

(11) Número de Publicação: **PT 1097211 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/15 (2006.01) **C12N 15/18** (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01) **C12N 15/82** (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01) **A01H 5/00** (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1999.07.10**

(30) Prioridade(s): **1998.07.10 US 113244**
1999.05.21 US 316847

(43) Data de publicação do pedido: **2001.05.09**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.04.18**
035/2007

(73) Titular(es):

CALGENE LLC

1920 FIFTH STREET DAVIS, CA 95616

US

(72) Inventor(es):

KEVIN E. MCBRIDE

US

JEFFREY M. STAUB

US

DAVID M. STALKER

US

NARENDER NEHRA

US

DOUGLAS A. RUSSELL

US

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS

RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **EXPRESSÃO DE PÉPTIDOS EUCARIÓTICOS EM PLASTOS VEGETAIS**

(57) Resumo:

RESUMO**"EXPRESSÃO DE PÉPTIDOS EUCARIÓTICOS EM PLASTOS VEGETAIS"**

São proporcionadas construções e métodos para expressão de péptidos derivados de organismos eucarióticos em plastos vegetais. As construções possuem um promotor funcional num plasto vegetal, uma sequência de ADN codificando um péptido derivado de um organismo eucariótico e uma região de terminação da transcrição. Outros elementos incluem um marcador seleccionável para selecção de células vegetais compreendendo um plasto expressando o marcador e regiões de ADN com homologia com o genoma do plasto e opcionalmente um local de ligação ao ribossoma ligado ao promotor. Através de métodos que utilizam tais construções são produzidos níveis elevados de péptidos eucarióticos, tais como proteínas de mamífero, numa célula vegetal através da cultura de células vegetais sob condições através das quais são expressas as sequências de ADN de codificação para produzir o péptido eucariótico no referido plasto.

DESCRIÇÃO

"EXPRESSÃO DE PÉPTIDOS EUCARIÓTICOS EM PLASTOS VEGETAIS"

INTRODUÇÃO

Campo Técnico

Este invento refere-se à aplicação de técnicas de engenharia genética a plantas. Especificamente, o invento refere-se a composições e métodos para aumentar a expressão de proteínas em plastos vegetais.

Antecedentes

Os plastos das plantas superiores são um alvo atractivo para a engenharia genética. Os plastos vegetais (cloroplastos, amiloplastos, elaioplastos, etioplastos, cromoplastos, etc.) são os principais centros biossintéticos que, para além da fotossíntese, são responsáveis pela produção de compostos industrialmente importantes tais como aminoácidos, hidratos de carbono complexos, ácidos gordos e pigmentos. Os plastos são derivados de um precursor comum conhecido como protoplasto e assim os plastos presentes numa dada espécie vegetal possuem todos o mesmo conteúdo genético. As células vegetais contêm 500-10000 cópias de um pequeno genoma circular de 120-160 quilobases, cada

molécula destas possui uma grande (aproximadamente 25 kb) repetição invertida. Assim, é possível modificar células vegetais para conterem até 20000 cópias de um determinado gene de interesse que possa potencialmente resultar em níveis muito elevados de expressão de genes estranhos. Além disso, os plastos da maioria das plantas são maternamente herdados. Consequentemente, ao contrário dos genes heterólogos expressos no núcleo, os genes heterólogos expressos nos plastos não são disseminados pelo pólen, por isso uma característica introduzida num plasto vegetal não será transmitida a parentes de tipo selvagem.

Permanece a necessidade de melhores elementos reguladores para expressão de genes num plasto vegetal. Até à data, os sinais de expressão utilizados rotineiramente para expressão de transgenes em plastos derivam de genes endógenos dos plastos. Os sinais de expressão em plastos são tipicamente derivados de regiões promotoras de genes altamente expressos em plastos tais como as regiões promotoras do operão do ARN ribossómico 16S (*Prrn*), do gene *psbA* (*PpsbA*) ou do gene *rbcL* (*PrbcL*). Os genes *psbA* e *rbcL* são altamente transcritos, mas a sua tradução é controlada por factores específicos do tecido e factores regulados pela luz que limitam a sua utilidade. No caso de *Prrn*, um local de ligação ao ribossoma (RBS) sintético modelado a partir do líder do gene *rbcL* do plasto tem sido tipicamente utilizado para dirigir a tradução. No entanto, este *Prrn*/RBS é traduzido ineficientemente devido a uma fraca ligação ao ribossoma.

Os plastos das plantas superiores apresentam um alvo atractivo para a engenharia genética. Tal como mencionado acima, os plastos das plantas superiores são maternamente herdados. Isto oferece uma vantagem para a engenharia genética de plantas para tolerância ou resistência a condições naturais ou químicas, tais como tolerância a herbicidas, uma vez que estas características não serão transmitidas aos parentes de tipo selvagem. Além disso, a expressão a elevado nível de genes estranhos é atractiva para características concebidas tais como a produção de proteínas farmacologicamente importantes.

A expressão de sequências de ácido nucleico codificando para enzimas que proporcionam tolerância a herbicidas assim como proteínas farmacêuticas a partir do genoma de plastos vegetais oferece uma alternativa atractiva à expressão a partir do genoma nuclear vegetal.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona sequências de ácido nucleico úteis no aumento da expressão de uma larga variedade de genes, tanto eucarióticos como procarióticos, em plastos vegetais. Para além disso, são proporcionadas construções de expressão de plastos que são úteis para engenharia genética de células vegetais e que proporcionam uma maior expressão das proteínas EPSP-sintetases ou da proteína hGH em plastos de células vegetais. Os plastos

transformados devem ser plastos metabolicamente activos e de preferência mantidos a um número elevado de cópias no tecido vegetal de interesse, de maior preferência os cloroplastos que se encontram nos tecidos verdes das plantas, tais como folhas ou cotilédones.

O invento proporciona assim:

1) uma construção compreendendo os seguintes componentes no sentido da transcrição de 5' para 3':

a) uma sequência promotora do operão do ARN ribossómico 16S (daqui em diante "Prn");

b) um local de ligação ao ribossoma ligado ao referido componente promotor (a), em que o referido local de ligação ao ribossoma é derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7;

c) uma sequência de ADN codificando um péptido derivado de um organismo eucariótico; e

d) uma região de terminação da transcrição,

em que o referido péptido eucariótico é diferente de um péptido de uma planta;

2) um método para produção de uma proteína numa célula vegetal, em que o referido método compreende a transformação de plastos da referida célula vegetal com uma construção compreendendo o seguinte como componentes operativamente ligados no sentido da transcrição de 5' para 3':

a) uma sequência promotora do operão do ARN ribossómico 16S (daqui em diante "Prn");

b) um local de ligação ao ribossoma ligado ao referido componente promotor (a), em que o referido local de ligação ao ribossoma é derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7;

c) uma sequência de ADN codificando um péptido derivado de uma célula eucariótica diferente de um péptido de um plasto vegetal; e

d) uma região de terminação da transcrição,

e células vegetais em crescimento compreendendo os referidos plastos transformados sob condições em que a referida sequência de ADN é expressa para produzir o referido péptido eucariótico no referido plasto;

3) um método para produção de uma proteína com um terminal N sem metionina num plasto, em que o referido método compreende:

transformação de um plasto com uma construção compreendendo, como componentes operativamente ligados no sentido da transcrição de 5' para 3':

a) uma sequência promotora do operão do ARN ribossómico 16S (Prn);

b) um local de ligação ao ribossoma ligado ao referido componente promotor (a), em que o referido local de ligação ao ribossoma é derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7;

c) uma sequência de ADN codificando um péptido de ubiquitina clivável;

d) uma sequência de ADN codificando uma proteína de interesse, e

e) uma região de terminação da transcrição; e

criação de uma célula vegetal compreendendo o referido plasto transformado sob condições adequadas para expressão da referida proteína de interesse e da referida sequência de ubiquitina clivável no referido plasto,

4) um método de produção de uma proteína com um terminal N sem metionina num plasto, em que o referido método compreende:

transformação de um plasto com uma construção compreendendo, como componentes operativamente ligados no sentido da transcrição de 5' para 3':

a) uma sequência promotora do operão do ARN ribossômico 16S (Prn);

b) um local de ligação ao ribossoma ligado ao referido componente promotor (a), em que o referido local de ligação ao ribossoma é derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7 ou é o local rbcLRBS;

c) uma sequência de ADN codificando uma proteína de interesse, em que a referida proteína de interesse é capaz de ser reconhecida por uma Metionina-Amino-Peptidase de células vegetais, e

d) uma região de terminação da transcrição; e cultura de uma célula vegetal compreendendo o referido plasto transformado sob condições adequadas para expressão da referida proteína de interesse possuindo um terminal N sem metionina.

As construções de expressão de plastos para

utilizar neste invento incluem uma região promotora de plastos capaz de proporcionar uma maior expressão de uma sequência de ADN, uma sequência de ADN codificando uma proteína EPSPS ou a hormona de crescimento humana (hGH) e uma região de terminação da transcrição capaz de terminar a transcrição num plasto vegetal.

A região promotora de plastos do presente invento é ligada a um local de ligação ao ribossoma que proporcione uma maior tradução de transcritos de ARNm num plasto vegetal.

A construção de expressão de plastos deste invento é de preferência ligada a uma construção possuindo uma sequência de ADN codificando um marcador seleccionável que possa ser expresso num plasto vegetal. A expressão do marcador seleccionável permite a identificação de células vegetais compreendendo um plasto que expressa o marcador.

Numa concretização preferida, os vectores para transferência da construção para uma célula vegetal incluem meios para inserção das construções de expressão e selecção no genoma do plasto. Os vectores compreendem de preferência regiões de homologia com o genoma do plasto alvo que flanqueiam as construções.

As construções do presente invento compreendem uma sequência promotora Prn ligada a um local de ligação ao ribossoma capaz de aumentar a tradução de transcritos de

ARNm no plasto vegetal. O local de ligação ao ribossoma é derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7.

De particular interesse no presente o invento é o elevado nível de expressão de sequências de ácido nucleico em plastos vegetais. De particular interesse é o elevado nível de expressão de sequências de ácido nucleico codificando para enzimas envolvidas em tolerância a herbicidas e codificando para proteínas farmacêuticas.

As construções do presente invento compreendem de preferência uma sequência de ADN codificando a 5-Enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintetase (US 5633435), nitrilase, fitoeno-dessaturase, aprotinina ou uma sequência de ADN codificando a hormona de crescimento humana (US 5424199).

Plastos de células vegetais contendo as construções estão também contemplados no invento, tal como o são plantas, sementes de plantas, células vegetais ou a descendência destas contendo plastos compreendendo a construção.

O presente invento inclui também métodos para maior expressão de sequências de ADN em plastos vegetais.

O invento inclui também um método para a expressão aumentada de uma enzima codificando hGH em plastos da célula vegetal.

O presente invento inclui ainda métodos para obtenção de uma proteína expressa a partir de uma célula vegetal, incluindo um plasto, possuindo um terminal N sem metionina. Para além disso, estão contempladas células vegetais e plastos que incluem proteínas com um terminal N sem metionina.

Assim, o presente invento refere-se a um gene quimérico contendo uma sequência de codificação de uma proteína farmacêutica, um vector de expressão em plastos vegetais contendo um promotor Prn operativamente ligado a um local de ligação ao ribossoma do gene 10 da Polimerase do Bacteriófago T7 capaz de maior expressão num plasto vegetal operativamente ligado a um gene de tolerância a herbicida ou codificando uma proteína farmacêutica, um vector de transformação de plantas possuindo inserido nele um gene de tolerância a herbicida ou codificando para uma proteína farmacêutica expresso a partir de um promotor Prn ligado a um local de ligação ao ribossoma do gene 10 da Polimerase do Bacteriófago T7, células vegetais transformadas utilizando tais vectores e plantas regeneradas a partir destas exibindo um grau substancial de expressão de sequências de ácido nucleico, e proteínas e métodos para produzir tais células e tais plantas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a sequência nucleotídica do local de ligação ao ribossoma de G10L.

A Figura 2 proporciona uma sequência de amino-ácidos codificando para aprotinina.

A Figura 3 proporciona os resultados da análise de RP-HPLC para caracterização da proteína hGH expressa no plasto. O Pico I (o pico mais alto) indica o tempo de retenção previsto para a GP2000 de 22 kDa nativa, correctamente dobrada.

A Figura 4 proporciona uma análise de espectrometria de massa (EM) de ionização por electrospray utilizando um espectrómetro de massa de tempo de voo de electrospray Micromass Q-Tof. Em particular, é proporcionada uma série de iões correspondendo à(s) espécie(s) presente(s) na amostra com um número variável de protões unidos. Os eixos do espectro são a intensidade *versus* a razão de massa para carga da(s) espécie(s) presente(s).

A Figura 5 proporciona uma representação gráfica da bioactividade de hGH expressa a partir de um plasto vegetal. As amostras representadas no gráfico são prolactina bovina (bPL), hGH expressa a partir de *E. coli* (Ala-hGH), e um transgénico nulo adicionado com prolactina bovina (SPFF Nulo com Adição) como controlos positivos, um transgénico nulo (SPFF Nulo) como controlo negativo, e amostras transgénicas de uma coluna de Sepharose (Amostra de SPFF, Amostra de SPFF) e uma amostra transgénica eluída a partir da coluna de Sepharose a pH 3,5 (SPFF pH 3,5 Eln).

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

De acordo com o presente invento, são proporcionadas construções de expressão de plastos que compreendem um promotor Prrn que é funcional num plasto vegetal, um local de ligação ao ribossoma derivado do líder do gene 10 da Polimerase do Bacteriófago T7, uma sequência de ADN codificando para um gene de interesse e uma região de terminação da transcrição capaz de terminar a transcrição num plasto vegetal. Estes elementos são proporcionados como componentes operativamente ligados no sentido da transcrição de 5' para 3'.

Para além disso, as construções do presente invento podem também incluir uma sequência de ácido nucleico codificando um péptido capaz de direccionar a referida sequência de ADN codificando uma proteína para o lúmen do tilacóide dentro do cloroplasto.

De particular interesse no presente invento são métodos para a produção de proteínas num plasto de uma célula vegetal hospedeira possuindo um terminal N sem metionina. Tais métodos envolvem geralmente a utilização de proteínas de fusão possuindo uma sequência N-terminal que é reconhecida por uma protease endógena. Em particular, uma sequência de ADN codificando um péptido de ubiquitina clivável é fundida com uma sequência de ADN codificando uma proteína de interesse. Após a expressão da proteína de

fusão no plasto, uma protease endógena actua na fusão para clivar a porção de ubiquitina da proteína.

Também de interesse no presente invento é a utilização das construções de expressão em plastos para dirigir a transcrição e tradução de elevado nível (expressão) de sequências de ácido nucleico. Tais construções de expressão em plastos encontram utilização na direcção da expressão de elevado nível de sequências de ADN codificando para enzimas envolvidas em tolerância a herbicidas ou codificando para a produção de proteínas farmacêuticas.

De mais particular interesse no presente invento é a utilização das construções de expressão de plastos para dirigir a tradução de elevado nível de ARN mensageiro transcrito.

A sequência de ADN e os dados bioquímicos revelam uma semelhança das maquinarias de transcrição e tradução dos organelos dos plastos e dos sinais de iniciação para estas verificados em sistemas procarióticos. De facto, foi relatado que sequências promotoras derivadas de plastos dirigem a expressão de genes repórter em células procarióticas. Além disso, os genes dos plastos estão frequentemente organizados em operões policistrónicos tal como estão nos procariotas.

Apesar das aparentes semelhanças entre plastos e

procariotas, existem diferenças fundamentais nos métodos utilizados para controlar a expressão génica em plastos e procariotas. Em oposição aos mecanismos de controlo da transcrição tipicamente observados em procariotas, a expressão génica em plastos é predominantemente controlada ao nível da tradução e da estabilidade do ARNm através de proteínas que actuam em *trans* codificadas pelo núcleo.

A tradução é um processo em múltiplos passos que envolve primeiro a ligação do ARN mensageiro (ARNm) aos ribossomas. Começando no codão de início da tradução, os codões do ARNm são lidos sequencialmente à medida que os ribossomas se movem ao longo da molécula de ARNm. Os aminoácidos especificados são então adicionados sequencialmente à cadeia polipeptídica em crescimento para produzir a proteína ou o polipéptido codificado no ARNm.

Tal como mencionado, o primeiro passo no processo de tradução é a ligação da molécula de ARNm ao ribossoma. A natureza desta interacção (*i.e.* ligação) foi apenas parcialmente elucidada. A análise de oligonucleótidos resistentes a ARNases isolados de complexos bacterianos de iniciação da tradução indica que um fragmento de ARN de aproximadamente 30 a 40 nucleótidos de comprimento compreende o local de ligação ao ribossoma (RBS) inicial. Assim, um RBS é daqui em diante entendido como compreendendo uma sequência de ARNm que rodeia o codão de iniciação da tradução que é responsável pela ligação do ribossoma e pela iniciação da tradução.

Recentemente, foram identificados locais de ligação ao ribossoma que são capazes de dirigir a tradução em procariotas. Por exemplo, foi identificado um local de ligação ao ribossoma derivado do líder do gene 10 do bacteriófago T7, G10L (US 5232840), que aumenta a expressão de sequências de ácido nucleico em procariotas.

Herbicidas tais como N-fosfometilglicina, hidroxibenzonitrilos halogenados e norflurazon foram objecto de muita investigação.

A N-fosfometilglicina, vulgarmente referido como glifosato, inibe a via do ácido chiquímico que conduz à biossíntese de compostos aromáticos incluindo aminoácidos, hormonas vegetais e vitaminas. Especificamente, o glifosato suprime a conversão do ácido fosfoenolpirúvico (PEP) e do ácido 3-fosfochiquímico em ácido 5-enolpiruvil-3-fosfochiquímico através da inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintetase (daqui em diante referida como EPSP-sintetase ou EPSPS).

Plantas tolerantes a glifosato foram produzidas através de transformação de vários genes de EPSP-sintetase no genoma nuclear de uma planta. Um gene para a EPSP-sintetase foi clonado a partir da estirpe CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* (US 5633435) e confere um elevado nível de tolerância a glifosato nas plantas. Para além disso, foram conseguidos níveis elevados de tolerância a

glifosato em várias plantas de cultivo fundindo EPSPS com um péptido de trânsito de cloroplasto (CTP) para expressão direccionada em plastos. Além disso, foram isoladas variantes da enzima EPSPS de tipo selvagem que são tolerantes a glifosato em consequência de alterações na sequência de codificação de aminoácidos de EPSPS (Kishore e Shah, *Ann. Rev. Biochem.* 57: 627-663, 1988; Shulze et al., *Arch. Microbiol.* 137: 121-123, 1984; Kishore et al., *Fed. Proc.* 45: 1506, 1986). Estas variantes têm tipicamente uma K_i mais elevada para o glifosato do que para a enzima EPSPS de tipo selvagem que confere o fenótipo tolerante a glifosato, mas estas variantes são também caracterizadas por uma elevada K_m para PEP o que torna a enzima cineticamente menos eficiente (Kishore e Shah, *Ann. Rev. Biochem.* 57: 627-663, 1988; Sost et al., *FEBS Lett.* 173: 238-241, 1984; Shulze et al., *Arch. Microbiol.* 137: 121-123, 1984; Kishore et al., *Fed. Proc.* 45: 1506, 1986; Sost e Amrhein, *Arch. Biochem. Biophys.* 282: 433-436, 1990).

Para além de serem modificadas plantas para tolerância a glifosato, foram também modificadas plantas para tolerar outras classes de herbicidas tais como hidroxibenzonitrilos halogenados e norflurazon utilizando sequências de ácido nucleico expressas no núcleo.

É sugerido que os hidroxibenzonitrilos halogenados, tais como Bromoxinil, actuam de forma herbicida através da inibição do complexo proteico de ligação à quinona do fotossistema II, inibindo a transferência de

electrões (Van Rensen, *Physiol. Plant* 54: 515-520, 1982, e Sanders e Pallett, *Pestic. Biochem. Physiol.* 26: 116-122, 1986). Herbicidas tais como norflurazon inibem a produção de carotenóides.

As plantas que são resistentes ao Bromoxynil foram produzidas através da expressão de sequências de ADN codificando para enzimas capazes de desintoxicar o Bromoxynil (nitrilases) no núcleo da célula vegetal. As sequências de ADN codificando para tais nitrilases foram clonadas a partir de bactérias tais como *Klebsiella pneumoniae* e utilizadas para construir vectores para dirigir a expressão da sequência de ADN no núcleo da célula vegetal (US 4810648).

As plantas que são resistentes ao Norflurazon foram modificadas através da expressão de sequências de ácido nucleico que codificam para enzimas na via biossintética dos carotenóides em núcleos de células vegetais. Por exemplo, a expressão de uma fitoeno-dessaturase a partir de *Erwinia uredovora* proporciona tolerância ao norflurazon.

Embora as plantas transformadas para expressar sequências de ácido nucleico codificando para tais enzimas a partir do genoma nuclear tenham encontrado utilidade na engenharia de plantas tolerantes a herbicidas, seria cada vez mais benéfico obter plantas tolerantes a herbicidas através da expressão em plastos.

Nos exemplos aqui proporcionados, sequências de ADN codificando para enzimas envolvidas na tolerância a herbicidas são utilizadas em construções para dirigir a expressão das sequências a partir do plasto vegetal. Sequências de ADN codificando para a 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintetase (EPSPS), bromoxinil-nitrilase (Bxn), fitoeno-dessaturase (crtI (Misawa *et al.*, *Plant Journal* 4: 833-840, 1993, e *Plant Journal* 6: 481-489, 1994) e aceto-hidroxiácido-sintetase (AHAS (Sathasiivan *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18: 2188-2193, 1990)) são utilizadas nas construções de expressão do presente invento para dirigir a expressão das referidas sequências nucleotídicas de tolerância a herbicidas a partir do plasto vegetal.

São identificadas plantas de tabaco transplastômicas que são homoplásmicas para as sequências de ADN codificando os genes de tolerância a herbicidas. As plantas homoplásmicas demonstram um elevado nível de expressão proteica a partir do plasto. Para além disso, as plantas homoplásmicas demonstram um elevado nível de tolerância para o respectivo herbicida. Por exemplo, tal como descrito em mais detalhe no exemplo abaixo, as plantas transformadas para expressar EPSPS a partir do plasto demonstram um elevado nível de tolerância para o herbicida glifosato. Adicionalmente, linhas homoplásmicas de tabaco que expressam nitrilase ou fitoeno-dessaturase demonstram elevados níveis de tolerância aos herbicidas bromoxinilo e norflurazon, respectivamente.

Um perito na técnica a que o presente invento pertence reconhecerá que podem ser empregues mais sequências nas construções de expressão de plastos do presente invento para produzir plantas tolerantes a herbicidas. Outra sequência de ácido nucleico que pode encontrar utilização nas construções de expressão de plastos em plantas tolerantes a herbicidas incluem o gene *bar* para tolerância a glufosinato (DeBlock, *et al.*, *EMBO J.* 6: 2513-2519, 1987).

Para além disso, podem ser empregues genes adicionais de tolerância a glifosato nas construções do presente invento. Os genes de EPSPS tolerante ao glifosato adicionais são descritos em Patente U.S. Nº 5627061, Padgett *et al.*, "Herbicide Resistant Crops", Lewis Publishers, 53-85, 1996, e em Penaloza-Vazquez, *et al.*, *Plant Cell Reports* 14: 482-487, 1995.

Deve observar-se que as construções de tolerância a herbicidas do presente invento podem também incluir sequências codificando genes envolvidos noutros genes de tolerância ao stress, por exemplo genes de resistência/tolerância a insectos ou doenças. Tal como descrito mais detalhadamente nos exemplos que se seguem, as construções de expressão de plastos são utilizadas para regenerar plantas que sejam resistentes ao herbicida Buctril e que expressam também a proteína *cryIAc* de *Bacillus thuringensis*.

Adicionalmente, as construções de expressão de plastos encontram também utilização na direcção da produção de proteínas biológicas humanas (proteínas farmacêuticas) a partir do plasto vegetal. Tal como exposto em detalhe nos exemplos, são proporcionadas construções para expressão de aprotinina e hormona de crescimento humana no plasto vegetal. Outras sequências que podem encontrar utilização nas construções de expressão do presente invento para a produção de produtos biológicos humanos incluem sequências codificando para insulina ou precursores de insulina. No entanto, o perito na técnica reconhecerá que muitas sequências nucleotídicas codificando para produtos biológicos humanos podem ser empregues nas construções do presente invento para dirigir a sua expressão a partir de um plasto vegetal tal como as descritas em Goodman e Gelman, "Pharmacological Bases of Therapeutics", Pergaman Press, 1990, 8ª Edição, Secções 14 e 15. Tal como está contemplado que qualquer proteína para a qual a sequência nucleotídica foi identificada pode ser utilizada nas construções do presente invento.

O presente invento proporciona também métodos para produção de uma proteína farmacêutica com um terminal N sem metionina num plasto vegetal. Em general, os métodos compreendem expressão de uma proteína de fusão incluindo um gene de ubiquitina fundido com uma proteína de interesse num plasto. O gene da ubiquitina é obtido a partir de uma fonte natural e clonado num vector apropriado, tal como descrito em WO 88/02406, *supra*, ou é sintetizado

quimicamente, utilizando, p. ex., o método descrito por Ecker et al., *J. Biol. Chem.* 262: 3524-3527, 1987, e Ecker et al., *J. Biol. Chem.* 262: 14213-14221, 1987, cujas divulgações são incorporadas por referência. As proteínas de fusão de ubiquitina são reconhecidas pela ubiquitina-protease, contrariamente aos relatórios anteriores (Vierstra, *Plant Mol. Biol.* 32: 275-302, 1996), que cliva imediatamente a jusante do resíduo de glicina carboxi-terminal da ubiquitina. Esta propriedade permitiu a produção de proteínas recombinantes contendo resíduos N-terminais diferentes de metionina (Baker, *Current. Opin. Biotech.* 7: 541-546, 1996).

São também proporcionados métodos adicionais para a produção de proteínas farmacêuticas com um terminal N sem metionina num plasto vegetal. Tal como descrito mais inteiramente nos Exemplos abaixo, as construções são preparadas para dirigir a produção de uma metionina-hGH (M-hGH) num plasto de uma célula vegetal. As construções compreendem geralmente uma região de iniciação da transcrição e uma sequência de ADN codificando hGH. Surpreendentemente, a sequenciação dos aminoácidos N-terminais da hGH extraída produzida em plantas transplastômicas revela que a metionina N-terminal é clivada da proteína hGH madura, produzindo hGH com um terminal N de alanina (A-hGH). Este resultado indica a interação da hGH expressa com uma metionina-amino-peptidase (MAP) na célula vegetal. Embora se antecipe que se possa seguir qualquer aminoácido na metionina N-terminal, o segundo aminoácido é de preferência

seleccionado de entre o grupo que consiste em alanina, cisteína, glicina, prolina, serina, treonina e valina.

Tal como descrito mais detalhadamente abaixo, as sequências de ácido nucleico codificando para a hormona de crescimento humana (hGH) são empregues nas construções de expressão de plastos do presente invento. Mais, as plantas transplastómicas de tabaco contendo tais construções demonstram um elevado nível de expressão de hGH. Adicionalmente, a proteína hGH expressa a partir do plasto vegetal exhibe características de processamento correcto bem como de dobragem correcta da proteína.

A hormona de crescimento humana (hGH) participa em muita da regulação do crescimento e desenvolvimento humanos normais. Esta hormona pituitária de 22000 dalton exhibe uma multiplicidade de efeitos biológicos incluindo crescimento linear (somatogénese), lactação, activação de macrófagos, efeitos semelhantes aos da insulina e diabetogénicos entre outros (Chawla, *Ann. Rev. Med.* 34: 519, 1983; Edwards, *et al.*, *Science* 239: 769, 1988; Thorner *et al.*, *J. Clin. Invest.* 81: 745, 1988). A hGH é um membro de uma família de hormonas homólogas que inclui lactogénios placentários, prolactinas e outras variantes genéticas e da espécie ou hormona de crescimento (Nicoll, *et al.*, *Endocrine Reviews* 7: 169, 1986). A hGH é invulgar entre estes por exhibir uma ampla especificidade da espécie e se ligar a qualquer um dos receptores somatogénicos (Leung *et al.*, *Nature* 33: 537, 1987) ou de prolactina (Boutin, *et*

al., *Cell* 53: 69, 1988) clonados. A principal utilização da hGH é no tratamento do nanismo hipopituitário em crianças. Indicações adicionais são no tratamento da síndrome de Turner, insuficiência renal crónica, caquexia (Síndrome de Wasting) por VIH e no tratamento de pessoas idosas e criticamente doentes (Tritos, *et al.* *Am. J. Med.* 105: 44-57, 1998).

Tal como produzida na glândula pituitária, a hGH entra no sistema secretor, de forma coincidente com a remoção de seu péptido sinal e a formação de duas ligações dissulfureto (Chawla, *et al.*, 1983, *supra*). Na glândula pituitária, a remoção do péptido do sinal de hGH (também referida como somatotrofina humana ou hST) durante a secreção deixa fenilalanina como o aminoácido N-terminal (Chawla, *et al.*, *Annu. Rev. Med.* 34: 519-547, 1983). Como a tradução normal em plastos se inicia na metionina, foi concebida uma fusão de ubiquitina-hGH para produzir um terminal N de fenilalanina (F-hGH) no produto hGH final.

Surpreendentemente, embora tivesse sido anteriormente relatado que a ubiquitina-protease não estava presente nos cloroplastos (Vierstra, *Plant Mol. Biol.* 32: 275-302, 1996), a fusão ubiquitina-hGH foi processada durante a síntese, acumulação ou purificação a partir de plantas para produzir um produto hGH com um terminal N de fenilalanina (F-hGH). A construção de controlo possuindo o cDNA inteiro codificava metionina e alanina como os primeiros aminoácidos de hGH.

Tal como descrito nos Exemplos abaixo, as construções compreendendo sequências de ácido nucleico codificando aprotinina (também conhecida como inibidor da tripsina pancreática bovina, BPTI) foram empregues em construções de expressão de plastos do presente invento. A aprotinina é uma proteína básica presente em diversos órgãos e tecidos bovinos, tais como os nódulos linfáticos, o pâncreas, os pulmões, a glândula parótida, o baço e o fígado. Sabe-se que a aprotinina inibe várias serina-proteases, incluindo tripsina, quimotripsina, plasmina e calicreína, e é utilizada terapêuticamente no tratamento de pancreatite aguda, vários estádios da síndrome de choque, hemorragia hiperfibrinolítica e enfarte do miocárdio. Adicionalmente, a administração de aprotinina em doses elevadas reduz significativamente a perda de sangue associada a cirurgia cardíaca, incluindo o desvio (by-pass) cardiopulmonar (Bidstrup, *et al.*, *Cardiovasc. Surg.* 44: 640-645, 1989).

Ao desenvolver as construções, os vários fragmentos que compreendem as regiões reguladoras e o enquadramento de leitura aberto podem ser sujeitos a diferentes condições de processando, tais como ligação, digestão com enzimas de restrição, PCR, mutagénese *in vitro*, adição de ligadores e adaptadores. Assim, podem ser efectuadas transições, transversões, inserções e deleções nucleotídicas ou semelhantes, no ADN que é empregue nas regiões reguladoras ou nas sequências de ADN de interesse para expressão nos plastos. Os métodos para digestões de restrição,

tratamentos de extremidades cegas com Klenow e ligações são bem conhecidos dos peritos na técnica e são descritos, por exemplo, por Maniatis *et al.* (em "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Durante a preparação das construções, os vários fragmentos de ADN serão frequentemente clonados num vector de clonagem apropriado, que permita a amplificação do ADN, modificação do ADN ou manipulação do ADN através da união ou remoção de sequências ou ligadores. De preferência, os vectores serão capazes de replicação até pelo menos um número relativamente elevado de cópias em *E. coli*. Vários vectores estão facilmente disponíveis para clonagem, incluindo vectores tais como pBR322, vectores da série pUC, vectores da série M13 e vectores pBluescript (Stratagene; La Jolla, CA).

A fim proporcionar um meio de seleccionar as células vegetais desejadas, os vectores para transformação de plastos contêm tipicamente uma construção que proporciona a expressão de um gene marcador seleccionável. Os genes marcadores são sequências de ADN expressáveis em plantas que expressam um polipéptido que resiste a uma inibição natural através da atenuação ou inactivação de uma substância selectiva, incluindo, mas não se limitando a, um antibiótico ou herbicida.

Alternativamente, um gene marcador pode propor-

cionar alguma outra resposta visivelmente reactiva, *i.e.*, pode causar uma aparência ou padrão de crescimento distintivos relativamente a plantas ou células vegetais que não expressem o gene marcador seleccionável na presença de alguma substância, aplicada directamente à planta ou às células vegetais ou presente nos meios do crescimento da planta ou das células vegetais.

Em ambos os casos, as plantas ou as células vegetais contendo tais genes marcadores seleccionáveis terão um fenótipo distintivo para fins de identificação, *i.e.*, serão distinguíveis de células não transformadas. O fenótipo característico permite a identificação de células, grupos de células, tecidos, órgãos, partes da planta ou plantas inteiras contendo a construção.

A detecção do fenótipo marcador torna possível a selecção de células possuindo um segundo gene ao qual o gene marcador foi ligado. Este segundo gene compreende tipicamente um fenótipo desejável que não é prontamente identificável em células transformadas, mas que está presente quando a célula vegetal ou um derivado desta é criado até à maturidade, mesmo sob condições em que o próprio fenótipo do marcador seleccionável não é aparente.

A utilização de um tal marcador para identificação de células vegetais contendo uma construção de plastos foi descrita por Svab *et al.* (1993, *supra*). Nos exemplos proporcionados abaixo, um gene bacteriano *aadA* é

expresso como marcador sob o controlo regulador das regiões promotora 5' e de terminação da transcrição 3' do cloroplasto, especificamente as regiões reguladoras do gene *psbA* (descrito em Staub et al., *EMBO J.* 12(2): 601-606, 1993). Numerosas regiões promotoras adicionais podem também ser utilizadas para dirigir a expressão do gene marcador seleccionável, incluindo vários promotores de plastos e promotores bacterianos que se mostrou funcionarem em plastos vegetais.

A expressão do gene *aadA* confere resistência a espectinomicina e estreptomicina, e permite assim a identificação das células vegetais que expressam este marcador. O produto do gene *aadA* permite o crescimento e enverdecimento contínuos das células cujos cloroplastos compreendem o produto do gene marcador seleccionável. As células que não contêm o produto do gene marcador seleccionável são descoradas. A selecção do gene marcador *aadA* baseia-se assim na identificação das células vegetais que não são descoradas pela presença da estreptomicina, ou de preferência espectinomicina, no meio de crescimento das plantas.

Foram desenvolvidos vários marcadores para utilizar com células vegetais, tais como resistência a cloranfenicol, ao aminoglicósido G418 ou a higromicina. Outros genes que codificam um produto envolvido no metabolismo dos cloroplastos podem também ser utilizados como marcadores seleccionáveis. Por exemplo, os genes que proporcionam resistência a herbicidas de plantas tais como

o glifosato, bromoxinil ou a imidazolinona podem encontrar uma utilização particular. Tais genes foram relatados (Stalker *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260: 4724-4728, 1985 (EPSP resistente a glifosato); Stalker *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263: 6310-6314, 1985 (gene da nitrilase resistente a bromoxinil) e Sathasivan *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18: 2188, 1990 (gene de resistência a imidazolinona AHAS)).

A transformação estável de genomas de plastos de tabaco através de bombardeamento de partículas está relatada (Svab *et al.*, 1990, *supra* e Svab *et al.*, 1993, *supra*). Os métodos aí descritos podem ser empregues para obter plantas homoplásmicas para construções de expressão de plastos.

Geralmente, o tecido bombardeado é cultivado durante aproximadamente 2 dias num meio promotor da divisão celular, após o que o tecido vegetal é transferido para um meio selectivo contendo uma quantidade inibidora do agente selectivo em particular, bem como as hormonas particulares e outras substâncias necessárias para obter regeneração para essa espécie vegetal em particular. Os rebentos são então subcultivados nos mesmos meios selectivos para assegurar a produção e selecção de rebentos homoplásmicos.

As plantas de tabaco transplastómicas são analisadas para saber se são uma população pura de genomas de plastos transformados (linhas homoplásmicas). A homoplasma é verificada utilizando análise "Southern" empregando

sondas de ácido nucleico abrangendo uma região do transgene e do genoma do cloroplasto (*i.e.*, a região de inserção). As plantas transplastômicas que são heteroplásmicas (*i.e.* contêm uma mistura de genomas de plastos contendo o transgene e sem o transgene) são caracterizadas por um padrão de hibridação de bandas de tipo selvagem e transgênicas. As plantas homoplásmicas mostram um padrão de hibridação sem a banda de tipo selvagem.

Alternativamente, a homoplasma pode ser verificada utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR). São utilizados iniciadores de PCR que são direccionados para amplificar a partir das sequências da região da inserção. Por exemplo, pode ser utilizado um par de iniciadores numa reacção de PCR. Um iniciador amplifica a partir de uma região no transgene, enquanto que o segundo iniciador amplifica de uma região proximal à região de inserção para a região de inserção. É efectuada uma segunda reacção de PCR utilizando os iniciadores desenhados para amplificar a região de inserção. As linhas transplastômicas identificadas como homoplásmicas produzem o fragmento de tamanho esperado na primeira reacção, enquanto que não produzem o fragmento de tamanho esperado na segunda reacção.

Quando os métodos de transformação e regeneração estiverem adaptados para uma dada espécie de planta, através de transformação mediada por *Agrobacterium*, bombardeamento ou algum outro método, as técnicas estabe-

lecidas podem ser modificadas para utilização em métodos de selecção e regeneração para produzir plantas com plastos transformados. Por exemplo, os métodos aqui descritos para tabaco são facilmente adaptáveis a outra espécie de solanácea, tal como tomate, petúnia e batata.

Para transformação de soja, foram descritos o bombardeamento de partículas bem como os protocolos de transformação nuclear mediada por *Agrobacterium* e de regeneração (Hinchee et al., US 5416011, e Christou et al., US 5015580). O perito na técnica reconhecerá que podem ser utilizados protocolos descritos para transformação de soja.

Em *Brassica*, os protocolos de transformação mediada por *Agrobacterium* e regeneração envolvem geralmente a utilização de tecido de hipocótilo, um tecido não verde que pode conter um baixo conteúdo de plastos. Assim, para *Brassica*, os tecidos alvo preferidos incluiriam tecidos de hipocótilo ou de cotilédones (que são verdes e contêm assim numerosos plastos) derivados de microsporos ou explantes de tecido foliar. Embora as taxas de regeneração de tais tecidos possam ser baixas, não se esperam efeitos posicionais, tal como observado com a transformação mediada por *Agrobacterium*, não sendo assim necessário pesquisar numerosas plantas transformadas com sucesso para obter um fenótipo desejado.

Para o algodão, a transformação de cotilédones de *Gossypium hirsutum* L. através de co-cultura com

Agrobacterium tumefaciens foi descrita por Firoozabady et al., *Plant Mol. Bio.* 10: 105-116, 1987 e Umbeck et al., *Bio/Technology* 5: 263-266, 1987. Novamente, tal como para *Brassica*, este tecido pode conter um conteúdo de plastos insuficiente para transformação de cloroplastos. Assim, tal como para *Brassica*, pode ser desejável um método alternativo para transformação e regeneração de um tecido alvo alternativo contendo cloroplastos, por exemplo atingindo tecido embrionário verde.

Outras espécies de plantas podem ser transformadas de forma semelhante utilizando técnicas relacionadas. Alternativamente, métodos de bombardeamento de microprojécteis, tais como descritos por Klein et al. (*Bio/Technology* 10: 286-291) podem também ser utilizados para obter plantas transformadas no núcleo compreendendo as construções de expressão da ARN-polimerase de subunidade única viral aqui descrita. A transformação do algodão através de bombardeamento de partículas é relatada em WO 92/15675, publicada a 17 de Setembro de 1992. Plantas adequadas para a prática do presente invento incluem, mas não são limitam a, soja, algodão, alfafa, colza, linho, tomate, beterraba sacarina, girassol, batata, tabaco, milho, trigo, arroz e alface.

Os vectores para utilização em transformação de plastos incluem de preferência meios para proporcionar uma transferência estável da construção de expressão do plasto e da construção do marcador seleccionável para o genoma do plasto. Isto é muito convenientemente proporcionado por

regiões de homologia com o genoma do plasto alvo. As regiões de homologia flanqueiam a construção a transferir e proporcionam a transferência para o genoma do plasto através de recombinação homóloga, através de um duplo cruzamento no genoma. A sequência de ADN completa do genoma do plasto de tabaco foi relatada (Shinozaki *et al.*, *EMBO J.* 5: 2043-2049, 1986). As sequências de ADN completas dos genomas dos plastos de hepática (Ohyama *et al.*, *Nature* 322: 572-574, 1986) e arroz (Hiratsuka *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 217: 185-194, 1989) foram também relatadas.

Quando as regiões de homologia estão presentes nas regiões de repetições invertidas do genoma dos plastos (conhecidas como IRA e IRB), esperam-se duas cópias do transgene por plasto transformado. Quando as regiões de homologia estão presentes fora das regiões de repetição invertidas do genoma dos plastos, espera-se uma cópia do transgene por plasto transformado. As regiões de homologia dentro do genoma do plasto têm aproximadamente 1 kb de tamanho. Regiões de homologia menores podem também ser utilizadas e tão pouco como 100 pb podem proporcionar recombinação homóloga no genoma do plasto. No entanto, a frequência de recombinação e assim a frequência de obtenção de plantas possuindo plastos transformados diminui com a diminuição do tamanho das regiões de homologia.

Exemplos de construções possuindo regiões de homologia dentro do genoma do plasto são descritos em Svab *et al.* (1990, *supra*), Svab *et al.* (1993, *supra*) e Zoubenko *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 22(19): 3819-3824, 1994).

Tal como descrito com mais detalhe nos exemplos abaixo, são descritas construções que proporcionam uma maior expressão de sequências de ADN em plastos vegetais. Várias sequências de promotor/local de ligação ao ribossoma são empregues para dirigir a expressão em plastos vegetais. Em particular as sequências promotoras do operão do ARN ribossómico 16S (*Prrn*) são ligadas a um local de ligação ao ribossoma (RBS) derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7 (G10L). As sequências de ADN expressas sob o controlo regulador da sequência *Prrn*/G10L mostra um nível significativamente mais elevado de expressão proteica do que os níveis obtidos sob o controlo de outras combinações de promotor/RBS, embora a expressão do ARNm possa ou não ser mais elevada nestas plantas.

Nos exemplos abaixo, as sequências de ácido nucleico codificando a EPSP-sintetase CP4 (US 5633435) são colocadas em construções de expressão para expressão da enzima EPSP-sintetase a partir do plasto vegetal. Para além disso, uma sequência de ADN codificando para hGH (US 5424199) é também colocada na construção de expressão para a expressão da hormona de crescimento humana a partir do plasto vegetal. As construções preparadas utilizam um local de ligação ao ribossoma desenhado após o líder do gene 10 do bacteriófago T7 (G10L) para aumentar a expressão das sequências de ácido nucleico no plasto vegetal.

As construções de expressão de plastos codifican-

do para a expressão de EPSPS e hGH são introduzidas através de um vector de transformação de cloroplastos.

As linhas de tabaco contendo a sequência de codificação nativa para a enzima EPSPS expressa em plastos sob o controlo da sequência do promotor/local de ligação ao ribossoma *Prrn/G10L* demonstram um nível significativamente mais elevado de expressão proteica do que os níveis obtidos a partir de EPSPS expressa sob o controlo da sequência *Prrn/RBS* de *rbcL*. No entanto, o ARNm de EPSPS é expresso a um nível mais elevado nas plantas que expressam EPSPS CP4 a partir do plasto sob o controlo de *Prrn/rbcL(RBS)*. Estes resultados indicam que a tradução dos transcritos contendo o local de ligação ao ribossoma do gene 10 do bacteriófago T7 é mais eficiente. Além disso, os níveis de expressão proteica de EPSPS obtidos a partir das linhas de tabaco transplastómicas expressando EPSPS sob o controlo de *Prrn/RBS* de G10L proporcionam um elevado nível de tolerância a glifosato.

Para além disso, as linhas de tabaco transplastómicas transformadas para expressar hGH sob o controlo da sequência do promotor/local de ligação ao ribossoma *Prrn/G10L* demonstram um nível significativamente mais elevado de expressão proteica do que os níveis obtidos a partir da hGH expressa sob o controlo da sequência do promotor *PpsbA/RBS*.

Podem ser obtidos aumentos nos níveis de expres-

são proteica de pelo menos aproximadamente 200 vezes a partir das construções que utilizam *Prrn*/local de ligação ao ribossoma G10L para a expressão de EPSPS e hGH sobre os níveis de expressão obtidos a partir de outras combinações de promotor/RBS para expressão em plastos. Além disso, os níveis de proteína obtidos a partir de construções de expressão de plastos que utilizam a sequência do promotor/RBS *Prrn*/G10L podem acumular níveis 50 a 3500 vezes mais elevados do que os das construções de expressão nuclear. Assim, a inclusão do local de ligação ao ribossoma G10L em construções de expressão de plastos pode encontrar utilização para aumentar os níveis de expressão proteica a partir de plastos vegetais.

Para além disso, as construções do presente invento podem também incluir sequências para direccionar a proteína expressa para uma determinada região suborganelar, por exemplo, o lúmen do tilacóide do cloroplasto. Por exemplo, tal como descrito nos exemplos abaixo, uma sequência nucleotídica codificando um péptido a partir do citocromo *f* do genoma do plasto direcciona a proteína aprotinina expressa para a membrana do tilacóide. Tal direccionamento de proteínas expressas pode proporcionar uma compartimentalização da proteína permitindo uma maior estabilidade oxidativa e uma dobragem correcta da proteína.

O invento que foi agora descrito geralmente, será mais facilmente compreendido por referência aos seguintes exemplos.

EXEMPLOS**Exemplo 1 Construções de Expressão**

As construções e os métodos para utilização na transformação de plastos de plantas superiores são descritos em Zoubenko *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 22(19): 3819-3824, 1994), Svab *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8526-8530, 1990 e *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917, 1993) e Staub *et al.* (*EMBO J.* 12: 601-606, 1993). As construções e os métodos para utilização em transformação de plastos de plantas superiores para expressar sequências de ADN sob o controlo de uma polimerase T7 codificada nuclearmente direccionada para os plastos são descritos em U.S. 5576198. As sequências de ADN completas do genoma dos plastos de tabaco são relatadas por Shinozaki *et al.*, (*EMBO J.* 5: 2043-2049, 1986). Todas as referências do ADN de plastos na seguinte descrição são para o número do nucleótido do tabaco.

A sequência nucleotídica completa codificando o citocromo *f* de tabaco (*petA*) é descrita em Bassham *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266: 23606-23610, 1991 e Konishi *et al.*, *Plant Cell Physiol.* 34: 1081-1087, 1993.

1A. Sequências de Promotor/Local de Ligação ao Ribossoma

A região promotora do operão do ARN ribossómico 16S de plastos (*Prn*) é ligada a um local de ligação ao

ribossoma (RBS) sintético modelado a partir do líder do gene *rbcl* de plastos para criar o fragmento *Prrn/rbclRBS*. A sequência *Prrn/rbclRBS* é tal como descrita em Svab *et al.* (1993, *supra*) para o fragmento *Prrn/rbcl(S)*.

A região promotora do promotor *psbA* de plastos (*PpsbA*) e as sequências terminadoras (*TpsbA*) são descritas em Staub *et al.* (*EMBO J.* 12: 601-606, 1993).

A sequência *Prrn/G10L* foi construída através da ligação de duas sequências oligonucleotídicas, *T7lead1* e *T7lead2* (Tabela 1), para criar o local de ligação ao ribossoma do plasto *G10L* (Figura 1). A sequência de *G10L* foi ligada ao terminal 3' da sequência promotora *Prrn* como um fragmento *EcoRI/NcoI* para criar a sequência *Prrn/G10L*.

Tabela 1

T7lead1 5'-AAT TGT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA
GAT ATA CC-3'

T7lead2 5'-CAT GGG TAT ATC TCC TTC TTA AAG TTA AAC AAA ATT
ATT TCT AC-3'

Os genes quiméricos são de preferência introduzidos no vector de expressão para dirigir a sua transcrição a partir do promotor *Prrn*. Assim, no genoma do plasto, os genes quiméricos são transcritos a partir do promotor *Prrn/RBS*, ou do promotor *Prrn/G10L* no plasto vegetal.

1B. Construções de Expressão de Plastos de EPSPS CP4

Um vector de expressão de plastos pMON30117 é construído a partir de um vector precursor pPRV111B (Zoubenko, et al., 1994, *supra*, acesso GenBank U12813). O vector pMON30117 possui um local de clonagem múltipla para inserção de um gene passageiro numa cassete de expressão *Prrn/rbcLRBS/Trpsl6*. A sequência *Prrn/rbcLRBS* é clonada no vector pPRV111B como um fragmento *EcoRI/NcoI*, e a região terminadora do gene *rpsl6* do plasto (*Trpsl6*) é clonada a 3' do promotor *Prrn* como um fragmento *HindIII/NcoI*. O fragmento *Trpsl6* compreende a região reguladora 3' do gene *rpsl6* dos nucleótidos 5087 a 4939 no ADN plasmídico de tabaco.

A estrutura de pPRV111B do vector pMON30117 contém um gene marcador, *aadA*, para selecção em espectinomicina e estreptomicina, e *rps7/12* para a integração, através de recombinação homóloga, do ADN passageiro na região intergénica *trnV-rps7/12*.

A construção de expressão de plastos pMON30118 foi preparada através de clonagem do gene de EPSPS CP4 nativo fundido com os cinco (5) aminoácidos N-terminais do gene *rbcl* de plastos (descrito em Svab et al., 1993, *supra*) como um fragmento *NcoI/SmaI* no local de clonagem múltipla do vector pMON30117.

A construção de expressão de plastos pMON30123 é essencialmente a mesma que pMON30118 com a excepção da

deleção dos cinco (5) aminoácidos N-terminais do *rbcL* de plastos.

A construção de expressão de plastos pMON30130 foi criada através da substituição do EPSPS CP4 nativo de pMON30123, por um gene CP4 sintético. Esta construção também não tem a fusão de 5 aminoácidos N-terminais do gene *rbcL* de plastos.

A construção de expressão de plastos pMON38773 foi construída através da substituição da sequência *Prrn*/RBS de pMON30123 pela sequência promotora *Prrn*/G10L descrita acima. A sequência de ADN de EPSPS de pMON38773 também não possui a fusão de 5 aminoácidos N-terminais do gene *rbcL* de plastos.

Uma construção de expressão de plastos pMON38766 foi construída utilizando o promotor do gene 10 do fago T7 (P-T7), incluindo G10L, a região de codificação do gene CP4 (nativa) e a sequência terminadora do gene *rps16* (*Trps16*) de plastos.

Uma construção de expressão de plastos pMON38797 foi construída utilizando o promotor do gene 10 do fago T7 (P-T7), incluindo G10L, a região de codificação do gene CP4 (sintética), o terminador do gene *rps16* (*Trps16*) de plastos.

Uma construção de expressão de plastos pMON38798

foi construída utilizando o promotor do operão 16SrDNA (Prrn), G10L, a região de codificação do gene CP4 (sintética), o terminador do gene rps16 (Trps16) de plastos.

Uma construção de expressão de plastos pMON38793 foi construída utilizando o promotor do operão 16SrDNA (Prrn), um local de ligação ao ribossoma (RBS) sintético modelado a partir do gene rbcL de plastos, o gene de EPSP-sintetase de *Petúnia* tolerante ao glifosato (P-EPSPS, Padgett, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 258: 564-573, 1987) possuindo a mutação de Glicina para Alanina na posição de aminoácido 101, o terminador do gene rps16 (Trps16) de plastos.

Uma construção de expressão de plastos pMON38796 foi construída utilizando o promotor do operão 16SrDNA (Prrn), o local de ligação ao ribossoma (RBS) sintético modelado a partir do gene rbcL de plastos, o gene da EPSP-sintetase de *Achromobacter* (estirpe LBAA) tolerante ao glifosato (US 5627061) possuindo a mutação de Glicina para Alanina na posição de aminoácido 100, o terminador do gene rps16 (Trps16) de plastos.

Uma construção de expressão de plastos pMON45204 foi construída utilizando o promotor do operão 16SrDNA (Prrn) com o G10L, o gene da EPSP-sintetase de *Pseudomonas* (estirpe LBAA) tolerante ao glifosato possuindo a mutação de Glicina para Alanina na posição de aminoácido 100, o terminador do gene rps16 (Trps16) de plastos.

Uma construção de expressão de plastos pMON45201 foi construída utilizando o promotor do operão 16SrDNA (Prn), o local de ligação ao ribossoma (RBS) sintético modelado a partir do gene *rbcL* de plastos, o gene *aroE* (EPSPS) de *Bacillus subtilis* de tipo selvagem tolerante ao glifosato (US 5627061), o terminador do gene *rps16* (*Trps16*) de plastos.

1C. Construções de Expressão de Plastos de Bucril (*bxn*)

O gene de resistência ao herbicida *bxn* (US 4810648) foi removido do plasmídeo pBrx47 como um fragmento de restrição de *NcoI* a *Asp718* e clonado em pUC120 cortado com *NcoI/Asp718* resultando no plasmídeo pBrx87. O plasmídeo pBrx87 foi então digerido com *NcoI/Xba* e clonado nos locais *NcoI/Xba* do plasmídeo pLAA21 que contém a região promotora de plastos *Prn* e a região 3' de *rpsL* para expressão em plastos. O plasmídeo resultante foi designado pBrx89. O plasmídeo pBrx89 foi digerido com *SacI* e *HindIII* e o gene quimérico *bxn* de 1,5 kb com os sinais de expressão de plastos foi introduzido nos locais *SacI/HindIII* do vector de homologia de plastos de tabaco pOVZ44B (Zoubenko et al., *Nucl. Acids Res.* 22: 3819-3824, 1994) para criar o plasmídeo pCGN5175.

Para construir o plasmídeo pCGN6114, o plasmídeo pBrx90 (um plasmídeo Bluescript contendo o gene *bxn* codificando a nitrilase específica de bromoxinil) foi

digerido com *NcoI/AscI* e o gene estrutural *bxn* substituiu o gene GUS no plasmídeo pCGN5063 digerido com *Nco/Asc* resultando no plasmídeo pCGN6107. Este plasmídeo contém o gene *bxn* sob o controlo do promotor T7/líder do gene 10 na extremidade 5' e o terminador da transcrição híbrido *psbA/T7* na extremidade 3' do gene quimérico. Este gene quimérico promotor T7/*bxn* foi excisado de pCGN6107 como um segmento de ADN *HindIII/NotI* e foi movido para o plasmídeo de cloranfenicol BCSK+ (Stratagene) nos locais *HindIII/NotI* para criar o plasmídeo pCGN6109. O gene quimérico foi então movido como um fragmento *HindIII/NotI* a partir de pCGN6109 no vector de homologia de cloroplastos pOVZ44B descrito acima para criar o plasmídeo pCGN6114. As plantas de tabaco transformadas com pCGN6114 requerem que a ARN-polimerase T7 seja proporcionada no fundo de plasto vegetal para activar a transcrição do gene quimérico *bxn* através do promotor T7. Este sistema foi anteriormente detalhado em McBride *et al.*, *PNAS* 91: 7301-7305, 1994 e McBride *et al.*, US 5576198.

1D. Construções de Expressão de Plastos *BXN/AHAS*

Uma construção de expressão de plastos, pCGN5026, é preparada para dirigir a expressão de *BXN* e *AHAS* a partir do plasto vegetal. A sequência nucleotídica de *AHAS* (descrita em EP-A 0525384 A2) é ligada pela tradução à sequência nucleotídica de *BXN* (US 4810648). O gene estrutural de *AHAS* codificando a aceto-hidroxiácido-sintetase foi clonado a partir do plasmídeo pCGN4277 como um fragmento de ADN de *NcoI* a *Age* nos locais *Nco/Xma* do plasmídeo pUC120 para criar o plasmídeo pCGN5022. Este plasmídeo foi então

digerido com as enzimas *Bam*HI e *Pst* e um segmento de ADN *Bam/Pst* de 1,3 kb contendo o gene *bxn* codificando a nitrilase específica de bromoxinil foi excisado a partir do plasmídeo pBrx26 e clonado nos locais *Bam/Pst* de pCGN5022 para criar o plasmídeo pCGN5023. O plasmídeo pCGN5023 continha um segmento de ADN de 3,3 kb contendo o segmento do operação AHAS/*bxn* e este fragmento. Este plasmídeo foi cortado no local *Pst* único e este local *Pst* foi removido e substituído por um ligador sintético contendo um local de restrição *Xba*I único gerando o plasmídeo pCGN5024. O plasmídeo pCGN5024 foi digerido com *Nco/Xba* e o fragmento de ADN *Nco/Xba* de 3,3 kb foi clonado no vector da cassete promotora de plastos pLAA21(*Pst*) que tinha sido digerido com *Nco* e *Xba* para remover o gene GUS. O plasmídeo resultante desta clonagem foi designado plasmídeo pCGN5025 e continha o operação do herbicida sob o controlo do promotor de plastos *Prrn* e o segmento de ADN 3' *rpsL*. Todo o operação quimérico do herbicida sob o controlo dos elementos de expressão de plastos foi excisado de pCGN5025 como um fragmento de ADN *Sac*I/*Pst* e clonado nos locais *Sac/Pst* do vector da cassete de homologia de plastos pOVZ44B (Zoubenko et al., *Nucl. Acids Res.* 22: 3819-3824, 1994) para facilitar a transferência para o genoma do cloroplasto de tabaco.

1E. Construção de Expressão de Plastos *Bt crylAc* e *bxn*

O plasmídeo pBrx9 (Stalker e McBride, *J. Bacteriol.* 169: 955-960, 1987), um clone original de *Klebsiella* contendo um segmento de ADN do gene *bxn*, foi utilizado como molde para gerar um fragmento de ADN de PCR

*Bam*HI/*Cla*I de ≈450 pb que abrange a extremidade N-terminal do gene *bxn* e inclui 44 pb da porção 5' não traduzida do gene nativo. Este fragmento foi trocado pelo fragmento *Bam*/*Cla* de ≈400 pb no plasmídeo pBrx90 resultando no plasmídeo pBrx90.1. Este plasmídeo contém o gene *bxn* inteiro e o segmento de ADN 5' não traduzido de 44 pb. O gene *bxn* foi excisado do plasmídeo pBrx90.1 como um segmento de ADN *Bam*/*Asc*I e foi inserido no plasmídeo pCGN5146 nos locais *Bgl*III/*Asc*I para gerar o plasmídeo pCGN5191. O plasmídeo pCGN5146 é um derivado de pKK233-2 (Pharmacia) contendo o gene *cry*IAC inteiro codificando a protoxina HD-73 Bt. O plasmídeo pCGN5191 contém então os genes *cry*IAC e *bxn* numa configuração de operação sendo o gene *bxn* distal no operação. Ambos os genes estão sob o controle do promotor *Ptac* para expressão de *E. coli* em 5191. O plasmídeo pCGN5191 foi digerido com *Nco*/*Asc* e o fragmento de ADN *Nco*/*Asc* contendo o operação Bt/*bxn* foi clonado nos locais *Nco*/*Asc* do vector de homologia do cloroplasto pCGN5155, um derivado de pOVZ44B. O plasmídeo resultante, pCGN5197 contém o operação Bt/*bxn* sob o controle das regiões promotora de plastos *Prrn* e terminadora da transcrição *rpsL*. Este plasmídeo facilitou a transferência do operação quimérico Bt/*bxn* no genoma dos plastos de tabaco.

1F. Construções de Expressão de Plastos da Fitoenodessaturase

O gene *crtI* foi obtido como um fragmento de PCR *Hind*III/*Sal*I a partir do plasmídeo original contendo o operação *crt* de *Erwinia carotova* (Misawa et al., *Plant Jour*

6: 481-489, 1994) e clonado como um segmento de ADN *HindIII/Sal* em BCSK+ (Stratagene) nos locais *HindIII/Sal* para gerar o plasmídeo pCGN5172. O fragmento *crtI* foi clonado a partir de pCGN5172 como um fragmento *NcoI/SalI* em pCGN5038 (um derivado de pOVZ44B) para criar a construção de expressão de plastos pCGN5177. Esta construção dirige a expressão da sequência *crtI* a partir do promotor *Prrn* e da sequência terminadora *rps16*. Este plasmídeo facilitou a transferência do gene quimérico *crtI* para o genoma de plastos de tabaco.

1G. Construções de Expressão de hGH para Transformação de Plantas

Construções de Expressão Nuclear

A construção pWRG4747 foi construída para dirigir a expressão de hGH no genoma nuclear de plantas. Este vector contém a hGH operativamente ligada ao promotor do Vírus do Mosaico de Escrofulariáceas (US 5378619) e ao líder de CTP2 para dirigir a proteína hGH para o plasto. O fragmento FMV/CTP2L::hGH::NpA é clonado juntamente com a sequência de ADN que confere resistência à canamicina entre as fronteiras direita e esquerda (RB e LB) do ADN de transferência (ADnt) de *Agrobacterium tumefaciens* para dirigir a integração no genoma nuclear.

O vector de transformação nuclear pWRG4744 contém essencialmente os mesmos elementos que pWRG4747 excepto que

a construção não tem o líder CTP2 nem a proteína hGH é dirigida para o citoplasma da célula vegetal.

Construções de Expressão de Plastos

O vector de expressão de plastos pWRG4838 foi construído utilizando o gene inteiro de hGH expresso a partir da região promotora e terminadora do gene psbA, PpsbA e TpsbA, respectivamente (descritas em Staub *et al.*, 1993, *supra*). Esta fusão quimérica de promotor-gene-terminador (PpsbA::hGH::TpsbA) é clonada adjacente ao gene do marcador seleccionável *aadA* também dirigido pelos elementos de expressão de plastos do gene psbA. As duas sequências do gene quimérico são clonadas num vector entre duas sequências que dirigem a integração das sequências do gene quimérico no genoma dos plastos de tabaco a montante do 16SrDNA dos plastos. Este é unido a um gene de resistência à ampicilina de 1 kb que proporciona a selecção de *E. coli* contendo a construção e a origem de replicação de pUC para a manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

A construção de expressão de plastos pMON38755 foi preparada utilizando a sequência de ADN de hGH fundida pela tradução no terminal N com o gene da ubiquitina de levedura (Ozkaynak, *et al.*, *Nature* 312: 663-666, 1984), criando o gene de fusão Ubi-hGH. O gene de fusão Ubi-hGH é clonado ao lado do gene *aadA* para selecção de tabaco transplastómico em meios contendo espectinomicina ou estreptomomicina (a partir do pPRV112B descrito em Zoubenko *et al.*,

1994, *supra*). São incluídas sequências para a recombinação homóloga das sequências codificando para a expressão de hGH e aadA. Estas sequências são obtidas a partir do vector pPRV112B descrito em Zoubenko *et al.*, (1994, *supra*). Estas sequências são unidas a um gene de resistência a ampicilina de 1 kb que proporciona a selecção de *E. coli* contendo a construção e a origem de replicação de pUC para manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

A construção de expressão de plastos pMON38794 contém essencialmente os mesmos elementos que pMON38755, com a excepção de que a sequência promotora de psbA de 0,15 kb é substituída pela sequência promotora *Prrn/G10L* descrita acima.

1H. Construções para a Expressão de Aprotinina em Plastos

Foi preparada uma série de construções para dirigir a expressão da proteína farmacêutica aprotinina a partir do plasto. A sequência de ácido nucleico codificando para aprotinina (Figura 2) foi clonada numa construção de expressão de plastos para controlar a expressão da aprotinina a partir do promotor do líder do gene 10 de T7 que é induzido a partir de uma polimerase T7 expressa nuclearmente, dirigida para os plastos. As construções utilizadas nas quais a sequência de aprotinina foi clonada são tal como descritas em US 5576198.

O vector de transformação de plastos pCGN6146 é

concebido através da substituição da sequência de ADN codificando para GUS a partir de pCGN4276 (descrito em US 5576198) pela a sequência de codificação da aprotinina. A construção de transformação de plastos de tabaco pCGN6147 contém os mesmos elementos que pCGN6146 excepto que pCGN6147 contém os seis aminoácidos 5' da sequência de codificação de GUS ligados ao terminal 5' da sequência de codificação da aprotinina. Os seis aminoácidos do terminal 5' da sequência nucleotídica de GUS são incluídos para ajudar na tradução da proteína da aprotinina. O vector de transformação de plastos de tabaco pCGN6156 é essencialmente o mesmo que pCGN4276 excepto que a região de codificação da aprotinina é clonada na extremidade 3' da sequência de codificação de GUS. Assim, pCGN6156 contém operativamente ligados o promotor T7, uma sequência de ADN codificando para GUS fundida com a sequência de ADN codificando para aprotinina e a sequência 3' de terminação da transcrição de psbA.

Uma construção de expressão de plastos, pCGN6154, foi construída a partir de pCGN4276 através da substituição da sequência de codificação de GUS pela proteína aprotinina operativamente ligada ao terminal 3' da sequência de codificação do citocromo *f* (*petA*) do cloroplasto de tabaco. Assim, pCGN6154 contém a sequência do promotor T7 operativamente ligada à sequência nucleotídica de *petA* e da aprotinina. A sequência de *petA* é incluída para dirigir a proteína aprotinina expressa para o tilacóide.

Exemplo 2 Transformação de Plantas*2A. Transformação Nuclear*

Plantas de tabaco transformadas para expressar as construções pWRG4744 e pWRG4747 no núcleo de uma célula vegetal podem ser obtidas tal como descrito por Horsch et al., *Science* 227: 1229-1232, 1985.

2B. Transformação de Plastos

Os plastos de tabaco são transformados através de distribuição de microprojecteis por canhão de partículas tal como descrito por Svab e Maliga (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917, 1993) e aqui descrito.

Folhas verde-escuro e redondas são cortadas, de preferência do meio do rebento, a partir de *Nicotiana tabacum* cv. Havana de 3-6 semanas de idade que foram mantidas *in vitro* em meio MS (Murashige e Skoog, *Physiol Plant.* 15: 473-497, 1962) sem hormonas suplementado com vitaminas B5 em Phytatrays ou copos de gelado com um fotoperíodo de 16 horas a 24°C. Cada folha cortada é então colocada com o lado adaxial para cima sobre papel de filtro estéril sobre meio de regeneração de rebentos de tabaco (meio TSO: sais MS, 1 mg/l de N⁶-benziladenina, 0,1 mg/l de ácido 1-naftalenoacético, 1 mg/l de tiamina, 100 mg/l de inositol, 7 g/l de agar pH 5,8 e 30 g/l de sacarose). As folhas são colocadas de preferência no centro da placa com

tanto contacto com o meio quanto possível. As placas são de preferência preparadas imediatamente antes da utilização, mas podem ser preparadas até um dia antes da transformação pelo bombardeamento de partículas embrulhando-as em sacos de plástico e armazenando a 24°C durante a noite.

Partículas de tungsténio ou ouro são esterilizadas para utilização como microtransportadores nas experiências de bombardeamento. As partículas (50 mg) são esterilizadas com 1 ml de etanol a 100% e são armazenadas a -20°C ou -80°C. Imediatamente antes da utilização, as partículas são sedimentadas por centrifugação, lavadas com 2 a 3 lavagens de 1 ml de água destilada desionizada estéril, sujeitas a vórtice e centrifugadas entre cada lavagem. As partículas lavadas são ressuspensas em 500 µl de glicerol a 50%.

As partículas esterilizadas são revestidas com ADN para transformação. São adicionadas alíquotas de vinte e cinco microlitros de partículas esterilizadas a um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, e 5 µg de ADN de interesse são adicionados e misturados batendo ligeiramente no tubo. Trinta e cinco microlitros de uma solução recentemente preparada de CaCl₂ 1,8 M e de espermidina 30 mM são adicionados à mistura de partículas/ADN, misturados suavemente e incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos. As partículas revestidas são rapidamente sedimentadas por centrifugação. As partículas são lavadas duas vezes através da adição de 200 µl de etanol a 70%, misturando suavemente e centrifugando rapidamente. As partículas revestidas são ressuspensas em 50 µl de etanol a 100% e são

misturadas suavemente. São utilizados cinco a dez microlitros de partículas revestidas para cada bombardeamento.

A transformação por bombardeamento de partículas é realizada utilizando o canhão PDS 1000 Helium (Bio Rad, Richmond, CA) utilizando um protocolo modificado descrito pelo fabricante.

As placas contendo as amostras de folha são colocadas na segunda prateleira a partir do fundo da câmara de vácuo e bombardeadas utilizando o disco da ruptura de 1100 psi. Após o bombardeamento, as caixas de petri contendo as amostras de folha são embrulhadas em sacos de plástico e incubadas a 24°C durante 48 horas.

Após incubação, as folhas bombardeadas são cortadas em peças de aproximadamente 0,5 cm² e colocadas com o lado abaxial para cima em meio TSO suplementado com 500 µg/ml de espectinomicina. Após 3 a 4 semanas no meio de selecção, aparecerão no tecido da folha pequenos rebentos verdes resistentes a espectinomicina. Estes rebentos continuarão a crescer em meio contendo espectinomicina e são referidos como putativos transformantes primários.

Quando os putativos transformantes primários tiverem desenvolvido 2 a 3 folhas, 2 pequenas peças (aproximadamente 0,5 cm²) são cortadas de cada folha e utilizadas para selecção ou para um segundo ciclo de regeneração de rebentos. Uma peça é colocada com o lado abaxial para cima em placas contendo meio TSO suplementado

com 500 µg/µl de espectinomicina, e a outra peça é colocada com o lado abaxial para cima em meio TSO suplementado com 500 µg/ml de cada espectinomicina e estreptomicina. Os transformantes positivos são identificados como os rebentos que formam calos verdes no meio TSO contendo espectinomicina e estreptomicina.

Após 3 a 4 semanas, o tecido colocado em meio TSO contendo apenas espectinomicina, que foi identificado como positivo no meio TSO com espectinomicina e estreptomicina, desenvolverá rebentos verdes. Dois a quatro rebentos de cada transformante positivo são seleccionados e transferidos para meio TSO suplementado com 500 µg/ml de espectinomicina para a criação de raízes. A análise "Southern" é efectuada em 2 rebentos para confirmar a homoplasmia tal como descrito abaixo. Os rebentos dos acontecimentos homoplásmicos são transferidos para a estufa para produção de sementes, enquanto que os transformantes que não são homoplásmicos são enviados para um segundo ciclo de regeneração em meio TSO com 500 µg/ml de espectinomicina para alcançar homoplasmia.

Exemplo 3 Análise de Plantas Transplastómicas de Tabaco Transformadas com Construções de Tolerância a um Herbicida

3A. Análise "Southern"

As plantas transformadas seleccionadas para expressão do gene marcador *aadA* são analisadas para deter-

minar se todo o conteúdo dos plastos da planta foi transformado (transformantes homoplásmicos). Tipicamente, após dois ciclos de formação de rebentos e selecção de espectinomicina, aproximadamente 50% das plântulas transgénicas que são analisadas são homoplásmicas, tal como determinado através de análise "Southern blot" do ADN dos plastos. As plântulas homoplásmicas são seleccionadas para posteriores culturas.

O ADN genómico é isolado a partir das plantas de tabaco transformadas, sujeito a electroforese e transferido para filtros tal como descrito em Svab *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917, 1993).

As plantas de tabaco homoplásmicas transformadas para expressar EPSPS CP4 em plastos foram identificadas utilizando uma sonda preparada a partir de um fragmento *EcoRI/EcoRV* de 2,4 kb do vector pOVZ2 (semelhante a pOVZ15 descrito em Zoubenko, *et al.*, 1994, *supra*). O fragmento da sonda de 2,4 kb abrange parte da sequência direccionadora.

Os resultados das hibridações "Southern" identificaram 3 linhas homoplásmicas do tabaco transformado com as construções pMON30123 e pMON30130 e 1 linha do tabaco transformado com pMON38773 para posteriores análises.

O completo desaparecimento do fragmento *BamHI* de tabaco nativo de 3,27 Kb das linhas 30123-19-1A, 30123-23-2A, 30123-18-1B, 30130-51-2A, 30130-51-2P, 30130-57-1P e

38773-6 com uma sonda que cobre a região de integração, e o aparecimento de bandas com o tamanho esperado para os fragmentos de ADN inseridos nesses transformantes, 5,14 kb e 0,9 kb, estabelece que as plantas transformadas são homoplásmicas para as construções pretendidas.

Os resultados das hibridações "Southern" identificaram 3 linhas homoplásmicas de tabaco transformado com pCGN5177, as linhas 74-1B-P, 74-2 e 74-7.

As linhas de tabaco transplastômicas 5175 e 6114 foram analisadas através de hibridação "Southern" quanto à homoplasma tal como descrito acima. Os resultados das hibridações "Southern" identificaram 4 linhas homoplásmicas de tabaco transformadas com pCGN6114.

Os resultados das hibridações das linhas transplastômicas de tabaco 5175 identificaram uma linha, 76-4A-F, como homoplásmica e uma segunda linha como 95% homoplásmica.

As plantas de tabaco homoplásmicas transformadas para expressar BXN/AHAS nos plastos foram identificadas utilizando hibridações "Southern" tal como descrito acima.

Os resultados das hibridações "Southern" identificaram 14 linhas homoplásmicas de tabaco transformado com pCGN5026. Os filtros foram novamente sondados com um fragmento do gene BXN e verificou-se que 21 linhas continham BXN, 14 linhas das quais eram homoplásmicas.

3B. Análise "Northern"

Para determinar o nível de transcrição do ARNm de EPSPS, BXN ou AHAS expresso nas plantas de tabaco transplastómicas, foram efectuadas hibridações "Northern blot" com ARN total isolado a partir de cada uma das linhas identificadas. O ARN total foi isolado utilizando o reagente TRIzol (Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) de acordo com o protocolo do fabricante. O ARN total, 2 µg, foi separado num gel de agarose desnaturante e transferido para uma membrana de nylon (Maniatis *et al.*, 1989, *supra*). As sondas radioactivas para as hibridações foram preparadas utilizando fragmentos de EPSPS CP4, fitoeno-dessaturase, BXN ou AHAS marcados por iniciadores aleatórios (utilizando o estojo de marcação Random Primer de Boehringer Mannheim) e as hibridações foram realizadas em SSPE 2× (Maniatis, *et al.*, 1989, *supra*) a 60°C. Os filtros foram despídos das sondas e sondados de novo com uma sonda do gene do ARN ribossómico 16S de plastos (do pPRV112A, Zoubenko, *et al.*, 1994, *supra*) para confirmar o carregamento homogéneo do ARN no filtro.

Os resultados das hibridações "Northern" efectuadas com as sondas de EPSPS demonstram que todas as sete (7) linhas examinadas expressam ARNm de EPSPS CP4. As hibridações efectuadas com a sonda do ribossoma 16S confirmam que os géis desnaturantes foram carregados com

quantidades semelhantes de ARN total para cada amostra. Para além disso, as linhas de tabaco transplastómicas que expressam EPSPS a partir dos elementos reguladores *Prrn/rbcL*(RBS) (pMON30123) expressam ARNm de EPSPS a níveis mais elevados do que as plantas de tabaco homoplásmicas para EPSPS controlado pelas sequências do promotor *Prrn/G10L* (pMON38773)/RBS.

Os resultados das hibridações "Northern" efectuadas com as sondas de BXN, AHAS e *crtI* demonstram que todas as linhas homoplásmicas de tabaco 5026, 5175 e 5177 expressaram ARNm de *crtI*, BXN e/ou AHAS.

3C. Análise "Western blot" de EPSPS CP4 de Tabaco

Para determinar a expressão da EPSPS, foi efectuada análise "Western blot" numa única linha de cada construção, pMON30123, pMON30130 e pMON38773.

A proteína solúvel total foi extraída a partir de tecido foliar congelado moendo 250 mg de tecido em 250 μ l de tampão PBS (KH_2PO_4 1 mM, Na_2HPO_4 1 mM, NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM, pH 7,0) contendo inibidores de proteases. O homogenato é centrifugado durante 5 minutos, e o sobrenadante é transferido para um tubo novo. A concentração da proteína no sobrenadante é determinada utilizando um ensaio de concentração proteica (BioRad, Richmond, CA).

A proteína total extraída é sujeita a electroforese num gel de SDS-PAGE a 4-20% (Sigma, St Louis, MO) e transferida para uma membrana de PVDF em tampão de SDS-PAGE 1× (Maniatis et al. 1989, Cold Spring Harbor Press). Padrões quantificados de proteína EPSPS CP4 purificada foram utilizados para quantificar a expressão da EPSPS CP4 tal como expressa no plasto vegetal.

As hibridações "Western" são efectuadas tal como descrito em Staub e Maliga *EMBO J.* 12(2): 601-606, 1993, excepto quanto à utilização de anticorpos criados para EPSPS. As membranas de PVDF contendo a proteína sujeita a electroforese transferida foram incubadas numa solução de bloqueio de tampão PBS contendo Tween-20 a 0,05% (PBS-T) e leite a 5% de um dia para o outro a 4°C. As membranas são então incubadas numa solução de PBS-T contendo leite a 1% e um anticorpo primário criado em cabras para a EPSPS CP4 durante 2 horas à temperatura ambiente. As membranas são lavadas três vezes numa solução de PBS-T contendo leite a 0,1%, cada lavagem durante 5 minutos à temperatura ambiente. As membranas são então incubadas numa solução de PBS-T contendo leite a 1% e anticorpo de ovelha anti-cabra durante 1 hora à temperatura ambiente e são lavadas outra vez em PBS-T contendo leite a 0,1%, três vezes durante 10 minutos à temperatura ambiente. Uma lavagem final utilizando apenas PBS-T é efectuada antes da revelação das membranas utilizando um estojo de detecção não radioactiva (ECL, Amersham).

Tabela 2

Número da Construção	Número do Acontecimento	% de Proteína Solúvel Total
pMON30123	T18-23-2A	0,001
pMON30130	T18-51-2P	0,002
pMON38773	9706-6-1	0,2

Os resultados listados na Tabela 2 demonstram que aumentos significativos no nível da proteína EPSPS podem ser obtidos a partir de plantas transformadas para expressar EPSPS a partir do promotor *Prrn/G10L*. Estes resultados demonstram que a expressão de EPSPS conduzida pelas sequências reguladoras *Prrn/rbcLRBS* pode produzir aproximadamente 0,001% da proteína solúvel total como EPSPS, enquanto que as plantas que expressam EPSPS a partir das sequências reguladoras *Prrn/G10L* expressam 0,2% da proteína solúvel total como EPSPS. As linhas subsequentes demonstraram proteína solúvel total de cerca de 1% de EPSPS quando expressas a partir das sequências reguladoras *Prrn/G10L*. Estes resultados, tomados em conjunto com os resultados das hibridações "Northern" acima, indicam que pode ser obtida uma tradução mais eficiente a partir do local de ligação ao ribossoma G10L.

Hibridação "Western immunoblot" foi também efectuada em 2 linhas homoplásmicas 5026 de tabaco tal como descrito acima, utilizando anticorpos criados contra bromoxinilo. Os resultados da análise "Western immunoblot" de proteína solúvel total extraída a partir das linhas de

tabaco transformadas com pCGN5026 demonstraram que ambas as linhas homoplásmicas produziram a proteína nitrilase.

A análise "Western immunoblot" foi efectuada tal como descrito acima a partir de proteína total extraída das linhas de tabaco transformadas com pCGN6114 e o pCGN5197.

Os resultados da análise demonstraram que foi produzido bromoxinilo nas linhas de tabaco 6114 variando de 1% a 2% da proteína solúvel total da folha.

Os resultados da análise "Western" das linhas de tabaco 205197 demonstraram que o bromoxinilo e Bt foram ambos produzidos como 1% da proteína solúvel total da folha.

3D. Análise da Actividade da Enzima EPSPS

A actividade da enzima EPSPS em plantas de tabaco transplastómicas contendo o vector de expressão de plastos pMON38773 foi determinada utilizando um ensaio de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

Os métodos para a análise da actividade da enzima EPSPS estão descritos em Padgette *et al.* (*J. Biol. Chem.* 263: 1798-1802, 1988 e *Archiv. Biochem. Biophys.* 258: 564-573, 1987) e Wibbenmeyer *et al.* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 760-766, 1988).

Os resultados são resumidos na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3

<u>Nuclear</u> Intervalo da Actividade Enzimática	<u>Nuclear</u> % Total de Plantas no Intervalo	<u>Cloroplasto</u> 38773-6
1-3,7 $\mu\text{mol/mg}$	1%	
>0,1 $\mu\text{mol/mg}$	16%	
>10 nmol/mg	55%	16,39 nmol/mg
>1 nmol/mg	32%	
0 nmol/mg	3%	

Estes resultados demonstram que a expressão de EPSPS em plastos produz enzima EPSPS activa.

3E. Análise da Tolerância a Glifosato

Uma linha de tabaco transplastómica homoplásmica para a construção pMON38773 foi testada *in vitro* para determinar o nível mais elevado de tolerância ao glifosato. O tecido de explante foi preparado a partir de peças de folha de plantas de tabaco de tipo selvagem não transgénico de controlo, *Havanna*, e da linha de tabaco homoplásmica 38773-6 e cultivou-se para regeneração de rebentos em meio TSO (descrito acima) suplementado com níveis de glifosato de 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM . Os resultados estão resumidos na Tabela 4 abaixo. O número de explantes produzindo rebentos foi determinado às 3 semanas e 6 semanas após a preparação dos explantes e cultura em meio contendo glifosato.

Tabela 4

Nível de Glifosato (μM)	Número Total de Explantes	Número de Regenerados 3 Semanas	Número de Regenerados 6 Semanas	% de Regeneração de Explantes
Tipo Selvagem				
50	10	0	0	0
75	10	0	0	0
100	10	0	0	0
150	10	0	0	0
200	10	0	0	0
38773-6				
50	8	5	8	100
75	18	14	18	100
100	17	12	15	88
150	18	10	16	89
200	16	8	15	86

Os resultados acima demonstram que em todos os níveis de glifosato examinados, se regeneraram rebentos a partir dos explantes preparados a partir de uma linha de tabaco homoplásmica para pMON38773, enquanto que nenhum rebento regenerou a partir dos explantes preparados a partir de plantas de controlo não transformadas. Estes resultados sugerem que as plantas de tabaco que expressam EPSPS nos plastos demonstram tolerância a níveis de glifosato de pelo menos 200 μM .

Linhas transplastômicas adicionais foram testadas *in vitro* quanto à tolerância a glifosato tal como descrito acima. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5

Resumo das experiências de transformação de plastos de tabaco com várias construções contendo genes de EPSPS.

Construção	Espec/Estrep (+)	Nº de Rebentos Gly 50 µM (+)
pMON38766 (Selvagem)	1	0
pMON38766 (T7)	6	0
pMON38773 (Selvagem)	9	5(1)
pMON38797 (Selvagem)	2	0
pMON38798	6	6
pMON38793	8	0
pMON38796	4	0
pMON45201	9	3
pMON45204	12	*

(Nº de rebentos positivos a glifosato 1 mM)

Estes resultados demonstram que estas linhas transplastômicas mostram tolerância ao glifosato. Os números entre parênteses são o número de rebentos resistentes à selecção em glifosato 1 mM. Assim, tal como se pode observar na tabela 5, são geradas linhas de tabaco que são tolerantes à selecção em glifosato 1 mM.

Plantas de tabaco homoplásmicas da linha 38773-6 são pulverizadas com glifosato utilizando um pulverizador de pista a concentrações que correspondem 0 kg/ha, 1,12 kg/ha, 2,24 kg/ha e 4,48 kg/ha (0 oz/acre, 16 oz/acre, 32 oz/acre e 64oz/acre) para testar a tolerância da planta inteira. A altura da planta foi medida antes e depois da pulverização com glifosato. Os dados sobre os ferimentos vegetativos foram colhidos duas semanas após a pulverização, enquanto que os dados sobre os ferimentos reprodutivos foram colhidos na maturidade da planta.

Os resultados iniciais indicam que as linhas de tabaco homoplásmicas pulverizadas são tolerantes ao glifosato na concentração de 1,12 kg/ha (16 oz/acre) tal como demonstrado no ferimento do tecido vegetativo (Tabela 6). Tal como se pode observar na Tabela 5 foram geradas linhas transplastômicas que demonstraram um bom nível de tolerância ao glifosato a 2,24 kg/ha (32 oz/acre). Em experiências subsequentes com linhas transformadas adicionais, as linhas transplastômicas mostraram tolerância ao glifosato a um nível de 4,48 kg/ha (64 oz/acre).

A tolerância é caracterizada pelo crescimento e enverdecimento contínuos dos tecidos pulverizados com glifosato. No entanto, uma vez que a concentração de glifosato aplicada aumentou, houve um aumento correspondente no nível de ferimentos vegetativos. Em contraste, as plantas de controlo não transformadas eram altamente susceptíveis a concentrações de glifosato tão baixas quanto 1,12 kg/ha (16 oz/acre).

Tabela 6

Nº da Planta	Construção	Taxa de glifosato (oz/A)	Altura da planta (cm) antes da pulverização	Altura da planta (cm) após pulverização	Ferimentos vegetativos	Valores da fertilidade
1	38773	0	12,2	30,5	0	0
2	38773	0	13,6	34,0	0	0
3	38773	0	8,6	23,8	0	0
4	38773	0	8,6	26,2	0	0
5	38773	0	7,8	28,8	0	0
6	38773	0	12,8	31,5	0	0
7	38773	0	12,2	31,6	0	0
8	38773	0	11,6	35,5	0	0
9	38773	16	9,0	29,0	1	0
10	38773	16	14,4	31,0	0	0
11	38773	16	13,4	32,0	0	0
12	38773	16	13,2	30,0	0	0
13	38773	16	14,2	30,5	0	1
14	38773	16	14,0	33,0	0	0
15	38773	16	13,2	30,2	0	0
16	38773	16	14,9	30,4	0	0
17	38773	32	12,0	26,5	2	4
18	38773	32	11,6	25,4	1	1
19	38773	32	9,4	22,0	1	3
20	38773	32	11,2	23,0	2	4
21	38773	32	13,8	25,8	1	2
22	38773	32	12,4	23,0	1	4
23	38773	32	10,2	19,0	2	4

24	38773	32	13,8	23,2	2	3
26	38773	64	11,8	20,0	2	5
27	38773	64	13,0	22,0	2	5
28	38773	64	12,2	18,0	3	5
29	38773	64	15,8	23,0	2	5
30	38773	64	10,4	17,5	2	5
32	38773	64	15,0	18,5	2	5
33	38773	64	13,8	21,8	2	5
34	38773	64	13,6	19,0	3	5
35	38773	64	10,8	16,0	3	5
36	T. selvagem	0	21,0	40,6	0	0
37	T. selvagem	0	16,0	38,0	0	0
38	T. selvagem	0	15,0	34,6	0	0
39	T. selvagem	0	17,6	32,2	0	0
40	T. selvagem	0	15,0	31,6	0	0
41	T. selvagem	0	14,0	32,0	0	0
42	T. selvagem	16	10,0	11,8	3	5
43	T. selvagem	16	8,0	10,0	3	5
44	T. selvagem	16	8,6	11,0	3	5
45	T. selvagem	16	8,0	14,0	3	5
46	T. selvagem	16	9,8	11,0	3	5
47	T. selvagem	16	10,4	14,0	3	5
48	T. selvagem	32	10,8	13,2	3	5
49	T. selvagem	32	9,0	13,0	3	5
50	T. selvagem	32	8,0	10,2	3	5
51	T. selvagem	32	11,0	14,0	4	5
52	T. selvagem	32	9,8	13,0	3	5

53	T. selvagem	32	8,0	10,8	4	5
54	T. selvagem	64	7,5	8,6	4	5
55	T. selvagem	64	11,2	12,5	4	5
56	T. selvagem	64	10,2	12,8	4	5
57	T. selvagem	64	11,5	13,0	4	5
58	T. selvagem	64	13,0	15,0	4	5
59	T. selvagem	64	9,8	11,2	4	5

Ferimentos vegetativos:

0 = planta normal

1 = ligeira clorose de folhas novas e definhamento

2 = clorose grave de folhas novas, malformação de folhas novas e definhamento grave

3 = planta a morrer

4 = planta morta

Valores da fertilidade:

0 = Fértil, sem atraso na maturidade, muitas sementes

1 = Algum aborto, ligeiro atraso na formação de sementes, com sementes

2 = Aborto significativo, atraso significativo no aparecimento de sementes, algumas sementes

3 = Aborto muito grave, vagens de sementes imaturas, poucas sementes

4 = Flores mal-formadas; quando florescem, atraso extremo na floração e sem produção de sementes

5 = Planta morta

3F. Análise de BT/BXN

As plantas de tabaco homoplásmicas das linhas 5175 e 5197 são pulverizadas com o herbicida Buctril a uma concentração de 4% para testar para tolerância da planta inteira.

Os resultados do teste de pulverização com Buctril demonstraram que todas as linhas 5197 que expressavam *bxn* eram completamente resistentes quando pulverizadas com uma solução contendo o herbicida Buctril a 4%.

Duas linhas das seis linhas 5175 testadas eram completamente resistentes ao herbicida quando pulverizadas com uma solução contendo Buctril a 4%.

3G. Análise da Resistência a Norflurazon

Foi montada uma experiência para determinar a eficácia da característica de *CrtI* em relação à resistência ao herbicida Norflurazon. Foram plantadas três linhas 5177 transformadas, 74-1B-P, 74-2-A e 74-7-C e três linhas de controlo. As plantas foram criadas durante sete semanas e depois regadas com uma solução de Norflurazon 3 μ M. As plantas negativas quanto à presença do gene *crtI* com origem nos plastos foram descoradas pelo tratamento com Norflurazon, as plantas positivas permaneceram verdes e continuaram a crescer.

Os resultados mostram que as três linhas 5177 homoplásmicas de tabaco eram resistentes à solução de Norflurazon 3 μM , enquanto que as plantas de controlo eram todas susceptíveis à solução (Tabela 7).

Tabela 7

Linha	Controlo/Transgénica	Resultado
Xanthi	Controlo	Susceptível
2560A Xanthi	Controlo	Susceptível
75-5D-A	Controlo	Susceptível
74-1B-P	Homoplásmica	Resistente
74-2-A	Homoplásmica	Resistente
74-7-C	Homoplásmica	Resistente

Exemplo 4 Análise das Plantas de Tabaco Transgénicas de hGH

4A. Análise "Southern"

Plantas transformadas seleccionadas quanto à expressão do gene marcador *aadA* são analisadas para determinar se todo o conteúdo dos plastos vegetais foi transformado (transformantes homoplásmicos). As plantas homoplásmicas são seleccionadas utilizando hibridação "Southern" para posteriores culturas.

O ADN genómico é isolado a partir de plantas de tabaco transformadas, sujeito a electroforese e transferido

para filtros tal como descrito em Svab *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917, 1993).

As plantas de tabaco homoplásmicas transformadas para expressar hGH foram identificadas utilizando uma sonda preparada a partir de um fragmento *EcoRI/EcoRV* de 2,4 kb do vector pOVZ2 (semelhante a pOVZ15 descrito em Zoubenko, *et al.*, 1994, *supra*). O fragmento de sonda de 2,4 kb abrange parte da sequência direccionadora.

O completo desaparecimento do fragmento *BamHI* de tabaco nativo de 3,27 Kb das linhas com uma sonda que cobre a região de integração, e o aparecimento da banda com o tamanho esperado para os fragmentos de ADN inseridos nesses transformantes, 5,6 kb, estabelece que as plantas transformadas são homoplásmicas para as construções pretendidas.

4B. *Análise da Expressão Proteica*

Linhas de tabaco homoplásmicas expressando hGH e transformantes nucleares de tabaco são utilizados para determinar a expressão da proteína hGH. Foi efectuada análise "Western blot" em linhas de tabaco contendo as construções pWRG4838, pMON38755 e pMON38794 para expressão em plastos e foi utilizado um ensaio ELISA para as linhas de tabaco transgénicas contendo pWRG4744 e pWRG4747 para expressão nuclear de hGH.

Foram efectuadas extracções de proteína total e

procedimentos de "Western blot" tal como descrito acima, com a exceção de que o anticorpo primário foi criado contra hGH.

Tabela 8

Níveis de Expressão de hGH no Genoma Nuclear e no Genoma de Plastos de Tabaco

Construção	Expressão	Nível de Expressão % de Proteína Solúvel Total
pWRG4744	nuclear	0,002-0,125%
pWRG4747	nuclear	0,002-0,025%
pWRG4838	plasto	0,2%
pMON38755	plasto	1,0%
pMON38794	plasto	7,0%

Os resultados da análise "Western" (Tabela 8) demonstram que a hGH expressa nos plastos de células vegetais se acumula até níveis significativamente mais elevados do que a hGH expressa no núcleo e direccionada para o citoplasma ou para os plastos das células vegetais. As plantas de tabaco transformadas para expressar hGH no núcleo acumularam níveis de hGH de 0,002% (direccionada para o citoplasma) a 0,025% (direccionada para os plastos) da proteína solúvel total da folha, enquanto que as plantas de tabaco expressando hGH nos plastos acumularam níveis de

hGH de 0,2% a 7,0% da proteína solúvel total da folha como hGH. Para além disso, as plantas de tabaco homoplásmicas expressando hGH dirigida a partir das sequências reguladoras *Prrn/G10L* acumulam níveis de hGH 35 vezes mais elevados que as plantas de tabaco homoplásmicas que expressam hGH dirigida a partir da sequência promotora *PpsbA*. O nível de expressão mais elevado pode ser devido ao forte promotor *Prrn* e/ou à maior tradução do gene de fusão mediada pela região rbs do líder do gene 10. Folhas de diferentes idades tinham padrões de acumulação de hGH variados, com as folhas maduras e velhas possuindo níveis semelhantes e as folhas mais novas muito menos hGH. Isto é consistente com o menor número de cloroplastos nas folhas novas.

Interessantemente, tanto a ubiquitina-hGH como a hGH processada se acumularam nos extractos pós-colheita das linhas Nt-38755 e Nt-38794. O processamento da ubiquitina foi frequentemente observado em >50% das espécies de proteína hST total, dependendo das condições de extracção. Este resultado confirma a utilidade da abordagem da proteína de fusão em proteínas expressas em cloroplastos. O aparecimento de uma banda extra observada na amostra Nt-4838 é consistente com um dímero de hGH.

Para comparação dos sistemas de expressão em plantas, foram criadas plantas transgênicas nucleares que expressam hGH a partir de dois conjuntos diferentes de

sinais de expressão. As construções wrg4747 e wrg4776 expressam hGH utilizando o forte promotor do Vírus do Mosaico de Escrofulariáceas ou o promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor, respectivamente. A construção wrg4747 emprega um péptido de trânsito de cloroplasto para direccionar após a tradução a hGH para os cloroplastos (FMV::CTP-hGH), enquanto que a construção wrg4776 direcciona a hGH através do retículo endoplasmático (ER) para a via secretora (35S::ER-hST). Linhas transgênicas para ambas as construções foram obtidas através de bombardeamento de partículas. A expressão de hST foi quantificada através de ensaio ELISA e mostrou-se que era menos de 0,025% pst. Este nível de expressão é pelo menos 300 vezes menor que nas linhas de pMON38794, provando a praticabilidade do sistema de expressão de cloroplasto para a potencial produção de hST.

4C. Caracterização da Proteína hGH Expressa no Plasto

Para determinar se a hGH expressa a partir dos plastos era correctamente processada, foram efectuadas experiências para determinar a dobragem correcta e a bioactividade.

Duas folhas inferiores das linhas transplastómicas de tabaco contendo pMON38794 foram utilizadas para extrair e purificar hGH. As nervuras grandes foram removidas das folhas excisadas e o tecido da folha foi cortado em pequenas secções (aproximadamente 0,5 cm²). As

peças das folhas foram rapidamente congeladas em azoto líquido e moídas num pó fino num almofariz e pilão arrefecidos. Dez gramas de tecido da folha congelado e moído foram adicionados a uma solução de Tris base 100 mM (30 ml) fria e misturados vigorosamente sujeitando a vórtice durante 5 minutos. A solução foi filtrada através de uma única camada de pano de ligadura.

A partir da solução filtrada, foram preparadas três amostras separadas. A primeira amostra foi preparada através da centrifugação de 4 ml do filtrado durante 1 minuto a 16000 rpm. O centrifugado foi distribuído em alíquotas em frascos de 1 ml e congelado em gelo seco. O restante filtrado foi centrifugado durante 10 minutos a 4800 rpm e foram congeladas várias alíquotas de 0,5 ml tal como acima para a segunda amostra. Ao restante filtrado centrifugado (aproximadamente 25 ml), foram adicionados 200 µl de ácido acético glacial para baixar o pH de 8,2 para 4,56. A solução foi centrifugada a 4800 rpm durante 30 minutos, e o sobrenadante foi congelado em gelo seco para a terceira amostra.

A proteína solúvel total (PST, Tabela 9) foi calculada nestas amostras através de procedimentos padrão de ensaio de proteínas (Maniatis), e a percentagem de pureza da hGH foi calculada com base em resultados de análise "Western blot" utilizando concentrações conhecidas do material de partida.

Tabela 9

ID da Amostra	PST mg/ml	GP2000 mg/l	% de Pureza
Extracto Filtrado imediatamente centrifugado e congelado	6,3	28	0,45%
Extracto Filtrado centrifugado a 4800 rpm durante 10 min e congelado	6,4	28	0,45%
Extracto de pH ajustado e centrifugado	0,75	21	2,8%

O extracto de pH ajustado e centrifugado foi purificado através de HPLC de Fase Inversa (RP-HPLC) para espectrometria de massa por electrospray e sequenciação dos aminoácidos amino-terminais. A RP-HPLC foi efectuada utilizando uma bomba e um carregador de amostras automático Perkin-Elmer série 200 e uma coluna de RP-HPLC Vydac C8 (250 por 4,6 mm). 750 Microlitros de amostra foram carregados na coluna equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 20 mM e acetonitrilo a 50%. Após o carregamento, a coluna foi lavada durante 2 minutos com acetonitrilo a 50%, TFA 20 mM seguido de um gradiente linear de acetonitrilo a 2% durante 10 minutos seguido de um gradiente de acetonitrilo a 10% durante 1 minuto. O caudal foi constante a 1,5 ml/minuto com o eluato da coluna monitorizado a 278 nm com um detector Perkin-Elmer 785. Os dados foram recolhidos e analisados com um sistema de dados PE-Nelson Turbochrom.

Os resultados da análise de RP-HPLC são mostrados na Figura 3. O pico I (o pico mais alto) tem o tempo de retenção esperado para a GP2000 nativa, correctamente dobrada de 22 kDa. Este pico foi recolhido e seco num Savant Speed-VAC para sequenciação amino-terminal e espectrometria de massa por electrospray.

A análise de espectrometria de massa (MS) de ionização por electrospray utilizou um espectrómetro de massa de tempo-de-voe por electrospray Micromass Q-Tof. As amostras foram preparadas ressuspendendo em metanol a 50% + ácido acético a 2%, e infundidas na fonte do espectrómetro de massa a uma velocidade de 4 ml/min. Os dados brutos mostrados na Figura 4 mostram uma série de iões correspondentes à(s) espécie(s) presente(s) na amostra com números variáveis de protões ligados. Os eixos deste espectro são a intensidade *versus* a razão massa/carga da(s) espécie(s) presente(s). Um algoritmo de desconvolução é utilizado para converter esta série de iões carregados de forma múltipla num espectro de peso molecular.

Os resultados da espectrometria de massa do pico I da RP-HPLC mostram 4 espécies principais de proteína de diferentes massas moleculares. A espécie de 21997 kDa representa a massa prevista da hGH com a Phe N-terminal prevista removida através de sobreclivagem da protease de Ubiquitina com um resíduo de prolina N-terminal (P-hGH). A espécie de 22124 kDa representa a massa prevista da sequência de aminoácidos correcta, correctamente processada

de hGH possuindo a fenilalanina N-terminal (F-hGH). Pensa-se que as espécies de 22507 kDa e 22664 kDa representam uma hGH com a Phe N-terminal e a hGH que foi modificada durante os procedimentos de extracção vegetal, respectivamente. A massa molecular calculada das proteínas sugere que a hGH expressa a partir do plasto está correctamente dobrada (*i.e.* são criadas as ligações dissulfureto correctas).

A mobilidade equivalente à proteína redobrada produzida por *E. coli* indica a formação das duas ligações dissulfureto e a dobragem correcta da hGH derivada de cloroplastos. Este resultado foi surpreendente devido à natureza procariótica dos cloroplastos. Não existem proteínas expressas em plastos conhecidas que possuam ligações dissulfureto. No entanto, enzimas importadas codificadas nuclearmente podem ser activadas através de ciclos de oxidação/redução da ligação dissulfureto, utilizando presumivelmente o sistema de tio-redoxina do cloroplasto (Jacquot, *et al.* *New Phytol.* 136: 543-570, 1997) ou uma proteína do cloroplasto dissulfureto-isomerase recentemente descoberta (Kim e Mayfield, *Science* 278: 1954-1957, 1997). Este resultado sugere que o organito procariótico possui a maquinaria necessária para dobrar proteínas eucarióticas complexas no compartimento solúvel do estroma do cloroplasto. Isto é distinto de *E. coli*, onde as proteínas recombinantes tendem a acumular-se dentro de corpos de inclusão e requerem então solubilização e redobragem.

A sequenciação do terminal amino foi feita atra-

vés de degradação padrão de Edman e confirmou as sequências N-terminais discutidas acima.

4D. *Bioactividade da hGH Expressa em Plastos Vegetais*

A bioactividade do extracto de pH ajustado e centrifugado foi testada utilizando células de uma linha celular Nb2. Estas células proliferam na presença de hormona de crescimento e de outro tipo de compostos estrogénicos. O ensaio envolve pôr extractos contendo várias concentrações de hormona de crescimento numa placa de 96 poços. Depois é adicionada uma quantidade constante de células a cada poço. A placa é incubada durante 48 h e depois é adicionado um reagente chamado MTS. As células metabolizadoras tomam o MTS e convertem-no numa substância colorida azul. Quanto mais células houverem mais cor azul existirá no poço. A cor azul é medida utilizando um espectrofotómetro. O número de células deve ser proporcional à concentração de hormona de crescimento nos meios. A uma determinada concentração elevada espera-se que as células se tornem saturadas com hormona de crescimento e que a resposta à dose se mantenha constante. A concentrações muito baixas de hGH não se observa essencialmente nenhum crescimento maior. Representando graficamente o número de células (ou absorvência) *versus* a concentração de hGH espera-se que seja produzido um gráfico de forma sigmóide.

O emparelhamento dissulfureto adequado na hGH de

cloroplastos implica que a proteína deva ser biologicamente activa. Para testar *in vitro* esta hipótese, foi empregue uma linha celular de linfoma de rato, Nb2, que prolifera na presença de somatotrofina (hGH) e outros compostos de tipo estrogénico. A proliferação desta linha celular é proporcional à quantidade de somatotrofina no meio de cultura, até ser alcançada a saturação. O eluato da coluna de permuta iónica das plantas transplastómicas Nt-4838 e Nt-38794 ou de plantas de tipo selvagem tratadas de forma idêntica foi adicionado ao meio de cultura das células Nb2. Como controlo foi utilizada hGH produzida em *E. coli*, redobrada. O extracto de plantas de tipo selvagem não mostrou nenhuma actividade neste ensaio, indicando que não há nenhum composto vegetal endógeno capaz de estimular o crescimento da linha celular Nb2. Em contraste, os extractos de Nt-4838 e Nt-38794 estimularam ambos a proliferação da linha celular até uma extensão igual à dos controlos positivos: o extracto da planta de tipo selvagem que tinha sido estimulada com hGH de *E. coli* purificada ou a hGH pura sozinha.

Os resultados das células Nb2 mostram que a hGH derivada de cloroplastos é biologicamente activa. Estudos anteriores de somatotrofina recombinante produzidos em *E. coli* mostraram uma farmacocinética equivalente da proteína com uma metionina ou fenilalanina N-terminal (Moore, *et al. Endocrinology* 122: 2920-2926, 1988). Neste estudo, a clivagem da proteína de fusão pela ubiquitina nas linhas Nt-38794 gerou predominantemente P-hST, sugerindo que esta

espécie também é bioactiva. A hST dos extractos de Nt-4838 foi também caracterizada. A análise dos aminoácidos indicou >95% das espécies da proteína com alanina no terminal N. Este resultado sugere que uma actividade de metionina-aminopeptidase gerou a alanina-hST, que é também bioactiva. Uma actividade semelhante de aminopeptidase existe em *E. coli* (Meinzel, et al., *Biochimie* 75: 1061-1075, 1993). Esta descoberta em plastos pode ser explorada no futuro como meio alternativo para gerar um terminal N sem metionina.

Os resultados do ensaio de bioactividade (Figura 5) demonstram que a hGH expressa a partir de um plasto vegetal possui uma forma sigmóide quando representada graficamente como absorvência versus concentração de hGH.

Exemplo 5 Análise de Plantas de Tabaco Transplas- tómicas para Aprotinina

5A. Análise "Western" da Expressão de Aprotinina em Plastos

Linhas de tabaco homoplásmicas expressando são utilizadas para determinar a expressão da proteína aprotinina. A análise "Western" foi efectuada em linhas de tabaco contendo as construções pCGN6146, pCGN6147, pCGN6154 e pCGN6156 para a expressão em plastos da aprotinina.

As extracções da proteína total e os procedimentos de "Western blot" foram efectuados tal como

descrito acima, com excepção do anticorpo primário ter sido criado contra aprotinina.

Os resultados da análise "Western" são mostrados na Figura 6. Estes resultados indicam que a aprotinina é expressa a partir do promotor da polimerase T7 quando a sequência de codificação da aprotinina é fundida com o gene PetA ou o gene GUS inteiro. Para além disso, estes resultados indicam que a sequência petA direcciona eficientemente a proteína aprotinina para o tilacóide da célula vegetal.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Calgene LLC

<120> Expressão de Péptidos Eucarióticos em Plastos Vegetais

<130> 15246WO

<140> novo pedido

<141> 1999-07-07

<150> 09/316847

<151> 1999-05-21

<150> 09/113244

<151> 1998-07-10

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 88

<212> ADN

<213> do gene 10 do bacteriófago T7

<400> 1

aattgtagaa ataattttgt ttaactttaa gaaggagata taccttaaca tctttattaa 60
 aacaaattga aattcttct ctatatgg 88

<210> 2

<211> 58

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
 20 25 30
 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
 35 40 45
 Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
 50 55

Lisboa, 28 de Junho de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Construção compreendendo os seguintes componentes no sentido da transcrição de 5' para 3':

a) uma sequência promotora do operão do ARN ribossômico 16S (Prn);

b) um local de ligação ao ribossoma ligado ao referido componente promotor (a), em que o referido local de ligação ao ribossoma é derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7;

c) uma sequência de ADN codificando um péptido derivado de um organismo eucariótico; e

d) uma região de terminação da transcrição,

em que o referido péptido eucariótico é diferente de um péptido de uma planta.

2. Construção de acordo com a reivindicação 1, em que a referida construção compreende ainda:

e) um gene codificando um marcador selecionável para selecção de células vegetais compreendendo um plasto expressando o referido marcador e

f) regiões de ADN de homologia com o genoma do referido plasto, em que as referidas regiões de homologia em (f) flanqueiam os componentes (a), (b), (c), (d) e (e).

3. Construção de acordo com a reivindicação 1,

em que o referido local de ligação ao ribossoma é o local de ligação da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7.

4. Construção de acordo com a reivindicação 1, em que a referida sequência de ADN codifica um péptido nuclear vegetal.

5. Construção de acordo com a reivindicação 4, em que o referido péptido nuclear vegetal é um gene do ciclo do carbono.

6. Construção de acordo com a reivindicação 5, em que o referido gene do ciclo do carbono é seleccionado de entre o grupo que consiste em frutose-1,6-bisfosfatase-aldolase e sedo-heptulose-bisfosfatase.

7. Construção de acordo com a reivindicação 4, em que o referido péptido nuclear vegetal é um péptido antifúngico.

8. Construção de acordo com a reivindicação 1, em que a referida sequência de ADN codifica um péptido de mamífero.

9. Construção de acordo com a reivindicação 8, em que o referido péptido de mamífero é uma proteína seleccionada de entre o grupo que consiste em interferões, anticorpos monoclonais, agentes hematopoiético, hormonas

pituitárias, hormonas da tiróide, hormonas do hipotálamo, albuminas e hormonas pancreáticas.

10. Construção de acordo com a reivindicação 9, em que o referido péptido de mamífero é a hormona pancreática insulina.

11. Construção de acordo com a reivindicação 9, em que o referido péptido de mamífero é uma hormona pituitária seleccionada de entre o grupo que consiste em hormonas somatomotróficas, hormonas gonadotróficas, hormonas tirotróficas e hormonas corticotróficas.

12. Construção de acordo com a reivindicação 11, em que a referida hormona pituitária é uma hormona gonadotrófica seleccionada de entre o grupo que consiste em gonadotrofinas coriónicas, hormonas luteinizantes e hormonas estimuladoras do folículo.

13. Construção de acordo com a reivindicação 11, em que a referida hormona pituitária é uma hormona somatomotrófica seleccionada de entre o grupo que consiste em prolactina e hormonas de crescimento.

14. Construção de acordo com a reivindicação 13, em que a referida hormona somatomotrófica é a hormona de crescimento bGH.

15. Construção de acordo com a reivindicação 13,

em que a referida hormona somatomamotrópica é a hormona de crescimento hGH.

16. Construção de acordo com a reivindicação 13, em que a referida hormona somatomamotrópica é a hormona de crescimento pBL.

17. Construção de acordo com a reivindicação 9, em que o referido péptido de mamífero é um agente hematopoiético seleccionado de entre o grupo que consiste em eritropoietinas, interleucinas e factores estimuladores de colónias.

18. Construção de acordo com a reivindicação 17, em que o referido péptido de mamífero é o factor estimulador de colónias G-CSF.

19. Construção de acordo com a reivindicação 9, em que o referido anticorpo monoclonal é um anticorpo de cadeia simples F variável.

20. Construção de acordo com a reivindicação 8, em que o referido péptido de mamífero é a proteína de coagulação não enzimática seleccionada de entre o grupo que consiste nas proteínas co-factores factor V e factor VIII.

21. Construção de acordo com a reivindicação 8, em que o referido péptido de mamífero é um inibidor de proteinases.

22. Construção de acordo com a reivindicação 21, em que o referido inibidor de proteinases é aprotinina.

23. Construção de acordo com a reivindicação 2, em que o referido marcador seleccionável é seleccionado de entre o grupo de aadA, resistência a espectinomicina, resistência a estreptomicina, resistência a canamicina e um gene de tolerância ao glifosato.

24. Construção de acordo com a reivindicação 1, em que a referida sequência de codificação de ADN é a sequência de codificação nativa para o referido gene.

25. Construção de acordo com a reivindicação 1, em que a referida sequência de codificação de ADN é uma sequência de codificação sintética para o referido gene.

26. Método de produção de uma proteína numa célula vegetal, em que o referido método compreende a transformação de plastos da referida célula vegetal com uma construção compreendendo o seguinte como componentes operativamente ligados no sentido da transcrição de 5' para 3':

a) uma sequência promotora do operão do ARN ribossómico 16S (Prn);

b) um local de ligação ao ribossoma ligado ao referido componente promotor (a), em que o referido local de ligação ao ribossoma é derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7;

c) uma sequência de ADN codificando um péptido derivado de uma célula eucariótica diferente de um péptido de um plasto vegetal; e

d) uma região de terminação da transcrição,

e células vegetais em crescimento compreendendo os referidos plastos transformados sob condições em que a referida sequência de codificação de ADN é expressa para produzir o referido péptido eucariótico no referido plasto.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, em que a referida construção compreende ainda:

e) um gene codificando um marcador selecionável para selecção de células vegetais compreendendo um plasto expressando o referido marcador e

f) regiões de ADN de homologia com o genoma do referido plasto,

em que as referidas regiões de homologia em (f) flanqueiam os componentes (a), (b), (c), (d) e (e).

28. Método de acordo com a reivindicação 26, em que o referido local de ligação ao ribossoma é o local de ligação da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7.

29. Método de acordo com a reivindicação 26, em que a referida construção compreende ainda:

g) uma sequência de codificação para uma proteína secundária fundida com a referida sequência de ADN codificando um péptido de uma célula eucariótica em (c).

30. Método de acordo com a reivindicação 29, em que a referida proteína secundária é o terminal direccionador para o tilacóide do citocromo f.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, em que a referida proteína secundária é o terminal N de ubiquitina clivável.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, através do qual a referida fusão do terminal N de ubiquitina clivável é clivada do péptido eucariótico através do passo de colheita das referidas células vegetais e exposição dos conteúdos do referido plasto transformado ao citosol da referida célula vegetal.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, através do qual a expressão do referido péptido eucariótico é aumentada.

34. Método de acordo com a reivindicação 26, em que o referido péptido eucariótico diferente de um péptido de um plasto vegetal expresso no referido plasto vegetal é dobrado com o número correcto de ligações dissulfureto.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, em que o referido péptido é hGH.

36. Método de acordo com a reivindicação 26, em

que o referido péptido eucariótico diferente de um péptido de um plasto vegetal expresso no referido plasto vegetal transformado é bioactivo quando isolado do referido plasto vegetal transformado.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o referido péptido eucariótico é hGH.

38. Método de acordo com a reivindicação 26 que é adequado para produzir uma proteína de terminal N sem metionina num plasto de uma célula vegetal, em que o referido método compreende: a transformação de um plasto de uma célula vegetal com uma construção compreendendo, como componentes operativamente ligados no sentido da transcrição de 5' para 3':

a) uma sequência promotora do operão do ARN ribossómico 16S (Prn);

b) um local de ligação ao ribossoma ligado ao referido componente promotor (a), em que o referido local de ligação ao ribossoma é derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7;

c) uma sequência de ADN codificando um péptido de ubiquitina clivável,

d) uma sequência de ADN codificando uma proteína de interesse, e

e) uma região de terminação da transcrição; e
criação de uma célula vegetal compreendendo o referido plasto transformado sob condições adequadas para expressão

da referida proteína de interesse e da referida sequência de ubiquitina clivável no referido plasto.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a referida construção compreende ainda (f) pelo menos duas regiões de ADN de homologia com o genoma do referido plasto.

40. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a referida construção compreende ainda (g) um gene codificando um marcador seleccionável para selecção de uma célula vegetal compreendendo um plasto expressando o referido marcador.

41. Método de acordo com a reivindicação 38, em que o referido local de ligação ao ribossoma é o local de ligação da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7.

42. Plasto de uma célula vegetal contendo a construção de acordo com a reivindicação 1.

43. Planta, semente de planta, parte de planta, célula vegetal ou descendência destas contendo um plasto vegetal de acordo com a reivindicação 42.

44. Célula vegetal da reivindicação 43 que é produzida de acordo com o método da reivindicação 27 e compreende mais de cerca de 0,01% da proteína solúvel total como o referido péptido eucariótico.

45. Célula vegetal da reivindicação 44 que compreende mais de cerca de 0,2% da proteína solúvel total como o referido péptido eucariótico.

46. Célula vegetal da reivindicação 44 que compreende mais de cerca de 1% da proteína solúvel total como o referido péptido eucariótico.

47. Célula vegetal da reivindicação 44 que compreende 7% ou mais da proteína solúvel total como o referido péptido eucariótico.

48. Célula vegetal da reivindicação 43 que é produzida de acordo com o método da reivindicação 27, em que o referido marcador seleccionável compreende uma 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintetase tolerante ao glifosato.

49. Célula vegetal da reivindicação 43 que possui um plasto transformado produzido de acordo com o método da reivindicação 26.

50. Planta, semente de planta ou parte de planta da reivindicação 43 que compreende uma célula vegetal de acordo com a reivindicação 49.

51. Plasto vegetal da reivindicação 42 possuindo uma proteína de interesse produzida de acordo com o método da reivindicação 47.

52. Plasto vegetal de acordo com a reivindicação 51, em que a referida proteína de interesse compreende pelo menos cerca de 1% da proteína solúvel total no referido plasto.

53. Plasto vegetal de acordo com a reivindicação 52, em que a referida proteína de interesse compreende pelo menos cerca de 7,0% da proteína solúvel total no referido plasto.

54. Plasto vegetal da reivindicação 42 que incorporou de forma estável a construção tal como definida na reivindicação 38 dentro do seu genoma.

55. Célula vegetal da reivindicação 43 que compreende um plasto vegetal possuindo estavelmente incorporada a construção tal como definida na reivindicação 38 dentro do seu genoma.

56. Célula vegetal da reivindicação 43 que compreende um plasto vegetal transformado produzido de acordo com o método da reivindicação 38.

57. Planta, semente de planta ou parte de planta da reivindicação 43 compreendendo um plasto vegetal de acordo com a reivindicação 51 ou 54.

58. Planta, semente de planta ou parte de planta

da reivindicação 43 compreendendo uma célula vegetal de acordo com a reivindicação 55 ou 56.

59. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a referida proteína de interesse é dobrada com o número correcto de ligações dissulfureto.

60. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a referida proteína de interesse é hGH.

61. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a referida proteína de interesse é bioactiva quando isolada da referida célula vegetal.

62. Método de acordo com a reivindicação 61, em que a referida proteína de interesse é hGH.

63. Plasto vegetal da reivindicação 42 que possui uma construção tal como definida na reivindicação 38 estavelmente integrada no seu genoma; e uma proteína de terminal N sem metionina.

64. Célula vegetal da reivindicação 43 que compreende um plasto vegetal possuindo uma construção tal como definida na reivindicação 38 estavelmente integrada no seu genoma; e uma proteína de terminal N sem metionina.

65. Método da reivindicação 26 que é adequado para a produção de uma proteína de terminal N sem metionina

num plasto de uma célula vegetal, em que o referido método compreende: a transformação de um plasto de uma célula vegetal com uma construção compreendendo, como componentes operativamente ligados no sentido da transcrição de 5' para 3':

a) uma sequência promotora do operão do ARN ribossômico 16S (Prn);

b) um local de ligação ao ribossoma ligado ao referido componente promotor (a), em que o referido local de ligação ao ribossoma é derivado da sequência líder do gene 10 do bacteriófago T7 ou é o local rbcLRBS;

c) uma sequência de ADN codificando uma proteína de interesse, em que a referida proteína de interesse é capaz de ser reconhecida por uma Metionina-Amino-Peptidase da célula vegetal, e

d) uma região de terminação da transcrição;

e

cultura de uma célula vegetal compreendendo o referido plasto transformado sob condições adequadas para expressão da referida proteína de interesse possuindo um terminal N sem metionina.

66. Método de acordo com a reivindicação 65, compreendendo ainda o passo de criação de uma planta possuindo a referida célula vegetal.

67. Método de acordo com a reivindicação 66, compreendendo ainda o passo de colheita da referida planta e sujeição das células da referida planta a meios para

purificar substancialmente a referida proteína de interesse.

68. Método de acordo com a reivindicação 65, em que a referida Metionina-Amino-Peptidase da célula vegetal cliva a metionina N-terminal.

69. Método de acordo com a reivindicação 65, em que o segundo aminoácido da referida proteína é selecionado de entre o grupo que consiste em alanina, cisteína, glicina, prolina, serina, treonina e valina.

70. Método de acordo com a reivindicação 69, em que o referido aminoácido é alanina.

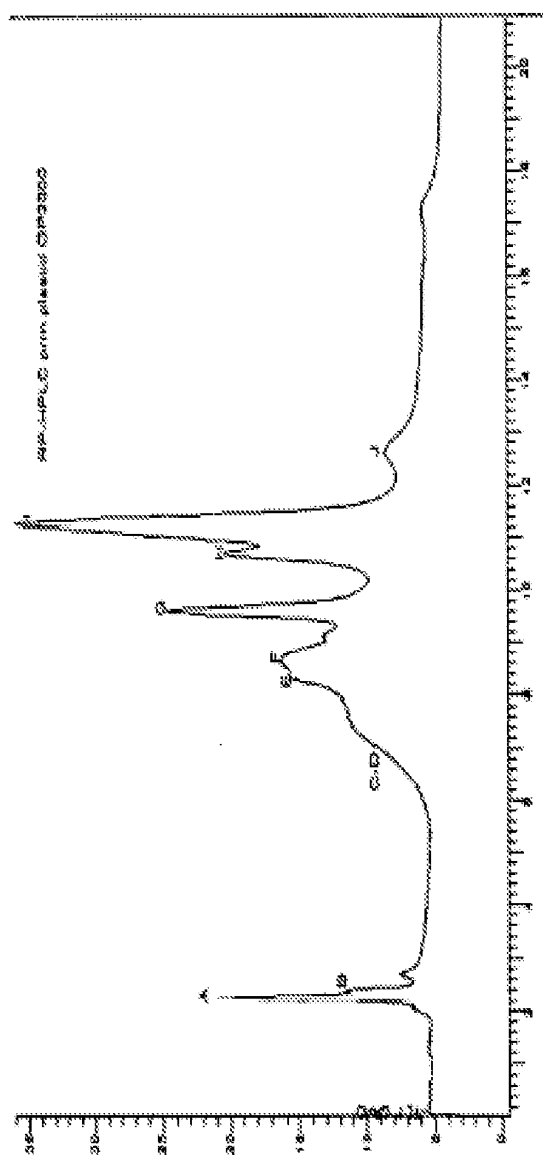
Lisboa, 28 de Junho de 2007

5' - AAT TGT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CC-3'
TTA ACA TCT TTA TTA AAA CAA ATT GAA ATT CTT CCT CTA TAT GG

FIGURA 1

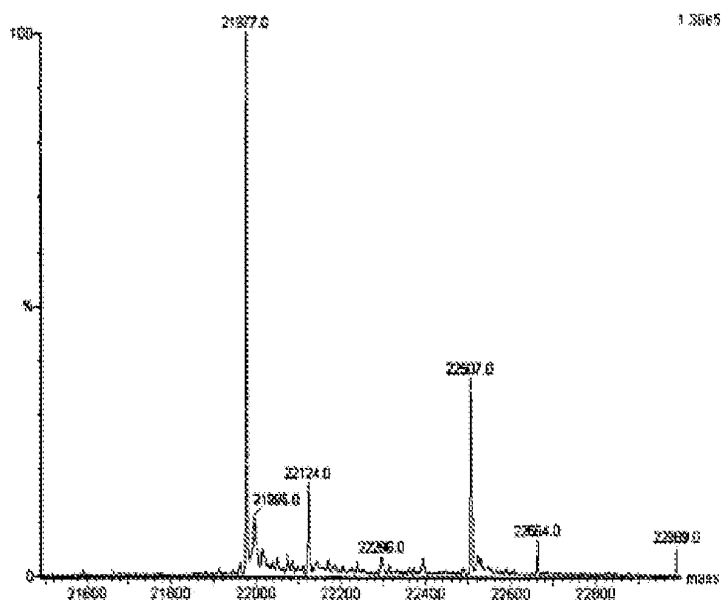
Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-
Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-
Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-
Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-Gly-
Gly-Ala

FIGURA 2



Análise de RP-HPLC mostrada acima. O pico 1 (o mais alto) tem o tempo de retenção esperado para a GP2000 nativa, correctamente dobrada de 22 kDa. Este pico foi recolhido e seco num Savant Speed-VAC para sequenciação do terminal amino e espectrometria de massa por electrospray.

FIGURA 3



Espectrometria de massa do pico 1 do RP-HPLC mostrado acima. Note-se que existem 4 espécies proteicas principais, de diferentes massas moleculares.

21977 kDa - Esta é a massa prevista da "des-Phe"-GP2000, i.e. GP2000 com a Phe N-terminal prevista removida através de sobre-clivagem pela protease de Ubiquitina.

****22124 -- Esta é a massa prevista da GP2000 com a sequência de aminoácidos correcta, correctamente processada.

22507 kDa - Esta é provavelmente des-Phe-GP2000 modificada durante os procedimentos de extração vegetal.

22664 kDa - Esta é provavelmente GP2000 modificada durante os procedimentos de extração vegetal.

A sequenciação do terminal amino foi feita através de degradação de Edman padrão, e confirmou as sequências N-terminais discutidas acima.

FIGURA 4

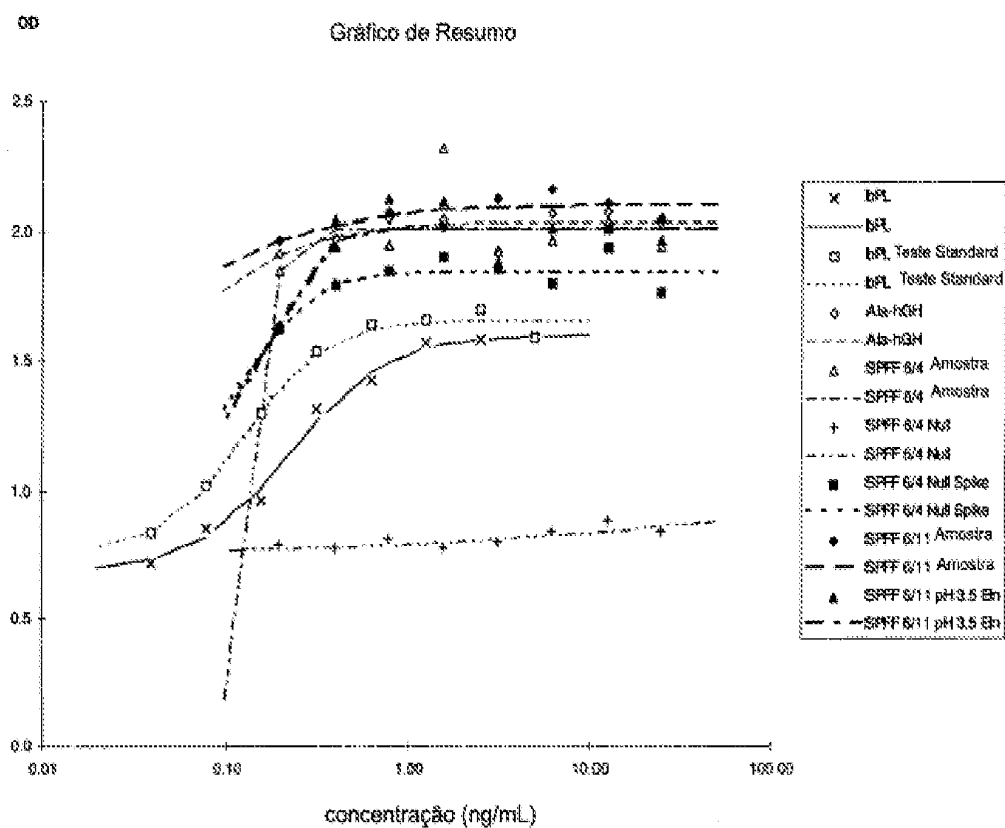


FIGURA 5