

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 681**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82	(2006.01)	C12P 19/26	(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)		
C12P 21/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007 E 10166705 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2224009**

54 Título: **Síntesis de ácido siálico en plantas**

30 Prioridad:

09.02.2006 US 743267 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.04.2013

73 Titular/es:

**MEDICAGO INC. (33.3%)
1020, ROUTE DE L'EGLISE, BUREAU 600
SAINTE-FOY, QC G1V 3V9, CA;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
UNIVERSITE DE ROUEN (33.3%)**

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/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 399 681 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 de ácido siálico en plantas

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con la síntesis del ácido siálico en plantas. Adicionalmente la presente invención
 5 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

Las plantas son potencialmente una fábrica segura de bajo costo y baja contaminación, para la producción de
 10 proteínas farmacéuticas recombinantes. La mayoría de las proteínas recombinantes producidas en las plantas no se distinguen de sus contrapartes de mamíferos, en cuanto a la secuencia de aminoácidos, conformación y actividad biológica. Adicionalmente, las glicoproteínas de mamífero son eficientemente glicosiladas 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 elaborados a partir de plantas ya que la presencia de glicopéptidos específicos de las plantas sobre
 15 estas proteínas puede producir respuestas inmunes en humanos (Bardor et al., 2003), así como la ausencia de epítopos del tipo mamífero, tal como las secuencias sialiladas, puede inducir su rápida eliminación del torrente sanguíneo. Como consecuencia, el control de la N-glicosilación de los productos farmacéuticos elaborados a partir de plantas, es un prerrequisito para su uso en terapia humana.

Recientemente han surgido estrategias de remodelación *in planta* para obtener anticuerpos derivados de las plantas
 20 con perfiles de carbohidratos compatibles con los humanos. Algunas estrategias involucran la retención de los plantícuerpos en el retículo endoplasmático (Ko et al., 2003; Sriraman et al., 2004; Triguero et al., 2005), otras involucran la transformación de las 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 murino
 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 el correspondiente IgG de murino (Bakker et al., 2001).

Las IgG de mamífero portan N-glicanos bi-antennarios en el sitio conservado de la N-glicosilación localizado en el
 30 dominio Fc. Estos oligosacáridos están 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 antennarios di, tri o tetra sialilados. Se requiere la presencia de ácidos siálicos terminales sobre estos glicanos 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 son detectadas por los receptores de asialoglicoproteína hepática y eliminados del suero, volviendo a estas proteínas de vida
 35 biológicamente corta e ineficaces (Kelm y Schauer, 1997). Por lo tanto, los compuestos farmacéuticos no sialilados elaborados a partir de plantas pueden ser rápidamente eliminados del torrente sanguíneo cuando se inyectan a un humano, por ejemplo, una Epo derivada del tabaco era 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).

La remodelación de los N-glicanos ligados a los plantícuerpos en N-glicanos similares a los humanos, ya ha sido
 40 lograda 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. También se ha introducido una sialiltransferasa de mamífero 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
 45 debate. Sin embargo, Neu5Ac, el principal ácido siálico presente en humanos, así como su precursor la N-acetilmanosamina (D-ManNAc) no parece que sean sintetizados en las plantas en cantidades detectables (Séveno et al., 2004). Como consecuencia, la modificación por ingeniería genética del glicol de los N-glicanos de la planta en oligosacáridos sialilados necesita de la coexpresión de enzimas exógenas capaces de catalizar la síntesis, la activación y la transferencia en el aparato de Golgi de Neu5Ac.

En los mamíferos y las bacterias, el anabolismo y catabolismo de Neu5Ac ocurre a través de diferentes rutas
 50 (Angata y Varki, 2002). Dos clases principales de enzimas se necesitan para formar Neu5Ac. La N-acetilneuraminato liasa (Neu5Ac liasa) está involucrada en el catabolismo de los ácidos siálicos mediante la catálisis de la escisión de Neu5Ac en N-acetilmanosamina (D-ManNAc) y piruvato en una reacción reversible. A altas concentraciones de D-ManNAc y piruvato, se puede desplazar el equilibrio a la síntesis de Neu5Ac. Acoplado a una actividad de la

glucosamina 2-epimerasa, se utilizó Neu5Ac liasa de *E. coli* fue para la producción a gran escala de Neu5Ac a partir de D-GlcNAc (Maru et al., 1998). De manera alternativa, las Neu5Ac sintasas, tales como NeuB, catalizan la condensación de ManNAc en fosfoenol piruvato (PEP) y están directamente involucradas en la biosíntesis de los ácidos siálicos (revisado en Tanner, 2005).

5 Resumen de la invención

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.

10 Un objetivo de la invención es el de proporcionar un método mejorado para la producción el ácido siálico en una planta.

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

i) el cultivo de una planta transgénica, que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) liasa microbiano, la secuencia de nucleótidos ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta, y

15 ii) la expresión de la secuencia de nucleótidos que sintetiza por lo tanto al ácido siálico.

Adicionalmente, después de la etapa de crecimiento, se puede recuperar el ácido siálico 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 la planta incluye además una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una epimerasa, una CMP-Neu5Ac sintasa, o un transportador de CMP-Neu5Ac, operativamente enlazado a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta, y la segunda secuencia de nucleótidos es coexpresada 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 describió anteriormente, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica Neu5Ac sintasa, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una de la epimerasa, CMP-Neu5Ac sintasa, o el transportador de CMP-Neu5Ac, o tanto la secuencia de nucleótidos, como 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 de una planta, o una semilla, que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica la Neu5Ac liasa microbiana operativamente enlazada con una región reguladora que es activa en la planta. La planta, la célula de la planta o la semilla pueden contener además una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una epimerasa, una CMP-Neu5Ac sintasa, un transportador de CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, operativamente enlazadas 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 La presente invención incluye una planta, una célula de una planta, o una semilla, que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica Neu5Ac liase microbiana operativamente enlazada con una región reguladora que es activa en la planta. La planta, la célula de la planta o la semilla pueden contener además una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una epimerasa, una CMP-Neu5Ac sintasa, un transportador de CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, operativamente enlazados a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta. Adicionalmente, la secuencia de nucleótidos que codifica Neu5Ac liasa, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más entre la epimerasa, CMP-Neu5Ac sintasa, o el transportador de CMP-Neu5Ac, o tanto la secuencia de nucleótidos, como la segunda secuencia de nucleótidos está optimizada por el codón para la expresión dentro de la planta, la célula de la planta, o la semilla.

40 Como se describe en este documento, la expresión en plantas de enzimas que sintetizan Neu5Ac, Neu5Ac liasa y NeuB2, resulta en la acumulación de enzimas funcionales dentro de tejidos de la planta. Las enzimas que sintetizan Neu5Ac, pueden ser expresadas en cualquier planta, por ejemplo, pero sin limitarse a tabaco y *Medicago sativa* (alfalfa), el cultivo de leguminosas perennes que se beneficia de una serie de ventajas agronómicas para las aplicaciones de agricultura molecular (Busse et al., 2001).

50

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:

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- La Figura 1a muestra un análisis de transferencias tipo Western de proteínas solubles extraídas a partir de células BY2 de tabaco de tipo silvestre (línea 1) o transgénicas que expresan la Neu5Ac liasa - FLAG (línea 2) utilizando anticuerpos anti-FLAG. La 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 BY2 de tabaco, que expresan la Neu5Ac liasa, sin (Figura 1b) o con Neu5Ac (Figura 1c). La Figura 1d muestra un perfil de GC de monosacáridos citosólicos de células BY2 de tabaco que expresan la Neu5Ac liasa alimentadas durante 48 h a 37°C con Neu5Ac exógena 10 mM. La Figura 1e y la Figura 1f muestran los espectros de masas de impacto de electrones del pico 1 (Figura 1e), y de los picos 2 y 3 (Figura 1f) detectados en el perfil (Figura 1c). Se indican los iones del fragmento principal de los derivados de 1-O-metil persililo de D-ManNAc.
- La Figura 2a y la Figura 2b muestran perfiles 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 BY2 de tabaco, que expresan la Neu5Ac liasa, sin (Figura 2a) o con (Figura 2b) D-ManNAc y piruvato. La Figura 2c muestra un espectro de masas de impacto de electrones del pico que aparece en el perfil (Figura 2b). Se indican los iones del fragmento principal de derivados de 1-O-metil metilester persililo del ácido N-acetilneuramínico.
- La Figura 3a muestra un análisis de transferencias tipo Western de proteínas citosólicas extraídas a partir de células BY2 de tabaco de tipo silvestre (línea 1) o transgénicas que expresan la NeuBZ-FLAG (línea 2) utilizando anticuerpos anti-FLAG. La Figura 3b y la Figura 3c muestran perfiles de cromatografía de gases de los productos finales obtenidos después de la incubación a pH 8 y 37°C de las proteínas solubles, extraídas a partir de hojas de plantas de alfalfa que expresan la NeuB2, sin (Figura 3b) o con (Figura 3c) D-ManNAc y PEP. La Figura 3d muestra un espectro de masas de impacto de electrones del pico que aparece en el perfil (Figura 3c). Se indican los iones del fragmento principal de derivados de 1-O-metil metilester persililo del ácido N-acetilneuramínico.

Descripción detallada

- 30
- 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 realización preferida.

- 35
- La presente invención proporciona un método para la síntesis del ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) dentro de plantas. La Neu5Ac liasa cataboliza ácidos siálicos en bacterias por medio de la catálisis de la escisión de Neu5Ac en ManNAc y piruvato en una reacción reversible. Como esta reacción es reversible, se puede utilizar la Neu5Ac liasa para la síntesis de Neu5Ac en presencia de los precursores apropiados.

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

- 40
- i) el cultivo de una planta transgénica, que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) liasa microbiano, la secuencia de nucleótidos ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta, y
- ii) la expresión de la secuencia de nucleótidos que sintetiza por lo tanto al ácido siálico.

El Neu5Ac así producido puede ser recuperado a partir de la planta y utilizado para la sialilación de las proteínas *in vitro*, utilizando procesos conocidos en el arte. De manera alternativa, el Neu5Ac puede ser utilizado como un sustrato endógeno para la sialilación de una proteína de interés que es coexpresada dentro de la planta.

- 45
- 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 coexpresión dentro de la planta de una o más de una secuencia adicional de nucleótidos que codifica una o más de una epimerasa, una CMP-Neu5Ac sintasa, y un transportador de CMP-Neu5Ac. Por ejemplo, ManNAc puede ser sintetizado por medio de la expresión dentro de una planta, UDP-GlcNAc 2-epimerasa, por ejemplo una UDP-GlcNAc 2-epimerasa bacteriana, o una epimerasa de otras fuentes, que convierten UDP-GlcNAc endógena en ManNAc. De manera alternativa, se puede producir
- 50
- ManNAc-6-fosfato, seguido por la hidrólisis con una fosfatasa. Con este enfoque se expresa GlcNAc-6-fosfato 2-

epimerasa, por ejemplo una GlcNAc-B-fosfato 2-epimerasa bacteriana, o una UDP-GlcNAc 2-epimerasa/Man-NAc quinasa de mamífero dentro de una planta. Por medio de la coexpresión esta segunda secuencia de nucleótidos junto con la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica de la Neu5Ac liasa, se pueden producir niveles incrementados de Neu5Ac. Sin embargo, la necesidad de la coexpresión de una o más de las anteriores secuencias de nucleótidos, puede depender de la planta huésped seleccionada, ya que las actividades endógenas de una o más de estas enzimas pueden estar presentes dentro de la planta.

Para asegurar la sialilación de N-glicanos a partir del ácido siálico citosólico, se pueden coexpresar CMP-Neu5Ac sintasa bacteriana o de mamífero, el transportador del CMP-Neu5Ac de mamífero, galactosiltransferasa de mamífero, (para la adición de lactosa, antes de que el ácido siálico pueda ser transferido a los N-glicanos) y la sialiltransferasa de mamífero dentro de una planta. 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) a través de la CMP-Neu5Ac sintasa, la CMP-Neu5Ac es luego utilizada como un sustrato para la sialilación de una proteína de interés que también se coexpresa dentro de la planta. En este caso, la planta también puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica de una sialiltransferasa. Se ha demostrado la expresión de una sialiltransferasa de mamífero, y CMP-Neu5Ac sintasa de mamífero en plantas (Wee et al., 1998, Misaki, R., et al., 2006).

Sin embargo, la necesidad de coexpresión de una o más de las anteriores secuencias de nucleótidos puede depender de la planta huésped seleccionada, ya que pueden estar presentes actividades endógenas de una o más de estas enzimas dentro de la planta.

En los casos donde las secuencias de nucleótidos se coexpresan dentro de la planta, se pueden introducir cada una de las secuencias deseadas de nucleótidos en la planta, utilizando técnicas de transformación estándar, técnicas de transformación transitorias, o se pueden cruzar dos plantas, cada una expresando una o más de las secuencias de nucleótidos deseadas para obtener una planta que coexpresa la combinación necesaria de secuencias de nucleótidos.

Las secuencias de nucleótidos que codifican Neu5Ac sintasa, epimerasa, CMP-Neu5Ac sintasa, un transportador de CMP-Neu5Ac, 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 bloques de construcción de oligonucleótidos, y su posterior ensamble enzimático, de un gen estructural o fragmento de este con el fin de abordar el uso del codón dentro de las plantas.

Con el fin de optimizar la expresión de la secuencia foránea dentro de una planta, se puede utilizar o alterar la secuencia de nucleótidos, que puede ser una secuencia sintética o de tipo silvestre, según se necesite de tal manera que se produzca la proteína correspondiente, por ejemplo, Neu5Ac liasa, epimerasa, CMP-Neu5Ac sintasa, el transportador de CMP-Neu5Ac, galactosiltransferasa, sialiltransferasa, la proteína de interés, o una combinación de estas, a un nivel superior al que se produciría cuando es codificada por la secuencia de nucleótidos sin modificar. Por ejemplo, que no se debe considerar como limitante, la secuencia puede ser una secuencia sintética, optimizada para el uso del codón dentro de una planta, que comprende al menos aproximadamente 80% de homología con la secuencia de tipo silvestre, según se determina utilizando técnicas de comparación de secuencias, por ejemplo, pero sin limitarse a BLAST (disponible a través del GenBank; utilizando parámetros predeterminados). También se contempla que los fragmentos o porciones de la secuencia que codifica la proteína de interés, o derivados de la misma, que muestran propiedades biológicas útiles, por ejemplo, pero sin limitarse a propiedades antigénicas, puedan expresarse dentro de tejidos vegetales.

Con el fin de maximizar los niveles de expresión y producción de la proteína transgénica de Neu5Ac liasa, epimerasa, CMP-Neu5Ac sintasa, el transportador de CMP-Neu5Ac, galactosiltransferasa, sialiltransferasa, y una proteína de interés, la secuencia del ácido nucleico puede ser examinada y la región de codificación modificada 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 está disponible a partir de varias fuentes incluyendo Murray et al. (Nuc Acids Res. 17: 477 - 498; 1989).

Adicionalmente, la presente invención se refiere a una planta, una célula de una planta, o una semilla, que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica Neu5Ac liasa operativamente enlazada con una región reguladora que es activa en la planta. La planta, célula de una planta, o semilla pueden incluir además una segunda secuencia de nucleótidos que codifica de una o más de una epimerasa, una CMP-Neu5Ac sintasa, un transportador de CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, operativamente enlazados a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta. La secuencia de nucleótidos que codifica Neu5Ac liasa, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una entre la epimerasa, CMP-Neu5Ac sintasa, o un transportador del CMP-Neu5Ac, o tanto la secuencia de nucleótidos como la segunda secuencia de nucleótidos, pueden ser optimizados por el codón para la expresión dentro de la planta, célula de la planta o semilla de la planta.

Por "operativamente enlazada" se entiende, que las secuencias particulares interactúan ya sea directa o indirectamente para llevar a cabo una función prevista, tal como la mediación o modulación de la expresión génica. La interacción de las secuencias operativamente enlazadas puede, por ejemplo, ser mediada por las proteínas que interactúan con las secuencias operativamente enlazadas. Una región reguladora de la transcripción y una secuencia de interés se enlazan operativamente cuando las secuencias se conectan funcionalmente con el fin de permitir la transcripción de la secuencia de interés que va a ser mediada o modulada por la región reguladora transcripcional.

Por el termino "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 estos. Además, el material de la planta puede incluir componentes intracelulares de la planta, componentes extracelulares de la planta, extractos sólidos o líquidos de las plantas, o una combinación de los mismos. Además, el material de la planta puede incluir plantas, células de la planta, tejido, un extracto líquido, o una combinación de los mismos, 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 pueda ser sometido a etapas mínimas de procesamiento como se define más adelante, o un procesamiento más riguroso, incluyendo purificación parcial o sustancial de la proteína utilizando técnicas conocidas comúnmente en el arte, incluyendo, pero sin limitarse a cromatografía, electroforesis y similares.

Por el término "procesamiento mínimo" se entiende material de la planta, por ejemplo, una planta o porción de la misma que contiene 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 incluir, pero no se limita a, rompimiento de las estructuras celulares de la planta, creando así una composición que contiene componentes solubles de la planta, y componentes insolubles de la planta que se pueden separar por ejemplo, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración o una combinación de los mismos. En este sentido, las proteínas secretadas dentro del espacio extracelular de las hojas o de otros tejidos, podrían ser obtenidas fácilmente utilizando vacío o extracción con centrifuga, o se podrían extraer los tejidos bajo presión, pasándolos a través de rodillos o de molienda o similares para comprimir o liberar la proteína dentro del espacio extracelular. Un procesamiento mínimo también podría involucrar la preparación de extractos crudos de proteínas solubles, dado que estas preparaciones tendrían una contaminación insignificante a partir de productos secundarios de la planta. Además, un procesamiento mínimo puede involucrar extracción acuosa de proteínas solubles a partir de hojas, seguido por 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 individuo. 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 puede ser concentrado 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, se introdujeron en plantas Neu5Ac liasa, y Neu5Ac liasa-FLAG (Neu5Ac liasa etiquetada en su terminal C con un epítipo FLAG para permitir la inmunodetección de la proteína recombinante en transformantes). El análisis de transferencias tipo Western, utilizando anticuerpos anti-FLAG, demostró que una proteína de PM_r de 32 kDa estaba presente en las células transformadas (Figura 1a). Adicionalmente, tanto la actividad de la liasa tanto *in vitro* como *in vivo* fue detectable en extractos obtenidos de plantas, o de plantas que expresan ya sea Neu5Ac liasa o Neu5Ac liasa-FLAG. No se detectó actividad de liasa endógena en plantas no transformadas. Sin embargo, se observó la síntesis de Neu5Ac utilizando Neu5Ac liasa producida en forma recombinante, en presencia de D-ManNAc y de piruvato (véase la Figura 2b). Por lo tanto, Neu5Ac liasa expresada en forma recombinante es biológicamente activa *in planta*.

Se introdujeron en plantas Neu5Ac sintasa (por ejemplo, pero sin limitarse a NeuB2) y Neu5Ac sintasa-FLAG (Neu5Ac sintasa etiquetada en su terminal C con un epítipo FLAG para permitir la inmunodetección de la proteína recombinante en transformantes). El análisis de transferencias tipo Western, utilizando anticuerpos anti-FLAG, demostró que una proteína de PM_r de 37 kDa estaba presente en las células transformadas. Tanto la actividad de la sintasa *in vitro* como *in vivo* fue detectable en extractos obtenidos a partir de, o por plantas que expresan ya sea Neu5Ac sintasa o Neu5Ac sintasa-FLAG. No se detectó actividad de sintasa endógena en plantas no transformadas. Sin embargo, se observó la síntesis de Neu5Ac utilizando Neu5Ac sintasa producida en forma recombinante en presencia de D-ManNAc y PEP (véanse las Figuras 3b, 3c). Por lo tanto, la Neu5Ac sintasa expresada en forma recombinante es biológicamente activa *in planta*.

Un "análogo" o "derivado" incluye cualquier sustitución, supresión, o adición a la secuencia de nucleótidos de silenciamiento, siempre y cuando la secuencia de nucleótidos retenga la propiedad de expresión de silenciamiento de un gen o secuencia objetivo, lo que reduce la expresión de una secuencia objetivo, o la reducción de la síntesis o actividad de una proteína codificada por la secuencia objetivo. Por ejemplo, derivados, y análogos de las secuencias

de ácidos nucleicos que típicamente exhiben 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 predeterminados (Programa: blastn; Base de datos: nr; Esperado 10; filtro: complejidad baja; Alineación: por pares; Tamaño de la palabra: 11). Los análogos, o derivados de los mismos, también incluyen aquellas secuencias de nucleótidos que hibridan bajo condiciones estrictas de hibridación (véase Maniatis et al., en *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, páginas 387 - 389, o Ausubel, et al. (eds.), 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, en la página 2.10.3) para cualquiera de las secuencias descritas en este documento, siempre y cuando las secuencias exhiban la propiedad de expresión de silenciamiento de un gen objetivo. Un ejemplo de una de tales condiciones estrictas de hibridación puede ser la hibridación con una sonda apropiada, por ejemplo pero sin limitarse a, una sonda etiquetada con [gama-³²P]dATP durante 16 - 20 h a 65EC en SDS al 7%, EDTA 1 mM, Na₂HPO₄ 0,5 M, pH 7,2. Después del lavado en SDS al 5%, EDTA 1 mM, Na₂HPO₄ 40 mM, pH 7,2 durante 30 min, seguido por el lavado en SDS al 1%, EDTA 1 mM, Na₂HPO₄ 40 mM, pH 7,2 durante 30 min. El lavado en esta solución amortiguadora 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 codificadora de la proteína de un gen, que puede estar compuesta ya sea de ADN o de ARN, o tanto ADN como ARN. Cuando una región reguladora es activa, y en asociación operativa, o enlazada 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 controlar la activación del gen temporal o de desarrollo. Una "región reguladora" incluye elementos promotores, elementos promotores del núcleo que exhiben una actividad promotora basal, elementos que son inducibles en respuesta a un estímulo externo, elementos que median la actividad promotora tales como elementos reguladores negativos o reforzadores 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 reforzadores 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 de codificación.

En el contexto de esta divulgación, el termino "elemento regulador" o "región reguladora" por lo general se refiere a una secuencia de ADN, usualmente, pero no siempre, secuencia arriba (en dirección 5') a la secuencia de codificación de un gen estructural, que controla la expresión de la región codificante proporcionando el reconocimiento para la ARN polimerasa y/o otros factores necesarios para que se inicie la transcripción 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 codificadora de interés. Un ejemplo de un elemento regulador que permite el reconocimiento para ARN polimerasa u otros factores transcripcionales para garantizar el inicio en un sitio particular es un elemento promotor. La mayoría, pero no todos, los elementos promotores eucariotas contienen una caja TATA, una secuencia del ácido nucleico conservada compuesta de los pares de bases 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 más arriba) que modifican la expresión del gen.

Existen varios tipos de regiones reguladoras, incluyendo aquellas que se regulan por desarrollo, inducibles o constitutivas. Una región reguladora que se regula por 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 por desarrollo preferencialmente pueden ser activas dentro de ciertos órganos o tejidos en etapas específicas de desarrollo, también pueden ser activas en una forma regulada por desarrollo, o a un nivel basal en otros órganos o tejidos también dentro de la planta. Ejemplos de regiones reguladoras específicas de tejido, por ejemplo véase una región reguladora específica, que incluye al promotor napina, y al promotor cruciferina (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 ausencia de un inductor, las secuencias de ADN o genes no serán transcritos. Por lo general, el factor de la 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 parte del 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 de una planta 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 medio de atomización, riego, calentamiento o métodos similares. Los elementos reguladores inducibles se pueden derivar ya sea a partir de genes de planta o que no son de planta (por

ejemplo Gatz, C. y Lenk, I. R. P., 1998, Trends Plant Sci. 3, 352 - 358). Los ejemplos de promotores potenciales inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor inducible de tetraciclina (Gatz, C., 1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 89 - 108), un promotor inducible de esteroides (Aoyama, T. y Chua, N. H., 1997, Plant J. 2, 397 - 404) y un promotor inducible de 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 (Brandstatter, I. y Kieber, J. J., 1998, Plant Cell 10, 1009 - 1019; Kakimoto, T., 1996, Science 274, 982 - 985) y el elemento inducible de 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. Los ejemplos de elementos reguladores constitutivos conocidos incluyen promotores asociados con el transcripto 35S del CaMV. (Odell et al., 1985, Nature, 313: 810 - 812), los genes de la actina 1 del arroz (Zhang et al., 1991, Plant Cell, 3: 1155 - 1165), de la actina 2 (An et al., 1996, Plant J., 10: 107 - 121), o tms 2 (patente de los Estados Unidos No. 5.428.147), y triosafosfato 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 el control de la región reguladora constitutiva se expresa al mismo nivel en todos los tipos de células, sino que el gen se expresa en un amplio rango de tipos de células incluso aunque se observa con frecuencia una variación en abundancia.

Las una o más secuencias de nucleótidos descritas aquí se pueden expresar en cualquier huésped de planta apropiada que es transformada por la secuencia de nucleótidos, o constructos, o vectores descritos aquí. Los ejemplos de huéspedes apropiados incluyen, pero no se limitan a, cultivos agrícolas 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 de una planta, o una semilla que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica de la Neu5Ac liasa operativamente enlazada con una región reguladora que es activa en la planta. Adicionalmente, la planta, la célula de la planta o la semilla pueden incluir una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una entre epimerasa, una CMP-Neu5Ac sintasa, un transportador de CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, operativamente enlazada a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta.

Los uno o más constructos genéticos quiméricos de la presente invención pueden incluir además 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 rastros del ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. Las señales de poliadenilación comúnmente se reconocen por medio de la presencia de homología con la forma canónica 5'-AATAAA-3' aunque las variaciones no son inusuales. Una o más de los constructos genéticos quiméricos de la presente invención también pueden incluir otros reforzadores, ya sea reforzadores de traducción o transcripción, según se requiera. Estas regiones reforzadoras son bien conocidas por aquellos ordinariamente capacitados en el arte, 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 de codificación para garantizar la traducción de la secuencia completa.

Los ejemplos no limitantes de regiones 3' adecuadas son las regiones no traducidas 3' transcritas que contienen una señal de poliadenilación de los genes del plásmido que inducen 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 de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (ssRUBISCO).

Para ayudar en la identificación de células de la planta transformadas, los constructos pueden ser manipulados adicionalmente para incluir marcadores seleccionables de la planta. Los marcadores seleccionables útiles incluyen enzimas que proporcionan resistencia a productos químicos tales como un antibiótico, por ejemplo, gentamicina, higromicina, Kanamicina, o herbicidas tales como fosfinotricina, glifosato, clorosulfurona, y similares. De forma similar, se pueden utilizar las enzimas que permiten la producción de un compuesto identificable por medio del cambio de color tales como GUS (beta-glucuronidasa), o luminiscencia, tales como luciferasa o GFP.

También se consideran parte de esta invención las plantas transgénicas, células de las plantas o semillas que contienen el constructo del gen quimérico de la presente invención. Los métodos de regeneración de plantas enteras a partir de las células de la planta también son conocidos en el arte. En general, las células transformadas de la planta se cultivan en un medio común apropiado, que puede contener agentes selectivos tales como antibióticos, donde los marcadores genéticos se usan para facilitar la identificación de células de la planta transformada. Una vez que se forma el callo, se puede fomentar la formación de brotes mediante el empleo de las apropiadas hormonas vegetales adecuadas de acuerdo con métodos conocidos y se transfieren los brotes al medio de enraizamiento para la regeneración de las plantas. Las plantas pueden ser luego utilizadas para establecer generaciones repetitivas, ya

sea a partir de semillas o utilizando técnicas de propagación vegetativa. Las plantas transgénicas también pueden ser generadas sin el uso de cultivos de tejido.

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

10 Los métodos para expresión transitoria, transformación, y regeneración de estos organismos se encuentran establecidos en el arte y son conocidos por alguien ordinariamente capacitado en el arte. El método de obtención de las plantas transformadas y regeneradas no es crítico para la presente invención.

15 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 un constructo quimérico a un huésped puede ser heredable y la transferencia de información genética considerada estable, o la transferencia pueden ser transitoria y la transferencia de la información genética no es heredable. La presente invención incluye además un vector apropiado que comprende el constructo del gen quimérico adecuado para ser usado ya sea con sistemas de expresión estable o transitoria.

20 Los constructos de la presente invención se pueden introducir en las células de la planta utilizando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus de la planta, transformación directa del ADN, microinyección, electroporación, etc. Para la revisión de tales técnicas véase por ejemplo Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, Nueva York VIII, páginas 421 - 463 (1988); Geierson y Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed. (1988); y Miki y Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. En *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, D. H. Turpin, D. D. Lefebvre, D. B. Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd., Londres, páginas 561 - 579 (1997). Otros métodos incluyen absorción directa del ADN, el uso de liposomas, electroporación, por ejemplo utilizando protoplastos, microinyección, microproyectiles o mezcladores, e infiltración al vacío. Véase, por ejemplo, Bilang, 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), Neuhaus 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 y Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler y Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu y Lomonosoff (*J Virol Meth.* 105: 343 - 348, 2002.), patentes de los Estados Unidos Nos. 4.945.050; 5.036.006; y 5.100.792.

35 Como se describe a continuación, los métodos de expresión transitoria pueden ser utilizados para expresar los constructos de la presente invención (véase Liu y Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105: 343 - 348). Estos métodos pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, un método de Agroinoculación o Agroinfiltración, sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos transitorios como se señaló anteriormente. Ya sea con Agroinoculación o Agroinfiltración, una mezcla de Agrobacterias que incluyen al ácido nucleico deseado ingresa a los espacios intercelulares del tejido, por ejemplo las hojas, la porción aérea de la planta (incluyendo el tallo, las hojas y las flores), otra porción de la planta (tallo, raíz, flor), o la planta completa. Después de atravesar la epidermis las Agrobacterias infectan y las copias del ADN-t de transferencia en las células. El ADN-t se transcribe en forma episomal y se traduce el ARNm, lo que conduce a la producción de la proteína de interés en las células infectadas, sin embargo, el paso del ADN-t dentro del núcleo es transitorio.

45 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 va a ser expresada 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 del mismo para piensos, alimentos, o tanto para uso como piensos o como alimentos. Una secuencia de nucleótidos, o una región codificante de interés también pueden incluir un gen que codifica una proteína farmacéuticamente activa, por ejemplo factores de crecimiento, reguladores de crecimiento, anticuerpos, antígenos, y fragmentos de estos, o sus derivados útiles para inmunización o vacunación y similares. Tales proteínas incluyen, pero no se limitan a, interleuquinas, por ejemplo una o más entre IL-1 a IL-24, IL-26 y IL-27, citoquinas, Eritropoyetina (EPO), insulina, G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF o combinaciones de estas, interferones, por ejemplo, interferón alfa, interferón beta, interferón gama, factores de coagulación de la sangre, por ejemplo, Factor VIII, Factor IX, o tPA hGH, receptores, agonistas del receptor, anticuerpos, neuropolipéptidos, insulina, vacunas, factores de crecimiento por ejemplo pero sin limitarse al factor de crecimiento epidérmico, al factor de crecimiento de queratinocito, al factor de crecimiento de transformación, reguladores de crecimiento, antígenos, autoantígenos, fragmentos de estos, o combinaciones de los mismos.

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

- 5 La región codificante de interés o la secuencia de nucleótidos de interés se pueden expresar en cualquier huésped de planta apropiado que sea o bien transformado o que incluya las secuencias de nucleótidos, o moléculas de ácido nucleico, o constructos genéticos, o vectores de la presente invención. Los ejemplos de huéspedes apropiados incluyen, pero no se limitan a, *Arabidopsis*, cultivos agrícolas incluyendo por ejemplo canola, *Brassica* spp., maíz, tabaco, alfalfa, patatas, ginseng, guisantes, avena, arroz, soja, trigo, cebada, girasol, y algodón.
- 10 La síntesis del ácido siálico, por ejemplo, la síntesis de Neu5Ac, en plantas se demostró mediante la expresión de Neu5Ac liasa o Neu5Ac sintasa recombinantes. La Neu5Ac liasa de *E. coli* y NeuB2 de *C. jejuni* fueron cada una expresadas en el citosol de células BY2 de tabaco, plantas de alfalfa por medio de transformación mediada por *Agrobacterium*, o cuando se expresa de forma transitoria en células de la planta. No se observó degradación de las proteínas recombinantes indicando que estas enzimas son estables en este compartimiento. La Neu5Ac liasa expresada en células BY2 fue capaz de catalizar la escisión de Neu5Ac en D-ManNAc y piruvato en una reacción reversible. La síntesis de Neu5Ac en presencia del piruvato y de ManNAc también se observó. La Neu5Ac liasa era biológicamente activa a pH 7 y sobre un rango de 25 - 37°C que es consistente tanto con el pH del citosol de la planta como con la temperatura de los cultivos más importantes. Adicionalmente, los experimentos de alimentación llevados a cabo en presencia de Neu5Ac exógena demostraron que la enzima era funcional en la planta.
- 15
- 20 La Neu5Ac sintasa, NeuB2 a partir de *C. jejuni*, cuando se expresa en células BY2 de tabaco se observó que sintetiza 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 Neu5Ac liasa microbiana o Neu5Ac sintasa en plantas resulta en la producción en el citosol de enzimas capaces de sintetizar Neu5Ac.

- 25 Una epimerasa capaz de convertir la GlcNAc endógena en ManNAc, puede ser coexpresada en las plantas con el fin de suplir la Neu5Ac liasa o Neu5Ac sintasa con el sustrato apropiado de aminoazúcar. En este sentido, la expresión de una CMP-Neu5Ac sintasa funcional y del transportador de CMP-Neu5Ac en células BY2 de tabaco ha sido reportada (Misaki et al., 2006). Mediante la coexpresión de CMPNeu5Ac sintasa, del transportador de CMP-Neu5Ac, o tanto de CMP-Neu5Ac sintasa como del transportador de CMP-Neu5Ac, junto con NeuB2, se puede mejorar la producción de Neu5Ac. La síntesis de N-acetilmanosamina (ManNAc) dentro de una planta se puede lograr a través de diferentes métodos. Por ejemplo, se puede sintetizar ManNAc 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 mediante la expresión de una GlcNAc-2 epimerasa a partir de otras fuentes. De manera alternativa, se puede formar ManNAc-6-fosfato, seguido por hidrólisis con una fosfatasa (en plantas transgénicas). Con este enfoque GlcNAc-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.
- 30
- 35

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

La presente invención será ilustrada además en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Métodos

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

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

- 50 Los genes de Neu5Ac liasa y *neuB2* fueron amplificados por PCR. El gen para Neu5Ac liasa fue amplificado a partir 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).

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

neuB2-P1:

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

neuB2-P2:

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

- 10 Estos ADN 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 Neu5Ac liasa y el vector del plásmido binario pCAMBIA 2300 para el gen de *neuB2*, respectivamente. El casete de expresión del promotor 35S de CaMV, Neu5Ac liasa, y el terminador de 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.

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

Liasa-FLAG-P1:

5'- CGGGGTACCAGAGAGATGGCAACGAATTTACGTGGC-3' (SEQ ID NO: 2),

- 20 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:

- 25 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 durante 1 min, hibridación durante 1 min a 58°C, y polimerización a 72°C durante 3 min. Los productos de la PCR se clonaron en pCR®-BLUNT II-TOPO® (Invitrogen). Antes de expresar las proteínas recombinantes en células de la planta, confirmamos todos los constructos de ADNc modificados por secuenciación.

- 30 Posteriormente, se digirieron los insertos con KpnI y SacI y luego se clonaron en pBLTI 121 digerido con KpnI-SacI. Cada vector (pBLTI 121 o pCAMBIA 2300) fue introducido en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* a través de transformación por choque térmico.

Expresión en células BY2

- 35 Las células BY2 de tabaco se mantuvieron en medio de Murashige y Skoog (1962) y utilizadas para la transformación. Los constructos derivados de pBLTI121 fueron transferidos en *Agrobacterium* (LBA4404) (Hofgen y Willmitzer, 1988). Las células transgénicas de *Agrobacterium* fueron seleccionadas en medio YEB que contiene 100 µg.mL⁻¹ de kanamicina y se utilizaron para transformar las células cultivadas en suspensión de tabaco como se describe en Gomord et al. (1998). Los transformantes fueron seleccionados y mantenidos en medio MS que contiene antibióticos (Kanamicina a razón de 100 ug.mL⁻¹ y cefotaxima a razón de 250 ug.mL⁻¹). Se prepararon ARNm y ADN genómicos de cada transformante, y se confirmó que los genes opuestos fueron insertados y expresados en células
- 40 de tabaco cultivadas en suspensión por PCR y RT-PCR. 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

- 5 La transformación de la alfalfa se realizó esencialmente como se describe en Tian et al., (Tian et al., 2002) con las siguientes modificaciones. Se transformó el genotipo R2336 de la alfalfa utilizando *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. La etapa de cocultivo se realizó con un cultivo sin diluir con una OD de 0,8 a 1, y se utilizó sacarosa al 3% en el medio Sh2k en lugar de sacarosa al 1,5%.

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

- 10 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 recolectados y fraccionados en Solución A (solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM (pH = 7,4) que contenía inhibidores de proteinasa (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pepstatina, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de E64 y PMSF 1 mM, Sigma). Los extractos celulares luego fueron centrifugados a 10000 g durante 10 min a 4°C y se precipitaron las proteínas con sulfato de amonio (concentración final del 80%) y luego se las sometió a diálisis contra Solución B (solución amortiguadora Tris- HCl 100 mM, pH = 7,4 para los ensayos de Neu5Ac liasa o pH = 8,5 para los ensayos de NeuB2 y MgCl_2 10 mM) con una membrana Spectra/Por® (corte de 10000 Da). Las proteínas luego fueron utilizadas para ensayos de enzimas o inmunodetecciones.

Inmunodetección de Neu5AC liasa-FLAG y NeuB2-FLAG

- 20 Las proteínas fueron solubilizadas en una solución amortiguadora desnaturante (Tris-HCl 20 mM pH 6,8, β -mercaptoetanol al 0,3%, glicerol al 5% (v/v) y SDS al 1% (p/v)), ebuló durante 5 min y se separó por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%. Las proteínas luego fueron transferidas sobre una membrana de nitrocelulosa. Para la inmunodetección, las membranas se probaron con un antisuero de conejo producido contra el epítipo FLAG. Las proteínas se detectaron por incubación con anticuerpos anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante seguido por revelado utilizando 4-cloronaftol o por medio de una reacción de quimioluminiscencia.

Ensayos de Neu5Ac liasa y sintasa

- 25 Las actividades de enzima soluble fueron analizadas mediante la incubación de extractos celulares con PEP 4 mM, NADH 4 mM, NaHCO_3 20 mM y DTE 10 mM. La oxidación de NADH fue medida por medio de una disminución de la absorbancia a 340 nm después de 10 min. La actividad de Neu5Ac liasa fue analizada por medio de la medición de la formación de ManNAc después de la incubación de extractos celulares de transformantes con Neu5Ac. Los extractos celulares fueron incubados 2 h a 37°C en Solución B (solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM, pH = 7,4 y MgCl_2 10 mM) que contenía inhibidores de proteinasa (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pepstatina, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de E64 y PMSF 1 mM) y Neu5Ac 40 mM. La actividad de sintasa de Neu5Ac liasa fue analizada por medio de 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 2 h a 37°C en Solución B (solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM, pH = 7,4 y MgCl_2 10 mM) que contenía inhibidores de proteinasa (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pepstatina, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de E64 y PMSF 1 mM) y ManNAc 20 mM y piruvato 40 mM. La actividad de sintasa de NeuB2 fue analizada por medio de 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 (solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM, pH = 7,4 y MgCl_2 10 mM) que contenía inhibidores de proteinasa (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pepstatina, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de E64 y PMSF 1 mM) y ManNAc 10 mM y PEP 10 mM. Las reacciones se detuvieron por calentamiento durante 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 por GC-EI-MS.

Experimentos de alimentación

- 45 Se incubaron células BY2 de tabaco de cuatro días en medio BY2 durante dos días a 37°C con Neu5Ac 10 mM o ManNAc 30 mM para ensayar la actividad de Neu5Ac liasa o sintasa *in vivo* respectivamente. Después de 2 días, se lavaron las células BY2 con medio BY2 sin Neu5Ac o ManNAc y se recolectaron. Se calentaron las células a 70°C durante 15 min en etanol al 70% para inactivar las enzimas y luego se molieron en un homogenizador de alfarero. Se lavó el homogenizado dos veces con etanol al 70% a 70°C. El resto del precipitado y el sobrenadante fueron considerados como representativos de las paredes celulares y los monosacáridos libres citosólicos respectivamente. Los monosacáridos de la fracción sobrenadante fueron luego analizados por cromatografía de gases.

- 50 Análisis de GC

Para los ensayos enzimáticos, se sometieron en primer lugar las mezclas de reacción a una etapa de purificación en

5 cartuchos Seppack C18. Los monosacáridos se eluyeron en 100% de agua. Después de la liofilización, las muestras fueron sometidas a una metanólisis durante 16 h a 80°C con 500 µL de HCl metanólico seco 2 M. Después de la evaporación del metanol, las muestras se volvieron a acetilar, mediante la adición de 20 µL de anhídrido acético anhidro y 20 µL de piridina. Los N-acetil metil glicósidos (éster metílico) resultantes se secaron y luego se convirtieron en sus derivados de TMS y se separaron por cromatografía de gases (GC). El cromatógrafo de gases estaba equipado con un detector de ionización de llama, una columna capilar de sílice fundida WCOT (longitud 25 m, diámetro interno 0,25 mm) con CP-Sil 5CP como fase estacionaria y helio como gas de arrastre. El programa de temperatura del horno fue: 2 min a 120°C, 10°C/min hasta 160°C, y 1,5°C /min hasta 220°C y luego 20°C /min hasta 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

15 Cultivo de *Agrobacterium*. Los clones de *Agrobacterium* que contienen un vector binario portan los constructos deseados de ADN descritos anteriormente se cultivaron durante 24 horas a 28°C en 2 mL de medio YEB o LB que contiene 25 y 50 pg/mL de carbenicilina y kanamicina, respectivamente. Se utilizaron 10 µL de estos cultivos como inóculos iniciales para generar los cultivos de 25 mL de medio de inducción YEB (medio YEB, ácido 2 (N morfolino) etanosulfónico (MES) 10 mM, pH ajustado a 5,6, 25 mg/L de carbenicilina, 50 mg/L de kanamicina, acetosiringona 20 µM). Estos últimos se cultivaron en incubadora con 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.

20 Cultivo de tabaco no transgénico. Se cultivaron plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum* a partir de semillas en un sustrato a base de turba (AgroMix) en un invernadero. Las plántulas inicialmente se desarrollaron en un vivero y después se trasplantaron en 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 iluminación artificial de 20 Watt m⁻² a nivel de la planta. Las plantas se pueden utilizar en las diferentes etapas de crecimiento, pero preferencialmente se seleccionaron entre 5 a 8 semanas de crecimiento.

25 Expresión transitoria de constructos en tabaco. Dos métodos de expresión transitoria se utilizaron en la presente invención: Agroinoculación o Agroinfiltración. En ambos métodos, una mezcla de dos o tres cultivos de *Agrobacterias* que portan el ADN de transferencia (ADN-t) de interés es forzada a entrar en los espacios intercelulares de las hojas. Una vez se cruza la barrera física de la epidermis, las *Agrobacterias* infectan las células vecinas transfiriendo copias del ADN-t dentro de las células de la planta. Con estos métodos, el paso 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 Agroinoculación utiliza una presión aplicada con una jeringa para insertar la mezcla de *Agrobacterias* dentro del tejido de la planta, mientras que la Agroinfiltración utiliza un vacío controlado.

35 El cultivo de *Agrobacterium* preparado como se describió anteriormente se centrifugó durante 8 min a 10 000 g, se resuspendió en el mismo volumen de medio de inoculación (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, ajustado a pH 5,6, y suplementado con acetosiringona 100 µM) y se mantuvo a temperatura ambiente (RT, 23°C) durante 1 h antes de la inoculación. De manera alternativa, la suspensión se puede mantener a 4°C durante 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 los constructos descritos anteriormente, se inoculó una mezcla de dos cepas de *Agrobacterias*. La primera cepa contenía uno de los clones descritos anteriormente y la segunda cepa contenía el supresor HcPro de silenciamiento 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 realizó después de 4 - 8 días.

Preparación de extractos de proteína soluble 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. Se pesó una biomasa de hojas Agroinoculadas o Agroinfiltradas de ~ 0,1 - 1 g y se la utilizó para generar un extracto líquido de proteína total.

50 Se utilizaron varios métodos de extracción para generar los extractos de proteína total: mediante la molienda del tejido vegetal con un mortero y una mano de mortero, utilizando un politrón, o mediante la pulverización en un MixerMill300 (MM300) de Retsch. Se transfirieron 0,1 - 1 g de la biomasa de la planta a un mortero limpio y previamente enfriado. Se añadió solución amortiguadora de extracción fría (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 solución amortiguadora que contenía, CaCl₂ 2 mM y butanol al 4%) a una relación en proporción 1:3 (p/v) así como PMSF y quimostatina hasta concentraciones finales de 1 mM y 10 µM, respectivamente. Las hojas se molieron con una mano de mortero hasta obtener una preparación homogénea. El extracto de la planta, fue luego transferido en un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 20,000 g por 20 min a 4°C. De manera alternativa, se introdujeron 0,1 g de

tejido de la planta con 0,3 mL de solución amortiguadora de extracción en un microtubo no estéril de 1,5 mL. Se añadió una cuenta de tungsteno a cada tubo. La caja fue sometida a un ciclo de agitación de 3 min a 30 Hz. El ciclo fue repetido 2 veces. Los extractos de la planta fueron luego centrifugados como se describió anteriormente. De manera alternativa, se pulverizó 1 g de biomasa con 3 mL de solución amortiguadora de extracción utilizando un politrón.

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

Ejemplo 1

10 Expresión de la Neu5Ac liasa de *E. coli* en células BY2 de tabaco

El gen que codifica la Neu5Ac liasa a partir de *Escherichia coli* K1 (número de acceso: D00067) fue introducido en células BY2 de tabaco. Los callos de BY2 transgénicos fueron generados después de la transformación mediada por *Agrobacterium* con el plásmido pBLT1121 que contenía el gen de Neu5Ac liasa de *E. coli* K1. Se etiquetó otro constructo en su terminal C con un epítipo FLAG para permitir la inmunodetección de la proteína recombinante en transformantes. Se analizaron los niveles de ARNm de los transformantes seleccionados para la resistencia a la kanamicina por RT-PCR. Treinta y seis de los 48 transformantes que expresan el transcripto de Neu5Ac liasa y 30 de 50 transformantes que expresan el transcripto de Neu5Ac liasa-FLAG fueron obtenidos. Los callos que albergan los niveles más altos de expresión de ARNm fueron transferidos en cultivos en suspensión para la caracterización de la actividad de Neu5Ac liasa. La presencia de la Neu5Ac liasa-FLAG se determinó en los extractos citosólicos de la proteína de células BY2 transformadas por medio de análisis de transferencias tipo Western. Se inmunodetectó una sola banda de proteína con un PM aparente de 32 kDa específicamente en las células transformadas utilizando anticuerpos anti-FLAG (Figura 1a).

Se llevaron a cabo los ensayos enzimáticos en extractos de proteína soluble a partir de células BY2 cultivadas en suspensión que expresan la Neu5Ac liasa y Neu5Ac liasa-FLAG. Ambos extractos mostraron una actividad de liasa. Otros análisis se realizaron en extractos de proteína aislados a partir de células que expresan la liasa no etiquetada. Estos extractos fueron primero incubados en 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 incubación de un extracto de proteína de Neu5Ac liasa en ausencia (Figura 1b) o en presencia de Neu5Ac (Figura 1c) a pH 7 y a 37°C. Tres señales (el pico 1, es un hombro de una señal endógena) fueron detectadas claramente cuando el extracto fue incubado con Neu5Ac. Estas señales eluyeron con tiempos de retención similares a aquellos de formas de piranosa (pico 1) y 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 persililo de ManNAcp (Figura 1e) y ManNAcf (Figura 1f). Los iones de diagnóstico con $m/z = 173$ y 186 fueron asignados a los fragmentos que contienen el átomo de nitrógeno, como usualmente se observa para los aminoazúcares.

La incubación de un extracto de proteína citosólica a partir de células BY2 de tabaco de tipo silvestre con Neu5Ac en condiciones similares no dio lugar a ninguna formación de ManNAc (no se muestran los datos), 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 la Neu5Ac liasa de *E. coli* expresó una enzima funcional capaz de escindir Neu5Ac en D-ManNAc.

El pH óptimo de la enzima recombinante se determinó que era aproximadamente de 7, con base en la cuantificación por GC de D-ManNAc generado en los ensayos llevados a cabo en un rango de pH de 4 - 10 (no se muestran los datos). 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 proteína soluble de células transformadas formó 0,5 μ moles de ManNAc a partir de 10 μ moles de Neu5Ac, en 1 h. Por debajo de 15°C, solo se detectó actividad residual.

La capacidad de la Neu5Ac liasa recombinante para sintetizar Neu5Ac se determinó mediante la incubación de extractos de proteínas de células BY2 de tabaco transformadas con D-ManNAc 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 ausencia o en presencia de sustratos respectivamente. Cuando se compara con el perfil control (Figura 2a), el perfil de GC de la reacción llevada a cabo en presencia de D-ManNAc y piruvato mostró una señal con un tiempo de retención esperado 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 con $m/z = 298$ y 420 específicos para la fragmentación de Neu5Ac, así como el ion con $m/z = 186$ asignado al fragmento que contiene nitrógeno. Estos datos indican que la liasa recombinante es capaz de sintetizar Neu5Ac en presencia del D-ManNAc y piruvato.

La actividad *in planta* de la Neu5Ac liasa se determinó mediante la alimentación de células BY2 de tabaco con

Neu5Ac 10 mM. La toxicidad de Neu5Ac en células BY2 de tabaco 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 período de 48 h a temperatura en un rango de 23° C a 37° C. Se detectó D-ManNAc en todos los tratamientos (Figura 1d). La cuantificación de D-ManNAc 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 Neu5Ac liasa es biológicamente activa *in planta* y es capaz de actuar después de un sustrato suministrado exógenamente.

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

10 Neu5Ac sintasa, NeuB2, de *Campylobacter jejuni* (número de acceso: NCO02163) cataliza la formación de Neu5Ac por condensación de D-ManNAc y PEP. Se generaron callos de BY2 transgénicos después de la transformación mediada por *Agrobacterium* con el plásmido pBLT1121 que contenía el ADNc de *neuB2*. Para la inmunodetección de la proteína, se etiquetó un segundo constructo en su extremo terminal C con un epítopo FLAG. Los transformantes seleccionados por la resistencia a la kanamicina fueron analizados por los niveles de ARNm por medio de RT-PCR.

15 Los callos que albergan los niveles más altos de expresión de ARNm fueron transferidos en cultivos en suspensión para análisis. La acumulación de NeuB en las células BY2 transformadas, fue luego determinada por medio de análisis de transferencias tipo Western de un extracto soluble de proteína 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 única banda de proteína con PM = 37 kDa consistente con el peso molecular esperado de la sintasa. *neuB2* también fue introducido en las plantas de alfalfa, mediante transformación mediada por *Agrobacterium* y la regeneración *in vitro* de las plantas (Tian et al., 2002). De 34 plantas transformadas, se demostró que 29 expresan el transcripto de *neuB2*.

25 Antes del análisis de las células transformadas y de las plantas que expresan la Neu5Ac sintasa bacteriana, se investigó la presencia de actividad endógena de la Neu5Ac sintasa. Los extractos de proteína soluble tanto de células BY2 de tabaco de tipo silvestre como de plantas de alfalfa fueron incubados con D-ManNAc y PEP. Los monosacáridos formados en los ensayos se separaron por medio de GC y se caracterizaron por medio de GC-EI MS. No se detectó ningún pico o iones de diagnóstico EI MS asignados a Neu5Ac, lo que indica que las plantas no expresan enzimas endógenas capaces de formar Neu5Ac por condensación de PEP sobre D-ManNAc.

30 La actividad sintasa del NeuB2 recombinante expresado en plantas se determinó por medio de la incubación de D-ManNAc y PEP con extractos de proteína soluble aislados de células BY2 de tabaco o de 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) D-ManNAc y PEP a pH = 8 y 37°C. Un pico que eluyó al tiempo de retención esperado para Neu5Ac, fue específicamente detectado 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 con m/z = 298 y 420. Aquellos iones no fueron detectados en el espectro de EI-MS de la región correspondiente del perfil de GC después de la incubación en ausencia de D-ManNAc (Figura 3b).

Se obtuvo el mismo resultado, mediante el análisis de células BY2 de tabaco que expresan la secuencia de NeuB2 o de NeuB2-FLAG.

40 Por lo tanto, la expresión de *neuB2* tanto en células BY2 de tabaco como en plantas de alfalfa resulta en la producción de una Neu5Ac sintasa funcional.

Referencias

- Angatta, T. and Varki, A. (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev.*, 102, 439 - 469.
- 45 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) Immunoreactivity in mammals of two typical plant glycoepitopes, core- α (1,3)-fucose and core-xylose. *Glycobiology*, 13, 427 - 434.
- 50 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., Levee, 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 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.
- 15 Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fitchette-Laine, A.-C., Gomord, V. and Faye, L. (1998) N-glycoprotein biosynthesis: recent development and future trends. *Plant Mol. Biol.*, 38, 31 - 48.
- 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-acetylneuraminidase. *Carbohydr. Res.*, 306, 575 - 578.
- 20 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.
- 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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 $\beta(1,3)$ -fucose residues. *Plant Biotech. J.*, 2, 279 - 287.
- Séveno, M., Bardor, M., Paccalet, T., Gomord, V., Lerouge, P. and Faye, L. (2004) Glycoprotein sialylation in plants? *Nature Biotech.* 22, 5 - 6.
- 40 Strohmaier, H., Remler, P., Renner, W. and Högner, 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 primarily at the transcriptional level in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 177, 4488 - 4500.
- 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.

Tanner, M. E. (2005) The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg. Chem.*, 33, 216 - 228.

- 5 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Medicago Inc. Centre National De La Recherche Scientifique Universite De Rouen

<120> Síntesis de Ácido Siálico En Plantas

- 10 <130> v8905026WO

<140> PCT/CA2007/000197

<141> 2007-02-09

<150> 60/743.267

<151> 2006-02-09

- 15 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

- 20 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido de la secuencia de Flag

<400> 1

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

- 25 <210> 2

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

- 30 <223> cebador Liase-FLAG-P1

<400> 2

cggggtacca gagagatggc aacgaattta cgtggc 36

<210> 3

<211> 60

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> cebador Liasa -FLAG-P2

<400> 3

gccgagctct cacttgcat cgcatcctt gtaatccatc ccgcgctctt gcatcaactg 60

<210> 4

10 <211> 38

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador neuB2-P1

15 <220>

<223> cebador neuB2-FLAG-P1

<400> 4

cggggtacca gagagatgaa aaaaacttta atcatcgc 38

<210> 5

20 <211> 60

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador neuB2-FLAG-P2

25 <400> 5

gccgagctct cacttgcat cgcatcctt gtaatccatc tcacgga- taa gctcatcttc 60

<210> 6

<211> 37

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador Liasa-P1

<400> 6

aataggccat tacggccatg gcaacgaatt tacgtgg 37

5 <210> 7

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador Liasa-P2

<400> 7

aataggccga ggcggcctca cccgcgctct tgcac 35

<210> 8

<211> 35

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador neuB2-P1

<400> 8

20 aataggccat tacggccatg aaaaaaactt taatc 35

<210> 9

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> cebador neuB2-P2

<400> 9

aataggccga ggcggcctta ctcacggata agctc 35

REIVINDICACIONES

1. Un método para sintetizar el ácido siálico que comprende,
 - 5 i) el cultivo de una planta transgénica, que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) liasa microbiano, la secuencia de nucleótidos ligada operativamente con una región reguladora que es activa en la planta, y
 - ii) la expresión de la secuencia de nucleótidos que sintetiza por lo tanto al ácido siálico.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido siálico es Neu5Ac, y en donde después de la etapa de expresión, la Neu5Ac se recupera a partir de la planta transgénica.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la región reguladora se selecciona del grupo que consiste de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido, y un promotor de desarrollo.
- 15 4. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la planta transgénica comprende además una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una epimerasa, una CMP-Neu5Ac sintasa, o un transportador de CMP-Neu5Ac, operativamente enlazados a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta transgénica, y la segunda secuencia de nucleótidos se coexpresa junto con la expresión de la secuencia de nucleótidos.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la segunda región reguladora se selecciona del grupo que consiste de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido, y un promotor de desarrollo.
- 20 6. El método de la reivindicación 4 o 5, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la Neu5Ac liasa, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una entre la epimerasa, la CMP-Neu5Ac sintasa, o el transportador de CPM-Neu5Ac, o tanto la secuencia de nucleótidos, como la segunda secuencia de nucleótidos es optimizada por el codón para expresión dentro de la planta.
7. Un método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la planta transgénica es transformada en forma transitoria.
- 25 8. Una planta, una célula de una planta, o una semilla, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una Neu5Ac sintasa microbiana operativamente enlazada con una región reguladora que es activa en la planta.
9. La planta, la célula de la planta o la semilla de la reivindicación 8, que comprende además una segunda secuencia de nucleótidos que codifica de una o más de una epimerasa, una CMP-Neu5Ac sintasa, un transportador de CMP-Neu5Ac, una galactosiltransferasa, y una sialiltransferasa, operativamente enlazadas a una o más de una segunda región reguladora activa dentro de la planta, célula de la planta, o la semilla.
- 30 10. La planta, la célula de la planta o la semilla de la reivindicación 9, en donde la primera y la segunda regiones reguladoras se seleccionan del grupo que consiste de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor específico de tejido, y un promotor de desarrollo.
- 35 11. La planta, célula de la planta o la semilla de la reivindicación 9 o 10, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la Neu5Ac liasa, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica una o más de una epimerasa, CMP-Neu5Ac sintasa, o un transportador de CMP-Neu5Ac, o tanto la secuencia de nucleótidos, como la segunda secuencia de nucleótidos es optimizada por el codón para la expresión dentro de la planta, célula de la planta, o la semilla.

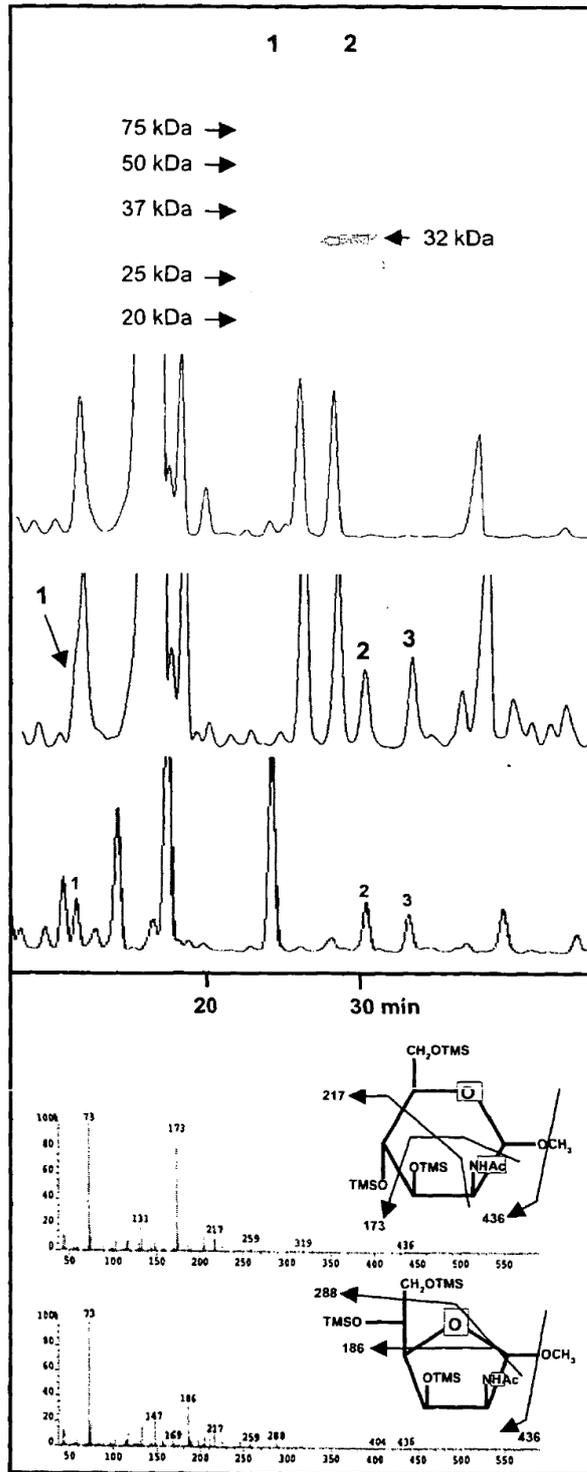


Figura 1a

Figura 1b

Figura 1c

Figura 1d

Figura 1e

Figura 1f

Figura 1

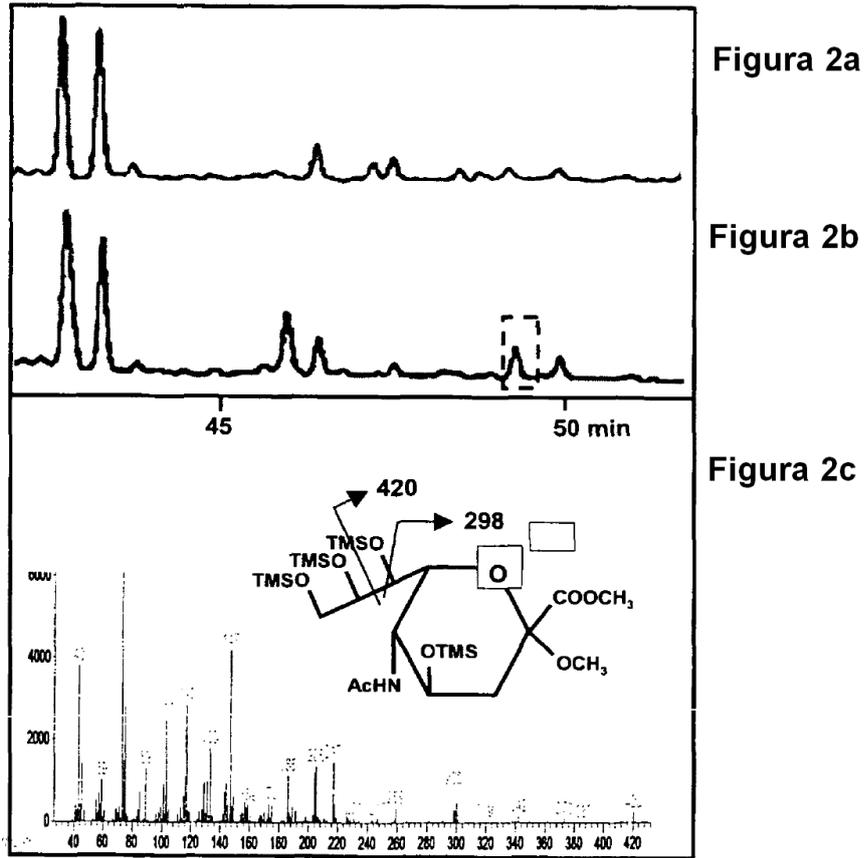


Figura 2

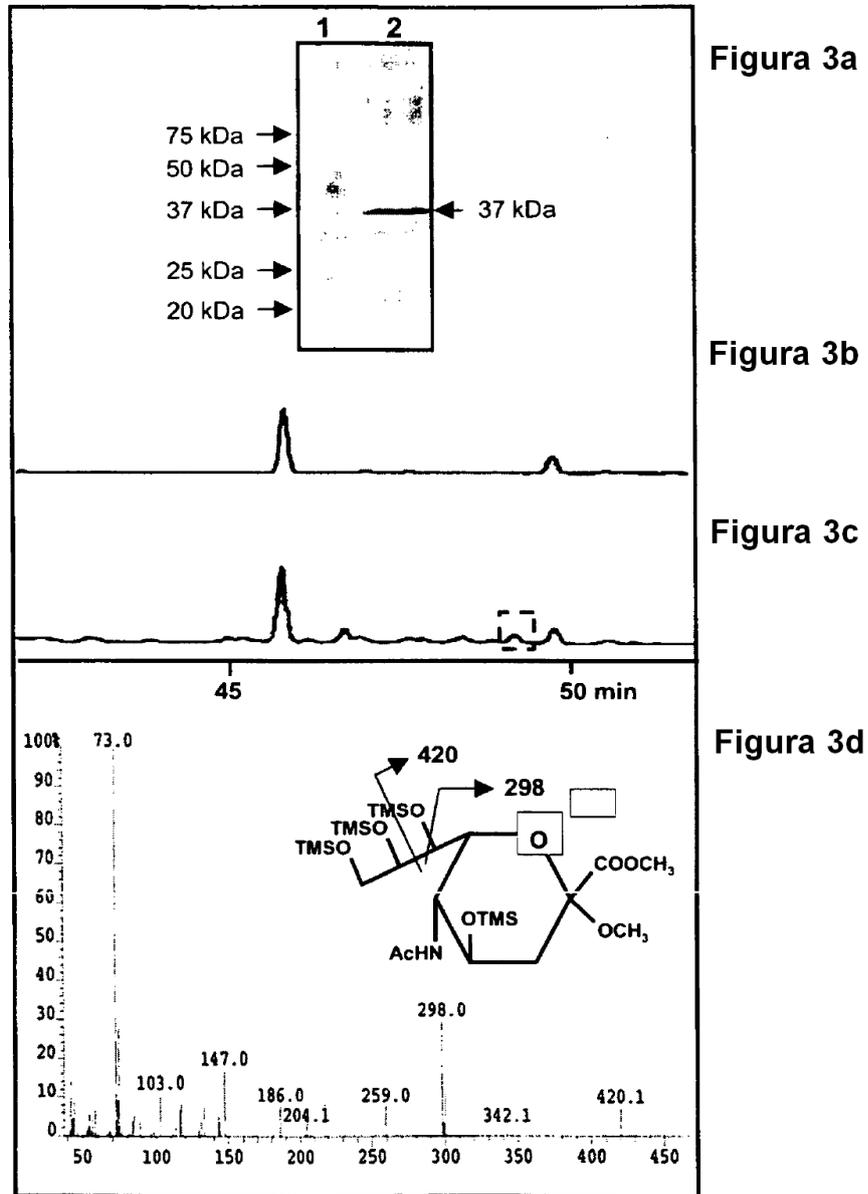


Figura 3