(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101815784 A
(43)申请公布日 2010.08.25

(21)申请号 200780007805.7

(22)申请日 2007.02.13

(30)优先权数据
60/773,378 2006.02.13 US
60/773,374 2006.02.13 US
11/353,905 2006.02.13 US
60/773,255 2006.02.13 US
60/879,450 2007.01.09 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2008.09.04

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2007/003942 2007.02.13

(87)PCT申请的公布数据
WO2007/095304 EN 2007.08.23

(71)申请人 美国弗劳恩霍夫股份有限公司
地址 美国密歇根州

(72)发明人 维达季·尤西波夫 瓦季姆·梅特
莎伊拉贾·拉宾德拉
穆奈姆·沙劳尔

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
代理人 孟锐

(51)Int.Cl.
C12N 15/05(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 39 页 附图 17 页

(54)发明名称

植物系统中外来核酸和多肽的产生

(57)摘要

本发明提供在幼苗中产生核酸或蛋白质的系统和方法。通常,所述幼苗是在封闭式可调控环境中生长。在一些实施例中,所述幼苗中医药学活性蛋白质的表达受外源诱导型启动子或病毒启动子控制。在一些实施例中,所述幼苗是可食用的并且能够生食或优选采集活的幼苗以保留所述核酸或蛋白质的最大生物活性。在一些实施例中,所述幼苗为豌豆幼苗或烟草属(Nicotiana)幼苗。

CN 101815784 A

1. 一种在幼苗中产生医药学活性蛋白质或多肽的方法，其包含以下步骤：

将豌豆幼苗与包括控制病毒序列转录的启动子的农杆菌构筑体融合，所述病毒序列载有编码所关注的蛋白质或多肽的编码序列；

在足以允许从所述启动子转录从而产生病毒转录物的条件下培养所述融合豌豆幼苗一段足以允许从所述启动子转录从而产生病毒转录物的时间，所述病毒转录物包括编码所关注的蛋白质或多肽的序列；

在足以允许产生所述蛋白质或多肽的条件下培养所述融合豌豆幼苗一段足以允许产生所述蛋白质或多肽的时间。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述农杆菌构筑体包含烟草花叶病毒、苜蓿花叶病毒、花椰菜花叶病毒或上述任何组合的病毒序列。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述农杆菌构筑体包含烟草花叶病毒的病毒序列。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述农杆菌构筑体包含苜蓿花叶病毒的病毒序列。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述农杆菌构筑体包含花椰菜花叶病毒的病毒序列。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述病毒序列处于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子的控制下。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述花椰菜花叶病毒的 35S 启动子在融合到所述豌豆幼苗中后驱动重组病毒基因组的起始转录。

8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述控制病毒序列转录的启动子为组成性启动子。

9. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述控制病毒序列转录的启动子为可诱导启动子。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述可诱导启动子为热休克启动子。

11. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述可诱导启动子为光可诱导启动子。

12. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述可诱导启动子为化学可诱导启动子。

13. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述农杆菌构筑体包含转录终止子。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述转录终止子为农杆菌 (Agrobacterium) 胭脂碱合成酶的转录终止子。

15. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述农杆菌构筑体包含一个或一个以上用于病毒复制的基因。

16. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述农杆菌构筑体包含一个或一个以上用于细胞到细胞运动的基因。

17. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述所关注的蛋白质或多肽处于病毒 mRNA 启动子的转录控制下。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述病毒 mRNA 启动子为外壳蛋白亚基因组 mRNA 启动子。

19. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述农杆菌构筑体包含左边界和右边界序列。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述左边界和右边界序列划定在将豌豆幼苗与所述农杆菌构筑体融合后转移到所述豌豆幼苗细胞中的所述农杆菌构筑体区的界限。

21. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述豌豆幼苗与多种构筑体融合。

22. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述豌豆幼苗选自由绿豌豆、比尔跳豆、黄夹豆、斑点豌豆和绿豌豆组成的群组。

23. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述所关注的蛋白质或多肽为胰岛素。

24. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述所关注的蛋白质或多肽为谷氨酸脱羧酶。

25. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述所关注的蛋白质或多肽为酪氨酸磷酸酶样蛋白 IA-2。

26. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述所关注的蛋白质或多肽为绿色荧光蛋白。

27. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述所关注的蛋白质或多肽为人类生长激素。

28. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述所关注的蛋白质或多肽为炭疽毒素的一种或一种以上组分。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述炭疽毒素的组分为保护性抗原。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中已引入使所述保护性抗原作为毒素无活性的突变。

31. 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述炭疽毒素的组分为致死因子。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中已引入使所述致死因子作为毒素无活性的突变。

33. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述所关注的蛋白质或多肽包含地衣聚糖酶序列。

34. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述融合豌豆幼苗是在水栽培生长条件下培养。

35. 根据权利要求 1 所述的方法，其中每千克植物组织产生至少 5 克所述蛋白质或多肽。

36. 根据权利要求 1 所述的方法，其中每千克植物组织产生至少约 1 克所述蛋白质或多肽。

37. 根据权利要求 1 所述的方法，其中每千克植物组织产生至少约 0.5 克所述蛋白质或多肽。

38. 根据权利要求 1 所述的方法，其中每千克植物组织产生至少约 20-500 毫克所述蛋白质或多肽。

39. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述足以允许产生所述蛋白质或多肽的时间为从所述农杆菌构筑体融合起至少约 6 周。

40. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述足以允许产生所述蛋白质或多肽的时间为从所述农杆菌构筑体融合起至少约 3 周。

41. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述足以允许产生所述蛋白质或多肽的时间为从所述农杆菌构筑体融合起至少约 2 周。

41. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述足以允许产生所述蛋白质或多肽的时间为从所述农杆菌构筑体融合起至少约 1 周。

42. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述足以允许产生所述蛋白质或多肽的时间为

从所述农杆菌构筑体融合起至少约 3 天。

43. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述足以允许产生所述蛋白质或多肽的时间为从所述农杆菌构筑体融合起至少约 1 天。

44. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述幼苗为豌豆幼苗。

45. 一种在烟草属 (Nicotiana) 植株中产生医药学活性蛋白质或多肽的方法，其包含以下步骤：

将烟草属幼苗与包括控制病毒序列转录的启动子的农杆菌构筑体融合，所述病毒序列载有编码所关注的蛋白质或多肽的编码序列；

在足以允许从所述启动子转录从而产生病毒转录物的条件下培养所述融合烟草属幼苗一段足以允许从所述启动子转录从而产生病毒转录物的时间，所述病毒转录物包括编码所关注的蛋白质或多肽的编码序列；

在足以允许产生所述蛋白质或多肽的条件下培养所述融合烟草属幼苗一段足以允许产生所述蛋白质或多肽的时间。

植物系统中外来核酸和多肽的产生

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请案为 2006 年 2 月 13 日申请的题为“幼芽系统中外来核酸和蛋白质的产生 (Production of Foreign Nucleic Acids and Polypeptides in Sprout Systems)”的共同待决的美国专利申请案第 11/353,905 号的部分接续案且主张其权益。所述申请案的完整内容是以引用的方式并入本文中。

[0003] 本申请案还主张共同待决的美国临时专利申请案第 60/773,255 号 (题为“炭疽芽胞杆菌抗原、疫苗组合物和相关方法 (Bacillus Anthracis Antigens, Vaccine Compositions, andRelated Methods)”)、第 60/773,374 号 (题为“HPV 抗原、疫苗组合物和相关方法 (HPVAntigens, Vaccine Compositions, and Related Methods)”) 和第 60/773,378 号 (题为“流感病毒抗原、疫苗组合物和相关方法 (Influenza Antigen, Vaccine Compositions,and RelatedMethods)”) 中每一者的权益,各所述专利申请案都于 2006 年 2 月 13 日申请。这些申请案中每一者的完整内容都是以引用的方式并入本文中。

[0004] 本申请案还主张 2006 年 6 月 15 日申请的题为“流感病毒抗原、疫苗组合物和相关方法 (Influenza Antigen,Vaccine Compositions,and Related Methods)”的共同待决的美国临时专利申请案第 60/813,955 号的权益。所述申请案的完整内容是以引用的方式并入本文中。

[0005] 本申请案还主张 2006 年 9 月 15 日申请的题为“流感病毒抗原、疫苗组合物和相关方法 (Influenza Antigen,Vaccine Compositions,and Related Methods)”的共同待决的美国临时专利申请案第 60/944,770 号的权益。所述申请案的完整内容是以引用的方式并入本文中。

[0006] 本申请案还主张 2007 年 1 月 9 日申请的题为“用于在植物中产生疫苗抗原的发射载体 (Launch Vector for the Production of Vaccine Antigens in Plants)”的共同待决的美国临时专利申请案第 60,879,450 号的权益。这些申请案中每一者的完整内容是以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0007] 无

背景技术

[0008] 药品的成本相当高且正在不断升高。除成本高外,一些药品的供应还受到限制,这使得这些药品无法为每一位有需要的患者所用。由于成本和可用性阻碍了药品于贫困群体中的分配,故这对于发展中国家来说是一个特别值得关注的问题。

[0009] 若干因素导致药品生产的高成本,并且引起消费者购买医药品的价格升高。引起此问题的最主要因素为生产所述产品的经济方式的缺乏。对于基于蛋白质和肽的药物来说尤其如此。对于一些药物,另一因素在于无法经口投与治疗有效量的药剂。许多医药品只能通过注射到身体特定部位来投与。举例来说,治疗过敏症或传染性疾病的一些免疫药物

需要通过注射投与。诸如人类生长激素和胰岛素等蛋白质和肽类药品通常只能通过注射投与。引起许多药品成本的另一因素在于其在医院或分配场所的传递。尤其在炎热天气，传递和存储药品需要昂贵的制冷设备。由于所述设备通常难以得到，故这在发展中国家是主要问题。

[0010] 已经在多种宿主中产生药用蛋白质和肽。已经在包括原核生物（诸如大肠杆菌(Escherichia coli)和枯草芽胞杆菌(Bacillus subtilis)）和真核生物（诸如酵母、真菌、昆虫细胞、动物细胞和转基因动物）的异源表达系统中产生许多治疗性蛋白质。细菌表达系统相对易于操作且产物的产率较高。然而，哺乳动物蛋白通常需要大规模的翻译后修饰来达到功能活性，这就成为细菌表达系统的限制因素。诸如哺乳动物、人类和昆虫细胞培养系统等细胞培养系统对于产生复杂蛋白质较为便利。然而，较长的交货期、较低的产品回收率、可能出现的病原转移以及较高的资本和生产成本都提出了严肃的问题。转基因动物可以提供对于复杂蛋白质的无限量供应。不幸的是，这一系统受产生新颖且经改进产物所耗费的较长时间以及病原转移到人类个体中的风险的限制。

[0011] 在原核和真核细胞中产生药用蛋白质和肽的经济和生物化学限制（包括高生产成本、低产率、分泌问题、蛋白质加工中的不当修饰、按比例扩大到较大体积的困难以及污染）已驱使研究人员研究植物作为新颖宿主，以便以预期降低的成本大规模产生蛋白质和肽。转基因植物中蛋白质的产生例如描述于美国专利第5,750,871号、第5,565,347号、第5,464,763号、第5,750,871号和第5,565,347号中。尽管植物的大量生长和采集比原核和真核细胞便宜，但植物细胞中外来基因的表达通常较低。此外，采集植物通常需要例如通过去除叶片、使茎与根分离或去除根来破坏植物。所述破坏通常会引起起始植株部分枯萎和植物凋亡的过程。经历凋亡的植物会在开始蛋白质纯化之前产生引起转基因表达的蛋白质降解的蛋白酶。即使是直接消费植物，所表达的药用蛋白质的活性也可能因采集诱导的细胞间降解机制而降低。

[0012] 与在露天生长的转基因植物中产生外来蛋白相关的另一主要问题在于与野外植物异花授粉的可能性，这使得可能会使外来蛋白进入食物链。围绕针对转基因植物的农业实践的政府规章的复杂性使得难以批准将新颖转基因植物用于农业用途。此外，户外环境无法控制，使得难以保证外来基因的适当生长、发育和对其表达的调控。举例来说，实际上无法在户外环境中进行热诱导型、光诱导型、激素诱导型或化学诱导型启动子的诱导。当然，也无法控制户外温度和光照水平。另外，喷到植物上的激素或化学品很可能不在植株上分散，而是经风和雨分散到环境中。喷洒农田的成本也相当高。

[0013] 需要产生蛋白质或多肽的改进系统。还特别需要在植物中产生蛋白质或多肽的改进系统。举例来说，需要用于在植物中产生药用蛋白质且在采集后减少所表达蛋白质的细胞间降解的量的受控可调控系统。

发明内容

[0014] 本发明提供在植物中产生蛋白质或多肽（和/或核酸）、尤其药用蛋白质或多肽的系统。

[0015] 一方面，本发明提供在植物中迅速表达蛋白质或多肽的系统。因此，在一些实施例中，本发明提供蛋白质或多肽在幼苗中的表达。在一些实施例中，所述幼苗为发芽幼苗。在

一些实施例中，可以消费或采集活的幼苗（例如发芽幼苗）。在一些实施例中，植物是在封闭式可调控环境（例如室内）中生长（例如从种子生长）。

[0016] 在一些实施例中，根据本发明产生的蛋白质或多肽是在植物细胞中由人工引入植物中的核酸构筑体表达。在一些实施例中，根据本发明产生的蛋白质或多肽是在植物细胞中由具有植物病毒特征的 RNA 翻译。在一些实施例中，这些特征包括自我复制、细胞到细胞运动、系统性运动和其组合，或选自由自我复制、细胞到细胞运动、系统性运动和其组合组成的群组。在一些实施例中，RNA 自我复制并且能够细胞到细胞运动，但无法在植株中系统性运动。

[0017] 在一些实施例中，根据本发明产生的蛋白质或多肽是在植物细胞中由在农杆菌 (Agrobacterium) 中复制的核酸构筑体表达。在一些实施例中，本发明利用在农杆菌中复制且还含有引导具有植物病毒特征的 RNA 表达的启动子的构筑体。在一些实施例中，所述 RNA 包括编码所关注的蛋白质或多肽的序列。因此，在本发明一些实施例中，在植物中通过包括将在农杆菌中复制且还含有引导具有植物病毒特征的 RNA 表达的启动子的载体引入植物细胞中的方法来产生所关注的蛋白质或多肽，所述 RNA 无法在植株中系统性运动，但能够自我复制且所述 RNA 另外编码所关注的蛋白质或多肽。

[0018] 在本发明一些实施例中，当利用在农杆菌中复制的构筑体时，通过农杆菌渗透法将所述构筑体引入植物细胞中。

[0019] 尽管本文中主要参考本发明用于产生药用蛋白质的用途来描述本发明，但本发明通常用于产生基本上任何所关注的核酸 (DNA 和 / 或 RNA) 和 / 或蛋白质，而不受有关核酸或蛋白质的特定用途的限制。举例来说，可以产生在多种工业过程或生物修复过程的任一种中使用的酶（例如，降解污染物的酶）。因此，即使未明确指出，但本发明和权利要求书中的描述应视为适用于任何所关注的核酸或蛋白质，包括具有治疗应用的核酸或蛋白质，以及不具有治疗应用的核酸或蛋白质。在某些实施例中，所述蛋白质在营养上并非重要蛋白质。在本文中未提及的情况下，本发明可以排除任何特定蛋白质。

[0020] 在本发明任何方面中，在其某些实施例中，所关注的核酸或蛋白质在表达其的细胞中经转录后和 / 或翻译后加工。在本发明某些实施例中，所关注的蛋白质是由表达其的细胞分泌。举例来说，所述蛋白质通常可以包含分泌信号序列，或可以修饰编码所述蛋白质的核酸的编码区以使其包括编码分泌信号序列的一部分。所属领域中众所周知分泌信号序列。

[0021] 在本发明任何方面中，在其某些实施例中，可以改变编码所关注的蛋白质的异源序列以使用与天然存在的序列中存在的密码子不同的密码子，从而改进在常见植物和 / 或特定物种的植物中的表达。举例来说，可以将所述序列密码子优化以便在特定物种中表达。所属领域中已知进行密码子优化的方法。

[0022] 本发明还提供含有如本文所述的表达构筑体的植物、含有所述植物的组合物、从所述植物中分离的蛋白质 / 多肽制剂、含有所述从所述植物中分离的蛋白质 / 多肽的组合物、进行所述分离的方法，和使用所述经分离蛋白质 / 多肽（或含有其的组合物）的方法，包括利用在植物中表达的医药学活性蛋白质治疗哺乳动物的方法。

[0023] 定义

[0024] 对有需要的个体“投与”医药学活性蛋白质或多肽意思为，以使所述蛋白质的治疗

功效保持足以对所述宿主提供所需有益作用的时间长度的方式对所述个体提供医药学活性蛋白质。

[0025] 术语“动物”涵盖所有脊椎动物（生活型），人类、牛、绵羊、猪、犬科、猫科、雪貂、啮齿动物、灵长类动物、鱼类、鸟类（例如家禽）等。在一些实施例中，所述动物为哺乳动物。在一些实施例中，所述动物为人类。

[0026] 根据本发明，多肽或蛋白质的“特征部分”为具有含有连续氨基酸伸长或一起为蛋白质或多肽的特征的连续氨基酸伸长的集合的蛋白质或多肽。在一些实施例中，各所述连续伸长通常将含有至少 2、5、10、15、20 或更多个氨基酸。一般来说，特征部分为除上文所述的序列一致性外与相关完整蛋白质共有至少一个功能特征的部分。在一些实施例中，特征部分可具生物活性。

[0027] 如本文所使用的术语，蛋白质或多肽“域”通常是指，当产生而远离蛋白质或多肽序列的剩余部分时保持三维完整程度和 / 或结构的蛋白质或多肽序列区段。如所属领域已知，许多蛋白质和多肽具有域结构。在一些实施例中，域具有活性（例如，结合、催化活性等）。在一些实施例中，域具有免疫原性。免疫原域至少与单表位一样大，且通常比单表位大；在一些实施例中，免疫原域除表位外还含有足够的序列以确保所述表位的正确呈递。

[0028] “表达”是指内源基因或转基因在植物（例如，幼芽）中的转录和 / 或翻译。可将或可不将转基因整合到植物的基因组 DNA 中。举例来说，“表达”是指细菌、质粒或病毒核酸中存在的基因在植物中的转录和 / 或翻译，而不管是否将所述细菌、质粒或病毒核酸整合到植物的基因组 DNA 中。所述基因可以为对于细菌、质粒或病毒而言为异源的基因。

[0029] “表达盒”或“表达载体”是指能够引导特定核苷酸序列在适当宿主细胞中表达的 DNA 序列（或在 RNA 病毒或 RNA 质粒的情况下为 RNA 序列）。举例来说，表达盒可以包括可操作地连接到所关注的核苷酸序列的启动子，其视情况可操作地连接到 3′ 序列，诸如 3′ 调控序列或终止信号。表达盒通常还可以包括当需要任何核苷酸序列时进行所述序列的适当翻译所需的序列。编码区通常编码所关注的蛋白质，但也可编码所关注的功能性 RNA，例如反义 RNA 或抑制特定基因表达的不翻译 RNA。包括所关注的核苷酸序列的表达盒可为嵌合体，意思是指所述核苷酸序列包括一个以上不同来源的 DNA 序列，其是通过重组 DNA 技术融合在一起，产生天然不存在且尤其在将要表达所述序列的植物中不存在的核苷酸序列。表达盒还可以为天然存在但以重组方式获得的适用于异源表达的表达盒。然而，通常表达盒关于宿主为异源的，亦即，表达盒的特定 DNA 序列在宿主细胞中天然不存在且必须通过转化事件引入宿主细胞或宿主细胞的始祖细胞中。表达盒中的核苷酸序列的表达受组成性启动子或只有当宿主细胞暴露于某些特定外部刺激物时才起始转录的可诱导启动子控制。在多细胞有机体（诸如植物）的情况下，启动子也可对特定组织、器官或发育阶段具特异性。通常将核表达盒插入植物核基因组中并且其能够引导植物的核基因组表达特定核苷酸序列。通常将质粒表达盒插入植物质粒基因组中并且其能够引导植物的质粒基因组表达特定核苷酸序列。在质粒表达盒的情况下，对于由质粒基因组表达核苷酸序列来说，将需要其它元件，例如核糖体结合位点，或阻止质粒 RNA 多聚腺苷酸化和随后降解的 3′ 茎 - 环结构。在本发明某些实施例中，利用包含作为最小启动子（诸如 TATA 元件）的启动子的表达盒，且反式活化因子 (trans-activating factor) 的存在可能为引导核苷酸序列表达、尤其引导高水平表达所必需。举例来说，表达盒可包含结合转录活化子的 DNA 区。所述表达盒和

其中的启动子称为“可活化的”。

[0030] “食物”或“食品”为可由人类或其它动物摄取的液体或固体制剂。优选所述术语包括可直接新鲜提供给人类和/或其它动物的生植物或活植物(例如,发芽幼苗)制剂。从植物获得的材料意欲包括可由人类或其它动物摄取的整个可食用植物。所述术语还可包括任何经加工植物(例如,发芽幼苗)与喂给人类和其它动物的营养载剂。加工步骤可包括食品或饲料工业中常用的步骤。所述步骤包括(但不限于)浓缩植物的固体物质以例如形成颗粒、产生糊状物、干燥或冻干;或者可以通过将植物切割、捣碎或研磨达到各种程度,或通过提取植物的液体部分以产生汤汁、糖浆或汁液来制造。加工步骤还可包括蒸煮(例如熏蒸)植物(例如发芽幼苗)。

[0031] “基因”为编码所关注的蛋白质或多肽(或RNA)的序列。基因可包括相关调控序列。基因的编码序列可以转录成RNA,诸如mRNA、rRNA、tRNA、snRNA、正义RNA或反义RNA。然而,如所属领域技术人员所了解,“基因”还可以为RNA(例如病毒RNA载体中的基因)。“调控序列”的实例为启动子序列、5′和3′不翻译序列以及终止序列。此外,还可以包括内含子和外显子。在某些实施例中,基因为编码序列且相关调控序列为异源序列。

[0032] 如本文所使用,“异源序列”意思指具有不同的天然来源或合成来源。举例来说,如果将核酸引入宿主细胞中且宿主细胞天然不含有所述核酸中存在的某些或全部序列,那么就称这些序列(和/或核酸)关于所述宿主细胞为异源的。所引入的核酸可包括异源启动子、异源编码序列或异源终止序列。另外,转化核酸可为完全异源的或者可包括任何可能的异源与内源核酸序列的组合。类似地,异源是指由相同天然来源的细胞类型得到且插入相同天然来源的细胞类型中,但以非天然状态(例如不同拷贝数)存在或在不同调控元件控制下的核苷酸序列。术语“异源”适用于细胞,包括植物和细菌细胞,且也适用于质粒、质体和病毒。

[0033] “宿主细胞”为引入核酸以供表达的细胞。通常所述引入需要人工操作。

[0034] “无活性表达盒”或“无活性表达载体”为包含无活性或沉默的外来核酸序列的DNA或RNA序列,其能够在活化后引导所关注的核酸或多肽的表达。一般来说,无活性表达盒具有如上文所述的表达盒特性,但编码所关注的核酸或多肽的序列不可操作地连接到启动子,例如,其可通过插入核酸区与启动子(或另一调控元件)分开。可操作连接是在重组事件后发生,由此随后发生表达。所述表达盒被称为“可活化的”。

[0035] 术语“可诱导启动子”意思指由直接或间接增加启动子活性的特定刺激物的存在或不存在启始的启动子。所述刺激物的一些非限制性实例包括热、光、发育调控因子、损伤、激素和化学品(例如小分子)。光诱导型启动子的一个实例为核糖-5-磷酸羧化酶启动子。化学诱导型的启动子也包括受体介导的系统,例如从其它有机体得到的系统,诸如类固醇依赖性基因表达、Lac阻遏物系统,和WO97/13864(以引用的方式并入本文中)中所述的利用来自果蝇(Drosophila)由保幼生长激素和其激动剂介导的USP受体的表达系统,以及(例如)如WO96/27673(也以引用的方式并入本文中)中所述利用受体组合的系统。其它化学诱导型的启动子包括诱导子诱导的启动子、安全剂诱导的启动子以及可由某些醇和酮诱导的alcA/alcR基因活化系统(WO93/21334;卡迪克(Caddick)等人(1998)自然—生物技术(Nat.Biotechnol.)16:177-180,其内容是以引用的方式并入本文中)。损伤诱导型启动子包括蛋白酶抑制剂的启动子,例如来自马铃薯的蛋白酶抑制剂II启动子,和损伤反应

路径中所涉及的其它植物来源的启动子，诸如聚苯基氧化酶、LAP 和 TD 的启动子。例如参看盖兹 (Gatz) “基因表达的化学控制 (ChemicalControl of Gene Expression)”，植物生理与分子生物学学报 (Ann.Rev.Plant Physiol.PlantMol.Biol.)(1997)48 :89-108，其以引用的方式并入本文中。其它可诱导的启动子包括植物来源的启动子，诸如系统获得抗性路径中的启动子，例如 PR 启动子。应注意，当在本文中论述可诱导启动子时，可活化启动子和表达盒可以类似形式用于本发明的某些实施例中。

[0036] “标记基因”为编码可选择或可筛选的特性的基因。

[0037] “医疗食品”包括供个体食用或饮用且对所述个体具有治疗作用的组合物。医疗食品例如包括已产生药用蛋白质或多肽的植物（例如，发芽幼苗）或由其得到的植物物质。医疗食品可单独摄取或可与医药领域中众所周知的医药组合物一起投与。医疗食品还包括供非人类动物用的等效的饲料。

[0038] “可操作地连接”是指核酸元件的缔合。举例来说，可操作地连接到编码蛋白质的异源 DNA 的启动子促进对应于异源 DNA 的功能性 mRNA 的产生。如果定位调控 DNA 序列与编码 RNA 或蛋白质的 DNA 序列，以致所述调控 DNA 序列影响所述编码 DNA 序列的表达，那么认为所述调控 DNA 序列“可操作地连接到”所述 DNA 序列或与所述 DNA 序列“缔合”。

[0039] “经口投与”医药学活性肽或蛋白质主要是指通过口、优选通过食用的方式投与，而且其意欲包括将所述肽或蛋白质提供到宿主的胃部或消化道的任何投药。在优选实施例中，经口投与导致医药学活性蛋白质与肠粘膜接触。

[0040] “医药学活性核酸”为编码医药学活性蛋白质的核酸，或其自身具有医药学活性，例如其具有一种或一种以上医药学活性，诸如针对医药学活性蛋白质所述的活性。举例来说，核酸可为 RNA 干扰 (RNAi) 因子的一个或一个以上链。所述因子包括靶向靶转录物（例如传染源的转录物或个体的内源性疾病相关转录物）的短干扰 RNA(siRNA)，或短发夹 RNA(shRNA)，或 siRNA 前体，或微 RNA 样 RNA。

[0041] 当将“医药学活性蛋白质或多肽”以治疗有效量投与宿主时，其以积极方式帮助或有助于宿主病状。医药学活性蛋白质或多肽对疾病具有康复治疗或减轻特性，并且可以投药以改善、减轻、缓解、逆转疾病或病症的一种或一种以上症状、延缓其发作或减轻其严重程度。医药学活性蛋白质或多肽可具有预防特性且可用于延缓疾病发作，或者当疾病出现时减轻所述疾病或病理病状的严重程度。术语“医药学活性蛋白质或多肽”包括整个蛋白质或多肽并且还可以指其医药学活性片段。其还可以包括蛋白质或肽的医药学活性类似物或者所述蛋白质或肽的片段的类似物。术语“医药学活性蛋白质或多肽”也可以指协作或协同作用以提供治疗益处的多种蛋白质或肽。应注意，术语“医药学活性蛋白质或多肽”尤其包括包含疫苗抗原的蛋白质，亦即，对个体投与蛋白质引起宿主的部分或全部预防性免疫反应。在本发明某些实施例中，免疫反应防止个体受传染源（例如病毒、细菌、真菌或原生动物病原体）影响。疫苗抗原的实例包括乙型肝炎表面抗原 (HbsAg)、大肠杆菌热敏性肠毒素、狂犬病毒糖蛋白和诺瓦克病毒衣壳蛋白 (Norwalkvirus capsid protein)。在本发明其它实施例中，免疫反应防止个体受非传染性病状或疾病影响或者减轻所述病状或疾病的至少一种病征或症状的严重程度。就这一点看，所关注的疾病包括（但不限于）癌症和自体免疫疾病。术语“医药学活性蛋白质或多肽”包括使个体部分或完全耐受暴露于将另外引起过敏 (allergic 或 anaphylactic) 反应的过敏原的蛋白质。

[0042] 如本文所使用，“启动子”为起始相关 DNA 序列转录的 DNA 序列。启动子区还可包括充当基因表达的调控子（诸如活化子、增强子和 / 或阻遏子）的元件。

[0043] “调控元件”是指涉及赋予核苷酸序列的表达的序列。调控元件包括 5′ 调控序列，诸如可与所关注的核苷酸序列连接的启动子；3′ 序列，诸如 3′ 调控序列或终止信号。调控元件通常还涵盖核苷酸序列适当翻译所需的序列。

[0044] “小分子”通常小于约 1 千道尔顿 (kilodalton) 并且为生物、有机或甚至无机化合物（例如顺铂 (cisplatin)）。所述小分子的实例包括养分，诸如糖和糖衍生物（包括磷酸盐衍生物）、激素（诸如植物激素赤霉酸或脱落酸）和合成小分子。

[0045] “特异性调控”是指如与非特异性作用相比，小分子优先影响一个启动子而非启动子组的转录（诸如增强或减弱细胞内的全局转录）的能力。

[0046] “发芽幼苗”或“幼芽”为来自种子或根的幼枝，优选新近发芽的种子。在一些实施例中，本发明的发芽幼苗为可食用发芽幼苗或幼芽（例如苜蓿芽、绿豆芽、萝卜芽、麦芽、芥菜芽、菠菜芽、胡萝卜芽、甜菜芽、洋葱芽、大蒜、芹菜芽、大黄芽；叶子，诸如卷心菜芽或莴苣芽、水田芥或水芹芽；药草芽，诸如欧芹或三叶草芽、花椰菜芽、西兰花芽、大豆芽、小扁豆芽；可食用花芽，诸如向日葵芽等）。根据本发明，发芽幼苗可发育到两叶期。通常，本发明的幼芽为 2 到 14 天大。

[0047] “实质上分离”在本文中多次使用，且通常是指使蛋白质或多肽与不相关或污染组分（例如植物结构蛋白和代谢蛋白）分离的至少部分纯化。所属领域众所周知分离和纯化蛋白质或多肽的方法。

[0048] “转化”是指将核酸引入细胞中，尤其将 DNA 分子稳定整合到所关注有机体的基因组中。

附图说明

[0049] 图 1 为使用基于植物病毒的载体表达外来基因的不同策略的示意图。

[0050] 图 2 为 AIMV 和 TMV 基因组的示意图。

[0051] 图 3 为经 Av/A4 和 Av/GFP 接种的本塞姆氏烟草 (Nicotiana benthamiana) 植株中重组 GFP 表达的 Western 印迹的图。

[0052] 图 4 为在经活体外 GH 转录物感染的本塞姆氏烟草植株中产生人类生长激素 (hGH) 的 Western 印迹的图。

[0053] 图 5 为大叶芥菜 (Brassica juncea) 中表达重组蛋白的转化构筑体的示意图。

[0054] 图 6 为在 HSP18.2 启动子控制下表达人类生长激素的转基因大叶芥菜的免疫印迹图。

[0055] 图 7 描述含有靶基因的各种农杆菌构筑体的示意图。图 7A：载体 pBIV，其中靶基因整合于植物启动子 (IV ＝任何植物启动子、人工启动子，或在植物细胞中起作用的其它启动子，例如，诸如花椰菜花叶病毒 (cauliflower mosaic virus) 的植物病毒的启动子）与 nos 终止子之间；图 7B：载体 pBIV-GUS，其中 GUS 基因插入 pBIV 中。图 7C：pBIV- 病毒载体 + 靶，其中载有靶基因的病毒载体或复制子（例如，病毒基因组或基因组部分）插入 pBIV 中；图 7D：载体 pBIV- 病毒载体 +GFP，其中 GFP 为由插入 pBIV 中的病毒载体或复制子携带的靶基因。将图 7C 和 7D 中所述的载体视为“发射”载体，这是因为，在引入植物细胞

后，其“发动”产生病毒序列（至少在发射所述序列到其中的特定植物细胞的情况下，其自我复制）。

[0056] 图 8 显示在用 pBIV-GUS 农杆菌渗透幼芽后进行的 GUS 染色。图 8A 显示绿豆芽的染色；图 8B 显示葫芦巴芽的染色。

[0057] 图 9 显示在用 pBIV-GUS 农杆菌渗透芸苔幼芽后进行的 GUS 染色。图 9A 显示染色结果；图 9B 为列出不同类型的幼芽的表，测试其表达借助农杆菌构筑体所传递的蛋白质或多肽的能力，所述农杆菌构筑体包括引导载有编码所关注的蛋白质或多肽的基因的病毒序列表达的启动子。

[0058] 图 10 显示在经 pBI121/D4-GFPC3 渗透后随时间流逝本塞姆氏烟草中 GFP 的表达。

[0059] 图 11 显示由渗透含有病毒载体（含编码 hGH 的序列）的农杆菌所引起的植物中 hGH 表达的 western 印迹分析。道数：第 1 道：分子量标准品 (ladder)；第 2 道：50ng hGH；第 3 道：经 pBI121/D4-HGH 6dpi 1:2 稀释液渗透的植物样品；第 4 道：经 pBI121/D4-HGH6dpi 1:10 稀释液渗透的植物样品；第 5 道：经 pBI121/D4-HGH 6dpi 1:50 稀释液渗透的植物样品；第 6 道：经 pBI121/D4-HGH 6dpi 1:100 稀释液渗透的植物样品；第 7 道：来自健康植物的植物样品；第 8 道：来自渗透 pBI121 的叶片的植物样品；第 9 道：来自感染 D4-HGH 的植物 13dpi 的植物样品；第 10 道：来自感染 D4-HGH 的克隆根系的样品。对于植物样品：将一片叶片（约 5mg 组织）在 100μL 布氏缓冲液 (Bradley buffer) 和拉氏装载缓冲液 (Laemmli loading buffer) 中研磨。每道装载 10μL。因此，对于第 3-6 道，此主要样品经稀释。

[0060] 图 12 显示利用水栽法生长的本塞姆氏烟草植株中 IA-2ic 蛋白质的表达：第 1 道：IA-2ic 标准品；第 2 道：神奇标记 (Magic Marker)；第 3 道：注射有农杆菌的土壤生长植株；第 4、5 道：渗透后 4 天的水栽法生长植株；第 6、7 道：渗透后 6 天的水栽法生长植株。

[0061] 图 13 描述根据本发明利用的用于将发射载有所关注的靶蛋白的病毒序列的农杆菌载体传递到幼苗中的农杆菌渗透系统的一个实施例。

[0062] 图 14 说明在经历使用图 13 的系统进行的农杆菌渗透法的各种豌豆品种中检测到的地衣聚糖酶活性。

[0063] 图 15 绘示经历使用图 13 的系统进行的农杆菌渗透法的斑点豌豆的 GFP 表达和植株生长。

[0064] 图 16 绘示经历使用图 13 的系统进行的农杆菌渗透法的某些斑点豌豆的组织特异性和渗透后最佳天数。

[0065] 图 17 描述可用于与根据本发明某些实施例的所关注的蛋白质或多肽融合的地衣聚糖酶载体分子。图 A 表示来自热纤梭菌 (Clostribium thermocellum) 的 b-1,3-1,4- 葡聚糖酶的示意性描述。图 B 表示环状交换的 LicKM 载体的示意性描述。在各图中，垂直影线对应于催化域的 N 末端区，且虚线框对应于催化域的 C 末端区。

[0066] 图 18 表示发射载体 pBID4 的示意图。

[0067] 图 19 为从靶基因优化到纯化终产物的过程中所涉及的各步骤的示意性描述，所述终产物易于根据本发明的一个特定实施例存储。

[0068] 图 20 描述用于从植物播种到组织采集的步骤的自动操作的设备设计。如所述，预计所述模块将占据约 40 英尺乘以约 70 英尺的地板面积且为约 32 英尺高。所示系统包括以下通过传送带连接的组件：中央棚架单元，其中保持各步骤间的植株；播种单元、真空渗

透和漂洗单元以及组织采集单元。

具体实施方式

[0069] 蛋白质或多肽

[0070] 本发明适用于在植物系统中产生任何蛋白质或多肽（或任何功能型DNA或RNA分子）。如上文所述，在某些实施例中，本发明针对药用蛋白质的产生，但本发明不受核酸或蛋白质的特定用途的限制。举例来说，可以产生在多种工业过程或生物修复过程的任一种中使用的酶（例如，降解污染物的酶）。因此，即使未明确指出，但本发明和权利要求书中的描述应视为适用于所关注的任何核酸或蛋白质，包括具有治疗应用的核酸或蛋白质，以及不具有治疗应用的核酸或蛋白质。在某些实施例中，蛋白质为在营养上不重要的蛋白质。在本文中未提及的情况下，本发明可以排除任何特定蛋白质。

[0071] 通常，所表达的蛋白质或多肽不为自然界中的植物中所表达的蛋白质或多肽。即使根据本发明，所述蛋白质或多肽为自然界中的植物中所表达的蛋白质或多肽，其通常在幼苗组织中是以高于在自然界中相当的组织中所存在的浓度表达。

[0072] 举少数实例来说，本发明可用于产生所关注的药用蛋白质，包括（但不限于）激素（胰岛素、甲状腺激素、儿茶酚胺、促性腺激素、促激素、催乳素、催产素、多巴胺、牛生长激素、瘦素等）、生长激素（例如人类生长激素）、生长因子（例如表皮生长因子、神经生长因子、类胰岛素生长因子等）、生长因子受体、细胞激素和免疫系统蛋白（例如，白细胞介素、集落刺激因子(CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、促红细胞生成素、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素、整合素、地址素、选择素、归巢受体、T细胞受体、免疫球蛋白、水溶性主要组织相容性复合体抗原、免疫活性抗原（诸如细菌、寄生虫或病毒抗原或过敏原）、自身抗原、抗体）、酶（组织型纤溶酶原活化物、链激酶、胆固醇生物合成或降解、类固醇合成酶、激酶、磷酸二酯酶、甲基化酶、去甲基化酶、脱氢酶、纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶、磷脂酶、芳香化酶、细胞色素、腺苷酸或鸟苷酸环化酶、神经氨酸酶等）、受体（类固醇激素受体、肽受体）、结合蛋白（类固醇结合蛋白、生长激素或生长因子结合蛋白等）、转录和翻译因子、癌蛋白或原癌蛋白（例如细胞周期蛋白）、肌蛋白（肌球蛋白或原肌球蛋白等）、菌蛋白、神经活性蛋白、肿瘤生长抑制蛋白（血管抑素或内皮抑素，二者都抑制血管新生）、抗菌蛋白（杀菌/通透性增加蛋白）、结构蛋白（诸如胶原蛋白、丝蛋白、纤维蛋白原、弹性蛋白、微管蛋白、肌动蛋白和肌球蛋白）、血液蛋白（凝血酶、血清白蛋白、VII因子、VIII因子、胰岛素、IX因子、X因子、组织型纤溶酶原活化物、C蛋白、温韦伯氏因子(von Wilebrand factor)、抗凝血酶III、葡糖脑苷脂酶、促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子(GCSF)或修饰因子VIII、抗凝剂（诸如水蛭素(huridin)）等。

[0073] 在一些特定实施例中，利用本发明来产生抗原蛋白或多肽。举例来说，可利用本发明产生由受传染个体的免疫系统识别的传染性有机体的蛋白（或其部分）。所述蛋白质或多肽可在研发防止相关有机体感染的疫苗方面特别有用。举少数实例来说，可根据本发明的系统产生来自炭疽(anthrax)（炭疽芽胞杆菌(Bacillus anthracis)；例如LF、PA)、霍乱（霍乱弧菌(Vibrio cholerae)）、巨细胞病毒(cytomegalovirus)、肠毒素型大肠杆菌菌株(enterotoxigenic strains of E.coli)、口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus)、乙型肝炎（例如乙型肝炎表面抗原HBsAg)、丙型肝炎（例如HCV核

心蛋白）、人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus）（例如 Tat、Rev、Nef、gp160、gp120 等）、人乳头瘤病毒（例如 E7、E6）、流感病毒（例如 HA、NA）、疟疾（malaria）（恶性疟原虫（Plasmodium falciparum）；例如 Pfs25、Pfs28、Pfs48/45、Pfs230）、麻疹病毒、诺瓦克病毒、鼠疫（plague）（鼠疫杆菌（Yersiniapestis）；例如 F1、LcrV）、绿脓杆菌（Pseudomonas aeruginosa）、狂犬病毒（rabies virus）、呼吸道合胞体病毒（respiratorysyncytial virus）（例如 F 蛋白、G 蛋白）、鼻病毒（rhinovirus）、轮状病毒（rotavirus）、金黄色葡萄球菌（Staphylococcus aureus）、传染性胃肠炎病毒（transmissible gastroenteritisvirus）、锥虫（trypanosomes）（布氏锥虫（Trypanosoma brucei）；例如 α－微管蛋白、β－微管蛋白）、结核病（tuberculosis）、SARS 等的有用的抗原蛋白。

[0074] 在一些特定实施例中，利用本发明产生多聚体蛋白复合物，例如包括免疫球蛋白，诸如抗体（即单克隆抗体）。举少数实例来说，可根据本发明的系统产生抗 PA、抗 LF、抗 NA、抗 TNFa、抗白细胞介素 12 等。更为普遍的是，可根据本发明制备针对与诸如以下疾病相关的抗原的单克隆抗体：癌症（例如急性髓系白血病（AML）、乳癌、结肠直肠癌、慢性淋巴细胞白血病（CLL）、非霍奇金氏淋巴瘤（non-Hodgkin′ s lymphoma）、肾细胞癌、实体肿瘤）、炎症和自体免疫病症（例如哮喘、克隆氏病（Crohn′ s disease）、糖尿病、移植物抗宿主疾病（器官排斥）、炎症性肠病、红斑狼疮、多发性硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、风湿性关节炎、血栓症、血管炎等）、传染性疾病（例如炭疽（炭疽芽胞杆菌）、霍乱（霍乱弧菌）、巨细胞病毒、肠毒素型大肠杆菌菌株、口蹄疫病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、人乳头瘤病毒、流感病毒、疟疾（恶性疟原虫）、麻疹病毒、諾瓦克病毒、鼠疫（鼠疫杆菌）、绿脓杆菌、狂犬病毒、呼吸道合胞体病毒、鼻病毒、轮状病毒、金黄色葡萄球菌、传染性胃肠炎病毒、锥虫（布氏锥虫）、结核病、SARS）等。

[0075] 在一些特定实施例中，利用本发明来产生 hGH、自体免疫疾病的自体抗原（例如针对糖尿病的 IA-2ic）、流感病毒抗原、炭疽抗原、HPV 抗原、流感病毒抗体等（参看实例）。

[0076] 在本发明的一些实施例中，产生全长异源蛋白。也就是说，在幼苗中完整产生自然界中存在或者已在另一情况下制备或设计的蛋白质。在一些所述实施例中，所产生的蛋白质无任何其它序列。在其它实施例中，仅产生一部分蛋白质，通常为具有已知所需活性的一部分（例如，抗原蛋白的表位、酶蛋白的活性域等）。在一些实施例中，所产生的部分为蛋白质或多肽的特征部分。在一些实施例中，所产生的部分包含表位。在一些实施例中，所产生的部分包含免疫原域。在一些实施例中，所产生的部分包含蛋白质域。

[0077] 在本发明的一些实施例中，产生蛋白质或多肽与其它蛋白质或多肽序列的融合体。如所属领域已知，可出于多种原因中的任一种使用融合体。举例来说，可将打算在幼苗（例如发芽幼苗）中产生的蛋白质或多肽与一种或一种以上便利检测和 / 或分离的部分融合。举例来说，可能将所关注的蛋白质或多肽与针对可用抗体或其它特异性配体且可用于便利分离或纯化的已知抗原表位融合。另外或其它，可将所关注的蛋白质或多肽与具有规定三维结构的另一多肽融合例如以赋予所关注的蛋白质或多肽以所需的三维排列。作为另一实例，可将所关注的蛋白质或多肽与一种或一种以上将引导其在植物细胞中亚细胞定位（或分泌）的部分融合。尤其当所关注的蛋白质或多肽为蛋白质抗原（例如用于制备亚单位疫苗）时，通常将需要产生与载体分子融合的蛋白质，以例如增强表

达、稳定性和/或免疫原性和/或协助分离或纯化。所属领域已知的某些例示性融合搭配物例如包括抗体表位(例如His标签等)、免疫原性载体蛋白、霍乱毒素、热敏性肠毒素等(例如参看维拉(Vella)等人,生物技术(Biotechnology)20:1,1992;凯利(Kelly)等人,免疫学(Immuology)113:163,2004;巴特利(Buttery)等人,伦敦皇家内科医师学会杂志(JR Coll Phuysicians Lond)34:163,2000;杰卡布逊(Jacobson)等人,Minerva儿科杂志(Minerva Peditr.)54:295,2002;德兹堡(Dertzbaugh)等人,传染与免疫学杂志(Infect Immunol.)61:48,1993;纳萨尔(Nashar)等人,疫苗(Vaccine)11:235,1993;里杰维斯特(Liljeqvist)等人,免疫方法杂志(J.Immunol.Methods)210:125,1997;斯塔尔(Stahl)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)86:6283,1989;尤里奇(Ulrich)等人,病毒研究进展(Adv.Virus Res.)50:141,1998;史密斯(Smith)等人,病毒学(Virology)348:475,2006;特尔本(Turpen)等人,生物技术(Biotechnology)13:53,1995)。

[0078] 本发明所涵盖的一种特殊的融合搭配物为热稳定蛋白,诸如来自热纤梭菌(Clostridium thermocellum)的地衣聚糖酶B(例如参看2003年5月22日申请的美国临时专利申请案60/472,495,和2004年5月24日申请且于2005年3月24日以WO2005/026375公开的PCT申请案US04/016452)。全长地衣聚糖酶(约35kDa)是由信号肽、催化域、富集Pro-Thr框和锚定域(参看图17)组成。根据本发明,融合蛋白中可缺失富集Pro-Thr框和锚定域。另外,天然信号肽可经在植物中操作者置换。

[0079] 所述地衣聚糖酶的催化域具有环结构,将其分成两个区:N末端区(N:氨基酸32-84)和C末端区(C:氨基酸85-246)。这两个区可在环结构处分开且环状交换以使所述分子更易于接受插入而不影响酶活性。在这两个区之间的接点处引入多克隆位点(MCS),并且将6×His标签和序列KDEL分别放于经交换载体的3′末端处以便利在内质网中的纯化和保留。图17)绘示分子量为约27kDa的经修饰地衣聚糖酶(LicKM;基因库登陆号DQ776900)的示意图。靶蛋白或多肽序列可表达为N或C末端融合体和/或MCS中的内部融合体(允许同时表达多个靶的特征)。

[0080] LicKM使得融合体成为规模从小肽到多达约100kDa或更高的全长蛋白的分子。LicKM可在高温(65℃)下保持其酶活性,此为通常也适用于融合体的特性。由于在65℃下进行10分钟的热处理可去除多达50%的污染植物蛋白,故这一特征使得能够容易且成本有效的回收靶蛋白。在纯化期间,可以通过监测地衣聚糖酶活性来追踪LicKM融合蛋白。LicKM作为载体分子的用途提供其它优势,包括可用于增强表达和并入所关注的多个多肽(例如,多疫苗抗原决定簇)。

[0081] 植物

[0082] 本发明的教示适用于多种不同植物。一般来说,能够表达如本文所述的所引入的构筑体的任何植物都适用于本发明中。在许多实施例中,将需要使用幼苗以便改进蛋白质/多肽的产生速度。如本文所述,在许多实施例中,利用发芽幼苗。如所属领域中已知,大部分幼芽快速生长,从而由存储的种子产生可食用植物。然而,所属领域技术人员将了解,术语“发芽幼苗”在本文中更常用于指幼苗,而不管品种是否通常归类为“幼芽”。生长足够长时间以具有充足绿色生物质从而允许引入和/或表达如本文所提供的表达构筑体的任何植物(应意识到,相关时间可视所述表达构筑体的传递和/或表达模式而变化)可视为本

文中的“发芽幼苗”。

[0083] 在本发明许多实施例中，利用可食用植物（即，将要投与蛋白质或多肽的个体可食用（对所述个体无毒）的植物）。

[0084] 在某些优选实施例中，本发明的植物可为芸苔属或拟南芥属。适于转化且作为发芽幼苗食用的一些适当植物包括苜蓿、绿豆、萝卜、小麦、芥菜、菠菜、胡萝卜、甜菜、洋葱、大蒜、芹菜、大黄、多叶植物（诸如卷心菜或莴苣、水田芥或水芹）、药草（诸如欧芹、薄荷或三叶草）、花椰菜、西兰花、大豆、小扁豆、可食用花（诸如向日葵等）。

[0085] 已测试多种植物物种在本发明实践中的适应性。已测试多种不同的豆类和其它物种由农杆菌构筑体（由如本文所述的农杆菌渗透法引入）发射的病毒载体产生异源蛋白质的适用性，例如包括赤豆、苜蓿、大麦、西兰花、比尔跳豆、荞麦、卷心菜、花椰菜、三叶草、羽衣甘蓝、葫芦巴、亚麻、鹰嘴豆、青豆、日本菠菜、无头甘蓝、卡姆小麦、甘蓝、绿豌豆、绿豆、芥菜、菜豆、萝卜、红三叶草、大豆、斑点豌豆、向日葵、芜菁、黄夹豆等（例如参看实例 5 和 8 图 9 等）。本发明提供意外结果，即某些豌豆品种特别适于所述操作。举例来说，根据本发明，比尔跳豆、青豆、绿豌豆、斑点豌豆和 / 或黄夹豆在本发明这一方面中特别有用。因此，在某些实施例中，本发明提供在一种或一种以上所述植物中使用发射编码所关注的相关蛋白质或多肽的病毒构筑体（即，具有植物病毒特征的 RNA）的农杆菌载体产生蛋白质或多肽（例如，抗原、抗体和 / 或其它蛋白质）。在一些实施例中，RNA 具有 AlMV 的特征（和 / 或包括 AlMV 序列）。在一些实施例中，所述 RNA 具有 TMV 的特征（和 / 或包括 TMV 序列）。

[0086] 应了解，一方面，本发明提供表达所关注的靶蛋白或多肽的幼苗（例如，发芽幼苗）。在一些实施例中，幼苗是从转基因种子生长；本发明还提供可由本文所述的方法产生和 / 或利用的种子。可使针对任何所关注的基因的转基因种子萌芽且视情况诱导产生所关注的蛋白质或多肽。举例来说，可使能够表达所关注的任何基因的种子萌芽和通过以下方式诱导：i) 病毒感染；ii) 农杆菌渗透；或 iii) 含有病毒基因组的细菌。可使能够表达针对任何单克隆抗体的重链或轻链的转基因的种子萌芽且通过以下方式诱导以产生全长分子：i) 病毒感染；ii) 农杆菌渗透；或 iii) 用含有病毒基因组的细菌接种。可使能够表达针对包含多个组分的复杂分子（诸如 sIgA）中的一种或一种以上组分的转基因的种子萌芽，且通过以下方式用于产生全功能分子：i) 病毒感染；ii) 农杆菌渗透；或 iii) 用含有病毒基因组的细菌接种。可使来自健康非转基因植物的种子萌芽且通过以下方式用于产生靶序列：i) 病毒感染；ii) 农杆菌渗透；或 iii) 用含有病毒基因组的细菌接种。

[0087] 在一些实施例中，幼苗是从非转基因的种子生长。通常，所述幼苗将包含引导所关注的蛋白质或多肽表达的病毒序列。在一些实施例中，所述植物还可包含农杆菌序列，视情况包括“发射”病毒序列的序列。

[0088] 在植物中表达蛋白质或多肽的系统

[0089] 根据本发明，可使用多种不同系统中的任一种在幼苗（例如发芽幼苗）中表达蛋白质或多肽。在一些实施例中，产生转基因细胞系或种子，其随后萌芽且生长一段时间，由此在幼苗组织中（例如在发芽幼苗中）产生转基因序列中所包括的蛋白质或多肽。产生转基因植物细胞和 / 或种子的典型技术包括根癌农杆菌 (Agrobacterium tumefacien) 介导的基因转移和基因枪法或电穿孔法。

[0090] 在一些实施例中，利用瞬时表达系统。在植物组织中产生蛋白质或多肽的瞬时表

达的典型技术利用植物病毒。病毒转化是一种较为快速且成本低廉的转化胚芽和发芽幼苗的方法，其可以在获得产物之前采集而不存在实验或世代的滞后。另一方面，未减毒的病毒可感染其它植物，潜在引起环境问题。

[0091] 本发明提供具有病毒表达系统优势（例如，快速表达、高产量）和农杆菌转化优势（例如受控投药）的表达系统。具体来说，如下文将详细论述，本发明提供农杆菌构筑体（即，在农杆菌中复制且因此可通过农杆菌传递来传递植物细胞的构筑体）包括植物启动子的系统，所述植物启动子在引入植物后，将引导载有所关注的蛋白质或多肽的基因的病毒序列（例如，包括病毒复制序列）的表达。此系统允许在植物中受控、高水平瞬时表达蛋白质或多肽。

[0092] 下文将独立地进一步详细论述多个不同的表达系统的实施例，其中一些表达系统产生转基因植物且另一些提供瞬时表达。对于任何所述技术来说，阅读本申请案的所属领域技术人员将了解如何调节和优化在幼苗组织（例如发芽幼苗）中表达蛋白质或多肽的方案。

[0093] 农杆菌转化

[0094] 农杆菌是革兰氏阴性根瘤菌科的代表性种属。此物种引起植物肿瘤，诸如根癌和毛状根疾病。在去分化植物组织（此为肿瘤的特征）中，农杆菌产生称为冠瘿碱 (opines) 的氨基酸衍生物且经植物分解代谢。负责冠瘿碱表达的细菌基因是嵌合表达盒的控制元件的便利来源。根据本发明，可使用农杆菌转化系统产生仅比成熟植物早采集的幼苗（例如，发芽幼苗，包括可食用发芽幼苗）。农杆菌转化方法易于用于再生表达药用蛋白的幼苗（例如，发芽幼苗）。

[0095] 一般来说，用农杆菌转化植物包括通过与载有植物 / 细菌载体的根癌农杆菌共培养来转化生长于组织培养基中的植物细胞。所述载体含有编码药用蛋白的基因。农杆菌将载体转移到植物宿主细胞中且随后使用抗生素治疗将其去除。对表达药用蛋白的经转化植物细胞进行选择，使其分化且最终再生成为完整幼株（海伦 (Hellens) 等人，植物分子生物学 (Plant Molecular Biology)(2000)42(819-832)；皮隆 - 史密兹 (Pilon-Smits) 等人，植物生理学 (Plant Physiolog.)(1999 年 1 月)119(1):123-132；巴菲尔德 (Barfield) 和普阿 (Pua) 植物细胞报告 (Plant Cell Reports)(1991)10(6/7):308-314)；瑞瓦 (Riva) 等人，生物技术杂志 (Journal of BiotechnologyI)(1998 年 12 月 15 日)1(3)，各自以引用的方式并入本文中）。

[0096] 用于本发明中的农杆菌表达载体包括编码药用蛋白的经设计以在植物中操作的基因（或表达盒）以及在所述表达盒上游和下游的伴随序列。伴随序列通常为质粒或病毒来源且对所述载体提供所需特征以将来自细菌的 DNA 转移到所需植物宿主中。

[0097] 基础细菌 / 植物载体构筑体优选提供较宽宿主范围的原核复制起点、原核可选标记。适当的原核可选标记包括对抗生素（诸如氨比西林 (ampicillin) 或四环素 (tetracycline)) 的抗性。所属领域众所周知的编码其它功能的其它 DNA 序列也可存在于载体中。

[0098] 农杆菌介导的 DNA 向植物染色体转移需要农杆菌 T-DNA 序列。在构筑农杆菌表达构筑体时，通常去除肿瘤诱导的 T-DNA 基因，且用编码药用蛋白或多肽的序列替换。由于 T-DNA 边界序列起始 T-DNA 区整合到植物基因组中，故将其予以保留。如果不易于检测药用

蛋白的表达，那么细菌 / 植物载体构筑体还将包括适于确定植物细胞是否已转化的可选标记基因，例如 nptII 卡那霉素 (kanamycin) 抗性基因。

[0099] Ti 序列可处于相同或不同细菌 / 植物载体 (Ti 质粒) 上。Ti 序列包括毒力基因，其编码一组引起 T-DNA 基因切除、转移和整合到植物基因组中的蛋白质 (斯谢尔 (Schell)，科学 (Science)(1987)237:1176-1183)。适于将异源序列整合到植物基因组中的其它序列还可包括转座子序列等以供同源重组。

[0100] 某些构筑体将包括编码所关注的蛋白质的表达盒。可将一个、两个或两个以上表达盒用于指定转化过程中。重组表达盒除编码药用蛋白的序列外还含有至少以下元件 : 启动子区、植物 5′ 不翻译序列、起始密码子 (视所表达的基因是否具有其自身的起始密码子而定) 以及转录和翻译终止序列。此外，本发明的表达盒或嵌合基因中可包括转录和翻译终止子。适当时，允许蛋白质加工和易位的信号分泌序列也可包括在表达盒中。

[0101] 多种启动子、信号序列以及转录和翻译终止子都例如描述于罗顿 (Lawton) 等人，植物分子生物学 (Plant Mol.Biol)(1987)9:315-324 或美国专利第 5,888,789 号中，其以引用的方式并入本文中。另外，通常将针对抗生素抗性的结构基因用作选择因子 (弗雷利 (Fraley) 等人，美国国家科学院院刊 (Proc.Natl.Acad.Sci.，USA)(1983)80:4803-4807)，其以引用的方式并入本文中。所述盒 5′ 和 3′ 端处独特的限制性酶位点使得易于插入预先存在的载体中。

[0102] 用于农杆菌介导的转化的载有至少一个 T-DNA 边界序列的其它二元载体系统描述于 PCT/EP99/07414 中，其以引用的方式并入本文中。有关农杆菌介导的转化的进一步论述可见于基尔文 S.B.(Gelvin，S.B.)，″ 农杆菌介导的植物转化 :“基因操纵”工具背后的生物学 (Agrobacterium-Mediated Plant Transformation:the Biology behind the″ Gene-Jockeying″ Tool)″，微生物学和分子生物学综述 (Microbiology and MolecularBiology Reviews),67(1) :16-37(2003)，(其以引用的方式并入本文中)，和其中的参考文献，所有所述文献都是以引用的方式并入本文中 ; 劳伦斯 A(Lorence A)、韦尔伯特 R.(Verpoorte R.)，植物中的基因转移和表达 (Gene transfer and expression in plants.)，分子生物学方法 (Methods Mol Biol.)，(2004)267:329-50，其以引用的方式并入本文中。

[0103] 在本发明某些实施例中，使用除农杆菌外的细菌将核酸序列引入植物中。例如参看布鲁斯厄特 W(Broothaerts W) 等人，通过不同细菌品种进行对植物的基因转移 (Genetransfer to plants by diverse species of bacteria)，自然 (Nature)(2005)，433(7026):629-633，其以引用的方式并入本文中。

[0104] 由已经农杆菌 (或其它细菌) 感染的植物制备种子，从而引入编码所关注的蛋白质或多肽的所需异源基因。采集所述种子，干燥，清洁并测试活力以及所需基因产物的存在和表达。一经确定，就将种子储备物存储于适当的温度、湿度、卫生和安全条件下待用。随后由经培养的原生质体再生整个植株，例如，如埃文斯 (Evans) 等人，植物细胞培养手册 (Handbook of Plant Cell Cultures)，第 1 卷 : 纽约麦克米伦出版公司 (MacMillanPublishing Co.New York)，1983 ; 和瓦西里 I.R.(Vasil I.R.)(编)，植物细胞培养和体细胞遗传学 (Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants)，奥兰多，学术出版社 (Acad.Press,Orlando)，第 I 卷，1984，和第 III 卷，1986，其以引用的方式并入本

文中。

[0105] 在某些实施例中，植株未再生成成株。举例来说，在一些实施例中，植株仅再生到发芽幼苗阶段。在其它实施例中，再生整株植物从而产生种子储备物且由所述种子储备物的种子产生根据本发明使用的幼苗（例如，发芽幼苗）。

[0106] 根据本发明可通过农杆菌转化可分离出原生质体并培养得到整株再生植物的所有植物，从而回收含有编码所关注的蛋白质或多肽的转移基因的整株植物。已知实际上所有植物都可由经培养细胞或组织（包括（但不限于）产生可食用幼芽的所有主要物种）再生。一些适当的植物包括苜蓿、绿豆、萝卜、小麦、芥菜、菠菜、胡萝卜、甜菜、洋葱、大蒜、芹菜、大黄、多叶植物（诸如卷心菜或莴苣、水田芥或水芹）、药草（诸如欧芹、薄荷或三叶草）、花椰菜、西兰花、大豆、小扁豆、可食用花（诸如向日葵等）。

[0107] 由经转化细胞再生植物的方式可随植物物种的不同而不同。然而，所属领域技术人员将认识到，通常首先提供含有异源基因拷贝的经转化原生质体的悬浮液。形成愈伤组织且可由愈伤组织诱导长出新芽且随后生根。或者，可由原生质体悬浮液诱导胚芽形成。使这些胚芽与天然胚芽一样发芽以形成植物。将种子浸泡于水中或用水喷洒种子以使种子的水分含量增加到 35-45％之间，从而起始发芽。为使发芽进行下去，通常在控制温度和气流条件下在水分达到饱和的空气中保存种子。培养基通常将含有各种氨基酸和激素（诸如生长素和细胞分裂素）。将谷氨酸和脯胺酸添加到所述培养基中也是有益的，尤其对于诸如苜蓿等物种更是如此。长出新芽和生根通常同时发生。有效再生将视培养基、基因型和培养历程而定。如果控制这三个变量，那么再生完全可再现和重复。

[0108] 由经转化植物细胞生长的成熟植物是自花授精且鉴别出不分离的纯合转基因植物。所述自交植物产生含有编码所关注的蛋白质或多肽的转移基因的种子。这些种子可发芽并生长到幼苗（例如，发芽幼苗）阶段以产生所关注的蛋白质或多肽。

[0109] 在相关实施例中，转基因种子（载有通常整合到基因组中的编码所关注的蛋白质或多肽的转移基因）可形成为种子产品并且伴随有关如何使幼苗生长到适当阶段（例如，生长到发芽幼苗阶段）以如本文所述进行采集和 / 或投药或调配的说明书一起销售。在其它相关实施例中，包含所需特性（即，编码所关注的蛋白质或多肽的转移基因）的杂交或新颖品种是由自交转基因植物发育而来。

[0110] 直接整合

[0111] 根据本发明，通过基因枪法或电穿孔法将 DNA 片段直接整合到植物细胞基因组中也可用于将编码所关注的蛋白质或多肽的表达构筑体引入植物组织中（例如参看，凯科特 J.R.(Kikkert, J.R.)、休米斯顿 (Humiston) 等人，活体内细胞与发育生物学 (In VitroCellular & Developmental Biology.) 植物 :组织培养协会杂志 (Plant : Journal of the TissueCulture Association.)(1999 年 1 月 /2 月)35(1):43-50 ; 倍特 G.W.(Bates, G.W.)，佛罗里达州塔拉哈西，佛罗里达州立大学 (Florida State University, Tallahassee, FL.)，分子生物技术 (Molecular Biotechnology)(1994 年 10 月)2(2):135-145)。更具体来说，可以将含有编码所关注的蛋白质或多肽的基因的载体通过各种技术引入植物细胞中。如上文所述，载体可包括可用于植物细胞中的可选标记。所述载体还可包括允许其在次级宿主中选择和繁殖的序列，诸如含有复制起点和可选标记的序列。通常次级宿主包括细菌和酵母。在一个优选实施例中，次级宿主为大肠杆菌，复制起

点为 colE1 型复制起点，且可选标记为编码氨比西林抗性的基因。所述序列已为所属领域众所周知且在市面有售（例如，美国加州帕罗奥多的科隆泰克公司 (Clontech，Palo Alto，CA) 或美国加州拉荷亚市的斯坦特基因公司 (Stratagene，La Jolla，CA))。

[0112] 还可将本发明的载体修饰成中间植物转化质粒，其含有与根癌农杆菌载体同源的区域、来自根癌农杆菌的 T-DNA 边界区和上文所述的嵌合基因或表达盒。其它载体可包括不导致植物肿瘤的根癌农杆菌诱导质粒。

[0113] 根据本发明的实施例，本发明载体的直接转化包括通过使用微量吸管机械地转移重组 DNA 来将所述载体直接微注射到植物细胞中（例如参看，克洛斯威 (Crossway)，分子遗传学与普通遗传学 (Mol.Gen.Genet.)，202:179-185，1985，其以引用的方式本文中）。还可使用聚乙二醇将遗传材料转移到植物细胞中（例如参看，克伦斯 (Krens) 等人，自然 (1982)296:72-74)。引入核酸区段的另一方法为利用在小珠粒或颗粒基质内或表面上具有核酸的小颗粒进行的高速弹道穿透（例如参看克莱恩 (Klein) 等人，自然 (1987)327:70-73；克诺德森和穆勒 (Knudsen and Muller) 植物学 (Planta) (1991)185:330-336))。另一种引入方法为将原生质体与其它微细胞、细胞、溶酶体或其它可融合脂质表面体的其它实体融合（例如参看弗雷利等人，美国国家科学院院刊 (1982)79:1859-1863)。还可将本发明的载体通过电穿孔引入植物细胞中（例如参看弗洛姆 (Fromm) 等人美国国家科学院院刊 (1985)82:5824)。根据此项技术，在含有基因构筑体的质粒存在的情况下电穿孔植物原生质体。高场强度的电脉冲可逆地渗透生物膜，从而允许引入质粒。经电穿孔的植物原生质体重新形成细胞壁，分裂并形成植物愈伤组织，其可再生形成本发明的发芽幼苗。所属领域技术人员将了解如何利用这些方法转化可用于产生可食用发芽幼苗的植物细胞。

[0114] 病毒转化

[0115] 根据本发明，使用植物病毒载体来感染种子、胚芽、发芽幼苗并于其中产生外来蛋白。就这一点来看，感染包括将病毒基因组或其部分引入细胞中的任何方法，包括（但不限于）天然病毒感染方法、磨损、接种等。所述术语包括将基因组 RNA 转录物或其 cDNA 拷贝引入细胞中。病毒基因组无需为完整基因组，但通常将含有足以允许复制的序列。所述基因组可编码病毒复制酶且可含有复制所需的任何顺式作用核酸元件。编码短肽以及较大复合蛋白质的外来基因的高水平表达（例如通过烟草花叶病毒属载体）例如描述于麦克马考 (McCormick) 等人，美国国家科学院院刊 (1999)96:703-708；熊谷 (Kumagai) 等人，基因 (Gene)(2000)245:169-174；和韦尔奇 (Verch) 等人，免疫方法杂志 (J.Immunol.Methods) (1998)220，69-75，所述文献各自以引用的方式并入本文中）。因此植物病毒载体经证实具有表达短肽以及较大复合蛋白质的能力。

[0116] 在某些实施例中，利用宿主 / 病毒系统产生表达药用蛋白质（诸如胰岛素、GAD 和与 1 型糖尿病相关的 IA-2) 的幼苗（例如，幼芽）。由病毒感染产生的幼苗提供已经证实为安全的所关注的蛋白质或多肽来源。举例来说，幼芽不受动物病原体污染。举例来说，与烟草不同，来自可食用幼芽的蛋白质至少在理论上可在不纯化的情况下经口应用，由此显著降低成本。

[0117] 此外，由于将相关基因（编码所关注的蛋白质或多肽）引入可在数天内生长到工业规模的病毒中，故病毒 / 幼苗（例如幼芽）系统还提供用于按比例扩大且制造的较为简

易、廉价的途径。相比之下，转基因植物在足够的种子或植物材料可用于大规模试验或商业化之前需要长达 5-7 年。

[0118] 根据本发明，植物 RNA 病毒具有某些优势，这使得其成为最引人注目的用于表达外来蛋白的载体。已确定多种植物 RNA 病毒的分子生物学和病理学，且存在相当多病毒生物学、遗传学和调控序列的知识。大部分植物 RNA 病毒具有较小基因组且感染性 cDNA 克隆可用于便利遗传操作。感染性病毒材料进入易感宿主细胞后，其即复制达到高水平且迅速在整个植株内（接种后 1 到 10 天）扩散。易于经济地从受感染组织回收病毒粒子。病毒具有较宽的宿主范围，使得能够使用单一构筑体来感染数种易感物种。这些特征易于转移到幼芽。

[0119] 图 1 描述使用植物病毒表达外来基因的若干种不同策略。可通过用所需序列置换一种病毒基因、将外来序列插入病毒基因组的适当位置处或通过将外来肽融合到病毒的结构蛋白中来表达外来序列。此外，可组合这些方法中的任一种通过病毒重要功能的反式互补来表达外来序列。存在多种不同的策略作为使用烟草花叶病毒 (TMV)、苜蓿花叶病毒 (AlMV) 和其嵌合体在受病毒感染的植物中表达外来序列的工具。

[0120] AlMV 基因组为雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae) 病毒家族的代表且由三个基因组 RNA(RNA1-3) 和亚基因组 RNA(RNA4) 组成（图 2）。基因组 RNA1 和 2 分别编码病毒复制酶蛋白 P1 和 2。基因组 RNA3 编码细胞到细胞运动蛋白 P3 和外壳蛋白 (CP)。CP 是由基因组 RNA3 合成的亚基因组 RNA4 翻译，且为开始感染所需。研究证实 CP 涉及多种功能，包括基因组活化、复制、RNA 稳定性、症状形成和 RNA 包壳（例如参看，波尔 (Bol) 等人，病毒学 (Virology)(1971)46:73-85；范德沃森 (Van Der Vossen) 等人，病毒学 (1994)202:891-903；优斯波夫 (Yusibov) 等人，病毒学 208:405-407；优斯波夫等人，病毒学 (1998)242:1-5；波尔等人，（综述 (Review)，100 参考文献 (100refs.)). 普通病毒学杂志 (J.Gen.Virol.)(1999)80:1089-1102；德格拉夫 (De Graaff)，病毒学 (1995)208:583-589；雅士伯 (Jaspars) 等人，病毒研究进展 (Adv.Virus Res)(1974).19，37-149；罗斯奇 - 弗莱斯 (Loesch-Fries)，病毒学 (1985)146:177-187；尼尔曼 (Neeleman) 等人，病毒学 (1991)181:687-693；尼尔曼等人，病毒学 (1993)196:883-887；范德库衣 (Van Der Kuyl) 等人，病毒学 (1991)183:731-738；范德库衣等人，病毒学 (1991)185:496-499)。

[0121] 病毒粒子的包壳对于病毒从种子、胚芽或幼苗（例如，发芽幼苗）的接种部分到未接种部分的长距离运动和系统性感染至关重要。根据本发明，接种可在植物发育的任何阶段发生。在胚芽和幼芽中，接种病毒的扩散应极快。将 AlMV 病毒粒子用独特 CP(24kD) 包壳，从而形成一类以上粒子。所述粒子的尺寸 (30 到 60nm 长和 18nm 直径）和形状（球形、椭圆体或杆状）视包壳 RNA 的尺寸而定。认为组装时 AlMV CP 的 N 末端位于病毒粒子的表面上且似乎不会干扰病毒组装（波尔等人，病毒学 (1971)6:73-85)。此外，在 N 末端具有额外 38 个氨基酸的肽的 AlMV CP 在活体外形成粒子且保持生物活性（优斯波夫等人，普通病毒学杂志 (1995)77:567-573)。

[0122] AlMV 具有较宽的宿主范围，其包括多种农业上有价值的作物，包括植物种子、胚芽和幼芽。总的来说，这些特征使得 AlMV CP 成为优良的载体分子候选物，且使得 AlMV 成为在处于发育的幼芽阶段的植物中表达外来序列的最引人注目的候选载体。此外，当由异源载体（诸如 TMV) 表达时，AlMV CP 在不干扰病毒感染性的情况下将 TMV 基因组包壳（优斯

波夫等人，美国国家科学院院刊(1997)94:5784-5788，其以引用的方式并入本文中)。这允许使用 TMV 作为与外来序列融合的 AlMV CP 的载体病毒。

[0123] TMV(烟草花叶病毒的原型)具有由经 17.0kD CP 包壳的单一正义 NRA 组成的基因组，所述 17.0kD CP 产生杆状颗粒(300nm 长)(图 2)。CP 为 TMV 唯一的结构蛋白且为病毒包壳和病毒在受感染宿主中长距离运动所需(塞托(Saito)等人，病毒学(1990)176:329-336)。183 和 126kD 蛋白是由基因组 RNA 翻译得到且为病毒复制所需(石川(Ishikawa)等人，核酸研究(Nucleic Acids Res.)(1986)14:8291-8308)。30kD 蛋白为病毒的细胞到细胞运动蛋白(梅西(Meshi)等人，欧洲分子生物学杂志(EMBOJ.)(1987)6:2557-2563)。运动蛋白和外壳蛋白是由亚基因组 mRNA 翻译得到(亨特(Hunter)等人，自然(1976)260:759-760；布恩林(Bruening)等人，病毒学(1976)71:498-517；毕奇(Beachy)等人，病毒学(1976)73:498-50，各自以引用的方式并入本文中)。

[0124] AlMV 和 TMV 基因组的示意性描述绘示于图 2 中。AlMV 的 RNA1 和 2 分别编码复制酶蛋白 P1 和 P2；基因组 RNA3 编码细胞到细胞运动蛋白 P3 和病毒外壳蛋白(CP)。CP 是由基因组 RNA3 合成的亚基因组 RNA4 翻译得到。TMV 的 126kD 和 183kD 蛋白为复制所需；30kD 蛋白为病毒细胞到细胞运动蛋白，且 17kD 蛋白为病毒的 CP。CP 和 30kD 蛋白是由亚基因组 RNA 翻译得到。箭头指示亚基因组启动子的位置。

[0125] 花转化

[0126] 可用于将编码所关注的蛋白质或多肽的基因引入植物细胞中的其它方法包括转化植物的花。可通过将植物的花浸入根癌农杆菌溶液中来实现拟南芥转化(柯蒂斯(Curtis)和纳姆(Nam)，转基因研究(Transgenic Research)(2001 年 8 月)104:363-371；秦(Qing)等人，分子育种：植物改良的新策略(Molecular Breeding:New Strategies in PlantImprovement)(2000 年 2 月).(1):67-72)。在由“浸泡”植物产生的种子群中形成经转化植物。在花发育的特定时间时，子房壁中存在小孔，根癌农杆菌通过所述小孔得以进入子房内部。在进入子房内后，根癌农杆菌繁殖并转化个别胚珠(迪斯优克斯(Desfeux)等人，植物生理学(Plant Physiology)(2000 年 7 月)123(3):895-904)。经转化胚珠在子房内遵循种子形成的典型路径。

[0127] 农杆菌介导的瞬时表达

[0128] 如本文所述，在本发明许多实施例中，需要在植物中迅速(例如瞬时)表达蛋白质或多肽的系统。其中本发明提供一种实现所述在植物(尤其在幼苗，例如发芽幼苗)中快速表达的有效系统，其利用农杆菌构筑体来传递编码所关注的蛋白质或多肽的病毒表达系统。

[0129] 具体来说，根据本发明，制备“发射载体”，其含有包括复制序列的农杆菌序列且还含有载有编码所关注的蛋白质或多肽的基因的植物病毒序列(包括自我复制序列)。优选通过允许实质上系统性传递的农杆菌渗透法将发射载体引入植物组织中。对于瞬时转化来说，发射载体的未整合 T-DNA 拷贝暂时保持存在于核中并且转录，引起载运基因的表达(卡佩拉(Kapila)等人，1997)。与病毒载体不同，农杆菌介导的瞬时表达无法使所关注的基因的表达系统性扩散。此系统的一个优势在于可克隆长于 2kb 的基因以产生无法利用病毒载体获得的构筑体(韦因尼特(Voinnet)等人，2003)。此外，使用所述技术，可利用一种以上转基因来转化植物，致使能够表达并组装多聚体蛋白(例如，复合蛋白质的抗体亚基)。另

外，通过与不同农杆菌共渗透而进行多种转基因共表达的可能性可由单独渗透或使用混合培养基来得到很好利用。

[0130] 在某些实施例中，发射载体包括允许在农杆菌中进行选择（或至少检测）和在渗透组织中进行选择 / 检测的序列。此外，发射载体通常包括在植物中转录得到病毒 RNA 产生随后产生病毒蛋白的序列。另外，病毒蛋白和病毒 RNA 的产生引起编码所关注的医药学活性蛋白质的多个 RNA 拷贝的快速产生。所述产生引起在相对较短的时间内快速产生所关注的靶蛋白质。因此可产生用于产生蛋白质的高效系统。

[0131] 利用病毒表达载体的农杆菌渗透技术可用于产生有限量的所关注的蛋白质，以便在确定其是否值得产生转基因植物之前检验表达水平。另外或其它，利用病毒表达载体的农杆菌渗透技术适用于快速产生能够作为主要生产平台产生大量蛋白质的植物。因此，此瞬时表达系统可在工业规模上使用。

[0132] 另外提供可在本发明这些和其它方面使用的多种不同农杆菌质粒、二元质粒或其衍生物中的任一种，诸如 pBIV、pBI1221、pGreen 等。大量适当的载体已为所属领域中已知，且可根据所属领域中已知的方法或本文所述的方法加以引导和 / 或修饰，以便能够用于本文所提供的所述方法中。

[0133] 图 18 表示特定例示性发射载体 pBID4 的示意图。此载体含有花椰菜花叶病毒 (DNA 植物病毒）的 35S 启动子，其驱使重组病毒基因组在引入植物中后起始转录；和 nos 终止子，即农杆菌胭脂碱合成酶的转录终止子。所述载体另外含有包括用于病毒复制 (126/183K) 和细胞到细胞运动 (MP) 的基因的烟草花叶病毒基因组序列。所述载体另外含有插入烟草花叶病毒基因组序列内独特克隆位点处且处于外壳蛋白亚基因组 mRNA 启动子的转录控制下的编码所关注的多肽的基因。由于此“靶基因”（即，编码所关注的蛋白质或多肽的基因）替换 TMV 外壳蛋白的编码序列，故所得病毒载体为比含 CP 载体不易经历重组且无法在所述环境中有效扩散和存活的自我复制裸 RNA。左和右边界序列 (LB 和 RB) 划定在利用载有载体的重组农杆菌渗透植物后转移到植物细胞中的发射载体区的界限。在将载有此载体的农杆菌引入植物组织中（通常通过农杆菌渗透法进行，但另外可通过注射或其它方式进行）后，即在 LB 与 RB 之间产生多个单链 DNA(ssDNA) 序列拷贝并于数分钟内释放。随后通过病毒复制来扩增这些已引入的序列。靶基因的翻译导致在较短时间内积累大量的靶蛋白或多肽。

[0134] 在本发明一些实施例中，农杆菌介导的瞬时表达产生每公斤植物组织多达约 5g 或更多靶蛋白。举例来说，在一些实施例中，产生每公斤植物组织多达约 4、3、2、1 或 0.5g 靶蛋白。在一些实施例中，产生每公斤植物组织至少约 20-500mg，或约 50-500mg 靶蛋白，或约 50-200、或约 50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190，或约 200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1500、1750、2000、2500、3000mg 或更多靶蛋白。

[0135] 在本发明一些实施例中，这些表达水平是在从渗透起约 6、5、4、3 或 2 周内达到。在一些实施例中，这些表达水平是在从引入表达构筑体起约 10、7、5、4、3、2 天或甚至 1 天内达到。因此，从引入（例如渗透）到采集的时间通常小于约 2 周、10 天、1 周或更少。此外，本发明此实施例的一个极引人注目的方面为，其允许在从选择氨基酸序列起约 8 周或更短时间内（甚至包括“预备”表达研究的时间）产生蛋白质。另外，每一批蛋白通常都可在约 8

周、6 周、5 周或更短时间内产生。所属领域技术人员将认识到，这些数量可视所使用的植物类型而略有变化。大部分幼芽（包括豌豆）将在指定数量的范围内。然而，本塞姆氏烟草因生长较慢（来自小得多的种子），而可能生长较长时间（尤其在渗透之前）。所属领域技术人员根据所利用的特定植物的生物学将了解其它预期的调节。

[0136] 本发明的发明者已使用发射载体系统以在多种不同的幼苗中产生多种靶蛋白和多肽。本发明的发明者已意外地发现，例如包括绿豌豆、比尔跳豆、黄夹豆、斑点豌豆和青豆在内的某些豌豆品种尤其适用于实践本发明的这个方面（例如参看实例 7）。

[0137] 本发明的发明者还意外地发现，各种烟草属植物尤其适用于实践本发明的这一方面，尤其包括本塞姆氏烟草。所属领域技术人员将了解，烟草属植物通常不被视为“幼芽”。尽管如此，本发明还教示，烟草属幼苗（尤其本塞姆氏烟草幼苗）适用于实践本发明。一般来说，在实践本发明的这一实施例时，本塞姆氏烟草植株将在渗透（例如传递含有发射载体的农杆菌）之前生长一段足以允许适量生物质发育的时间。通常，所述植物在渗透之前生长大于约 3 周、更通常大于约 4 周或介于约 5-6 周的时间以积累生物质。

[0138] 本发明的发明者还意外地发现，尽管证实 TMV 与 AlMV 序列可在所述发射载体构筑体内有效，但在一些实施例中，AlMV 序列对于确保高水平产生经传递蛋白质或多肽特别有效。

[0139] 因此，在本发明某些特定实施例中，在豌豆幼苗或烟草属幼苗（例如，本塞姆氏烟草）中由引导产生载有所关注的基因的 AlMV 序列的发射载体产生所关注的蛋白质或多肽。

[0140] 表达构筑体

[0141] 适用于本发明中的表达构筑体的许多特征将特别针对对如上文所论述的特定表达系统。然而，可适用于不同表达系统的某些方面将于此处更详细地描述。

[0142] 举一例来说，在本发明许多实施例中，将需要所关注的蛋白质或多肽（或核酸）的表达可诱导。在许多所述实施例中，编码所关注的蛋白质或多肽的 RNA 的产生（和 / 或反义 RNA 的产生）处于可诱导（例如外源诱导型）启动子的控制下。外源诱导型启动子可响应外部而非内部刺激物来增加或减少转录物的表达。多种环境因素可充当所述外部刺激物。在本发明某些实施例中，转录受热诱导型启动子（诸如，热休克启动子）控制。

[0143] 外部诱导型启动子可特别适用于受控、可调控生长环境的情形。举例来说，使用热休克启动子，可简单地升高封闭环境的温度以诱导相关转录物的表达。当然，应了解，由于户外温度无法控制，故在户外从未使用热诱导型启动子。当户外温度上升到某一程度时，启动子将启始。类似地，当户外温度降低时，启动子将关闭。所述温度转变可在一天内发生，例如在白天使表达启始且在夜间关闭。热诱导型启动子（诸如本文所述的启动子）甚至将不可能在温室中使用，其易受气候转型的影响程度与户外情况大致相同。基因工程改造的植物在温室中的生长相当昂贵。相比之下，在本发明的系统中，可以控制每一变量，从而可在每次采集时实现最大量的表达。

[0144] 根据本发明利用的其它外部诱导型启动子包括光诱导型启动子。如果在封闭的可调控环境中灯始终打开，那么可保持光诱导型启动子作为组成性启动子。或者，可在发育期间的特定时间时通过简单地开灯来启始相关转录物的表达。

[0145] 在其它实施例中，使用化学诱导型启动子来诱导相关转录物的表达。根据这些实施例，可将化学品简单地喷雾或喷洒于种子、胚芽或幼苗（例如幼苗）上以诱导相关转录物

的表达。可视需要精确控制喷雾和喷洒且将其引导至特定种子、胚芽或幼苗（例如幼苗）上。封闭环境缺少将使化学品远离预期接受者分散的风或气流，因此化学品停留在预期的接受者上。

[0146] 生长环境

[0147] 本发明一方面为在受控、经调控生长条件下于植物中产生蛋白质或多肽（和/或核酸）。根据本发明，与在幼苗（例如，发芽幼苗）中产生蛋白质或多肽相关的一个引人注目的特征在于，需要比当相同植物类型在成年期生长将利用的时间短的生长时间。此外，在许多情况下，可利用比当植物生长到其完全成年的尺寸将需要的空间小的空间。一般来说，在受控、可调控环境中表达药用蛋白质或多肽的生长植物可以比生长基因工程改造的植物用更少的努力、风险和调控事项较快地（由于可在较年轻时采集植物）提供药用产物。本发明中所使用的封闭式可调控环境减少或排除自然界异花授粉植物的风险。

[0148] 在本发明许多实施例中，蛋白质或多肽是在封闭系统中生长的植物中表达。所述系统避免环境污染的风险且还提供能够实现重复可比较的结果的可调控、可再现环境。此外，所述系统允许需要时例如通过使用如本文所述的可诱导启动子或其它可调控特征实现蛋白质或多肽表达受控诱导。

[0149] 在本发明某些实施例中，植物是在封闭式可调控的环境中生长。在一些实施例中，封闭式可调控的环境为可使种子在室内生长的房屋单元或房间。可控制封闭式可调控环境的所有环境因素。由于幼芽的生长无需光，且照明极为昂贵，故在一个特定实施例中，使植物在不存在光的情况下于室内生长（例如，生长到发芽幼苗阶段）。

[0150] 可在本发明的封闭式可调控环境中调控的其它环境因素包括温度、湿度、水、养分、气体（例如，O_2 或 CO_2 含量或空气循环）、化学品（小分子，诸如糖和糖衍生物，或激素，诸如植物激素赤霉酸或脱落酸等）等。

[0151] 在本发明许多实施例中，植物是在水栽培下生长。水栽培生长系统提供多种优势。举例来说，水栽培生长系统通常需要比基于土壤的系统更小的空间来生长相同数量的植物。养分和其它试剂通常可流过水栽培系统，使得控制生长比基于土壤的系统更容易实现。可使水栽培生长的许多方面自动化。此外，水栽培生长植物的采集极为平常。可简单地通过将植物从其生长溶液中升高来予以采集。采集时无需净化。能够在不进行洗涤或擦洗的情况下直接从水栽培环境采集幼苗（例如，发芽幼苗）使所采集的材料的破坏减到最少。植物的破坏和枯萎会诱导凋亡。在凋亡期间，某些蛋白水解酶变得具有活性，其可降解发芽幼苗中所表达的药用蛋白质或多肽，导致蛋白质治疗活性的降低。凋亡诱导的蛋白水解能显著降低成熟植物中蛋白质的产率。使用本发明的方法，例如由于在从植物提取蛋白质之前不进行采集，故优选从不会诱导凋亡（即，避免凋亡）。

[0152] 在本发明某些实施例中，植物（例如发芽幼苗）是可在发育期间任何时间时浇水、喷洒或喷雾的托盘中生长。举例来说，所述托盘可配有一个或一个以上浇水、喷洒、喷雾和排水设备，其可在发芽幼苗发育期间特定时间和达到确切量时传递和/或去除水、养分、化学品等。举例来说，种子需要足够的水分来使其保持潮湿。过量的水分通过托盘中的孔洞排到房间地板中的排水沟中。优选在适当时处理排水以在其再排到环境中之前去除有害的化学品。

[0153] 托盘的另一优势在于其可封闭在极小的空间内。由于幼苗（例如发芽幼苗）生长

通常不需要光，故含有种子、胚芽或幼苗（例如发芽幼苗）的托盘可垂直紧密堆叠于另一托盘的顶部，从而在特别针对这些目的而构建的房屋设施中每单位地板面积提供大量生物质。此外，可在房屋单元内沿水平行排列托盘的堆叠。当幼苗已生长到适于采集的阶段（例如，约 2 天或 14 天或视植物的类型、所产生的蛋白质或多肽等而定为较长时间）后，即将个别托盘通过人工或自动构件（诸如传送带）移到加工设施中。

[0154] 所属领域技术人员易于了解适用于实践本发明的生长条件和技术的多个方面。举例来说，当利用可诱导表达系统时，需要选择诱导表达的时间以使采集时幼苗中所关注的蛋白质或多肽的表达最大化。在特定生长阶段（例如在发芽后特定天数时）时胚芽中的诱导表达可导致采集时所关注的蛋白质或多肽的产生最大化。举例来说，发芽后 4 天时由启动子诱导表达可导致合成比 3 天后或 5 天后由启动子诱导表达多的蛋白质。所属领域技术人员将理解可通过常规实验来实现表达的最大化。在优选实施例中，在发芽后约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 天时采集幼苗，尤其发芽幼苗。在其它实施例中，使幼苗、尤其烟草属幼苗在发芽后生长数周。

[0155] 当利用组成性而非可诱导表达系统时，可在引入编码序列后某一时间时采集幼苗。举例来说，如果在发育早期（例如在胚芽阶段）通过病毒转化发芽幼苗，那么可在表达在转化后达到其最大量时（例如转化后约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 天时）采集发芽幼苗。依赖于种子的发芽，也可以为幼苗在转化后发育 1、2、3 个月或更长时间的幼苗（例如幼芽）。

[0156] 一般来说，当开始药用蛋白质的表达后，使种子、胚芽或幼苗（例如发芽幼苗）生长直到表达足够量的所关注的药用蛋白质或多肽。在某些实施例中，足够量为当以原样食用所采集的生物质时将对患者提供治疗益处的量。或者，足够量为可由生物质浓缩或纯化所述药用蛋白质或多肽且将其调配成在投药后对个体提供治疗益处的医药组合物的量。

[0157] 在某些实施例中，在诱导药用蛋白质表达后，使生长持续直到达到采集发芽幼苗的发芽幼苗阶段。在特别优选的实施例中，采集活发芽幼苗。采集活发芽幼苗具有若干益处，包括最少努力和破坏。

[0158] 其中，本发明提供一种独特系统，其又提供含有大量所表达的所关注的蛋白质或多肽（和 / 或核酸）的幼苗生物质。不管直接消费还是加工成医药组合物的形式，当幼苗（例如发芽幼苗）在封闭式可调控的环境中生长时，可以较低成本向消费者提供植物生物质和 / 或生物质来源的医药组合物。此外，能够控制幼苗生长的条件的事实使得产物质量和纯度恒定。本发明的封闭式可调控环境还可回避阻止科学家在户外生长基因工程改造的农业产品的 EPA 的许多安全规章。

[0159] 蛋白质 / 多肽制备

[0160] 本发明提供在幼苗中产生的各种蛋白质或多肽（和 / 或活性核酸）制剂和调配物。

[0161] 在本发明许多实施例中，所产生的蛋白质或多肽不是从植物组织中分离，而是在活幼苗（例如发芽幼苗）的情形下提供。在一些实施例中，当植物可食用时，直接提供含有经表达的蛋白质或多肽的植物组织以供消费。因此，本发明提供含有经表达蛋白质或多肽的可食用幼苗生物质（例如，可食用发芽幼苗）。

[0162] 当可食用幼苗（例如发芽幼苗）表达足够量的药用蛋白质或多肽且新鲜消费时，

在一些实施例中，在消费发芽幼苗之前绝对不会出现采集。以此方式，确保在对需要治疗的患者投与药用蛋白质之前，不存在采集诱导的药用蛋白质的蛋白水解降解。举例来说，可将准备消费的幼苗（例如，发芽幼苗）直接传递到患者。或者，将基因工程改造的种子或胚芽传递给需要治疗的患者并使其通过患者生长到发芽幼苗阶段。在一个优选实施例中，对患者或将治疗患者的医生提供基因工程改造的发芽幼苗的供给，因此可培养表达某些所需药用蛋白质的发芽幼苗的连续储备物。这对于无力负担或传递昂贵药品的发展中国家人口来说特别有意义。生长本发明的发芽幼苗的便利性使得本发明的发芽幼苗特别合乎所述发展中国家人口需要。

[0163] 在一些实施例中，在消费或调配植物生物质之前，例如通过匀质化、粉碎、干燥或提取来进行处理。在一些实施例中，从所述生物质中分离或纯化出经表达蛋白质或多肽并将其调配成医药组合物。

[0164] 举例来说，可将活幼苗（例如幼芽）研磨、粉碎或掺合于含有蛋白酶抑制剂的缓冲液中以产生生物质浆液。优选缓冲液为约 4℃。在某些实施例中，将生物质空气干燥、喷雾干躁、冷冻或冷冻干燥。与成熟植物中相同，一些所述方法（诸如空气干燥）会导致药用蛋白质或多肽活性的丧失。然而，由于所利用的植物（例如发芽幼苗）极小且通常具有较大表面积与体积比率，故这种情形不太可能发生。所属领域技术人员将了解，可使用许多使药用蛋白质或多肽的蛋白水解减到最少的采集生物质的技术并将其应用于本发明中。

[0165] 投药和医药组合物

[0166] 本发明提供表达医药学活性蛋白质或多肽的幼苗，所述蛋白质或多肽在投与有需要的宿主时仍保持其医药活性。优选宿主包括脊椎动物，优选哺乳动物，更优选人类。根据本发明，宿主包括兽类个体，诸如牛、绵羊、犬科、猫科等。在优选实施例中，将可食用幼芽以治疗有效量经口投与个体。在其它优选实施例中，提供如本文所述的医药制剂形式的医药学活性蛋白质。

[0167] 可以多种方式将本发明的医药制剂投与宿主，诸如经口、经肠、经鼻、不经肠、肌肉内或静脉内、经直肠、经阴道、局部、经眼、经肺部或通过接触施用投与。在优选实施例中，将在幼苗（例如幼芽）中表达的药用蛋白质经口投与宿主。在另一优选实施例中，提取和 / 或纯化在幼苗（例如幼芽）中表达的医药学活性蛋白质并将其用于医药组合物的制备中。根据常规条件和所属领域中已知的技术分离和纯化蛋白质。所述技术包括诸如提取、沉淀、色谱法、亲和色谱法、电泳等方法。

[0168] 本发明的组合物通常包括有效量的医药学活性蛋白质或多肽与一种或一种以上有机或无机、液体或固体医药学适当的载剂材料。

[0169] 根据本发明产生的医药学活性蛋白质可以诸如以下剂型使用 ：片剂、胶囊、锭剂、分散液、悬浮液、溶液、胶囊、乳膏、油膏、气雾剂、粉末包装、液体溶液、溶剂、稀释剂、表面活性剂、等张剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂，只要所述蛋白质的生物活性不受所述剂型破坏即可。

[0170] 可用作医药学上可接受的载剂的物质的一些实例包括（但不限于）糖，诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖 ；淀粉，诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉 ；纤维素和其衍生物，诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素 ；粉末状黄芪胶 ；麦芽 ；明胶 ；滑石 ；赋形剂，诸如可可脂和栓剂蜡 ；油，诸如花生油、棉籽油、红花油、蓖麻油、橄榄油、玉米油和大豆油 ；二醇，诸如丙二

醇；酯，诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，诸如氢氧化镁和氢氧化铝、藻酸、无热原质水、等渗盐水、林格氏溶液 (Ringer′ s solution)、乙醇和磷酸盐缓冲溶液；以及其它无毒可相容润滑剂，诸如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁；且根据配方设计师的判断，所述组合物中还可存在着色剂、释放剂、涂布剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂（还参看雷氏药学大全 (Remington′ s PharmaceuticalSciences)，第 15 版，E.W. 马丁 (martin)（美国宾夕法尼亚州伊斯顿市麦克出版社公司 (Mack Publishing Co.,Easton PA)，1975)。举例来说，可借助常规混合、制粒、糖衣丸制造、溶解、冻干或类似方法提供医药组合物形式的蛋白质。

[0171] 在某些实施例中，需要通过减缓经皮下或肌肉内注射的药用蛋白质或多肽的吸收来延长医药制剂的作用。这可以通过使用具有弱水溶性的结晶或非晶形物质的液体悬浮液来实现。蛋白质或多肽的吸收速率则视其溶解速率而定，而其溶解速率又可视尺寸和形式而定。

[0172] 或者，通过将蛋白质溶解或悬浮于油媒剂中来实现不经肠投与的蛋白质的延缓吸收。通过以生物可降解聚合物（诸如聚丙交酯－聚乙交酯）形成蛋白质的微胶囊基质来制得可注射储槽形式。视蛋白质比聚合物的比率和所使用的特定聚合物的性质而定，可控制释放速率。其它生物可降解聚合物的实例包括聚（原酸酯）和聚（酸酐）。储槽式可注射调配物也可通过将蛋白质封装于与身体组织可相容的脂质体或微乳液中来制备。

[0173] 经肠投与的蛋白质或多肽制剂可以固体、半固体、悬浮液或乳液形式引入并且可与诸如水、悬浮剂和乳化剂等任何医药学上可接受的载剂混合。还可借助泵或持续释放形式投与本发明的蛋白质或多肽，尤其当投药作为预防措施时更是如此，以便防止个体疾病的发展或者改善或延缓已患疾病。

[0174] 根据本发明产生的蛋白质或多肽尤其适于以医药组合物形式经口投与。可投与所采集的活幼苗（例如幼苗）或可视所需蛋白质或多肽产物的特性和所需终产物的形式而以多种方式进行加工，例如空气干燥、冷冻干燥、提取等。

[0175] 在某些实施例中，单独经口摄取如上文所述的组合物或将其与食物或饲料或饮料一起摄取。经口投与的组合物包括发芽幼苗；幼苗（例如发芽幼苗）的提取物，和从幼苗纯化的以干粉、食品、水性或非水性溶剂、悬浮液或乳液形式提供的蛋白质或多肽。

[0176] 非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油、鱼油和可注射有机酯。水性载剂包括水、水－醇溶液、乳液或悬浮液，包括生理盐水，和经缓冲普通不经肠媒剂 (bufferedmedial parenteral vehicle)，包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖溶液 (Ringer′ s dextrosesolution)、右旋糖加氯化钠溶液、含有乳糖或不挥发性油的林格氏溶液。

[0177] 干粉的实例包括已经干燥（例如冻干、空气干燥或喷雾干燥）的任何幼苗（例如发芽幼苗）生物质。举例来说，可通过将幼苗放入市售空气干燥器中在约华氏 120 度 (120degrees Fahrenheit) 下空气干燥，直到生物质含有小于 5 重量％含水量。将经干燥植物以块状固体形式存储以进一步加工或通过将其研磨成具有所需网目尺寸的粉末来进一步加工。或者，可将冷冻干燥用于对空气干燥敏感的产物。可通过将产物放入真空干燥器中且在真空下冷冻干燥来对其进行冷冻干燥直到生物质含有小于约 5 重量％含水量。可如本文所述进一步加工干燥材料。

[0178] 药草制剂已为所属领域众所周知。可用于投与本发明的幼苗的药草制剂包括液

体和固体药草制剂。药草制剂的一些实例包括酊剂、提取物（例如，水溶液提取物、醇提取物）、汤剂、干燥制剂（例如空气干燥、喷雾干燥、冷冻或冷冻干燥）、散剂（例如冻干散剂）和液体。药草制剂可以诸如胶囊、片剂、栓剂、液体剂等任何标准的传递媒剂提供。所属领域技术人员将了解可应用于本发明中的传递药草制剂的各种调配物和方式。

[0179] 所属领域技术人员将了解，获得所需医药学活性蛋白质或多肽的特别优选的方法为提取法。可提取新鲜幼苗（例如幼苗）以从残余生物质中移出所需蛋白质产物，从而增加所述产物的浓度和纯度。还可在缓冲溶液中提取幼苗。举例来说，可将新鲜采集的植物以 1 比 1 的重量比转移到一定量例如已经磷酸盐缓冲液缓冲的冰冷的水中。还可视需要添加蛋白酶抑制剂。可在将植物组织悬浮于缓冲溶液中的同时，通过用力掺合或研磨来破坏所述植物组织并通过过滤或离心来去除所提取的生物质。可通过其它步骤来进一步纯化溶液中所载有的蛋白质产物，或通过冷冻干燥或沉淀将其转变成干粉。

[0180] 还可通过压榨来进行提取。可通过在压榨机中压榨来提取活植物，或者当其通过密集的滚筒时通过粉碎来提取。收集从经粉碎植物压出的流体并根据所属领域众所周知的方法进行加工。通过压榨提取允许释放较浓形式的产物。然而，所述产物的总产率低于在溶液中提取产物的产率。

[0181] 幼苗（例如发芽幼苗）提取物、散剂、干燥制剂和经纯化蛋白质产物等还可以为存在或不存在一种或一种以上如上文所述的赋形剂的封装形式。片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可利用诸如肠衣、控释包衣和其它医药调配领域中众所周知的包衣等包衣和外壳制备。在所述固体剂型中，可将药用蛋白质与至少一种惰性稀释剂（诸如蔗糖、乳糖或淀粉）混合。与普通实践相同，所述剂型还可包含除惰性稀释剂外的其它物质，例如压片润滑剂和其它压片助剂，诸如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，所述剂型还可包含缓冲剂。其可视情况含有遮光剂且还可为使其在肠道某一部分中视情况以延缓的方式只释放活性成分或优先释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。

[0182] 在其它实施例中，将表达本发明的医药学活性蛋白质的幼苗或所述幼苗的生物质以医疗食品的形式经口投与。所述可食用组合物如果为固体形式，那么可通过生食消费；或者如果为液体形式，那么通过饮用消费。在优选实施例中，直接摄取植物材料，而无需先前的加工步骤或后续的最低限度的烹调。举例来说，医药学活性蛋白质或多肽是在可直接食用的幼芽中表达。举例来说，蛋白质是在苜蓿芽、绿豆芽或者菠菜或莴苣叶幼芽、豌豆幼苗等中表达。在另一实施例中，对发芽幼苗生物质进行加工并且摄取在加工步骤后回收的材料。

[0183] 优选用于本发明中的加工方法为常用于食品或饲料工业中的方法。所述方法的终产物仍包括大量经表达的医药学活性蛋白质或多肽且优选便利地食用或饮用。还可将终产物与其它食品或饲料形式（诸如盐、载剂、风味增强剂、抗生素等）混合并且以固体、半固体、悬浮液、乳液或液体形式消费。在另一优选实施例中，所述方法包括保存步骤，诸如巴氏灭菌法 (pasteurization)、蒸煮法或添加保存和防腐剂。

[0184] 可在本发明中使用和加工任何植物以产生可食用或可饮用植物物质。可通过所属领域中的标准方法（例如，凝胶电泳、Elisa 法或 Western 印迹分析）使用对可食用或可饮用幼芽制剂中的医药学活性蛋白质具特异性的抗体，来测试所述蛋白质的量。所述测定法

可用于使所摄取的蛋白质的量标准化。举例来说，可例如通过混合数批具有不同蛋白质含量的产物测定和调控幼芽汁液中治疗活性蛋白质的量，以致可标准化将要饮用而摄取单一剂量的汁液数量。然而，使用根据本发明的封闭式可调控环境应使对于进行所述标准化程序的需要减到最少。

[0185] 在幼苗（例如发芽幼苗）中产生且供宿主食用的医药学活性蛋白质或多肽是通过消化系统吸收。摄取发芽幼苗或发芽幼苗制剂、尤其完整幼芽或已经最低限度加工的幼芽生物质的一个优势在于，在植物细胞中提供蛋白质的封装或分离。因此，蛋白质可在到达肠或小肠之前，至少在某种程度上受到保护以免上消化道的消化，且可将较高比例的活性物质用于吸收。

[0186] 可治疗性或预防性地投与本发明的医药组合物。在某些优选实施例中，可使用所述组合物治疗或预防疾病（例如，延缓疾病发作）。举例来说，可治疗罹患疾病或有发展疾病风险的个体。应了解，在尚未诊断出具有所述疾病的任何症状的情况下，可认为个体有发展疾病的风险。举例来说，如果个体具有鉴别为与发展特定疾病的风险增加有关的特定遗传标记，那么将认为所述个体有发展所述疾病的风险。类似地，如果个体的家族成员已诊断患有特定疾病（例如癌症），那么可认为所述个体将有发展所述疾病的风险。

[0187] 经口投与的液体剂型包括（但不限于）医药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除所关注的蛋白质或多肽外，液体剂型可含有所属领域中常用的惰性稀释剂，诸如水或其它溶剂；增溶剂和乳化剂，诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3- 丁二醇、二甲基甲酰胺、油（尤其棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢呋喃基醇、聚乙二醇和聚山梨糖醇脂肪酸酯，和其混合物。除惰性稀释剂外，口服组合物还可包括佐剂，诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0188] 经直肠或阴道投与的组合物优选为栓剂，其可通过将本发明的组合物与适当的非刺激性赋形剂或载剂（诸如可可脂、聚乙二醇，或栓剂蜡，其在周围温度下为固体但在体温下为液体，且因此在直肠或阴道腔内熔融并释放活性蛋白质）混合制备得到。

[0189] 局部或透皮投与本发明的医药组合物的剂型包括油膏、糊剂、乳膏、洗液、凝胶、散剂、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴片。在无菌条件下将活性蛋白质或其制剂与医药学上可接受的载剂以及视需要任何所需防腐剂或缓冲剂混合。预期眼用调配物、滴耳液和滴眼液也在本发明的范围内。此外，本发明涵盖使用透皮贴片，其具有对身体提供医药学活性蛋白质的受控传递的附加优势。所述剂型可通过将医药学活性蛋白质悬浮或分散于适当介质中制得。还可使用吸收增强剂来增加医药学活性蛋白质穿过皮肤的通量。可通过提供速率控制膜或通过将医药学活性蛋白质分散于聚合物基质或凝胶中来控制速率。

[0190] 组合物是以达到所需结果必需的量投与且历时达到所需结果必需的时间。如上文所述，在本发明某些实施例中，医药组合物的“治疗有效量”为有效治疗、减轻或预防宿主疾病的量。因此，如本文所使用，“有效治疗、减轻或预防疾病的量”是指无毒但足以治疗、减轻或预防任何宿主的疾病的医药组合物的量。举一例来说，“治疗有效量”可为治疗、减轻或预防糖尿病的量。

[0191] 所需的确切量将视个体种类、年龄和一般状况、疾病阶段、特定医药混合物、投药模式等随个体不同而变化。优选将本发明的幼苗（例如发芽幼苗）和 / 或其蛋白质制剂调

配成单位剂量形式以便利投药和剂量均一性。如本文所使用，表述“单位剂量形式”是指适于待要治疗的患者的医药学活性蛋白质的实体离散单位。然而，应了解，优选由主治医师在合理的医学判断范围内确定本发明组合物的总每日用量。任何特定患者或有机体的特定治疗有效剂量将视多种因素而定，包括所治疗的病症和所述病症的严重程度；所使用的特定化合物的活性；所使用的特定组合物；患者的年龄、体重、一般健康状况、性别；患者的饮食；患者的药物动力学情况；投药时间；投药途径；和所使用的特定化合物的排泄速率；治疗持续时间；与所使用的特定化合物组合或同时使用的药物；和医药技术领域众所周知的类似因素。

[0192] 还应了解，可将本发明的医药组合物用于组合疗法中，也就是说，可与一种或一种以上其它所需的治疗剂或医疗程序同时、在其之前或在其之后投与医药组合物。用于组合方案中的疗法（治疗剂或程序）的特定组合应考虑所需治疗剂和/或程序的可相容性以及所需欲达到的治疗效果。还应了解，所使用的疗法可对同一病症达到所需效果（例如，可将本发明化合物与另一抗癌剂同时投与），或其可达到不同效果。

[0193] 试剂盒

[0194] 另一方面，本发明还提供一种医药包装或试剂盒，其在一个或一个以上填充有本发明医药组合物的一种或一种以上成分的容器中包括本发明的活的幼苗（例如，发芽幼苗）或含有由所述幼苗所表达的医药学活性蛋白质或多肽的制剂、提取物或医药组合物。在某些实施例中，医药包装或试剂盒包括用作组合疗法的其它获批准的治疗剂。视情况与所述容器相联的可为政府机构规定形式的规定医药产品制造、使用或销售的说明书，所述说明书反映所述机构批准制造、使用或销售用于人类投药。

[0195] 本发明包括从幼苗（例如发芽幼苗）纯化药用蛋白质，以及使用多种植物表达系统、最优选病毒植物表达系统（也就是说，包括病毒组分的系统）实现由幼苗（例如发芽幼苗）产生药用蛋白质的可提供的按比例扩大。提供在诊断试剂盒中包括针对遗传和免疫疾病的各蛋白质的试剂盒。在一个优选实施例中，本发明提供具有生物蛋白质测试样品以及测试患者血清中针对所述生物蛋白质的抗体的存在的试剂的试剂盒。举例来说，试剂盒可提供 IA-2 和 GAD 以及测试患者血清中针对所述蛋白质的过量抗体的存在（1 型糖尿病存在或发展的清晰指示）的试剂。

[0196] 本发明可扩展到提供试剂盒形式的诊断试剂。举一非限制性实例来说，与糖尿病的自体反应相关的蛋白质胰岛素、GAD 和 IA-2 可以口服调配物的形式提供且投药以诱导对这些蛋白质的口服耐受性。或者可以可注射调配物或疫苗形式提供一种或一种以上治疗蛋白质以供投与。根据优选实施例，试剂盒中将提供用于对诊断患有疾病的个体（例如糖尿病个体）或有发展疾病（例如 1 型糖尿病）的风险的个体投药的医药剂量或有关其的说明书。

[0197] 等效物

[0198] 以下代表性实例意欲帮助说明本发明，且不意欲或不应将其解释为限制本发明的范围。实际上，所属领域技术人员将从本案的完整内容（包括以下实例和对本文所引用的科技和专利文献的参考）而对除本文显示和描述的内容外的本发明和其许多其它实施例的各种修饰显而易见。还应了解，所引用的参考文献的内容是以引用的方式并入本文中以帮助说明技术现状。以下实例含有重要的附加信息、范例和指导，其可用于在本发明的各个

实施例和其等效内容中实践本发明。

[0199] 实例

[0200] 实例 1 :在由农杆菌转化制备的转基因幼芽中产生药用蛋白或多肽

[0201] 采集经农杆菌转化的植物种子,干燥、清洁并测试活力以及所需遗传物质的存在。将种子储备物在适当条件下存储待用。使用时,将适量的种子浸泡于含有一定量表面除菌剂(例如克洛克罗斯公司 (Clorox)) 的水中达 20 分钟到 4 小时。将种子在托盘平面上展开,所述平面含有生长物质的供应和排水装置。将含有种子的托盘放于处于控制温度、光照、入口、空气循环、水源和排水装置下的封闭式可调控环境中的支架上。用装备有自动计时器的喷雾器向托盘喷水达 1 到 30 分钟且间隔为 30 分钟到 4 小时,足以使种子保持湿润。过量的水分通过托盘中的孔洞排到房间地板中的排水沟中。

[0202] 使种子在受控条件下发芽并发育。将种子培养约 2 到 14 天,随后采集并加工。在培养过程期间的某段时间(采集前 4 小时到 7 天),将种子暴露于可诱导已引入 DNA 启动子序列或固有 DNA 启动子序列的环境条件中,从而引起发芽幼苗组织中一种或一种以上所需蛋白质合成的增加。将培养温度从约 30℃瞬时增加到约 37℃以诱导热休克启动子。

[0203] 在将幼苗培养 2 到 14 天后,通过将个别托盘在传送带上移到加工设施中来采集幼苗。通过在含有蛋白酶抑制剂的磷酸盐缓冲的溶液中进行提取来加工所采集到的幼苗。在将幼苗悬浮于缓冲溶液中的同时通过用力掺合或研磨来破坏幼苗并通过离心移出所提取的生物质。

[0204] 实例 2 :在经植物病毒瞬时感染的发芽幼苗中产生药用蛋白或多肽

[0205] 从商业种植者合同获得野生型种子形式的所需植物的种子。将种子储备物在适当的温度、湿度、卫生和安全条件下存储待用。使用时,将适量的种子浸泡于水中并在如上文所述的托盘中于受控条件下培养。

[0206] 培养 2 到 14 天后,将含有具转基因的病毒的溶液喷于发芽幼苗上,且另外或同时用引起植物叶片组织机械性磨损的材料处理。在本实例中,用含有磨粒的空气喷雾器刮擦叶片。使病毒系统性感染植物达适当时间段(约 1 到约 10 天)并监测所需异源蛋白质的表达。

[0207] 在感染幼苗达 1 到 10 天后,如上文实例 1 中所述采集幼苗。

[0208] 实例 3 :在本塞姆氏烟草植物中由病毒载体 (AvA4) 表达糖尿病相关蛋白和人类生长激素

[0209] 早发型 1 型或青少年糖尿病是一种影响儿童、青少年和青年的疾病。胰腺内分泌系统的 β 胰岛细胞响应高血糖的代谢信号产生胰岛素。所述疾病的潜在病原学为 β 胰岛细胞受身体自身免疫系统的攻击和破坏。

[0210] 患有 1 型糖尿病的个体产生针对至少三种通常见于所有个体体内的蛋白质(即,胰岛素、谷氨酸脱羧酶 (GAD) 和酪氨酸磷酸酶样蛋白 IA-2) 的抗体(莱斯利 (Leslie) 等人,糖尿病学 (Diabetologia)(1999)42:30-14)。在疾病发作前,可在 50 到 75% 的 1 型糖尿病患者体内发现针对 IA-2 和 GAD 蛋白的自体抗体。此外,针对这些表面上普通的蛋白质的自体抗体早在与 1 型糖尿病相关的典型症状发作之前 7 到 8 年就已出现。

[0211] 诸如胰岛素、GAD 和 IA-2 等自体抗原适用于至少在口服耐受这些蛋白质的水平上在易感个体体内诱导并且防止或降低会导致糖尿病发展的胰岛细胞的损伤。非肥胖型糖

尿病小鼠 (NOD) 自发发展糖尿病的自体免疫形式 (张 (Zahang) 等人,美国国家科学院院刊 (1991)88:10252-10256)。已将编码人类胰岛素的基因与霍乱毒素 B 亚基基因融合并且在转基因马铃薯植物中表达所得构筑体。当用这些植物饲养 NOD 小鼠时,所述动物展现胰岛炎症的明显降低以及糖尿病进展的延缓 (荒川 (Arakawa) 等人,自然生物工艺学 (Nat. Biotechnol)(1998)16:934-936)。也已经在马铃薯植物中表达 GAD 蛋白。当用这些转基因马铃薯饲养 NOD 小鼠时,40 周后其也防止或明显延缓糖尿病发作 (马 (Ma) 等人,自然—医学 (Nature Medicine)(1997)3:793-796)。

[0212] 在本实例中,描述表达 GAD 和 IA-2 和从植物中回收 GAD 和 IA-2 的某些非限制性条件。使用 His 标签方法来纯化 GAD 和 IA-2 蛋白。原材料和蛋白质的产生是分两个阶段发生 :1) 在动物中进行的小规模初步研究 (毫克量) ;和 2) 中等规模的临床试验 (克量)。

[0213] 测试稳定性和运动。为进行病毒稳定性和运动测试,合成少量各构筑体。每一构筑体含有与严格病毒基因组 RNA5′ 末端融合的 T7 或 SP6RNA 聚合酶启动子以及在活体外转录前用于使质粒线性化的 3′ 末端独特限制性位点。随后 T7 或 SP6RNA 聚合酶产生失控转录物 (run-off transcript),将其用于接种植物。在两叶期,通过在存在磨擦剂 (诸如碳化硅粉末 (320 粒度 ;宾夕法尼亚州匹兹堡的世尔公司 (Fisher,Pittsburgh,PA)) 的情况下,将接种物轻柔擦于叶片表面来机械接种植物。每种构筑体接种 5 到 10 株植物并且每次接种使用 1-2μg 各 RNA 转录物。监测病毒扩散到整个植物时植物症状的严重程度,并回收产物。感染后 10-15 天 (dpi),从经感染的叶片样品采集叶片样品以评定全尺寸重组 IA-2 和 GAD 的存在。将一部分采集的材料 (10 个叶片) 在 -80℃下冷冻并且作为种子接种物保留以供随后进行的所选构筑体的按比例扩大生产。立即加工组织的剩余部分。

[0214] 感染后 15-20 天,回收重组 IA-2 和 GAD。将程序优化以回收最佳量的高纯度产物 (90-95%纯度)。在回收具有预期尺寸的产物并测定血清学身份 (使用 Western 印迹法和 ELISA 通过特异性抗体识别) 后,通过三代健康植物测试构筑体的稳定性。通过改变感染条件或通过使用另一宿主植物,在核苷酸序列或氨基酸序列水平上解决重组病毒与在所使用的尺寸范围内的蛋白质的组装、回收或稳定性问题。

[0215] 确定种子批次和程序以供中等规模生产。当第 1 阶段完成时,制各少量 (100μl) 活体外合成的重组构筑体的转录物并且将其用于接种 10 株植物。在接种后 10-12 天内采集叶片,通过 Western 印迹法测试 GAD 或 IA-2 的存在并且在 -70℃下作为种子材料存储。将此材料的一部分 (3-4) 用于接种 150-200 株植物 (1-2kg 新鲜组织)。接种后 15 到 20 天,回收重组蛋白并将其用于功能的研究。预期平均每批 60mg 产物。

[0216] 植物接种和产物回收。使用 T7RNA 聚合酶和经纯化质粒 DNA 合成含有 GAD 和 IA-2 的重组病毒活体外转录物。使用 RNA 帽结构类似物 m7G(5)ppp(5)G 给转录物戴帽。对于接种,将活体外转录产物的混合物施用于靶宿主植物的叶片,随后用碳化硅刮擦叶片表面并且在叶片表面上轻柔磨擦以使接种物扩散且进一步刮擦所述表面。测试产生 IA-1 和 GAD 的植物的纯度和活性。在蛋白质纯化期间和之后通过 ELISA 测试植物产生抗原的抗体结合能力。

[0217] 本塞姆氏烟草中蛋白质的表达 :为在病毒感染的植物中表达全长蛋白质,使用功能互补法在本塞姆氏烟草植物中表达来自水母的绿色荧光蛋白 (GFP)(图 4)。在植物到植物传代期间,受感染组织中苜蓿花叶病毒 (Av)/GFP 的量逐渐降低并且在第三次转移后,只

能检测到 Av/A4。(从环境安全性的观点看,这是有利的。)使用本方法,每克新鲜组织可表达平均 100μgGFP。这一系统的重要组分苜蓿花叶病毒 CP 具有将不相关病毒的基因组 RNA 包入受感染宿主中的感染性粒子中的能力,故其是独一无二的。利用苜蓿花叶病毒 CP 的这一独特能力以工程改造特异性靶向所选作物物种的杂交载体。

[0218] 通过 Western 印迹法分析经 Av/A4 和 Av/A4GFP 接种的本塞姆氏烟草植物中重组 GFP 的表达(参看图 3)。通过电泳法在 12% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上分离来自如本文所述系统性感染的叶片的蛋白质提取物,将其转移到硝酸纤维素膜中并使其与蛋白质特异性抗体反应。苜蓿花叶病毒 CP 特异性抗体识别经 Av/A4 或 Av/A4 与 Av/A4GFP 混合物接种的植物中具有预期尺寸的蛋白质 (24.0kD)。GFP 特异性抗体只识别来自经 Av/A4 与 Av/A4GFP 混合物接种的植物的提取物中的蛋白质。GFP 特异性抗体不与只经 Av/A4 接种的植物中的任何蛋白质反应。苜蓿花叶病毒 CP 和 GFP 特异性抗体都不与来自只经 Av/GFP 接种的植物的提取物中的任何蛋白质反应,这表明系统运动的缺乏。

[0219] 也已使用此 Av/A4 载体系统工程改造和表达人类生长激素。用活体外转录物接种本塞姆氏烟草植物并监测植物中 hGH 的产生。在 5dpi(接种后天数)时未检测到对所述蛋白质的特异性信号,但在 11dpi 时可在接种植物中检测到有关 hGH 的信号。图 4 为在感染 125C/hGH 的活体外转录物的本塞姆氏烟草植物中产生的 hGH 的 Western 印迹。接种后 24 小时分析样品。装载 1μg 纯 hGH 作为标准品。MWM 为分子量标记。图 4 的箭头指向印迹上由 hGH 特异性抗体检测到的 hGH 谱带。

[0220] 实例 4:转基因大叶芥菜植物中炭疽相关蛋白和人类生长激素的表达

[0221] 炭疽的毒力是由至少两个主要的毒力因子引起。这些因子为帮助保护宿主中的细菌的聚谷氨酸荚膜和三部分循环毒素 (three-part circulating toxin)。炭疽毒素是由称为 pXO1 的 184kb 质粒编码且由称为保护性抗原 (PA) 的受体结合蛋白以及称为水肿因子和致死因子的两种酶活性蛋白组成(巴特纳格尔 (Bhatnagar) 和巴特拉 (Batra),微生物学述评 (Crit.Rev.Mirobiol.)(2001)27(3):167-200)。

[0222] 在本实例中,在大叶芥菜的叶片中产生两种至少 0.1mg/gm 干重浓度的无活性炭疽毒素组分,即保护性抗原 (PA) 和致死因子 (LF)。已将这些植物基因的密码子使用优化并改变氨基酸序列以使两种毒素分子的毒性减到最小。建议将合成 DNA 插入能够调控大叶芥菜中基因表达的载体中。将 PA 基因改变成在 314 和 315 位缺失苯丙氨酸残基。使 LA 基因在 686 位或 690 位的组氨酸被丙氨酸取代(例如参看,西恩 (Singh) 等人,生物化学杂志 (J.Biol.Chem.)(1994)269:29039-29046;克兰帕乐 (Klimpel) 等人,分子微生物学杂志 (Mol.Microbiol.)(1994)13:1093-1097)。

[0223] 转化载体:将二元载体 pGREENII0229(海伦 (Hellens) 等人,植物分子生物学 (PlantMolecular Biology)(2000 年 4 月)42(6):819-832) 用于植物转化中(参看图 5)。此质粒包括以下组分。1)pGREENII 质粒主链包括在大肠杆菌和根癌农杆菌中复制所需的序列。2) 根癌农杆菌 T-DNA 左边界和右边界 (LB 和 RB) 序列为将 LB 与 RB 之间的所有序列整合到植物基因组中所需。3) 编码卡那霉素抗性的 npt 基因,其用于选择大肠杆菌和根癌农杆菌转化体。4)nos-bar 基因,其编码对除草剂双丙氨磷的抗性(使用双丙氨磷抗性来选择转基因植物)。nos-bar 基因是由植物中具有组成性活性的花椰菜花叶病毒 (CAMV)35S 启动子转录,并且所述基因的转录是使用 CaMV 终止子终止。5)vir 基因 PA 和 LF 的表达是由如

图 5 所示的 CAMV35S 启动子或者拟南芥低分子量热休克蛋白的 HSP18.2 启动子（基因库登录号 #X17295，基因座 At5g59720）驱动（松原 (Matsuhara) 等人，植物杂志 :细胞与分子生物学 (The Plant Journal :for Cell & Molecular Biolog)(2000 年 4 月)22(1):79-86)。转录终止是由胭脂碱合成酶基因 (nos) 的终止子介导。根据不同活性选择 35S 和 HSP18.2 启动子。35S 启动子在大部分植物组织中具有组成性活性。在许多情况下，35S 启动子驱动所关注的蛋白质的高水平表达。相比之下，HSP18.2 启动子几乎无活性，除费通过热休克来激发植物。一些蛋白质的高水平表达只能使用可诱导启动子系统来实现。

[0224] 载体构筑和植物转化。使用 DH5（实验室大肠杆菌菌株）来构筑载体。通过限制性核酸内切酶作图和测序来分析构筑。在确定构筑之后，使用所述载体转化缺乏天然 Ti 质粒且适于将二元载体的 TDNA 转移到植物中的根癌农杆菌菌株 GV3101。通过任何可用的转化方法，将载有转化载体的 GV3101 引入花中来转化大叶芥菜植物。

[0225] 引入 PA 和 LF 基因中的修饰。对 PA 和 LF 的核苷酸序列进行修饰以在植物中表达。天然 PA 的编码序列为 2295bp 且天然 LF 为 2430bp。这些序列修饰如下 :1) 引入使 PA 和 LF 作为毒素无活性的突变。使 PA 缺失 Phe314 和 Phe315 且使 His686 和 His690 突变成 Ala。2) 优化密码子使用以在大叶芥菜中表达。由于大叶芥菜的密码子使用和 GC/AT 比率不确定，故引入 PA 和 LF 中的改变并不多。PA 中改变 4 个密码子且 LF 中改变 7 个。3) 将独特限制性位点添加到基因的 5′ 和 3′ 端以供克隆到植物表达载体中。[4] 添加翻译起始的一致序列（乔什 (Joshi) 等人，植物分子生物学 (Plant Molecular Biology.)(1997 年 12 月)35(6):993-1001)。限制性位点和优化的翻译起始位点描述于图 5 中。5′ 端显示添加的 XbaI 限制性位点和植物基因的一致翻译起始位点，其包括起始密码子，随后为 Ala 密码子。3′ 端显示添加的 SacI 限制性位点。经修饰 PA 和 LF 基因是由 Entelechon 公司（德国雷根斯堡 (Regensburg, Germany)) 化学合成。

[0226] 第二构筑也是针对 PA 和 LF 产生。第二构筑体的目的在于通过靶向内质网中的蛋白质并将其滞留于内质网中来优化 PA 和 LF 的积累 [40]。靶向和滞留于 ER 中可产生重组蛋白的高水平积累（哈洛夫 (Haseloff) 等人，美国国家科学院院刊 (Proceedings of theNational Academy of Sciences USA.)(1997 年 3 月 18 日)94(6):2122-2127)。为达到此目的，添加氨基末端信号序列和羧基末端 ER 滞留序列。信号序列包括来源于拟南芥壳多糖酶基因的 22 个密码子（哈洛夫等人，同上文）。ER 滞留序列为四肽 HisAspGluLeu（格莫德 (Gomord) 等人，植物杂志 :细胞与分子生物学 (The Plant Journal :for Cell &Molecular Biology.)(1997 年 2 月)11(2):313-325)。通过使用由 Entelechon 公司生产的合成基因作为模板进行的 PCR 拼接来添加信号序列（汤米 (Tomme) 等人，细菌学杂志 (J Bacteriol.)(1995)177:4356-4363)。通过使用已并入 HisAspGluLeu 编码序列的 3′ 引物的 PA 和 LF 基因的 PCR 扩增来添加 ER 滞留序列。将经修饰 PA 和 LF 序列克隆到 35S 和 HSP18.2 表达载体中。克隆 PA 和 LF 各两种经修饰型式（总计 4 种）。总的来说，测试 8 种不同的构筑体。

[0227] 表达转基因的植物的选择和分析。用载有转化构筑体的根癌农杆菌菌株 GV3101 转化大叶芥菜后，使植物经由其正常发育程序发展。25 天内，产生成熟种子，干燥并采集。将种子播种于盆栽土壤中，并使幼苗生长 15 天。随后将 0.0058％ (w/v) 的双丙氨磷 (FINALE，法纳姆公司 (Farnam, Inc.)，亚利桑那州菲尼克斯 (Phoenix, AZ)) 溶液喷于各植物的叶片上。通常在 5 到 7 天内杀死非转基因敏感植物。通过绿色和健康外观可显而易见双丙氨

磷抗性植物。确认推测的转基因植物并使用一系列方案加以分析。将使用对构筑体具特异性的寡核苷酸引物的聚合酶链反应用于确定推测的转基因植物中 TDNA 的存在。随后通过使用特异性 DNA 探针（经修饰 PA 或 LF 基因）印迹基因组 DNA 来检验 TDNA 的存在。最后，通过 SDS-PAGE，随后用考马斯蓝 (Coomassie Blue) 染色或免疫印迹来检验所关注的蛋白质的表达。蛋白质表达的分析方案随用于产生转基因植物的构筑体而不同。由于由 35S 启动子的表达为组成性的，故可直接分析载有 35S 启动子构筑体的植物。在分析前使载有 HSP18.2 启动子的植物热休克。重组蛋白表达的动力学可能随不同转基因植物而不同。最后，使用标准方法对各诱导条件进行优化。然而，对于初始分析来说，可能会进行将建立大叶芥菜中其它重组蛋白的表达的标准化热休克方案。

[0228] 图 6 绘示在 HSP18.2 启动子控制下表达人类生长激素 (hGH) 的转基因大叶芥菜的免疫印迹图。使转基因大叶芥菜在盆栽混合物中生长。如图 6 所示，从植物中剥离重 1 到 3 克鲜重的叶片，并将其放入含有经水润湿的滤纸的皮氏培养皿 (petri dish) 中。将皮氏培养皿覆盖并将其放于高湿度、37℃恒温培养箱中达 1.5 小时。随后将含有所述叶片的皮氏培养皿从恒温培养箱中取出，并将其放入处于 100μmol 光子 $m^{-2}s^{-1}$ 强度的荧光下的 24℃生长室中达 5 小时。随后采集植物材料并通过使用针对 hGH 的单克隆抗体（西格玛化学品公司 (Sigma Chemical Co.)，产品编号 G-8523) 进行的免疫印迹加以分析。较低谱带为 16kDa 重组 hGH。在热休克之前未观察到此谱带。第 8 道显示来自仅经载体转化的转基因植物的结果。较高分子量谱带为与用于检测免疫复合物的辣根过氧化物酶连接的二级抗体的非特异性反应。预计 PA 为约 88kDa 且 LF 为 93kDa。

[0229] 在炭疽毒素表达的初始筛选后，进行对表达的更为详细地分析。使用 ELISA 方法来定量表达水平。对后续的植物子代进行进一步分析。为避免对于在后续子代中选择转基因植物的需求，最终需要分离关于 TDNA 构筑体不分离的转基因株系。这可以通过对原代转基因植物进行自花授粉，将第二代植物栽培成熟并且关于双丙氨磷抗性分离测试第三代来实现。鉴别不分离的第二代个体。此后，形成大量不分离植物子代并且将其用于生产规模条件（例如每月 1,600Kg 干生物质）的分析。将生长为幼苗的植物的生长和诱导条件优化以达生产规模。此时，还需要表征良种系的插入位点和 TDNA 拷贝数并且在 mRNA 表达水平上表征表达。

[0230] 实例 5：在幼芽中由含有病毒序列的农杆菌构筑体表达 GUS 报告子

[0231] 将含有 GUS 报告基因的 pBI121 转化到根癌农杆菌 LBA4404 中。使细菌培养物在含有 50μg/ml 卡那霉素、20μM 乙酰丁香酮和 10mM MES(pH5.6) 的 YEB 培养基中生长整夜。将整夜培养物离心，将其以 OD_{600}2.0 悬浮于 MMA 培养基 (MS 盐、10mMMES(pH5.6)、200μM 乙酰丁香酮和 2％蔗糖）中，并将其用于幼芽的真空渗透。

[0232] 室温下，使各种植物的种子在振荡平台上的水中吸液膨润达 24 小时，将其转移到具有潮湿滤纸的塑料容器中并在 12 小时白天下于 21℃下培养 4 到 6 天（视植物物种而定）。

[0233] 真空渗透后，将幼芽在 12 小时白天下于 21℃下再培养 48-60 小时并使用 X-gluc 组织化学底物原位检测 GUS 活性。在 37℃进行整夜染色并使植物样品在乙醇中脱色。

[0234] 使用多种幼芽测试所述系统。参看图 8A 和 8B 以及图 9。

[0235] 实例 6：由含有病毒序列的农杆菌构筑体表达糖尿病相关蛋白和人类生长激素

[0236] 已在农杆菌载体中产生基于 TMV 的载体 :D4-hGH 或 D4-GFP。为此,首先须在 pBI121 中产生多个克隆位点。pBI121-Xba1-BamH1-Sal1-Pac1-BsiW1-Stu1-Xho1-Spe1-Kpn1-Sac1-pBI121。使用适当的引物和 PCR,产生具有这些位点的 pBI121。确定所述序列后,接着将 TMV 基因组序列引入此质粒中。有关 D4-hGH 和 D4-GFP 的进一步论述,也参看 2004 年 2 月 3 日申请的 U.S.S.N.10/770,600 和 2003 年 2 月 3 日申请的美国临时申请案第 60/444,615 号(以引用的方式并入本文中)以及 U.S.S.N.10/832,603 和美国临时申请案 60/546,339(以引用的方式并入本文中)。原载体 D4 和由其得到的载体描述于施普赛德 (Shivprasad) 等人,病毒学,255(2):312-23,1999 中。所得质粒称为 pBID4。

[0237] 将花椰菜花叶病毒的 35S 启动子与 TMV 序列融合。由此,35S 启动子引导 TMV 序列的转录。成功并入细胞中后,产生病毒转录物。在本发明某些实施例中,还产生病毒复制和在整个植物中扩散所需的组分。这些组分例如包括复制酶、运动蛋白和外壳蛋白,其可来自 TMV 或各个实施例中的其它病毒(诸如苜蓿花叶病毒)。可在单独病毒载体或质粒中提供的 TMV 序列、质粒序列内编码这些组分,或者植物可为包含编码所述组分的转基因的转基因植物。例如参看 2004 年 2 月 3 日申请的 USSN10/770,600,其以引用的方式并入本文中。

[0238] TMV 序列内的亚基因组 TMV 启动子引导 hGH 序列的转录。将锤头核酶引入 TMV 序列的 3′ 端。所述核酶并非本发明所需。nos 终止子(所属领域众所周知)为所述核酶序列的 3′ 端。

[0239] 最终载体含有 D4-hGH 或 D4-GFP。随后使用 pBI121 中的这些构筑体转化根癌农杆菌并且用经转化农杆菌渗透植物。由于存在复制病毒,故将植物培养 2 周。通过 Western 印迹法分析叶片中 hGH 的产生。通过用长波紫外光照射植物来监测 GFP 表达并拍摄照片。图 10 中所示的结果表明在整个经渗透叶片中存在 GFP 表达。图 11 中所示的使用针对 hGH 的抗体进行的 Western 印迹分析证实,所述构筑体在植物中起作用并且可以检测到较高含量的 hGH。

[0240] 类似地,将 IA-2ic 工程改造到 pBID4 质粒中以产生 pBID4-IA-2ic。另外,产生载有 GFP 的基于 AMV 病毒的载体。使用所得质粒转化农杆菌并且用经转化农杆菌渗透水栽培生长的本塞姆氏烟草中。简单来说,将本塞姆氏烟草种子播种于在水栽培条件中作为养分的 1/2 浓度的霍格兰溶液 (Hoagland solution) 中预先润湿的岩棉种植垫 (Rockwoolslab) (18×18×1) 上。在同一种溶液中将水栽培植物保持 4 周。随后,在载有 pBID4-IA-2ic 或载有 GFP 的基于 AMV 病毒的载体的农杆菌悬浮液 (OD_{600}0.1) 中对 4 周龄的植物实施真空渗透。

[0241] 使细菌培养物生长并诱导整夜,随后将细胞再悬浮于 MMA 培养基 (MS 盐、10mMMES(pH5.6)、20g/l 蔗糖、200μM 乙酰丁香酮)中直到 OD_{600} 为 0.1。在轻柔振荡下,在室温下将再悬浮培养物培养 2-3 小时,并且将水栽培本塞姆氏烟草植物放入细菌悬浮液中,随后在室温下施加真空达 30-60 秒。迅速释放真空以促进细菌有效注入组织中,并将经渗透植物在 1/2 浓度的霍格兰溶液养分中保持 5-7 天。或者,使用无针头的 10cm^2 注射器将细菌悬浮液强压到完全膨胀的叶片的表皮内。渗透后 3-6 天时采集叶片并在 -80℃存储或针对表达分析进行分析。图 12 显示表达 IA-2ic 的植物的 western 印迹分析。有关在光下经基于 AMV 的 GFP 构筑体渗透的植物的分析表明在经渗透植物的整个叶子中存在 GFP 表达。

[0242] 实例 7 :在豌豆品种中由含有病毒序列的农杆菌构筑体表达蛋白质(绿色荧光蛋

白；地衣聚糖酶）

[0243] 本实例描述利用载有病毒表达载体的农杆菌构筑体进行的某些豌豆品种的农杆菌渗透。

[0244] 图 13 描述用于载有 AlMV 序列的农杆菌构筑体的整个策略。已知 AlMV 具有分段的基因组（如上文所论述），故使用三种不同的构筑体：载有编码复制酶 1 和 2 的 AlMV 序列的构筑体 (pMOG-R1 和 R2)；载有 AlMV RNA3 序列的构筑体 (pBI-RNA3)（视情况包括待表达的所关注的基因，其通常替换 RNA3 中的天然 AlMV 外壳蛋白序列）；和载有编码 AlMV 外壳蛋白的 AlMV 序列的构筑体 (pBI-CP)。所属领域技术人员将了解，严格地说，并不需要包括编码 AlMV 外壳蛋白的构筑体。然而，由于外壳蛋白可促进病毒序列（且因此其所载有的所关注的基因）的复制和 / 或系统性扩散，故包括所述构筑体将是有用的。

[0245] 即使在需要确保 AlMV 外壳蛋白表达的情况下，也并非必需利用三种构筑体。举例来说，或者可能会利用已关于 AlMV 外壳蛋白转基因的植物，因此无需单独提供。另外或其它，可利用关于一种或两种 AlMV 复制酶蛋白转基因的植物。在所述植物（视情况另外关于 AlMV 外壳蛋白为转基因的）中，可利用仅载有 RNA3 和所关注序列基因的单一构筑体以达到类似结果。

[0246] 如图 13 所示，在这些特定实施例中，利用表达三种不同蛋白质（即，绿色荧光蛋白 (GFP)、地衣聚糖酶 (Lich) 和地衣聚糖酶 - 炭疽保护性抗原融合体 (Li-PA)）的构筑体。

[0247] 在图 13 所涉及的特定实验中，使至少 1 升各农杆菌菌株（即，各菌株载有 3 种构筑体 pMOG-R1 与 R2、pBI-RNA3/ 所关注蛋白质、pBI-CP 中的一种）生长，将其制成球状，并再悬浮于 MMA 中达 1.0 的 O.D.。所属领域技术人员将了解不同植物可能需要不同的 O.D.。对于豌豆植物，如果技术可以达到，通常需要例如在 1.5 范围内的较高 O.D.。

[0248] 在图 13 所涉及的特定实验中，将载有复制酶 (pMOG-R1 与 R2)、外壳蛋白 (pMOG-CP) 和 RNA3/ 靶蛋白 (pBI-RNA3/GFP、Lich 或 Li-PA) 的农杆菌菌株以 1:1:2 的比率组合达到 1.5L 的总体积。所属领域技术人员将了解，这些比率和体积并不重要；选择所利用的特定比率以反映 AlMV 的生活周期通常涉及比其它基因组组分高的 RNA3 含量。此外，需要较高含量载有所关注的基因（即，GFP、地衣聚糖酶或地衣聚糖酶 - 保护性抗原基因）的 RNA。

[0249] 在图 13 所涉及的特定实验中，利用如所属领域中已知的无土壤支撑物（在此情况下为干酪布）使菜豆幼芽水栽培生长。将幼苗浸没于组合农杆菌混合物中，并在 -28psi 下施加真空达 90 秒以实现农杆菌渗透。在一些情况下，施加一次以上真空。

[0250] 在图 13 所涉及的特定实验中，在农杆菌渗透后，在自来水中漂洗幼苗 1 次，且随后将其放回生长空间并浇水。接着采集幼苗，汇集并进行提取。

[0251] 图 14-16 提供根据图 13 中所述的策略进行的各项实验的结果。举例来说，如图 14 所示，将产生地衣聚糖酶的构筑体通过农杆菌渗透斑点豌豆 (SP)、黄豌豆 (YP) 或比尔跳豆 (BP) 幼苗中。在农杆菌渗透前，使幼苗在暗处生长 2 天（以允许发芽）且在光照下生长 8 天（如由“2(8)”符号所示）。这 10 天之后进行如上文所述的农杆菌渗透，并使其在接种后生长 5 天 (dpi)，随后检测所产产生的蛋白质。如图 14 中可看出，所有三种豌豆品种都产生地衣聚糖酶蛋白质，但黄色豌豆的产量比斑点豌豆略高，且比尔跳豆具有略低的产量。所述变化在熟悉在植物中表达蛋白质的技术人员的经验范围内；根据这些结果，将只需要常规

实验来选择产生任何特定蛋白质的优选植物品种。总的来说，在这些豌豆幼苗系统中所观察到的表达水平为当在本塞姆氏烟草中表达相关蛋白（例如 Lich-PA）时所观察到的表达水平的约 1/3（未图示）。这些幼苗优于本塞姆氏烟草的优势在于，其可食用，由于已知所述植物的所有组分至少对于人类无害，故其应可简化针对所产生的医药学活性蛋白质的任何所需分离。此外，其生长迅速并且价格低廉。另一方面，由于种子比常见幼苗且尤其豌豆的种子小得多，故种子存储也比本塞姆氏烟草简单。

[0252] 如从参考图 14 可看出，在这些特定实施例中，上述 AlMV 产生系统对于产生所关注的蛋白质比类似的 TMV 系统（如本文所述）更为成功。所属领域技术人员将了解，对于在某些特定植物物种中产生某些特定蛋白质来说，将优选 TMV 系统；而在其它情况（包括所述情况）下可优选 AlMV。

[0253] 图 15 绘示在农杆菌渗透前生长不同时间段的斑点豌豆和黄色豌豆中 GFP 的成功产生。在图 15 中所提供的特定实验中，施加三次真空各历时 90 秒。此外，所利用的特定再悬浮培养基为“完全 MMA”。所属领域技术人员将了解，可另外使用多种其它渗透培养基中的任一种（包括基本培养基 MMA、AB 等）并且可能会增加或降低农杆菌渗透和因此蛋白质或多肽产生的最终效率。

[0254] 图 16 绘示渗透后不同时间段时斑点豌豆叶片 (L)、整个幼苗 (W)、根 (R) 或胚轴 (H) 中地衣聚糖酶的表达。如可看出的，大部分表达发生在叶片中。而且，渗透后约 5-7 天时此特定系统中表达最佳。预期一些变化将建立在所利用的植物的年龄和品种以及所表达的蛋白质的基础之上。

[0255] 其它类似实验表明，举例来说，使用缺乏 5/3′ UTR 结构的 pBI-CP 构筑体大概是通过增加外壳蛋白 (CP) 的产量来增加所关注的蛋白质的产量。此外，在本系统中，9-12 天龄的植物表达最佳。总的来说，在较年轻组织中蛋白质表达水平较高，但较老组织中具有较多生物质。

[0256] 其它类似实验提出将植物暴露于 24 小时光照而非 12/12 白天 / 黑夜循环明显降低所关注的蛋白质的含量。

[0257] 其它类似实验表明，在农杆菌渗透期间，将豌豆幼苗暴露于弱清洁剂大概可通过增加成功农杆菌渗透的效率和 / 或程度来增加所关注蛋白质的产量。

[0258] 实例 8：在植物中大规模产生蛋白质或多肽的模块系统

[0259] 本实例描述一种技术平台，其将使生物医药的制造发生巨大变化，减少批次生产时间（在一些情况下减少到 5 周）。本实例中所述的特定生产系统利用农杆菌载体，在数分钟内将极大拷贝数的载有所关注的蛋白质或多肽的编码序列的植物病毒 RNA 传递到幼苗内。因此可在将农杆菌载体引入植物中的一周内，以大量植物生物质实现所关注的蛋白质或多肽的高水平瞬时表达。

[0260] 本实例中所述的技术平台适用于多种单体或多聚体蛋白，包括疫苗抗原、单克隆抗体和其它治疗剂（尤其）并且可在多种植物物种中进行。植物中的表达比在一些其它系统中表达更适合提供正确折叠和溶解性，且具有无动物病原体的附加优势。在此特定实例中，关注在幼苗中工程改造并产生疫苗抗原和单克隆抗体。

[0261] 如本实例中所述，将编码所关注的蛋白质或多肽的基因克隆到组合有农杆菌和植物 RNA 病毒序列元件的发射载体中。随后使用农杆菌通过真空渗透将数百万个发射载体拷

贝引入植物中。在植物组织中，另外通过病毒复制大量扩增载体序列。随后在引入载体后，在不到一周的时间内由这些病毒转录物产生靶蛋白。应了解并非必需（但也不禁止）将农杆菌载体整合到植物细胞中。相反，载体的农杆菌元件仅促进最终产生蛋白质的病毒 RNA 的快速系统性传递（经由农杆菌渗透法）。

[0262] 可使用所述系统来产生每公斤新鲜植物组织大量（例如数百毫克量）靶蛋白。此外，由于易于得到大量种子（如所述，其无需为转基因的），故可实现极高容量。

[0263] 如本文所述，在一些情况下，产生与载体分子融合的靶蛋白或多肽，以例如使所述蛋白质稳定和 / 或促进下游加工。所述载体对于产生抗原蛋白尤其有用。特别值得关注的载体例如包括热稳定性蛋白，诸如 2003 年 5 月 22 日申请的 USSN60/472,495 以及 2004 年 5 月 24 申请且于 2005 年 3 月 24 日以 WO05/026375 公开的 PCT/US04/016452 中所述的蛋白质。应注意，从这一点看，所述热稳定性载体分子为来自热纤梭菌的 β-1,2-1,4- 葡聚糖酶 (LicKM) 的工程改造型式。可将靶序列迅速工程改造为与 LicKM 的 N 末端、C 末端或内部融合物。LicKM 中外来序列的存在不会导致分子热稳定性的丧失。这一特性促进容易且成本有效地回收靶蛋白。简单的热处理步骤（例如在 65℃下至多 10 分钟）会导致去除大部分宿主蛋白。此外，可将一种以上靶蛋白与每一 LicKM 分子融合，但同时使用多个插入位点。

[0264] 具体来说，使来自未基因修饰的植物的种子在水栽培条件下发芽，并且在封闭式室内植物设施中保持一段时间（例如，对于幼苗通常至多约 10 天；对于本塞姆氏烟草有时为 2-6 周），然后进行真空渗透。在这些条件下，每平方英尺植物生物质的产率通常为利用在土壤中生长的植物所得到的产率的 4-5 倍。使用幼苗（例如，发芽幼苗），可产生每平方英尺具有大量（例如约 100-1000kg）绿色组织的密集冠层 (canopy)。举少数实例来说，利用诸如豌豆的幼芽通常可产生每平方英尺具有约 700g 绿色组织的冠层；利用本塞姆氏烟草通常产生每平方英尺具有约 200g 绿色组织的冠层。所属领域技术人员将了解其它植物可能介于这些量之间。

[0265] 可通过在具有配套照明单元的棚架 (1000 平方英尺生长空间将在不到两周内提供多达 4 公吨生物质）上将幼苗（例如幼苗）的支架堆叠于另一所述支架上来实现极高容量。将包含发射载体的农杆菌通过施用且随后快速释放真空渗透植物的所有空气中的部分。这迫使农杆菌渗透具有几乎完全的叶子覆盖的植物组织的整个冠层中。随后，将靶蛋白积累数天的时间（例如，约 2 到约 14 天，在一些实施例中约 2 到 10 天、3 到 7 天、4 到 6 天等）。

[0266] 从种子到所采集的组织的整个过程通常需要数周（例如，小于 6、5、4、3 或 2 周；对于幼苗通常约 2 周）。由于种子材料为非转基因的，故种子的产生和存储价格低廉和简单易懂，且对于有效按比例扩大无任何限制。因此有可能在大概数周内产生大量重组蛋白。

[0267] 必要时，可分离所产生的靶蛋白。加热步骤可用于分离与热稳定性载体融合的标靶。其它纯化法可包括各种分离和 / 或色谱分析步骤。举例来说，可使用诸如硫酸铵沉淀、pH 值依赖性分离、尺寸排阻色普、离子交换色谱和亲和色谱等步骤。

[0268] 本实例中所涵盖的整个过程包括 1) 基因优化和合成；2) 克隆到发射载体中；3) 植物材料和农杆菌培养物的制备；4) 发芽幼苗的真空渗透；5) 标靶表达；6) 组织采集；和 7) 标靶回收。为实现高通量生产，使这一过程的大部分自动化。具体来说，将使从非转基因种子播种和农杆菌培养物发酵到匀质化、澄清和均质化植物材料的体积减少的所有步骤

(参看图 19) 自动化。将设计和建造具有一批产生 1.5 公吨植物生物质能力的模块。具体来说,将构建图 20 中概念性显示的设备。

[0269] 图 20 中所述的设备设计使用塔架的概念,从而使整个模块可装配于约 5000 平方英尺的空间内。中央棚架单元提供必需的空间、光照和水源以生长 1.5 公吨植物生物质。自动监测并控制湿度、温度和光照。在图 20 所示的设计中,植物将在尺寸为 1′ ×2′ 的托盘中水栽培生长。因此,将使用约 6000 个托盘。可由 36 个可堆叠的个别存储单元构建模块。各存储单元将容纳 6×7×4 个托盘。设计的模块性允许可扩大生产。存在两个将托盘放入棚架且从棚架取出的自动机械 (robot),棚架每一侧一个。自动播种是在适于水栽培生长的材料上进行。当植物已达到适当的成熟度后,传送带将其输送到渗透单元,其具有真空室,所述真空室具有在约 8 小时内渗透 1.5 公吨植物生物质的容量。漂洗单元将去除过量的农杆菌培养物。在漂洗植物后,将其传送回中央棚架单元以供数天的标靶积累。随后,将托盘传送到采集植物并将其均质化的采集单元。随后将均质化植物提取物输送到下游加工单元。

[0270] 实例 9 :由含有病毒序列的农杆菌构筑体表达 HPV 抗原

[0271] 可利用通过农杆菌渗透法得到的农杆菌介导的瞬时表达系统 (特尔本 (Turpen) 等人,1993,病毒学方法杂志 (J.Virol.Methods),42:227)。利用含有经工程改造以表达 LicKM-E7 或 LicKM-E7GGG 的病毒载体的发根农杆菌渗透本塞姆氏烟草的健康叶片。

[0272] 将发根农杆菌菌株 A4(ATCC43057) 或根癌农杆菌 (GV3103) 用构筑体 pBI-D4-PRACS-LicKM-E7-KDEL、pBI-D4-PRACS-LicKM-E7VAC、pBI-D4-PRACS-LicKM-E7GGG-KDEL 和 pBI-D4-PRACS-LicKM-E7GGG-VAC 转化。如所述使农杆菌培养物生长并进行诱导 (卡佩拉等人,1997,植物科学 (Plant Sci.),122 :101)。28℃下,使 2ml 引发培养物 (starter-culture)(从新鲜菌落中拣选) 在具有 25μg/ml 卡那霉素的 YEB(5g/l 牛肉浸膏、1g/l 酵母提取物、5g/l 蛋白胨、5g/l 蔗糖、2mM $MgSO_4$) 中生长整夜。将引发培养物以 1:500 稀释于 500ml 具有 25μg/ml 卡那霉素、10mM2-4(- 吗啉基) 乙烷磺酸 (MES)(pH5.6)、2mM 额外 $MgSO_4$ 和 20μM 乙酰丁香酮的 YEB 中。随后使经稀释培养物在 28℃下生长整夜以达到约 1.7 的 O.D.600。将细胞以 3,000×g 离心 15 分钟且将其再悬浮于 MMA 培养基 (MS 盐、10mM MES(pH5.6)、20g/l 蔗糖、200μM 乙酰丁香酮) 中以达到 2.4 的 O.D.600,在室温下保持 1 小时,且将其用于农杆菌渗透。使用无针头一次性注射器将农杆菌悬浮液注入本塞姆氏烟草叶片中。渗透后 6 天采集渗透的叶片。

[0273] 实例 10 :由含有病毒序列的农杆菌构筑体表达炭疽抗原

[0274] 可利用通过农杆菌渗透法得到的农杆菌介导的瞬时表达系统来产生炭疽抗原。利用含有经工程改造以表达 LicKM 或 LicKM-PAD4 的病毒载体的发根农杆菌渗透本塞姆氏烟草的健康叶片。所使用的载体为 pBI-D4,即引入农杆菌载体 pBI121 中的病毒表达载体 D4 型式。(陈 (Chen) 等人,2003,分子育种 (Mol.Breed.),11 :287。) 将 35S 启动子融合于病毒序列的 5′ 端。载体序列位于 pBI121 的 BamHI 与 SacI 位点之间。将锤头核酶放于病毒序列的 3′ 端 (特尔本 (Turpen) 等人,1993,病毒学方法杂志 (J.Virol.Methods),42:227)。这些构筑体包括编码 LicKM-PAD4 或 LicKM 的序列与编码来自烟草 PR-1a 蛋白的信号肽的序列、6×His 标签以及 ER 滞留锚定序列 KDEL(参看 SEQ ID NO. :10) 的融合物。

[0275] 将发根农杆菌菌株 A4(ATCC43057) 用构筑体 pBI-D4-PRLicKM-PAD4K 和

pBI-D4-PRLicKMK 转化。如所述使农杆菌培养物生长并进行诱导（卡佩拉等人，1997，植物科学 (Plant Sci.)，122:101)。28℃下，使 2ml 引发培养物（从新鲜菌落中拣选）在具有 25μg/ml 卡那霉素的 YEB(5g/l 牛肉浸膏、1g/l 酵母提取物、5g/l 蛋白胨、5g/l 蔗糖、2mM $MgSO_4$) 中生长整夜。将引发培养物以 1:500 稀释于 500ml 具有 25μg/ml 卡那霉素、10mM2-4(-吗啉基）乙烷磺酸 (MES)(pH5.6)、2mM 额外 $MgSO_4$ 和 20μM 乙酰丁香酮的 YEB 中。随后使经稀释培养物在 28℃下生长整夜以达到约 1.7 的 O.D.600。将细胞以 3,000×g 离心 15 分钟且将其再悬浮于 MMA 培养基 (MS 盐、10mM MES(pH5.6)、20g/l 蔗糖、200μM 乙酰丁香酮）中以达到 2.4 的 O.D.600，在室温下保持 1 小时，且将其用于农杆菌渗透。使用无针头一次性注射器将农杆菌悬浮液注入本塞姆氏烟草叶片中。渗透后 6 天采集渗透的叶片。

[0276] 实例 11：由含有病毒序列的农杆菌构筑体表达流感病毒抗原

[0277] 可利用通过农杆菌渗透法得到的农杆菌介导的瞬时表达系统来表达流感病毒抗原。（特尔本等人，(1993) 由创伤利用含有烟草花叶病毒的 cDNA 的根癌农杆菌接种的整个植物的转染 (Transfection of whole plants from wounds inoculated with Agrobacteriumtumefaciens containing cDNA of tobacco mosaic virus)（病毒学方法，42:227。）利用含有经工程改造以表达 LicKM-HA 或 LicKM-NA 的病毒载体的发根农杆菌渗透本塞姆氏烟草的健康叶片。

[0278] 将发根农杆菌菌株 A4(ATCC43057) 用构筑体 pBI-D4-PRACS-LicKM-HA-KDEL、pBI-D4-PRACS-LicKM-HA-VAC、pBI-D4-PRACS-LicKM-NA-KDEL 和 PBI-D4-PRACS-LicKM-NA-VAC 转化。如卡佩拉等人所述使农杆菌培养物生长并进行诱导（卡佩拉 J.(Kapila J.)，德雷克 R.(De Rycke R.)，范蒙塔古 M.(Van Montagu M.) 和安吉侬 G.(Angenon G.)(1997) 针对完整叶片的农杆菌介导的瞬时基因表达系统 (AnAgrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves.) 植物科学 (Plant Sci.)122,101-108)。28℃下，使 2ml 引发培养物（从新鲜菌落中拣选）在具有 25μg/ml 卡那霉素的 YEB(5g/l 牛肉浸膏、1g/l 酵母提取物、5g/l 蛋白胨、5g/l 蔗糖、2mM $MgSO_4$) 中生长整夜。将引发培养物以 1:500 稀释于 500ml 具有 25μg/ml 卡那霉素、10mM2-4(-吗啉基）乙烷磺酸 (MES)(pH5.6)、2mM 额外 $MgSO_4$ 和 20μM 乙酰丁香酮的 YEB 中。随后使经稀释培养物在 28℃下生长整夜以达到约 1.7 的 O.D.600。将细胞以 3,000×g 离心 15 分钟且将其再悬浮于 MMA 培养基 (MS 盐、10mM MES(pH5.6)、20g/l 蔗糖、200μM 乙酰丁香酮）中以达到 2.4 的 O.D.600，在室温下保持 1-3 小时，且将其用于农杆菌渗透。使用无针头一次性注射器将农杆菌悬浮液注入本塞姆氏烟草叶片中。渗透后 6 天采集渗透的叶片。可通过对地衣聚糖酶活性检定和免疫印迹分析的评定针对靶抗原表达的存在筛选植物。

[0279] 酶谱分析揭示在所测试的本塞姆氏烟草转基因根中存在 HA 与 NA 嵌合蛋白的表达。所述表达与地衣聚糖酶活性有关。与融合蛋白相关的活性谱带显示其比地衣聚糖酶对照物的分子量高且与农杆菌感染后植物所表达的产物的分子量相同，证实完整融合产物的存在。

[0280] 实例 12：由含有病毒序列的农杆菌构筑体表达流感病毒抗体

[0281] 其它实施例

[0282] 所属领域技术人员将了解，前述代表本发明的某些优选实施例且不应将其解释为

限制如由以下权利要求书所界定的本发明精神或范围。

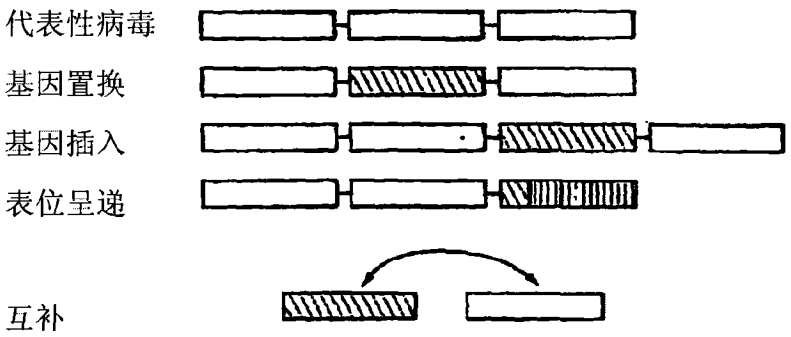

代表性病毒
基因置换
基因插入
表位呈递
互补

图 1

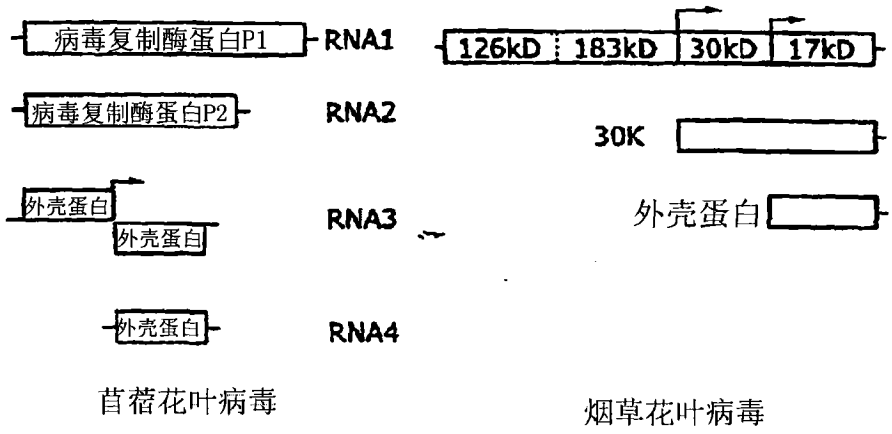

病毒复制酶蛋白P1
RNA1
126kD
183kD
30kD
17kD
病毒复制酶蛋白P2
RNA2
30K
外壳蛋白
外壳蛋白
RNA3
外壳蛋白
外壳蛋白
RNA4
苜蓿花叶病毒
烟草花叶病毒

图 2

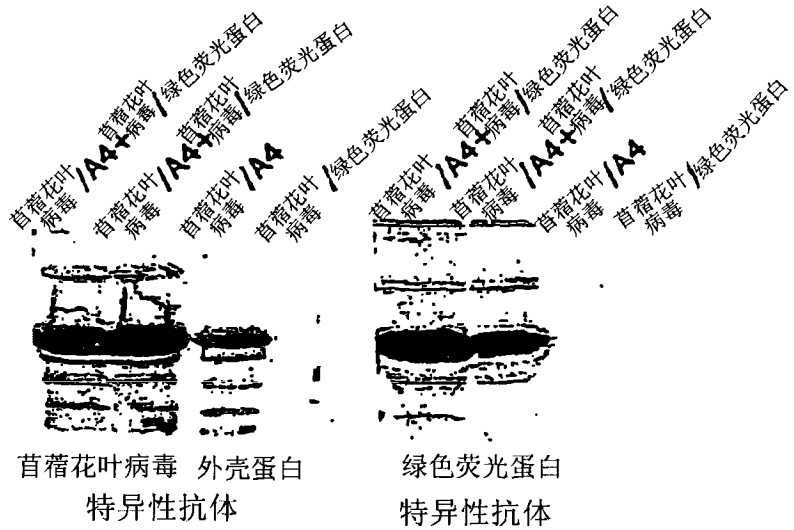
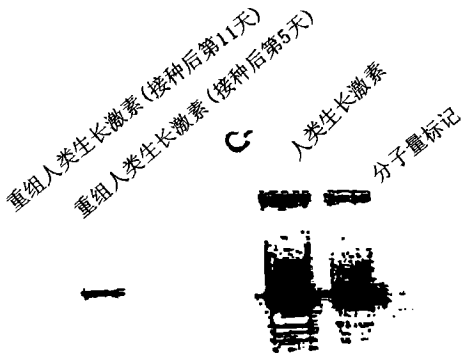

苜蓿花叶病毒/A4+绿色荧光蛋白
苜蓿花叶病毒/A4
苜蓿花叶病毒/绿色荧光蛋白
苜蓿花叶病毒/A4+绿色荧光蛋白
苜蓿花叶病毒/A4
苜蓿花叶病毒/绿色荧光蛋白
苜蓿花叶病毒 外壳蛋白
特异性抗体
绿色荧光蛋白
特异性抗体

图 3



人类生长激素 特异性抗体

图 4

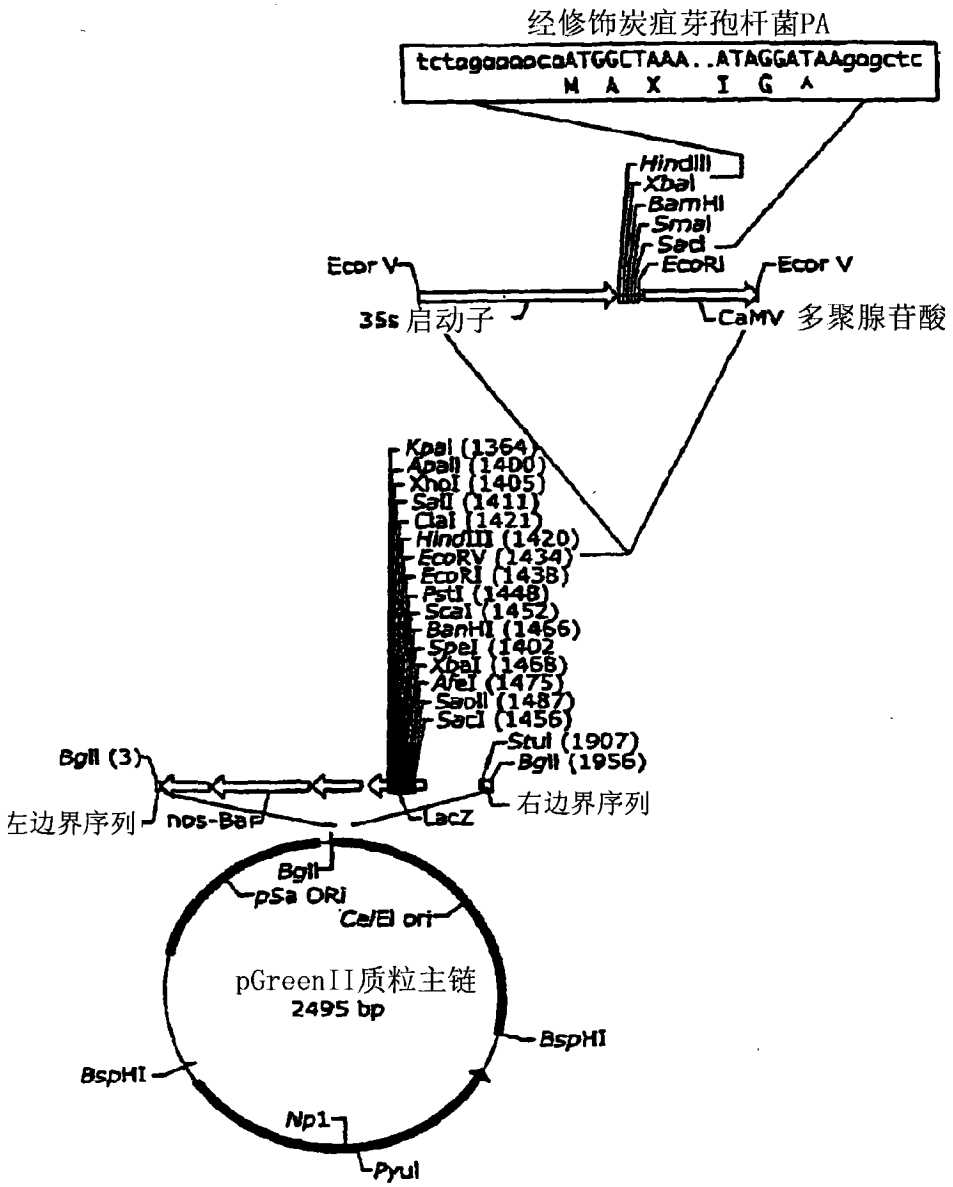

经修饰炭疽芽孢杆菌PA
tctagaaaaccaATGGCTAAA..ATAGGATAAgagctc
M A X I G A
HindIII
XbaI
BamHI
SmaI
SacI
EcoRI
Ecor V
Ecor V
35s 启动子
CaMV 多聚腺苷酸
KpaI (1364)
ApaII (1400)
XhoI (1405)
SalI (1411)
ClaI (1421)
HindIII (1420)
EcoRV (1434)
EcoRI (1438)
PstI (1448)
ScaI (1452)
BamHI (1466)
SpeI (1402
XbaI (1468)
AfeI (1475)
SacII (1487)
SacI (1456)
StuI (1907)
BglI (1956)
BglI (3)
左边界序列
nos-Bap
LacZ
右边界序列
BglI
pSa ORi
CelEi ori
pGreenII质粒主链
2495 bp
BspHI
BspHI
Np1
PyuI

图 5

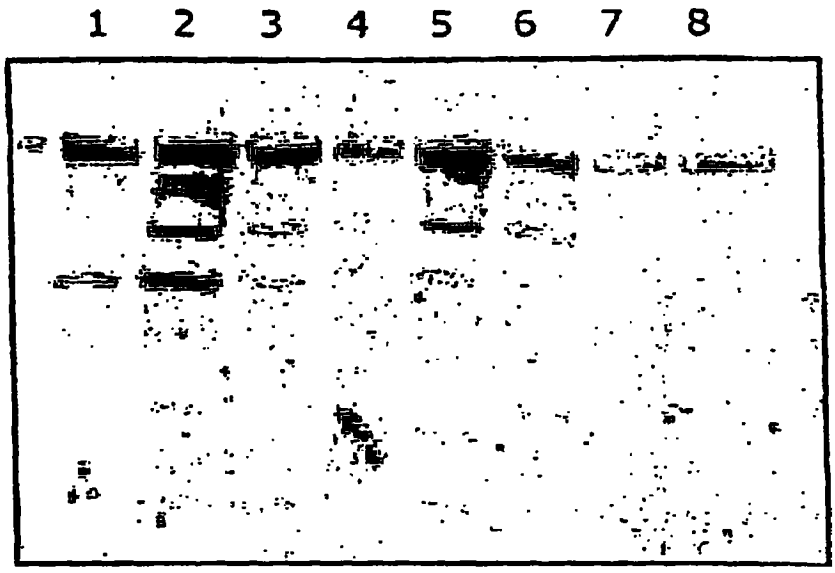


图 6

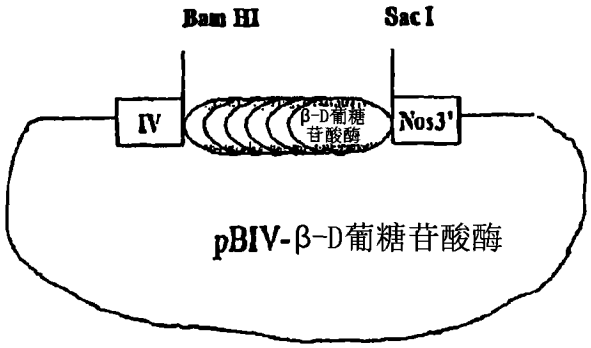


图7B

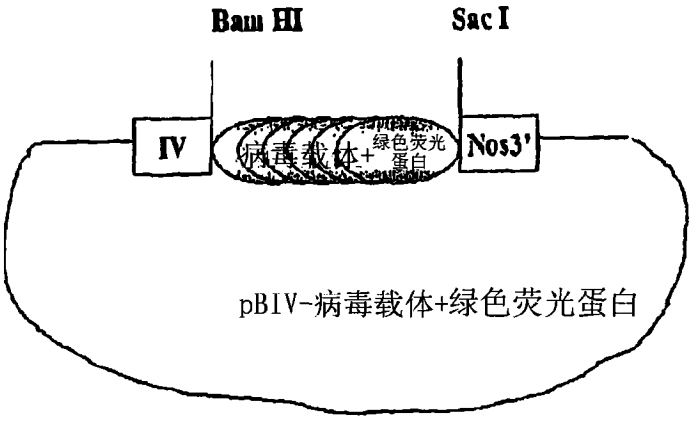

Bam HI
Sac I
IV
病毒载体+
绿色荧光蛋白
Nos3'
pBIV-病毒载体+绿色荧光蛋白

图7D

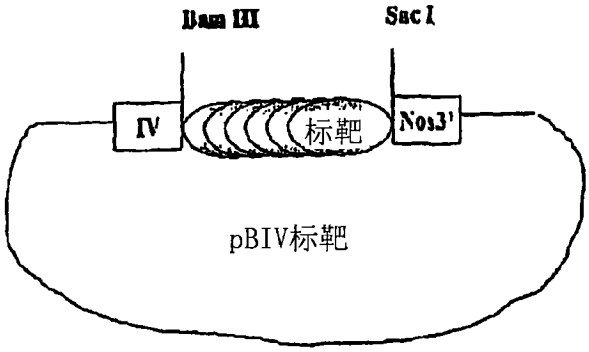

Bam HI
Sac I
IV
标靶
Nos3'
pBIV标靶

图7A

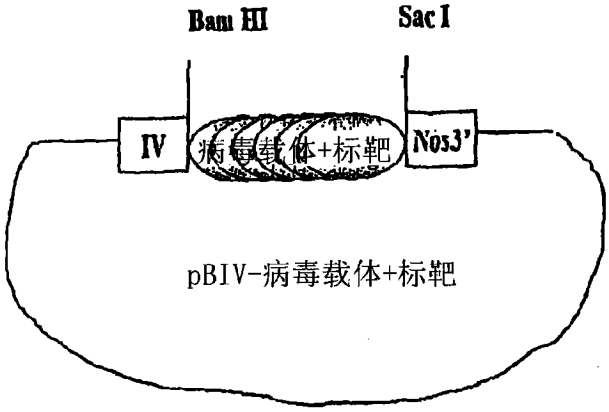


图7C

在农杆菌渗透绿豆芽后β-D葡糖苷酸酶染色

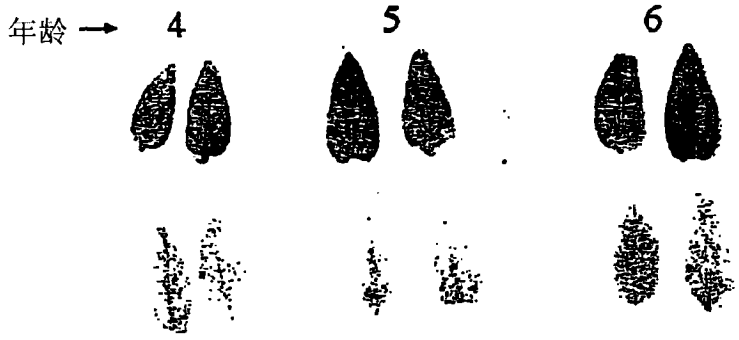


图 8A

在农杆菌渗透葫芦巴芽后β-D葡糖苷酸酶染色



酪氨酸磷酸酶样蛋白

图 8B

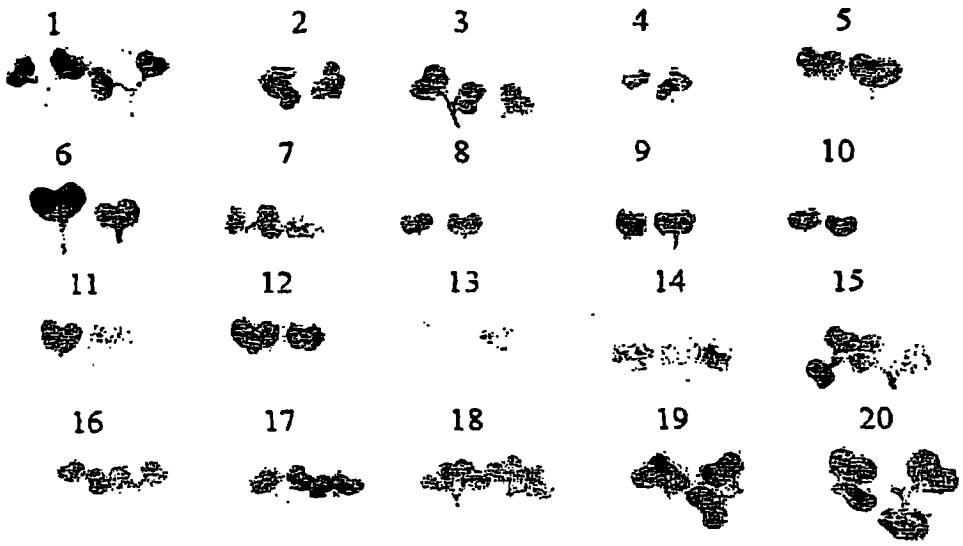


图 9A

所测试的幼芽：

芸苔属

拉丁名	品种	常用名	供应商
1 大叶芥菜	嫩绿	芥菜	海尔路姆种子公司
2 大叶芥菜	绿波	芥菜	海尔路姆种子公司
3 大叶芥菜	佛罗里达宽叶	芥菜	海尔路姆种子公司
4 大叶芥菜	南方巨大卷曲	芥菜	海尔路姆种子公司
5 大叶芥菜	来自努赛克公司	芥菜	努赛克公司
6 大叶芥菜	嫩绿	芥菜，印度博尔普公司	
7 甘蓝	俄罗斯红无头甘蓝	无头甘蓝	海尔路姆种子公司
8 甘蓝	矮小的蓝色卷曲无头甘蓝	无头甘蓝	海尔路姆种子公司
9 甘蓝	早期西伯利亚无头甘蓝	无头甘蓝	海尔路姆种子公司
10 甘蓝	冬季红色无头甘蓝	无头甘蓝	海尔路姆种子公司
11 甘蓝	先知羽衣甘蓝	羽衣甘蓝	海尔路姆种子公司
12 甘蓝	佐治亚羽衣甘蓝	羽衣甘蓝	海尔路姆种子公司
13 甘蓝	莫里斯汉鼎羽衣甘蓝	羽衣甘蓝	海尔路姆种子公司
14 甘蓝	早熟白色茎蓝	大头菜	海尔路姆种子公司
15 甘蓝	早熟紫色茎蓝	大头菜	海尔路姆种子公司
16 芸苔	七头	萝卜	博尔普公司
17 芸苔属小松菜	东京	日本菠菜	长荣Y. H. 公司
18 抱子甘蓝	雪球X	花椰菜	美国种子公司
19 芥兰	早熟金土地	卷心菜	美国种子公司
20 芜青	玉塔	大白菜	阿格威公司
21 赤豆		红豆	
22 红花苜蓿		红三叶草	
23 紫花苜蓿		苜蓿	
24 绿豆		绿豆	
25 葫芦巴		葫芦巴	

图 9B



图 10

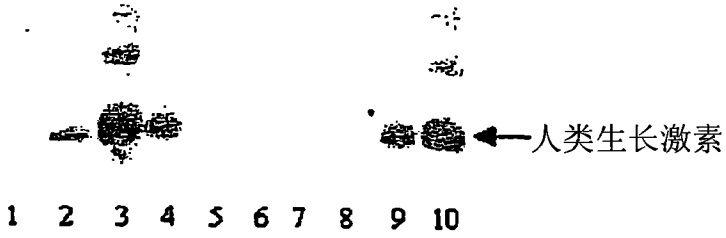


图 11

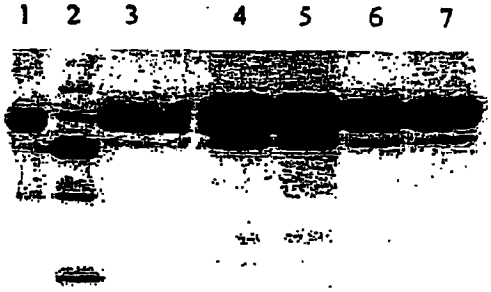


图 12

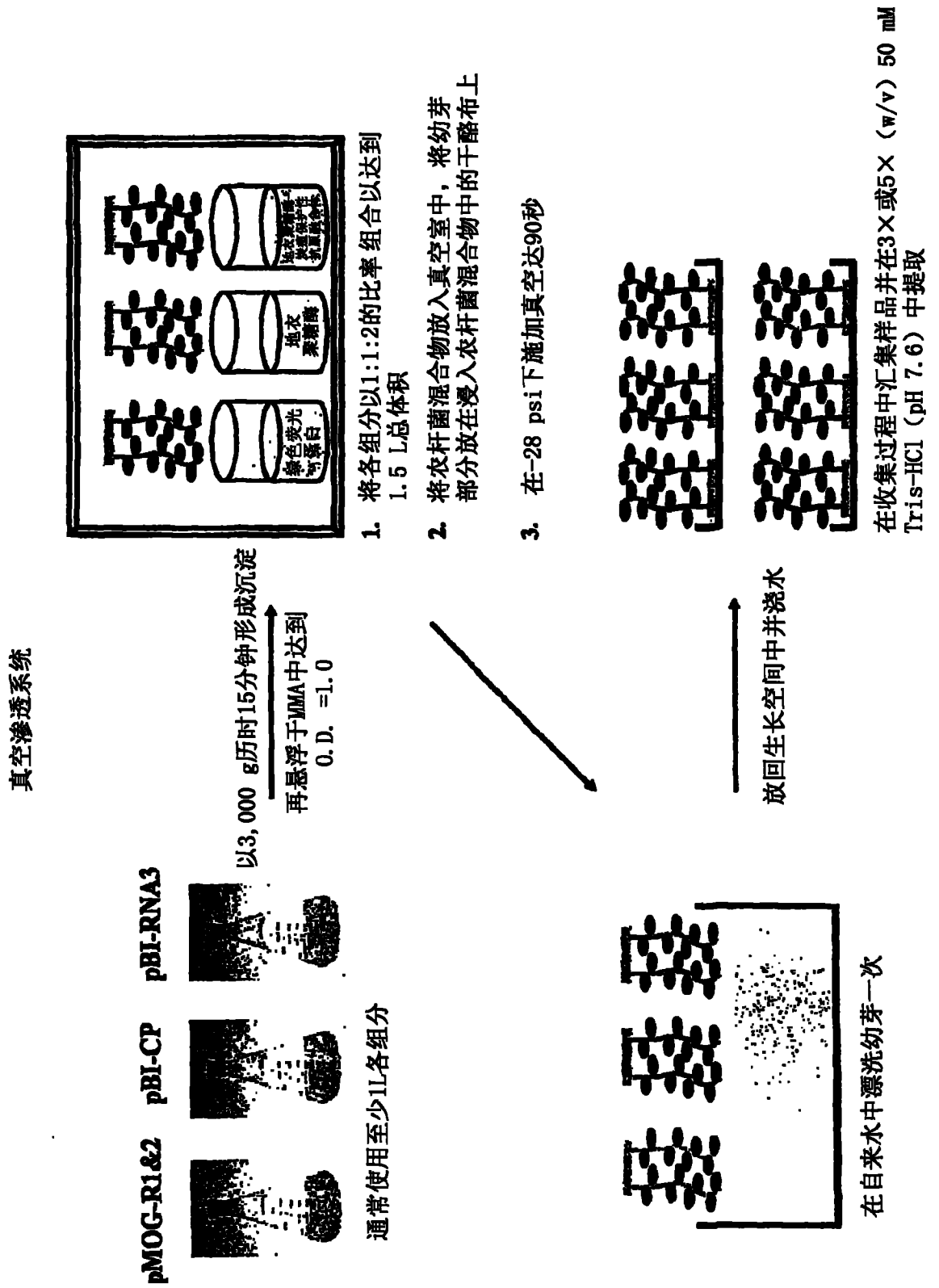
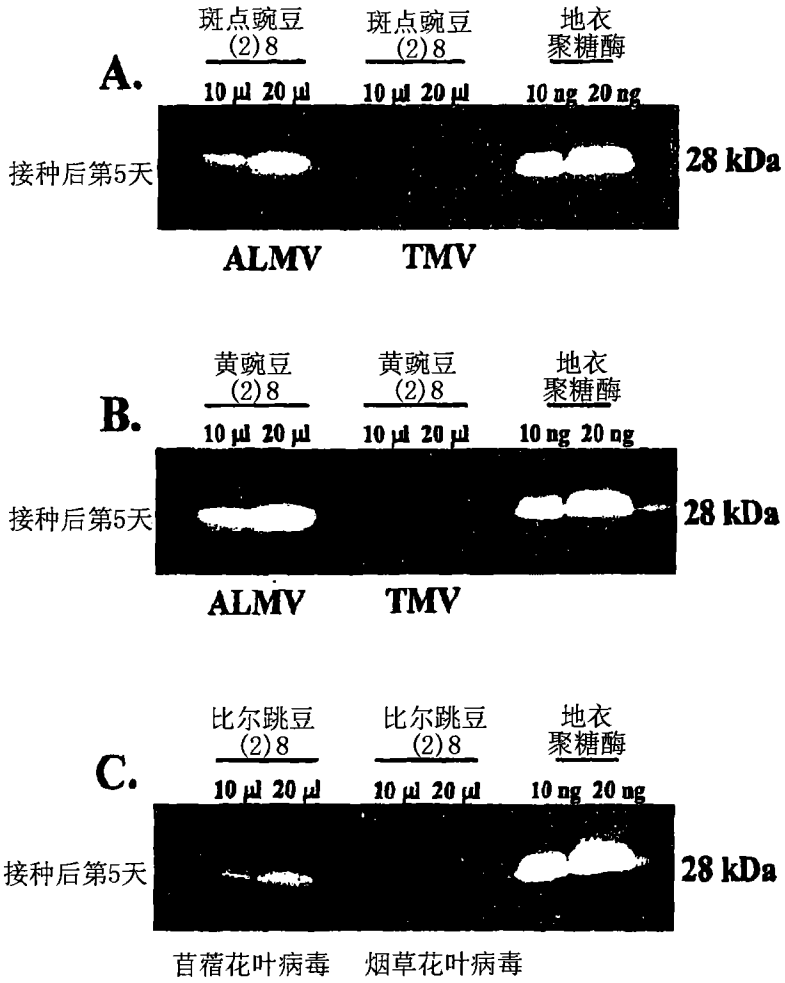

真空渗透系统
pMOG-R1&2
pBI-CP
pBI-RNA3
通常使用至少1L各组分
以3,000 g历时15分钟形成沉淀
再悬浮于MMA中达到
0.D. =1.0
1. 将各组分以1:1:2的比率组合以达到1.5 L总体积
2. 将农杆菌混合物放入真空室中，将幼芽部分放在浸入农杆菌混合物中的干酪布上
3. 在-28 psi下施加真空达90秒
放回生长空间中并浇水
在自来水中漂洗幼芽一次
在收集过程中汇集样品并在3×或5×（w/v）50 mM Tris-HCl（pH 7.6）中提取

图13

检测豌豆品种中地衣聚糖酶活性



1. 通过在存在完全MMA的情况下施加真空达90秒来说明三种绿豌豆品种中地衣聚糖酶的活性

2. 经由酶谱，黄豌豆具有最高表达，随后为斑点豌豆和比尔跳豆。

3. 在这些实验中，苜蓿花叶病毒载体系统得到比烟草花叶病毒系统更高的产量。

图14

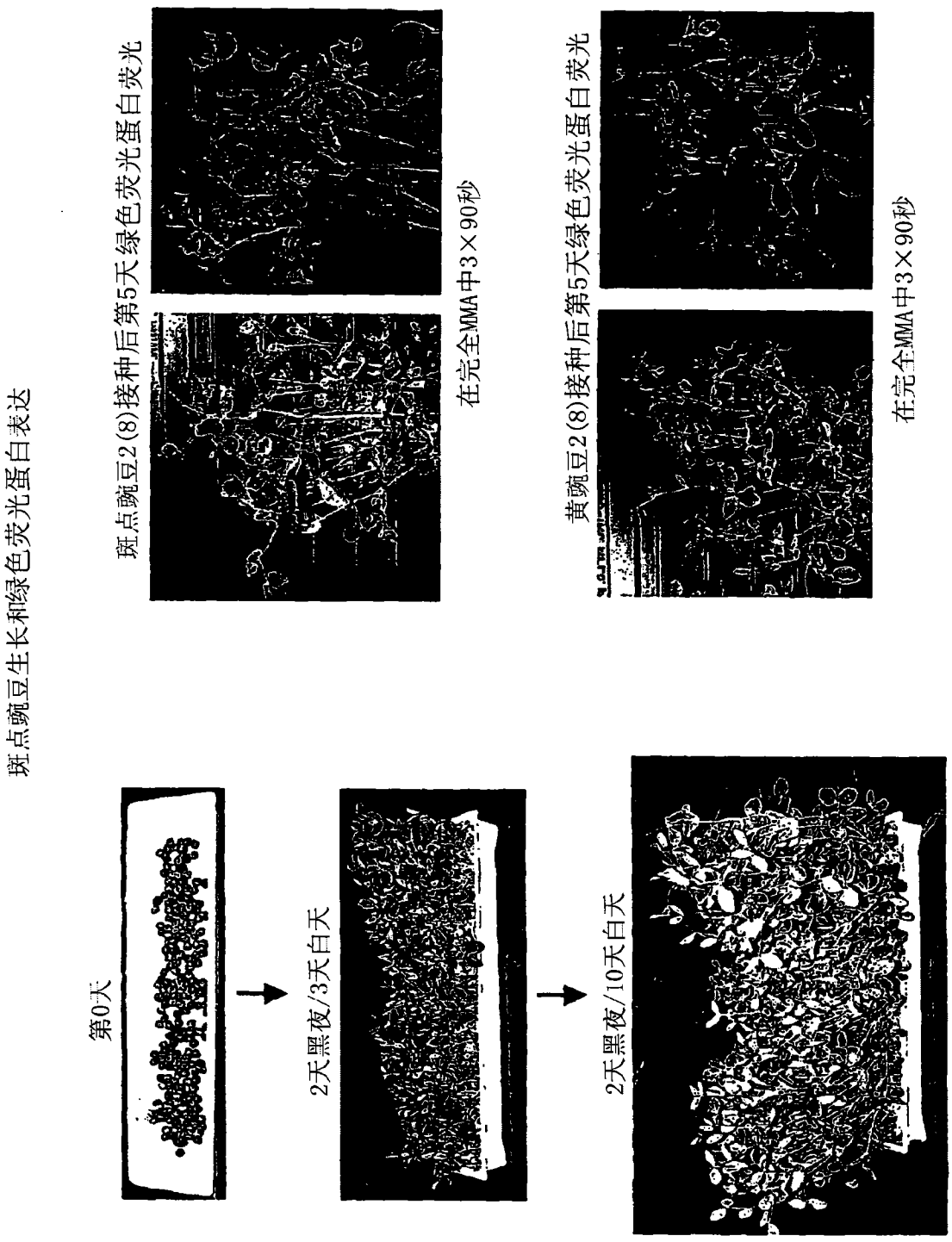

斑点豌豆生长和绿色荧光蛋白表达
第0天
2天黑夜/3天白天
2天黑夜/10天白天
斑点豌豆2(8)接种后第5天绿色荧光蛋白荧光
在完全MMA中3×90秒
黄豌豆2(8)接种后第5天绿色荧光蛋白荧光
在完全MMA中3×90秒

图15

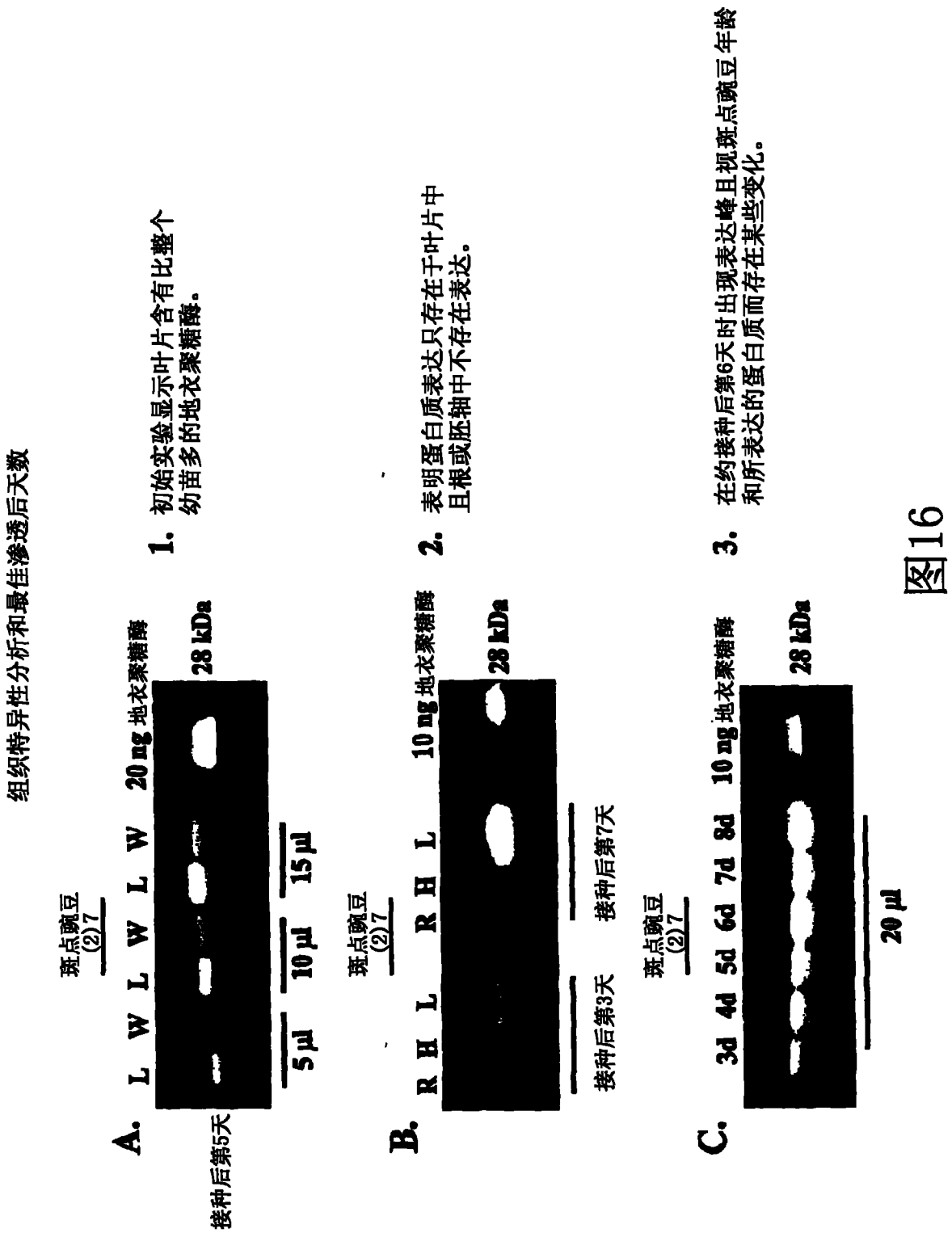

组织特异性分析和最佳渗透后天数
A.
斑点豌豆
(2)7
L W L W L W 20 ng 地衣聚糖酶
28 kDa
接种后第5天
5 µl 10 µl 15 µl
1. 初始实验显示叶片含有比整个幼苗多的地衣聚糖酶。
B.
斑点豌豆
(2)7
R H L R H L 10 ng 地衣聚糖酶
28 kDa
接种后第3天 接种后第7天
2. 表明蛋白质表达只存在于叶片中且根或胚轴中不存在表达。
C.
斑点豌豆
(2)7
3d 4d 5d 6d 7d 8d 10 ng 地衣聚糖酶
28 kDa
20 µl
3. 在约接种后第6天时出现表达峰且视斑点豌豆年龄和所表达的蛋白质而存在某些变化。

图16

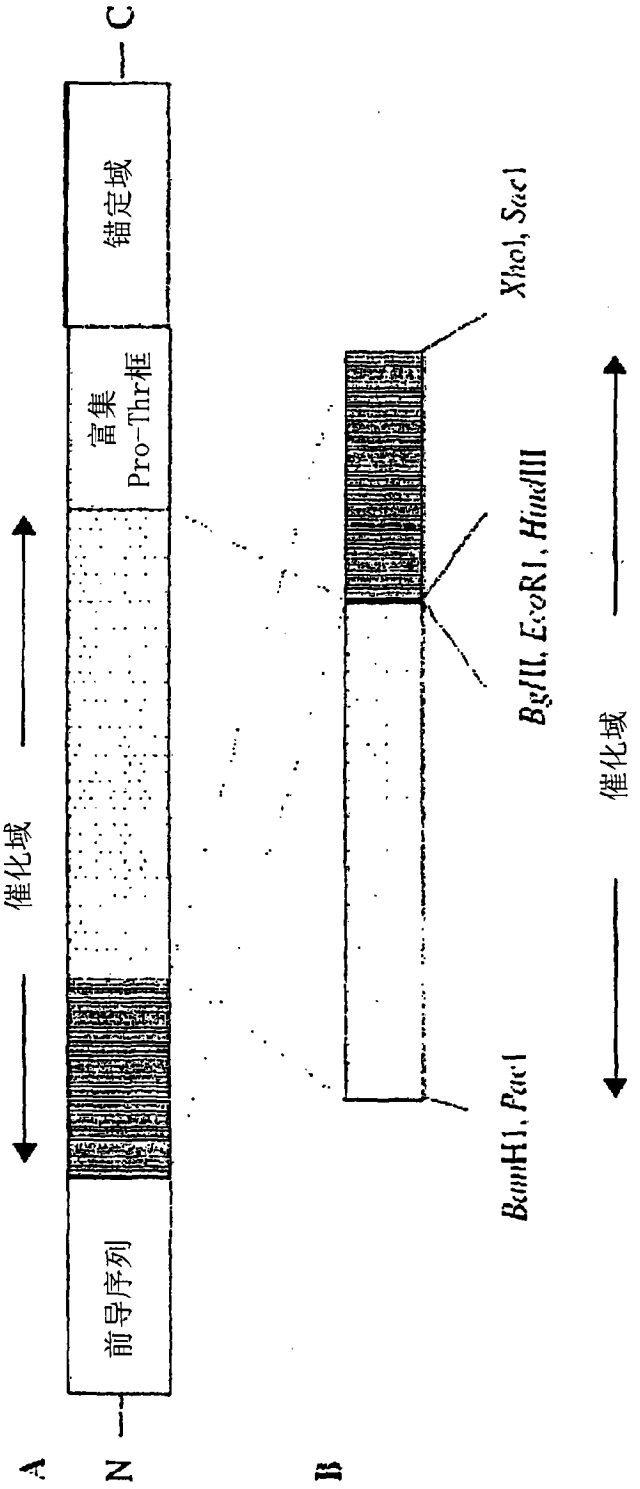

A
N
前导序列
催化域
富集
Pro-Thr框
锚定域
C
B
BamH1, Pac1
BglII, EcoR1, HindIII
XhoI, SacI
催化域

图17

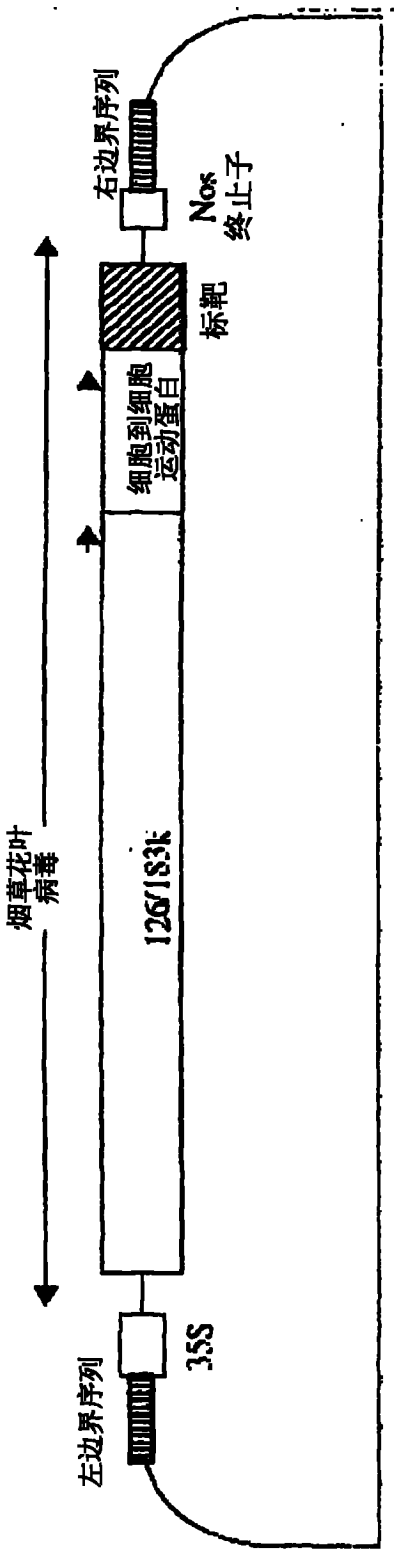


图18

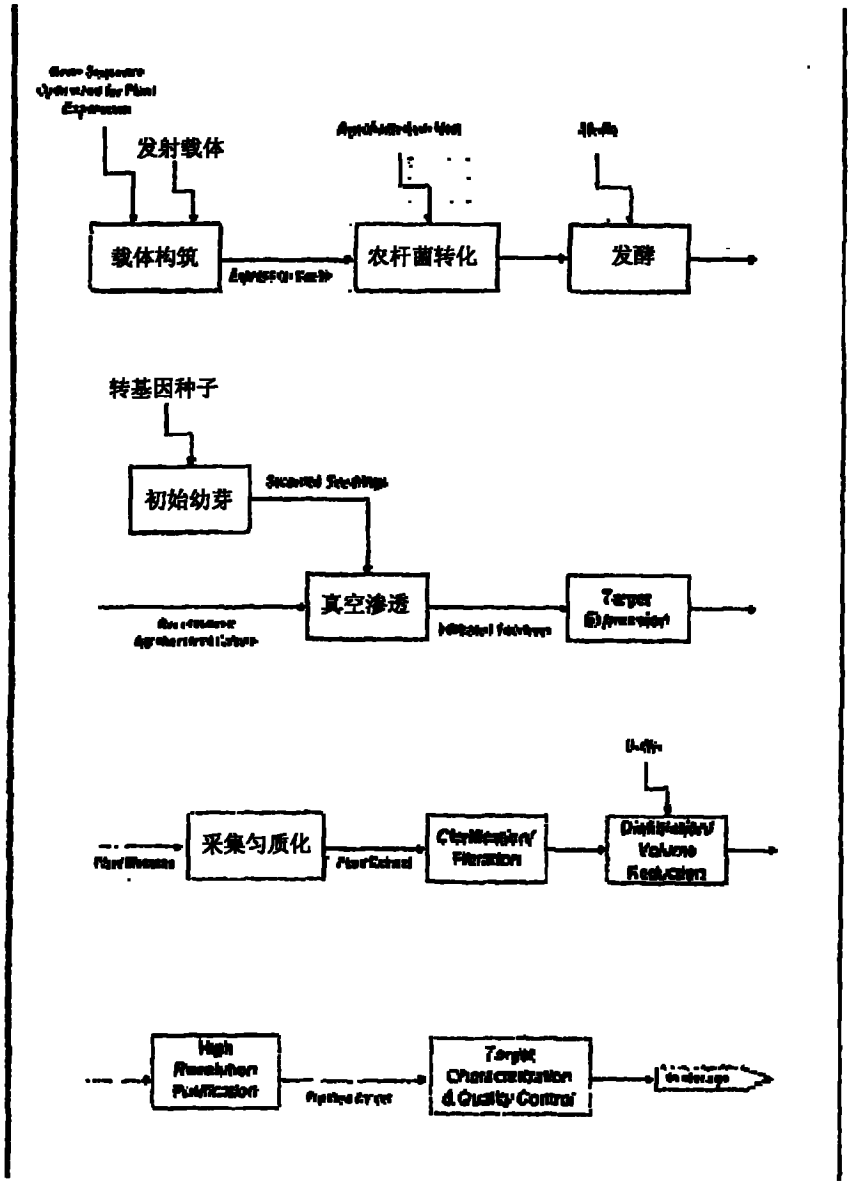

发射载体
载体构筑
农杆菌转化
发酵
转基因种子
初始幼芽
真空渗透
采集匀质化
High Resolution Purification
Target Characterization & Quality Control

图19

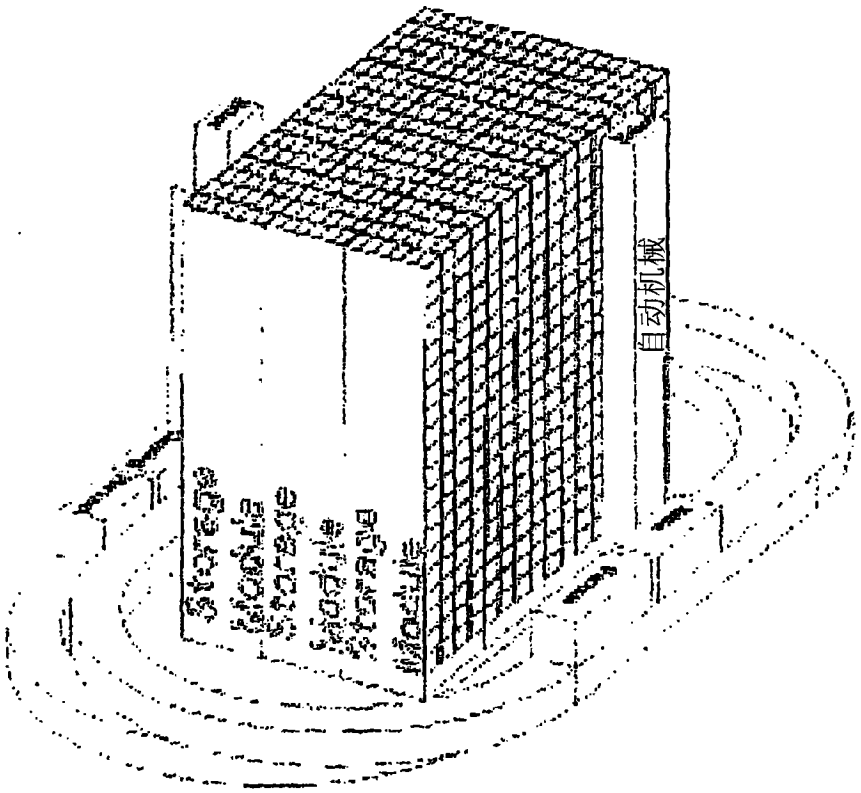


图20