

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 657**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 15/54** (2006.01)  
**C12N 15/60** (2006.01)  
**C12N 5/04** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 9/88** (2006.01)  
**C12N 9/90** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**A01H 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07710612 .8**  
 96 Fecha de presentación: **09.02.2007**  
 97 Número de publicación de la solicitud: **1987137**  
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **SÍNTESIS DEL ÁCIDO SIÁLICO EN PLANTAS.**

30 Prioridad:  
**09.02.2006 US 743267 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.11.2011**

73 Titular/es:  
**MEDICAGO INC.**  
**1020, ROUTE DE L'EGLISE, BUREAU 600**  
**SAINTE-FOY, QC G1V 3V9, CA;**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE y**  
**UNIVERSITE DE ROUEN**

72 Inventor/es:  
**PACCALET, Thomas;**  
**BARDOR, Muriel;**  
**RIHOUEY, Christophe;**  
**GOMORD, Véronique;**  
**FAYE, Loïc;**  
**LEROUGE, Patrice;**  
**AQUIN, Stéphanie;**  
**VEZINA, Louis-Philippe y**  
**D'AOUST, Marc-André**

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

ES 2 368 657 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Síntesis del ácido siálico en plantas.

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con la síntesis del ácido siálico en plantas. Adicionalmente la presente invención proporciona los métodos y las plantas que producen el ácido siálico, y las proteínas sialiladas producidas a partir de estas plantas.

Antecedentes de la invención

10 Las plantas son potencialmente una fábrica de bajo coste y de contaminación segura, para la producción de proteínas farmacéuticas recombinantes. La mayoría de las proteínas recombinantes producidas en las plantas no se distinguen de sus homólogos mamíferos, en cuanto la secuencia de aminoácido, conformación y actividad biológica. Adicionalmente, las glicoproteínas de mamífero son glicosiladas eficientemente cuando se expresan en plantas transgénicas. Sin embargo, las plantas producen moléculas con N-glicanos que difieren de aquellos encontrados en glicoproteínas de origen animal (Lerouge *et al.*, 1998). Esto puede limitar el uso de productos farmacéuticos hechos de plantas, ya que la presencia de glicoeptótipos específicos de vegetales en estas proteínas puede producir 15 respuestas inmunes en humanos (Bardor *et al.*, 2003), así como la ausencia de epítipes del tipo de mamífero, tales como secuencias sialiladas, puede inducir su rápido evacuación del flujo sanguíneo. Como una consecuencia, que controla la N-glicosilación de los productos farmacéuticos hechos de plantas, es un requisito para su uso en terapia humana.

20 En el remodelado de las *plantas* han surgido recientemente estrategias para obtener anticuerpos derivados de vegetales con perfiles de carbohidratos compatibles a humanos. Algunas estrategias involucran la retención de los anticuerpos en el retículo endoplasmático (Ko *et al.*, 2003; Sriraman *et al.*, 2004, Triguero *et al.*, 2005), otras involucran la transformación de plantas con glicosiltransferasas de mamífero. Por ejemplo, la N-glicosilación de las plantas se puede humanizar parcialmente mediante la transformación de la planta con una  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa humana (Palacpac *et al.*, 1999; Bakker *et al.*, 2001). La expresión de un anticuerpo de murine 25 en una planta transformada resulta en la producción de un anticuerpo derivado de la planta que albergan un perfil de galactosilación similar al observado en la correspondiente IgG de murina (Bakker *et al.*, 2001).

30 Los IgGs de mamífero llevan N-glicanos bi-antenarios en el sitio conservado de la N-glicosilación localizado en el dominio Fc. Estos oligosacáridos son débilmente sialilados, y la ausencia del Neu5Ac terminal no interfiere con la función y estabilidad del anticuerpo. En contraste, la mayoría de las otras glicoproteínas en circulación tienen N-glicanos antenarios di-, tri o tetra sialilados. La presencia de ácidos siálicos terminales sobre estos glicanos se requiere para numerosas funciones biológicas, siendo la primera el control de la vida media de la proteína en el sistema circulatorio. En la ausencia de ácidos siálicos terminales, las glicoproteínas se detectan por los receptores asialoglicoproteína hepática y se eliminan del suero, representando estas proteínas de vida biológicamente corta e ineficaz (Kelm and Schauer, 1997). Por lo tanto, los productos farmacéuticos hechos de plantas no-sialilados se 35 pueden eliminar rápidamente de la corriente sanguínea cuando se inyectan a un ser humano, por ejemplo, una Epo derivada del tabaco fue biológicamente activa *in vitro* pero no funcional *in vivo*, debido a su eliminación de la circulación antes de que alcance los tejidos eritropoyéticos (Matsumoto *et al.*, 1995).

40 La remodelación de los N-glicanos ligados a los anticuerpos en N-glicanos similares a humanos, ya se ha logrado parcialmente en plantas, mediante la expresión de una  $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa humana (Palacpac *et al.*, 1999; Bakker *et al.*, 2001), una transferasa que utiliza la UDP-Gal endógena como co-sustrato. Una sialiltransferasa de mamífero también ha sido introducida en las plantas y se demostró que es funcional y se dirige correctamente al aparato de Golgi (Wee *et al.*, 1998). Sin embargo, no se observó sialilación de oligosacáridos endógenos. La presencia de ácidos siálicos así como la maquinaria de sialilación en plantas es todavía un tema de debate. Sin embargo, Neu5Ac, el principal ácido siálico presente en humanos, así como su precursor N-acetilmanosamina (D-ManNAc) no parece que se sintetice en las plantas en cantidades detectables (Séveno *et al.*, 2004). Como consecuencia, la glico-ingeniería de N-glicanos en la planta en oligosacáridos sialilados necesita la co-expresión de 45 enzimas exógenas capaces de catalizar la síntesis, la activación y la transferencia en el aparato de Golgi de Neu5Ac.

50 En los mamíferos y las bacterias, el anabolismo y catabolismo de Neu5Ac ocurre a través de diferentes rutas (Angata and Varki, 2002). Dos clases principales de enzimas se necesitan para formar Neu5Ac. N-acetilneuraminato liasa (liasa de Neu5Ac) se involucra en el catabolismo de los ácidos siálicos mediante la catálisis de la división de Neu5Ac en N-acetilmanosamina (D-ManNAc) y piruvato en una reacción reversible. A altas concentraciones de D-ManNAc y piruvato, el equilibrio se puede cambiar a la síntesis de Neu5Ac. Acoplado a una actividad de la 2-epimerasa glucosamina, liasa de Neu5Ac a partir de la *E. coli* fue utilizada para la producción a gran escala de Neu5Ac a partir de D-GlcNAc (Maru *et al.*, 1998). De manera alternativa, las sintetasas del Neu5Ac, tales como NeuB, 55

catalizan la condensación de ManNAc en fosfoenol piruvato (PEP) y se involucran directamente en la biosíntesis de los ácidos siálicos (revisado en Tanner, 2005).

#### Resumen de la invención

5 La presente invención se relaciona con la síntesis del ácido siálico en plantas. Adicionalmente, la presente invención proporciona los métodos y las plantas que producen ácido siálico, y las proteínas sialiladas producidas a partir de estas plantas.

Es un objeto de la invención proporcionar un método mejorado para producir el ácido siálico en una planta.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para sintetizar el ácido siálico que comprende,

10 i) cultivo de una planta transgénica, que comprende una secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del ácido 1 2 N-acetil neuramínico (Neu5Ac) microbiana, la secuencia de nucleótidos ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta, y

15 ii) expresión de la secuencia de nucleótidos, sintetizando así el ácido siálico. Adicionalmente, después de la etapa de expresión, el ácido siálico se puede recuperar a partir de la planta. La región reguladora se puede seleccionar del grupo que consiste de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido, y un promotor de desarrollo.

20 La presente invención también se refiere al método definido anteriormente, en donde en la etapa de proporcionar, la planta además comprende una segunda secuencia de nucleótidos codificadora una o más de una epimerasa, una sintasa del CMP-Neu5Ac, un transportador del CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, ligada operativamente a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta, y la segunda secuencia de nucleótidos es co-expresada junto con la expresión de la secuencia de nucleótidos. Adicionalmente, la segunda región reguladora se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido, y un promotor de desarrollo.

25 La presente invención también se refiere al método como se describe anteriormente (Método A), en donde la secuencia de nucleótidos codificadora sintasa del Neu5Ac la segunda secuencia de nucleótidos codificadora una o más de una de la epimerasa, sintasa de CMP-Neu5Ac, o transportador del CMP-Neu5Ac, o ambas la secuencia de nucleótidos, y la segunda secuencia de nucleótidos es optimizada por el codón para la expresión dentro de la planta.

30 La presente invención proporciona una planta, una célula vegetal, o una semilla, que comprende una secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del Neu5Ac ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta. La planta, la célula vegetal o la semilla además puede comprender una segunda secuencia de nucleótidos codificadora de una o más de una epimerasa, una sintasa de CMP-Neu5Ac, un transportador del CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, ligada operativamente a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta. Adicionalmente, la región reguladora y la segunda región reguladora se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido, y un promotor de desarrollo.

35 Como se describe en este documento, la expresión en plantas de enzimas que sintetizan el Neu5Ac, liasa de Neu5Ac y NeuB2, resulta en la acumulación de enzimas funcionales dentro de tejidos vegetales. Las enzimas que sintetizan Neu5Ac, se pueden expresar en cualquier planta, por ejemplo pero no limitando a tabaco y *Medicago sativa* (alfalfa), el cultivo de leguminosas perennes que se beneficia de una serie de ventajas agronómicas de las aplicaciones de agricultura molecular (Busse *et al.*, 2001).

40 Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

#### Breve descripción de los dibujos

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

45 **Figura 1a** muestra un análisis Western-blot de proteínas solubles extraídos a partir de células del tabaco BY2 del tipo salvaje (línea 1) o transgénicas que expresan la liasa de Neu5Ac-FLAG (línea 2) utilizando anticuerpos anti-FLAG. Figura 1b y Figura 1c muestran los perfiles de cromatografía de gases de los productos finales obtenidos después de la incubación a pH 7 y 37°C de proteínas citosólicas, aisladas de las células del tabaco BY2, que expresan la liasa del Neu5Ac, sin (Figura 1b) o con (Figura 1c) Neu5Ac. La Figura 1d muestra un perfil de GC de monosacáridos citosólicos de células del tabaco BY2 que expresan la liasa de Neu5Ac alimentadas durante 48 h a 37°C con Neu5Ac 10 mM exógeno. La Figura 1e y la Figura 1f muestran los espectros de masas de impacto de

Electrón del pico 1 (Figura 1e), y picos 2 y 3 (Figura 1f) detectados en el perfil (Figura 1c). Los iones del fragmento principal de los derivados de 1-O-metil persilil de D-ManNAc se indican.

**Figura 2a** y **Figura 2b** muestran un perfil de cromatografía de gases de los productos finales obtenidos después de la incubación a pH 7 y 37°C de proteínas citosólicas, aisladas a partir de las células del tabaco BY2, que expresan la liasa de Neu5Ac, sin (Figura 2a) o con (Figura 2b) D-ManNAc y piruvato. **Figura 2c** muestra un espectro de masas de impacto de Electrón del pico que aparece en el perfil (Figura 2b). Los iones del fragmento principal de derivados de 1-O-metil metilester persilil del ácido N-acetilneuramínico se indican.

**Figura 3a** muestra un análisis Western-blot de proteínas citosólicas extraídas a partir de células del tabaco BY2 del tipo salvaje (línea 1) o transgénicas que expresan la NeuB2-FLAG (línea 2) utilizando anticuerpos anti-FLAG. La **Figura 3b** y la **Figura 3c** muestran un perfil de cromatografía de gases de los productos finales obtenidos después de la incubación a pH 8 y 37°C de las proteínas solubles, extraídos a partir de hojas de plantas de alfalfa que expresan la NeuB2, sin (Figura 3b) o (Figura 3c) D-ManNAc y PEP. **Figura 3d** muestra un espectro de masas de impacto de Electrón del pico que aparece en el perfil (Figura 3c). Los iones del fragmento principal de derivados de 1-O-metil metilester persilil del ácido N-acetilneuramínico, se indican.

#### 15 Descripción detallada

La presente invención se relaciona con la síntesis del ácido siálico en plantas. Adicionalmente la presente invención proporciona los métodos y las plantas que expresan el ácido siálico, y las proteínas sialiladas producidas a partir de estas plantas.

La siguiente descripción es de una modalidad preferida.

20 La presente invención proporciona un método para la síntesis del ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) dentro de plantas. La sintasa del Neu5Ac cataliza la formación de Neu5Ac por condensación de D-ManNAc y PEP.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para sintetizar el ácido siálico que comprende,

25 i) cultivo de una planta transgénica que comprende una secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) microbiana, la secuencia de nucleótidos ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta, y

ii) expresión de la secuencia de nucleótidos, sintetizando así el ácido siálico. De manera alternativa, el método puede involucrar la producción transitoria del Neu5Ac dentro de una planta, o una porción de la planta.

30 El Neu5Ac así producido se puede recuperar a partir de la planta y se utiliza para la sialilación de las proteínas *in vitro*, utilizando procesos conocidos dentro del oficio. De manera alternativa, el Neu5Ac puede ser utilizado como un sustrato endógeno para la sialilación de una proteína de interés que es co-expresada dentro de la planta.

35 Si se desea, los niveles del sustrato para la síntesis del Neu5Ac dentro de la planta, incluyendo pero no limitando a N-acetilmanosamina (D-ManNAc), se puede incrementar mediante la co-expresión dentro de la planta de una o más de una secuencia de nucleótidos adicional codificadora de una o más de una epimerasa, una sintasa de CMP-Neu5Ac, y un transportador del CMP-Neu5Ac. Por ejemplo, ManNAc puede ser sintetizado por la expresión dentro de una planta, UDP-GlcNAc 2-epimerasa, por ejemplo una UDP-GlcNAc 2- epimerasa bacteriana, o una epimerasa forman otras fuentes, que convierten UDP- GlcNAc endógena en ManNAc. De manera alternativa, ManNAc-6-fosfato se puede producir, seguido por la hidrólisis con una fosfatasa. Con este método GlcNAc-6-fosfato 2-epimerasa, por ejemplo una GlcNAc-6-fosfato 2-epimerasa bacteriana, o una UDP-GlcNAc 2-epimerasa/Man-NAc quinasa de mamífero se expresa dentro de una planta. Por la co-expresión esta segunda secuencia de nucleótidos junto con la expresión de la secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del Neu5Ac, niveles incrementados de Neu5Ac se pueden producir. Sin embargo, la necesidad de la co-expresión de una o más de las anteriores secuencias de nucleótidos, puede depender de la planta huésped seleccionada, como actividades endógenas de una o más de estas enzimas pueden estar presentes dentro de la planta.

45 Para asegurar la sialilación de N-glicanos a partir del ácido siálico citosólico, la sintasa de CMP-Neu5Ac bacteriana o de mamífero, transportador del CMP-Neu5Ac de mamífero, galactosiltransferasa de mamífero, (para la adición de galactosa, antes el ácido siálico se puede transferir a los N-glicanos) y sialiltransferasa de mamífero se puede co-expresar dentro de un planta. El Neu5Ac producido dentro de la planta de acuerdo con la presente invención puede ser utilizado como un sustrato para la síntesis del ácido CMP-N-acetilneuramínico (CMP-Neu5Ac) vía sintasa del CMP-Neu5Ac, el CMP-Neu5Ac luego se utiliza como un sustrato para la sialilación de una proteína de interés que también se co-expresa dentro de la planta. En este caso la planta también puede comprender una secuencia de nucleótidos codificadora de una sialiltransferasa. La expresión de una sialiltransferasa de mamífero, y sintasa del CMP-Neu5Ac de mamífero en plantas se ha demostrado (Wee *et al.*, 1998, Misaki, R., *et al.*, 2006). Sin embargo, la

necesidad de co-expresión de una o más de las anteriores secuencias de nucleótidos, puede depender de la planta huésped seleccionada, como actividades endógenas de una o más de estas enzimas pueden estar presentes dentro de la planta.

5 En los casos donde las secuencias de nucleótidos se co-expresan dentro de la planta, cada una de las secuencias de nucleótidos deseadas se puede introducir en la planta, utilizando técnicas de transformación estándar, técnicas de transformación transitoria, o dos plantas, cada expresión de una o más de las secuencias de nucleótidos deseadas se puede cruzar para obtener un planta que co-exprese la combinación necesaria de secuencias de nucleótidos.

10 Las secuencias de nucleótidos codificadora de la sintasa del Neu5Ac, epimerasa, sintasa de CMP-Neu5Ac, un CMPNeu5Ac transportador, una galactosiltransferasa, y sialiltransferasa pueden ser optimizadas por el codón para aumentar el nivel de expresión dentro de la planta. Por optimización del codón, se entiende la selección de nucleótidos de ADN apropiados para la síntesis de unidades estructurales de oligonucleótidos, y su posterior ensamblaje enzimático, de un gen estructural o fragmento de este con el fin de abordar el uso del codón dentro de las plantas.

15 Con el fin de optimizar la expresión de la secuencia foránea dentro de un planta, la secuencia de nucleótidos, que puede ser una secuencia sintética o del tipo salvaje puede ser utilizada o alterada, según se necesite de manera que la proteína correspondiente, por ejemplo la sintasa del Neu5Ac, epimerasa, sintasa de CMP-Neu5Ac, transportador del CMP-Neu5Ac, galactosiltransferasa, sialiltransferasa, la proteína de interés, o una combinación de estas, se produce a un nivel superior al que se produce cuando se codifica por la secuencia de nucleótidos sin-modificar. Por  
20 ejemplo, que no se debe considerar como limitante, la secuencia puede ser una secuencia sintética, optimizada para el uso del codón dentro de un planta, que comprende al menos aproximadamente 80% de homología con la secuencia del tipo salvaje, según se determina utilizando técnicas de comparación de secuencias, por ejemplo pero no limitando a BLAST (disponible a través de GenBank; utilizando los parámetros por defecto). También se contempla que los fragmentos o porciones de la secuencia codificadora de la proteína de interés, o derivados de  
25 esta, que muestran útiles propiedades biológicas, por ejemplo pero no limitando a propiedades antigénicas, se pueden expresar dentro de tejidos vegetales.

Con el fin de maximizar los niveles de expresión y producción de la proteína transgénica de sintasa del Neu5Ac, epimerasa, sintasa de CMP-Neu5Ac, transportador del CMP-Neu5Ac, galactosiltransferasa, sialiltransferasa, y una  
30 proteína de interés, la secuencia del ácido nucleico puede ser examinada y la región codificante se modifica para optimizar la expresión del gen en las plantas, utilizando un procedimiento similar al descrito por Sardana *et al.* (Plant Cell Reports 15:677-681; 1996). Una tabla del uso del codón a partir de genes altamente expresados de plantas dicotiledóneas es disponible de varias fuentes incluyendo Murray *et al.* (Nuc Acids Res. 17:477-498; 1989).

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para sintetizar el ácido siálico que comprende,  
35 proporcionar un planta que comprende una secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac), la secuencia de nucleótidos ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta, el cultivo del planta, y la expresión de la secuencia de nucleótidos, sintetizando así el ácido siálico. La secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del Neu5Ac puede ser optimizada por el codón para la expresión dentro de la planta. Adicionalmente, en la etapa de proporcionar, la planta además se puede comprender una  
40 segunda secuencia de nucleótidos codificadora de una o más de una epimerasa, una sintasa de CMP-Neu5Ac, o un transportador del CMP-Neu5Ac, ligada operativamente a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta, y la segunda secuencia de nucleótidos es co-expresada junto con la expresión de la secuencia de nucleótidos. La segunda secuencia de nucleótidos codificadora de una o más de una de la epimerasa, sintasa del CMP-Neu5Ac, o transportador del CMP-Neu5Ac, puede ser optimizada por el codón para la expresión dentro de la planta.

45 Adicionalmente, la presente invención se refiere a una planta, una célula vegetal, o una semilla, que comprende una secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del Neu5Ac ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta. La planta, célula vegetal, o semilla además puede comprender una segunda secuencia de nucleótidos codificadora de una o más de una epimerasa, una sintasa de CMP-Neu5Ac, un transportador del CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, ligada operativamente a una o más de una segunda  
50 región reguladora activa dentro de la planta. La secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del Neu5Ac, la segunda secuencia de nucleótidos codificadora de una o más de una de la epimerasa, sintasa de CMP-Neu5Ac, o transportador del CMP-Neu5Ac, o ambas la secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos, pueden ser optimizadas por el codón para la expresión dentro de la planta, célula vegetal o semilla de planta.

Por "ligada operativamente" se entiende, que las secuencias particulares interactúan ya sea directa o indirectamente  
55 para llevar a cabo una función prevista, tal como mediación o modulación de la expresión génica. La interacción de las secuencias ligadas operativamente, por ejemplo, puede ser mediada por las proteínas que interactúan con las secuencias ligadas operativamente. Una región reguladora transcripcional y una secuencia de interés se ligan

operativamente cuando las secuencias se conectan funcionalmente con el fin de permitir la transcripción de la secuencia de interés que será mediada o modulada por la región reguladora transcripcional.

Por el término "material de la planta", se entiende cualquier material derivado de una planta. El material de la planta puede comprender una planta completa, tejido, células, o cualquier fracción de esta. Además, el material de la planta puede comprender componentes intracelulares de la planta, componentes extracelulares de la planta, extractos sólidos o líquidos de las plantas, o una combinación de estos. Además, el material de la planta puede comprender plantas, células vegetales, tejido, un extracto líquido, o una combinación de estos, a partir de hojas, tallos, frutos, raíces de la planta o una combinación de estos. El material de la planta puede comprender una planta o porción de esta que no ha sido sometida a ninguna de las etapas del proceso. Sin embargo, también se contempla que el material de la planta se puede someter a etapas del proceso mínimo como se define a continuación, o proceso más riguroso, incluyendo purificación de la proteína parcial o sustancial utilizando técnicas conocidas comúnmente dentro del oficio incluyendo, pero no limitando a cromatografía, electroforesis y similares.

Por el término "proceso mínimo" se entiende material de la planta, por ejemplo, una planta o porción de esta que comprende una proteína de interés que se purifica parcialmente para producir un extracto de planta, homogeneizado, fracción de planta homogeneizada o similares. La purificación parcial puede comprender, pero no se limita a alterar las estructuras celulares de la planta, por consiguiente, creando una composición que comprende componentes de la planta solubles, y componentes de la planta insolubles que se pueden separar por ejemplo, pero no limitando a, mediante centrifugación, filtración o una combinación de estos. En este sentido, las proteínas secretadas dentro del espacio extracelular de hojas u otros tejidos se podrían obtener fácilmente utilizando vacío o extracción con centrifuga, o los tejidos se podrían extraer bajo presión, pasándolos a través de rodillos o molienda o similares para comprimir o liberar la proteína libre desde el interior del espacio extracelular. El proceso mínimo también podría involucrar la preparación de extractos crudos de proteínas solubles, dado que estas preparaciones tendrían una contaminación insignificante a partir de los productos secundarios de la planta. Además, un proceso mínimo puede involucrar extracción acuosa de proteínas solubles a partir de hojas, seguido por la precipitación con cualquier sal apropiada. Otros métodos pueden incluir maceración a gran escala y extracción del jugo con el fin de permitir el uso directo del extracto.

El material de la planta, en la forma de material de la planta o tejido puede ser administrado por vía oral a un sujeto. El material de la planta puede ser administrado como parte de un suplemento dietético, junto con otros alimentos, o encapsulado. El material de la planta o tejido también pueden ser concentrados para mejorar o aumentar la palatabilidad, o suministrado junto con otros materiales, ingredientes, o excipientes farmacéuticos, según se necesite.

Como se describe con más detalle en los Ejemplos, liasa de Neu5Ac, y liasa de Neu5Ac-FLAG (liasa de Neu5Ac etiquetada en su C-terminal con un epítipo FLAG para permitir la inmunodetección de la proteína recombinante en transformantes) fueron introducidos en las plantas. El análisis Western-blot, utilizando anticuerpos anti-FLAG, demostró que una proteína de MWr 32 kDa estaba presente en las células transformadas (Figura 1a). Adicionalmente, tanto la actividad de liasa *in vitro* como *in vivo* fue detectable en extractos obtenidos de, o la expresión de plantas ya sea liasa de Neu5Ac o liasa de Neu5Ac-FLAG. No se detectó actividad de liasa endógena en plantas no-transformadas. Sin embargo, la síntesis de Neu5Ac utilizando liasa de Neu5Ac producida recombinantemente, en la presencia de D-ManNAc y piruvato fue observada (ver Figura 2b). Por lo tanto, liasa de Neu5Ac expresada recombinantemente es biológicamente activa en la planta.

La sintasa del Neu5Ac (por ejemplo, pero no limitando a NeuB2) y sintasa del Neu5Ac-FLAG (sintasa del Neu5Ac etiquetada en su C-terminal con un epítipo FLAG para permitir la inmunodetección de la proteína recombinante en transformantes) fueron introducidos en las plantas. El análisis Western-blot, utilizando anticuerpos anti-FLAG, demostró que una proteína de MWr 37 kDa estaba presente en las células transformadas. Ambas actividad sintasa *in vitro* e *in vivo* fue detectable en extractos obtenidos a partir de, o expresión de plantas ya sea sintasa del Neu5Ac o sintasa del Neu5Ac-FLAG. No se detectó actividad sintasa endógena en plantas no-transformadas. Sin embargo, la síntesis de Neu5Ac utilizando sintasa del Neu5Ac producida recombinantemente en la presencia de D-ManNAc y PEP fue observada (ver Figuras 3b, 3c). Por lo tanto, la sintasa del Neu5Ac expresada recombinantemente es biológicamente activa en la planta.

Un "análogo" o "derivado" incluye cualquier sustitución, delección, o adición a la secuencia de nucleótidos de silenciamiento, a condición que la secuencia de nucleótidos retenga la propiedad de expresión de silenciamiento de un gen o secuencia diana, lo que reduce la expresión de una secuencia diana, o reduciendo la síntesis o actividad de una proteína codificada por la secuencia diana. Por ejemplo, derivados, y análogos de la secuencia de ácidos nucleicos por lo general muestran más del 80% de similitud con, una secuencia del ácido nucleico de silenciamiento. La similitud de la secuencia, se puede determinar mediante el uso del algoritmo BLAST (GenBank: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/), utilizando parámetros por defecto (Programa: blastn; Base de datos: nr; Espera 10; filtro: complejidad baja; Alineación: pairwise; Tamaño de la palabra: 11). Los análogos, o derivados de estos, también incluyen aquellas secuencias de nucleótidos que hibridizan bajo condiciones estrictas de hibridación (ver Maniatis *et al.*, en Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 387-389, o

Ausubel, *et al.* (eds), 1989, Current Protocols en Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3) para cualquiera de las secuencias descritas en este documento, a condición que las secuencias muestran la propiedad de expresión de silenciamiento de un gen diana. Un ejemplo de tales condiciones estrictas de hibridación puede ser la hibridación con una sonda apropiada, por ejemplo pero no limitando a, una sonda etiquetada [ $\gamma$ - $^{32}$ P]dATP por 16-20 hrs a 65°C en SDS al 7%, EDTA 1mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M, pH 7.2. Después del lavado en SDS al 5%, EDTA 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40mM, pH 7.2 por 30 min, seguido por el lavado en SDS 1%, EDTA 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40mM, pH 7.2 por 30 min. El lavado en esta solución reguladora se puede repetir para reducir el fondo.

Por "región reguladora" "elemento regulador" o "promotor" se entiende una porción de ácido nucleico por lo general, pero no siempre, en dirección 5' de la región codificante de la proteína de un gen, que puede estar compuesta de ya sea ADN o ARN, o ambos ADN y ARN. Cuando una región reguladora es activa, y en asociación operativa, o ligada operativamente, con un gen de interés, esto puede dar lugar a la expresión del gen de interés. Un elemento regulador puede ser capaz de mediar la especificidad del órgano, o que controla la activación del gen temporal o de desarrollo. Una "región reguladora" incluye elementos promotor, elementos promotores del núcleo que muestran una actividad promotor basal, elementos que son inducibles en respuesta a un estímulo externo, elementos que median la actividad promotora tales como elementos reguladores negativos o potenciadores transcripcionales. "Región reguladora", como se utiliza en este documento, también incluye elementos que son activos después de la transcripción, por ejemplo, elementos reguladores que modulan la expresión del gen tal como potenciadores transcripcionales y de traducción, represores transcripcionales y de traducción, secuencias de activación en dirección 5', y determinantes de la inestabilidad del ARNm. Varios de estos últimos elementos se pueden localizar cerca a la región codificante.

En el contexto de esta divulgación, el término "elemento regulador" o "región reguladora" por lo general se refiere a una secuencia de ADN, usualmente, pero no siempre, en dirección 5' (5') a la secuencia codificante de un gen estructural, que controla la expresión de la región codificante proporcionando el reconocimiento de polimerasa de ARN y/u otros factores necesarios para que la transcripción inicie en un sitio particular. Sin embargo, se debe entender que otras secuencias de nucleótidos, localizadas dentro de los intrones, o 3' de la secuencia también pueden contribuir a la regulación de la expresión de una región codificante de interés. Un ejemplo de un elemento regulador que proporciona para el reconocimiento de polimerasa de ARN u otros factores transcripcionales para asegurar el inicio en un sitio particular es un elemento promotor. La mayoría, pero no todos, los elementos promotor eucariotas contienen una caja TATA, una secuencia del ácido nucleico conservada se componen de pares de base de nucleótidos adenosina y timidina usualmente situados aproximadamente 25 pares de base en dirección 5' de un sitio de inicio transcripcional. Un elemento promotor comprende un elemento promotor basal, responsable del inicio de la transcripción, así como otros elementos reguladores (como se enumera anteriormente) que modifican la expresión del gen.

Existen varios tipos de regiones reguladoras, incluyendo aquellas que se regulan del desarrollo, inducible o constitutivas. Una región reguladora que se regula del desarrollo, o controla la expresión diferencial de un gen bajo su control, se activa dentro de ciertos órganos o tejidos de un órgano en momentos específicos durante el desarrollo de ese órgano o tejido. Sin embargo, algunas regiones reguladoras que se regulan del desarrollo preferencialmente pueden ser activos dentro de ciertos órganos o tejidos en etapas de desarrollo específicas, también pueden ser activos en una forma de desarrollo regulado, o a un nivel básico en otros órganos o tejidos dentro de la planta también. Ejemplos de regiones reguladoras específicas de tejido, por ejemplo ver-específico una región reguladora, incluyen el promotor napin, y el promotor cruciferin (Rask *et al.*, 1998, J. Plant Physiol. 152: 595-599; Bilodeau *et al.*, 1994, Plant Cell 14: 125-130).

Una región reguladora inducible es aquella que es capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes en respuesta a un inductor. En la ausencia de un inductor las secuencias de ADN o genes no serán transcritas. Por lo general, el factor de proteína que se une específicamente a una región reguladora inducible para activar la transcripción puede estar presente en una forma inactiva, que luego se convierte directa o indirectamente a la forma activa por el inductor. Sin embargo, el factor de proteína también puede estar ausente. El inductor puede ser un agente químico tal como una proteína, metabolito, regulador de crecimiento, herbicida o compuesto fenólico o un estrés fisiológico impuesto directamente por calor, frío, sal, o elementos tóxicos o indirectamente a través de la acción de un agente patógeno o enfermedad tal como un virus. Una célula vegetal que contiene una región reguladora inducible puede ser expuesta a un inductor mediante la aplicación externa del inductor a la célula o planta tal como por atomización, riego, calentamiento o métodos similares. Los elementos reguladores inducibles se pueden derivar a partir de genes de planta o no-planta (por ejemplo Gatz, C. and Lenk, I.R.P., 1998, Trends Plant Sci. 3, 352-358). Ejemplos, de potenciales promotores inducibles incluyen, pero no limitando a, promotor inducible de la tetraciclina (Gatz, C., 1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 89-108), promotor inducible de esteroides (Aoyama, T. and Chua, N.H., 1997, Plant J. 2, 397-404) y promotor inducible del etanol (Salter, M.G., *et al.*, 1998, Plant Journal 16, 127-132; Caddick, M.X., *et al.*, 1998, Nature Biotech. 16, 177-180) genes IB6 y CK11 inducibles de la citoquina (Brandstatter, I. and Kieber, J.J., 1998, Plant Cell 10, 1009-1019; Kakimoto, T., 1996, Science 274, 982-985) y el elemento inducible de la auxina, DR5 (Ulmasov, T., *et al.*, 1997, Plant Cell 9, 1963-1971).

Una región reguladora constitutiva dirige la expresión de un gen a través de las diferentes partes de una planta y continuamente a través del desarrollo de la planta. Ejemplos de elementos reguladores constitutivos conocidos incluyen promotores asociados con la transcripción CaMV 35S. (Odell *et al.*, 1985, *Nature*, 313: 810-812), la genes de actina 1 del arroz (Zhang *et al.*, 1991, *Plant Cell*, 3: 1155-1165), actina 2 (An *et al.*, 1996, *Plant J.*, 10: 107-121), o tms 2 (U.S. 5,428,147), y triosefosfato isomerasa 1 (Xu *et al.*, 1994, *Plant Physiol.* 106: 459-467), el gen de la ubiquitina 1 del maíz (Cornejo *et al.*, 1993, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646), los genes de la ubiquitina 1 y 6 de *Arabidopsis* (Holtorf *et al.*, 1995, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646), y el gen 4A del factor de inicio de la traducción del tabaco (Mandel *et al.*, 1995 *Plant Mol. Biol.* 29: 995-1004). El término "constitutiva" como se utiliza en este documento no indica necesariamente que un gen bajo control de la región reguladora constitutiva se expresa en el mismo nivel en todos los tipos de células, pero que el gen se expresa en un amplio rango de tipos de células incluso aunque la variación en abundancia se observa con frecuencia.

Una o más de una secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar en cualquier huésped de planta apropiada que se transforma por la secuencia de nucleótidos, o construcciones, o vectores de la presente invención. Ejemplos de huéspedes apropiados incluyen, pero no se limitan a, cultivos de agricultura incluyendo alfalfa, canola, *Brassica spp.*, maíz, tabaco, alfalfa, patata, ginseng, guisante, avena, arroz, soja, trigo, cebada, girasol, y algodón.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona una planta, una célula vegetal, o una semilla que comprende una secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del Neu5Ac ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta. Adicionalmente, la planta, la célula de la planta o la semilla puede comprender una segunda secuencia de nucleótidos codificadora de una o más de una epimerasa, una sintasa de CMP-Neu5Ac, un transportador del CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, ligada operativamente a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta.

Una o más construcciones genéticas quiméricas de la presente invención además pueden comprender una región 3' no traducida. Una región 3' no traducida se refiere a aquella porción de un gen que comprende un segmento de ADN que contiene una señal de poliadenilación y cualquier otra señal reguladora capaz de efectuar el procesamiento del ARNm o la expresión del gen. La señal de poliadenilación usualmente se caracteriza por efectuar la adición de pistas del ácido poliadenílico al extremo 3' del ARNm precursor. Las señales de poliadenilación comúnmente se reconocen por la presencia de homología con la forma canónica 5' AATAAA-3' aunque las variaciones no son inusuales. Una o más de las construcciones genéticas quiméricas de la presente invención también pueden incluir otros potenciadores, ya sea potenciadores de traducción o transcripción, como se puede necesitar. Estas regiones del potenciador son bien conocidas por aquellos de habilidad en el oficio, y pueden incluir el codón de inicio de ATG y secuencias adyacentes. El codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante para asegurar la traducción de la secuencia total.

Ejemplos no-limitantes de las regiones 3' apropiadas son las regiones sin traducir 3' transcritas que contienen una señal de poliadenilación de los genes del plásmido que induce el tumor de *Agrobacterium* (Ti), tales como la nopalina sintasa (gen Nos) y genes de planta tales como los genes de la proteína de almacenamiento de soja y la subunidad pequeña del gen ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa (ssRUBISCO).

Para ayudar en la identificación de células vegetales transformada, las construcciones de esta invención pueden además ser manipuladas para incluir marcadores genéticos de la planta. Los marcadores genéticos útiles incluyen enzimas que proporcionan la resistencia a productos químicos tales como un antibiótico por ejemplo, gentamicina, higromicina, Kanamicina, o herbicidas tales como fosfotricina, glifosato, clorosulfuron, y similares. De manera similar, enzimas que proporcionan la producción de un compuesto identificable por cambio de color tales como GUS (beta-glucuronidasa), o luminiscencia, tales como luciferasa o GFP, se pueden utilizar.

También se consideran parte de esta invención las plantas transgénicas, células vegetales o semillas que contienen la construcción del gen quimérico de la presente invención. Los métodos de regeneración completa de las plantas a partir de las células vegetales también son conocidos en el oficio. En general, las células vegetales transformadas se cultivan en un medio común apropiado, que puede contener agentes selectivos tales como antibióticos, donde los marcadores genéticos se utilizan para facilitar la identificación de células vegetales transformadas. Una vez que el callo se forma, la formación de brotes se puede fomentar mediante el empleo de las apropiadas hormonas de la planta de acuerdo con métodos conocidos y los brotes se transfieren al medio de enraizamiento para la regeneración de las plantas. Las plantas luego se pueden utilizar para establecer generaciones repetitivas, ya sea a partir de semillas o utilizando técnicas de propagación vegetativa. Las plantas transgénicas también se pueden generar sin el uso de cultivos de tejido.

Los elementos reguladores de la presente invención también se pueden combinar con la región codificante de interés para la expresión dentro de un rango de los organismos huésped que son susceptibles a la transformación, o expresión transitoria. Tales organismos incluyen, pero no se limitan a plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, por ejemplo pero no limitando a maíz, plantas de cereales, trigo, cebada, avena, tabaco, *Brassica*, soja, alubia, guisante, alfalfa, patata, tomate, ginseng, y *Arabidopsis*.

Los métodos para expresión transitoria, transformación, y regeneración de estos organismos se establecen en el oficio y conocido por alguien de habilidad en el oficio. El método de obtención de las plantas transformadas y regeneradas no es crítica para la presente invención.

5 Por "transformación" se entiende la transferencia interespecífica de información genética que se manifiesta genotípicamente, fenotípicamente, o ambas. La transferencia interespecífica de información genética a partir de una construcción quimérica a un huésped puede ser heredable y la transferencia de información genética considerada estable, o la transferencia pueden ser transitorias y la transferencia de la información genética no es heredable. La presente invención además incluye un vector apropiado que comprende la construcción apropiada del gen quimérico para utilizar con ya sea sistemas de expresión estable o transitoria.

10 Las construcciones de la presente invención se pueden introducir en las células vegetales utilizando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores del virus de la planta, transformación directa del ADN, micro-inyección, electroporación, etc. Para las revisiones de tales técnicas ver por ejemplo Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, pp. 421-463 (1988); Geierson and Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed. (1988); and Miki and Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. In *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. London, pp. 561-579(1997). Otros métodos incluyen absorción directa del ADN, el uso de liposomas, electroporación, por ejemplo utilizando protoplastos, micro-inyección, microproyectiles o agitadores, e infiltración con vacío. Ver, por ejemplo, Bilanz, *et al.* (*Gene* 100: 247-250 (1991)), Scheid *et al.* (*Mol. Gen. Genet.* 228: 104-112, 1991), Guerche *et al.* (*Plant Science* 52: 111-116, 1987), Neuhauser *et al.* (*Theor. Appl Genet.* 75: 30-36, 1987), Klein *et al.*, *Nature* 327: 70-73 (1987); Howell *et al.* (*Science* 208: 1265, 1980), Horsch *et al.* (*Science* 227: 1229-1231, 1985), DeBlock *et al.*, *Plant Physiology* 91: 694-701, 1989), *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu and Lomonosoff (*J Virol Meth*, 105:343-348, 2002,), U.S. Pat. Nos. 4,945,050; 5,036,006; and 5,100,792).

25 Como se describe a continuación, los métodos de expresión transitoria pueden ser utilizados para expresar las construcciones de la presente invención (ver Liu and Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105:343-348). Estos métodos pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, un método de Agro-inoculación o Agro-infiltración, sin embargo, otros métodos transitorios también se pueden utilizar como se señaló anteriormente. Con cualquiera Agro-inoculación o Agro-infiltración, una mezcla de Agrobacteria que comprende el deseado ácido nucleico ingresa a los espacios intercelulares del tejido, por ejemplo las hojas, porción aérea de la planta (incluyendo tallo, hojas y flores), otra porción de la planta (tallo, raíz, flores), o la planta completa. Después de atravesar la epidermis el Agrobacteria infecta y el ADN-t de transferencia se copia en las células. El ADN-t se transcribe episomalmente y el ARNm se traduce, lo que conduce a la producción de la proteína de interés en las células infectadas, sin embargo, el pasaje del ADN-t dentro del núcleo es transitorio.

35 Por "gen de interés", "secuencia de nucleótidos de interés", o "región codificante de interés", se entiende cualquier gen, secuencia de nucleótidos, o región codificante que se va a expresar dentro de un organismo huésped, por ejemplo una planta. Estos términos se utilizan de forma intercambiable. Tal secuencia de nucleótidos de interés pueden incluir, pero no se limita a, un gen o región codificante cuyo producto es una enzima industrial, un suplemento de proteína, un nutracéutico, un producto con valor agregado, o un fragmento de este para piensos, alimentos, o ambos usos como piensos y alimentos. Una secuencia de nucleótidos, o región codificante de interés también pueden incluir un gen codificadora una proteína farmacéuticamente activa, por ejemplo factores de crecimiento, reguladores de crecimiento, anticuerpos, antígenos, y fragmentos de estos, o sus derivados útiles para la inmunización o vacunación y similares. Tales proteínas incluyen, pero no se limitan a, interleucinas, por ejemplo una o más de una de IL-1 a IL-24, IL-26 y IL-27, citoquinas, Eritropoyetina (EPO), insulina, G-CSF, GM-CSF, hPGCSF, M-CSF o combinaciones de estas, interferones, por ejemplo, interferon-alfa, interferon-beta, interferon-gama, factores de coagulación de la sangre, por ejemplo, Factor VIII, Factor IX, o tPA hGH, receptores, receptor agonistas, anticuerpos, neuropolipéptidos, insulina, vacunas, factores de crecimiento por ejemplo pero no limitando a factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocito, factor de crecimiento de transformación, reguladores de crecimiento, antígenos, autoantígenos, fragmentos de estos, o combinaciones de estos.

50 Si el gen de interés codifica un producto que es directa o indirectamente tóxico a la planta, a continuación, utilizando el método de la presente invención, dicha toxicidad se puede reducir a través de la planta por expresión selectiva del gen de interés dentro de un deseado tejido o a una deseada etapa de desarrollo de la planta.

55 La región codificante de interés o la secuencia de nucleótidos de interés se pueden expresar en cualquier huésped de planta apropiado que es cualquiera transformados o comprenden las secuencias de nucleótidos, o moléculas de ácido nucleico, o construcciones genéticas, o vectores de la presente invención. Ejemplos de huéspedes apropiados incluyen, pero no se limitan a, *Arabidopsis*, cultivos de agricultura incluyendo por ejemplo canola, *Brassica spp.*, maíz, tabaco, alfalfa, patata, ginseng, guisante, avena, arroz, soja, trigo, cebada, girasol, y algodón.

La síntesis del ácido sialílico, por ejemplo, síntesis de Neu5Ac, en plantas se demostró mediante la expresión recombinante de liasa de Neu5Ac o sintasa del Neu5Ac. La liasa de Neu5Ac a partir del *E. coli* y NeuB2 a partir de

*C. jejuni* cada uno fueron expresados en el citosol de células del tabaco BY2, plantas de alfalfa por transformación mediada por el *Agrobacterium*, o cuando se expresa de forma transitoria en células vegetales. No se observó degradación de las proteínas recombinantes indicando que estas enzimas son estables en este compartimiento. La liasa de Neu5Ac expresada en células BY2 fue capaz de catalizar la división de Neu5Ac en D-ManNAc y piruvato en una reacción reversible. La síntesis de Neu5Ac en presencia del piruvato y ManNAc también se observó. La liasa de Neu5Ac fue biológicamente activa a pH 7 y sobre un rango de 25-37°C que es consistente con ambos el pH de la citosol de la planta y temperatura de los cultivos más importantes. Adicionalmente, los experimentos de alimentación se llevan a cabo en presencia del Neu5Ac exógeno demostraron que la enzima fue funcional en la planta.

La sintasa del Neu5Ac, NeuB2 a partir de *C. jejuni*, cuando se expresa en células del tabaco BY2 fue observada para sintetizar Neu5Ac en presencia del D-ManNAc y PEP. La expresión de NeuB2 en plantas de alfalfa también resulta en una acumulación de una enzima funcional. Por lo tanto, la expresión de una liasa de Neu5Ac microbiana o sintasa del Neu5Ac en plantas resulta en la producción en el citosol de enzimas capaces de sintetizar Neu5Ac.

Una epimerasa capaz de convertir el GlcNAc endógeno en ManNAc, se puede co-exresar en las plantas con el fin de suplir la liasa de Neu5Ac o Neu5Ac sintasa con el apropiado sustrato aminoazúcar. En este sentido, la expresión de una sintasa de CMP-Neu5Ac funcional y transportador del CMP-Neu5Ac en células del tabaco BY2 ha sido reportada (Misaki *et al.*, 2006). Mediante la co-expresión de la sintasa del CMPNeu5Ac, transportador del CMP-Neu5Ac, o ambas sintasa de CMP-Neu5Ac y transportador del CMP-Neu5Ac, junto con NeuB2, la producción de Neu5Ac puede ser mejorada. La síntesis de N-acetilmanosamina (ManNAc) dentro de una planta se puede lograr vía varios métodos. Por ejemplo, ManNAc puede ser sintetizado mediante la expresión dentro de una planta, UDP-GlcNAc 2-epimerasa, por ejemplo una UDP-GlcNAc 2-epimerasa bacteriana, que convierte UDP-GlcNAc en ManNAc en una reacción irreversible. UDP-GlcNAc está presente en el citosol dado que esta alimenta la ruta de la síntesis de N-glicanos. La síntesis de ManNAc también se puede lograr por la expresión de una GlcNAc-2 epimerasa a partir de otras fuentes. De manera alternativa, ManNAc-6-fosfato se puede formar, seguido por la hidrólisis con una fosfatasa (en plantas transgénicas). Con este método Glc-NAc-6-fosfato 2-epimerasa, por ejemplo una GlcNAc-6-fosfato 2-epimerasa bacteriana, o una UDP-GlcNAc 2-epimerasa/ManNAc quinasa de mamífero se expresa dentro de una planta.

Para asegurar la sialilación de N-glicanos a partir del ácido siálico citosólico, sintasa de CMP-Neu5Ac bacteriana o de mamífero, transportador del CMP-Neu5Ac de mamífero, una galactosiltransferasa de mamífero, y sialiltransferasa de mamífero se puede co-exresar dentro de una planta (Misaki, R., *et al.* 2006).

La presente invención además será ilustrada en los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

### Métodos

Anticuerpos policlonales dirigidos contra el polipéptido de la secuencia FLAG sintética (Asp-Tyr-Lys-Asp- Asp-Asp-Asp-Lys; SEQ ID NO:1) se prepararon en conejos en Eurogentec (Seraing, Belgium). Los cartuchos C18 Bond-Elut fueron de Varian (Sugarland, TX). *Escherichia coli* DH5-alfa y *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 se utilizaron para los experimentos de clonación y la transformación de las células de tabaco o *M. sativa*, respectivamente. Las células *Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow 2 (BY-2) fueron cultivados como se describe en Gomord *et al.* (1998).

### Clonación de los genes liasa de Neu5Ac y neuB2 y construcción del vector de expresión de la planta

Los genes de liasa de Neu5Ac y neuB2 fueron amplificados por PCR. El gen para liasa de Neu5Ac fue amplificado de ADN genómico K1 de *E. coli* por PCR utilizando los cebadores:

Liasa-P1:

5'- AATAGGCCATTACGGCCATGGCAACGAATTTACGTGG-3' (SEQ ID NO:6) y

Liasa-P2:

5'- AATAGGCCGAGGCGGCCTCACCCGCGCTCTTGCAT-3' (SEQ ID NO:7).

Para el gen neuB2, se utilizaron los siguientes cebadores para obtener el fragmento de ADN:

*neuB2-P 1*:

5'- AATAGGCCATTACGGCCATGAAAAAACTTTAATC-3' (SEQ ID NO:8) y

*neuB2-P2*:

5'- AATAGGCCGAGGCGGCCTTACTCACGGATAAGCTC-3' (SEQ ID NO:9).

Estos ADNs amplificados fueron colocados bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) del vector del plásmido pDNR-LIB para el gen de liasa de Neu5Ac y vector binario del plásmido pCAMBIA 2300 para el gen *neuB2*, respectivamente. El casete de expresión del promotor CaMV35S, liasa de Neu5Ac, y terminador nopalina sintasa (Nos) fue introducido en vector de expresión de la planta pBLTI 121 (Pagny *et al.*, 2000) con el gen de resistencia a la Kanamicina.

Para generar los plásmidos pBLTI liasa de Neu5Ac-FLAG y pBLTI *neuB2-FLAG*, los siguientes cuatro cebadores, diseñados para amplificar los genes con el péptido FLAG codificado en el extremo C-terminal de las proteínas se utilizaron:

Liasa-FLAG-P1:

5'- CGGGGTACCAGAGAGATGGCAACGAATTTACGTGGC-

3' (SEQ ID NO:2),

Liasa-FLAG-P2:

5'GCCGAGCTCTCACTTGTGCATCGTCATCC TTGTAATCCATCCCGCGCTCTTGCATCAACTG-3' (SEQ ID NO:3),

*neuB2-FLAG-P1*:

5'- CGGGGTACCAGAGAGATGAAAAAACTTTAATCATCGC-3' (SEQ ID NO:4) y

*neuB2-FLAG-P2*:

5'-GCCGAGCTCTCACTTGTGCATCGTCATCCTT GTAATCCATCTCACGGATAAGCTCATCTTC-3' (SEQ ID NO:5),

Estas secuencias amplificadas fueron generadas por PCR con el siguiente programa para 30 ciclos: desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación durante 1 min a 58°C, y polimerización a 72°C durante 3 min. Los productos de PCR se clonaron en pCR®-BLUNT II-TOPO® (Invitrogen). Antes de expresar las proteínas recombinantes en células vegetales, confirmamos que todas de las construcciones de ADNc modificadas por secuenciación. Posteriormente, los insertos fueron digeridos con KpnI y SacI y luego se clonaron en KpnI-SacI digerido pBLTI 121. Cada vector (pBLTI 121 o pCAMBIA 2300) fue introducido en la cepa del *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 vía transformación de shock de calor.

#### *Expresión en células BY2*

Las células del tabaco BY2 se mantuvieron en medio Murashige and Skoog (1962) y utilizados para la transformación. Las construcciones derivadas de pBLTI121 fueron transferidas en *Agrobacterium* (LBA4404) (Hofgen and Willmitzer, 1988). Las células de *Agrobacterium* transgénicas fueron seleccionadas en medio YEB que contiene 100 µg.mL<sup>-1</sup> de Kanamicina y se utiliza para transformar las células cultivadas de tabaco en suspensión como se describe en Gomord *et al.* (1998). Los transformantes fueron seleccionados y conservados en medio MS que contiene antibióticos (Kanamicina a 100 µg mL<sup>-1</sup> y cefotaxima a 250 µg.mL<sup>-1</sup>). ARNm y ADN genómico fueron preparados a partir de cada transformante, y se confirmó que los genes opuestos fueron insertados y expresados en células de tabaco cultivadas en suspensión por PCR y RTPCR. Después de la inmunodetección, los microcallos que producen las proteínas recombinantes se utilizaron para iniciar los cultivos en suspensión de células transgénicas (Gomord *et al.*, 1998).

#### ***Expresión en plantas de alfalfa***

La transformación de la alfalfa se realizó esencialmente como se describe en Tian *et al.*, (Tian *et al.*, 2002) con las siguientes modificaciones. El genotipo de la alfalfa R2336 fue transformada utilizando *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. La etapa de co-cultivo se realizó con un cultivo sin diluir a 0.8 a 1 OD, y 3% de sacarosa fue utilizada en el medio Sh2K en lugar de 1.5% de sacarosa.

*Preparación de extractos celulares para el ensayo de actividad de liasa de Neu5Ac y NeuB2.*

Un gramo de cultivos de cuatro días de células cultivadas en suspensión BY2 de transformantes o 600 mg de hojas frescas de *M. sativa* fueron cultivados y fraccionados en Solución A (solución reguladora Tris- HCl 100 mM (pH=7.4) que contiene inhibidores de proteinasa (pepstatina 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , E64 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y PMSF 1 mM, Sigma). Los extractos celulares luego fueron centrifugados a 10000 g durante 10 min a 4°C y las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio (concentración final 80%) y luego se dializaron contra Solución B (solución reguladora Tris- HCl 100 mM, pH=7.4 para los ensayos de liasa de Neu5Ac o pH=8.5 para los ensayos de NeuB2 y  $\text{MgCl}_2$  10 mM) con Spectra/Por® membrana (corte 10000 Da). Las proteínas luego fueron utilizadas para ensayos de enzimas o inmunodetecciones.

*Inmunodetección de liasa de Neu5Ac-FLAG y NeuB2-FLAG*

Las proteínas fueron solubilizadas en una solución reguladora desnaturizante (Tris-HCl 20 mM pH 6.8, 0.3%  $\beta$ -mercaptoetanol, 5% (v/v) de glicerol y 1% (peso/v) de SDS), se hierve durante 5 min y se separa por SDS-PAGE en geles al 15% de poliacrilamida. Las proteínas luego fueron transferidas en una membrana de nitrocelulosa. Para la inmunodetección, las membranas se probaron con un antisuero de conejo construido contra el epítopo FLAG. Las proteínas se detectaron por incubación con anticuerpos anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante seguido por la revelación utilizando 4-cloronaftol o por una reacción de quimioluminiscencia.

*Ensayos de liasa de Neu5Ac y sintasa*

Las actividades de enzima soluble fueron analizadas mediante la incubación de extractos celulares con PEP 4 mM, NADH 4 mM,  $\text{NaHCO}_3$  20 mM y DTE 10 mM. La oxidación de NADH fue medida por una disminución de la absorbancia a 340 nm después de 10 min. La actividad de liasa de Neu5Ac fue analizada por la medición de la formación de ManNAc después de la incubación de extractos celulares de transformantes con Neu5Ac. Los extractos celulares fueron incubados 2h a 37°C en Solución B (Tris- HCl 100 mM solución reguladora, pH=7.4 y  $\text{MgCl}_2$  10 mM) que contiene inhibidores de proteinasa (pepstatina 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , E64 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y PMSF 1 mM) y Neu5Ac 40 mM. La actividad sintasa de liasa de Neu5Ac fue analizada por la medición de la formación de Neu5Ac después de la incubación de extractos celulares de transformantes con ManNAc y piruvato. Los extractos celulares fueron incubados 2h a 37°C en Solución B (Tris- HCl 100 mM solución reguladora, pH=7.4 y  $\text{MgCl}_2$  10 mM) que contiene inhibidores de proteinasa (pepstatina 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , E64 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y PMSF 1 mM) y ManNAc 20 mM y piruvato 40 mM. La actividad sintasa de NeuB2 fue analizada por la medición de la formación de Neu5Ac después de la incubación de extractos celulares de transformantes con ManNAc y PEP. Los extractos celulares fueron incubados 2 h a 37°C en Solución B (Tris- HCl 100 mM solución reguladora, pH=7.4 y  $\text{MgCl}_2$  10 mM) que contiene inhibidores de proteinasa (pepstatina 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , E64 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y PMSF 1 mM) y ManNAc 10 mM y PEP 10 mM. Las reacciones se detuvieron por calentamiento 5 min a 80°C y se purificaron mediante la elución sucesiva con agua sobre un cartucho C18 Bond-Elut, se liofilizaron y derivaron para análisis GC-EI-MS.

*Experimentos de alimentación*

Células BY2 del tabaco de cuatro días fueron incubados en medio BY2 por dos días a 37°C con Neu5Ac 10 mM o ManNAc. 30 mM para ensayar la actividad de liasa de Neu5Ac o sintasa *in vivo* respectivamente. Después de 2 días, las células BY2 se lavaron con medio BY2 sin Neu5Ac o ManNAc y se cultivaron. Las células se calentaron a 70°C durante 15 min en 70% de etanol para inactivar las enzimas y luego se muelen en un homogeneizador Potter. El homogeneizado se lavó dos veces con 70% de etanol a 70°C. El pellet remanente y el sobrenadante fueron considerados como representativos de las paredes celulares y los monosacáridos libres citosólicos respectivamente. Los monosacáridos de la fracción sobrenadante luego fueron analizados por cromatografía de gases

*Análisis GC*

Para los ensayos enzimáticos, las mezclas de reacción en primer lugar fueron sometidas a una etapa de purificación en cartuchos Seppack C18. Los monosacáridos se eluyeron en 100% de agua. Después de la liofilización, las muestras fueron sometidas a una metanólisis de 16 h a 80°C con 500  $\mu\text{L}$  de HCl metanólico 2M seco. Después de la evaporación del metanol, las muestras se volvieron a acetilar, mediante la adición de 20 $\mu\text{L}$  de anhídrido acético anhidro y 20  $\mu\text{L}$  de piridina. Los N-acetil metil glicósidos (metil éster) resultantes se secaron y luego se convirtieron en sus TMS-derivados y se separan por cromatografía de gases (GC). El cromatógrafo de gases estaba equipado con un detector de ionización de llama, una columna capilar de sílica fundida WCOT (longitud 25 m, d.i. 0.25 mm) con CP-Sil 5CP como fase estacionaria y helio como gas vector. El programa de temperatura del horno fue: 2 min a 120°C, 10°C /min a 160°C, y 1.5°C /min a 220°C y luego 20°C /min a 280°C. La cuantificación del azúcar se hizo mediante la integración de picos y la determinación de los valores molares correspondientes utilizando factores de respuesta establecidos con monosacáridos estándar.

*Expresión transitoria en plantas*

*Cultivo de Agrobacterium.* Los clones de *Agrobacterium* que contienen un vector binario que lleva las deseadas construcciones de ADN descritas anteriormente se cultivaron durante 24 horas a 28°C en 2 mL de medio YEB o LB que contiene 25 y 50 µg/mL de carbenicilina y Kanamicina, respectivamente. 10 µL de estos cultivos se utilizaron como inóculos iniciales para generar los cultivos de 25 mL de medio de inducción YEB (medio YEB, 10 mM 2 (N morfolino) ácido etanosulfónico (MES), pH ajustado a 5.6, 25 mg/L de carbenicilina, 50 mg/L de Kanamicina, 20 µM acetosiringona). Estos últimos se cultivaron en incubadora de agitador rotatorio (220 rpm) a 28°C durante 18 horas o hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0.8 a 1.

*Cultivo de tabaco no-transgénico.* Plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum* se cultivaron a partir de semillas en un sustrato a base de turba (AgroMix) en un invernadero. Las plántulas inicialmente fueron construidas en un vivero y después se trasplantaron a macetas. Las plantas fueron regadas dos veces un día y recibieron 180 ppm de nitrógeno en cada aplicación. Las condiciones del invernadero se mantuvieron a 25°C durante el día y 21°C durante la noche, bajo un régimen de fotoperiodo de día largo (ciclos de 16 h de luz/8 h de oscuridad), con luz artificial de 20 Watt m<sup>2</sup> a nivel de planta. Las plantas se pueden utilizar en las diferentes etapas de crecimiento, pero preferencialmente se seleccionaron entre 5 a 8 semanas de crecimiento.

*Expresión transitoria de construcciones en tabaco.* Dos métodos de expresión transitoria se utilizaron en la presente invención: Agro-inoculación o Agro-infiltración. En ambos métodos, una mezcla de dos o tres cultivos de *Agrobacteria* que lleva el ADN de transferencia (ADN-t) de interés se obliga a entrar en los espacios intercelulares de las hojas. Una vez que la barrera física de la epidermis se cruza, la *Agrobacteria* infecta las copias del ADN-t que transfiere las células adyacentes en las células vegetales. Con estos métodos, el pasaje de ADN-t dentro del núcleo es transitorio, los genes presentes en el ADN-t se transcriben de forma episomal y el ARNm se traduce, lo que conduce a la producción de la proteína de interés en las células infectadas. La técnica de Agro-inoculación utiliza una presión aplicada con una jeringa para insertar la mezcla de *Agrobacteria* dentro del tejido de la planta, mientras que la Agro-infiltración utiliza un vacío controlado.

El cultivo de *Agrobacterium* preparado como se describe anteriormente se centrifugó 8 min a 10 000 g, se vuelve a suspender en el mismo volumen de medio de inoculación (MgC12 10 mM, MES 10 mM, ajustado a pH 5.6, y suplementado con 100 µM de acetosiringona) y se mantiene a temperatura ambiente (RT, 23°C) por 1h antes de la inoculación. De manera alternativa, la suspensión se puede mantener a 4°C por 24 horas antes de la inoculación. La transformación transitoria de *N. benthamiana* y *N. tabacum* se realizó esencialmente como se describe en Liu y Lomonosoff (2002, Journal of Virological Methods, 105:343-348), con las siguientes modificaciones. Para la expresión de las construcciones descritas anteriormente, una mezcla de dos cepas de *Agrobacteria* fue inoculada. La primera cepa contenía uno de los clones descritos anteriormente y la segunda cepa contenía el supresor HcPro de silenciamiento a partir del Virus Y de la patata, bajo el control del promotor 35S. Después de la inoculación, las plantas fueron incubadas en un invernadero. La temperatura se mantuvo a un mínimo de 23°C durante el día y 21°C durante la noche. Las plantas fueron regadas dos veces al día y recibieron 180 ppm de nitrógeno en cada aplicación. La cosecha de la biomasa se llevó a cabo después de 4-8 días.

*Preparación de extractos de proteínas solubles a partir de biomasa transformada* Las hojas fueron analizadas directamente después de la cosecha o después de la congelación de la biomasa a -80°C. Una biomasa de hojas Agro-inoculadas o Agro-infiltradas de ~0.1-1 g se pesó y se utilizó para generar un extracto líquido de proteína total.

Varios métodos de extracción se utilizaron para generar los extractos de proteína total: mediante la molienda del tejido vegetal con un mortero y su mano, utilizando un politron, o mediante la pulverización de este en un MixerMill300 (MM300) de Retsch. 0.1 - 1 g de la biomasa de la planta fueron transferidos en un mortero limpio y pre-enfriado. La solución reguladora de extracción fría (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4 solución reguladora que contiene, CaCl<sub>2</sub> 2 mM y 4% de butanol) se adicionó a una relación 1:3 (peso/v) así como PMSF y quimostatina a concentraciones finales de 1 mM y 10 µM, respectivamente. Las hojas se molieron con una mano de mortero hasta que se obtiene una preparación homogénea. El extracto de la planta, luego se transfirió en un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 20,000g por 20 min a 4°C. De manera alternativa, 0.1 g de tejido de planta con 0.3 mL de solución reguladora de extracción fueron introducidos en un microtubo 1.5 no-estéril. Una cuenta de tungsteno se adicionó a cada tubo. La caja fue sometida a un ciclo de 3 min de agitación a 30 Hz. El ciclo fue repetido 2 veces. Los extractos de plantas luego fueron centrifugados como se describe anteriormente. De manera alternativa, 1 g de biomasa fue pulverizado con 3 mL de solución reguladora de extracción utilizando un politrón.

Después de la centrifugación, el sobrenadante fue transferido en un microtubo limpio y se mantuvo sobre hielo. Finalmente, el contenido de proteína total de los extractos de proteína individuales fue medido por el método de Bradford utilizando BSA como la proteína referencia.

**Ejemplo 1***Expresión de liasa de Neu5Ac de E.coli en células del tabaco BY2*

El gen codificador de la liasa de Neu5Ac a partir de *Escherichia coli* K1 (número de acceso: D00067) fue introducido en las células del tabaco BY2. Los callos de BY2 transgénicos fueron generados después de la transformación mediada del *Agrobacterium* con el plásmido pBLTI121 que contiene el *gen K1 de E. coli* de liasa de Neu5Ac. Otra construcción fue etiquetada en su C-terminal con un epítipo FLAG para permitir la inmunodetección de la proteína recombinante en transformantes. Los transformantes seleccionados para la resistencia a la kanamicina fueron analizados para niveles de ARNm por RT-PCR. Treinta y seis de 48 transformantes que expresan la transcripción de liasa de Neu5Ac y 30 de 50 transformantes que expresan la transcripción de liasa de Neu5Ac-FLAG fueron obtenidas. Los callos que albergan los niveles más altos de expresión de ARNm fueron transformados en los cultivos en suspensión para la caracterización de la actividad de liasa de Neu5Ac. La presencia del liasa de Neu5Ac-FLAG se determinó en los extractos citosólicos de la proteína de células BY2 transformadas por análisis de western-blot. Una banda de proteína única con un MW aparente de 32 kDa fue inmunodetectado específicamente en las células transformadas utilizando los anticuerpos anti-FLAG (Figura 1a).

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en extractos de proteínas solubles a partir de células cultivadas en suspensión BY2 que expresan la liasa de Neu5Ac y liasa de Neu5Ac-FLAG. Ambos extractos mostraron una actividad de liasa. Otro análisis fue realizado en extractos de proteínas aisladas a partir de células que expresan la liasa no-etiquetada. Estos extractos primero fueron incubados en la presencia de Neu5Ac para investigar su actividad de liasa. Las Figuras 1b y 1c muestran los perfiles de GC de los productos finales formados por la incubación de un extracto de proteína de liasa de Neu5Ac en ausencia (Figura 1b) o presencia de Neu5Ac (Figura 1c) a pH 7 y a 37°C. Tres señales (pico 1, es un hombro de una señal endógena) fueron detectadas claramente cuando el extracto fue incubado con Neu5Ac. Estas señales eluyeron a tiempos de retención similares a aquellas de piranosa (pico 1) y formas de furanosa (picos 2 y 3) de ManNAc estándar. La cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas por Impacto de Electrones (GC-EI MS) de la muestra confirmó la asignación de estas señales a los derivados de 1-O-metil persilil de ManNAc (Figura 1e) y ManNAc (Figura 1f). Los iones de diagnóstico a  $m/z = 173$  y  $186$  fueron asignadas a los fragmentos que contienen el átomo de nitrógeno, como usualmente se observa para los aminoazúcares.

La incubación de un extracto de proteína citosólico a partir de las células del tabaco BY2 del tipo salvaje con Neu5Ac en condiciones similares no dio lugar a ninguna formación de ManNAc (los datos no se muestran), demostrando así la ausencia de una actividad de liasa endógena en las plantas. Este dato indica que las células BY2 transformadas con el gen de *E. coli* de liasa de Neu5Ac expresó una enzima funcional capaz de transformar Neu5Ac en D-ManNAc.

El pH óptimo de la enzima recombinante se determinó que era aproximadamente 7, basándose en la cuantificación por GC de D-ManNAc generado en los ensayos se llevan a cabo en un rango de pH 4-10 (los datos no se muestran). Adicionalmente, la enzima recombinante mostró una actividad dependiente de la temperatura con alta actividad de liasa observada en un rango de 25-37°C. A pH 7 y a 37°C, un extracto de proteínas solubles a partir de células transformadas formó 0.5 pmoles de ManNAc a partir de 10 pmoles de Neu5Ac, en 1h. Por debajo de 15°C, solo se detectó actividad residual.

La capacidad de la liasa de Neu5Ac recombinante para sintetizar Neu5Ac se determinó mediante la incubación de extractos de proteínas de células BY2 transformadas del tabaco con DManNAc y piruvato a pH 7 y 37°C. La Figura 2a y la 2b muestran los perfiles de GC de los productos finales después de la incubación en la ausencia o presencia de sustratos respectivamente. Cuando se compara con el perfil control (Figura 2a), el perfil de GC de la reacción conducida en la presencia de DManNAc y piruvato mostró una señal a un tiempo de retención previsto para Neu5Ac (caja en la Figura 2b). El espectro de masas por impacto de electrones (EI MS) de esta señal (Figura 2c), mostró los iones de diagnóstico a  $m/z = 298$  y  $420$  específico para la fragmentación de Neu5Ac, así como el ion a  $m/z = 186$  asignado al fragmento que contiene nitrógeno. Este dato indica que la liasa recombinante es capaz de sintetizar Neu5Ac en presencia del D-ManNAc y el piruvato.

*En la actividad de la planta* de la liasa de Neu5Ac se determinó mediante la alimentación de las células del tabaco BY2 con Neu5Ac 10 mM. La toxicidad de Neu5Ac en células del tabaco BY2 fue investigada, y ningún efecto tóxico fue observado durante un periodo de 48 h mediante pruebas de la viabilidad celular utilizando yoduro de propidio y diacetato de fluoresceína. La formación de D-ManNAc se determinó mediante el análisis de monosacáridos citosólicos por GC después de un periodo de 48 h a temperatura que oscila de 23 ° C a 37 ° C. D-ManNAc se detectó en todos los tratamientos (Figura 1d). La cuantificación de DManNAc por GC mostró un incremento de 25-veces en el contenido de este aminoazúcar a 37°C en comparación con 23°C. Estos experimentos *in vivo* demostraron que la liasa de Neu5Ac es biológicamente activa en la planta y es capaz de actuar bajo un sustrato suministrado exógenamente.

*Expresión de NeuB2 de Campylobacter jejuni en plantas de tabaco BY2 y alfalfa*

Neu5Ac sintasa, NeuB2, a partir de *Campylobacter jejuni* (número de acceso: NC002163) cataliza la formación de Neu5Ac por condensación de D-ManNAc y PEP. Los callos de BY2 transgénicos fueron generados después de la transformación mediada del *Agrobacterium* con el plásmido pBLT1121 que contiene el ADNc de *neuB2*. Para la inmunodetección de la proteína, una segunda construcción fue etiquetada en su extremo C-terminal con un epítipo FLAG. Los transformantes seleccionados para la resistencia a la kanamicina fueron analizados para los niveles de ARNm por RT-PCR. Los callos que albergan los niveles más altos de ARNm de expresión fueron transformados en los cultivos en suspensión para el análisis. La acumulación de NeuB en las células BY2 transformadas, luego fue determinada por análisis de western-blot de un extracto de proteína soluble aislado a partir de las células BY2 transformadas con la secuencia de NeuB2-FLAG. Como se ilustra en la Figura 3a, los anticuerpos anti-FLAG reconocieron específicamente una banda de proteína única a MW=37 kDa consistente con el peso molecular esperado de la sintasa. *neuB2* también fue introducido en las plantas de alfalfa, mediante la transformación mediada por el *Agrobacterium* y la regeneración *in vitro* de las plantas (Tian *et al.*, 2002). De 34 plantas transformadas, se demostró que 29 expresan la transcripción de *neuB2*.

Antes del análisis de las células transformadas y las plantas que expresan la sintasa del Neu5Ac bacteriana, la presencia de actividad endógena de la sintasa del Neu5Ac fue investigada. Los extractos de proteína soluble de ambas células del tabaco BY2 del tipo salvaje y plantas de alfalfa fueron incubados con D-ManNAc y PEP. Los monosacáridos formados en los ensayos se separaron por GC y caracterizaron por GC-EI MS. Ningún pico o iones de diagnóstico EI MS asignados al Neu5Ac fueron detectados, indicando que las plantas no expresan enzimas endógenas capaces de formar Neu5Ac por condensación de PEP en D-ManNAc.

La actividad sintasa del NeuB2 recombinante expresado en plantas se determinó por incubación de D-ManNAc y PEP con extractos de proteínas solubles aislados a partir de las células del tabaco BY2 o plantas de alfalfa transformadas con el gen *neuB2*. Las Figuras 3b y 3c muestran los perfiles de GC obtenidos mediante la incubación de un extracto de alfalfa transformado sin (Figura 3b) o con (Figura 3c) DManNAc y PEP a pH=8 y 37°C. Un pico eluyó al tiempo de retención esperado para Neu5Ac, se detectó específicamente después de la incubación con los sustratos de la sintasa. El EI-MS de este pico mostró un patrón de fragmentación similar al de un Neu5Ac estándar, con iones de diagnóstico a m/z =298 y 420. Aquellos iones no se detectaron en el espectro EI-MS de la región correspondiente del perfil de GC después de la incubación en ausencia de DManNAc (Figura 3b).

El mismo resultado fue obtenido, mediante el análisis de células del tabaco BY2, que expresan la NeuB2 o la secuencia de NeuB2-FLAG.

Por lo tanto, la expresión de *neuB2* en ambas las células del tabaco BY2 y las plantas de alfalfa resulta en la producción de una sintasa del Neu5Ac funcional.

## Referencias

Angatta, T. and Varki, A. (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev.*, 102, 439-469.

Bakker, H., Bardor, M., Molhoff, J., Gomord, V., Elbers, I., Stevens, L., Jordi, W., Lommen, A., Faye, L., Lerouge, P. and Bosch D. (2001) Humanized glycans on antibodies produced by transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2899-2904.

Bardor M, Faveeuw C, Fitchette A-C, Gilbert D, Galas L, Trottein F, Faye L and Lerouge P. (2003) Immureactivity in mammals of two typical plant glycoepitopes, core- $\alpha$ (1,3)-fucose and core-xylose. *Glycobiology*, 13, 427-434.

Bravo, I. G., Garcia-Vallvé, S., Romeu, A. and Reglero, A. (2004) Prokaryotic origin of cytidyltransferases and K-ketoacid synthases. *Trends in Microbiol.*, 12, 120-128.

Busse, U., Levée, V., Trépanier, S. and Vézina, L. (2001) Production of antibodies in alfalfa (*Medicago sativa*). In: *Molecular Farming of plants and animal for human and veterinary medicine*. (Erickson, L., ed), pp 199-219. J. Wiley and sons, New York.

Delmas F, Petit J, Joubes J, Séveno M, Paccalet T, Hemould M, Lerouge P, Mouras A and Chevalier C. (2003) The gene expression and enzyme activity of plant 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-8-phosphate synthase are preferentially associated with cell division in a cell cycle-dependent manner. *Plant Physiol.*, 133, 348-360.

Gomord, V., Fitchette-Lainé, A.-C., Denmat, L.-A., Michaud, D., and Faye, L. (1998) Production of foreign proteins in tobacco cell suspension culture. In *Methods in Biotechnology*, C.C. Cunningham and A.J.R. Porter, eds. Totowa, NJ, Humana Press, pp. 155-164.

- Hofgen, R. and Willmitzer L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res* 16, 9877.
- Kelm, S. And Schauer, R. (1997) Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.* 175, 137-240.
- 5 Ko, K., Tekoah, Y., Rudd, P.M., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Spitsin, S., Hanlon, C.A., Rupprecht C., Dietzschold, B., Golovkin, M. and Koprowski, H. (2003) Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 8013-8018
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fitchette-Lainé, A.-C., Gomord, V. and Faye, L. (1998) N-glycoprotein biosynthesis: recent development and future trends. *Plant Mol. Biol.*, 38, 31-48.
- 10 Maru, I., Ohnishi, J., Ohta, Y. and Tsukada, Y. (1998) Simple and large-scale production of N-acetylneuraminic acid from N-acetyl-D-glucosamine and pyruvate using N-acyl-D-glucosamine epimerase and N-acetylneuraminase. *Carbohydr. Res.*, 306, 575-578.
- Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M. and Sasaki, R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* 27, 1163-1172.
- 15 Misaki, R., Fujiyama, K., and Seki, T. (2006) Expression of human CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase and CMP-sialic acid transporter in tobacco suspension-cultured cell. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 339, 1184-1189.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473.
- Pagny, S., M. Cabanes-Macheteau, J. W. Gillikin, N. Leborgne-Castel, P. Lerouge, R. S. Boston, L. Faye and V. Gomord (2000). Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. *Plant Cell* 12, 739-756.
- 20 Palacpac, N.Q., Yoshida, S., Sakai, H., Kimura, Y., Fujiyama, K., Yoshida, T. and Seki, T. (1999) Stable expression of human beta 1,4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4692-4697.
- Ray, P.H. (1980) Purification and characterization of 3-deoxy-D-manno-octulosonic 8-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 141, 635-644.
- 25 Sriraman, R., Bardor, M., Sack, M., Vaquero, C., Faye, L., Fischer, R., Finnern R. and Lerouge, P. (2004) Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core xylose and core K(1,3)-fucose residues. *Plant Biotech. J.*, 2, 279-287.
- 30 Séveno, M., Bardor, M., Paccalet, T., Gomord, V., Lerouge, P. and Faye, L. (2004) Glycoprotein sialylation in plants? *Nature Biotech.*, 22, 5-6.
- Strohmaier, H., Remler, P., Renner, W. and Högenauer, G. (1995) Expression of genes *kdsA* and *kdsB* involved in 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid metabolism and biosynthesis of enterobacterial lipopolysaccharide is growth phase regulated primary at the transcriptional level in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 177, 4488-4500.
- 35 Tian, L., Wang, H., Wu, K., Latoszek-Green, M., Hu, M., Miki, B., Brown, D.C.W. (2002) Efficient recovery of transgenic plants through organogenesis and embryogenesis using cryptic promoter to drive marker gene expression. *Plant Cell Rep.*, 20, 1181-1187.
- Triguero, A., Cabrera, G., Cremata, J., Yuen, C.-T., Wheeler J. and Ramirez N.I. (2005) Plant-derived mouse IgG monoclonal antibody fused to KDEL endoplasmic reticulum-retention signal is N-glycosylated homogeneously throughout the plant with mostly high-mannose-type N-glycans. *Plant Biotech. J.* 3, 449-457
- 40 Tanner, M. E. (2005) The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg. Chem.*, 33, 216-228. Wee, E.Q., Sherrier, D.J., Prime, T.A. and Dupree, P. (1998) Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell*, 10, 1759-1768.
- 45 La presente invención ha sido descrita con respecto a una o más modalidades. Sin embargo, será aparente por aquellos de habilidad en el oficio, que un número de variaciones y modificaciones se pueden hacer sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para sintetizar el ácido siálico que comprende,
- 5 i) cultivo de una planta transgénica que comprende una secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa del ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) microbiana, la secuencia de nucleótidos ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta, y
- ii) expresión de la secuencia de nucleótidos, sintetizando así el ácido siálico.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido siálico es el Neu5Ac, y en donde después de la etapa de expresión, el Neu5Ac se recupera a partir de la planta transgénica.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la planta transgénica además comprende una segunda secuencia de nucleótidos codificadora de una o más de una epimerasa, una sintasa de CMP-Neu5Ac, o una transportador de CMP-Neu5Ac, ligada operativamente a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta transgénica, y la segunda secuencia de nucleótidos es co-expresada junto con la expresión de la secuencia de nucleótidos.
- 15 4. Una planta, una célula vegetal, o una semilla, que comprende una secuencia de nucleótidos codificadora de una sintasa de Neu5Ac microbiana ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta.
5. La planta, la célula vegetal o la semilla de la reivindicación 4, que además comprende una segunda secuencia de nucleótidos codificadora de una o más de una epimerasa, una sintasa de CMP-Neu5Ac, un transportador de CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, ligada operativamente a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta, célula vegetal, o la semilla.
- 20 6. La planta, célula vegetal, o semilla de la reivindicación 5, que además comprende una tercera secuencia de nucleótidos codificadora de una proteína de interés ligada operativamente con una o más de una región reguladora que es activa en la planta, célula vegetal, o la semilla.
- 25 7. La planta, la célula vegetal o la semilla de la reivindicación 6, en donde la secuencia de nucleótidos codificadora de la sintasa de Neu5Ac bacteriana, la segunda secuencia de nucleótidos codificadora una o más de una epimerasa, sintasa de CMP-Neu5Ac, transportador de CMP-Neu5Ac, galactosiltransferasa, sialiltransferasa, y/o la tercera secuencia de nucleótidos codificadora de la proteína de interés, es optimizada por el codón para la expresión dentro de la planta, célula vegetal, o la semilla.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la planta transgénica se transforma de forma transitoria.

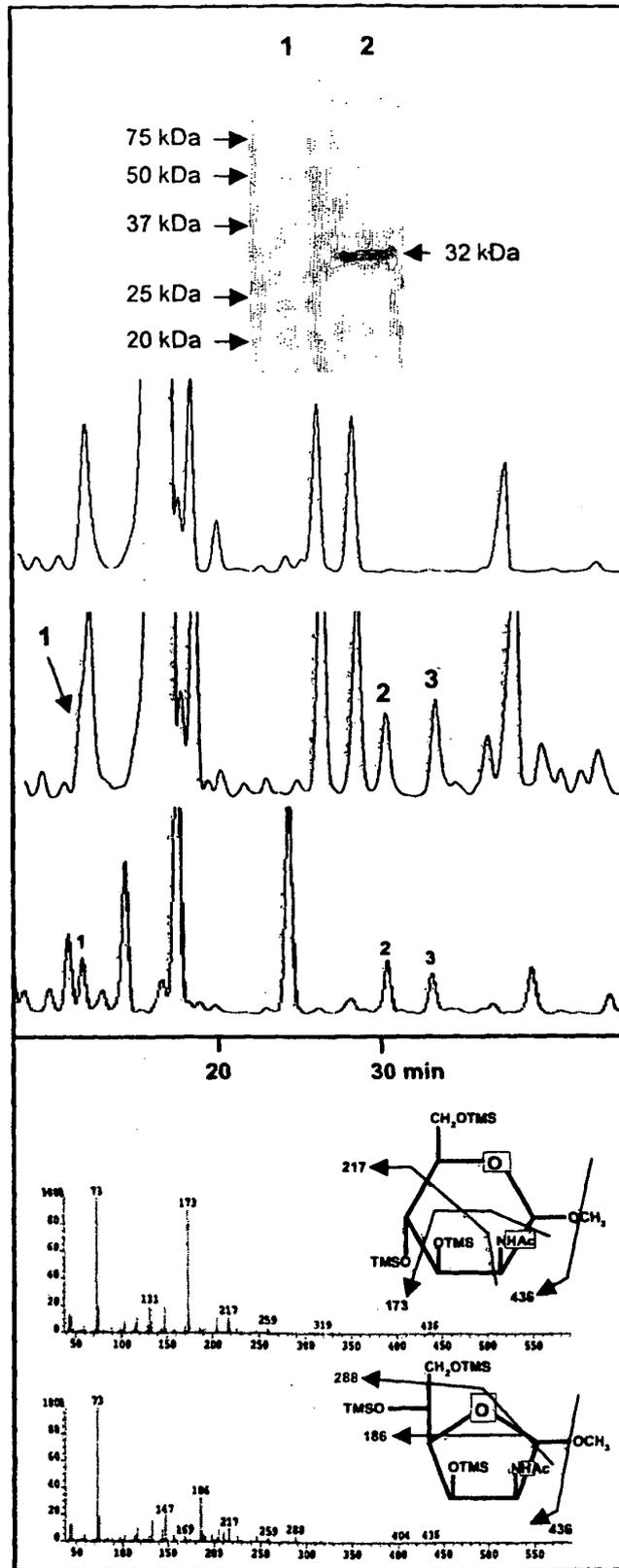


Figura 1a

Figura 1b

Figure 1c

Figura 1d

Figura 1e

Figura 1f

Figura 1

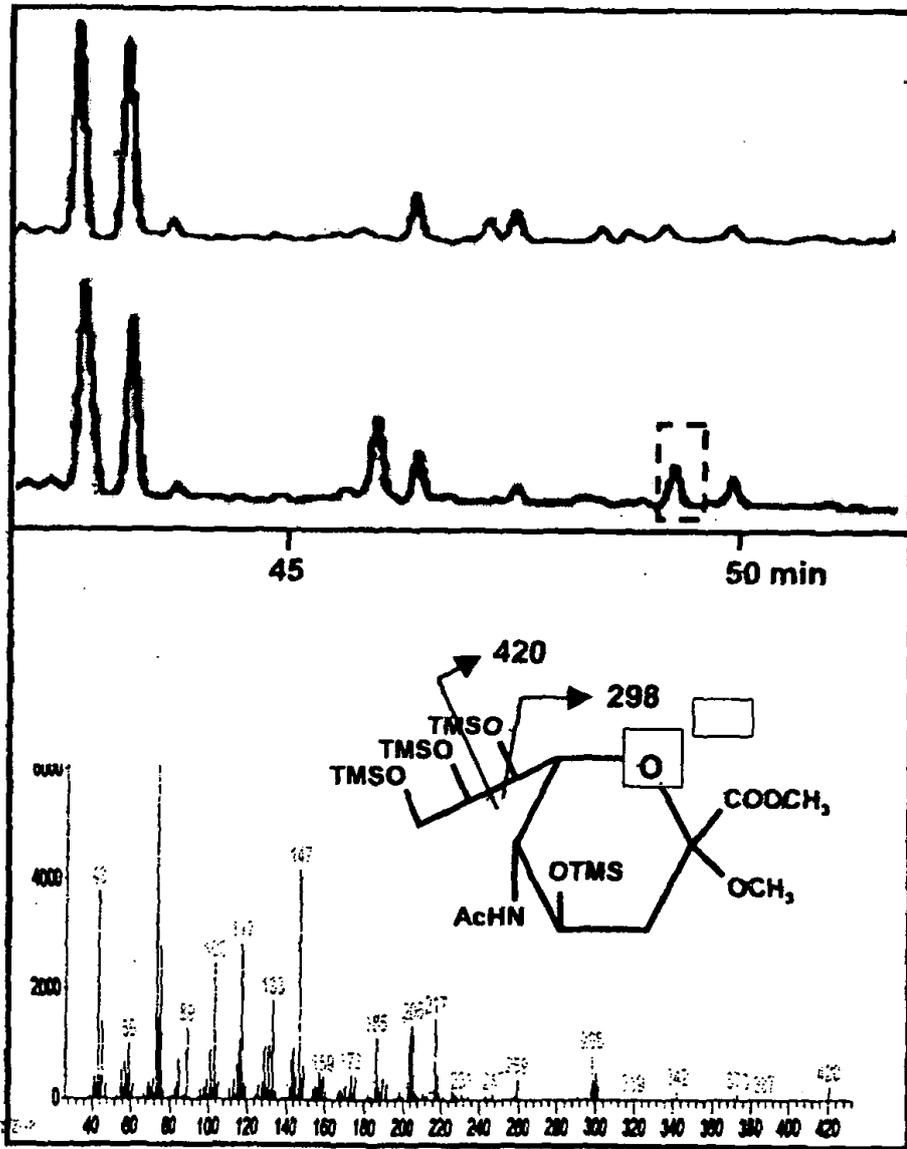


Figura 2a

Figura 2b

Figura 2c

Figura 2

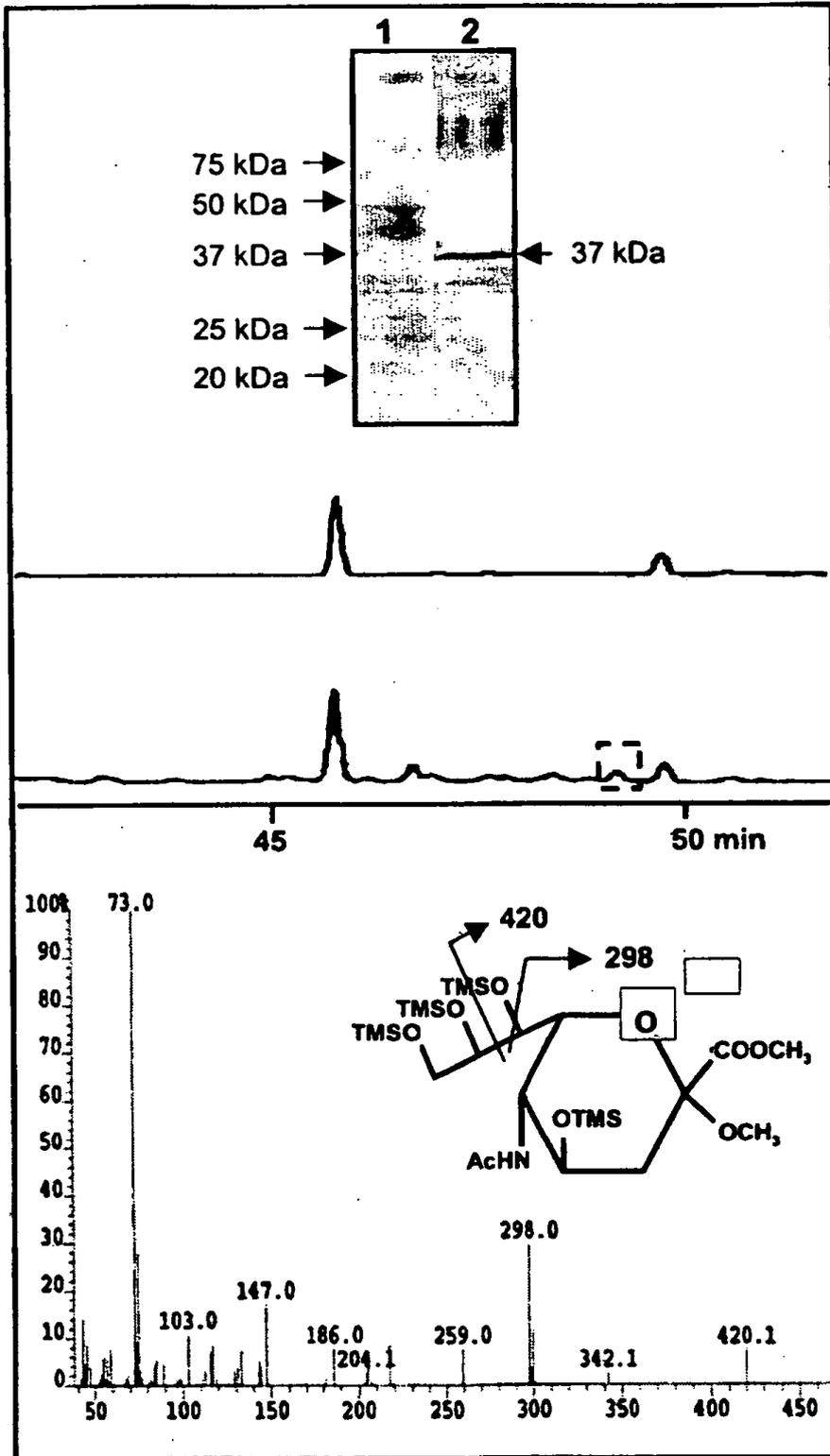


Figura 3a

Figura 3b

Figura 3c

Figura 3d

Figura 3

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

*Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.*

- 5 Documentos de patentes citadas en la descripción
- US 5428147 A [0043]
  - US 4945050 A [0053]
  - US 5036006 A [0053]
  - US 5100792 A [0053]
- 10 Literatura no-patente citada en la descripción
- Sardana et al. Plant Cell Reports, 1996, vol. 15, 677-681 [0029]
  - Murray et al. Nuc Acids Res., 1989, vol. 17, 477-498 [0029]
  - Maniatis et al. Molecular Cloning (A Laboratory Manual). Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 387-389 [0038]
- 15
- Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc, 1989, vol. 1, 2.10.3 [0038]
  - Rask et al. J. Plant Physiol., 1998, vol. 152, 595-599 [0041]
  - Bilodeau et al. Plant Cell, 1994, vol. 14, 125-130 [0041]
  - Gatz, C.; Lenk, I.R.P. Trends Plant Sci., 1998, vol. 3, 352-358 [0042]
  - Gatz, C. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1997, vol. 48, 89-108 [0042]
- 20
- Aoyama, T. ; Chua, N.H. Plant J., 1997, vol. 2, 397-404 [0042]
  - Salter, M.G. et al. Plant Journal, 1998, vol. 16, 127-132 [0042]
  - Caddick, M.X. et al. Nature Biotech., 1998, vol. 16, 177-180 [0042]
  - Brandstatter, I. ; Kieber, J.J. Plant Cell, 1998, vol. 10, 1009-1019 [0042]
  - Kakimoto, T. Science, 1996, vol. 274, 982-985 [0042]
- 25
- Ulmasov, T. et al. Plant Cell, 1997, vol. 9, 1963-1971 [0042]
  - Odell et al. Nature, 1985, vol. 313, 810-812 [0043]
  - Zhang et al. Plant Cell, 1991, vol. 3, 1155-1165 [0043]
  - An et al. Plant J., 1996, vol. 10, 107-121 [0043]
  - Xu. Plant Physiol., 1994, vol. 106, 459-467 [0043]
- 30
- Cornejo et al. Plant Mol. Biol., 1993, vol. 29, 637-646 [0043]
  - Holtorf et al. Plant Mol. Biol., 1995, vol. 29, 637-646 [0043]
  - Mandel et al. Plant Mol. Biol., 1995, vol. 29, 995-1004 [0043]

- Weissbach ; Weissbach. *Methods for Plant Molecular Biology*. Academy Press, 1988, 421-463 [0053]
- Geierson ; Corey. *Plant Molecular Biology*. 1988 [0053]
- *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. Miki ; Iyer. *Plant Metabolism*. Addison Wesley, Langmans Ltd, 1997, 561-579 [0053]
- 5 • Bilanz et al. *Gene*, 1991, vol. 100, 247-250 [0053]
- Scheid et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 228, 104-112 [0053]
- Guerche et al. *Plant Science*, 1987, vol. 52, 111-116 [0053]
- Neuhauser et al. *Theor. Appl Genet.*, 1987, vol. 75, 30-36 [0053]
- Klein et al. *Nature*, 1987, vol. 327, 70-73 [0053]
- 10 • Howell et al. *Science*, 1980, vol. 208, 1265 [0053]
- Horsch et al. *Science*, 1985, vol. 227, 1229-1231 [0053]
- DeBlock et al. *Plant Physiology*, 1989, vol. 91, 694-701 [0053]
- *Methods for Plant Molecular Biology*. Academic Press Inc, 1988 [0053]
- *Methods in Plant Molecular Biology*. Academic Press Inc, 1989 [0053]
- 15 • Liu; Lomonosoff. *J Virol Meth*, 2002, vol. 105, 343-348 [0053]
- Liu; Lomonosoff. *Journal of Virological Methods*, 2002, vol. 105, 343-348 [0054] [0080]
- Angatta, T. ; Varki, A. Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev.*, 2002, vol. 102, 439-469 [0095]
- 20 • Bakker, H. ; Bardor, M. ; Molhoff, J. ; Gomord, V. ; Elbers, I. ; Stevens, L. ; Jordi, W. ; Lommen, A. ; Faye, L. ; Lerouge, P. Humanized glycans on antibodies produced by transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, 2899-2904 [0095]
- Bardor M; Faveeuw C ; Fitchette A-C ; Gilbert D ; Galas L ; Trottein F ; Faye L ; Lerouge P. Immureactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core-alpha(1,3)-fucose and core-xylose. *Glycobiology*, 2003, vol. 13, 427-434 [0095]
- 25 • Bravo, I. G. ; Garcia-Vallvé, S. ; Romeu, A. ; Reglero, A. Prokaryotic origin of cytidyltransferases and K-ketoacid synthases. *Trends in Microbiol.*, 2004, vol. 12, 120-128 [0095]
- Production of antibodies in alfalfa (*Medicago sativa*). Busse, U. ; Levée, V. ; Trépanier, S. ; Vézina, L. *Molecular Farming of plants and animal for human and veterinary medicine*. J. Wiley and sons, 2001, 199-219 [0095]
- 30 • Delmas F ; Petit J ; Joubes J ; Séveno M ; Paccalet T ; Hemould M ; Lerouge P ; Mouras A ; Chevalier C. The gene expression and enzyme activity of plant 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-8-phosphate synthase are preferentially associated with cell division in a cell cycle-dependent manner. *Plant Physiol.*, 2003, vol. 133, 348-360 [0095]
- Production of foreign proteins in tobacco cell suspension culture. Gomord, V. ; Fitchette-Lainé, A.-C. ; Denmat, L.-A. ; Michaud, D. ; Faye, L. *Methods in Biotechnology*. Humana Press, 1998, 155-164 [0095]
- 35 • Hofgen, R ; Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res*, 1988, vol. 16, 9877 [0095]
- Kelm, S. ; Schauer, R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.*, 1997, vol. 175, 137-240 [0095]

- Ko, K. ; Tekoah, Y. ; Rudd, P.M. ; Harvey, D.J. ; Dwek, R.A. ; Spitsin, S. ; Hanlon, C.A. ; Rupprecht C. ; Dietzschold, B. ; Golovkin, M. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 101, 8013-8018 [0095]
- 5 • Lerouge, P. ; Cabanes-Macheteau, M. ; Rayon, C. ; Fitchette-Lainé, A.-C. ; Gomord, V. ; Faye, L. N-glycoprotein biosynthesis: recent development and future trends. *Plant Mol. Biol.*, 1998, vol. 38, 31-48 [0095]
- Maru, I. ; Ohnishi, J. ; Ohta, Y. ; Tsukada, Y. Simple and large-scale production of N-acetylneuraminic acid from N-acetyl-D-glucosamine and pyruvate using N-acyl-D-glucosamine epimerase and N-acetylneuraminase. *Carbohydr. Res.*, 1998, vol. 306, 575-578 [0095]
- 10 • Matsumoto, S. ; Ikura, K. ; Ueda, M. ; Sasaki, R. Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.*, 1995, vol. 27, 1163-1172 [0095]
- Masaki, R. ; Fujiyama, K. ; Seki, T. Expression of human CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase and CMP-sialic acid transporter in tobacco suspension-cultured cell. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2006, vol. 339, 1184-1189 [0095]
- 15 • Murashige, T. ; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, 473 [0095]
- Pagny, S. ; M. Cabanes-Macheteau ; J. W. Gillikin ; N. Leborgne-Castel ; P. Lerouge ; R. S. Boston ; L. Faye ; V. Gomord. Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. *Plant Cell*, 2000, vol. 12, 739-756 [0095]
- 20 • Palacpac, N.Q. ; Yoshida, S. ; Sakai, H. ; Kimura, Y. ; Fujiyama, K. ; Yoshida, T. ; Seki, T. Stable expression of human beta 1,4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 4692-4697 [0095]
- Ray, P.H. Purification and characterization of 3-deoxy-D-manno-octulosonic 8-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1980, vol. 141, 635-644 [0095]
- 25 • Sriraman, R. ; Bardor, M. ; Sack, M. ; Vaquero, C. ; Faye, L. ; Fischer, R. ; Finnern R. ; Lerouge, P. Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core xylose and core K(1,3)-fucose residues. *Plant Biotech. J.*, 2004, vol. 2, 279-287 [0095]
- Séveno, M. ; Bardor, M. ; Paccalet, T. ; Gomord, V. ; Lerouge, P. ; Faye, L. Glycoprotein sialylation in plants?. *Nature Biotech.*, 2004, vol. 22, 5-6 [0095]
- 30 • Strohmaier, H. ; Remler, P. ; Renner, W. ; Högenauer, G. Expression of genes *kdsA* and *kdsB* involved in 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid metabolism and biosynthesis of enterobacterial lipopolysaccharide is growth phase regulated primary at the transcriptional level in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, 4488-4500 [0095]
- Tian, L. ; Wang, H. ; Wu, K ; Latoszek-Green, M. ; Hu, M. ; Miki, B. ; Brown, D.C.W. Efficient recovery of transgenic plants through organogenesis and embryogenesis using cryptic promoter to drive marker gene expression. *Plant Cell Rep.*, 2002, vol. 20, 1181-1187 [0095]
- 35 • Triguero, A. ; Cabrera, G. ; Cremata, J. ; Yuen, C-T. ; Wheeler J. ; Ramirez N.I. Plant-derived mouse IgG monoclonal antibody fused to KDEL endoplasmic reticulum-retention signal is N-glycosylated homogeneously throughout the plant with mostly high-mannose-type N-glycans. *Plant Biotech. J.*, 2005, vol. 3, 449-457 [0095]
- Tanner, M. E. The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg. Chem.*, 2005, vol. 33, 216-228 [0095]
- 40 • Wee, E.Q. ; Sherrier, D.J. ; Prime, T.A. ; Dupree, P. Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus. *Plant Cell*, 1998, vol. 10, 1759-1768 [0095]