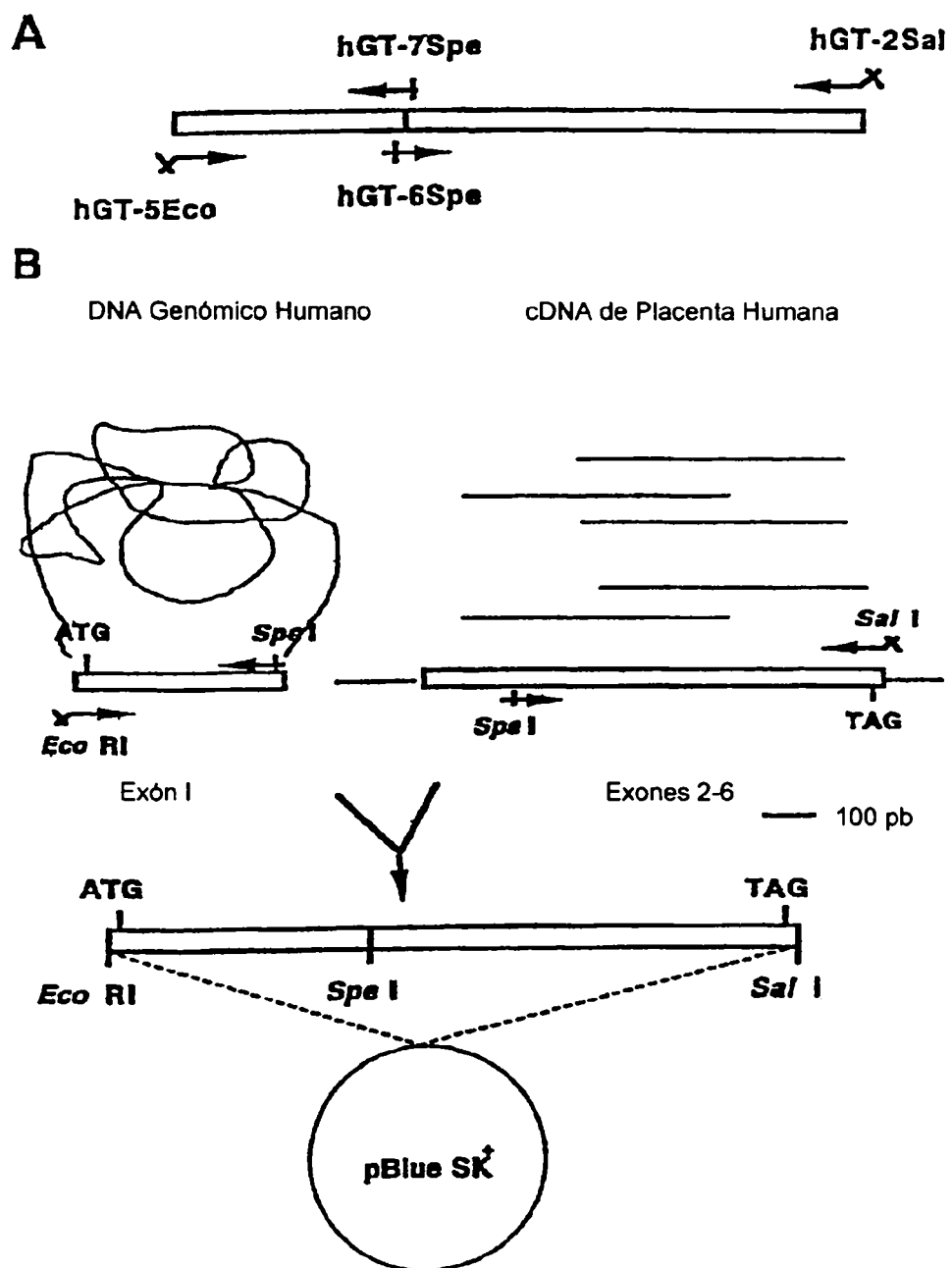


FIG 2

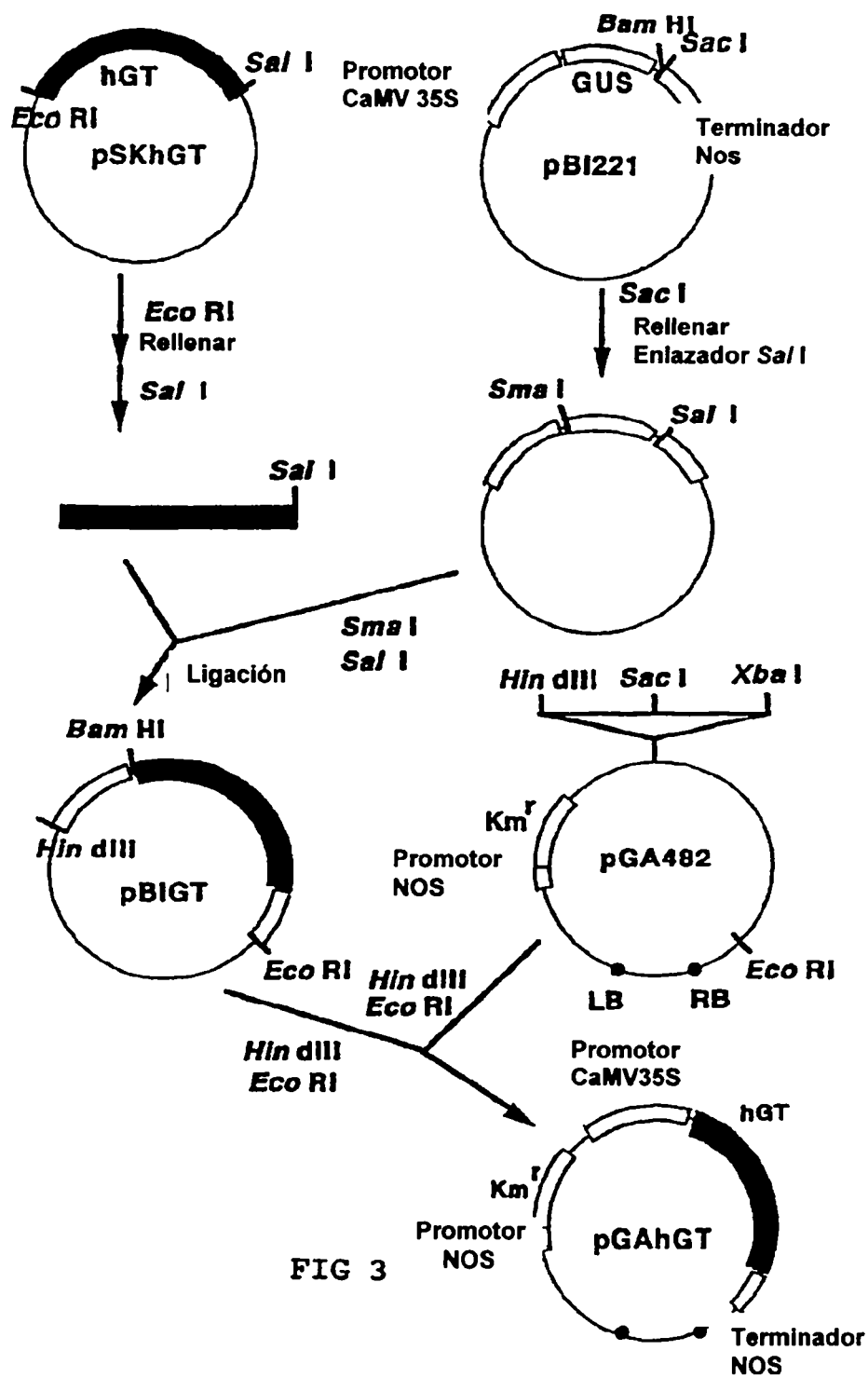


FIG 3

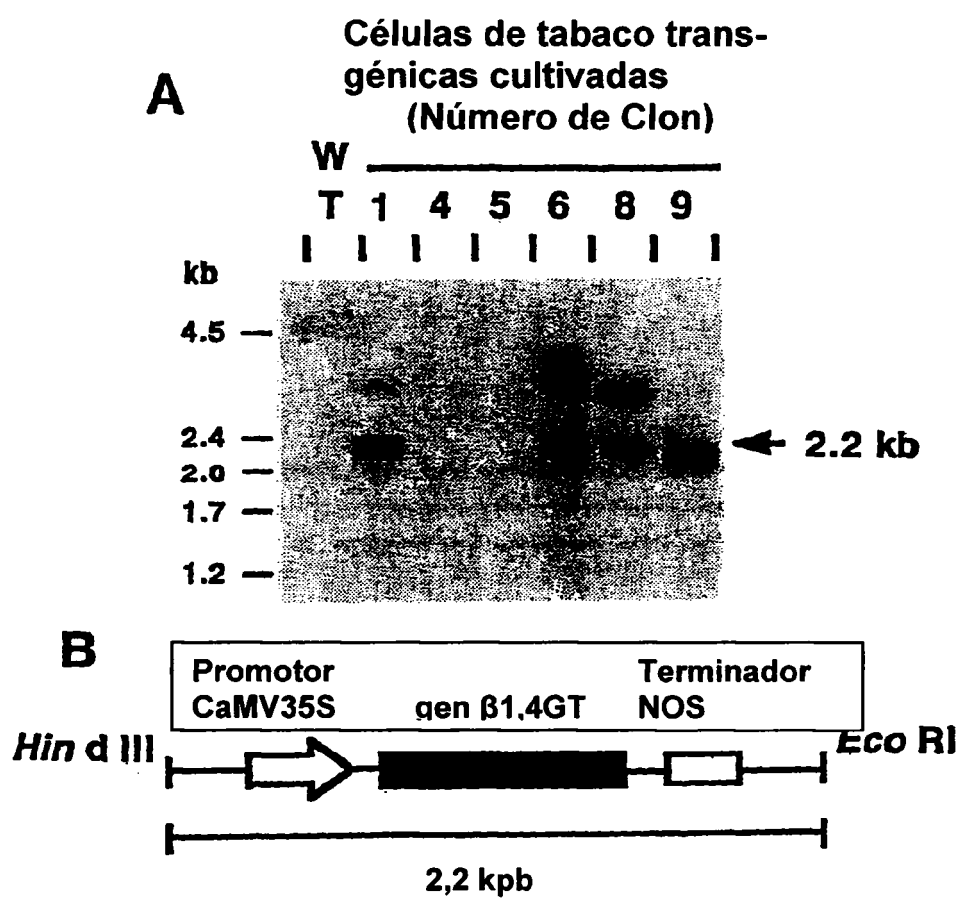


FIG 4

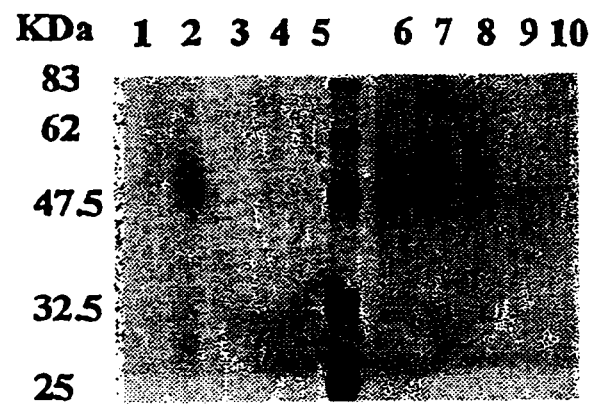


FIG 5

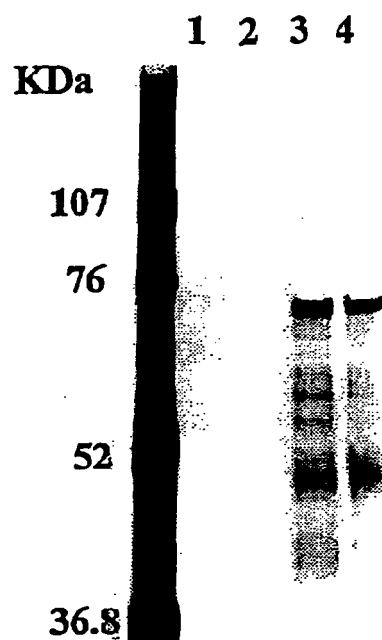


FIG 6

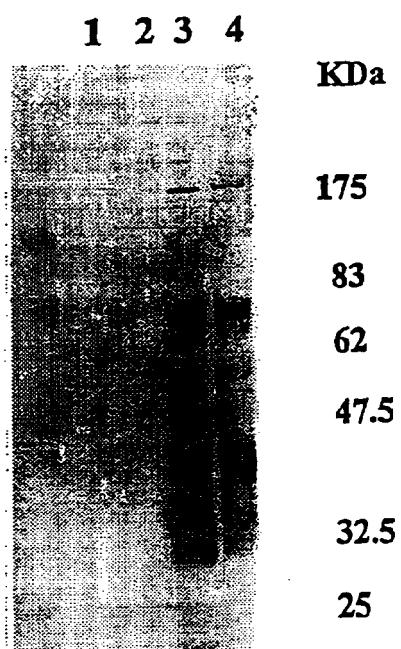


FIG 7

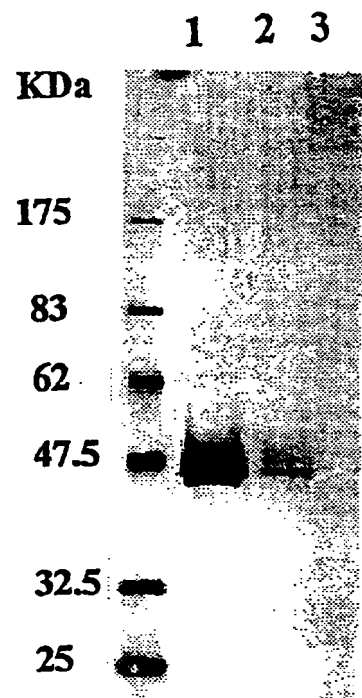


FIG 8

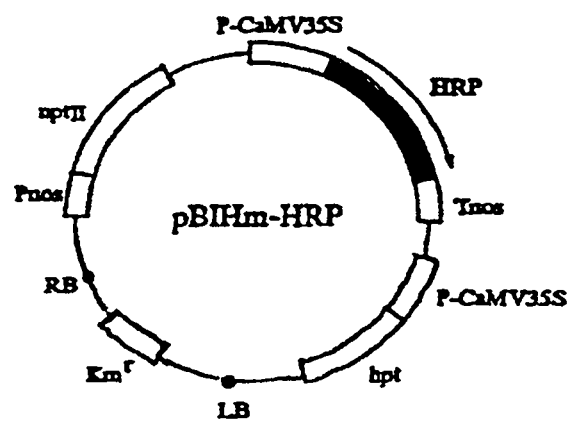


FIG 9

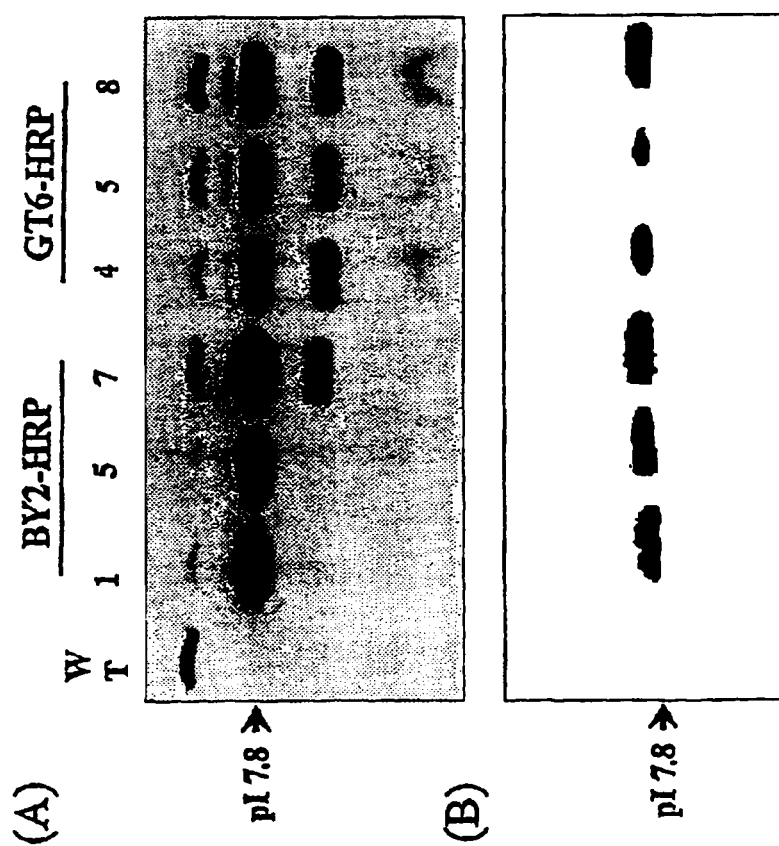


FIG 10

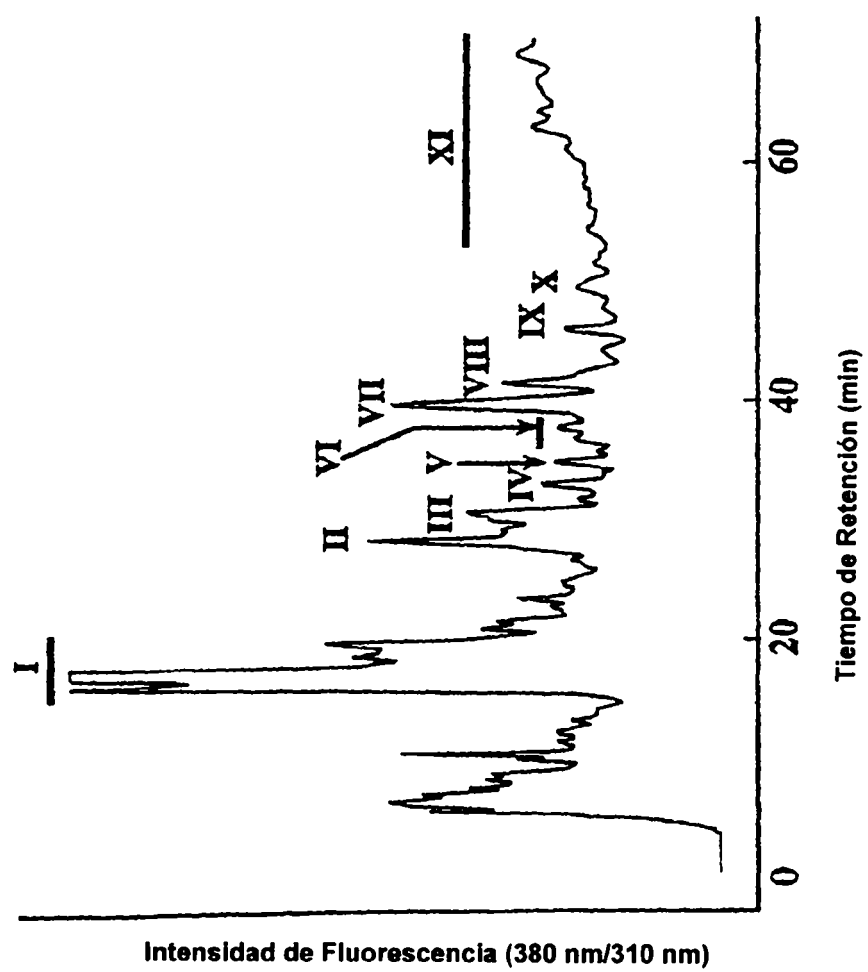


FIG 11

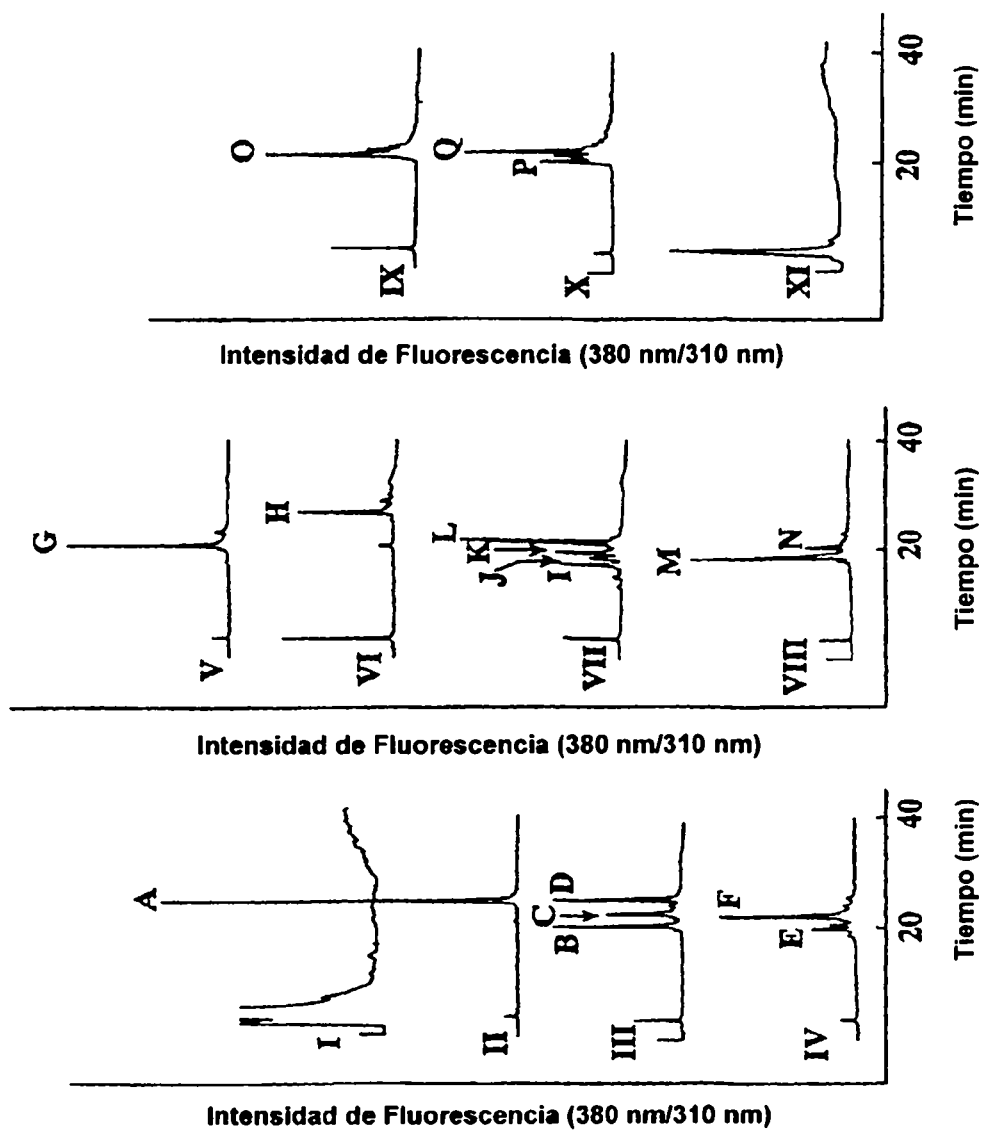


FIG 12

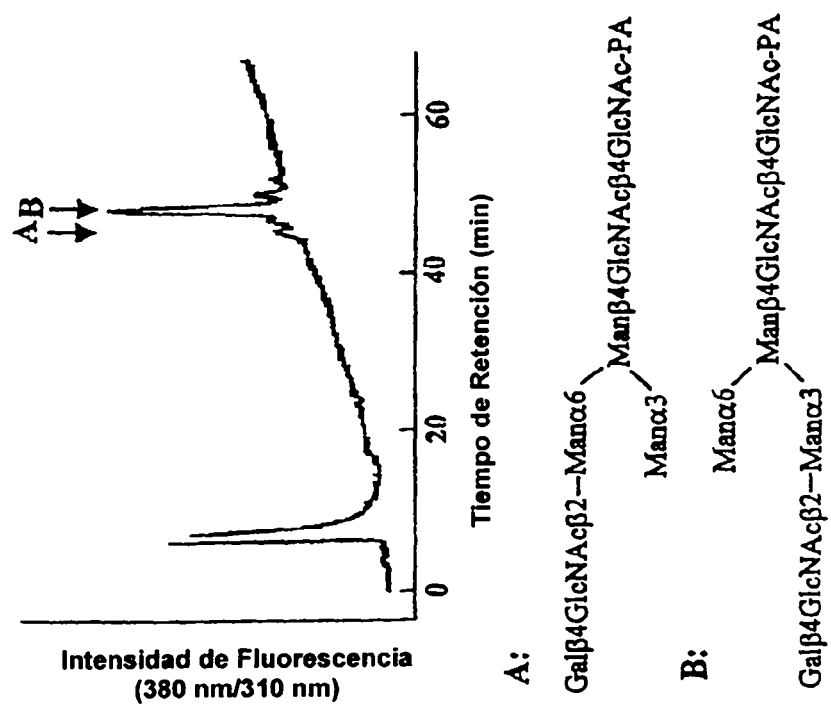


FIG 13

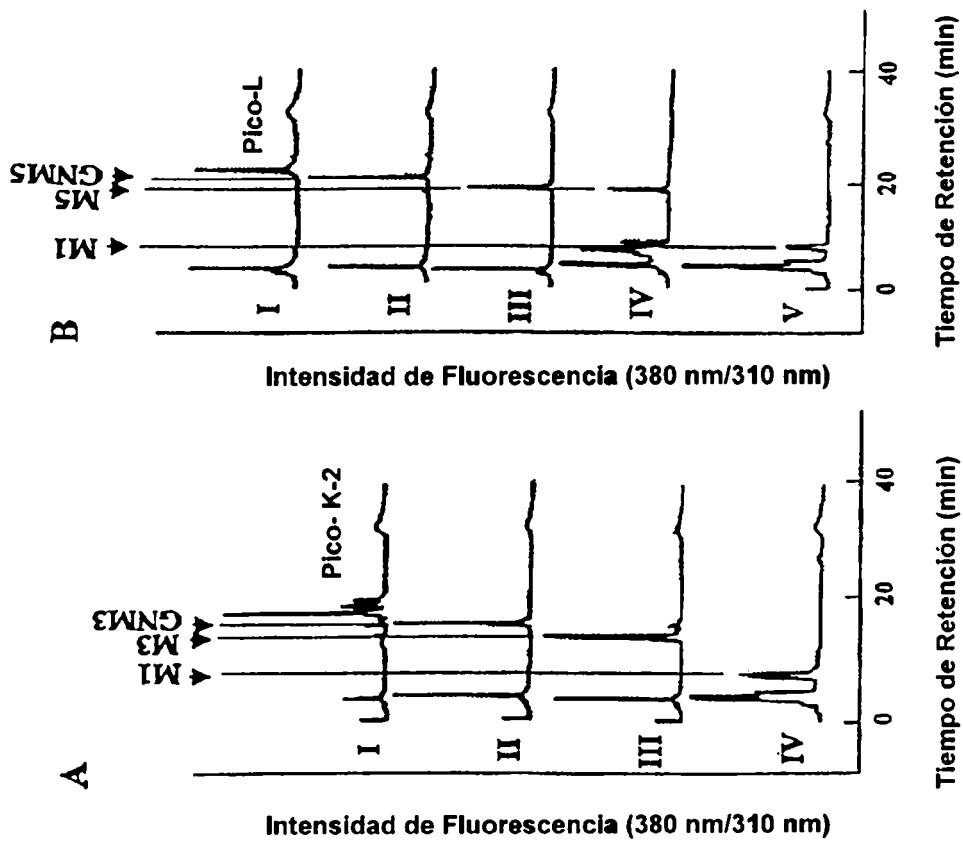


FIG 14

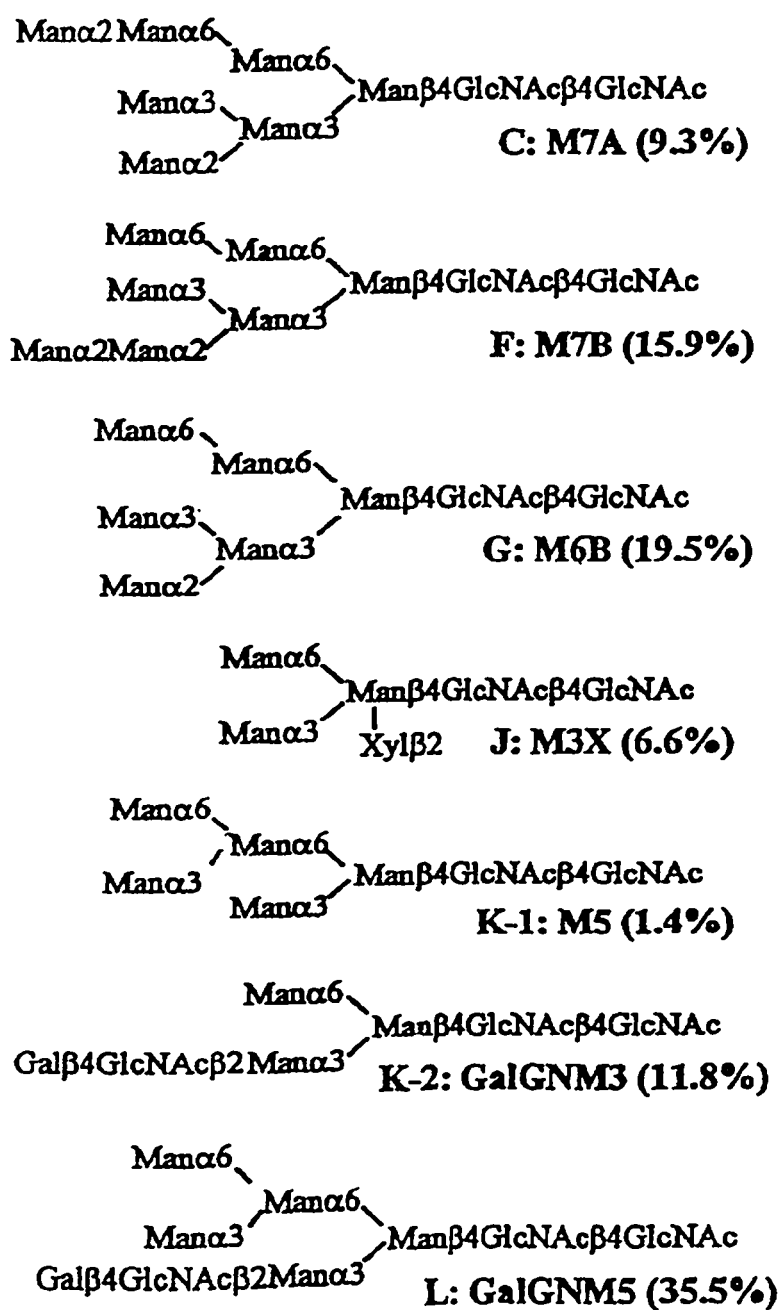


FIG 15

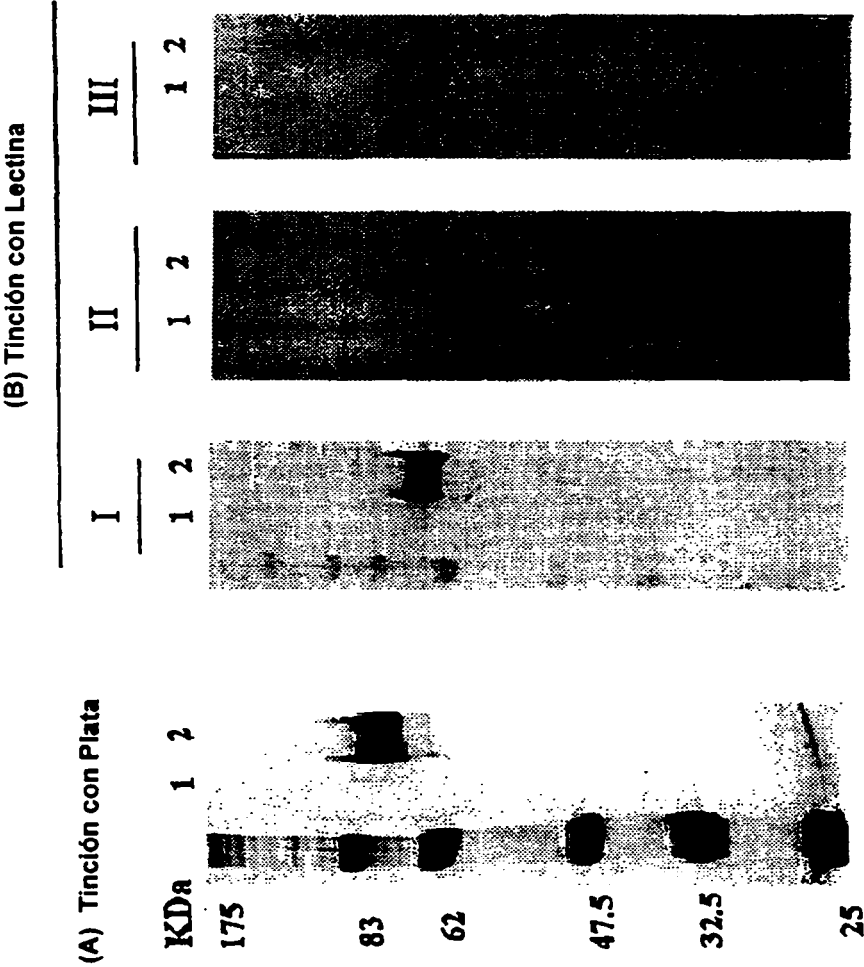


FIG 16

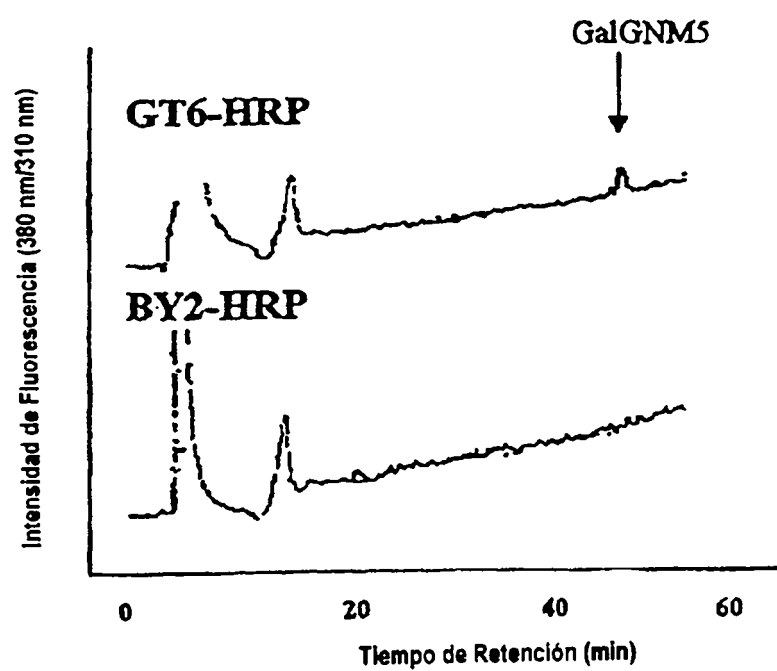


FIG 17

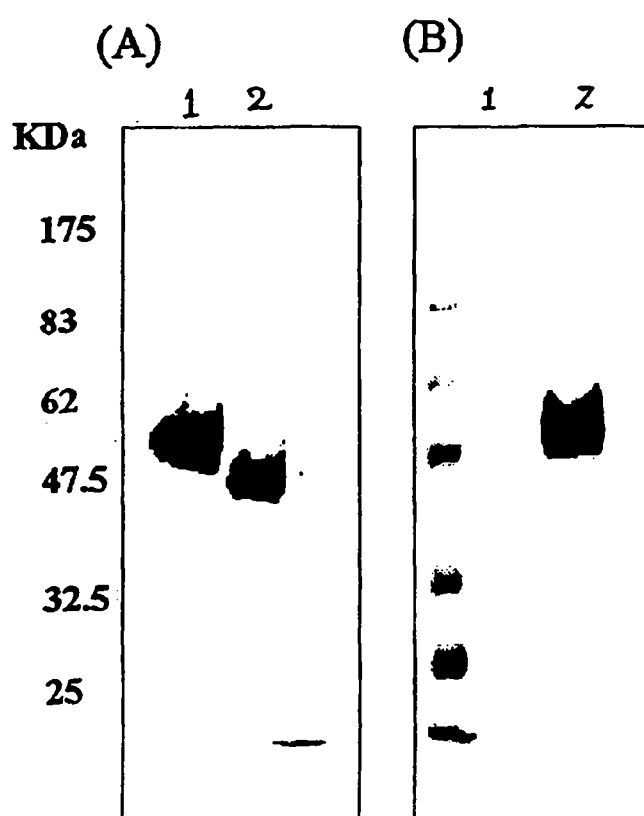


FIG 18

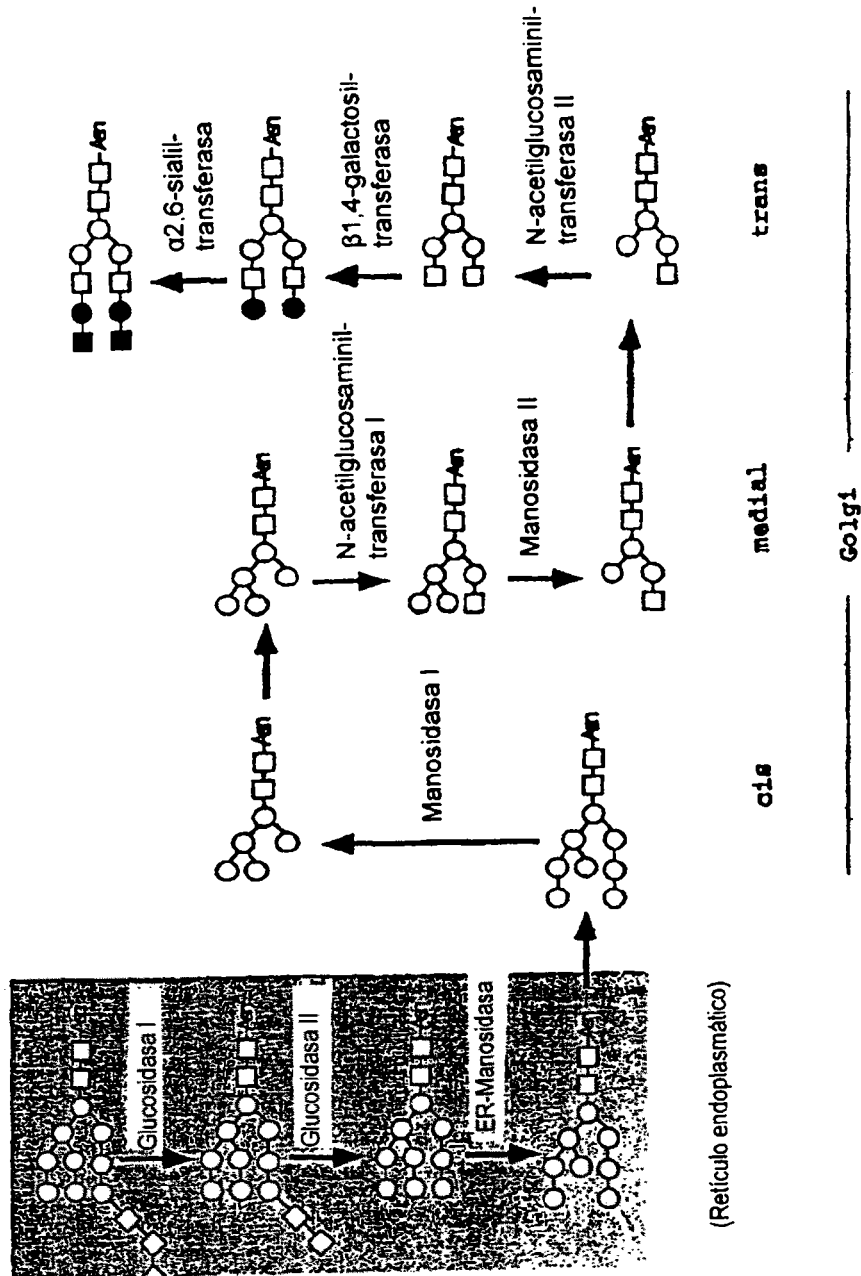
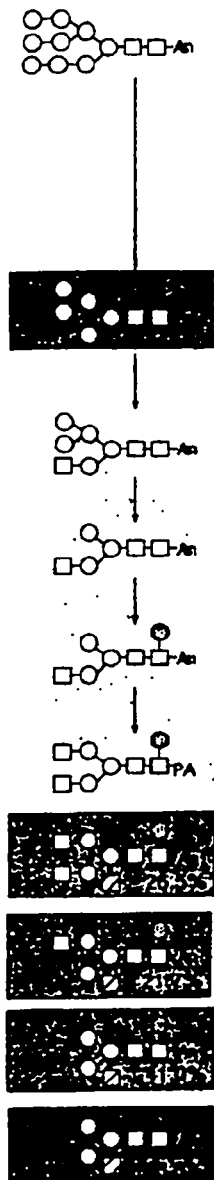


FIG 19

Tipo salvaje; célula BY2



Transgénico; célula GT6

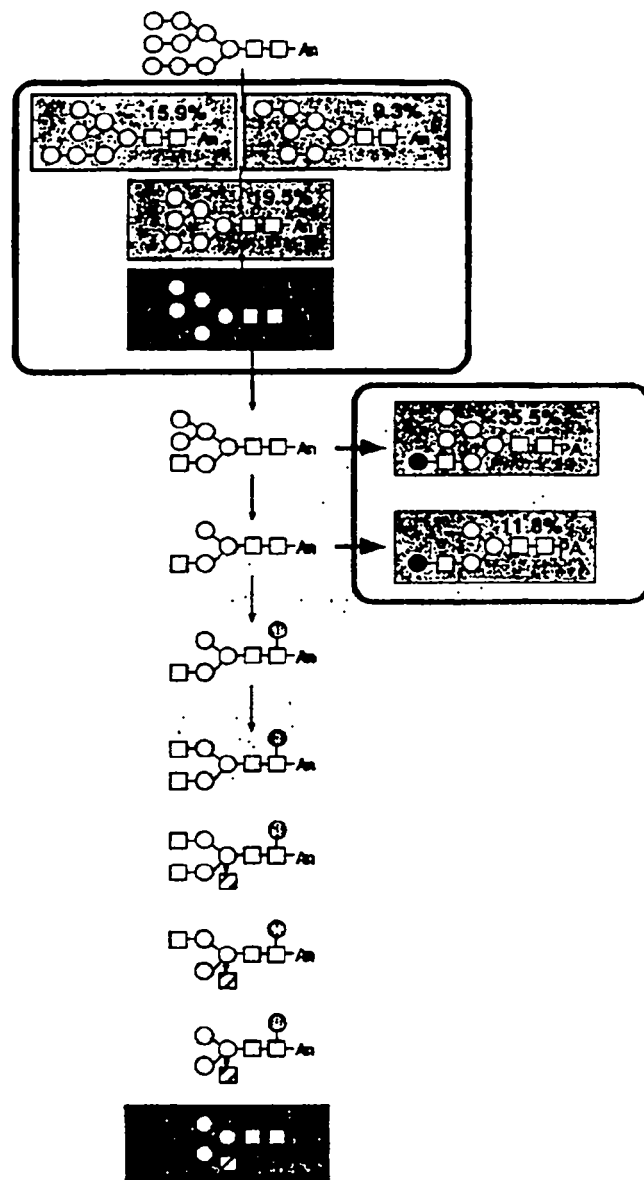


FIG 20

Célula GT6 Super Transgénica

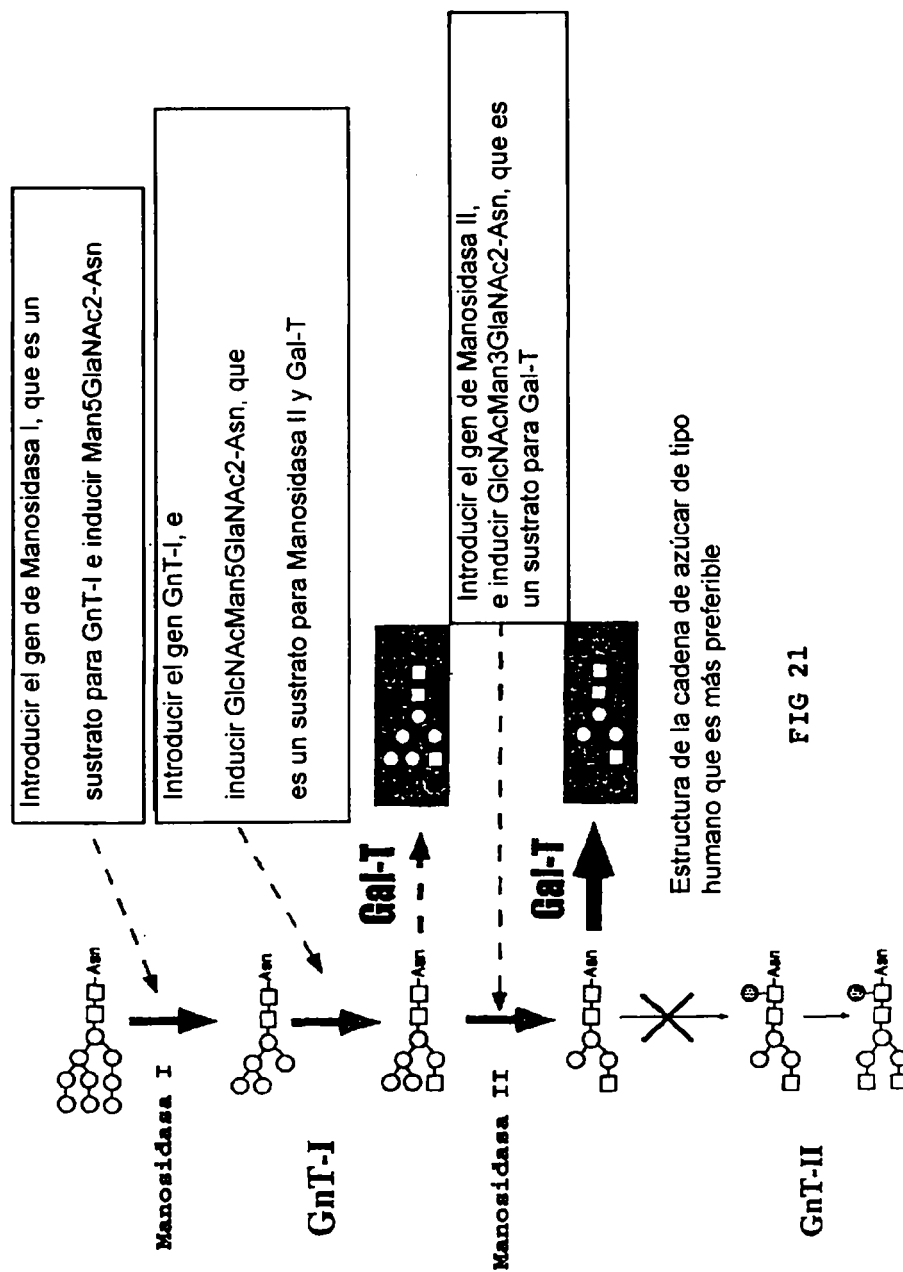
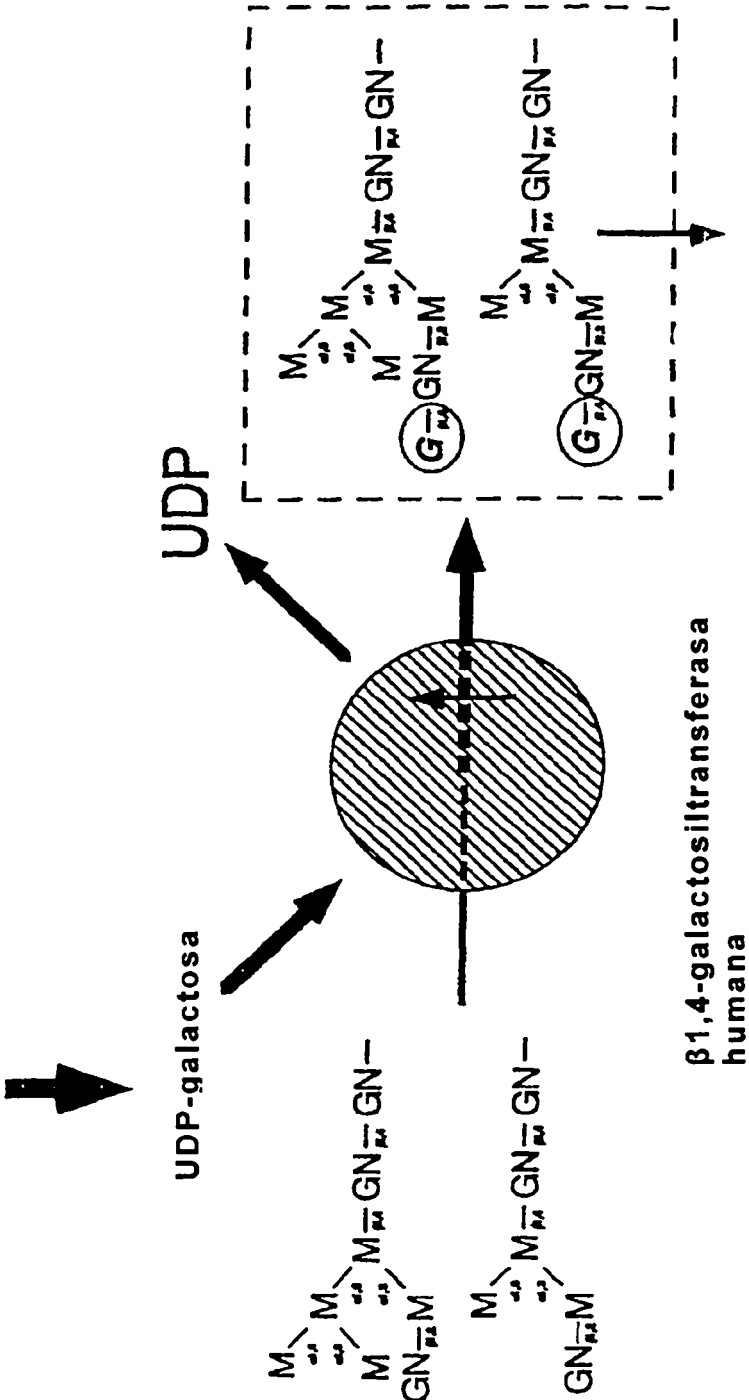


FIG 21

Grupo de enzimas sintéticas de UDP-galactosa



Aumento de la cantidad de
cadenas de azúcar con galactosa

FIG 22

ES 2 350 063 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Tatsuji, Seki and Kazuhito, Fujiyama	
5	<120> Método para fabricación de glicoproteínas que tienen cadenas de azúcar de tipo humano	
	<130> J198080401	
	<150> JP P1998-350584	
	<151> 1998-12-09	
10	<160> 6	
	<170> PatentIn Ver. 2.0	
	<210> 1	
15	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador hGT-5Eco	
	<400> 1	
25	aaagaattcg cgatgccagg cgcgcggtccc t	31
	<210> 2	
	<211> 28	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador hGT-2Sal	
35	<400> 2	
	tcgatcgcaa aacctgtgc agctgatg	28
40	<210> 3	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador hGT-7Spe	
	<400> 3	
50	acgggactcc tcaggggcga tgatcataa	29
	<210> 4	
	<211> 27	
55	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador hGT-6Spe	
	<400> 4	
	aagactagtg ggccccatgc tgattga	27
65	<210> 5	
	<211> 1.158	

ES 2 350 063 T3

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

5 <221> CDS

<222> (1).. (1155)

<400> 5

```

10      atg cca ggc gcg tcc cta cag cgg gcc tgc cgc ctg ctc gtg gcc gtc   48
      Met Pro Gly Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val
           1           5           10           15

15      tgc gct ctg cac ctt ggc gtc acc ctc gtt tac tac ctg gct ggc cgc   96
      Cys Ala Leu His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg
                20                25                30

20      gac ctg agc cgc ctg ccc caa ctg gtc gga gtc tcc aca ccg ctg cag   144
      Asp Leu Ser Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln
                35                40                45

25      ggc ggc tgc aac agt gcc gcc gcc atc ggg cag tcc tcc ggg gag ctc   192
      Gly Gly Ser Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Gln Leu
                50                55                60

30      cgg acc gga ggg gcc cgg ccg ccg cct cct cta ggc gcc tcc tcc cag   240
      Arg Thr Gly Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln
                65                70                75                80

35      ccg cgc ccg ggt ggc gac tcc agc cca gtc gtg gat tct ggc cct ggc   288
      Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly
                85                90                95

40      ccc gct agc aac ttg acc tgg gtc cca gtg ccc cac acc acc gca ctg   336
      Pro Ala Ser Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu
                100                105                110

45      tgg ctg ccc gcc tgc cct gag gag tcc ccg cta cta gtg ggc ccc atg   384
      Ser Leu Pro Ala Cys Pro Gln Gln Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met
                115                120                125

50      ctg att gag ttt aac atg cct gtg gac ctg gag ctc gtg gca aag cag   432
      Leu Ile Gln Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Gln Leu Val Ala Lys Gln
                130                135                140

55      aac cca aat gtg aag atg ggc ggc cgc tat gcc ccc agg gac tgc gtc   480
      Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val
                145                150                155                160

60      tct cct cac aag gtg gcc atc atc att cca ttc cgc aac cgg cag gag   528
      Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Gln
                165                170                175

```

65

ES 2 350 063 T3

cac ctc aag tac tgg cta tat tat ttg cac cca gtc ctg cag cgc cag 576
 His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln
 180 185 190

cag ctg gac tat ggc atc tat gtt atc aac cag gcg gga gac act ata 624
 Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile
 195 200 205

ttc aat cgt gct aag ctc ctc aat gtt ggc ttt caa gaa gcc ttg aag 672
 Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Gln Ala Leu Lys
 210 215 220

gac tat gac tac acc tgc ttt gtg ttt agt gac gtc gac ctc att cca 720
 Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro
 225 230 235 240

atg aat gac cat aat gcg tac agg tgt ttt tca cag cca cgg cac att 768
 Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile
 245 250 255

tcc gtt gca atg gat aag ttt gga ttc agc cta cct tat gtt cag tat 816
 Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr
 260 265 270

ttt gga ggt gtc tct gct cta agt aaa caa cag ttt cta acc atc aat 864
 Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn
 275 280 285

gga ttt cct aat aat tat tgg ggc tgg gga gga gaa gat gat gac att 912
 Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Gln Asp Asp Asp Ile
 290 295 300

ttt aac aga tta gtt ttt aga ggc atg tct ata tct cgc cca aat gct 960

ES 2 350 063 T3

Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala
305 310 315 320

gtg gtc ggg agg tgt cgc atg atc cgc cac tca aga gac aag aaa aat 1008
Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn
325 330 335

gaa ccc aat cct cag agg ttt gac cga att gca cac aca aag gag aca 1056
Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Gln Thr
340 345 350

atg ctc tct gat ggt ttg aac tca ctc acc tac cag gtg ctg gat gta 1104
Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val
355 360 365

cag aga tac cca ttg tat acc caa atc aca gtc gac atc ggg aca ccg 1152
Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro
370 375 380

agc tag 1158

Ser
385

<210> 6

<211> 385

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Met Pro Gly Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val
1 5 10 15

Cys Ala Leu His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg
20 25 30

ES 2 350 063 T3

Asp Leu Ser Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln
 35 40 45
 Gly Gly Ser Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Gln Leu
 50 55 60
 Arg Thr Gly Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln
 65 70 75 80
 Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly
 85 90 95
 Pro Ala Ser Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu
 100 105 110
 Ser Leu Pro Ala Cys Pro Glu Gln Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met
 115 120 125
 Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Gln Leu Val Ala Lys Gln
 130 135 140
 Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val
 145 150 155 160
 Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu
 165 170 175
 His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln
 180 185 190
 Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile
 195 200 205

ES 2 350 063 T3

Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys
 210 215 220
 5
 Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro
 225 230 235 240
 10
 Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile
 245 250 255
 15
 Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr
 260 265 270
 20
 Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn
 275 280 285
 25
 Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Gln Asp Asp Asp Ile
 290 295 300
 30
 Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala
 305 310 315 320
 35
 Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn
 325 330 335
 40
 Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Gln Thr
 340 345 350
 45
 Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val
 355 360 365
 50
 Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro
 370 375 380
 55
 Ser
 385
 60
 65