(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 467 155**

(51) Int. CI.:

C12N 9/08	(2006.01)	***C07K 14/81***	(2006.01)
C12N 9/36	(2006.01)	***C12N 9/24***	(2006.01)
A23L 1/10	(2006.01)	***C12N 9/00***	(2006.01)
A23L 1/185	(2006.01)		
A23L 1/30	(2006.01)		
C07K 14/485	(2006.01)		
C07K 14/79	(2006.01)		
C12N 15/82	(2006.01)		
A23L 1/305	(2006.01)		
C07K 14/65	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2002 E 02719020 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 1367908**

(54) Título: **Expresión de proteínas de leche humana en plantas transgénicas**

(30) Prioridad:

14.02.2001 US 269199 P
02.05.2001 US 847232

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2014

(73) Titular/es:

VENTRIA BIOSCIENCE (100.0%)
4110 NORTH FREEWAY BOULEVARD
SACRAMENTO, CA 95834-1219, US

(72) Inventor/es:

HUANG, NING;
RODRIGUEZ, RAYMOND, L. y
HAGIE, FRANK, E.

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Expresión de proteínas de leche humana en plantas transgénicas

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de proteínas de leche humana producidas en las semillas de plantas transgénicas, a extractos de semillas que contienen las proteínas, a plantas y semillas transgénicas y a métodos para producir y usar las mismas.

Referencias

En el presente documento se citan las siguientes referencias.

Alber y Kawasaki, *Mol. and Appl. Genet* 1: 419-434,1982.

Aniansson, G. *et al.* (1990). "Anti-Adhesive Activity Of Human Casein Against Streptococcus Pneumoniae And Haemophilus Influenzae," *Microb Pathog,* 8(5): 315-323.

Amold R. R. *et al*., *Infect Immun.* 28*: 893-898,*1980.

Ausubel F. M. *et al.,* CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y., 1993.

Bhan, M. K. *et al., J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7: 208-213,1988.

Beatty, K., *et a*l., "Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin," *J. Biol. Chem.* 255: 3931-3934, 1980.

Boesman-Finkelstein M. y Finkelstein R. A. *FEBS Letters,* 144: 1-5, 1982.

Bradford M. *Analytical Biochem.* 72: 248-254, 1976.

Brandt, *et al., Carisberg Res. Commun.* 50: 333-345,1985.

Briggs, D. *et al.* (1981). MaltIng And Brewing Science - Volume 1, Malt And Sweet Wort (Chapman & Hall, Nueva York, 2ª edición).

Briggs, D (1998). Malts And Malting (Blackie Academic And Professional, Nueva York).

Bullen JJ. *et al., Br. Med. J.* 1, 69-75,1972.

Carrell, R. W. *et al.* "Structure and varíation of human alpha-1-antitrypsin", *Natura* 298: 329-334, 1983.

Castañón M. J. *et al., Gene,* 66: 223-234, 1988.

Chandan R. C., *J Dairy Sci,* 51: 606-607,1968.

Chong, D. K. y Langrídge, W. H., *Transgenic Res* 9: 7.1-8, 2000.

Chowanadisai, W. y Lönnerdal, B., "Alpha-1-antitrypsin and antichymotrypsin in human milk: origin, concentrations, and stability", *Am. J. Clin. Nutr.* 2001 (en prensa).

Chrispeels K., *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 42: 21-53, 1991.

Ciark *et al., J. Biol. Chem.* 264: 17544-17550,1989.

Davidson LA, *et al.* (1987). "Persistence Of Human Milk Proteins In The Breast-Fed Infant", *Act Pediatric Scand* 76(5): 733-740.

Davidson, L. A., y Lönnerdal, B. "Fecal alpha-1-antitrypsin in breast-fed infants is derived from human milk and is not indicative of enteric protein loss", *Acta Paediatr. Scand.* 79: 137-141,1990.

della-Cioppa *et al., Plant Physiol.* 84: 965-968, 1987.

Dellaporta S. L. *et al., Plant Mol. Biol.* Rep. 1: 19-21, 1983.

Depicker *et al., Mol. Appl. Genet* 1: 561-573,1982.

Dewey K. G. *et al., J Pediatrics* 126: 696-702,1995.

Dewey K. G. *et al., Pediatrics* 89: 1035-1041,1992.

Dewey K. G. *et al.*, *Am J Clin Nutr* 57: 140-145,1993.

Ditta *et al., Proc. Nat. Acad. Sci, EE.UU.* 77: 7347-7351,1980.

Doncheck, J (1995). *Malts And Malting.* En: Kirk-Othmer Encyclopedia Of Chemical Technology (John Wiley & Sons, Nueva York, 4ª edición), volumen 15, páginas 947-962.

Eley, E, (1990), *A Wandful World.* Food Processing agosto 1990, páginas 17-18

Faure A. y Jollès P., *et al., Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L Academie des Sciences. D: Sciences Naturelles,* 271: 1916-1918, 1970.

Fujihara T. y Hayashi K., *Archives of Virology* 140: 1469-1472,1995.

Gastañaduy, A. *et al., J Pediatr Gastroenterol Nutr* 11: 240-6,1990.

Gelvin, S. B. *et al.,* eds. PLANT MOLECULAR BIOLOGY MANUAL, 1990.

Gielen, *et al., EMBO J* 3: 835-846, 1984.

Goto, F *et al., Nature Biotech.* 17: 282-286,1999.

Grover M. *et al., Acta* Paediatrica 86: 315-316,1997.

Hamosh, M, *et al.* (1999). "Protective Function Of Human Milk: The Fat Globule," *Semin Perinatol* 23(3): 242-9.

Harmsen M. C. *et al., Journal of Infectious Diseases* 172: 380-388, 1995.

Hickenbottom, JW (1977). *Sweeteners In Biscuits And Crackers.* The Bakers Digest, diciembre 1977, páginas 18-22.

Hickenbottom, JW (1983). AIB Research Department Technical Bulletin, V(3), marzo 1983, páginas 1-8.

Hickenbottom, JW (1996). *Processing, Types, And Uses Of Barley Matt Extracts And Syrups.* Cereal Foods World 41(10): 778-790.

Hickenbottom JW (1997). *Malts In Baking.* American Society Of Bakery Engineers, Boletín Técnico Nº 238, agosto 1997, páginas 1010-1013.

Huang N. *et al., Plant Mol. Biol.*, 23: 737-747, 1993.

Hough, JS, *et al.* (1982).). Malting And Brewing Science - volumen 2, Hopped Wort And Beer (Chapman & Hall, Nueva York, 2ª edición).

Huang N. *et al., J CAASS,* 1:73-86, 1990a.

Horvath H. *et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA,* 97: 1914-1919,2000.

Humphreys, D. P. y Glover, D. J. "Therapeutic antibody production technologies: molecules, applications, expression and purification," *Curr Opin Drug Discov Devel* Mar; 4(2): 172-85, 2001.

Huang N. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 14: 655-668, 1990b.

Huang, J., *et al.,* "Expression and purification of functional human alpha-1-antitrypsin from cultured plant cells", *Biotechnol. Prog*. 17: 126-133, 2001.

Jensen L. G. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 93: 3487-3491, 1996.

Jigami Y. *et al., Gene,* 43: 273-279,1986.

Johnson, T. "Human alpha-1-proteinase inhibitor", *Methods Enzymol.* 80: 756-757, 1981.

Jollès P., LYSOZYMES-MODEL ENZYMES IN BIOCHEMISTRY AND BIOLOGY. Birkhäuser Verlag, Basel; Boston, 1996.

Jouanin *et al., Mol. Gen. Genet* 201: 370-374, 1985.

Kortt A. A. *et al.,* "Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cáncer targeting", *Biomol Eng* 18: 95-108, 2001.

Kovar M. G. *et al., Pediatrics* 74: 615-638,1984.

Kunz C. *et al., Clin. Perinatol.* 26(2): 307-33, 1999.

Lake, C, (1988). *From Strength To Strength.* Food Flavorings, Ingredients, Packaging And Processing, febrero 1988, páginas 55 -57.

Langridge *et al. Planta* 156: 166-170, 1982.

Larrick, J. W. *et al.,* "Production of antibodies in transgenic plants", *Res Immunol* 149: 603-8, 1998.

Lásztity, R. The chemistry of cereal proteins. CRC Press, Boca Ratón, 1996.

Lee-Huang S. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 96: 2678-2681, 1999.

Lindberg, T. "Protease inhibitors in human milk", *Pediatr. Res.* 13: 969-972, 1979.

Lollike K. *et al., Leukemia,* 9: 206-209, 1995a.

Lönnerdal B., *Am L Clin Nutr,* 42: 1299-1317,1985.

Lönnerdal, B. "Recombinant milk proteins- an opportunity and a challenge", *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 622S-626S, 1996.

Maga E. *et al., J. of Food Protection,* 61: 52-56,1998.

Maga E. *et al., Transgenic Research,* 3: 36-42,1994.

Maga E. *et al., Journal of Dairy Science, 78: 2645-2652,*1995.

Maniatis, *et al.,* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Edición, 1989.

Matsumoto, A. *et al., Plant Mol Bio* 27: 1163-72, 1995.

Maynard, J. y Georgiou, G. Antibody engineering, Annu Rev Biomed Eng 2: 339-76, 2000.

McBride y Summerfelt, *Plant Mol. Biol.* 14: 269-276,1990.

McGilligan, K. M, *et al.,* (1987), "Alpha-1-Antitrypsin Concentraron In Human Milk," *Pediatr Res* 22(3): 268-270.

Mitra A. y Zhang Z., *Plant Physiol.* 106: 977-981,1994.

McGilligan, K. M. *et al.,* "Alpha-1-Antitrypsin concentración in human milk," *Pediatr. Res.* 22: 268-270, 1987.

Mitra, A, y Zhang, Z., *Plant Physiol* 106: 977-81, 1994.

Moe, T, *et al.* (1995). *Mashing Of Rice With Barley Malt Under Non-Conventional Process Conditions For Use In Food Processes.* International Journal Of food Science And Technology 29: 635-649.

Moore, K (1978). "Rice-Barley Malt Combo Improves Functionality And Nutrition Of Meats, Breads, And Baked Goods", *Food Product Development* 12(5): 74.

Moreira-Ludewig, R. y Healy, C, *J. Pharm. and Tox.Meth.,* 27: 75-100, 1992.

Motil K. J., *Curr Opin Pediatr* 12(5): 469-76, 2000.

Murphy MS (1998). "Growth Factors And The Gastrointestinal Tract", *Nutrition* 14(10): 771-4.

Nakajima H. *et al., Plant Cell Reports,* 16: 674-679,1997.

Newburg, DS (1999). "Human Milk Glycoconjugates That Inhibit Pathogens", *Curr Med Chem* 6(2): 117-127.

Newburg, DS, *et al.* (1998). "Role Of Human-Milk Lactadherin In Protection Against Symptomatic Rotavirus Infection", *Lancet* 351 (1910): 1160-4.

NIH publication, American Academy of Allergy and Immunology Committee on adverse reaction to food and National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, 1984.

Peeters, K., *et al.,* "Production of antibodies and antibody fragments in plants", *Vaccine* 9: 2756-61,2001.

Peterson JA, *et al.* (1998). "Glycoproteins Of The Human Milk Fat Globule In The Protection Of The Breast-Fed Infant Against Infections", *Bio Neonate* 74(2): 143-162.

Piper, D. W. y Fenton, B. H. "pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance", *Gut* 6: 506-508,1965.

Prosser, CG (1996). "Insulin-Like Growth Factors In Milk And Mammary Gland," *J Mammary Gland Bio Neoplasia* (3):

297-306.

Raikhel N., *Plant Phys.* 100: 1627-1632,1992.

Rey, M. W., *Nucleic Acid Res.* 18:5288, 1990.

Romer *et al.*, *Biochem. Biophys. Res Commun.* 196: 1414-1421, 1993.

Rudloff, S. and Lönnerdal, B. "Solubility and digestibility of milk proteins in infant formulas exposed to different heat treatments", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 15: 25-33, 1992.

Saarinen K. M. *et al., Adv Exp Med Biol* 478: 121-30, 2000.

Salmon V. *et al.*, *Protein Expression and purification* 9: 203-210, 1997.

Salmon, V. *et al.,* Protein Expr Purif 13: 127-135, 1998.

Samaranayake Y. H. *et al.*, *Apmis,* 105: 875-883,1997.

Sambrook J. *et al.,* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Segunda Edición), Cold Spring arbor Press, Plainview, N. Y, 1989.

Satue-Gracia M. T. *et al., J Agric Food Chem* 48(10): 4984-90, 2000.

Schütte H. y Kula M. R., *Biotechnology and Applied Biochemistry,* 12: 599-620, 1990.

Sfat, M, *et al* (1981). *Malts And Malting.* In: Kirk-Othmer Encyclopedia Of Chemical Technology (John Wiley & Sons, Nueva York, 3ª edición), volumen 14, páginas 810-823.

Shah *et al., Science* 233: 478-481, 1986.

Shin, K, *et al.* (2000). "PCR Cloning And Baculovirus Expression Of Human Lactoperoxidase And Myeloperoxidase", *Biochem Biophys Res Commun* 27(13): 831-836.

Shugar D., *Biochim. Biophys. Acta,* 8: 680-68, 1952.

Symbicon AB (1995). "Human Milk Kappa-Casein And Inhibition Of Helicobacter pylori Adhesión To Human Gastric Mucosa", *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21(3): 288-296.

Takai I. *et al., J. Chrom. B, Biomedical Applications,* 685: 21-25, 1996.

Tsuchiya K. *et al., Applied Microbiology and Biotechnology,* 38: 109-114,1992.

Von Heijne *et al., Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126, 1991.

Wang C. S. y Kloer H. U., *Anal. Biochem.,* 139: 224-227, 1984.

Wang C. *et al., Comp. Biochem. Physiol.* 78B: 575-580, 1984.

Ward P. P. *et al., Bio/technology* 10: 784-789,1992.

Ye X. *et al., Science* 287: 303-305, 2000.

Yoshimura K. *et al., Biochem. Biophys Res Com,* 150: 794-801, 1988.

Antecedentes de la invención

Se sabe que las proteínas de la leche tales como lactoferrina (LF), lisozima (LZ), lactoperoxidasa (LP), inmunoglobulina A (IgA), alfa lactalbúmina, beta lactoglobulina, alfa, beta y kappa caseínas, seroalbúmina, lipasa y otras tienen una cantidad de efectos nutricionales y otros beneficios particularmente para lactantes. La alimentación materna de leche humana fresca se ha considerado tradicionalmente como el mejor medio para proporcionar nutrición a un bebé. Aunque no se han aclarado todas las funciones fisiológicas de las proteínas de la leche humana, se han obtenido pruebas de que la lisozima, lactoferrina y otras proteínas de la leche controlan la microflora en el intestino de los niños (Lönnerdal, 1985). Se ha sugerido que la leche materna contiene muchos factores inmunitarios que compensan los mecanismos de defensa no desarrollados del intestino de los lactantes (Saarinen KM *et al.,* 2000). Se ha demostrado que diversas proteínas de leche humana poseen efectos fisiológicos beneficiosos en lactantes, particularmente en la defensa contra infecciones y en la optimización de captación de nutrientes.

Sin embargo, surgen muchas situaciones en las que los lactantes no pueden alimentarse de leche materna y se usan fórmulas lácteas infantiles sintéticas en lugar de alimentación materna (Motil KJ, 2000). Se han realizado

esfuerzos considerables para mejorar fórmulas de leche sintéticas para simular estrechamente la leche humana.

La composición proteica y no proteica de la leche humana y de la leche de vaca se describe en Kunz *et al.,* 1999. Las concentraciones relativas de las proteínas de la leche varían entre la leche humana y de vaca. Por ejemplo, la lactoferrina y lisozima están presentes en una cantidad relativamente alta en la leche humana pero solo en pequeñas cantidades o trazas en la leche de vaca.

En general, las fórmulas infantiles sintéticas se preparan usando la leche de vaca que no se asemeja mucho a la composición proteica encontrada en la leche humana. Por consiguiente, las fórmulas infantiles basadas en leche de vaca se complementan típicamente con diversos componentes proteicos de leche humana. Típicamente, las fórmulas para lactantes comerciales basadas en leche de vaca contienen aproximadamente 0,1 mg/ml de lactoferrina mientras que la leche materna humana natural contiene una concentración media de 1,4 mg/ml. Las fórmulas para lactantes basadas en soja no contienen lactoferrina añadida.

Aunque se ha propuesto la adición de proteínas de leche humana recombinante a la leche para lactantes o preparados lácteos para lactantes, por ejemplo, usando vacas transgénicas o añadiendo proteínas lácteas humanas producidas por microbios a la leche o a fórmulas lácteas, estas estrategias no superan los diversos problemas de (i) alergias a la leche de vaca (ii) el elevado coste de la producción de proteínas recombinantes y/o (iii) cuestiones de seguridad relacionados con productos alimenticios.

Sería por tanto deseable proporcionar una fórmula infantil derivada de plantas que tuviese niveles beneficiosos de una o más proteínas normalmente presentes en leche humana, a la vez evitando en gran medida las técnicas de producción de proteínas recombinantes y los problemas de seguridad asociados. Más generalmente, sería deseable proporcionar un extracto nutricional de alimentos que pueda obtenerse fácilmente y de manera asequible en grandes cantidades, que pudiese suministrarse individualmente, como un nutraceútico o añadirse a alimentos procesados, para suministrar una o más proteínas lácteas humanas beneficiosas para la salud humana.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a

1. Una semilla de arroz transgénica madura o una planta transformada de manera estable con un gen quimérico que tiene

    (i) una secuencia de ADN líder que codifica una secuencia transitoria específica de semilla monocotiledónea capaz de dirigir un polipéptido unido a un orgánulo de célula endospermo unido operativamente a una región transcripcional reguladora de un gen de una monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semilla, en el que dicha región reguladora transcripcional y dicha secuencia de ADN líder unida operativamente se representa en la SEC ID Nº: 15 o 16; y

    (ii) una secuencia codificante de proteína optimizada por codones que codifica una proteína normalmente presente en leche humana.

2. La semilla del punto 1, en el que la proteína de leche humana se selecciona del grupo que consiste en lactoferrina, lisozima, lactoferricina, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa y alfa-1-antitripsina.

3. La semilla del punto 2, en el que la proteína de leche humana se selecciona del grupo que consiste en lisozima, lactoferrina, alfa-1-antitripsina, y kappa caseína.

4. La semilla del punto 2 o 3, en el que la proteína de leche humana es lactoferrina o lisozima.

5. Un método de producción de una proteína de leche humana recombinante en semillas de plantas de arroz que comprende las etapas de:

    (a) obtener una planta de arroz transformada de manera estable con un gen quimérico que tiene

        (i) una secuencia de ADN líder que codifique una secuencia transitoria específica de semilla monocotiledónea capaz de dirigir un polipéptido unido a un orgánulo de célula de endospermo unido operativamente a una región reguladora transcripcional de un gen de una monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semillas, en el que dicha región reguladora transcripcional y secuencia de ADN líder unida operativamente se representa en la SEC ID Nº: 15 o 16; y

        (ii) una secuencia codificante de proteína optimizada por codones que codifica una proteína normalmente presente en leche humana;

    (b) cultivar la planta en condiciones de maduración de semillas;

    (c) cosechar las semillas de la planta cultivada; y

(d) extraer de las semillas recogidas una harina, extracto o composición de malta que contenga la proteína de leche humana en forma no purificada.

6. El método del punto 5, en el que la planta monocotiledónea transformada comprende adicionalmente un ácido nucleico que codifica al menos un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en Reb, O2 y PBF, y un fragmento activo del mismo.

7. El método del punto 6, en el que el factor de transcripción es O2 y/o PBF.

8. El método de uno cualquiera de los puntos 5 a 7, en el que la secuencia codificante de proteínas es la secuencia codificante de una proteína de leche humana seleccionada del grupo que consiste en lactoferrina, lisozima, lactoferricina, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa, alfa-1-antitripsina e inmunoglobulinas.

9. El método del punto 8, en el que la secuencia codificante de proteína se selecciona del grupo de secuencias optimizadas por codones identificadas por las SEC ID Nº: 1, 3 y 7-14.

En un aspecto, se describe en el presento documento un alimento nutricionalmente mejorado que tiene uno o más ingredientes alimenticios derivados de plantas, y como aditivo, una composición de semillas que contiene una harina, extracto o malta obtenido de semillas de monocotiledóneas maduras y una o más proteínas de leche humana producidas por semillas sustancialmente en forma no purificada. La proteína o proteínas producidas por semillas incluyen lactoferrina, lisozima, lactoferricina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento insulínico 1, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa y/o alfa-1-antitripsina, preferentemente al menos lisozima y/o lactoferrina.

La composición de semillas comprende preferentemente entre el 0,1 al 20 % del peso sólido total del alimento. La proteína o proteínas de leche humana producidas por semillas se presentan preferentemente en una cantidad que es al menos el 50 % de la cantidad de la proteína o proteínas en leche humana, en una base de peso/peso.

El alimento puede ser un preparado para lactantes, en forma deshidratada o líquida. Las proteínas de leche incluyen al menos lisozima y lactoferrina, y la composición de semillas contiene un extracto de semillas o malta obtenido de semillas maduras de arroz o cebada. La lisozima está presente preferentemente en una cantidad entre 0,03 a 0,3 g proteína/litro de preparado, y lactoferrina, en una cantidad entre 0,3 y 3 g proteína/litro[2].

En otro aspecto, se describe en el presente documento una composición de semillas monocotiledóneas ingerible que contiene una harina, extracto o malta obtenido de semillas monocotiledóneas maduras y una o más proteínas de la leche humana producidas por semillas en forma sustancialmente no purificada. Como se ha indicado anteriormente, la proteína o proteínas producidas por semillas preferentemente incluyen lactoferrina y/o lisozima, pero como alternativa o además, incluye lactoferricina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento insulínico 1, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa, IgA y alfa-1-antitripsina. La o las una o más proteínas de la leche están en el extracto de composición en una cantidad mayor a 1 mg/g por peso seco de extracto.

La harina puede prepararse moliendo semillas de monocotiledóneas maduras; el extracto, suspendiendo la harina molida en un medio acuoso tamponado; y la malta, (i) empapando semillas de cebada hasta un contenido de agua deseado; (ii) haciendo germinar la cebada empapada, (iii) secando las semillas germinales en condiciones eficaces para detener la germinación; (iv) triturar las semillas secas, (v) opcionalmente, añadir las semillas trituradas de una planta monocotiledónea que no sea cebada (vi) formar una mezcla de las semillas trituradas en agua y (vii) maltear la mezcla de semillas trituradas hasta que se consigue una malta deseada, donde al menos una de las semillas monocotiledóneas de cebada o no cebada contienen tal proteína o proteínas de leche.

También se describe en el presente documento una semilla de monocotiledónea que contiene, en forma extraíble, una o más proteínas normalmente presentes en leche humana, donde la proteína (o proteínas) de leche humana incluyen lactoferrina, lisozima, lactoferricina, EGF, IGF-I, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa, alfa-1-antitripsina, e inmunoglobulinas, preferentemente al menos lactoferrina y/o lisozima. La proteína de la leche preferentemente incluye al menos 0,25 por ciento en peso de la proteína total de las semillas maduras recolectadas.

En un aspecto relacionado, se describe en el presente documento un método de producción de un preparado ingerible a base de semillas. En la realización práctica del método, primero se obtiene una planta monocotiledónea que se ha transformado de manera estable con un primer gen quimérico que tiene (i) una región reguladora transcripcional de un gen de monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semillas, (ii) unido operativamente a dicha región reguladora transcripcional, una secuencia de ADN líder que codifica una secuencia transitoria específica de semillas de monocotiledónea capaz de dirigir un polipéptido unido a un orgánulo de células de endospermo y (iii) una secuencia codificante de proteína que codifica una proteína normalmente presente en leche humana. La planta transformada se cultiva en condiciones de maduración de semillas, y se cosechan las semillas maduras. A partir de las semillas cosechadas se obtiene una harina, extracto o composición de malta que contiene la proteína de leche humana en forma sustancialmente no purificada. La proteína (o proteínas) de leche humana constituyen preferentemente al menos el 0,1 por ciento de la proteína total en las semillas maduras recogidas.

La harina puede prepararse moliendo semillas de monocotiledóneas maduras; el extracto, suspendiendo la harina molida en un medio acuoso tamponado, y la malta, (i) empapando semillas de cebada hasta un contenido de agua deseado, (ii) haciendo germinar la cebada empapada, (iii) secando las semillas germinadas en condiciones eficaces para detener la germinación, (iv) triturando las semillas secas, (v) opcionalmente añadiendo las semillas trituradas de una planta monocotiledónea que no sea de cebada, (vi) formar una mezcla de las semillas trituradas en agua y (vii) maltear la mezcla de semillas molidas hasta que se consiga una malta deseada, donde al menos una de las semillas monocotiledóneas de cebada o no cebada contiene dicha proteína (o proteínas) de la leche.

La planta monocotiledónea obtenida puede transformarse adicionalmente con un segundo gen quimérico que tiene (i) una región reguladora transcripcional de un gen monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semillas, (ii) unido operativamente a dicha región reguladora transcripcional, una secuencia de ADN de tránsito que codifica una secuencia de tránsito específica de semilla de monocotiledónea capaz de dirigirse a un polipéptido unido a un orgánulo de célula de endospermo y (iii) una secuencia codificante de proteína que codifica una proteína normalmente presente en leche materna humana distinta de la codificada por el primer gen quimérico.

En un aspecto relacionado, se describe en el presente documento una planta monocotiledónea transgénica que está transformada establemente con un primer gen quimérico que tiene (i) una región reguladora transcripcional de un gen monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semillas, (ii) unido operativamente a dicha región regulada transcripcional, una secuencia de ADN de tránsito que codifica una secuencia de tránsito específica de semillas de monocotiledónea capaz de dirigir un polipéptido unido a un orgánulo de célula de endospermo y (iii) una secuencia codificante de proteína que codifica una proteína normalmente presente en la leche humana.

Las regiones reguladoras transcripcionales ejemplares en el gen quimérico son del promotor del grupo de genes: glutelinas de arroz, globulinas de arroz, oricinas, y prolaminas, hordeínas de cebada, gliadinas y gluteínas de trigo, ceínas y glutelinas de maíz, glutelinas de avena y cafirinas de sorgo, penisetinas de mijo y genes de secalinas de arroz. La secuencia líder es del mismo modo del grupo de genes: gen seleccionado del grupo de glutelinas de arroz, oricinas, globulinas y prolaminas de arroz, hordeínas de cebada, gliadinas y gluteinas de trigo, ceínas y glutelinas de maíz, glutelinas de avena y cafirinas de sorgo, penisetinas de mijo y genes de secalinas de arroz.

Preferentemente, la región reguladora transcripcional en el gen quimérico es un promotor Gt1 de glutelina de arroz, y la secuencia de ADN líder es una secuencia señal Gt1 de glutelina de arroz capaz de dirigir un polipéptido unido a un cuerpo de almacenamiento de proteína. Se incluyen un promotor Gt1 de glutelina ejemplar y una secuencia señal Gt1 de glutelina dentro de la secuencia identificada por la SEC ID Nº: 15. En otra realización preferida, la región reguladora transcripcional en el gen quimérico es un promotor Glb de globulina de arroz y la secuencia de ADN líder es una secuencia señal Gt1 de glutelina de arroz capaz de dirigir un polipéptido unido a un cuerpo de almacenamiento de proteína. Se incluyen un promotor Glb de globulina ejemplar y una secuencia de señal Gt1 de glutelina con la secuencia identificada por la SEC ID Nº: 16.

La semilla de monocotiledónea transformada puede codificar adicionalmente al menos un factor de transcripción O2, PBF y Reb, como se ilustra mediante las SEC ID Nº: 31, 32 y 33, respectivamente, y preferentemente O2 y/o PBF.

La secuencia codificante de proteína es la secuencia codificante de una proteína de leche humana seleccionad del grupo que consiste en lactoferrina, lisozima, lactoferricina, EGF, IGF-I, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa, alfa-1-antitripsina e inmunoglobulinas, preferentemente una secuencia que se ha optimizado por codones para expresión en monocotiledóneas. Las secuencias optimizadas por codones ejemplares para estas proteínas se representan por las SEC ID Nº: 1, 3 y 7-14.

La planta puede adicionalmente transformarse de manera estable con un segundo gen quimérico que tiene

(i) una región reguladora transcripcional de un gen de monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semillas, (ii) unido operativamente a dicha región reguladora transcripcional, una secuencia de ADN de tránsito que codifica una secuencia de tránsito específica de semilla monocotiledónea capaz de dirigirse a un polipéptido unido a un orgánulo celular endospermo, y (iii) una secuencia codificante de proteína que codifica una proteína normalmente presente en leche materna humana distinta de la codificada por el primer gen quimérico.

En otro aspecto adicional, se describe en el presente documento un método para formar un jarabe de malta que contiene una o más proteínas de la leche humana. El método incluye las etapas de (i) empapar semillas de cebada hasta un contenido de agua deseado, (ii) germinar la cebada empapada, (iii) secar las semillas germinadas en condiciones eficaces para detener la germinación, (iv) triturar las semillas secas, (v) opcionalmente, añadir las semillas trituradas de una planta monocotiledónea que no es de cebada, (vi) formar una mezcla de las semillas trituradas en agua y (vii) maltear de la mezcla de semillas trituradas hasta que se consiga una malta deseada. Al menos una de las semillas monocotiledóneas de cebada o no cebada se obtienen de plantas que se han transformado establemente con un primer gen quimérico que tiene (i) una región reguladora transcripcional de un gen de monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semillas, (ii) unido operativamente a dicha región reguladora transcripcional, una secuencia de ADN de tránsito que codifica una secuencia de tránsito específica de semilla monocotiledónea capaz de dirigirse a un polipéptido unido a un orgánulo de célula de endospermo y (iii) una secuencia codificante de proteína que codifica una proteína normalmente presente en la

leche materna humana.

Estos y otros objetos y características de la invención serán completamente evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un mapa del la construcción de expresión pAPI159 que contiene la secuencia codificante de lisozima humana bajo el control de un promotor Gt1 y secuencia señal Gt1.

La Figura 2 muestra los resultados de análisis de transferencia de Western para la expresión de la lisozima humana recombinante en diversos tejidos de plantas de arroz, en el que los carriles 1 y 15 son un estándar de lisozima de leche humana; el carril 2 es un marcador de peso molecular de amplio intervalo de Sigma; los carriles 3 y 4 representan extractos tisulares de semilla madura; los carriles 5 y 6 representan extractos de semilla germinada, los carriles 7 y 8 representan extractos de tejido de raíz; los carriles 9 y 10 representan extractos de tejido radicular joven; los carriles 11 y 12 representan extractos foliares; y los carriles 13 y 14 representan extractos de hojas jóvenes, de plantas no transformadas (“NT”) o plantas transgénicas (“T”), respectivamente. La cantidad de proteína de carga total fue 40 μg por carril.

La Figura 3 muestra el efecto de la incubación de lisozima humana recombinante de semilla de arroz transgénica, un estándar de lisozima humana (30 μg/ml), un control (fosfato sódico 20 mM, pH 7,0, EDTA 5 mM) o un extracto de arroz no transformado en el crecimiento de la cepa JM109 de *E. coli*. Al final de la incubación (durante el tiempo indicado), se sembró una alícuota de la mezcla en placas LB y se calcularon las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

La Figura 4 es un gráfico que muestra la actividad específica de lisozima, determinada incubando una concentración idéntica de una lisozima humana convencional, lisozima humana de arroz transgénico (planta) y lisozima de huevo de pollo con una cantidad estándar de *M. luteus,* seguido por evaluación de la reducción de la turbidez debido a la actividad de lisozima durante cinco minutos.

Figura 5A: estabilidad térmica de la lisozima humana (“Lish”) y lisozima humana recombinante de arroz transgénico (“Lishr”). Se disolvió la lisozima a 100 μg/ml en PBS. Las mezclas se sometieron a diferentes temperaturas durante diferentes espacios de tiempo. Al final de cada tratamiento con calor, se evaluó la actividad restante de las lisozimas mediante un ensayo de actividad.

Figura 5B: estabilidad de pH de Lish y Lishr. Se disolvió la lisozima en diferentes tampones a 100 μg/ml. La mezcla se incubó a 37 ºC durante 30 minutos. La actividad de la lisozima se determinó mediante ensayo de actividad.

La Figura 6 representa los resultados de un análisis de expresión de lisozima en granos de arroz transgénico a lo largo de varias generaciones. Las proteínas de 1 g de harina de arroz integral se extrajeron con 40 ml de tampón de extracción que contenía NaCl 0,35 M en PBS. La extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. El homogeneizado se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 ºC. El sobrenadante de proteína se retiró y se diluyó según se necesitase para el ensayo de actividad turbidimétrica de lisozima. La extracción se repitió tres veces y la desviación típica se mostró como una barra de error. El rendimiento de lisozima se expresó como porcentaje de proteína soluble total (% de PST).

La Figura 7 es un mapa de restricción del plásmido pAPI164 que contiene la secuencia codificante de lactoferrina humana bajo el control de un promotor de glutelina de arroz (Gt1), un péptido señal Gt1, un lugar de terminación/poliadenilación de nopalina sintasa (NOS).

La Figura 8 muestra los resultados de un análisis SDS-PAGE para la lactoferrina humana teñida con azul de Coomassie, donde el carril 1 es el marcador de peso molecular; los carriles 2-5 son lactoferrina derivada de la humana purificada (Sigma, EE.UU.); los carriles 6-10 son extractos de semillas sencillas de líneas transgénicas homocigotas y el carril 11 es un extracto de semillas de TP-309 no transformadas.

La Figura 9 muestra los resultados de un análisis de transferencia de Western de diversos tejidos de las plantas de arroz transgénicas, que demuestra la especificidad tisular de la expresión LFr. El carril 1 es el marcador de peso molecular; el carril 2 es lactoferrina humana (Sigma, USA); el carril 3 es un extracto de hoja; el carril 4 es un extracto de vaina; el carril 5 es un extracto de raíz; el carril 6 es un extracto de semilla y el carril 7 es un extracto de semillas germinadas durante 5 días.

La Figura 10 es un diagrama de barras que ilustra el efecto bactericida de lactoferrina humana nativa (“LFHn”) y la lactoferrina humana recombinante("LFHn ") purificada producida por arroz transgénico en el crecimiento de *E. coli* (EPEC) después de tratamiento con pepsina/pancreatina.

La Figura 11 es un gráfico que ilustra la liberación de hierro dependiente de pH por lactoferrina humana nativa (“LFHn”) y lactoferrina humana recombinante ("LFHn") purificada producida por semillas de arroz transgénicas.

La Figura 12 muestra la unión y captación de LFh por células Caco-2 después de digestión *in vitro*. La Figura 12A muestra la determinación de la constante de disociación. La Figura 12B muestra el número de sitios de unión para LFh sobre células Caco-2. La Figura 12C muestra la captación total de LFh y Fe en células Caco-2 a las 24 horas. La Figura 12D muestra la degradación de LFh después de la captación en células Caco determinada por la cantidad de ^{125}I libre en las fracciones celulares.

La Figura 13 muestra tres plásmidos AAT: pAPI255 que contiene el promotor Glb, el péptido de señal Glb, el gen AAT optimizado por codones, el terminador Nos y el gen de resistencia a ampicilina; pAPI250 que contiene el promotor Gt1, el péptido señal Gt1, el gen AAT optimizado por codones, el terminador Nos y un gen de resistencia a ampicilina; y pAPI282 que contiene el promotor Bx7, el péptido señal Bx7, el gen AAT optimizado por codones, el terminador Nos y el gen de resistencia a ampicilina.

La Figura 14 muestra tinción con azul brillante de Coomassie de extracción en fase acuosa de células de arroz transgénico que expresan AAT humano. Los granos de arroz tanto transgénicos como no transformados se molieron con PBS. El extracto resultante se centrifugó a 14.000 rpm a 4 ºC durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se cargó sobre un gel SDS-PAGE prefabricado.

La Figura 15 muestra un análisis de transferencia de Western de AAT humano recombinante de granos de arroz transgénico. El extracto de grano de arroz transgénico se separó por gel de SDS-PAGE y después se realizó la transferencia en un filtro. La identificación de AAT en grano de arroz se realizó mediante anticuerpo anti-AAT por análisis Western.

La Figura 16 muestra la tinción con Coomassie (Figura 16A) y el análisis de transferencia de Western (Figura 16B) de proteína de granos de arroz transgénico que expresan AAT. La actividad de AATr se demostró mediante un ensayo de desplazamiento de banda. Las muestras AAT de diferentes fuentes se incubaron con moles iguales de elastasa pancreática porcina (PPE) a 37 ºC durante 15 minutos. Se preparó un control negativo para un ensayo de cambio de banda con las muestras AAT incubadas con un volumen igual añadido de PPE. El carril M son marcadores de peso molecular. El carril 1a es AAT purificado de plasma humano. El carril 1b es AAT purificado de plasma humano + PPE. El carril 2a es un extracto de proteína que contiene AAT de semilla de arroz transgénico; el carril 2b es un extracto de proteína que contiene AAT de semilla de arroz transgénico + PPE. El carril 3a es un extracto de semilla no transformada. El carril 3b es un extracto de semilla no transformada + PPE. Se observó un cambio de banda en el carril 1b, 2b y 3b en la Figura 16A. En la Figura 16B se confirmó por transferencia de Western que la banda desplazada contenía una entidad AAT.

Las Figuras 17A-C son representaciones esquemáticas de 3 plásmidos que contienen la secuencia codificante Reb bajo el control de 3 promotores diferentes. La Figura 17A muestra el promotor de globulina (Glb), con el gen Reb y el terminador Reb. La Figura 17B muestra el promotor de actina (Act), con el gen Reb y el terminador Reb. La Figura 17C muestra el promotor Reb nativo, con el gen Reb y el terminador Reb.

Las Figuras 18A-B son representaciones esquemáticas de 2 plásmidos que contienen diferentes secuencias codificantes de factores de transcripción bajo el control del promotor de glutelina específico de endospermo de arroz (Gt1). La Figura 18A muestra el plásmido pGT1-BPBF (API286) que contiene el promotor Gt1, el factor de unión de la caja de prolamina de cebada (BPBF), el terminador Nos y el gen de resistencia a kanamicina. La Figura 18B muestra pGT1-PBF (API285) que contiene el promotor Gt1, el factor de unión de la caja de prolamina de maíz (PBF), el terminador Nos y el gen de resistencia a kanamicina.

La Figura 19 ilustra los resultados de un análisis para la expresión de la lisozima humana recombinante en semillas maduras de plantas transgénicas de T_0 derivadas de células progenitoras transformadas con construcciones que contienen el gen de lisozima humana expresado bajo el control del promotor Glb y el gen Reb expresado bajo el control de su propio promotor (“Reb Nativo”). Se analizaron semillas de 30 plantas que contienen los genes Reb y lisozima y semillas de 17 plantas que contienen solo el gen de lisozima para el contenido de lisozima, con veinte semillas individuales de cada planta analizada.

La Figura 20 es una comparación de la secuencia del factor de crecimiento epidérmico (“factor Eg”) optimizado por codones con una secuencia del factor de crecimiento epidérmico nativo (“Gen Nativo”), alineada para mostrar 53 codones en las secuencias maduras, con 27 (51 %) cambios de codones y 30 (19 %) cambios de nucleótidos.

La Figura 21 es un mapa de restricción del plásmido API270 (pGlb-EFG v2.1) de 4.143 pb que muestra un casete de expresión para el factor de crecimiento epidérmico (“EGF”) que contiene el promotor Glb, un péptido de señal Glb, EGF optimizado por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 22 es un mapa de restricción del plásmido API303 (pGt1-EGF v2.1) de 3.877 pb, que muestra un casete de expresión para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y que contiene un promotor Gt1 de arroz, un péptido de señal Gt1, un EGF optimizado por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 23 es un análisis de transferencia de Western del EGF humano recombinante (“EGFhr”) en semillas de arroz transgénico. El carril 1 muestra un intervalo amplio de marcadores de peso molecular. El carril 2 muestra el

EGFhr expresado en levadura, cargado a 125 ng. Los carriles 2 a 6 muestran el EGFhr expresado en diferentes semillas de arroz transgénico. El carril 7 es de semillas de control no transformadas TP 309.

La Figura 24 es una comparación del factor I de crecimiento insulínico optimizado por codones ("Insgfact") con una secuencia del factor I de crecimiento insulínico humano nativo ("Gen Nativo"), alineada para mostrar 70 codones en las secuencias maduras, con 40 (57 %) cambios de codones y 47 (22 %) cambios de nucleótidos.

La Figura 25 es un mapa de restricción del plásmido API304 (pGt1-EFG v2.1) de 3.928 pb que muestra un casete de expresión para el factor I de crecimiento insulínico ("IGF") que contiene un promotor Gt1 de arroz, un péptido de señal Gt1, un IGF optimizado por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 26 es un mapa de restricción del plásmido API271 (pGlb-EGF v2.1) de 4.194 pb, que muestra un casete de expresión para el factor I de crecimiento insulínico ("IGF") y que contiene un promotor Glb de arroz, un péptido de señal Glb, un IGF optimizado por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 27 es un análisis de transferencia de Western de la IGF-I recombinante humana ("rhIGF") expresada en semillas de arroz transgénicas. El carril 1 muestra un amplio intervalo de marcadores de peso molecular. El carril 2 muestra el rhIGF expresado en levadura, cargado a 1 μg. Los carriles 3-9 muestran rhIGF de diferentes semillas transgénicas. El carril 10 es de semillas de control no transformadas TP 309.

La Figura 28 es un mapa de restricción del plásmido, API321 (pGIb-gtlsig-Haptocorrina v 2.1) de 5.250 bp, que muestra un casete de expresión para la haptocorrina y que contiene el promotor Glb, un péptido señal Gt1, una haptocorrina optimizada por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 29 es un mapa de restricción del plásmido, API320 (pGtl-Haptocorrina v 2.1) de 4.948 bp, que muestra un casete de expresión para la haptocorrina, y que contiene el promotor Gt1, un péptido señal Gt1, una haptocorrina optimizada por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 30 es un mapa de restricción del plásmido API292 (pGlb-kcasein v2.1) de 4.468 pb, que muestra un casete de expresión para kappa caseína ("k-casein") y que contiene un promotor Glb, un péptido señal Glb, un gen k-caseína, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 31 es un mapa de restricción del plásmido API297 (pGT1-kappa-Casein v2.1) de 4.204 pb, que muestra un casete de expresión para kappa caseína y que contiene un promotor Gt1, un péptido señal Gt1, un gen que codifica el polipéptido maduro de kappa caseína, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 32 es un mapa de restricción del plásmido API420 (pGt1-LAD) de 4.834 pb, que muestra un casete de expresión para lactadherina y que contiene un promotor Gt1, un péptido señal Gt1, un gen de lactadherina, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 33 es un mapa de restricción del plásmido API418 (pGT1-LPO-S) de 5.634 pb, que muestra un casete de expresión para lactoperoxidasa (menos el propéptido), y que contiene un promotor Gt1, un péptido señal Gt1, un gen lactoperoxidasa sin el propéptido, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a kanamicina.

La Figura 34 es un mapa de restricción del plásmido API416 (pGtl-lactoperoxidase) de 5.801 pb, que muestra un casete de expresión para la lactoperoxidasa humana optimizada por codones y que contiene un promotor Gt1 de arroz, un péptido señal Gt1, una lactoperoxidasa optimizada por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a kanamicina.

La Figura 35 es un mapa de restricción del plásmido API230 (pBX7-Lysozyme V2.1.1) de 4.408 pb, que muestra un casete de expresión para lisozima optimizada por codones y que contiene un promotor BX-7, un péptido señal Gt1, un gen de lisozima optimizado por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

Las Figuras 36A-B representan diagramas esquemáticos del mapa de 2 plásmidos, API254 (Figura 36A) y API264 (Figura 36B) que contienen secuencias codificantes de proteína heteróloga bajo el control del promotor de globulina específico de endospermo de arroz (Glb), el péptido señal Glb y un terminador Nos. API254 contiene las secuencia codificante de lactoferrina, y API264 contiene la secuencia codificante de lisozima humana.

La Figura 37 es un mapa de restricción del plásmido API225 de 4.271 pb, que muestra un casete de expresión para la lisozima optimizada por codones, y que contiene un promotor GT-3, un péptido señal Gt1, una lisozima optimizada por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

La Figura 38 es un mapa de restricción del plásmido API229 de 4.106 pb, que muestra un casete de expresión para la lisozima optimizada por codones, y que contiene un promotor RP-6, un péptido señal Gt1, una lisozima optimizada por codones, un terminador Nos y un marcador de selección de resistencia a ampicilina.

Las Figuras 39A-B son una comparación de la expresión de la lisozima bajo el promotor Gt1 o Glb con un péptido señal Gt1 o un péptido señal Glb. La Figura 39A es una representación esquemática del plásmido API159 que contiene el promotor Gt1, el péptido señal Gt1, un gen de lisozima y un terminador Nos; el plásmido API228 que contiene el promotor Glb, péptido señal Gt1, un gen de lisozima y un terminador Nos; y el plásmido API264 que contiene el promotor Glb, el péptido señal Glb, un gen de lisozima y el terminador Nos. La Figura 39B muestra las actividades de lisozima en semillas positivas a lisozima producidas en plantas de arroz transgénicas transformadas con API159, API228 y API264. Las semillas de líneas múltiples de cada construcción se analizaron mediante el ensayo de actividad de lisozima. Se analizaron semillas individuales de cada planta. Las semillas que carecen de cantidades detectables de lisozima se excluyeron. Las actividades de 20 semillas positivas a lisozima por planta, incluyendo tanto semillas hemicigotas como homocigotas se promediaron. Las actividades promedio se representaron sobre el cuadro.

La Figura 40 muestra el ciclo de expresión de la lisozima humana durante el desarrollo del endospermo en la línea transgénica. Las espículas se recogieron a los 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días después de la polinización ("DAP") y se analizaron mediante un ensayo de actividad de lisozima. Las barras negras eran de 159-1-53-16-1. Las barras en blanco eran de 264-1-92-6-1.

La Figura 41 es un gráfico de barras que compara el nivel de expresión de lisozima en semillas de arroz T1 transgénicas bajo 7 diferentes promotores: Gt1, Glb, Glub-2, Bx7, Gt3, Glub-1 y Rp6. Todos las construcciones contenían un péptido señal Gt1.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos utilizados en el presente documento tienen los significados proporcionados a continuación, y coinciden generalmente con el mismo significado que los términos tienen para aquellos expertos en la técnica de la presente invención. Los expertos pueden dirigirse en particular a Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Segunda Edición), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. y Ausubel FM *et al.* (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y., para definiciones y términos de la técnica. Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar.

El término "polipéptido" se refiere a un compuesto biopolimérico compuesto de una sola cadena de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El término "proteína" como se usa en el presente documento puede ser sinónimo con el término "polipéptido" o puede referirse además, a un complejo de dos o más polipéptidos.

La expresión "proteína antimicrobiana" se refiere a una proteína que es antibacteriana y que incluye proteínas de fase aguda, péptidos antimicrobianos catiónicos y proteínas probióticas. Tales proteínas antimicrobianas son capaces de inhibir el crecimiento de una o más bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas, hongos (incluyendo levaduras), parásitos (incluyendo planarios y nematodos) y virus. Típicamente, dichos péptidos antimicrobianos presentan actividad biológica selectiva contra dichos microbios sobre las células eucariotas.

La expresión "proteína antibacteriana" se refiere a una proteína que es bacteriostática o bactericida por naturaleza.

La expresión "proteína bacteriostática" se refiere a una proteína capaz de inhibir el crecimiento de, pero no capaz de, destruir bacterias.

La expresión "proteína bactericida" se refiere a una proteína capaz de destruir bacterias.

El término "vector" se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para transferir entre diferentes células hospedadoras. Un "vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogo en una célula extraña. Se encuentran disponibles comercialmente muchos vectores de expresión procariota y eucariota. La selección de vectores de expresión apropiados se encuentra dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. Por consiguiente, un "casete de expresión" o "vector de expresión" es una construcción de ácido nucleico generada de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificos que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante puede incorporarse en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plastidial, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la parte del casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico para transcribirse y un promotor.

El término "plásmido" se refiere a una construcción de ADN bicatenaria (bc) circular usada como un vector de clonación, y que forma un elemento genético de autorreplicación extracromosómico en muchas bacterias y en algunos eucariotas.

La expresión "secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de selección" se refiere a una secuencia de nucleótidos capaz de expresión en células de plantas y donde la expresión del marcador de selección confiere a las

células de las plantas que contienen el gen expresado la capacidad de crecer en presencia de un agente selectivo. Como se usa en el presente documento, la expresión “gen Bar” se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de fosfinotricin acetiltransferasa que después de la expresión confiere resistencia al herbicida glufosinato amonio (“Basta”).

Una “región reguladora de la transcripción” o “promotor” se refiere a secuencias de ácido nucleico que ejercen influencia y/o promueven el inicio de la transcripción. Se considera que los promotores incluyen típicamente regiones reguladoras, tales como elementos potenciadores o inductores. El promotor será generalmente apropiado para la célula hospedadora en la cual el gen diana se está expresando. El promotor, en conjunto con otras secuencias de ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional (denominadas también “secuencias de control”), es necesario para expresar cualquier gen dado. En general, las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales incluyen, pero sin limitación, secuencias promotoras, sitios de unión a ribosoma, secuencias de inicio y finalización transcipcional, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras.

“Gen quimérico” o “construcción de ácido nucleico heteróloga”, como se define en el presente documento se refiere a una construcción que se ha introducido en un hospedador y que puede incluir partes de diferentes genes de origen exógeno o autólogo, incluyendo elementos reguladores. Una construcción de gen quimérico para la transformación de plantas/semillas se compone típicamente de una región reguladora transcripcional (promotor) unida operativamente a una secuencia codificante de proteína heteróloga o de una construcción de ácido nucleico heterólogo de marcador de selección, a un gen marcador de selección que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos a las células de planta transformada. Un gen quimérico típico de la presente invención, incluye una región reguladora transcripcional inducible durante el desarrollo de la semilla, una secuencia codificante de proteína, y una secuencia terminadora. Una construcción de gen quimérico también puede incluir una segunda secuencia de ADN que codifica un péptido señal si se desea la secreción de la proteína diana.Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o líder secretor se une operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une operativamente a una secuencia codificante si esto afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los elementos “unidos operativamente”, por ejemplo, potenciadores, no tienen porque estar contiguos. La unión se realiza por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se usan los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El término “gen” significa segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica, que puede o no incluir regiones precediendo y a continuación de la región codificante, por ejemplo, secuencias 5’ no traducidas (5’UTR) o “líder” y secuencias 3’UTR o “trailer”, así como secuencias de intervención (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

La expresión “identidad de secuencia” significa un ácido nucleico o una identidad de secuencia de aminoácido en dos o más secuencias alineadas, alineadas usando un programa de alineación de secuencias. La expresión “% de homología” se usa indistintamente en el presente documento con la expresión “% de identidad” y se refiere al nivel de identidad de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos entre dos o más secuencias alineadas, cuando se alinean usando un programa de alineación de secuencias. Por ejemplo, una homología del 70 % significa lo mismo que una identidad de secuencia del 70 % determinada por un algoritmo definido, y por consiguiente un homólogo de una secuencia dada tiene una identidad de secuencia mayor del 80 % sobre una longitud de una secuencia determinada. Niveles ejemplares de identidad de secuencia incluyen, pero sin limitación, una identidad de secuencia del 80, 85, 90 o 95 % o más con una secuencia dada, por ejemplo, la secuencia codificante para la lactoferrina, como se describe en el presente documento.

Los programas de ordenador ejemplares que pueden usarse para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el conjunto de programas de BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, públicamente disponible en Internet en la web www.ncbi.nlm.gov/BLAST/. Véase también Altschul, S. F. *et al.,* 1990 y Altschul, S. F. *et al.,* 1997.

Las búsquedas de secuencias se realizan típicamente usando el programa BLASTN cuando se evalúa una secuencia de ácido nucleico determinada con respecto a secuencias de ácido nucleico en las secuencias de ADN de GenBank y en otras bases de datos públicas. El programa BLASTX se prefiere para la búsqueda de secuencias de ácido nucleico que se ha introducido en todas las fases de lectura frente a las secuencias de aminoácidos en las Secuencias de Proteína del GenBank y otras bases de datos públicas. Tanto BLASTN como BLASTX se procesan utilizando parámetros por defecto de una penalización de apertura de hueco de 11,0 y una penalización de hueco extendido de 1,0 y utilizan la matriz BLOSUM-62. [Véase, Altschul, *et al.,* 1997].

Un alineamiento preferido de secuencias seleccionadas para determinar el “% de identidad” entre dos o más secuencias, se realiza usando, por ejemplo, el programa CLUSTAL-W en la versión MacVector 6.5, empleado con parámetros por defecto incluyendo una penalización de apertura de hueco de 10,0, una penalización de hueco

extendido de 0,1, y una matriz de similitud BLOSUM 30.

Se considera que una secuencia de ácido nucleico puede “hibridarse selectivamente” con una secuencia de ácido nucleico de referencia si las dos secuencias se hibridan específicamente entre sí en condiciones de hibridación y de lavado de moderadas a alta rigurosidad. Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (Tm) del complejo de unión a ácido nucleico o sonda. Por ejemplo, una “rigurosidad máxima” se produce típicamente aproximadamente una Tm -5 ºC (5 ºC por debajo de la Tm de la sonda); una “alta rigurosidad” se produce aproximadamente de 5-10 º por debajo de la Tm; una “rigurosidad intermedia” a aproximadamente 10-20 º por debajo de la Tm de la sonda, y una “baja rigurosidad” a aproximadamente 20-25 º debajo de la Tm. Funcionalmente, las condiciones de máxima rigurosidad pueden usarse para identificar secuencias que tienen una identidad estricta o casi estricta con la sonda de hibridación; mientras que condiciones de alta rigurosidad se usan para identificar secuencias que tienen aproximadamente una identidad de secuencia del 80 % o más con la sonda.

Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderadas y altas son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo Sambrook *et al,* 1989, Capítulos 9 y 11, y en Ausubel *et al.,* 1993). Un ejemplo de condiciones de rigurosidad elevadas incluye la hibridación a aproximadamente 42 ºC en formamida al 50 %, 5X SSC, 5X de solución de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100 μg/ml de ADN transportador desnaturalizado seguido de lavado dos veces en 2X SSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente y dos veces más en 0,1X SSC y SDS al 0,5 % y 42 ºC.

Como se usa en el presente documento, “recombinante” incluye referencia a una célula o vector, que se ha modificado mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en forma idéntica con la forma nativa (no recombinante) de la célula o que expresa genes nativos que de otra manera se expresan de manera anómala, se expresan de menos o no se expresan en absoluto como resultado de una intervención humana deliberada.

Una célula, tejido u órgano de planta, o una planta en la que se ha introducido una construcción de ácido nucleico heteróloga que comprende la secuencia codificante de una proteína antimicrobiana o péptido se considera transformada, transfectada o transgénica. Una célula o una planta transgénica o transformada también incluye progenie de la célula o planta y progenie producida de un programa de reproducción que emplea dicha planta transgénica como un progenitor en un cruce y que presenta un fenotipo modificado resultante de la presencia de la secuencia codificante para una proteína antimicrobiana. Por tanto, una planta de la invención incluirá cualquier planta que contenga secuencias de ácido nucleico introducidas independientemente de si la secuencia se introdujo en la planta directamente a través de medios de transformación o se introdujo mediante transferencia generacional de una célula progenitora que originalmente recibió la construcción por transformación directa.

La expresión “planta transgénica” se refiere a una planta que tiene incorporadas secuencias de ácido nucleico exógeno, es decir, secuencias de ácido nucleico que no están presentes en la planta o célula de la planta nativa (no transformada). Por tanto, una planta que tiene dentro de sus células o un polinucleótido heterólogo se denomina en el presente documento una "planta transgénica". El polinucleótido heterólogo puede integrarse establemente en el genoma o puede ser extracromosómico. Preferentemente, el polinucleótido de la presente invención se integra establemente en el genoma de tal manera que el polinucleótido pasa a las generaciones sucesivas. El término "transgénico “como se usa en el presente documento no acompaña la alteración del genoma (cromosómica o extracromosómica) por métodos de reproducción de plantas convencionales o por eventos que se producen en la naturaleza tales como fertilización cruzada aleatoria, infección viral no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, trasposición no recombinante o mutación espontánea. “Transgénico” se emplea en el presente documento para incluir cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de planta o planta, cuyo genotipo se ha modificado por la presencia de ácidos nucleicos heterólogos incluyendo aquellos transgénicos alterados inicialmente de este modo así como aquellos creados por cruces sexuales o reproducción asexual de los transgénicos iniciales.

Los términos “transformado”, “establemente transformado” o “transgénico” con referencia a una célula vegetal significa que la célula vegetal tiene una secuencia de ácido nucleico no nativa (heteróloga) integrada en su genoma que se mantiene a lo largo de dos o más generaciones.

El término “expresión” con respecto a una proteína o péptido se refiere al proceso mediante el cual se produce la proteína o péptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción. El término “expresión” puede también usarse con respecto a la generación de ARN a partir de una secuencia de ADN.

El término “introducido” en el contexto de insertar una secuencia de ácido nucleico en una célula, significa “transfección” o “transformación” o “transducción” e incluye la incorporación de una secuencia de ácido nucleico en una célula eucariota o procariota donde la secuencia de ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido, ADN mitocondrial), convirtiéndose en un replicón autónomo, o expresándose transitoriamente (por ejemplo, ARNm transfectado).

Por “célula hospedadora” se entiende una célula que contiene un vector y que soporta la replicación y/o transcripción o transcripción y traducción (expresión) de la construcción de expresión. Las células hospedadoras para su uso en la

presente invención pueden ser células procariotas, tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levaduras, plantas, insectos, anfibios o de mamífero. En general, las células hospedadoras son células de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Una “célula de planta” se refiere a cualquier célula derivada de una planta, incluyendo tejido no diferenciado (por ejemplo, callo) así como a semillas de plantas, polen, propágulos y embriones.

La expresión “planta madura” se refiere a una planta complemente diferenciada.

Las expresiones “nativo” y “tipo silvestre” en referencia a un rasgo determinado o un fenotipo de planta se refiere a la forma en la que el rasgo o fenoma se encuentra en la misma variedad de planta en la naturaleza.

El término “planta” incluye referencia a plantas completas, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas y células de plantas y su propia progenie. La célula de planta como se usa en el presente documento incluyen, sin limitación, semillas, cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametocitos, esporofitos, polen y microesporas. La clase de plantas que puede usarse en los métodos de la presente invención es generalmente tan amplío como la clase de plantas superiores dóciles para las técnicas de transformación, incluyendo plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas.

El término “semilla” se refiere a incluir cualquier componente de las semillas incluyendo por ejemplo, el coleóptilo y las hojas, radículos y coleoriza, escutelo, endospermo de almidón, capa de aleurona, pericarpio y/o testa bien durante la maduración de la semilla y germinación de la semilla.

El término “semilla en una forma para su uso como un alimento o complemento alimenticio” incluye, pero sin limitación, fracciones de semilla tales como semilla completa descascarillada, harina (semilla que se ha descascarillado moliendo y triturando en un polvo), un extracto de proteína de semilla (donde la fracción de proteína de la harina se ha separado de la fracción de carbohidrato) y/o una fracción de proteína purificada derivada del grano transgénico.

El término “purificación” se usa indistintamente con el término “aislamiento” y se refiere generalmente a la separación de un componente particular de otros componentes del entorno en el que se encontró o produjo. Por ejemplo, purificar una proteína recombinante de células de planta en las que se ha producido, típicamente significa someter a la proteína transgénica que contiene material de planta a purificación bioquímica y/o cromatografía en columna.

El término “activo” se refiere a cualquier actividad biológica asociada con una proteína de leche particular, tal como la actividad enzimática asociada con la lisozima humana. Se deduce que la actividad biológica de una proteína láctea determinada se refiere a cualquier actividad biológica típicamente atribuida a ese factor por los expertos en la técnica.

La expresión “proteína de leche humana” o “proteínas normalmente presentes en leche humana” se refiere a una o más proteínas, o a fragmentos biológicamente activos de las mismas, encontrados en leche humana normal, incluyendo, sin limitación, lactoferrina, lisozima, lactoferricina, EGF, IGF-I, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa, alfa-1-antitripsina e inmunoglobulinas, y fragmentos biológicamente activos de los mismos.

La expresión “alimento nutricionalmente mejorado” se refiere a un alimento, típicamente a un alimento procesado, en el que se ha añadido una proteína de la leche humana producida por semillas, en una cantidad eficaz para conferir algún beneficio para la salud, tal como una salud intestinal mejorada, resistencia a bacterias patógenas, o transporte de hierro, para un humano que consuma el alimento.

“Ingredientes alimentarios derivados de plantas” se refiere a un alimento derivado de planta, típicamente grano de monocotiledóneas, pero también incluyendo, por separado, lecitinas, gomas, azúcares, proteínas producidas por plantas y lípidos, que pueden combinarse o mezclarse en solitario o en combinación con uno o más ingredientes derivados de plantas, para formar un alimento comestible.

“Componentes de semillas monocotiledóneas” se refiera un carbohidrato, proteína, y componentes lipídicos extraíbles de semillas de monocotiledóneas, típicamente semillas monocotiledóneas maduras.

“Componentes de semillas malteados” se refiere a componentes derivados de semillas, predominantemente componentes de carbohidratos, después de la conversión de carbohidratos complejos azúcares de malta por el malteado, es decir, tratando con enzimas de malteado, tales como amilasa y glucanasas de cebada, en condiciones eficaces para la conversión de carbohidratos derivados de semillas a azúcares de malta.

“Forma sustancialmente no purificada”, como se aplica a las proteínas de la leche humana en un extracto de semilla significa que la proteína o las proteínas presentes en el extracto están presentes en una cantidad menor del 50 % en peso, típicamente entre el 0,1 y el 10 por ciento en peso.

“Maduración de semilla” o “desarrollo del grano” se refiere a un periodo que comienza con la fertilización en el que las reservas metabolizables, por ejemplo, azúcares, oligosacáridos, almidón, fenólicos, aminoácidos y proteínas, se

depositan, con o sin direccionamiento de vacuolas, en diversos tejidos en la semilla (grano), por ejemplo, endospermo, testa, capa de aleurona, y epitelio escutelar, conduciendo a un aumento del grano, rellenado del grano, y finaliza con una desecación del grano.

"Inducible durante la maduración de semilla" se refiere a promotores que se activan sustancialmente (en más del 25 %) durante la maduración de la semilla.

"ADN heterólogo" o "ADN extraño" se refiere a ADN que se ha introducido en células de plantas de otra fuente, o que es de una fuente vegetal, incluyendo la misma fuente vegetal, pero que está bajo el control de un promotor o terminador que no regula normalmente la expresión del ADN heterólogo.

"Proteína heteróloga" es una proteína, incluyendo un polipéptido, codificada por un ADN heterólogo.

Una "secuencia señal/de direccionamiento/de transporte" es una secuencia polipeptídica N o C terminal que es eficaz para localizar el polipéptido o proteína a la cual está unido a una región intracelular o extracelular seleccionada, incluyendo una vacuola intracelular u otro cuerpo de almacenamiento de proteínas, cloroplasto, mitocondria o retículo endoplasmático o un espacio extracelular o región de semilla, tal como endospermo, seguido de la secreción por parte de la célula.

Un "producto" codificado por una molécula de ADN incluye, por ejemplo, moléculas de ARN y polipéptidos.

Una secuencia de ADN "deriva de" un gen si se corresponde en secuencia a un segmento o región del gen. Los segmentos de genes que pueden derivar de un gen incluyen la región promotora, la región 5' no traducida, y la región 3' no traducida del gen.

"Alfa amilasa" como se usa en el presente documento se refiere a una enzima que degrada principalmente almidón en dextrinas.

"Beta amilasa" como se usa en el presente documento se refiere a una enzima que convierte el almidón y dextrinas en maltosa.

"Adjuntos de cereales" como se usa en el presente documento, se refiere a granos de cereales, principalmente cebada, trigo, avena, centeno, maíz, sorgo y arroz, o completamente procesada o partes de las mismas, especialmente la fracción de almidón, que se añaden a la masa de cebada, que permite que las enzimas de cebada hidrolicen tanto el almidón de cebada como el almidón derivado del adjunto cereal.

"Adjuntos de cereales transgénicos" como se usa en el presente documento, se refiere a granos de cereales transgénicos, principalmente cebada, trigo, centeno, avena, maíz, sorgo y arroz y que expresan una molécula recombinante en una parte del grano, principalmente en la capa del endospermo (almidón).

"Conversión" como se usa en el presente documento se refiere al proceso de hidrólisis del almidón, normalmente catalizado por un ácido o por acción enzimática, que produce dextrosa, maltosa y polisacáridos superiores del almidón.

"Enzima diastática (amiolítica)" como se usa en el presente documento se refiere a una enzima capaz de ocasionar la hidrólisis del almidón.

"Harina de malta diastática" como se usa en el presente documento se refiere a la harina enzimáticamente activa molida de cebada germinada (malteada).

"Jarabe de malta diastático" como se usa en el presente documento se refiere al jarabe de malta líquido activo enzimáticamente (cebada y adjuntos de cereal).

"Malta diastática seca" como se usa en el presente documento se refiere a una combinación de harina de cebada diastática malteada, harina de trigo y dextrosa con niveles enzimáticos estandarizados a 20 grados y 60 grados Lintner.

"Malta diastática deshidratada" como se usa en el presente documento se refiere a una forma de extracto de malta líquido no diastático o jarabe secado por pulverización.

"Lintner" como se usa en el presente documento se refiere a una medición de laboratorio de la fuerza de la actividad enzimática. A mayor valor, mayor actividad.

"Malta deshidratada" como se usa en el presente documento se refiere a grano seco resultante de germinación controlada de granos de cereales, normalmente cebada, aunque también pueden maltearse otros cereales.

"Extracto de malta" como se usa en el presente documento se refiere a un concentrado viscoso del extracto acuoso de malta seca.

"Maltodextrina" como se usa en el presente documento se refiere a una solución acuosa concentrada purificada de sacáridos nutritivos, obtenidos de almidón comestible o el producto deshidratado derivado de la solución. Las maltodextrinas tienen un equivalente de dextrosa menor de 20 y se consideran "sólidos solubles no dulces". Se comercializan normalmente secas, pero pueden obtenerse como una solución concentrada. Normalmente las maltodextrinas se ofrecen como 10 a 14 D.E. productos o como versiones de 15 a 19 D.E. Otra maltodextrina, con una D.E. de aproximadamente 5, se fabrica algunas veces, pero no se usa ampliamente. La composición de las maltodextrinas es generalmente de 65 al 80 % de sacáridos superiores, del 4 al 9 % de pentasacáridos, del 4 al 7 % de tetrasacáridos, y del 5 al 9 % de trisacáridos. Están presentes trazas de mono y disacáridos. Normalmente se usan como agentes voluminosos o como constructores de viscosidad, sin dulzor.

"Jarabe de malta" como se usa en el presente documento se refiere a un concentrado viscoso y al extracto acuoso de la malta seca y otros granos de cereales.

"Malta" se refiere a un extracto de malta o jarabe de malta.

"Jarabe de malta no diastático" como se usa en el presente documento se refiere a un jarabe de malta líquido (cebada y adjuntos de cereales) sin actividad enzimática.

"Extracto de malta transgénica" como se usa en el presente documento se refiere a un concentrado viscoso del extracto acuoso de malta seca que incluye una proteína, polipéptido y/o metabolito recombinantes.

"Jarabe de malta transgénico" como se usa en el presente documento se refiere a un concentrado viscoso del extracto acuoso de "malta" seca y otros granos de cereales que incluyen una proteína, polipéptido y/o metabolito recombinantes.

II. Productos de la leche-estado de la técnica/cuestiones

Los pediatras y nutricionistas piensan que la leche humana proporcionada por madres sanas y bien alimentadas es la forma óptima de alimentar a los lactantes durante los seis primeros meses de vida. La leche materna no solo proporciona al lactante un aporte bien equilibrado de nutrientes, sino también una multitud de componentes únicos que facilitan la digestión de los nutrientes y la absorción, protegen contra microorganismos y promueven el desarrollo y crecimiento. La leche humana es una fuente de péptidos, aminoácidos y nitrógeno y también contiene proteínas de suero implicadas en el desarrollo de la respuesta inmunitaria (por ejemplo, inmunoglobulinas), junto con otras proteínas de defensa no inmunológica (por ejemplo, lactoferrina).

Sin embargo, los preparados para lactantes a menudo se usan como una fuente nutricional para lactantes menores de un año por diversas razones, por ejemplo, producción insuficiente de leche por, o infección patógena de, la madre. los preparados para lactantes y la leche de vaca no estándar se usan debido a (1) la leche de vaca tiene más de dos veces las proteínas de la leche materna o preparado para lactantes y esta proteína puede ser fuerte para que los bebés la digieran; (2) el nivel de hierro, cinc y vitamina C (que los bebés necesitan en su dieta) es baja en leche de vaca; y (3) el nivel de sodio es de tres a cuatro veces el de la leche materna y generalmente demasiado alto para lactantes menores de un año. Diversos tipos de preparados para lactantes que varían en el contenido calórico, composición de nutrientes, digestibilidad, sabor y coste se encuentran disponibles como una alternativa a la leche materna. Los ejemplos incluyen fórmulas basadas en leche de vaca estándar, fórmulas de proteína de soja y fórmulas para lactantes prematuros o lactantes con necesidades dietéticas especiales debido a alergias, etc.

Durante las últimas décadas, se ha dispuesto de preparados mejorados para lactantes que son seguros y contienen concentraciones de nutrientes similares a, o mayores que, la leche materna. Sin embargo, los lactantes alimentados con leche materna, aún tienen una menor prevalencia de infección que los alimentados con preparados para lactantes y cuando se ponen enfermos, la duración de la diarrea y las infecciones respiratorias superiores es más corta que en los bebés alimentados con preparados para lactantes. (Véase, por ejemplo Kovar *et al.,* 1984, y Dewey *et al.,* 1995). Además, se ha descrito que los lactantes alimentados con leche materna tienen un patrón de crecimiento diferente que los lactantes alimentados con preparados para lactantes (Dewey *et al.,* 1992; Dewey *et al.,* 1993), y los estudios epidemiológicos muestran que tienen una menor incidencia de enfermedades crónicas, tales como diabetes y cardiopatía coronaria.

Se ha postulado que muchas de las ventajas para los lactantes alimentados con leche materna se efectúan mediante de proteínas exclusivas presentes en la leche materna, pero no en los preparados para lactantes (Lönnerdal, 1985). Las proteínas de la leche humana son exclusivas e incluso si las fuentes de proteína alternativa utilizadas en los preparados (por ejemplo, leche descremada, proteína de suero y aislados de soja) imitan la concentración de aminoácidos y la proporción encontrada en la leche materna, las propiedades biológicas de las proteínas humanas no pueden copiarse fácilmente.

Las proteínas únicas ejemplares presentes en la leche humana incluyen lactoferrina y lisozima. La lactoferrina es una proteína de unión a hierro encontrada en los gránulos de neutrófilos que ejerce una actividad antimicrobiana y la lisozima es una proteína básica cristalina presente en la saliva, lágrimas, clara de huevo y en muchos fluidos animales que actúa como una enzima antibacteriana.

Las composiciones alimenticias mejoradas que contienen proteínas de leche humana se describen en el presente documento.

Las proteínas de la leche humana se producen en el grano de plantas transgénicas y se añaden a nuevas composiciones alimenticias, siendo el preparado para lactantes un ejemplo. El preparado para lactantes que contiene dichas proteínas recombinantes de la leche humana es útil en la complementación o mejora de la dieta de lactantes, particularmente lactantes de muy bajo peso al nacer.

Otros alimentos que pueden complementarse con las proteínas de la leche humana incluyen, pero sin limitación, alimentos en los que la lactoferrina recombinante puede añadirse y utilizarse como un complemento de hierro reemplazando la necesidad de añadir exógenamente hierro en la formulación alimenticia final.

III. Composiciones que contienen proteínas de la leche humana

En el presente documento se describen composiciones complementarias alimenticias (también denominadas “composiciones alimenticias mejoradas”) que comprenden proteínas de la leche humana y métodos para preparar dichas composiciones. En la realización práctica de la invención, se produce una proteína de leche humana en las semillas o grano de plantas transgénicas que expresa la secuencia codificante de ácido nucleico para la proteína de la leche humana y los granos transgénicos añadidos a un alimento tal como un preparado para lactantes para dar como resultado "composiciones alimenticias mejoradas". Más específicamente, la invención se basa en la expresión de proteínas de la leche humana, ilustradas por lactoferrina humana (LFh) y lisozima humana, bajo el control de un promotor específico de semilla en arroz. La proteína humana producida por plantas transgénicas se compara con la forma natural de la misma proteína, más adelante se describe de manera adicional la información sobre la estabilidad de la proteína recombinante y las ventajas del uso del grano de arroz que contiene dicha proteína de la leche humana recombinante en un preparado para lactantes y/u otros alimentos.

La invención se basa en el uso de construcciones de ácido nucleico heterólogas que incluyen la secuencia codificante de una proteína o polipéptido de la leche importante desde el punto de vista comercial o de valor nutricional y/o terapéutico, ilustrado en el presente documento por lactoferrina y lisozima.

Las proteínas de la leche ejemplares, lisozima y lactoferrina son una parte integral del sistema inmunitario de los animales multicelulares. Se encuentran en secreciones epiteliales (lágrimas, mucosa, jugo gástrico) y en el plasma sanguíneo de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y diversos invertebrados. También están enriquecidas en leche de mamífero y huevos de aves, donde actúan como proteínas antimicrobianas primarias. Adicionalmente, la lisozima es un componente principal de los gránulos secretores de neutrófilos y macrófagos y se libera en el sitio de infección, en las etapas más tempranas de la respuesta inmunitaria. La lactoferrina se encuentra a elevadas concentraciones dentro de gránulos específicos de leucocitos polimorfonucleares.

Se ha demostrado previamente que la lisozima y la lactoferrina son eficaces en la promoción de la resistencia contra enfermedades infecciosas en animales experimentales y en humanos y que desempeñan un papel de proteínas de defensa primaria sobre superficies epiteliales además de ser determinantes importantes en el establecimiento de una microflora sana dentro del tracto digestivo. Estas propiedades sugieren que los complementos alimenticios que comprenden lisozima y/o lactoferrina serán beneficiosos para la salud general de los lactantes.

Las composiciones alimenticias mejoradas como se describen en el presente documento incluyen proteínas de la leche tales como lactoferrina y lisozima, producidas en el grano de plantas transgénicas, que son útiles para una nutrición mejorada. En una estrategia preferida, las composiciones alimenticias mejoradas se administran a un lactante. Típicamente las composiciones alimenticias mejoradas, por ejemplo, preparado para lactantes que contiene una o más proteínas recombinantes de la leche humana en una cantidad que corresponde a la cantidad y proporciones de las mismas proteínas de la leche humana encontradas en la leche humana endógena.

A. Lisozimas

La lisozima de la leche humana, denominada muramidasa o péptidoglucano N-acetilmuramoil hidrolasa (EC 3.2.1.17) contiene 130 restos de aminoácidos y es una proteína de 14,7 kDa de tamaño. La lisozima humana no está glicosilada y posee estabilidad inusual *in vitro* e *in vivo* debido a sus estructura de aminoácidos y secundaria.

La lisozima es una de las proteínas más abundantes presentes en la leche humana con una concentración de aproximadamente 400 μg/ml. La concentración de la lisozima es de aproximadamente 0,13 μg/ml en la leche de vaca (casi 3000 veces menor que la encontrada en la leche humana), 0,25 μg/ml en la leche de cabra, 0,1 μg/ml en la leche de oveja y casi ausente en la leche de roedores (Chandan RC, 1968). La lisozima también puede encontrarse en otras secreciones de mamíferos, tales como lágrimas y saliva.

Se ha observado que el papel protector de la lisozima incluye la lisis de las paredes celulares microbianas, actividad adyuvante de la lisis de péptidoglucano de los productos finales, efectos inmunomoduladores directos sobre leucocitos y neutralización de endotoxinas bacterianas. Las acciones bacterioestáticas y bactericidas de la lisozima las descubrieron originalmente por Fleming en 1922 y se han estudiado con detalle. La lisozima es eficaz contra bacterias gram positivas y gram negativas, así como contra algunos tipos de levaduras. Los efectos antimicrobianos

de la lisozima a menudo actúan sinérgicamente con otras moléculas de defensa, incluyendo inmunoglobulina y lactoferrina. Además, los cambios estructurales en la pared celular debido a la lisozima hacen que las bacterias sean más susceptibles a fagocitosis por macrófagos y neutrófilos.

La hidrólisis de péptidoglucanos microbianos da como resultado la liberación del producto de escisión, muramil dipéptido, que es un fuerte adyuvante y es el componente activo del adyuvante completo de Freund. El muramil dipéptido potencia la producción de IgA, la activación de macrófagos, y la rápida eliminación de diversos patógenos bacterianos *in vivo*. La propia lisozima es también inmunomoduladora. Interacciona directamente con la membrana celular de fagocitos para aumentar su captación de bacterias. La lisozima también aumenta la respuesta proliferativa de linfocitos estimulados por mitógeno contra la interleucina 2 y aumenta la tasa de síntesis de IgG e IgM en más de 5 y 2 veces respectivamente. Además, la acción inmunomoduladora de lisozima no depende de la actividad enzimática y se conserva después de desnaturalización. Cuando se administra lisozima a ratones, aumenta el número de linfocitos de nódulos linfáticos intraepiteliales y mesentéricos que presentan los antígenos.

Las lisozimas actúan como enzimas que escinden péptidoglucanos y el componente de la pared celular ubicuo de microorganismos, en particular bacterias. Específicamente, las lisozimas son 1,4-β-acetilmuramidasas que hidrolizan el enlace glucosídico entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Las bacterias gram positivas son muy susceptibles a la lisozima debido al péptidoglucano en la parte exterior de la pared celular. Las cepas gram negativas tienen una sola capa de polipéptidoglucanos cubierta por lipopolisacáridos y son por lo tanto menos susceptibles a lisis por lisozima, sin embargo, la sensibilidad puede aumentar por la adición de EDTA (Schütte y Kula, 1990). La lisozima también presenta actividad antiviral, como se ilustra por la reducción significativa en las apariciones recurrentes de herpes genital y labial después de tratamiento oral de pacientes con lisozima (Jollès, 1996). Se ha demostrado más recientemente que la lisozima de claras de huevo de pollo, leche humana y neutrófilos humanos inhibe el crecimiento del VIH-1 en un ensayo *in vitro* (Lee-Huang *et al.,* 1999). Además, se ha demostrado una actividad antifúngica para las lisozimas usando aislados orales de *Candida albicans* (el agente fúngico más común causante de infección orofaríngea en seres humanos) (Samaranayake *et al.,* 1997). Por tanto la lisozima actúa como un agente antimicrobiano de amplio espectro.

La capacidad de la lisozima para unirse a endotoxinas bacterianas, especialmente LPS, le confiere una importante propiedad antimicrobiana a la molécula. La lisozima se une electroestáticamente al componente lípídico A de endotoxinas bacterianas a una relación molar de 1:3. El cambio conformacional resultante en la endotoxina impide que interactúe con receptores de macrófagos y obstaculiza la liberación de citocinas proinflamatorias tales como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF). Por tanto, la lisozima presenta actividad antiinflamatoria durante las exposiciones a patógenos.

La principal fuente comercial actual de lisozima es la clara de huevo de pollo. El análisis de secuencias muestra que la lisozima de clara de huevo de pollo presenta solo homología parcial (60 %) con la sintetizada por seres humanos. La lisozima de pollo y humana no reacciona en cruzado con sus anticuerpos respectivos (Faure *et al.,* 1970), indicando diferencias estructurales significativas entre estas dos lisozimas. La lisozima humana se ha purificado de la leche materna (Boesman-Finkelstein *et al.,* 1982; Wang *et al.,* 1984), neutrófilos (Lollike *et al.,* 1995) y orina de pacientes que se someten a hemodiálisis (Takai *et al.,* 1996). La leche materna se mantiene como la principal fuente para el aislamiento de la lisozima humana, pero el suministro es limitado. Se requieren precauciones para el aislamiento de la enzima de las fuentes humanas para impedir la contaminación con patógenos virales y microbianos.

La lisozima humana recombinante se ha producido en la glándula mamaria de ratones transgénicos. La enzima conserva su actividad antimicrobiana, pero la concentración final en la leche es baja (Maga *et al.,* 1998; Maga *et al.,* 1994; Maga *et al.,* 1995). La lisozima humana se ha expresado en *Aspergillus oryzae (A. oryzae)* (Tsuchiya *et al.,* 1992), levadura (*S. cerevisiae;* Castañón *et al.,* 1988; Jigami *et al.,* 1986; y Yoshimura *et al.,* 1988) y en pequeñas cantidades en hojas de tabaco (Nakajima *et al.,* 1997). Sin embargo, el nivel de expresión de la lisozima humana recombinante en estos organismos sería muy bajo, y el coste de estas formas sería prohibitivo para aplicaciones en alimentos. Además, la lisozima humana producida en microorganismos puede requerir una purificación extensiva antes de que se use en alimentos, particularmente para lactantes y niños.

A diferencia de otras proteínas, la lisozima es muy resistente a la digestión en el tracto gastrointestinal. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que ambas moléculas son resistentes a la hidrólisis por pepsina en el intervalo de pH encontrado en el estómago. Además, la desnaturalización parcial de la lisozima aumenta su actividad bactericida contra algunos tipos de bacterias, y un bajo pH, tal como el que se encuentra en el estómago, aumenta los efectos bactericidas de la lisozima. Un fragmento proteolítico (aminoácidos 98-112 de lisozima de clara de huevo de pollo) que carecen completamente de actividad enzimática se ha encontrado que es el componente bactericida activo de la lisozima. De manera adicional, un fragmento de lactoferrina, conocido como lactoferricina, se forma por digestión proteolítica limitada y se ha demostrado que tiene una actividad antibacteriana extremadamente eficaz.

La lisozima humana producida en arroz del presente documento presenta una resistencia a pH ácido, así como resistencia a pepsina y pancreatina para hacerla resistente a digestión en el tracto gastrointestinal. La excelente termoestabilidad proporciona la posibilidad de pasteurizar productos que incluyan la lisozima humana recombinante.

B. Lactoferrina

La lactoferrina es una proteína que de unión a hierro que se encuentra en los gránulos de neutrófilos donde ejerce aparentemente una actividad antimicrobiana reteniendo hierro de bacterias y hongos ingeridos; también se produce en muchas secreciones y exudados (leche, lágrimas, moco, saliva, bilis, etc.). Además de su papel en el transporte de hierro, la lactoferrina tiene actividades bacterioestáticas y bactericidas, además de desempeñar un papel como un antioxidante (Satue-Gracia *et al.,* 2000).

El polipéptido de lactoferrina (LF) maduro consta de 692 aminoácidos, consta de un polipéptido monocatenario que es relativamente resistente a la proteolisis, está glucosilada en dos sitios (N138 y N478) y tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kD. La lactoferrina humana (LFh) se encuentra en la leche humana a altas concentraciones (a un promedio de 1-3 mg/ml) y a una menor concentración (0,1-0,3 mg/ml), en fluidos exocrinos de células epiteliales glandulares tales como bilis, lágrimas, saliva etc.

Las funciones primarias de la lactoferrina se han descrito como regulación de hierro, modulación inmunitaria y protección frente a microbios infecciosos. La lactoferrina puede unirse a dos iones férricos y se ha observado que tiene actividades biológicas incluyendo bacterioestáticas (Bullen *et al,* 1972), bactericidas (Arnold, *et al.,* 1980) y actividad de factor de crecimiento *in vitro*. Además, la lactoferrina puede promover el crecimiento de bacterias que son beneficiosas para el organismo hospedador liberando hierro en su presencia. Estudios adicionales han mostrado recientemente que la lactoferrina tiene actividad antiviral contra citomegalovirus, virus del herpes simple, rotavirus y VIH tanto *in vivo* como *in vitro*. (Véase, por ejemplo Fujihara *et al.,* 1995; Grover *et al.,* 1997; y Harmsen *et al.,* 1995.)

La lactoferrina, al igual que la transferrina, tiene una fuerte capacidad de unirse a hierro libre en condiciones fisiológicas debido a su estructura terciaria, que consiste en dos lóbulos globulares unidos por una alfa hélice extendida. La capacidad de la lactoferrina para eliminar el hierro del entorno fisiológico puede inhibir eficazmente el crecimiento de “más del 90 % de todos los microorganismos” privándoles de un componente necesario para su metabolismo, que inhibirá su crecimiento *in vitro* e *in vivo*.

No relacionada con la unión al hierro, la actividad bactericida de la lactoferrina se produce por su capacidad de desestabilizar la membrana externa de bacterias gram negativas mediante de la liberación de lipopolisacáridos que constituyen las paredes celulares de las bacterias. Adicionalmente, se ha demostrado recientemente que la lactoferrina se une a priones, un grupo de moléculas comunes en *E. coli*, ocasionando cambios de permeabilidad en la pared celular. Estudios en lechones libres de gérmenes a los que se ha administrado lactoferrina antes de exponerse a *E. coli* muestran una disminución significativa en la mortalidad en comparación con el grupo control.

La LF recombinante (LFr) se ha producido como una proteína de fusión en *Aspergillus oryzae* (Ward *et al.,* 1992) y en el sistema de expresión de baculovirus (Salmon *et al.,* 1997). La proteína producida por *Aspergillus* requerirá un alto grado de purificación así como un ensayo de seguridad y toxicidad antes de usarla como un aditivo alimentario (Lönnerdal, 1996). La lactoferrina también se ha expresado en cultivo de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L cv Amarillo Brillante) (Mitra y Zhang, 1994), plantas de tabaco (Salmon *et al.,* 1998) y plantas de patata (*Solanum tuberosum*) (Chong y Langridge, 2000). En cultivos de células de tabaco la proteína estaba truncada, mientras que en plantas de tabaco y de patata la LFr se procesó correctamente, aunque sus niveles de expresión eran muy bajos (0,1 % de proteína soluble total) (Chong y Langridge, 2000). Sin embargo, el nivel de expresión de la lactoferrina humana recombinante en estos organismos sería muy bajo, y el coste de estas formas puede ser prohibitivo para aplicaciones alimentarias. Además, la lactoferrina humana producida en microorganismos puede requerir una amplia purificación antes de que pueda usarse en alimentos, particularmente para lactantes y niños.

A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de otras proteínas, se ha observado que la lactoferrina es resistente a degradación proteolítica *in vitro*, siendo tripsina y quimiotripsina extraordinariamente ineficaces en la digestión de lactoferrina, particularmente en su forma saturada de hierro. Se formaron algunos fragmentos grandes de lactoferrina se formaron, pero la proteolisis estaba limitada claramente.

C. Lactoperoxidasa

La lactoperoxidasa es una enzima que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno a agua. Esta enzima se encuentra en la leche humana y desempeña funciones de defensa de hospedadores a través de la actividad antimicrobiana. Cuando se añade peróxido de hidrógeno y tiocianato a la leche sin procesar, el SNC oxidado por el complejo peróxido de hidrógeno-enzima produce compuestos bactericidas que destruyen bacterias Gram negativas (Shin).

D. Kappa-caseína

Este grupo de proteínas se digieren fácilmente y suman prácticamente la mitad del contenido de proteína en la leche humana. Son importantes como proteínas nutricionales para lactantes que se alimentan de leche materna. También se ha postulado que parte de la actividad antimicrobiana de la leche humana reside en las caseínas, más probablemente en la kappa caseína glucosilada (Aniansson).

E. Alfa-1-antitripsina (“AAT”)

La AAT pertenece a la clase de inhibidores de serpina, tiene una masa molecular de 52 kD, y contiene aproximadamente un 15 % de carbohidratos (Carrell *et al*, 1983). Las concentraciones de AAT en leche humana varían de 0,1 a 0,4 mg/ml (Davidson y Lönnerdal, 1979; McGilligan *et al.,* 1987). Aunque la afinidad de unión de AAT es mayor para la elastasa de neutrófilos humanos, también tiene afinidad por proteasas pancreáticas tales como quimotripsina y tripsina (Beatty *et al.,* 1980).

Aunque las proteínas de la leche se han expresado en sistemas tales como vacas transgénicas y *Aspergillus* (Lönnerdal, 1996), el arroz transgénico proporciona un vehículo más atractivo para la producción de la AAT humana recombinante para aplicaciones alimentarias. Son posibles altos niveles de expresión usando la combinación de elementos reguladores tales como promotor, péptido señal y terminador como se describe en el presente documento. Además, el arroz es a menudo uno de los primeros productos introducidos a los lactantes debido a su valor nutricional y a su baja alergenicidad. Los Asuntos de seguridad sobre sistemas de expresión microbianos (por ejemplo *Aspergillus*) limitan la posibilidad de usar proteínas de tales fuentes como componentes alimenticios en preparados (Lönnerdal, 1996). Además, el coste de producción y purificación de proteínas de estos otros sistemas es a menudo prohibitivo para aplicaciones alimentarias. Por tanto, la expresión de las proteínas de la leche humana recombinantes en arroz puede ser una posibilidad segura y económicamente viable para complementar los preparados para lactantes con dichas proteínas. (Véase también Chowanadisai; Huang; Johnson; Lindberg; y Rudloff).

F. Lactadherina

La lactadherina es una glucoproteína protectora presente en la leche humana que ayuda a proteger a los lactantes alimentados con leche materna contra infecciones por microorganismos. La protección contra determinadas infecciones víricas por la leche humana también está asociada con la lactadherina. (Newburg, 1999, 1998; Peterson; Hamosh).

G. Factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento insulínico

El Factor de Crecimiento Epidérmico y el Factor 1 de crecimiento insulínico son dos factores de crecimiento presentes en la leche humana. Estas moléculas pueden estimular el crecimiento y desarrollo del tracto gastrointestinal del lactante. (Murphy; Prosser).

H. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas presentes en el ser humano actúan para conferir resistencia a una diversidad de patógenos a los que la madre puede haber estado expuesta. (Véase, por ejemplo, Humphreys; Kortt; Larrick; Maynard; y Peeters).

IV. Vectores de expresión para la generación de plantas transgénicas que expresan proteínas de la leche humana

Los vectores de expresión para su uso en la presente invención son construcciones de ácido nucleico quimérico (o vectores o casetes de expresión), diseñados para actuar en plantas, con secuencias asociadas aguas arriba y aguas abajo.

En general, los vectores de expresión para su uso en la realización práctica de la invención incluyen los siguientes componentes unidos operativamente que constituyen un gen quimérico: (i) una región reguladora transcripcional de un gen de monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semilla, (ii) unido operativamente a dicha región reguladora transcripcional, una secuencia de ADN líder que codifica una secuencia de tránsito específica de semilla de monocotiledónea capaz de dirigir un polipéptido unido a un orgánulo de células de endospermo, tal como la secuencia líder para dirigirse a un cuerpo de almacenamiento de proteína y (iii) una secuencia codificante de proteína que codifica una proteína normalmente presente en la leche humana.

El gen quimérico, a su vez, se coloca típicamente en un vector de transformación de plantas adecuado que tiene (i) secuencias compañeras aguas arriba y/o aguas abajo del gen quimérico que son de origen plásmido o viral y proporcionan características necesarias al vector para permitir que el vector traslade el ADN de las bacterias a la planta hospedadora deseada; (ii) una secuencia marcadora de selección; y (iii) una región de terminación transcripcional generalmente en el extremo opuesto del vector de la región reguladora del inicio de la transcripción.

Métodos ejemplares para construir genes quiméricos y vectores de transformación que llevan genes quiméricos se proporcionan en los ejemplos siguientes.

A. Promotores

En un aspecto, en el presente documento se describe que la construcción de expresión incluye una región reguladora de transcripción (promotor) que presenta actividad específicamente regulada de manera positiva durante la maduración de la semilla. Los ejemplos de dichos promotores incluyen la región promotora específica de maduración asociada con una de las siguientes proteínas de almacenamiento de monocotiledóneas específicas de

maduración: glutelinas, oricinas y prolaminas de arroz, hordeínas de cebada, gliadinas y gluteninas de trigo, ceínas y glutelinas de maíz, glutelinas de avena y cafirinas de sorgo, penisetinas de mijo y secalinas de centeno. Las regiones reguladoras ejemplares de estos genes se ilustran mediante la SEC ID Nº: 15-23, como se identifica en la descripción de las Secuencias.

Es de particular interés la expresión del ácido nucleico que codifica una proteína de leche humana a partir de una región de iniciación de la transcripción que se expresa preferentemente en tejido de semillas de plantas. Ejemplos de dichas secuencias de inicio de la transcripción preferenciales de semilla incluyen aquellas secuencias derivadas de secuencias que codifican genes de proteínas de almacenamiento de plantas o de genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos en semillas oleaginosas. Los promotores preferidos ejemplares incluyen un promotor de glutelina (Gt-1), como ilustra la SEC ID Nº: 15, que efectúa la expresión génica en la capa externa del endospermo y un promotor de globulina (Glb), como ilustra la SEC ID Nº: 16, que efectúa la expresión génica en el centro del endospermo. Las secuencias promotoras para regular la transcripción de secuencias codificantes de genes unidas operativamente a los mismos incluyen promotores de origen natural, o regiones de los mismos capaces de dirigir la transcripción específica de semilla y promotores híbridos, que combinan elementos de más de un promotor. En la técnica se conocen bien métodos para la construcción de dichos promotores híbridos.

De acuerdo con la invención, el promotor se deriva de la misma especie de planta que la célula de la planta en la que va a introducirse la construcción de ácido nucleico quimérico. En particular, los promotores para su uso en la invención se derivan de arroz. Los promotores típicamente derivados de cereales tales como cebada, trigo, avena, centeno, maíz, mijo, triticali o sorgo también se describen en el presente documento.

En el presente documento también se describe que, como alternativa, un promotor específico de semilla de un tipo de monocotiledónea puede usarse para regular la transcripción de una secuencia codificante de ácido nucleico de una monocotiledónea diferente o de una monocotiledónea que no es de cereales.

Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados, y secuencias reguladoras adecuadas se conocen en la técnica para una diversidad de células hospedadoras de planta. La región promotora o reguladora de la transcripción se selecciona para regularse de una manera que permita la introducción en condiciones de maduración de semilla. Ejemplos de dichos promotores incluyen los que están asociados con las siguientes proteínas de almacenamiento de monocotiledóneas: glutelinas, oricinas y prolaminas de arroz, hordeínas de cebada, gliadinas y glutelinas de trigo, ceínas y glutelinas de maíz, glutelinas de avena y cafirinas de sorgo, penisetinas de mijo y secalinas de centeno. Las secuencias promotoras ejemplares se identifican en el presente documento como SEC ID Nº: 15-23. Otros promotores adecuados para la expresión en semillas en maduración incluyen el promotor de hordeína B1 específico de endospermo de cebada (Brandt, A., *et al.,* (1985), el promotor Glub-2, promotor Bx7, promotor Gt3, promotor Glub-1 y promotor Rp-6, particularmente si estos promotores se usan junto con factores de transcripción. La estructura principal de un gen de hordeína B1 de cebada se proporciona en Carlsberg Res. Commun. 50, 333-345.

B. Secuencias de señal/direccionamiento/transporte

Además de codificar la proteína de interés, el casete de expresión o la construcción de ácido nucleico heterólogo puede codificar un péptido señal/de dirección/de transporte que permita procesar y translocar la proteína según sea apropiado. Las secuencias señal/de dirección/de transporte ejemplares, particularmente para dirigir proteínas a cuerpos intracelulares, tales como vacuolas, son secuencias señal/de direccionamiento asociadas con los genes específicos de maduración de monocotiledóneas: glutelinas, prolaminas, hordeínas, gliadinas, gluteninas, ceínas, albúmina, globulina, ADP glucosa pirofosforilasa, sintasa de almidón, enzima ramificadora, Em y lea. Las secuencias ejemplares que codifican una secuencia líder para un cuerpo de almacenamiento de proteínas se identifican en el presente documento como SEC ID Nº: 24-30.

En una realización preferida, el método se refiere hacia la localización de la expresión de proteína de leche recombinante en un compartimento subcelular determinado, en particular un cuerpo de almacenamiento de proteína, pero también incluye la mitocondria, retículo endoplásmático, vacuolas, cloroplasto u otro compartimento plastídico. Por ejemplo, cuando la expresión de la proteína de leche recombinante se dirige a plástidos, tales como cloroplastos, para que se realice la expresión, la construcción también emplea el uso de secuencias que dirigen el gen al plástido. Tales secuencias se denominan en el presente documento péptidos de tránsito del cloroplasto (CTP) o péptidos de tránsito del plástido (PTP). De esta manera, cuando el gen de interés no se inserta directamente en el plástido, la construcción de expresión contiene originalmente un gen que codifica un péptido de tránsito para dirigir el gen de interés al plástido. Los péptidos de tránsito del cloroplasto pueden derivarse del gen de interés o pueden derivarse de una secuencia heteróloga que tiene un CTP. Tales péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Von Heijne *et al.,* 1991; Clark *et al.,* 1989; della-Cioppa *et al.,* 1987; Romer *et al.,* 1993; y Shah *et al.,* 1986. Péptidos de tránsito adicionales para la translocación de la proteína al retículo endoplásmático (RE) (Chrispeels, K., 1991), señales de localización nuclear (Raikhel, 1992), o vacuolas también pueden ser de utilidad en las construcciones de la presente invención.

Otra clase ejemplar de secuencias señal/de direccionamiento/transporte son secuencias eficaces para promover la secreción de proteínas heterólogas de células de aleurona durante la germinación de semillas, incluyendo las secuencias señal asociadas con α-amilasa, proteasa, carboxipeptidasa, endoproteasa, ribonucleasa, DNasa/RNasa,

(1-3)-β-(3-glucanasa, (1-3)(1-4)-β-glucanasa, esterasa, fosfatasa ácida, pentosamina, endoxilanasa, β-xilopiranosidasa, arabinofuranosidasa, β-glucosidasa, (1-6)-β-glucanasa, perioxidasa y lisofosfolipasa.

Dado que muchas proteínas de almacenamiento de proteína se encuentran bajo el control de un promotor específico de maduración y este promotor está unido operativamente a una secuencia líder para dirigirse a un cuerpo de proteína, el promotor y la secuencia líder pueden aislarse de un solo gen de almacenamiento de proteína, después unirse operativamente a una proteína de almacenamiento de proteína de leche en la construcción de gen quimérico. Una secuencia líder promotora preferida y ejemplar es la del gen Gt1 de arroz, que tiene una secuencia ejemplar identificada por la SEC ID Nº: 15. Como alternativa, el promotor y la secuencia líder pueden derivarse de genes diferentes. Una combinación de promotor/secuencia líder ejemplar y preferida es el promotor Glb de arroz unido a la secuencia líder Gt1 de arroz, como ilustra la SEC ID Nº: 16.

C. Secuencias codificantes de proteína

La construcción también incluye la secuencia codificante de ácido nucleico de una proteína heteróloga, bajo el control de un promotor, preferentemente un promotor específico de semilla. De acuerdo con la presente invención, las secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas de la leche humana tales como lisozima o lactoferrina incluyen variantes de corte y empalme, fragmentos de tales proteínas de la leche humana, proteínas de fusión, formas modificadas o equivalentes funcionales de las mismas, denominadas en conjunto en el presente documento como “secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de leche humana”.

Tales “secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de leche humana” pueden usarse en vectores de expresión recombinante (denominados también construcciones de ácido nucleico heterólogo) que dirigen la expresión de una proteína de la leche humana en células hospedadoras apropiadas.

Debido a la degeneración intrínseca del código genético, una diversidad de secuencias de ácido nucleico que codifican sustancialmente una secuencia de aminoácidos igual o funcionalmente equivalente pueden generarse y usarse para clonar y expresar una proteína de la leche humana determinada, como se ilustra en el presente documento mediante secuencias codificantes optimizadas por codones usadas para realizar la invención (descrita con más detalle más adelante). Por tanto, para una secuencia dada de ácido nucleico que codifica proteína de leche humana, se aprecia que como resultado de la degeneración del código genético, pueden producirse diversas secuencias codificantes que codifican la misma secuencia de aminoácidos de la proteína de la leche humana. Por ejemplo, el triplete CGT codifica el aminoácido arginina. Como alternativa, la arginina se codifica por CGA, CGC, CGG, AGA y AGG. Por lo tanto tales sustituciones en la región codificante se encontrarán dentro de la serie de variantes de secuencia incluidas en la presente invención. Cualquiera de y todas estas variantes de secuencia pueden utilizarse de la misma manera que se describe en el presente documento para una secuencia de ácido nucleico codificante de proteína de leche humana "de referencia”.

Una secuencia de ácido nucleico codificante de proteína de leche humana “variante” puede codificar una secuencia de aminoácidos de proteína de leche humana “variante” que está alterada en uno o más aminoácidos respecto de la secuencia de proteína de la leche nativa, estando ambas incluidas dentro del ámbito de la invención. De manera similar, la expresión “forma modificada de”, con respecto a una proteína de la leche humana dada, significa un derivado o forma variante de una proteína de leche humana nativa o su secuencia codificante. Esto es, una “forma modificada de” una proteína de leche humana tiene una secuencia derivada que contiene al menos una sustitución de ácido nucleico o aminoácido, deleción e inserción. La sustitución, inserción o deleción de ácido nucleico o aminoácido puede producirse en cualquier resto dentro de la secuencia, siempre que las secuencias de aminoácidos codificada mantenga la actividad biológica de la proteína de la leche humana natural, por ejemplo, el efecto bactericida de la lisozima.

Una secuencia de ácido nucleico codificante de proteína de la leche humana “variante” puede codificar una secuencia de proteína de leche humana “variante” que contiene inserciones o deleciones de aminoácidos,o ambas. Además, una secuencia codificante de proteína de leche humana variante puede codificar el mismo polipéptido que el polinucleótido de referencia o secuencia nativa pero, debido a la degeneración del código genético, tiene una secuencia codificante de ácido nucleico que está alterada en una o más bases de la secuencia de polinucleótidos de referencia o natural.

La secuencia codificante de ácido nucleico variante puede codificar una secuencia de aminoácidos variante que contenga una sustitución “conservativa”, en donde el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares a las del aminoácido que reemplaza y propiedades físico químicas de cadena lateral de aminoácidos y altas frecuencias desustitución en proteínas homólogas encontradas en la naturaleza (como se determina por ejemplo por una matriz de intercambio de frecuencia de Dayhoff convencional o matriz BLOSUM). Además, o como alternativa, la secuencia codificante de ácido nucleico variante puede codificar una secuencia de aminoácidos variante que contenga una sustitución “no conservativa”, en donde el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas distintas a las del aminoácido que sustituye.

Las clases de sustitución convencionales incluyen seis clases de aminoácidos basándose en las propiedades comunes de cadena lateral y la más alta frecuencia de sustitución en proteínas homólogas en la naturaleza, como es

sabido generalmente por los expertos en la técnica y pueden emplearse para desarrollar secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de la leche humana variantes. Una secuencia de ácido nucleico que codifica proteína de leche humana "variante" puede codificar una proteína de secuencia de leche humana "variante" que contenga una combinación de cualquiera de dos o tres de las inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de leche humana también incluyen "variantes alélicas", definidas como una forma alternativa de una secuencia de polinucleótidos que puede tener una sustitución, deleción o adición de uno o más nucleótidos, que no altera sustancialmente la función del polipéptido codificado.

Los polinucleótidos para su uso en la realización práctica de la invención incluyen secuencias que codifican proteínas de la leche humana y sus variantes de corte y empalme, secuencias complementarias a la secuencia codificante de proteína, y nuevos fragmentos del polinucleótido. Los polinucleótidos pueden estar en forma de ARN, o en forma de ADN, e incluyen ARN mensajero, ARN y ADN sintéticos, ADNc y ADN genómico. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido, complementaria).

Como entenderán los expertos en la técnica, en algunos casos puede ser ventajoso utilizar secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de leche humana que posean codones de origen no natural. Los codones preferidos para un hospedador eucariota particular (Murray *et al.,* 1989) pueden seleccionarse, por ejemplo, para aumentar la tasa de expresión de la proteína de leche humana o para producir transcriptos de ARN recombinantes que tengan propiedades deseables, tales como una mayor semivida, que los transcritos producidos a partir de secuencia de origen natural. Las secuencias optimizadas por codones para su uso en la realización práctica de la invención también se describen más adelante.

Una secuencia de nucleótidos codificante de proteína de leche humana puede diseñarse para alterar la secuencia codificante de la proteína de leche humana por diversas razones, incluyendo, pero sin limitación, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento y/o expresión de la proteína de la leche humana por una célula.

Las construcciones de ácido nucleico heterólogas pueden incluir la secuencia codificante de una proteína de leche humana dada, una variante, fragmento o variante de corte y empalme de la misma: (i) en aislamiento; (ii) en combinación con secuencias codificantes adicionales; tales como proteína de fusión o péptido señal, en el que la secuencia codificante de la proteína de leche humana es la secuencia codificante dominante; (iii) en combinación con secuencias no codificantes, tales como intrones y elementos de control, tales como elementos promotores y terminadores o regiones no traducidas 5' y/o 3', eficaces para la expresión de la secuencia codificante en un hospedador adecuado; y/o (iv) en un vector o entorno hospedador en el que la secuencia codificante de la proteína de leche humana es un gen heterólogo.

Dependiendo del uso que se desee, una construcción de expresión puede contener la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de leche humana completa, o una parte de la misma. Por ejemplo, cuando las secuencias de la proteína de leche humana se usan en construcciones para su uso como una sonda, puede ser ventajoso preparar construcciones que contengan solo una porción particular de la secuencia codificante de la proteína de leche humana, por ejemplo, una secuencia que se descubre que codifica una región de proteína de leche humana altamente conservada.

En una realización general, una secuencia de aminoácidos de lisozima codificada por una secuencia de ácido nucleico codificante de lisozima humana en un vector de expresión usado para la realización práctica de la invención tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, preferentemente 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más con la secuencia de aminoácidos de la lisozima humana presentada como SEC ID Nº: 2.

En otra realización general, una secuencia de aminoácidos de lactoferrina humana codificada por una secuencia de ácido nucleico codificante de lactoferrina humana en un vector de expresión usado para la realización práctica de la invención tiene una identidad de secuencia de al menos 70 %, preferentemente 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o más con la secuencia de aminoácidos de lactoferrina humana presentada como SEC ID Nº: 4.

D. Optimización por codones

Se ha observado que la producción de proteína recombinante en grano de cebada transgénico se potenció mediante optimización por codones del gen (Horvath *et al*., 2000; Jensen *et al.,* 1996). La intención de la optimización por codones fue cambiar una A o T en la tercera posición de los codones de G o C. Esta disposición se conforma más estrechamente con el uso de codones en genes de arroz típicos (Huang *et al.,* 1990a).

Para obtener un nivel de alta expresión para la lisozima humana en células de arroz, la secuencia codificante se optimizó por codones. El contenido G + C aumentó por tanto del 46 % al 68 %. La secuencia codificante de lisozima optimizada por codones para su uso en la realización práctica de la invención se presenta como SEC ID Nº: 1.

De manera similar, para obtener alto nivel de expresión de lactoferrina humana (LFh) en células de arroz, la secuencia codificante de LFh natural se optimizó por codones. De los 693 codones usados en el gen de lactoferrina,

413 codones se cambiaron en uno o dos nucleótidos. La secuencia de aminoácidos de LF no cambió. La secuencia codificante de lactoferrina optimizada por codones para su uso en la realización práctica de la invención se presenta como SEC ID Nº:3.

Las secuencias optimizadas por codones para otras proteínas de leche humana se proporcionan del siguiente modo: para lactoferrina SEC ID Nº: 7; para EGF, SEC ID Nº: 8; para IGF-1, SEC ID Nº: 9; para lactadherina, SEC ID Nº: 10; para kappa caseína, SEC ID Nº: 11; para haptocorrina, SEC ID Nº: 12; para lactoperoxidasa, SEC ID Nº: 13; y para alfa-1-antitripsina, SEC ID Nº: 14.

E. Secuencias codificantes de factores de transcripción

En una realización de la invención, la planta transgénica también se transforma con la secuencia codificante de uno o más factores de transcripción capaces de estimular la expresión de un promotor específico de maduración. En concreto, la realización implica el uso de *Opaque 2* (O2) de maíz y el factor de unión a la caja de prolamina (PBF) junto con la proteína bZip (Reb) de endospermo de arroz como activadores transcripcionales de genes de proteína de almacenamiento de monocotiledóneas. Se proporcionan secuencias ejemplares para estos tres factores de transcripción identificadas a continuación como SEC ID Nº: 31-33. Las secuencias de factores de transcripción y construcciones aplicables a la presente invención se detallan en la solicitud PCT Nº PCT/US01/14234, Publicación Internacional número WO 01/83792 A1. publicada el 8 de noviembre del 2001, del mismo propietario que la presente solicitud.

Los factores de transcripción son capaces de interacción específica de secuencia con una secuencia génica o secuencia reguladora génica. La interacción puede ser unión directa específica de secuencia en que el factor de transcripción se pone directamente en contacto con el gen o la secuencia reguladora del gen o unión indirecta específica de secuencia mediada por interacción del factor de transcripción con otras proteínas. En algunos casos, la unión y/o efecto de un factor de transcripción está influenciado (de una manera aditiva, sinérgica o inhibidora) por otro factor de transcripción. El gen o región reguladora del gen y el factor de transcripción pueden derivarse del mismo tipo (por ejemplo, especies o géneros) de planta o de un tipo diferente de planta. La unión de un factor de transcripción a una secuencia génica o secuencia reguladora génica puede evaluarse mediante diversos ensayos empleados rutinariamente por un experto en la técnica, por ejemplo, la unión específica de secuencia puede evaluarse directamente usando un marcador o a través de análisis de desplazamiento en gel.

Como se detalla en la solicitud PCT citada, el gen del factor de transcripción se introduce en la planta en un gen quimérico que contiene un promotor adecuado, preferentemente un promotor de semilla específico de maduración unido operativamente al gen del factor de transcripción. Las plantas pueden transformarse de manera estable con un gen quimérico que contenga el factor de transcripción mediante métodos similares a los descritos con respecto al gen (o genes) de la proteína de la leche. Las plantas transformadas de manera estable con un factor (o factores) de transcripción exógeno y genes de proteína de la leche pueden prepararse por cotransformando células o tejidos de plantas con construcciones génicas, seleccionando células o tejidos de plantas que se han cotransformado y regenerando las células o tejidos transformados en plantas. Como alternativa, diferentes plantas pueden transformarse independientemente con genes de factores de transcripción exógenos y genes de proteína de la leche, después cruzarse para producir híbridos de plantas que contienen los genes añadidos.

F. Componentes de vector de expresión adicional

Los vectores de expresión o construcciones de ácido nucleico heterólogas diseñadas para funcionar en plantas, comprenden secuencias acompañantes aguas arriba y aguas abajo del casete de expresión. Las secuencias acompañantes son de origen de plásmido o viral y proporcionan características necesarias al vector para permitir que el vector desplace ADN de la bacteria a la planta hospedadora, tales como, secuencias que contienen un origen de replicación y un marcador de selección. Los hospedadores secundarios típicos incluyen bacterias y levaduras.

En una realización, el hospedador secundario es *E. coli*, el origen de replicación es un tipo colE1, y el marcador de selección es un gen codificante de resistencia a ampicilina. Dichas secuencias son conocidas en la técnica y también se encuentran disponibles en el mercado (por ejemplo, Clontech. Palo Alto, Calif.; Stratagene, La Jolla, CA).

La región de terminación de la transcripción puede extraerse de un gen en el que esté normalmente asociado con la región de inicio transcripcional o puede obtenerse de un gen diferente. Como regiones de terminación transcripcionales ejemplares se incluyen el terminador NOS del plásmido Ti de *Agrobacterium* y el terminador de α-amilasa de arroz.

También pueden añadirse colas de poliadenilación (Alber *et al.,* 1982) al casete de expresión para optimizar altos niveles de transcripción y una correcta terminación de la transcripción, respectivamente. Las secuencias de poliadenilación incluyen, sin limitación, la señal octopina sintetasa de *Agrobacterium*, Gielen, *et al.,* 1984 o la nopalina sintasa de la misma especie, Depicker, *et al.,* 1982.

Los Marcadores de selección adecuados para la selección en células de plantas incluyen, pero sin limitación, genes de resistencia a antibióticos tales como, kanamicina (*nptII*), G418, bleomicina, higromicina, cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina y similares. Otros marcadores de selección incluyen un gen bar que codifica la resistencia a bialafos; un

gen EPSP sintasa mutante que codifica resistencia a glifosato; un gen de nitrilasa que confiere resistencia a bromoxinilo; un gen de acetolactasa sintasa (ALS) mutante que confiere resistencia a imidazolinona o sulfonilurea; y un gen DHFR resistente a metrotexato.

El gen marcador concreto empleado es uno que permita la selección de células transformadas en comparación con células que carecen del ADN que se ha introducido. Preferentemente, el gen marcador de selección es uno que facilita la selección en la fase de cultivo de tejido, por ejemplo, un gen de resistencia a kanamicina, higromicina o ampicilina.

Los vectores de la presente invención también pueden modificarse para incluir plásmidos intermedios de transformación de plantas que contengan una región de homología con un vector de *Agrobacterium tumefaciens,* una región borde de ADN T de *Agrobacterium tumefaciens*, y genes quiméricos o casetes de expresión (descritos anteriormente). Además, los vectores de la invención pueden comprender un plásmido de inducción de tumor desarmado de *Agrobacterium tumefaciens.*

En general, una secuencia de ácido nucleico seleccionado se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción en el vector. Los expertos en la técnica conocen métodos convencionales de corte, ligamiento y transformación en *E. coli*, usados en la construcción de vectores para su uso en la presente invención. (Véase en líneas generales, Maniatis, *et al*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Edición; Ausubel, *et al.,* (c) 1987, 1988, 1989,1990, 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley y Sons. Nueva York. N. Y; y Gelvin, S.B., *et al.,* eds. PLANT MOLECULAR BIOLOGY MANUAL. (1990).

V. Generación de plantas transgénicas

Las células o tejidos de plantas se transforman con construcciones de expresión (construcciones de ácido nucleico heteróloga, por ejemplo, ADN plasmídico en el que se ha insertado el gen de interés) usando diversas técnicas convencionales. La introducción eficaz de vectores para facilitar la expresión potenciada de genes de plantas es un aspecto importante de la invención. Se prefiere que las secuencias del vector se integren de manera estable en el genoma del hospedador.

El método utilizado para la transformación de células de plantas hospedadoras no es crítico para la presente invención. La transformación de la planta es preferentemente permanente, es decir por integración de las construcciones de expresión introducidas en el genoma de la planta hospedadora, de tal manera que las construcciones introducidas pasan a sucesivas generaciones de plantas. El experto en la técnica reconocerá que existe una amplia diversidad de técnicas de transformación en la técnica y se dispone continuamente de nuevas técnicas.

Cualquier técnica que sea adecuada para la planta hospedadora diana puede emplearse dentro del ámbito de la presente invención. Por ejemplo, las construcciones pueden introducirse en diversas formas incluyendo pero sin limitación, como una cadena de ADN, en un plásmido, o en un cromosoma artificial. La introducción de las construcciones en las células de planta diana pueden realizarse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por liposomas, fusión de protoplastos o bombardeo con microproyectiles. El experto en la técnica puede dirigirse a la bibliografía para detalles y seleccionar las técnicas adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención. En el Ejemplo 2 se proporcionan métodos ejemplares para la transformación de plantas.

Cuando se utiliza *Agrobacterium* para la transformación de células de plantas, se introduce un vector en el hospedador de *Agrobacterium* para la recombinación homóloga con ADN T o el plásmido Ti o Ri presente en el hospedador de *Agrobacterium*. El plásmido Ti o Ri que contiene el ADN T para la recombinación puede estar armado (capaz de producir formación de agallas) o desarmado (incapaz de producir formación de agallas), siendo el último permisible, siempre que el gen *vir* esté presente en el hospedador *Agrobacterium* transformado. El plásmido armado puede proporcionar una mezcla de células de planta normalesy agalla.

En algunos casos cuando se usa *Agrobacterium* como vehículo para transformar células de plantas hospedadoras, la construcción de expresión o transcripción bordeada por la región (o regiones) borde de ADN se insertan en un vector de amplio rango de hospedador capaz de replicación en *E. coli* y *Agrobacterium,* ejemplos de los cuales se describen en la bibliografía como por ejemplo pRK2 o derivados del mismo. Véase, por ejemplo Ditta *et al.,* 1980 y EPA 0 120 515. Como alternativa, las secuencias pueden insertarse para expresarse en células de plantas en un vector que contenga secuencias de replicación individuales, una de las cuales estabiliza el vector en *E. coli* y la otra en *Agrobacterium*. Véase, por ejemplo, McBride *et al.,* 1990, en el que el origen de replicación pRiHRI (Jouanin, *et al., 1985),* se utiliza y proporciona estabilidad añadida de los vectores de expresión en planta en células hospedadoras de *Agrobacterium*.

Incluida con la construcción de expresión y el ADN T se encuentran una o más secuencias codificantes de marcadores de selección que permiten la selección de *Agrobacterium* transformadas y de células de plantas transformadas. Diversos marcadores se han desarrollado para su uso con células de plantas, tales como resistencia a cloranfenicol, kanamicina, al aminoglicósido G418, higromicina o similares. El marcador particular empleado no es

esencial para la presente invención, dependiendo un marcador particular preferido del huésped concreto y del modo de construcción.

Para la transformación de células de plantas mediada por *Agrobacterium*, se incuban explantes con *Agrobacterium* durante un tiempo suficiente para dar como resultado una infección, se destruyen las bacterias y las células de plantas se cultivan en un medio de selección apropiado. Una vez se forman los callos, se puede inducir la formación de brotes empleando las hormonas de plantas apropiadas de acuerdo con métodos conocidos, y los brotes pueden transferirse a medio para enraizar para la regeneración de plantas. Las plantas pueden cultivarse a continuación hasta que producen semillas y las semillas se usan para establecer generaciones repetitivas y para el aislamiento de la proteína recombinante producida por las plantas.

Existen diversas formas posibles para obtener células de plantas que contengan más de una construcción de expresión. En una estrategia, las células de plantas se cotransforman con una primera y segunda construcción mediante la inclusión de ambas construcciones de expresión en un solo vector de transformación o usando vectores separados, uno de los cuales expresa genes deseados. La segunda construcción puede introducirse en una planta que ya se ha transformado con la primera construcción de expresión o como alternativa, en plantas transformadas, una que tiene la primera construcción y otra que tiene la segunda construcción, pueden cruzarse para unir las construcciones en la misma planta.

A. Plantas

En el presente documento se describen células hospedadoras que incluyen células de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. En un aspecto preferido, las plantas usadas en el presente documento se derivan de monocotiledóneas, particularmente los miembros de la familia taxonómica conocida como *Gramineae.* Esto incluye todos los miembros de la familia de las herbáceas, cuyas variedades comestibles se conocen como cereales. Los cereales incluyen una amplia diversidad de especies tales como trigo (*Triticum sps.*), arroz (*Oryza sps.*) cebada (*Hordeum sps.*) avena, (*Avena sps.*) centeno (*Secale sps.*), maíz (*Zea sps.)* y mijo (*Pennisettum sps.*). En la realización práctica de la presente invención, los granos son arroz. En el presente documento también se describe que los granos son de trigo, maíz, cebada, centeno, triticale. También se describen dicotiledóneas ilustradas por semilla de soja. (*Glycine* spp.).

Para producir plantas transgénicas que expresen proteína de leche humana, se transforman células o tejidos de plantas monocotiledóneas derivadas de las mismas con un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de una proteína de leche humana. Las células de planta transgénicas obtenidas como resultado de dicha transformación expresan la secuencia codificante de una proteína de leche humana, tal como lisozima o lactoferrina. Las células de plantas transgénicas se cultivan en medio que contenga el agente de selección apropiado para identificar y seleccionar las células de plantas que expresen la secuencia de ácido nucleico heterólogo. Después de seleccionar células de plantas que expresen la secuencia de ácido nucleico heterólogo, se regeneran plantas completas a partir de las células de plantas transgénicas seleccionadas. Las técnicas para regenerar plantas completas a partir de células de plantas transformadas son generalmente conocidas en la técnica. Pueden desarrollarse líneas de plantas transgénicas, por ejemplo, arroz, trigo, maíz o cebada, y cruzarse genéticamente empleando técnicas convencionales de reproducción de plantas.

La producción de proteínas recombinantes en semillas de monocotiledóneas, por ejemplo, semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) tiene las ventajas de que (a) el alto nivel de expresión la convierte en una estrategia práctica económicamente (b) el arroz es una parte normal de la dieta de bebés y niños, tiene un buen valor nutricional y una baja alergenicidad. Por tanto, es improbable que el uso de arroz como base de un complemento alimenticio pueda introducir cualquier riesgo y por tanto eliminar la necesidad de un alto grado de purificación cuando se incluye en un preparado para lactantes.

Además, el arroz es el cultivo de alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Informes recientes sobre la producción de provitamina A (beta caroteno) en semillas de arroz ilustra la necesidad del valor añadido de alimentos de cultivo especialmente en los países en vías de desarrollo (Ye *et al.,* 2000) donde el arroz se usa como un cultivo alimenticio principal.

VI. Detección de la expresión de proteínas de leche humana recombinantes

Las células de plantas transformadas se evalúan con respecto a su capacidad para cultivarse en medios selectivos que tengan una concentración umbral de un agente selectivo. Las células de plantas que crecen sobre o en el medio selectivo se transfieren típicamente a un aporte reciente del mismo medio y se cultivan de nuevo. Después los explantes se cultivan en condiciones de regeneración para producir brotes regenerados de plantas. Después de formarse los brotes, estos se transfieren a un medio enraizante selectivo para proporcionar una plántula completa. Después la plántula puede cultivarse para proporcionar semillas, esquejes o similares para propagar las plantas transformadas. El método proporciona transformación eficaz de células de plantas con la expresión de un gen de origen autólogo o heterólogo y la regeneración de plantas transgénicas que puede producir una proteína de leche humana recombinante.

La expresión de la proteína de leche humana recombinante puede confirmarse usando técnicas analíticas convencionales tales como transferencia de Western, ELISA, PCR, HPLC, NMR o espectroscopia de masas, junto con ensayos para una actividad biológica específica para la proteína particular que se está expresando.

El ejemplo 3 describe la caracterización de lisozima humana producida en las semillas de plantas de arroz transgénicas. Los análisis usados para confirmar que la lisozima recombinante producida en arroz transgénico es esencialmente la misma que la forma nativa de la proteína tanto en características físicas como en actividad biológica incluye, SDS-PAGE, electroforesis inversa en gel IEF, análisis de transferencia de Western, ensayo inmunoabsorbente asociado con enzimas (ELISA), ensayo de actividad enzimática y ensayo de actividad bactericida usando cepas indicadoras, *Micrococcus luteus* y cepa *E. coli* JM109.

El ejemplo 4 describe la caracterización de lactoferrina humana producida en las semillas de plantas de arroz transgénico. Los análisis usados para confirmar que la lactoferrina recombinante producida en arroz transgénico es esencialmente la misma que la forma nativa de la proteína tanto características físicas como actividad biológica incluyen, transferencia de Southern, transferencia de Western, ELISA, Secuenciación de Aminoácido N Terminal, análisis de glucosilación y determinación de contenido de azúcares, y determinación del punto isoeléctrico, liberación de hierro dependiente de pH de LFr, ensayo de actividad bacteriostática de LFr usando *E. coli* enteropatógena como cepa indicadora.

El ejemplo 5 detalla la caracterización de alfa 1-antitripsina producida por células de plantas monocotiledóneas transgénicas. El ejemplo 6 detalla la caracterización de otras proteínas de la leche también producidas por plantas monocotiledóneas transformadas con los genes quiméricos de la invención.

VII. Preparación de composición de semillas y alimentos procesados

En el presente documento se describe, en un aspecto, una composición de semillas que contiene una harina, extracto o malta obtenidos a partir de semillas monocotiledóneas maduras y una o más proteínas de la leche humana producidas por semillas en forma sustancialmente no purificada. Cuando la proteína láctea se expresa a un nivel de entre aproximadamente 0,1 a 1 por ciento en peso de semilla, la composición contendrá el mismo o preferentemente un porcentaje superior de proteína de la leche, por ejemplo del 0,1 al 20 % de la composición dependiendo de la composición añadida. En particular, una composición de grano rendirá una cantidad de proteína de leche que es comparable con la de la semilla madura; la composición del extracto, en comparación, en la que la mayoría del almidón se ha extraído, típicamente mostrará un aumento de varias veces en porcentaje de proteína de la leche, por ejemplo, 10-40 % del peso total del extracto. La composición de malta contendrá un nivel intermedio, típicamente mayor que el grano, pero menor que el extracto.

En la determinación de la composición de grano, extracto o malta a añadir a un alimento, es útil determinar la cantidad de cualquier proteína de la leche presente (véase Sección VI anterior), y añadir una cantidad de composición que lleve el nivel final de proteína de la leche a un nivel deseado en el alimento. Por ejemplo, en preparados para lactantes, puede desearse tener una concentración final de lisozima entre 0,03 y 0,3 gramos/litro de fórmula, y una cantidad de lactoferrina entre aproximadamente 0,3 a 3 gramos/litro de fórmula. Por lo tanto, si se encuentra que una composición de semillas contiene 10 g/kg de lisozima, se añadirán aproximadamente 10 gramos de la composición para preparar un litro de fórmula con una concentración final de lisozima de aproximadamente 0,1 g/litro. A continuación se describen métodos para preparar cada uno de estos tres tipos de composiciones de semilla que contienen proteína de la leche.

A. Composición de harina

La composición de harina se prepara moliendo semillas de plantas monocotiledóneas maduras, usando molienda convencional y opcionalmente, métodos de purificación de harina, por ejemplo, preparando harina refinada. En resumen, las semillas maduras se descascarillan, y las semillas descascarilladas se muelen después en una harina fina mediante un equipo de molienda convencional.

La harina puede añadirse a alimentos durante el procesamiento de alimento de acuerdo con los métodos de procesamiento de alimentos convencionales. Preferentemente, la temperatura de procesado no conduce a la desnaturalización de las proteínas de la leche, por ejemplo, por encima de 60-70 ºC. La harina también puede usarse directamente, bien en cápsulas, comprimidos o en forma de polvo, como una composición nutracéutica. Una composición de harina preferida contiene lactoferrina y/o lisozima. La harina puede incluir, como alternativa, o adicionalmente, una o más de otras proteínas de leche humana tales como factor de crecimiento epidérmico, factor 1 de crecimiento insulínico, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa y alfa 1-antitripsina.

La harina que contiene dos o más proteínas de la leche puede prepararse combinando harina de semillas que producen individualmente las diferentes proteínas, por ejemplo, cantidades iguales de una harina que contiene lisozima y harina que contiene lactoferrina. Como alternativa, puede prepararse una composición multiproteína como una harina de semillas de plantas, tal como plantas monocotiledóneas cotransformadas con genes quiméricos que expresan diferentes proteínas de la leche, por ejemplo, lactoferrina y lisozima.

B. Composición de extracto

Se prepara una composición de extracto moliendo semillas para formar una harina, extrayendo la harina con una solución acuosa tamponada, y opcionalmente, tratando posteriormente el extracto para concentrar parcialmente el extracto y/o eliminar los componentes no deseados. En el ejemplo 9 se proporcionan detalles de métodos ejemplares para producir la composición de extracto. De manera resumida, se muelen semillas de monocotiledóneas maduras, tales como semillas de arroz, para dar lugar a una harina, y la harina se suspende después en solución salina o en un tampón, tal como Solución Salina Tamponada con Fosfato ("PBS"), tampón de bicarbonato amónico, tampón de acetato amónico o tampón Tris. Un tampón o sal volátil, tal como bicarbonato amónico o acetato amónico pueden obviar el suministro de una etapa de eliminación de sal y por tanto simplificar el método de procesamiento del extracto.

La suspensión de harina se incuba con agitación durante un periodo típicamente de entre 30 minutos y 4 horas a una temperatura entre 20-55 ºC. El homogeneizado resultante se depura por filtración o centrifugación. El filtrado depurado o sobrenadante puede procesarse adicionalmente, por ejemplo por ultrafiltración o diálisis o ambas cosas para eliminar contaminantes tales como lípidos, azúcares y sale. Finamente, el material puede deshidratarse, por ejemplo por liofilización para formar un paste o polvo seco. El extracto combina ventajas de alto rendimiento de proteína de leche, esencialmente limitando las pérdidas asociadas con la purificación de proteínas. Al mismo tiempo, las proteínas de la leche están en una forma fácilmente utilizable y disponible después de la ingestión del extracto o alimento que contiene el extracto. Una ventaja particular para el uso en preparados para lactantes o alimentos infantiles es la baja cantidad de almidón de semilla presente en el extracto. En particular, el extracto puede aumentar la concentración de proteína recombinante desde aproximadamente el 0,5 % de proteína soluble total ("PTS") en estrategias convencionales a aproximadamente más del 25 % de PTS en la estrategia de extracto. Algunas de las presentes estrategias de extracto incluso alcanzan el 40 % de PTS dependiendo del nivel de expresión de la proteína recombinante en las semillas. Además, la estrategia de extracto elimina los gránulos de almidón que requieren una alta temperatura de gelificación, por ejemplo por encima de 75 ºC. Por consiguiente, la estrategia del extracto proporciona más flexibilidad en el procesamiento del grano de arroz y de las proteínas recombinantes en alimentos y bebidas nutricionales, particularmente en alimentos y preparados para lactantes, debido a la dificultad de los lactantes para digerir el almidón de semilla no desnaturalizado. Los gránulos de almidón no desnaturalizados no pueden digerirse por el intestino humano sin una gelatinización inicial, mediante por ejemplo alta temperatura.

El extracto puede usarse como un nutraceútico para uso directo, por ejemplo, en cápsulas, comprimidos o en forma de polvo o como un aditivo alimentario en el procesamiento de alimentos. En una realización, el extracto se añade a una preparado lácteo para lactantes, en una cantidad típicamente entre el 0,1 al 10 por ciento en peso seco, preferentemente del 1 al 5 % en peso seco del peso total de la fórmula. Un preparado para lactantes preferido contiene tanto lactoferrina como lisozima, preferentemente en una cantidad entre 50-200 % de la cantidad de lactoferrina o lisozima humana, respectivamente, de la encontrada en la leche humana normal. Como se ha indicado anteriormente, la lactoferrina está presente en una concentración de aproximadamente 1 gramo/litro de leche humana y la lisozima, aproximadamente 0,1 /litro de leche humana. El extracto puede como alternativa o además, incluir uno o más de otras proteínas de la leche humana incluyendo el factor de crecimiento epidérmico, factor 1 de crecimiento insulínico, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa, alfa-1-antitripsina e inmunoglobulinas. De manera similar, para su uso como un aditivo para alimentos infantiles sólidos, o bebidas nutricionales, el extracto se añade en cantidades preferentemente de entre aproximadamente 0,1 a 10 % del material alimento/bebida por peso seco.

Como se ha indicado anteriormente, el extracto que contiene dos o más proteínas de la leche puede prepararse combinando extractos de semillas que producen por separado las diferentes proteínas, o procesando semillas de plantas cotransformadas con genes quiméricos que expresan diferentes proteínas de la leche, por ejemplo lactoferrina y lisozima.

C. Composición de malta

Un reto técnico para la comercialización de granos de monocotiledónea modificados genéticamente que expresan proteínas de leche humana es formular los granos transgénicos en productos comestibles sin pérdida de biodisponibilidad de las proteínas de la leche en el producto final.

De acuerdo con otro aspecto, en el presente documento se describe un extracto de malta o un jarabe de malta ("malta") en el que los almidones de la semilla se han reducido en gran medida en azúcares de malta, y la proteína (o proteínas) de la leche están en una forma activa, biodisponible. Pueden producirse una amplia diversidad de productos alimenticios y/o aditivos alimenticios variando los tipos de malta empleada, el programa de triturado y los tipos en los que el mosto se manipula posteriormente. Si se emplean materiales distintos de la malta de cebada en el puré (tal como almidón de otros granos), el producto resultante se clasifica como un jarabe de malta. Los extractos de malta, que pueden tener una consistencia de jarabe o pueden ser polvos, se preparan haciendo puré de la malta molida, normalmente malta de cebada, en un equipo de fermentación convencional, recogiendo el mosto y concentrándolo o secándolo. La producción moderna de extractos de malta de alimentos y jarabes de malta ha evolucionado en tres estados básicos del grano: remojo, germinación y secado de la semilla germinada, seguido por tres etapas más que implican la licuefacción del grano germinado, el triturado del grano germinado, tamizado

(filtrado) y evaporación. Son posibles muchas variaciones de extracto de malta o jarabes. El aroma, color, sólidos, actividad enzimática y proteína son las características básicas que pueden ajustarse durante la producción para proporcionar maltas específicas para aplicaciones alimentarias dadas. (Véase, de manera general, Eley; Hickenbottom, 1996,1997a, 1997b, 1983; Lake; Moore; Moe; Sfat; Doncheck; Briggs, 1981, 1998; y Hough).

C1. Remojado

Después de que la cebada de elección se haya depurado de material extraño, se clasifica por tamaños y se transfiere a tanques de remojo equipados tuberías de entrada y salida de agua. Se inyecta aire comprimido por la parte inferior del tanque para una fuerte aireación y mezcla para la mezcla de cebada/agua. Cuando la cebada ha alcanzado un contenido de agua del 43-45 %, se detiene el remojo.

C2. Germinación

La cebada remojada se traslada a plantas o salas de germinación dependiendo de la capacidad particular de la fábrica de malta y se deja germinar en condiciones controladas de temperatura, aire y humedad. La germinación total tarda entre cuatro y siete días, dependiendo del tipo de cebada, uso final de la densidad de la malta y los controles o el método de germinación empleado. Todos los aspectos de germinación deben tenerse en cuenta en el equilibrio constante para garantizar la modificación adecuada del grano y la producción.

Durante la germinación se activan muchos sistemas enzimáticos. Dos de los sistemas son los sistemas oxidativos y reductores implicados en la fase de respiración. Otras enzimas degradan la estructura celular del endospermo, que en sí mismo es una medida de la tasa de germinación cuando se evalúa la producción de pentosa. Las enzimas proteolíticas liberan o activan beta amilasa y también trabajan sobre las proteínas presentes para hacerlas solubles. De hecho, aproximadamente el 40 % de la proteína total se vuelve soluble en agua. La germinación óptima activa un sistema enzimático equilibrado, que hidroliza el almidón presente.

C3. Secado al horno

El secado al horno o simplemente secado, cuando se realiza en un momento adecuado y un grado óptimo de modificación de almidón, detiene la germinación. El calor también cataliza reacciones adicionales, de manera destacable el desarrollo del sabor y color. La etapa de calentamiento se realiza de acuerdo con condiciones de secado al horno bien conocidas. Cuando el secado está completo, los brotes y otros materiales extraños se retiran y los granos están entonces listos para un procesamiento posterior.

C4. Extractos de malta y jarabes

Se efectúa un molido grueso de la cebada malteada (grano) en trituradoras y se introduce en cubas de amasado donde se mezcla con agua. Durante una serie de cambios de tiempo y temperatura, una parte del almidón se convierte en azúcares fermentables por la acción de alfa y beta amilasas naturales, más conocido como el sistema diastático. Si se van a añadir adjuntos de cereales, que den como resultado jarabes de malta con sabores más suaves y dulces que los extractos, se añaden en esta fase normalmente derivados de los granos de cereales, almidón y arroz, aunque en algunas ocasiones se emplean cebada, trigo, centeno, mijo y sorgo, derivados de semillas maduras que producen las proteínas de la leche recombinante deseadas.

Una vez que el lote de puré alcanza el grado correcto de hidrólisis, se transfiere a cubas de tamizado. La cuba de tamizado tiene un fondo ranurado o falso a unos centímetros del fondo real para permitir la filtración y también están dotadas de algunos medios de agitación. Durante esta fase de extracción, las enzimas amiolíticas licúan almidones insolubles adicionales convirtiéndolos en maltosa y dextrinas. Al mismo tiempo, las enzimas proteolíticas se unen a determinadas proteínas convirtiéndolas en formas solubles más simples. Cuando se alcanzan las condiciones apropiadas, la fase líquida o mosto se extrae de las cubas de tamizado hacia evaporadores.

La evaporación del mosto se lleva a cabo al vacío donde se convierte en un jarabe con aproximadamente un 80 % de sólidos. Dependiendo de la temperatura empleada, se pueden producir extractos de malta o jarabes de actividad enzimática alta media o nula. El color y el sabor también pueden controlarse durante esta fase. Las etapas de acabado como filtración, enfriamiento y envasado completan el proceso del extracto de malta/jarabe.

C5. Extracto de malta transgénico

Para un extracto de malta transgénico, la cebada de partida es una cebada transgénica modificada genéticamente para producir o una o más proteínas de leche humana en el endospermo en la maduración del grano o en el proceso de malteado, o en ambas ocasiones. Los tiempos y condiciones de malteado y procesadoy se ajustan para que la bioactividad de las moléculas recombinantes diana se conserve y la biodisponibilidad de la molécula recombinante diana se maximice. El extracto de malta resultante se consume o bien directamente como un concentrado que se consume directamente como un alimento, o bien se incorpora como un ingrediente en una mezcla alimenticia. Los estudios realizados para sustentar la presente invención demuestran que las proteínas recombinantes conservan actividad después del malteado durante hasta al menos 288 horas.

C6. Jarabe de malta transgénico

Para un jarabe de malta transgénico, la cebada de partida puede ser una cebada no transgénica o una cebada transgénica o una mezcla de ambas. La cebada se procesa como se describe, excepto que durante el proceso de producción del puré, se añade un adjunto de cereal en una forma que se convierte durante el proceso de producción del puré con la retención simultánea y generación de biodisponibilidad y bioactividad de la molécula recombinante diana encontrada dentro del adjunto de cereal transgénico. El uso de un adjunto de cereal transgénico permite la producción de la molécula recombinante diana expresada en el endospermo del grano transgénico en el jarabe de malta.

El extracto de malta o jarabe puede usarse directamente como un jarabe o añadirse a alimentos o bebidas procesados de acuerdo con procedimientos de procesamiento de alimentos convencionales que emplean extractos de grano o jarabes, por ejemplo para edulcorar. Un alimento preferido, es una preparado para lactantes que contiene al menos entre aproximadamente del 0,1 al 10 % de malta (extracto o jarabe). La malta también es útil como un aditivo edulcorante/nutricional en alimentos para bebés y adultos, y en bebidas nutricionales.

Los extractos de malta o jarabes preferidos contienen lactoferrina y/o lisozima. La malta puede como alternativa o además incluir una o más proteínas de la leche humana tales como factor de crecimiento epidérmico, factor 1 de crecimiento insulínico, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa, alfa-1-antitripsina e inmunoglobulinas. Como se ha indicado anteriormente, la malta que contiene dos o más proteínas de la leche puede prepararse combinando o preparando maltas de semillas que producen por separado las diferentes proteínas o preparando una malta a partir de las semillas de plantas cotransformadas con genes quiméricos que expresan diferentes proteínas de la leche, por ejemplo lactoferrina y lisozima.

A partir de lo anterior, puede apreciarse como se cumplen diversos objetos y características de la invención. La producción de altos niveles de proteínas de leche humana en granos, ilustrados en el presente documento por arroz, proporciona la clara ventaja de que los complementos alimenticios pueden prepararse con poca o ninguna purificación. En una estrategia preferida, el grano transgénico que contiene la proteína de leche humana se muele (por ejemplo en una harina) y se añade directamente a un alimento tal como una preparado para lactantes, sin procesamiento adicional. Dado que el grano recombinante es útil como un alimento o complemento alimenticio, los requisitos reguladores para la pureza no son rigurosos.

Las plantas transgénicas son biorreactores ideales, combinando bajos costes de producción y bajos o mínimos costes de procesamiento final antes de su uso. Las proteínas de granos de semilla pueden acumular hasta el 9-19 % del peso del grano (Lásztitym 1996); las proteínas del endospermo se sintetizan durante la maduración del grano y se conservan en cuerpos de proteína para su uso en la germinación y crecimiento de semilla de la próxima generación de plantas; los granos pueden conservarse durante años sin pérdida de funcionalidad y por lo tanto el procesamiento final puede realizarse independientemente de las estaciones de crecimiento.

Los granos transgénicos que contienen proteína de leche humana de la invención pueden usarse directamente como alimentos, por ejemplo arroz. El maíz, el trigo, cebada, semillas de soja, etc. también se describen en el presente documento para usarse directamente como un alimento. Como alternativa, se preparan suplementos alimenticios a partir del grano transgénico que contiene proteína de leche humana. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que las proteínas de la leche humana pueden expresarse a altos niveles en las semillas de plantas transgénicas, por ejemplo, hasta un 0,25 al 1 % del peso seco de la semilla. La producción de altos niveles de proteínas de leche humana en granos, ilustrado en el presente documento por arroz, proporcionan la clara ventaja de que los complementos alimenticios pueden prepararse con escasa o ninguna purificación. En una estrategia preferida, el grano transgénico que contiene proteína de leche humana se muele (por ejemplo, en una harina) y directamente se añade a un alimento, o en forma de un extracto o malta, tal como para preparar una preparado para lactantes potenciado nutricionalmente, sin procesamiento adicional. Dado que el grano recombinante es de utilidad como un alimento o un complemento alimenticio, como una harina, extracto o malta, los requerimientos reguladores en cuanto a la pureza no son rigurosos. Por consiguiente, los granos transgénicos que contienen proteína de leche humana son biorreactores ideales, combinando bajos costes de producción y un bajo mínimo coste de procesamiento final antes del uso.

Los granos transgénicos que contienen proteínas de leche humana de la invención pueden usarse directamente como un alimento, por ejemplo, arroz. En el presente documento también se describen el maíz, el trigo, la cebada, las semillas de soja, etc. para usarse directamente como alimentos. Como alternativa, se preparan suplementos alimenticios a partir de grano transgénico que contiene proteína de leche humana. Dado que el grano transgénico es arroz, la invención proporciona ventajas adicionales en que: el arroz se consume por la mayoría de la población en el mundo y que es generalmente considerado como seguro para el consumo humano. Los alimentos a base de arroz se consideran hipoalergénicos (publicación NIH, 1984). En muchos países, el arroz es el primer alimento sólido que se da a los niños y están disponibles en el mercado preparados para lactantes basados en arroz (Bhan *et al,* 1988; Gastañaduy *et al*, 1990). Esto hace que el arroz sea atractivo como una “fábrica de proteínas” para producir agentes biomédicos y nutraceúticos para el consumo humano. La clonación y expresión de proteínas humanas, por ejemplo, las proteínas lisozima y lactoferrina de leche humana en granos de arroz han abierto un nuevo camino para la bioproducción de otras proteínas de la leche.

Los siguientes ejemplos ilustran, pero no se pretende que limiten de modo alguno, la invención.

EJEMPLO 1

Vectores de expresión para generación de plantas transgénicas

En general, los vectores de expresión se construyeron empleando técnicas de biología molecular convencionales como se describe en Ausubel *et al*., 1987. Los vectores contienen una secuencia codificante de proteínas heteróloga para lactoferrina o lisozima bajo el control de un promotor específico de tejido de arroz, como se describe con más detalle más adelante.

A. Un vector de expresión para la expresión de lisozima humana en células de arroz transgénico

El gen de lisozima sintetizado se clonó en un vector base API pAPI137 mediante técnicas de clonación molecular convencionales (Sambrook *et al.,* 1989). El plásmido pAPI137 contiene el promotor *RAmy3D* (Huang *et al.,* 1993), los codones para el péptido señal *RAmy3D* y el terminador *RAmy3D*. El promotor *RAmy3D*, aislado de la familia de genes de la amilasa de arroz, se activa en callos de arroz por deprivación de azúcar (Huang *et al*, 1993). El gen de lisozima humano se colocó entre las secuencias de péptido señal *RAmy3D* y el terminador *RAmy3D* para dar el plásmido pAPI156 que tiene un tamaño de 4.829 pb.

El promotor del gen de Glutelina 1 (*Gt-1*) de arroz y la secuencia de nucleótidos del péptido señal se clonaron con dos cebadores basándose en la secuencia publicada del gen Gt1 (Okita *et al.* J Biol Chem 264: 12573-12581, 1989). El cebador directo con el sitio *Hin*dIII se denominó MV-*Gt-1*-F1; 5'-ATCGAAGCTTCATGAGTAATGTGTGAGCATTATGGGACCACG-3' (SEC ID Nº: 5). El cebador inverso se denominó Xba-*Gt-1*-R1; 5'-CTAGTCTAGACTCGAGCCACGGCCATGGGGCCGGCTAGGGAGCCATCGCACAAGAGGAA-3' (SEC ID Nº: 6). El ADN genómico se aisló de hojas de la variedad de arroz M202 (Dellaporta *et al.,* 1983). El producto PCR amplificado del ADN genómico se clonó en pCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El plásmido resultante se denominó pCRGt-1 o pAPI134.

Para generar un plásmido de expresión *Gt-1,* pAPI134 se digirió con *Hin*dIII y *Xba*l. El fragmento que contenía el promotor *Gt-1* y el péptido señal *Gt-1* se clonó en un plásmido basado en pUC19 que contenía el terminador de nopalina sintasa 3' (*nos*). El plásmido resultante se denominó pAPI141 y contiene el promotor *Gt-1* de arroz, el péptido señal *Gt-1*, un sitio de clonación múltiple y el terminador *nos*.

El gen de lisozima humano sintetizado "lys-ger" (por Operon Technologies, Inc., Alameda, CA) que se optimizó basándose en el uso de codones del gen de arroz se digirió con *Dra*l y *Xho*l y se clonó en pAPI141 digerido con *Nae*l y *Xho*l de acuerdo con técnicas de clonación estándar (Sambrook *et al.,* 1989). El plásmido resultante se denominó pAPI159 (Fig. 1) que tenía un tamaño de 4.131 pb.

B. Un vector de expresión para la expresión de lactoferrina humana en arroz transgénico

El gen de LFh (Rey, MW, 1990) se optimizó por codones y se sintetizó por Operon Technologies (CA, USA). El plásmido que contenía el gen optimizado por codones se denominó Lac-ger. Lac-ger se digirió con *Sma*l/*Xho*l y el fragmento que contenía el gen de lactoferrina se clonó en pAPI141 que se digirió parcialmente con *Nae*l y se digirió completamente con *Xho*l. El plásmido resultante se denominó pAPI164. Para la expresión de LFh en semillas de arroz, el gen optimizado por codones se unión operativamente al promotor de glutelina (Gt1) específico del endospermo de arroz y el terminador NOS (Fig. 7).

EJEMPLO 2

Generación de células de plantas transgénicas que expresan proteínas de leche humana

Se siguió el procedimiento de transformación de arroz mediado por microproyectil (Patente de Estados Unidos 6.284.956). Se generaron callos de semillas de arroz maduro TP309, con callos de dos a cuatro mm de diámetro seleccionados y se colocó en medio N6 complementado con manitol 0,3 M y sorbitol 0,3 M durante 20 horas antes del bombardeo. El bombardeo biolístico se realizó con el sistema PDC-1000/He biolístico (Bio-Rad, EE.UU). El plásmido portador de genes de proteína de leche y pAPI76, un plásmido portador de gen marcador de selección a higromicina se recubrieron con oro y se cobombardearon a una velocidad de 6:1 con una presión de helio de 1100 psi. Después los callos bombardeados durante dos días se transfirieron al medio de selección N6 suplementado con higromicina B 20 mg/l y se dejaron crecer en la oscuridad a 26 ºC durante 45 días.

Para desarrollar plantas de arroz transgénico, los callos seleccionados se transfirieron a medios de preregeneración y regeneración. Cuando las plantas regeneradas alcanzaron 1-3 cm de altura, las plántulas se transfirieron a un medio enraizante que consistía en la mitad de la concentración de MS y NAA 0,05 mg/l. Después de dos semanas, las plántulas con raíces y brotes desarrollados se transfirieron a suelo y se mantuvieron bajo un envase de plástico cubierto durante una semana. Las plantas se dejaron crecer aproximadamente hasta 12 cm de longitud y se cambiaron al invernadero donde se desarrollaron hasta la madurez.

A. Generación de células y plantas de arroz transgénico que expresan lisozima humana

El gen de lisozima humano sintético (Lish) bajo el control del promotor y terminador *RAmy3D* en el plásmido pAPI156 (ejemplo 1A) se empleó para generar sesenta transformantes independientes mediante transformación mediada por bombardeo de partículas.

La transformación mediada por bombardeo de partículas de arroz se realizó como se ha descrito anteriormente. En resumen, los callos de arroz derivados de TP309 se bombardearon con partículas de oro recubiertas con plásmidos pAPI156 y pAPI76 en una proporción de 6:1 usando el sistema de administración de partículas biolísticas de helio PDS 1000 (Bio-Rad, CA). Los callos transformados se seleccionaron en presencia de higromicina B (35 mg/l) en N6 (Sigma, MO).

Las líneas celulares seleccionadas se mantuvieron en medios de cultivo con sacarosa al 3 % (Huang *et al.,* 1993). La expresión de lisozima se indujo por deprivación de azúcar. En resumen, se retiró medio AA (que contenía sacarosa al 3 %) por aspiración, seguido de lavado de las células tres veces con AA sin sacarosa (AA-S). Después las células se incubaron con AA-S a una densidad del 40 % (v/v) durante tres días y medio para obtener el nivel óptimo de expresión de lisozima.

Los transformantes que expresan lisozima se identificaron mediante análisis de inmunotransferencia, determinación de tasa turbidimétrica con *Micrococcus lysodeikticus* o ELISA. Los callos se clasificaron de acuerdo con el nivel de lisozima expresado. Los cultivos de células en suspensión de las líneas superiores se establecieron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Huang *et al.,* 1993). La cantidad de proteína total (ensayo Bradford) y lisozima (ELISA) se evaluó en los callos seleccionados (Tabla 1).

Tabla 1. Nivel de expresión de lisozima de leche humana en callos transformados

Línea celular	Callos (g)	Total de proteína (μg)	Lisozima (μg)	Lisozima/proteína (%)
156-1	0,39	2626,5	65,7	2,5
156-5	0,38	5510	68,9	1,25
156-16	0,4	4815	120,4	2,5
156-19	0,44	2440	30,5	1,25
156-28	0,49	4910	24,6	0,5
156-43	0,56	8150	101,9	1,25
156-47	0,37	2472	6,2	0,25

El gen de lisozima humano sintético (Lish) bajo el control del promotor *Gt1* y terminador Nos en el plásmido pAPI159 (Fig. 1) se empleó para generar transformantes independientes por transformación mediada por bombardeo de partículas. Los callos transformados se seleccionaron como se ha descrito anteriormente, y después se transfirieron a medios de preregeneración y regeneración. Cuando las plantas regeneradas alcanzaron un altura de 1-3 cm, las plántulas se transfirieron a un medio enraizante que consistía en la mitad de la concentración de MS y NAA 0,05 mg/l. Después de dos semanas, las plántulas con raíces y brotes desarrollados se transfirieron suelo y se mantuvieron bajo un envase cubierto de plástico durante una semana. Las plantas se dejaron crecer aproximadamente 12 cm de altura y se llevaron al invernadero donde se desarrollaron hasta la madurez (plantas de R0).

Exploración de plantas de R0 que expresan lisozima humana. Se molieron endospermos o granos de arroz individuales con solución salina fría tamponada con fosfato (PBS) con la adición de NaCl 0,35 M. El molido se realizó con un almirez preenfriado a un tampón/grano de 1 ml. El homogeneizado de grano depurado se obtuvo sometiendo el extracto de grano resultante a centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a 40 ºC.

Los embriones de semillas de R_1 individuales (derivadas de plantas de R0) que presentaron un nivel de expresión de lisozima que era mayor de 10 μg/semilla se guardaron y emplearon para generar plantas de R1. En resumen, las semillas se diseccionaron en partes de embrión y endospermo. El endospermo se molió y se sometió a ensayo para la expresión de lisozima (como se describe adicionalmente más adelante). Los embriones se esterilizaron en lejía comercial al 50 % durante 25 minutos y se lavaron con H_2O estéril tres veces durante 5 minutos cada vez. Los embriones esterilizados se colocaron en un tubo de cultivo tisular que contenía medio sólido MS. Los embriones germinados y las plántulas que tenían brotes de aproximadamente tres pulgadas y sistemas reticulares sanos se obtuvieron en dos semanas. Las plántulas se transfirieron después a macetas para obtener plantas maduras (R_1).

Se germinaron un total de 197 embriones de 12 plantas de R0 seleccionadas y se plantaron 157 semillas de R_1 en el

invernadero para la generación de granos de R2. Los granos de R2 individuales (n=1502) de 109 plantas fértiles de R1 se estudiaron con respecto a la expresión de lisozima mediante un ensayo de actividad de lisozima para identificar 42 plantas homocigóticas.

Las plantas de R1 homocigotas se identificaron analizando expresiones positivas de lisozima humana recombinante (Hlisr) a partir de un mínimo de 20 granos de R2 individuales. Las líneas homocigotas derivadas de estas plantas se plantaron en un campo de arroz en California. Durante el cultivo se determinaron y compararon las características agronómicas de las plantas transgénicas y no transgénicas tales como la altura de la planta, porcentaje de fertilidad, número de vástagos efectivos, granos cargados/penícula, granos no cargados/planta, tiempo hasta la madurez y peso de 1000 granos. Se seleccionaron las plantas con rasgos agronómicos satisfactorios y se determinaron los niveles de expresión de Hlisr mediante ensayo de actividad de lisozima. Las plantas que cumplían los criterios de los rasgos agronómicos satisfactorios y que tenían más de 35 μg de Hlisr/grano se llevaron a las siguientes generaciones.

Se llevaron a cabo SDS-PAGE, análisis de electrotransferencia y análisis de transferencia de Western con el 18 % del gel prefabricado (Invitrogen, Carlsbad, CA) como se describe en el Ejemplo 3. El anticuerpo policlonal de conejo primario contra lisozima humana se adquirió en Dako A/S (Dinamarca) y se usó a 1:5000. La lisozima se cuantificó mediante un ensayo de actividad turbidimétrica con *Micrococcus luteus* (Sigma) en una placa de microtitulación de 96 pocillos como se describe en el Ejemplo 3. En resumen, se incubó 250 μl de suspensión celular de *M. luteus* 0,015 %, con 10 μl de muestras que contenían lisozima con una concentración menor de 2,4 μg/ml. Se efectuó un seguimiento de la reacción mediante el modo cinético en un Microplate Manager (Bio-Rad, CA) durante 5 minutos a 450 nm. La concentración de lisozimas se determinó después en referencia a la curva patrón.

El nivel de expresión estable de la lisozima humana (Hlisr) alcanzó al menos aproximadamente Hlisr al 0,6 % por peso de arroz integral representando el 45 % del extracto de proteína soluble total del grano de arroz. La Figura 2 ilustra la expresión específica de semilla de la lisozima humana en plantas transgénicas. Hlisr solo se encuentra en grano maduro y germinado, pero no en ningún otro de los tejidos ensayados. La Figura 6 muestra el nivel de expresión de la lisozima humana en semillas de R3 en polvo de plantas de arroz transgénicas.

B. Generación de células y plantas de trigo transgénico que expresan lisozima humana

Se emplearon los plásmidos API159 (Figura 1) y API230 (Figura 35) para transformar células de trigo sustancialmente de la misma manera que en la transformación de células de arroz. Se produjeron ocho líneas transgénicas de trigo con AP1159, generando un nivel de expresión de aproximadamente 150 a 300 μg de lisozima por grano. Se produjeron dos líneas de trigo transgénicas con API230, obteniendo un nivel de expresión de aproximadamente 50 a 120 μg de lisozima por grano.

C. Generación de células y plantas de cebada transgénica que expresan lisozima humana

También se utilizó el plásmido API159 para transformar células de cebada sustancialmente como se describe para la transformación en las células de arroz. Se produjeron cinco líneas de cebada transgénica que produjeron aproximadamente de 3,9 a 12,3 μg de lisozima por grano.

D. Generación de células y plantas de arroz transgénico que expresan lactoferrina humana

Se empleó el gen de lactoferrina humano sintético bajo el control del promotor Gt1 en el plásmido pAPI164 para generar más de 100 transformantes independientes mediante transformación mediada con bombardeo de partículas.

La transformación mediada con bombardeo de partícula de arroz se realizó como se ha descrito anteriormente. Se analizaron al menos 20 granos de R1 de cada planta de R0 para la expresión de LFHr . Los granos de R1 individuales se dividieron en mitades. La mitad endospérmica se sometió a análisis de expresión LFHr mediante transferencia de Western o ELISA y la otra mitad embrionaria positiva correspondiente se germinó para generar plántulas de R1. Las plántulas se trasplantaron para generar granos de R2. Durante la exploración de los granos de R1 se observó que todos los granos positivos tenían un color rosáceo opaco en comparación con los granos negativos o control. El color rosáceo opaco en los granos de arroz se usó después para identificar líneas homocigotas. Una planta transgénica se consideró que era homocigota y que expresaba LFHr si todos los granos de la planta tenían un color rosáceo opaco. Después las líneas homocigotas se confirmaron mediante análisis ELISA. Basándose en el en análisis de expresión o caracteres agronómicos, las líneas de R2 homocigotas seleccionadas se desarrollaron hasta generaciones de R3 y R6.

EJEMPLO 3

Caracterización de lisozima humana recombinante (Lisr) producida por células y plantas de arroz transgénico

A. Análisis de transferencia Southern

Aproximadamente tres gramos de hojas jóvenes se recogieron y molieron con nitrógeno líquido formando un polvo fino. El ADN genómico se aisló de acuerdo con el procedimiento descrito en Dellaporta *et al.,* 1983, y se purificó por

extracción con fenol-cloroformo. Aproximadamente 5 μg de ADN se digirieron con *Hin*dIII y *EcoR*I, se separaron en un gel de agarosa al 1 %, se transfirieron sobre una membrana Hybond$^+$ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La transferencia se sondó con gen Hlis humano purificado en gel y se reveló mediante un sistema de detección y marcaje de ácido nucleico directo ECL™ (Amersham Pharmacia). Comparando con cantidades conocidas del gen de lisozima humano (Hlis) de 1.470 pb intacto, el número de copias intactas de los transgenes, incluyendo los genes promotor y Hlis, se calculó que variaba de aproximadamente 1 a aproximadamente 6. No pudo diferenciarse ninguna correlación positiva entre el número de copias del transgén Hlisr y la cantidad de Hlisr sintetizada.

B. SDS-PAGE y electroforesis inversa en gel IEF

Los callos inducidos o las células recogidas de cultivos de células en suspensión se trituraron con solución salina fría tamponada con fosfato (PBS) con un coctel inhibidor de proteasa (aprotonina 2 μg/ml, leupeptina 0,5 μg/ml, EDTA 1 mM y Pefabloc 2 mM). El coctel inhibidor de proteasa se excluyó del tampón usado posteriormente durante la purificación de la enzima, ya que los inhibidores no aumentaron el rendimiento de la expresión de lisozima. La molienda se realizó con un almirez previamente enfriado a aproximadamente 2 ml de tampón/g de callo o células. Se obtuvo un homogeneizado transparente sometiendo el extracto resultante a centrifugación a 16.000 x g durante 10 minutos a 4 ºC.

La SDS-PAGE se realizó usando un gel prefabricado al 18 % (Novex, CA). El gel resultante se tiñó con azul brillante Coomassie al 0,1 % R-250 a metanol 45 % y ácido acético glacial al 10 % durante tres horas. La eliminación de la tinción del gel se realizó con metanol al 45 % y ácido acético glacial al 10 % hasta conseguir el fondo deseado.

La electroforesis inversa en gel IEF se realizó usando un gel IEF prefabricado Novex pH 3-10 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Novex, CA). Se cargó aproximadamente 30 μg de lisozima sobre el gel y se sometió electroforesis a 100 V durante 50 minutos seguido por la aplicación de 200 V durante 20 minutos. Después el gel se fijó en ácido sulfosalicílico 136 mM y TCA al 11.5 % durante 30 minutos y se tiñó en azul brillante de Coomassie al 0,1 % R-250, etanol al 40 %, ácido acético glacial al 10 % durante 30 minutos. La solución desteñida contenía etanol al 25 % y ácido acético al 8 %.

C. Análisis de transferencia de Western

Un gel SDS-PAGE se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm usando un Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, CA) y posteriormente se sometió a análisis de inmunotransferencia. La transferencia se bloqueó con leche en polvo desgrasada al 5 % en PBS, pH 7,4, durante al menos dos horas seguido de tres lavados con PBS, pH 7,4 durante 10 minutos cada uno. El anticuerpo policlonal de conejo primario contra lisozima humana (Dako A/S, Dinamarca) se diluyó a 1:2000 en el tampón de bloqueo y la transferencia se incubó en la solución durante al menos una hora. Después la transferencia se lavó con PBS tres veces durante 10 minutos cada una. El conjugado anti IgG de conejo de cabra secundario-fosfatasa alcalina (H+L) (Bio-Rad, CA) se diluyó en el tampón de bloqueo a 1:4000. Después la membrana se incubó en la solución de anticuerpo secundario durante una hora y después se lavó tres veces. El revelado del color se inició añadiendo el sistema de sustrato BCIP-NBT (Sigma) y el proceso se detuvo enjuagando la transferencia con H_2O una vez conseguida la intensidad deseable de las bandas.

D. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Se desarrolló un ELISA de tipo sándwich indirecto para cuantificar la lisozima total expresada en callos o células de arroz y se utilizó como un ensayo alternativo para determinar la producción de la expresión de lisozima. Previamente se ha descrito una ELISA de tipo sándwich directo para la cuantificación de lisozima (Lollike *et al.,* 1995, Taylor, 1992), sin embargo se desarrolló un ensayo alternativo ya que un reactivo clave utilizado en el ensayo ya no se encuentra disponible en el mercado.

Al realizar el ensayo, el anticuerpo antilisozima humana de conejo (Dako D/K, Dinamarca) se usó para recubrir una placa de 96 pocillos a 1:5000 diluida en PBS durante una noche a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, la placa se bloqueó con suero de burro normal al 5 % (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA) en PBS durante una hora. La placa se lavó de nuevo con PBS. Las muestras de lisozima se diluyeron en Tween al 0,05 % en PBS y se capturaron añadiendo a la placa e incubando durante una hora. Después de lavar la placa con PBS, se añadió anticuerpo anti-lisozima humana de oveja a 1:1000 diluido con Tween al 0,5 % en PBS y se incubó durante una hora. La placa se lavó de nuevo con PBS. Se añadió anticuerpo anti IgG de oveja (H+L) de burro de affinipure conjugado con peroxidasa diluido en Tween al 0,05 % en PBS a 1:10.000 y se incubó durante una hora. Después del lavado final de la placa con PBS, se reveló el color incubando la placa con sustrato TMB (Sigma, MO) durante 5-15 minutos y se leyó la absorbancia a 655 nm.

E. Ensayo de actividad enzimática para la lisozima

Se desarrolló un método fiable y cuantitativo para analizar el nivel de expresión de la lisozima enzimáticamente activa. Se desarrolló un ensayo turbidimétrico usando un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos y basado en el ensayo de lisozima estándar que se realiza en cubetas de un modo espectrofotométrico. Un método basado en

placas de microtitulación previamente descrito para la detección de la liberación de lisozima de neutrófilos humanos tuvo un intervalo de detección de 1-100 ng/ml (Moreira-Ludewig *et al.,* 1992). Las condiciones de ensayo se modificaron para mantener la linealidad de la detección hasta 3,0 μg/ml.

El ensayo enzimático de la lisozima se determinó de manera rutinaria mediante control espectrofotométrico de la disminución de la turbidez a 450 nm de una suspensión de células de *Micrococcus luteus* (*M. lysodeikticus*) (Shugar, 1952). En concreto, se prepararon 250 μl de una suspensión celular de *Micrococcus luteus* al 0,015 % (p/v) en fosfato potásico 66 mM, pH 6,24 (tampón A). Las suspensiones celulares se equilibraron a temperatura ambiente y la reacción se inició añadiendo muestras de 10 μl que contenían la lisozima con concentraciones de 0 a 2,4 μg/ml. La actividad enzimática se determinó en un modo cinético durante 5 minutos a 450 nm. Después la concentración de lisozima se calculó por referencia a la curva patrón construida con la lisozima derivada de leche humana.

Se comparó la actividad enzimática de la lisozima de leche humana y la lisozima derivada de células de arroz de la invención. Como se muestra en la Figura 4, la reducción efectuada con lisozima de la turbidez de las suspensiones celulares de *Micrococcus luteus* a 450 nm fue muy similar para la lisozima de las dos fuentes, mientras que el tampón solo no tuvo ningún efecto sobre la reducción de la turbidez.

Se indujeron tres líneas de cultivo de células en suspensión seleccionadas para expresar la lisozima y la producción se estimó en paralelo por ELISA y el ensayo de actividad enzimático descrito anteriormente (Tabla 2). El análisis de la prueba t mostró que no había diferencia significativa entre la concentración de lisozima medida por ELISA y el ensayo de actividad enzimática ($p < 0,05$). Estos resultados demuestran que la lisozima de la leche humana recombinante activa se sintetiza y se conserva en células y callos de arroz y puede aislarse sin perder su actividad.

Tabla 2. Comparación de producciones de lisozima calculado por ensayo de actividad enzimático y ELISA

Línea celular	**Producción de lisozima por ensayo de actividad enzimático (lisozima/proteína total μg/mg)**	**Lisozima producida por ELISA (lisozima/proteína total μg/mg)**
156-5	25,8 ± 6,3	30,3 ± 3,9
156-16	32,1 ± 5,7	32,9 ± 3,2
156-31	47,0 ± 6,2	42,3 ± 7,0

F. La lisozima humana recombinante tiene función bactericida

La lisis sensible de células de *Micrococcus luteus* en un ensayo turbidimétrico (Fig. 4) indica que la lisozima humana recombinante posee actividad enzimática y actúa como un bactericida. Para confirmar esto con una bacteria gram negativa, se realizó un ensayo bactericida usando una cepa de *E. coli* (JM109) como organismo de ensayo (Fig. 3).

En la realización del ensayo, una alícuota de un cultivo de JM109 de una noche se cultivó en medio LB hasta la fase semilogarítmica. Se utilizó un inóculo patrón de fase semilogarítmica JM109 a 2 x 10^5 UFC (unidades formadoras de colonias)/ml en el ensayo bactericida. Se esterilizaron por filtración tampón (fosfato Sódico 20 mM, pH 7,0, EDTA 0,5 mM) en solitario, tampón que contenía lisozima de leche humana o lisozima derivada de semilla de arroz a aproximadamente 30 μg/ml. La mezcla de células y solución de lisozima se incubó después a 37 ºC durante el intervalo de tiempo especificado. Una quinta parte del volumen de mezcla se sembró en placa sobre placas de agar LB y se incubó durante una noche a 37 ºC para determinar el número de unidades formadoras de colonias. A la concentración de 30 μg/ml, la lisozima humana recombinante presentó un efecto bactericida similar al de la lisozima de leche humana. No hubo ninguna reducción de unidades formadoras de colonias usando un extracto del control no transgénico.

G. Purificación de lisozima de callos de arroz, cultivos en suspensión y granos de arroz transgénicos

Se propagaron cinco líneas de callos de arroz que expresaban altos niveles de lisozima y se indujeron por privación de sacarosa. Los callos o células se molieron en un Tissuemizer en tampón de extracción (PBS, NaCl 0,35 M) a 2 ml de tampón/g de callo húmedo. El homogeneizado tisular resultante se centrifugó a 25.000 x g durante 30 minutos a 4 ºC. El sobrenadante se retiró y se sometió a filtración a través de un prefiltro y después a través de un filtro de nitrocelulosa de 0,45 μm.

Aproximadamente 1 litro del sobrenadante filtrado de 500 gramos de callo húmedo inducido se dializó después frente a fosfato sódico 50 mM, pH 8,5 a 4 ºC durante una noche. El sobrenadante se cargó sobre una columna de flujo rápido Sefarosa SP (XK26/40, Pharmacia) de 200 ml equilibrada con el tampón de carga (fosfato sódico 50 mM, pH 8,5) a un caudal de cuatro ml/min. Después la columna se lavó con el mismo tampón hasta conseguir una línea basal de A280. La lisozima se eluyó mediante NaCl 0,2 M en el tampón de carga y se agruparon las fracciones que contenían la actividad de lisozima, se concentraron y se reaplicaron a una columna Sephacryl-100 equilibrada y se hizo correr con PBS a un caudal de un ml/min. Las proteínas se eluyeron y se separaron usando PBS a un caudal

de un ml/min. Las fracciones de lisozima pura se identificaron por ensayo de actividad y el ensayo de proteína total (Bradford) y la pureza de la lisozima se confirmó por SDS-PAGE.

Las cinco líneas con el mayor nivel de expresión de lisozima se seleccionaron y se propagaron continuamente en placas de petri o matraces de agitación para aislar y purificar la lisozima. Un extracto bruto de callos de arroz contiene tanto lisozima humana recombinante como grandes cantidades de proteínas de arroz natural. Dado que la pI calculada de la lisozima es aproximadamente 11, se seleccionó una columna de intercambio de cationes fuerte, SP-Sefarosa de flujo rápido (Pharmacia), como la primera columna para separar las proteínas de arroz de la lisozima humana recombinante. La mayoría de las proteínas de arroz no se unieron a la columna cuando se equilibró con fosfato sódico 50 mM, pH 8,5. La lisozima humana recombinante, por su parte, se unió a la columna y se eluyó por NaCl 0,2 M. Las proteínas de arroz que coeluyeron con lisozima humana recombinante, se separaron de la lisozima por filtración en gel a través de una columna Sephacryl S-100 y se obtuvo una lisozima humana recombinante altamente purificada.

Para purificar la lisozima humana de los granos de arroz, se descascarillaron y se molieron semillas de arroz de R_2 de plantas transgénicas hasta obtener una harina usando métodos convencionales. La lisozima se extrajo mezclando la harina de arroz con NaCl 0,35 N en PBS a 100 g/l a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla resultante se sometió a filtración a través de 3 μm de una cápsula plegada, y después a través de 1,2 μm de una cápsula de suero y finalmente a través de una cápsula Suporcap 50 con un filtro de vidrio de 0,8 μm en la parte superior del filtro 0,45 μm (Pall, MI).

El extracto de arroz depurado (1 litro) se dializó después frente a fosfato sódico 50 mm, pH 8,5 a 4 ºC durante una noche y la muestra dializada se cargó sobre una SP-Sefarosa de resina de intercambio catiónico (Pharmacia Amersham), que se preacondicionó con fosfato sódico 50 mm, pH 8,5 antes de cargar. Después de cargar, la columna se lavó con el mismo tampón hasta conseguir una lectura de línea basal de A280, después la lisozima se eluyó con NaCl 0,2 N en fosfato sódico 50 mM, pH 8,5. Las fracciones que contenían lisozima se agruparon y volvieron a aplicarse a una columna Sephacryl S-100 (Bio-Rad; equilibrada y corrida con PBS). Las fracciones de lisozima pura se identificaron mediante ensayo enzimático y ensayo de proteína total (Bradford). Finalmente la pureza de la lisozima se confirmó mediante SDS-PAGE.

H. Atributos de la lisozima humana recombinante producida en arroz

(i). Secuenciación de aminoácidos N Terminal

La lisozima humana recombinante (Lisr) aislada de células de arroz como se ha descrito anteriormente, se separó por SDS-PAGE al 18 % seguido por electrotransferencia a una membrana de PVDF (Bio-Rad, CA). La banda de lisozima se identificó tiñendo la membrana con Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0,1 % e metanol al 40 % y ácido acético glacial al 1 % durante 1 minuto. Inmediatamente, se eliminó el color de la membrana de PVDF teñida, en metanol al 50 % hasta que la banda fue claramente visible. Después de lavar cuidadosamente la transferencia con H_2O y secarla al aire, se secuenció con un secuenciador ABI 477 mediante química de degradación Edman en el Protein Structure Laboratory de la University of California en Davis. Los resultados muestran que la lisozima producida en semilla de arroz transgénico tiene idénticas secuencias N-terminales a las de la lisozima humana, y son las siguientes:

Lis Recombinante----------LysVaLPheGluArg( )GluLeuAlaArgThr

Lis Humana----------LysValPheGluArgCysGluLeuAlaArgThr

El paréntesis en blanco en la lisozima recombinante representa el resto de Cys que la máquina no puede detectar. Este ciclo no se define y pudo deberse al resto de cisteína no modificado que no puede formar un derivado estable en el análisis de degradación Edman.

De manera adicional, se descubrieron diversos atributos estructurales y funcionales de la lisozima humana y lisozima recombinante producidas en el arroz que eran las mismas, incluyendo peso molecular pI, efecto bactericida con *E. coli*, estabilidad térmica y pH y actividad específica.

(ii). Estabilidad térmica y de pH de lisozima

Para aplicaciones biotecnológicas de la lisozima humana recombinante, su estabilidad térmica y de pH así como su resistencia a proteasas es de importancia decisiva. Un estándar de lisozima humana y una lisozima de arroz se diluyeron a una concentración final de 50 μg/ml en PBS y se sometieron al siguiente tratamiento térmico en un modo secuencial: (1): 62 ºC durante 15 minutos; (2): 72 ºC durante 20 segundos; (3): 85 ºC durante 3 minutos y finalmente; (4): 100 ºC durante entre 8 a aproximadamente 20 segundos. Se realizaron estudios con 100 μl por tubo y se repitieron tres veces. Se recogieron alícuotas al final de cada tratamiento y la actividad de lisozima restante se midió mediante ensayo de actividad. El resultado mostró que la lisozima recombinante mostraba el mismo grado de estabilidad térmica en el intervalo de temperaturas de 62 ºC a 100 ºC que la lisozima humana.

En otra realización, aproximadamente 50 µl de lisH o LisHr se disolvió en PBS a 100 µg/ml y se sometió a tratamiento térmico. Se ensayaron cuatro temperaturas diferentes de 65 ºC, 72 ºC, 85 ºC y 100 ºC. Seleccionándose con cada temperatura, 0 minutos, 0,33 min, 1,5 min, 3 min, 5 min y 15 min para analizar el impacto del tiempo de incubación sobre la estabilidad de la lisozima (Fig. 5A).

Para estudios sobre estabilidad de pH, la lisozima se disolvió en NaCl al 0,9 % a 100 µg/ml a pH 10, 9, 7,4, 5, 4 y 2. Las soluciones se incubaron a 24 ºC durante una hora. Se realizaron experimentos con 200 µl por tubo y se repitieron tres veces. La lisozima restante se detectó mediante ensayo de actividad de lisozima.

Para los tratamientos de pH a pH 2, 4 y 5, la lisH y lisHr se disolvió en PBS ajustada a los pH correspondientes con HCl a 100 µg/ml. Para pH 9 y 10, la lisozima se disolvió en TBS y 150 mM de carbonato sódico/bicarbonato a 100 µg/ml, respectivamente. Aproximadamente 100 µl de solución de lisozima se incubaron a 37 ºC durante 30 minutos. La actividad de lisozima se evaluó mediante ensayo de actividad (Fig. 5B).

Tanto lisH como lisHr presentaron una estabilidad térmica y de pH similar.

(iii). Determinación de la resistencia a proteasas *in vitro* de la lisozima

La lisozima se disolvió en NaCl al 0,9 % a 100 µg/ml. El pH de la solución se redujo a 3, 4 y 5 con HCl. Se añadió pepsina (Sigma, MO) (pepsina:lisozima = 1:22 (p/p)) y las soluciones se incubaron a 37 ºC durante una hora. Después el pH de todos los tratamientos se elevó a pH 7 con bicarbonato. Se añadió pancreatina (Sigma, MO) (pancreatina: lisozima =1:110 (p/p)) a la solución neutra y se incubó a 37 ºC durante dos horas. La actividad de lisozima restante se midió mediante ensayo de actividad.

En experimentos de digestión *in vitro* con pepsina y pancreatina, la lisozima humana natural y recombinante presentaron resistencia muy similar a digestión por pepsina y pancreatina. En estas condiciones, la albúmina humana se degradó como se demostró por SDS-PAGE (datos no mostrados).

(iv). Caracterización bioquímica de la lisozima

Después de que la lisozima humana recombinante se purificase casi hasta la homogeneicidad, se realizaron diversas caracterizaciones bioquímicas para comparar la lisozima de leche humana con la lisozima de leche humana recombinante derivada de células de arroz. Los resultados resumidos en la Tabla 3 muestran que mediante SDS-PAGE, la lisozima de leche humana natural y la lisozima recombinante migran a la misma posición.

Los nucleótidos que codifican el péptido señal *Ramy3D* de arroz se unieron al gen de lisozima humana en el vector de expresión pAPI156. La determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal de la lisozima humana recombinante purificada reveló una secuencia N terminal idéntica a la de la lisozima humana natural, como se ha detallado anteriormente. Por tanto las células de arroz escinden el enlace peptídico correcto para eliminar el péptido señal *RAmy3D* cuando este está unido al precursor de lisozima humana.

El cambio total de la lisozima humana recombinante y natural se comparó por electroforesis en gel de isoelectroenfoque (IEF) y se determinaron los valores pI. Dado que la lisozima es una proteína básica con una pI calculada de 10,20, los estudios de comparación de pI se realizaron por electroforesis inversa en gel IEF. La lisozima humana recombinante y natural presentaron idéntico valor pI, indicando la misma carga global (datos no mostrados).

La lisozima humana recombinante derivada de arroz transgénico tuvo una actividad específica similar a la de la lisozima natural (200.000 unidades/mg (Sigma, MO), mientras que la lisozima de claras de huevo de pollo tuvo la actividad específica esperada 3-4 veces inferior (Sigma, MO) (Fig. 4).

Tabla 3. Comparación de características bioquímicas en lisozima de leche humana y lisozima recombinante

Fuente de lisozima	**Secuencia N terminal**	**Tamaño (kDa)**	**Glucosilación**	**Actividad específica (unidades/mg)**	**pI**
Leche humana	KVFER C ELART	14	No	201.526	10,2
arroz	KVFER(-)*ELART	14	No	198.000	10,2

* Este ciclo no se definió, y puede deberse a un resto de cisteína no modificado que no puede formar un derivado estable en el análisis de degradación de Edman.

Los resultados descritos anteriormente demuestran la capacidad de usar células de arroz como un sistema de producción para expresar lisozima humana de leche. Se exploraron más de 160 transformante individuales por inmunotransferencia, ensayo de actividad enzimática y ELISA. Las producciones de lisozima de leche humana recombinante alcanzaron el 4 % de proteínas de células solubles en cultivos de células y más del 40 % de proteínas

solubles en granos de arroz. Aunque el mecanismo no forma parte de la invención, el alto nivel de expresión puede explicarse por la utilización del fuerte promotor *RAmy3D* (Huang *et al.,* 1993) en el sistema de células de cultivo y el promotor Gt1 en el sistema de expresión de granos y el gen optimizado por codones.

La lisozima de leche humana derivada de planta obtenida por los métodos de la presente invención era idéntica a la lisozima humana endógena en cuanto a movilidad electroforética, peso molecular, cargas globales de superficie y actividad bactericida específica.

EJEMPLO 4

Caracterización de lactoferrina humana recombinante (LFr) producida por plantas de arroz transgénico

A. Análisis de transferencia Southern

Aproximadamente tres gramos de hojas jóvenes se recogieron y se molieron con nitrógeno líquido en un polvo muy fino. El ADN se aisló de acuerdo con el procedimiento como se describe en Dellaporta et *al.,* 1983, y se purificó por extracción con fenol/cloroformo. Aproximadamente 5 μg de ADN digerido con *E*CoRI y *Hin*dIII de cada línea se usó para realizar la transferencia para análisis de Southern. Para el análisis se utilizó el sistema de marcaje y detección de ácido nucleico directo ECLTM (Amersham, EE.UU.).

Se calculó que el número de copias del gen de lactoferrina era de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 según se determina mediante hibridación de transferencia Southern usando ADN genómico digerido con *E*coRI y *Hin*dIII. La línea de planta transgénica (de R0) API164-12-1 se sometió a análisis Southern junto con diez líneas de R1 cultivadas en campo, positivas en transferencia Western. Una transferencia Southern típica muestra que hay al menos tres fragmentos por encima la unidad de transformación (3.156 pb) de la planta derivada con el plásmido original. Todos los insertos LF parecen heredarse del acontecimiento de la planta transgénica de R0 original en la generación de R5.

B. Aislamiento y transferencia de Western de proteínas

Las semillas de arroz se molieron con 1 ml de NaCl 0,35 N en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4 usando un almirez enfriado con hielo y el homogeneizado resultante se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4 ºC. El sobrenadante se usó como un extracto de proteína y aproximadamente 1/25 o 1/50 del contenido soluble salino se cargó sobre un gel prefabricado al 10 % (Novex, Estados Unidos) y la electroforesis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la detección de proteína total, el gel de poliacrilamida se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 al 0,1 % (disuelto en metanol al 45 % y ácido acético glacial al 10 %) durante al menos tres horas y la tinción se eliminó con etanol al 45 % y ácido acético glacial al 10 % hasta conseguir el fondo deseado.

Para el análisis de transferencia de Western, los geles SDS-PAGE se electroinmunotransfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm con un Sistema Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Estados Unidos) y posteriormente se sometió a análisis de inmunotransferencia. La transferencia se bloqueó con leche deshidratada desgrasada al 5 % en PBS durante al menos dos horas seguido de tres lavados con PBS durante 10 minutos cada uno. El anticuerpo policlonal de conejo primario contra LFh (Daka A/S, Dinamarca) se diluyó a 1:2500 en el tampón de bloqueo y la transferencia se incubó en la solución durante una hora. La transferencia se lavó con PBS tres veces durante 10 minutos cada una. El conjugado anti IgG de conejo de cabra secundario (H+L)-fosfatasa alcalina (Bio-Rad, Estados Unidos) se diluyó en el tampón de bloqueo a una proporción de 1:5000. La membrana se incubó en la solución de anticuerpo secundario durante una hora y después se realizaron tres lavados con PBS. El revelado del color se inició añadiendo el sistema sustrato BCIP-NBT (Sigma, Estados Unidos) y el proceso se detuvo aclarando la transferencia con H_2O una vez conseguida la intensidad deseable de las bandas.

Ciento ocho (108) plantas de R0 se desarrollaron hasta la madurez, se recogieron las semillas de 56 plantas fértiles y se analizaron las semillas individuales mediante transferencia Western para detectar la expresión de LFr. Se realizó tinción con azul de Coomassie para comparar la movilidad de LFr con la lactoferrina humana (LFh) natural (Fig. 8), con 40 μg de proteína total cargada sobre cada carril, junto con 40 ng de LFh purificada natural por carril como control positivo.

La estimación de LFr total por ELISA indica que se expresó desde 93 μg a 130 μg de LFr en semillas de arroz transformadas. Un análisis de transferencia de Western típico (Fig. 9) ilustra que tanto la LFr como la LFh natural migran a aproximadamente la misma velocidad con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, coherente con lo determinado por otros investigadores (Wang *et al.,* 1984).

C. Purificación de proteína

Semillas de arroz de generación homocigota R2 se descascarillaron y molieron hasta una harina convencional. Se extrajo lactoferrina recombinante mezclando la harina de arroz con NaCl 0,35 N en PBS a 100 g/l a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla resultante se centrifugó a 15.000 rpm durante una hora a 4 ºC. El sobrenadante recogido se sometió a las siguientes etapas de filtración antes de cargar sobre una columna Sefarosa.

En primer lugar, el sobrenadante se procesó a través de algunas capas de estopilla. Después el filtrado se hizo pasar secuencialmente a través de un papel de 8 μm, un papel de 1 μm y una membrana de nitrocelulosa de 0,25 μm. La solución de proteína transparente se cargó sobre una columna ConA Sefarosa (Pharmacia, XK 26) que se había equilibrado con NaCl 0,5 N en Tris 20 mM, pH 7,4 (tampón de unión) a un caudal de 4 ml/min. Después de completar la carga, la columna se lavó con tampón de unión hasta conseguir la línea basal a A280 nm. La lactoferrina se eluyó con manósido 0,1 N en el tampón de unión. Las fracciones que contenían lactoferrina se agruparon y se cargaron sobre una segunda columna SP-Sefarosa (Bio-Rad, EE.UU) que se había equilibrado con NaCl 0,4 N en fosfato sódico 50 mM, pH 8,0 (tampón de unión B) al caudal de 4 ml/min. Después la columna se lavó con el tampón de unión B hasta obtener una línea basal a A280. La lactoferrina se eluyó mediante NaCl 1 N en fosfato sódico 50 mM, pH 8,0 y las fracciones que contenían LF se agruparon y dializaron frente a PBS. Finalmente la pureza de la LF se evaluó mediante SDS-PAGE y se conservaron a -80 ºC.

En otra realización, se extrajo lactoferrina humana recombinante (LFHr) mezclando harina de arroz con NaCl 0,35 M en PBS a 75 g/l a temperatura ambiente durante 2,5 horas. El extracto se hizo pasar a través de seis capas de estopilla antes de la centrifugación (10.000 g durante 1 hora a 4 ºC). Se recogió el sobrenadante y se ajustó la concentración de NaCl a 0,4 M (pH 8,0). Después de una segunda centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos a 4 ºC, se recogió el sobrenadante y se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm. El filtrado se cargó en una columna de SP-Sefarosa (Bio-Rad, Hercules, CA) que se había equilibrado con NaCl 0,4 M en fosfato sódico 50 mM, pH 8,0 (tampón de unión) a un caudal de 4 ml/min. La columna se lavó con el tampón de unión hasta obtener una línea basal de A280. La lactoferrina se eluyó mediante un gradiente lineal y se dializó frente a PBS. La LFHr purificada se analizó mediante SDS-PAGE y se conservó a -80 ºC.

D. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Se realizó ELISA usando extractos de semilla, aislados como se ha descrito anteriormente, con un total de proteína ensayada usando el método Bradford (Bradford, M., 1976). El ELISA se basó en un formato típico de sándwich conocido generalmente en la técnica. En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos con anticuerpo anti-lactoferrina humana de conejo (Daka A/S, Dinamarca), después se añadieron muestras de LFr y de control a pocillos individuales de la placa y se incubaron durante 1 hora a 35 ºC. Después a cada pocillo se añadió conjugado de anticuerpo anti-lactoferrina humana de conejo con peroxidasa de rábano picante (Biodesign, EE.UU.) y se incubó durante 1 hora a 35 ºC, seguido por la adición del sustrato de tetrametilbencidina (Sigma, EE.UU.) y una incubación durante 3 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo H_2SO_4 1 N a cada pocillo. Las placas se leyeron a longitudes de onda duales de 450 y 650 nm en un Microplate Reader (Bio-Rad, modelo 3550) y los datos se procesaron usando Microplate Manager III (Bio-Rad). Los resultados de un análisis de 10 líneas homocigotas seleccionadas mostraron que en cada semilla se expresaba de 93 μg a 130 μg de LFr.

E. Selección de plantas para generaciones sucesivas

Se analizaron al menos 20 - 40 semillas de 11 líneas independientes. Semillas de R1 individuales se cortaron a la mitad y las mitades endoespérmicas se sometieron a análisis por transferencia Western con las correspondientes mitades embrionarias positivas germinadas sobre medio sacaroso al 3 % con agar al 0,7 %. Las plántulas se transplantaron al campo para la generación de R1. De las 11 líneas individuales, se expresaron 3 líneas. Un total de 38 plantas se cultivaron en el campo derivadas de las 3 líneas madre expresadas. Basándose en el carácter agronómico (Tabla 4) de estas 38 plantas, se seleccionaron 28 plantas.

Se observó que todas las plantas de R1 positivas en Western tenían un color de opaco a rosáceo en comparación con las semillas control, por lo tanto este criterio se aplicó en la selección de las semillas de R2. Las semillas de R2 maduras se recogieron cuando llegaron a la madurez y se descascarillaron. Se confirmó por transferencia puntual de Western y ELISA que las semillas de R2 rosáceas expresaban LFr (datos no presentados). Finalmente se seleccionaron 10 líneas de R2 homocigotas y se cultivaron en el campo para la generación sucesiva.

Tabla 4. Comparación de características fenotípicas de semillas de arroz TP-309 naturales y TP-309 transformadas

Fuente	**Vástago eficaz**	**Grano control**	**1000 semillas peso (g)**	**μg de LFr/semilla**
TP-309	43	5.0	25	
Líneas transgénicas homocigotas	42	19,7	20,2	125

Durante la generación de R2 y R3, el porcentaje de semillas control fue superior en las líneas transgénicas homocigotas que en el control no transgénico. Esto afectó al peso de 1000 semillas. Sin embargo, en la generación de R4 no se observaron diferencias significativas en el carácter fenotípico en las líneas transgénicas homocigotas cuando se compararon con las TP309 no transformadas (Tabla 4).

F. Atributos de la lactoferrina humana recombinante producida en arroz

La caracterización física de la LFr mostró que no había diferencias significativas entre la LFr y una forma de LFh purificada disponible comercialmente basada en secuenciación de aminoácidos N terminal, y las características físicas de la LFr tal como peso molecular determinado por MALDI-MS, perfil de HPLC del cual muestra un mapa peptídico comparable, la liberación de hierro dependiente de pH y actividad bacterioestática usando los análisis descritos más adelante.

(i). Secuenciación de aminoácidos N terminal

La LFr purificada de semillas de arroz se resolvió por SDS-PAGE al 10 %, seguido de electroinmunotransferencia a una membrana de PVDF (Bio-Rad, EE.UU.). La banda diana se identificó por tinción de la membrana con azul brillante de Coomassie R-250 al 0,1 % en metanol al 40 % y ácido acético glacial al 1 % durante 1 minuto. La tinción de la membrana de PVDF teñida se eliminó inmediatamente en metanol al 50 % hasta que la banda fue claramente visible. La transferencia se lavó exhaustivamente con H_2Odd y se secó al aire. Finalmente esta muestra se envió al Protein Structure Laboratory en la Universidad de California en Davis (CA, EE.UU.) para el análisis de secuenciación.

(ii). Detección de glucosilación y determinación del contenido de azúcar

La glucosilación de la lactoferrina humana recombinante producida en arroz se analizó mediante un kit de inmunotransferencia para la detección de glucoproteínas (Bio-Rad, EE.UU.). Siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó un aumento del peso molecular de la lactoferrina debido al contenido de carbohidratos mediante espectrometría de ionización de masas por Desorción Láser Asistida por Matriz (MALDI-MS) (PE Applied Biosystems, Voyager System).

La lactoferrina recombinante producida en arroz se glucosila como resulta evidente a partir de la unión con resina Con A, la tinción positiva por el kit de tinción de glucoproteína así como la masa más grande detectada en comparación con la masa calculada (76,2 kDa) basada en la estructura peptídica. MALDI-MS mostró que la lactoferrina recombinante derivada de semilla tenía un peso molecular de 78,5 kDa mientras que la lactoferrina de leche humana es de 80,6 kDa (Tabla 5). La diferencia puede deberse a un menor grado de glucosilación en la lactoferrina derivada de semilla de arroz. El análisis muestra que la LFHr purificada contiene xilosa pero carece de ácido siálico, lo que es consistente con los patrones de modificación postraduccionales en plantas (Matsumoto *et al.,* 1995).

(iii). Determinación del punto isoeléctrico de la lactoferrina

Se realizó electroforesis inversa en gel de isoelectroenfoque (IEF) con un gel Novex IEF prefabricado, pH 3-10 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 30 μg de LFr purificada se cargó y la condición de procesamiento fue 100 V durante 50 minutos y 200 V durante 20 minutos. Después el gel se fijó en ácido sulfosalicílico 136 mM y TCA al 11,5 % durante 30 minutos, se tiñó en azul brillante Coomassie R-250 al 0,1 %, etanol al 40 % y ácido acético glacial al 10 % durante 30 minutos y se eliminó la tinción en una solución que contenía etanol al 25 % y ácido acético al 8 %.

(iv). Comparación de características físicas de LFr con LFh natural

El perfil HPLC de la LFr natural mostró un mapa peptídico comparable. Esto confirmó que la LF de las dos fuentes tenía una secuencia de aminoácidos idéntica (datos no presentados). Comparaciones adicionales confirman que la lactoferrina humana producida en arroz transgénico se parece mucho a la lactoferrina humana natural, como se demuestra por (1) la secuencia N terminal de la LFr purificada de semillas de R2 homocigotas y LFh (Dakao A/S, Dinamarca), que se demuestra que son idénticas (Tabla 5); (2) el punto isoeléctrico (pl) de la LF derivada de semilla de arroz y natural que es el mismo, lo que indica que tienen similares cargas de superficie (Tabla 5); (3) la liberación de hierro dependiente de pH de la LFr que se demuestra que está muy relacionada con la de la LFh natural (Fig. 11 y véase sección vii del ejemplo 4); y (4) la actividad bacterioestática de la LFHr se demuestra que es similar a la de la lactoferrina humana natural (LFHn) en *E. coli* enteropatógena (EPEC; Fig. 10) y se confirmó la presencia de LF recombinante activa de extractos derivados de semillas de arroz transformadas (véase la sección ix del Ejemplo 4).

Tabla 5. Datos de caracterización física para la lactoferrina humana (LFh) y lactoferrina recombinante (LFr) derivada de semillas de arroz

Fuente de LF	**Tamaño (kDa)**	**Secuencia N terminal**	**pl**	**Glucosilada**	**Contenido de azúcar (%)**
LFh	80,6	GlyArgArgArgArgSerValGlnTrpCysAla	8,2	SÍ	5,5
LFr	78,5	GlyArgArgArgArgSerValGlnTrp( )Ala	8,2	SÍ	2,9

(v). Determinación del valor de nutrientes y contenido de hierro de las semillas de arroz

Se determinó el contenido de hierro de semillas homocigotas de R2. Dos gramos de semillas maduras secas de cada línea transformada y no transformada se pesaron y incieraron por vía húmeda con solución de HNO_3 y H_2O_2 a 110 ºC (Goto *et al.,* 1999). La ceniza se disolvió en solución de HCl 1 N. El contenido de hierro se midió después por absorbancia de Fe-O-fenantrolin a 510 nm, usando un kit Sigma (Sigma, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los diferentes valores de los datos de nutrientes de semillas transgénicas homocigotas y semillas no transgénicas se midieron mediante un procedimiento convencional en A y L Western Agricultural Laboratories (Modesto, CA, EE.UU).

Un análisis comparativo de semillas de arroz que expresan lactoferrina transgénica con Teipei-309 natural o transformada mostró que no hay diferencias significativas entre las semillas transformadas y no transformadas en cuanto al valor de nutrientes con la excepción de que la concentración de hierro es 50 % mayor (Tabla 6). El nivel aumentado de hierro puede ser la razón de la opacidad y coloración rosácea de las semillas de arroz transgénicas que expresan LFr.

En otra realización, 0,2 gramos de granos deshidratados descascarillados que expresan LFHr se incineraron por vía húmeda con HNO_3 concentrado durante dos días y se disolvió en 5 m l de DDI H_2O. El contenido de hierro de las muestras se midió por espectrofotometría de absorción atómica de llama (Thermo Jarrel Ash SH4000, Franklin, MA). Se analizó simultáneamente hígado de NIST para verificar la precisión de la curva patrón.

El contenido de hierro de los granos de arroz transgénicos era más de dos veces el de los granos TP309 no transformados, aunque no hubo diferencias significativas en otros factores de nutrición ensayados entre los granos transformados y no transformados (Tabla 7). Esto sugiere que grupos que ingieran arroz transgénico con LFHr aumentarán la captación de hierro.

Los granos transgénicos con contenido de hierro aumentado eran de color opaco-rosáceo. El color opaco-rosáceo se observó tanto dentro y como fuera del endospermo de arroz. Este color opaco-rosáceo, segregado de una manera Mendeliana, se relacionó con la expresión de LFHr y se heredó a lo largo de la generación de R4.

No se observaron diferencias durante la germinación de la semilla de las semillas transgénicas, el fenotipo de las plantas de R2, R3 y R4 fue vigoroso y el rendimiento de la semilla fue similar al de las plantas Teipei-309 no transgénicas (datos no mostrados).

Tabla 6. Comparación del valor nutricional (en mg) por 100 gramos de semillas de arroz no transformadas y transformadas

Fuente	Carbohidrato	Proteína	Grasa	Ca	K	Na	Fe	Agua	Calorías
TP-309	76,0	8,7	2,4	9	370	<10	0,8	11,3	369
Líneas homocigotas transformadas	75,7	8,7	2,2	8	330	<10	1,2	11,8	367

Tabla 7. Comparación de contenido mineral (en μg) por gramo de LFHr de granos de arroz transformados y no transformados

Fuente	Cu	Fe	Mn	Zn
No transformados	2,9	8,7	33,1	20,8
Transformados	4,7	19,2	17,7	28,7

(vi). Especificidad y estabilidad tisular de LFr

Se utilizó un promotor de glutelina específico de endospermo de arroz para expresar lactoferrina recombinante en semillas en maduración o maduradas. Para confirmar la especificidad tisular de la lactoferrina expresada, se extrajo proteína de raíz, brote, hoja junto con semilla madura y se sometió a transferencia de Western y los resultados indican que no hubo expresión detectable de LFr excepto en la semilla/endospermo (Fig. 9). Además la presencia de LFr en semillas germinadas de 5 días mostró la estabilidad de la LFr almacenada dentro de la célula de la planta durante la germinación.

(vii). Saturación de hierro y liberación de hierro dependiente de pH

Se incubó lactoferrina con un exceso de hierro férrico 2 M ($FeCl_3$:NTA = 1:4) y bicarbonato sódico (Fe:HCO_3- = 1:1) durante 2 h a temperatura ambiente. El exceso de hierro libre se eliminó usando una columna desalinizante PD-10 (Pharmacia, Estados Unidos) y se determinó el nivel de saturación de hierro mediante la proporción A280/A456. Tanto la LFh natral como la LFr se saturaron completamente por hierro. Se incubó holo LFh en tampones con un pH entre 2 y 7,4, a temperatura ambiente durante 24 horas. El hierro libre liberado de LFh se retiró y la saturación de hierro se determinó mediante la proporción A280/A456.

Los resultados muestran que la liberación de hierro fue similar tanto la LFh como para LFr. La liberación de hierro comenzó aproximadamente a un pH 4 y se completó aproximadamente a un pH 2 (Fig. 11). La unión a hierro fue reversible dado que la LFr desnaturalizada por hierro se restauró elevando el pH a 7 (datos no mostrados). La similitud en la liberación de hierro dependiente de pH de la LFr con la de la LFh convencional demostró que la LFr es capaz de adaptar la estructura terciaria apropiada para la unión y liberación correcta del hierro (Salmon, Legrand *et al.* 1997).

(viii). Unión y captación por células Caco-2

Se sembraron 50.000 células Caco-2/pocillo y se cultivaron en Medio Esencial Mínimo (GIBCO, Rockville, MD) que contenía suero bovino fetal al 10 % en placas de cultivo de tejido de 24 o 48 pocillos durante 3 semanas. Para los estudios de unión, las células Caco-2 se incubaron con diversas concentraciones (0-2 μM) de ^{125}I-LFh en presencia o en ausencia de 100 veces un exceso molar de LFHn no marcada durante 2 horas a 4 ºC y las células se lavaron 5 veces con PBS enfriado con hielo. Las células se disolvieron co 0,5 ml de SDS al 0,1 % y se cuantificó la radioactividad en un contador gamma. Para los estudios de captación, se incubaron 0,4 μM de ^{125}I-LFh con células Caco-2 durante 0 a 24 horas a 37 ºC y las células se lavaron, se disociaron de la misma manera que en el estudio de unión. Se añadieron 0,5 ml de solución TCA al 24 % a las células disociadas y el yodo libre se retiró por centrifugación. El ^{125}I unido a la proteína y libre se cuantificó por separado para evaluar cuanta LFh se degradó en las células. La unión al receptor de la LFHr con la línea celular Caco-2 intestinal humana fue saturable y específica, indicando que la LFHr se unía al receptor de LF. La constante de unión era similar para la LFHr y la LFHn, pero el número de sitios de unión fue ligeramente superior para la LFHr , lo que podía deberse a la diferencia en la glucosilación. La captación de LfH por células Caco-2 fue idéntica para LFHr y LFHn.

(ix). Digestión *in vitro*: efecto sobre la actividad antimicrobiana y unión/captación a células Caco-2

Se sabe que la lactoferrina inhibe el crecimiento de diversas especies bacterianas basándose en su quelación de hierro y propiedades bactericidas directas. El efecto antimicrobiano de la LFr extraída de semillas de arroz se ensayó después del tratamiento usando un modelo de digestión *in vitro* con un sistema enzimático que contenía pepsina (una enzima activa en estómago) y pancreatina (una enzima activa en el duodeno).

Las proteínas LF se disolvieron en PBS a 1 mg/ml, y o bien se dejaron sin tratar, se trataron con pepsina (0,08 mg/ml a 37 ºC durante 30 min), o se trataron con pepsina/pancreatina (0,016 mg/ml a 37 ºC durante 30 min). Las proteínas LF se esterilizaron haciéndolas pasar a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,2 μm [Rudloff, 1992]. La LF esterilizada mediante filtración (0,5 μg/ml) se incubó con 104 unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli* enteropatógena (EPEC)/μl en 100 μl de caldo sintético estéril (1,7 %: AOAC) que contenía dextrosa al 0,1 % y 0,4 ppm de sulfato ferroso a 37 ºC durante 12 horas y se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC).

Comenzando con una concentración de *E. coli* enteropatógena (EPEC) de 10^4 UFC (unidades formadoras de colonias), las muestras no tratadas de LFr alcanzaron hasta $10^{6,5}$ UFC después de 12 horas de incubación a 37 ºC en comparación con LFh, que produjo hasta 10^6 UFC. Se empleó un modelo de digestión *in vitro* usando un sistema enzimático que contenía pepsina (enzima activa en estómago) y pancreatina (enzima activa en duodeno) con agitación moderada para imitar el tránsito de la proteína a través del intestino del bebé [Rudloff, 1992]. La LFr y LFHn se trataron con enzimas pepsina y pancreática activas y se expusieron a 10^4 UFC de células EPEC durante 12 horas a 37 ºC (Fig. 10). Tanto el patrón de lactoferrina humana natural (LFHn) como la lactoferrina recombinante derivada de arroz (Lfr) permanecieron activas en la inhibición del crecimiento de *E. coli* enteropatógena, indicando que tanto la LFHn como la LFHr eran resistentes a digestión por proteasas.

La SDS-PAGE y ELISA revelaron que LFHn y LFHr resisten la digestión por pepsina (a pH 3,8) y pancreatina, mientras que la seroalbúmina humana era completamente digerida después de una digestión *in vitro*. Las transferencias Western revelaron que la inmunoreactividad también se mantenía después de la digestión. Aunque se generaron algunas moléculas más pequeñas durante la digestión de LFh, la mayoría de la LfH inmunológicamente detectable conservó su tamaño intacto. Más del 50 % de la LFHr y LFHn era inmunólogicamente detectables por ELISA, pero la ^{125}I-LfH era aproximadamente un 40 % y ^{59}Fe-LfH era detectable solo en un 20 % detectable indicando que ELISA detecta fragmentos peptídicos pequeños de LfH, que se eliminan por una columna PD-10 y que aproximadamente 50-60 % del Fe se libera de la LfH detectable después de digestión *in vitro*. La capacidad de mantener el hierro no era significativamente diferente.

La constante de disociación (Kd) y la cantidad de sitios de unión de LfH con su receptor se determinaron a partir del estudio de unión. Tanto la Kd como la cantidad de sitios de unión no eran significativamente distintos entre la LFHn y

la LFHr después de digestión *in vitro* (Figura 12A, 12B). La digestión no parecía afectar a la Kd pero hizo que se redujera en gran medida el número de sitios de unión. La captación total de LF no era significativamente diferente entre LFHn y LFHr después de digestión *in vitro* (Figura 12C), aunque la captación fue aproximadamente un tercio comparada con la LFHn no digerida. La captación de hierro total de LFHn fue dos veces más alta que la de LFHr . El porcentaje de degradación de LfH fue similar independientemente de si había digestión o no, y de la forma natural o recombinante (Figura 12D).

(x). Estabilidad térmica: efecto de la actividad antimicrobiana y unión/captación a células Caco-2

Se trató 1,0 mg/ml de holo-LfH en PBS en las siguientes condiciones: (a) 62 ºC durante 15 minutos, (b) 72 ºC durante 20 segundos, (c) 85 ºC durante 3 minutos o (d) 100 ºC durante 8 segundos. El índice de supervivencia de LfH determinado por ELISA fue más del 90 % después del tratamiento a 62 ºC durante 15 minutos, a 72 ºC durante 20 segundos o a 85 ºC durante 3 minutos, pero fue considerablemente inferior después de 100 ºC durante 8 segundos. Esta alta temperatura precipitó ambos tipos de LfH y solamente el 10 % de LfH fue detectable por ELISA. Más del 80 % de hierro quedaba aún unido tanto a LFHr como a LFHn después de todos los tratamientos térmicos con la excepción de 100 ºC durante 8 segundos. En el 10 % de la LfH superviviente después de 100 ºC durante 8 segundos, el nivel de saturación de hierro de LFHn fue superior al 80 % mientras que el de LFHr fue solo aproximadamente del 40 %.

Las SDS-PAGE y transferencias Western revelaron que no había diferencias en la inmunoreactividad entre LFHn y LFHr a 62 ºC durante 15 minutos, a 72 ºC durante 20 segundos y a 85 ºC durante 3 minutos, pero a 100 ºC durante 8 segundos, LFHr casi completamente perdía su actividad inmunológica mientras que la LFHn aún conservaba inmunoreactividad detectable.

No hubo diferencias significativas en la actividad antimicrobiana entre LFHn y LFHr después de tratamiento con calor. La actividad antimicrobiana de LfH no se vio afectada por el tratamiento a 62 ºC durante 15 minutos, 72 ºC durante 20 segundos o a 85 ºC durante 3 minutos.

La Kd y el número de sitios de unión de LFHn y LFHr no eran significativamente diferentes a 62 ºC y 72 ºC aunque hay una tendencia de que la LFHn tenga una Kd más baja y menos sitios de unión que LFHr . A medida que la temperatura aumenta (tal como 85 ºC y 100 ºC), más LFHr se une a células Caco-2, más probablemente por uniónes no específicas debido a que la LFHr está más desnaturalizada que la LFHn. Las propiedades de captación fueron similares para LFHn y LFHr incluso en el grupo tratado a 100 ºC donde la captación de ambos tipos de LfH era superior entre todos los tratamientos térmicos. Los niveles de yodo libre en las células también se valoraron dado que reflejan la degradación de LfH. Aproximadamente se degradó un 20 % de LfH en la muestra no tratada. No hubo diferencias significativas entre la LFHn y la LFHr . Cabe destacar que las muestras tratadas a 100 ºC se degradaron dos veces más que las muestras no tratadas de LFHn y LFHr , que puede indicar que la desnaturalización de LfH causada por el tratamiento con calor hará que la proteína sea más susceptible a proteasas en las células.

(xi). Estabilidad de pH: efecto sobre la actividad antimicrobiana y unión/captación a células Caco-2

Se ajustó 1,0 mg/ml de holo-LfH en PBS a pH 2, 4, 6 o 7,4 por la adición de HCl 1 M y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después el pH se ajustó a 7,0 con $NaHCO_3$ 1 M. El hierro libre liberado de LfH se eliminó mediante una columna desalinizante.

Después de un tratamiento a pH bajo, el 100 % de LFHn y LFHr sobrevivireon. La capacidad de retención de hierro se mantuvo en todas las muestras y el nivel de saturación de hierro fue superior al 95 %. La SDS-PAGE y las transferencias Western revelaron que no había diferencias entre LFHn y LFHr en ninguno de los tratamientos. Se detectó una molécula inmunoreactiva ligeramente más pequeña (~70 kD); después exposición de LFHn a pH 2 y 4 y de LFHr a pH 2.

Las actividades antimicrobianas de LFHn y LFHr eran estables después de una exposición a pH bajo en el intervalo de pH 2,0 a 7,4. A medida que el pH disminuía, la actividad de LFHr parecía ser mayor y constante, mientras que la LFHn no mostró ninguna dependencia con respecto al pH.

La Kd y el número de sitios de unión para LFHn no fueron significativamente diferentes de aquellos para LFHr pero hubo una tendencia que fue siempre inferior para la LFHn con el intervalo de pH 2,0 a 7,4, que es similar a las muestras de tratamiento de control y con calor. La Kd y el número de sitios de unión de la LFHn y LFHr no se vieron afectadas por el tratamiento con el pH por debajo de 2,0 durante 1 hora. Las propiedades de captación fueron similares para LFHn y LFHr en el intervalo de pH de 2,0 a 7,4. La degradación de LfH en células Caco-2 también se evaluó y no hubo diferencias significativas entre LFHn y LFHr .

EJEMPLO 5

Generación y caracterización de α-1-antitripsina (AAT) humana recombinante producida por plantas de arroz transgénicas

A. Construcción y expresión de AAT humana en células de arroz

La construcción y purificación de AAT humana recombinante funcional se realizó como se ilustra en los ejemplos anteriores. En resumen, el gen AAT optimizado por codones se clonó en un pAPI145 que contiene el promotor Gt1 de arroz, el péptido señal Gt1 y terminador Nos, pAPI241 que contiene el promotor Glb, el péptido señal Glb y terminador Nos y API280 que contiene el promotor Bx7, el péptido señal Bx7 y el terminador Nos, como se ilustra en el Ejemplo 1. Los plásmidos resultantes se denominaron pAPI250, API255 y pAPI282, respectivamente (Figura 13).

Las plantas transgénicas que expresan AAT se generaron como se ha indicado anteriormente, y se caracterizó la AAT recombinante generada por plantas. Para expresar AAT en células de cultivo, el gen AAT optimizado por codones se clonó en un casete de expresión que contenía el promotor, el péptido señal, y terminador RAmy3D de arroz. La expresión de AAT recombinante se indujo y se segregó al medio de cultivo bajo las condiciones de privación de azúcar. La purificación de AATr se consiguió a través de un esquema que consistía en una columna de afinidad (Con A), una columna de intercambio aniónico (DEAE) y una columna de interacción hidrófoba (Octil).

B. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Las muestras de AAT se molieron con PBS con un almirez. El extracto resultante se centrifugó y se cargaron 20 microlitros de sobrenadante en un gel SDS-PAGE prefabricado. La proteína AAT se visualizó claramente con tinción de azul brillante de Coomassie (Figura 14).

C. Análisis de transferencia Western

Para los análisis de inmunotransferencia, los geles se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm con un Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer cell (Bio-Rad, EE.UU) y posteriormente se sometieron a análisis de inmunotransferencia. Las transferencias se bloquearon con leche deshidratada desgrasada al 5 % en PBS, pH 7,4 durante al menos dos horas seguido de tres lavados con PBS, pH 7,4 durante 10 minutos cada uno. El anticuerpo policlonal de conejo primario contra alfa-1-antitripsina humana (Dako A/S, Dinamarca) se diluyó a 1:2500 en el tampón de bloqueo y la transferencia se incubó durante al menos una hora. La transferencia después se lavó como se describió anteriormente. El anticuerpo secundario, IgG de cabra anti conejo (H+L) conjugado con fosfatasa alcalina (Bio-Rad), se diluyó en el tampón de bloqueo a una dilución de 1:4000. Después la membrana se incubó en la solución de anticuerpo secundario durante una hora y se continuó el mismo proceso de lavado. El revelado del color se inició añadiendo el sustrato BCIP/NBT de Sigma.

El resultado de la western mostró que la proteína AAT se visualizaba claramente y confirmaba que AAT se expresa y deposita en granos de arroz transgénico, tiene un peso molecular que es algo más pequeño que el de la AAT natural (Figura 15).

D. ELISA

Los patrones para este ensayo variaban de 1,25 - 20 ng/ml de AAT (Athena) diluido en PBST. Placas de 96 pocillos Nunc immuno-plate Maxisorp (Nunc, Dinamarca) se recubrieron durante 16 horas a 4 ºC por una dilución 1:10.000 de anti-AAT humano de conejo en bicarbonato sódico 0,05 M pH 9,6. Las placas se lavaron tres veces con PBST (PBS, pH=7,4, Tween-20 al 0,05 %) y posteriormente se incubaron con muestra durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron de nuevo 3 veces con PBST, seguido por incubación con una dilución 1:50.000 de anti-AAT humano de cabra conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBST, y el anticuerpo unido se detectó mediante reacción catalizada por HRP/peróxido de hidrógeno de TMB. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 M y las placas se leyeron sobre un lector de placa de microtitulación a 450 nm, usando 620 nm como filtro de referencia.

La AAT recombinante es 2,1 veces más inmunorreactiva cuando se compara con las mismas concentraciones determinadas por el ensayo de Lowry.

E. Ensayo de actividad AAT

La actividad AAT se analizó usando un método modificado publicado por Travis y Johnson (1981). En placas de microtitulación de 96 pocillos, se diluyeron muestras de 60 μl en tampón Tris (Tris 0,2 M, pH 8,0). En cada pocillo también se añadieron 60 μl de elastasa [0,01 mg/ml de elastasa pancreática porcina (PPE) en tampón Tris]. La placa se agitada durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir que cualquier AAT disponible se uniese a la elastasa. Se añadieron otros 120 μl de solución sustrato (N-Succinil-AAA-p-nitroanilida 10 M en DMSO diluida en tampón Tris para proporcionar N-Succinidil-AAA-p-nitroanilida 0,33 M) y la placa se agitó durante 1-2 minutos a temperatura ambiente. La placa se leyó inmediatamente sobre una placa de microtitulación a 405 nm. La placa se leyó de nuevo después de 5 minutos y se calculó el cambio de absorbancia. La actividad de AAT se determinó

usando regresión lineal a partir de una curva patrón. Los resultados muestran que la proteína AAT producida en grano de arroz tiene similar bioactividad a la de la AAT natural.

F. Ensayo de cambio de banda

La propiedad única del complejo unido de manera covalente formado entre AAT y PPE permite un análisis de la actividad de AAT por SDS-PAGE. En resumen, 20 µl de muestras ensayadas que contenían AAT para el análisis o proceso de purificación se incubaron con 100 ng de PPE a 37 ºC durante 15 minutos. Se añadieron cinco µl de tinte de carga de SDS y la mezcla de reacción se hirvió durante 5 minutos. Después la muestra se centrifugó y se mantuvo en hielo hasta cargarse sobre un gel SDS-PAGE prefabricado al 10 %. El gen resultante se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 al 0,1 % como se describe más adelante. Para la inmunodetección, se realizó un análisis de transferencia western como se ha descrito anteriormente. De nuevo el ensayo de cambio de banda indica que la proteína AAT producida en el grano de arroz tiene actividad similar a la de la AAT natural (Fig. 16A y 16B).

G. Digestión *in vitro*

La digestión se realizó usando un método modificado de Rudloff y Lonnerdal (1992) usado después de algunas modificaciones. La AAT natural y recombinante se diluyeron en PBS o preparado a 0,5 mg/ml. Se añadió ácido clorhídrico (1 M) a todas las muestras para ajustar el pH a 3, 4 y 5, después se añadieron 2,5 µl de pepsina al 2 % en HCl 0,01 M (3,100 U/mg sólido) y todas las muestras se colocaron en una incubadora con agitador durante 30 o 60 minutos a 37 ºC. El pH se reestableció por adición gota a gota de $NaHCO_3$ 1 M, y se añadieron 2,5 µl de pancreatina al 0,4 % en $NaHCO_3$ 0,1 M. Las muestras se incubaron durante 1o 2 horas a 37 ºC, y la reacción se detuvo por dilución 1:2 en tampón de muestra y ebullición durante 3 minutos. Para las muestras sometidas unicamente a digestión con pepsina, la ebullición fue innecesaria dado que la pepsina se inactivó cuando el pH se elevó por encima de un pH de 6, con $NaHCO_3$ (Piper y Fenton, 1965). La relación de enzima: sustrato fue de aproximadamente 1:20 para muestras solo en tampón y aproximadamente 1:600 para muestras en preparado.

Una cantidad significativa de AAT recombinante y natural sobrevivió la digestión *in vitro* y ambas formas fueron más resistentes a degradación que la seroalbúmina humana. La digestión con pepsina a pH 4 muestra que el 65 % de la AAT recombinante es detectable por ELISA después de digestión, que es similar al 67 % de la AAT natural que sobrevive. El ensayo de tripsina muestra que la mayoría de las propiedades inhibidoras de ambas formas permanecen aún intactas y que el ensayo de actividad revela que el 63 % y el 59 % de la actividad de la AAT natural y recombinante permanecen, respectivamente. Cuando se expone tanto a pepsina como a pancreatina en tampón, la AAT natural resiste la degradación cuando el pH de la incubación con pepsina fue de pH 4 o mayor. En esta condición, la forma recombinante fue menos resistente, aunque una gran parte permaneció después de la digestión con pepsina a pH 5 y digestión con pancreatina. A pH 4, se degradó más cantidad de la proteína recombinante, bien debido a la actividad de la pepsina o a la inestabilidad por pH. La actividad a AAT no pudo determinarse después de digestión por pepsina y pancreatina porque la inactivación de la pancreatina por ebullición también inactiva la actividad AAT. En preparado, ambas formas parecen ser igualmente resistentes a degradación. Aunque tanto la AAT natural como la recombinante aún estaban presentes después de digestión con pepsina a pH 5 seguido de digestión con pancreatina, las bandas a aproximadamente 33 kD (caseína) son débiles o no existen. Es posible que otras proteínas en preparado se escindan preferentemente reduciendo la cantidad de AAT que va a digerirse.

H. Estabilidad térmica de la AAT humana recombinante

Tanto la AAT humana natural como recombinante se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o preparado para lactantes (Enfamil con Hierro, Mead Johnson, Evansville, IL) a una concentración de 0,1 mg/ml. Las muestras, 100 µl en tubos de vidrio con tapón de 10 x 75 mm, se trataron de la siguiente manera: 60 ºC durante 15 minutos, 72 ºC durante 20 segundos, 85 ºC durante 3 minutos y 137 ºC (temperatura de baño de aceite) durante 20 segundos. Las muestras se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente después del tratamiento con calor. Para las muestras de preparado con extracto biliar añadido, se añadieron 2,5 µl de extracto biliar porcino (Sigma) al 12 % y después se sometieron rápidamente a agitación vorticial, se incubaron a 37 ºC durante 10 minutos y de nuevo se sometieron a agitación vorticial. Todas las muestras se diluyeron a 1:10 en PBS y se transfirieron a tubos de 1,5 ml. Las muestras de preparado se centrifugaron a 15.000 g durante 20 minutos para eliminar la fracción insoluble, y el sobrenadante se retiró después de eliminar la grasa. Todas las muestras se transfirieron posteriormente a tubos de 1,5 ml y se analizaron.

La estabilidad térmica de la AAT natural excedió a la de la forma recombinante en tampón, pero la AAT recombinante mantuvo estabilidad significativa en la mayoría de las condiciones. Cuando se calentó solo en tampón, la SDS-PAGE y transferencias Western mostraron que las dos formas de AAT tenían similar estabilidad estructural. Aunque los datos ELISA mostraron que la proteína recombinante era menos estable a temperaturas más elevadas, la proteína recombinante es similar a la forma natural en las otras condiciones. Sin embargo, la estabilidad funcional de la proteína recombinante puede verse afectada. El ensayo de estabilidad térmica muestra que la proteína recombinante pierde su capacidad funcional a diversas de las condiciones de calor, mientras que la proteína natural fue funcional en todas las condiciones de calor excepto a 62 ºC durante 15 minutos. Mientras que las propiedades inhibidoras de la elastasa de la AAT natural fueron aproximadamente del 90 % después de todos los tratamientos con calor, el 60 y 51 % de la actividad de la proteína recombinante permaneció después de 85 ºC, 3 minutos y 137

ºC, 20 segundos, respectivamente.

Los tratamientos con calor de la AAT natural y recombinante en preparado afectaron a la detección de las proteínas, pero la adición de extracto biliar después de tratamiento térmico reestableció el reconocimiento del antígeno de la forma recombinante. Mientras que los datos de la transferencia Western muestran una proteína menos detectable solo a 85 ºC, 3 minutos para la AAT natural y a 72 ºC, 20 segundos y 137 ºC, 20 segundos para la AAT recombinante, los datos del ELISA muestran menos del 20 % de proteína detectada en ambas formas y en todas las condiciones de calor. Cuando se añadieron los extractos biliares a las muestras de preparado calentadas, los datos del ELISA para la forma recombinante mostraron que más de 50 % era detectable después de tratamiento con calor. El extracto biliar afectó a la detección de la forma natural por ELISA en la mayoría de los tratamientos con calor. Las transferencias Western corroboraron los datos del ELISA y mostraron que el extracto biliar puede disociar la AAT recombinante de otras proteínas del preparado, pero no es eficaz para la AAT natural a las temperaturas más elevadas.

I. Estabilidad de pH de la AAT humana

La AAT natural recombinante se diluyeron en PBS o preparado a 0,1 mg/ml. El volumen de la muestra fue 1 ml y el pH de cada muestra se ajustó gota a gota con HCl 1 M. El intervalo de los pH ensayados fue de pH 2 a 8 para las muestras en PBS y pH 2 a 7 para las muestras en preparado. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, el pH se reestableció a pH 7 con $NaHCO_3$ 1 M. Las muestras de preparado se centrifugaron como se ilustra en la sección de Estabilidad Térmica anterior.

Tanto la AAT natural como recombinante parecen ser resistentes a bajas condiciones de pH tanto en PBS como en preparado. No hubo diferencias entre los grupos de tratamiento y controles para un pH de 3 a 7, y controles o entre la AAT natural y recombinante de acuerdo con la SDS-PAGE, ensayo de transferencia Western y de tripsina. Sin embargo, el ensayo con elastasa y los datos del ELISA muestran que la AAT recombinante se vé más afectada por las condiciones ácidas que la forma natural. En PBS, la AAT natural permanecía intacta en más del 95 %, mientras que aproximadamente el 60-80 % de la actividad AAT recombinante permanecía intacta. El preparado para lactantes puede tener un efecto estabilizante sobre la proteína recombinante, ya que se encontró que era tan estable como la forma natural de acuerdo con el ELISA y transferencia Western.

La AAT natural y recombinante puede soportar condiciones ácidas y digestivas según se evalúa por SDS-PAGE, transferencias Western, ELISA y ensayo de actividad. La AAT natural recupera en gran medida su estabilidad estructural y funcional después de tratamiento a condiciones ácidas seguido por neutralización, mientras que la AAT recombinante muestra cierta pérdida de actividad a un intervalo de pH amplio, lo cual puede reflejar un patrón de glucosilación diferente. Las condiciones de la digestión modelada infantil, pH 5 durante tratamiento con pepsina, no son ideales para la pepsina, que normalmente posee una actividad completa a pH 2. Se ha detectado AAT en heces de lactantes humanos, lo que confirma la idea de que es capaz de sobrevivir a la digestión *in vivo*, particularmente durante los tres primeros meses de la vida del lactante. Esta prueba también confirma la validez del sistema de digestión *in vitro*. Es probable que la AAT posea suficiente resistencia a condiciones ácidas y digestivas lo que permite que una cantidad significativa sobreviva y afecte al proceso de digestión.

La AAT recombinante permaneció funcionalmente intacta después de exponerse a un pH bajo, digestión *in vitro*, y diversos tipos de tratamiento con calor. Por lo tanto es posible que la AAT recombinante pueda añadirse al preparado para lactantes, que pueda tolerar algunas condiciones de procesamiento y permanecer intacta en el tracto gastrointestinal de bebés. Por tanto, la AAT recombinante puede ayudar a proteger otras proteínas fisiológicamente activas, tales como lactoferrina y lisozima, que también pueden añadirse en formas recombinantes en el intestino de los bebés alimentados con preparados para lactantes. Como conclusión, la adición de la AAT recombinante junto con otras proteínas recombinantes puede potenciar su bioactividad y hacer que el preparado se asemeje más a la leche humana.

J. Expresión de AAT en trigo transgénico

Se empleó el plásmido API282 que contiene el promotor Bx7, el péptido señal Bx7 y el gen AAT, terminador Nos y el gen de resistencia a ampicilina para transformar células de trigo sustancialmente como en la transformación de células de arroz. Se produjeron veintiuna líneas transgénicas. La expresión de AAT se determinó que era aproximadamente de 5 a 12 μg por grano de semillas de trigo.

EJEMPLO 6

Generación y caracterización de proteínas recombinantes producidas por plantas de arroz transgénicas

A. Generación de anticuerpos recombinantes

Se han expresado anticuerpos recombinantes en plantas transgénicas (para los ejemplos, véanse Peeters *et al.*, 2001; Giddings *et al.,* 2000; Larrick *et al.,* 1998). Sin embargo la expresión y producción de anticuerpos recombinantes en las semillas de plantas transgénicas tiene determinadas ventajas. La producción de altos niveles de anticuerpos en granos, por ejemplo granos de arroz, proporciona la ventaja distintiva de que los suplementos

alimenticios se pueden preparar con poca o sin purificación, y otras ventajas que se ilustran en el presente documento de la solicitud de patente.

En una realización, se construye un vector de expresión como se ilustra en el Ejemplo 1 que incluye secuencias de nucleótidos optimizadas por codones que codifican componentes funcionales de un anticuerpo. Por ejemplo, los componentes pueden ser una cadena pesada, una cadena ligera, una región conectora o una cadena J y un componente secretor. El vector de expresión también incluye un promotor, una secuencia o secuencias señal/diana/transporte y una secuencia o secuencias terminales. En el presente documento se ilustran los promotores, secuencias de señal/diana/transporte y secuencias terminales preferidas. Por ejemplo, para la expresión de cada componente funcional de un anticuerpo en semillas de arroz, Se une operativamente un gen componente optimizado por codones al promotor de glutelina (Gt1) específico de endospermo de arroz, un péptido señal Gt1 y terminador NOS para formar un vector de expresión componente.

Cada vector de expresión componente se introduce en las células de arroz y plantas para generar células y plantas de arroz transgénico que expresen el componente de anticuerpo, como se ilustra en el Ejemplo 2. En una realización, los vectores de expresión que contienen la cadena pesada, cadena ligera, región conectora o cadena J del anticuerpo y un componente secretor puede introducirse individualmente. Las plantas que expresan cada componente individual pueden cruzarse para generar plantas que expresen un anticuerpo funcional.

En otra realización, los vectores de expresión que contienen componentes funcionales de un anticuerpo pueden introducirse en la planta al mismo tiempo, usando los métodos de transformación ilustrados en el Ejemplo 2, tal como mediante cobombardeo. Una planta que expresa anticuerpo funcional se selecciona para propagación posterior.

En otra realización, el vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos optimizada por codones que codifican un anticuerpo monocatenario se introduce en células y plantas de arroz para generar células y plantas de arroz transgénico que expresen anticuerpos, como se ilustra en el Ejemplo 2. La secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monocatenario puede construirse como es convencional en la técnica, por ejemplo Kortt *et al.,* 2001, Maynard y Georgiou, 2000; Humphreys DP y Glover, 2001.

El anticuerpo recombinante generado en la planta puede aislarse y purificarse como se ilustra en la solicitud de patente.

B. Generación de EGF humano

El gen del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) se optimizó por codones como se muestra en la Figura 20 y se sintetizó por Operon Technologies (CA, EE.UU) con una SEC ID Nº: 8. El gen se clonó en pAPI145 y pAPI241 respectivamente como se ilustra en el Ejemplo 1. Los plásmidos resultantes se denominaron API270 (Figura 21) y API303 (Figura 22), respectivamente. Para la expresión de EGF en semillas de arroz, el gen optimizado por codones se une operativamente al promotor de glutelina (Gt1) especifico de endospermo de arroz, péptido señal Gt1 y terminador NOS en pAPT303 y al promotor de globulina (Glb) específico de endospermo de arroz, péptido señal Glb y terminador NOS en API270. Se generó la planta transgénica que expresaba EGF, y se detectó la EGF recombinante generado por la planta como se observa en la Figura 23 y se ilustra en el presente documento.

C. Generación de IGF humano

El gen del Factor de Crecimiento Insulínico (IGF) se optimizó por codones como se muestra en la Figura 24, y se sintetizó por Operon Technologies (CA, EE.UU) con SEC ID Nº: 9. El gen se clonó en pAPI145 y pAPI241 respectivamente, como se ilustra en el Ejemplo 1. Los plásmidos resultantes se denominaron API271 (Figura 26) y API304 (Figura 25), respectivamente. Para la expresión del IGF en semillas de arroz, el gen optimizado por codones se une operativamente al promotor de glutelina (Gt1) específico de endospermo de arroz, péptido señal Gt1 y terminador NOS en pAPI304 y al promotor de globulina (Glb) específico de endospermo de arroz, péptido señal Glb y terminador NOS en API271. Se generó la planta transgénica que expresaba IGF y se detectó el IGF recombinante generado por la planta como se muestra en la Figura 27 y se ilustra en el presente documento.

D. Generación de otros plásmidos de expresión

Se realizaron otros plásmidos de expresión para su uso en transformación de plantas del presente documento para la producción de polipéptidos recombinantes en plantas transgénicas sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Estos plásmidos se muestran en la Figura 28, que muestran API321, que contiene el promotor Glb, péptido señal Gt1, gen de haptocorrina optimizado por codones, terminador Nos, y un gen de resistencia a ampicilina; la Figura 29 muestra API320, que contiene un promotor Gt1, un péptido señal Gt1, un gen de haptocorrina humana optimizado por codones, terminador nos y un gen de resistencia a ampicilina; la Figura 30, muestra API292, que contiene un promotor Glb, un péptido señal Glb, un gen de kappa caseína, terminador Nos y un gen de resistencia a ampicilina; la Figura 31, muestra API297, que contiene un promotor Gt1, un péptido señal Gt1, un gen que codifica el polipéptido kappa caseína maduro, terminador Nos y un gen de resistencia a ampicilina; la Figura 32, que muestra API420, contiene un promotor Gt1, un péptido señal Gt1, un gen de lactadherina, terminador Nos y un gen de resistencia a kanamicina; la Figura 33 muestra API418, que contiene un promotor Gt1,

un péptido señal Gt1, un gen de lactoperoxidasa menos la secuencia que codifica el propéptido, terminador Nos y un gen de resistencia a kanamicina; la Figura 34 muestra API416, que contiene un promotor Gt1 de arroz, un péptido señal Gt1, un gen de lactoperoxidasa optimizado por codones, terminador Nos y un gen de resistencia a kanamicina, y la Figura 35 muestra API230, que contiene un promotor Bx7, un péptido señal Gt1, un gen de lisozima optimizado por codones, terminador nos y un gen de resistencia a ampicilina, la Figura 36A muestra API254, que contiene un promotor Glb, un péptido señal Glb, un gen de lactoferrina, terminador Nos y un gen de resistencia a ampicilina, la Figura 36B muestra API264, que contiene un promotor Glb, un péptido señal Glb, un gen de lisozima humano, terminador Nos y un gen de resistencia a ampicilina; la Figura 37 muestra API225, que contiene un promotor GT3, un péptido señal Gt1, un gen de lisozima optimizado por codones, terminador Nos y un gen de resistencia ampicilina; y la Figura 38 muestra API229, que contiene un promotor RP-6, un péptido señal Gt1, un gen de lisozima optimizado por codones, terminador Nos y un gen de resistencia a ampicilina.

EJEMPLO 7

Comparación de la actividad de los promotores en la expresión de lisozima en arroz transgénico

A. comparación entre promotores Gt1 y Glb y péptidos señal

En estudios previos se observaron incoherencias entre la actividad promotora de *Glb* y *Gt1* a partir de datos transitorios de ensayo y el nivel de acumulación de proteína en plantas transgénicas que llevaban los mismos promotores con péptido señal. Estos estudios no publicados sugieren que la regulación postraduccional estaba implicada en la expresión de proteínas recombinantes y su acumulación en el endospermo. No se sabe si el péptido señal de la proteína de almacenamiento desempeña una función en el nivel de expresión de la proteína recombinante o si las proteínas heterólogas podrían enviarse a los cuerpos de proteína a lo largo de las rutas de clasificación de las proteínas de conservación de almacenamiento naturales. Para mejorar el nivel de expresión de las proteínas recombinantes en semillas de cultivo de cereales, es importante entender el direccionamiento y transporte de las proteínas recombinantes en el sistema de expresión del endospermo. Por tanto, se realizó una comparación entre los promotores de proteínas de almacenamiento de arroz y péptidos señal del gen de Glutelina 1 ("*Gt1*") y el gen de globulina ("*Glb*") mostró que ambos promotores y ambos péptidos señal eran capaces de efectuar la expresión de la lisozima.

(i). Proteínas de almacenamiento

El endospermo de arroz contiene cuatro proteínas de almacenamiento principales: glutelina soluble en ácido, prolamina soluble en alcohol, albúmina soluble en agua y globulina soluble en sal (Juliano BO. Polysaccharides, proteins, and lipids of rice. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN (1985)). Estos están dirigidos en dos tipos de cuerpos de proteína en endospermo de arroz. Los agregados de prolamina dentro del lumen del retículo endoplasmático ("RE") en vacuolas con forma regular se denominan cuerpo de proteína de tipo I. La formación de estos cuerpos de proteína es dependiente de la chaperona BiP80 en el RE. La glutelina se deposita en las vacuolas de almacenamiento de proteína (PSV) a través del aparato de Golgi en las vacuolas de forma irregular denominadas cuerpo de proteína de tipo II. Los componentes en el cuerpo de proteína de tipo II y su ruta de clasificación se desconocen. Las localizaciones de direccionamiento y ruta de clasificación de la globulina y albúmina también se desconocen. Parece que una vez que se elimina la secuencia señal en el RE, la clasificación y transporte dependen de la información de direccionamiento dentro de los polipéptidos y chaperonas en el RE. Las señales de clasificación se dividen en tres categorías: señales de clasificación vacuolar específica de secuencia (ssVSS), señal de clasificación vacuolar C-terminal (ctVSS), y señales de clasificación vacuolar de estructura física (psVSS), como se describe en Frigerio L *et al*., Plant Physiol. 126: 167-175 (2001); Matsuoka K. *et al.,* J. Exp. Botany 50: 165-174 (1999) y Vítale A. & Raikhel N. V., Trends in Plant Science 4: 149-155 (1999).

(ii). Método

Se utilizaron dos promotores de genes de proteína de almacenamiento, *Gt1* y *Glb,* y las correspondientes secuencias que codifican los péptidos señal de globulina y glutelina-1 correspondientes para expresar la proteína lisozima humana en el endospermo en desarrollo. En los tres plásmidos, pAPI264, pAPI159 y pAPI228, el gen de lisozima humano se fusionó con las secuencias de nucleótidos del promotor *Glb* y las secuencias codificantes del péptido señal de globulina, el promotor *Gt1* y las secuencias codificantes del péptido señal de glutelina y la combinación del promotor *Glb* con las secuencias codificantes del péptido señal de glutelina (*Gt1*), respectivamente (Figura 39A). Se determinaron las cantidades de lisozima de las semillas T1 en 23 líneas independientemente transformadas de pAPI264, 10 líneas de pAPI159 y 7 líneas de pAPI159. Las líneas transgénicas de pAPI159, que sintetizan la lisozima usando el promotor *Gt1* y el péptido señal de glutelina, producen la enzima en cantidades que varían de 34,25 μg a 297,23 $\mu g \cdot mg^{-1}$ de proteína soluble total (PTS) con un promedio de 133,76 $\mu g \cdot mg^{-1}$ PTS. Las plantas transformadas con pAPI264 que llevan el promotor *Glb* y el péptido señal globulina produjeron entre 4,09 y 63,64 $\mu g \cdot mg^{-1}$ PTS de lisozima con un promedio de 33,96 $\mu g \cdot mg^{-1}$ PTS, mientras que las líneas de pAPI228, que combinaban el promotor *Glb* y el péptido señal glutelina, produjeron entre 8,9 y 203,46 $\mu g \cdot mg^{-1}$ PTS con un promedio de 87,70 $\mu g \cdot mg^{-1}$ PTS.

Las cantidades de expresión de lisozima conseguidas con el promotor *Gt1* + el péptido señal GT1 fue 3,94 veces mayor que con la del promotor *Glb* + el péptido señal GLB mientras que las cantidades de expresión de la lisozima obtenida con el promotor *Glb* + el péptido señal GT1 fue intermedia pero aumentó 2,58 veces sobre la producida con el péptido GLB (Fig. 39B). Aparentemente el péptido señal GT1 es más eficaz que el péptido señal GLB en cuanto a la expresión y deposición en endospermo de arroz de lisozima. Esto demuestra la importancia de elegir un péptido señal óptimo para la producción de proteínas recombinantes en el desarrollo de granos de arroz.

(iii). Componentes de genes quiméricos

Cinética de la expresión de la lisozima humana durante el desarrollo de endospermo de arroz. Se monitorizó la acumulación de lisozima durante el desarrollo del endospermo de líneas las transgénicas 159-1-53-16-1 y 264-92-6. Se recogieron espigas inmaduras a los 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días después de la polinización ("DAP"). Se midieron las cantidades de lisozima en los endospermos mediante el ensayo de actividad. La acumulación de lisozima en las semillas de la planta transgénica 159-1-53-16-1 comenzó a 7 DAP y su máximo estuvo en 21 DAP. Por lo tanto el contenido de lisozima disminuyó hasta 35 DAP y después se estabilizó hasta la madurez de la semilla (Figura 40). La acumulación de lisozima en semillas en desarrollo de la planta transgénica 264-92-6 comenzó del mismo modo a 7 DAP, alcanzando un máximo a 28 DAP, después de lo cual el contenido de lisozima disminuyó de manera constante a lo largo de la maduración de la semilla (Figura 40). Estos resultados muestran que la acumulación de lisozima en los dos tipos de líneas transgénicas durante el desarrollo de endospermo sigue el mismo patrón al de las proteínas de almacenamiento de globulina y glutelina naturales.

(iv). Localización subcelular de lisozima humana en semillas transgénicas

Para determinar si la lisozima recombinante se dirigía a cuerpos de proteína en el endospermo, se investigó su localización subcelular mediante microscopía por inmunofluorescencia. Se analizaron la planta transgénica 264-92-6 que sintetiza lisozima con el promotor *Glb* y péptido señal de globulina, y la planta transgénica 159-1-53-16-1, que produce la lisozima humana con el promotor *Gt1* y el péptido señal de glutelina. La localización dual con la glutelina o globulina natural se usó para determinar el sitio de deposición de lisozima.

Se utilizaron péptidos sintéticos derivados de las secuencias de aminoácidos de la glutelina y globulina de arroz para inducir la producción de anticuerpos en conejos. La especificidad del anticuerpo se confirmó con transferencias Western de proteínas de endospermo. No se detectó reacción cruzada de anticuerpos de glutelina y globulina con otras proteínas de endospermo con el TP309 hospedador o las líneas transgénicas 264-92-6 y 159-1-53-16-1. El anticuerpo específico de lisozima humana detectó los 13 kD de proteína lisozima exclusivamente en el extracto de proteína fraccionada y total.

Se recogieron y fijaron semillas inmaduras de dos líneas transgénicas, 159-1-53-16-1 (T4) y 264-92-6(T2) y control no transformado, TP309, a los 14 DAP y se realizó un análisis comparable. En la línea transgénica 264-92-6, se detectaron fuertes señales de inmunofluorescencia de lisozima y proteínas naturales con un patrón completamente solapante, cuando se compararon tanto la lisozima como la globulina o la lisozima y la glutelina (datos no mostrados). Fusionando las dos imágenes registradas por separado se produce una seudo señal de color amarillo. Un escáner de emisión de longitud de onda verde y roja a través de los 5 cuerpos de proteína junto con la línea blanca en las imágenes no perfectamente alineadas identifica la colocalización de la lisozima humana con globulina. El tono naranja de los cuerpos de proteína se debe a una emisión más fuerte de fluorescencia roja que verde. La fusión perfecta de imágenes proporciona un color amarillo brillante, y el registro de emisión de fluorescencia verde y roja a lo largo de la línea blanca identifica los mismos 5 cuerpos de proteína. Estos resultados demuestran que la lisozima se colocalizó en los cuerpos de proteína con las proteínas de almacenamiento naturales. Los resultados también demuestran que las proteínas de almacenamiento globulina y glutelina se localizan en el mismo compartimento celular, confirmando la prueba de que la globulina y la glutelina se dirigen al interior de los mismos cuerpos de proteína de tipo II en el endospermo de arroz. Se llegó a la conclusión de que la lisozima contenía toda la información de clasificación para dirigirse al cuerpo de proteína al menos cuando se coexpresaba con proteínas de almacenamiento de arroz.

Los patrones de localización de la lisozima y de las proteínas de almacenamiento natural en 159-1-53-16-1 son, sin embargo, muy diferentes y más complejos que aquellos de la línea transgénica 264-92-6. En la línea transgénica 159-1-53-16-1, la lisozima no se colocaliza completamente con las proteínas de almacenamiento naturales. La globulina se localizó de manera preferente en cuerpos de proteína periféricos más pequeños en las células más jóvenes de la región cortical del endospermo de 14 DAP, mientras que la lisozima se localizó de manera preferente en cuerpos de proteína de forma irregular. Sin embargo, la lisozima si se colocalizó de manera más homogénea con la globulina en las células más viejas de la región central del endospermo en desarrollo. Fusionando las dos imágenes escaneadas por separado se visualizaron cuerpos de proteína tipo II ricos en lisozima con fluorescencia verde, y una fluorescencia roja más, de cuerpos de proteína, más pequeños, ricos en globulina. El registro de la emisión de fluorescencia roja y verde a lo largo de la línea blanca de escáner revela que hay prácticamente el doble de lisozima en los cuerpos de proteína de tipo II grandes que en los cuerpos de proteína pequeños, mientras que la señal de globulina en los cuerpos de proteína pequeño es 2-3 veces el observado en los cuerpos de proteína de tipo II. Por lo tanto, parece haber un direccionamiento preferencial de las dos proteínas. En la región central del endospermo, se observó una colocalización más igual de la lisozima y globulina, especialmente en los cuerpos de

proteína de tipo II más grandes, cuando se valora la intensidad de la fluorescencia verde y roja que proporciona el color amarillo después de fusionar las dos imágenes. Esto resulta evidente a partir del escáner de la imagen fusionada a las dos longitudes de onda de emisión. Sin embargo, también hay pequeños cuerpos de proteína que contienen una parte dominante de globulina o lisozima en estas células.

También se encontraron patrones distintos en 159-1-53-16-1 cuando el anticuerpo anti-glutelina se coincubó con anticuerpo anti-lisozima en células más jóvenes de la región cortical del endospermo en desarrollo intermedio. Al igual que la globulina, la mayoría de la glutelina se localizó en los cuerpos de proteína periféricos más pequeños en células más jóvenes, mientras que la lisozima se localizaba en cuerpos de proteína con forma irregular. La lisozima parcialmente se colocalizó con la glutelina en las células más viejas de la región central de endospermo en desarrollo medio. Fusionando las dos imágenes y escaneando la intensidad de fluorescencia en las dos longitudes de onda se revela la colocalización de las dos proteínas en los cuerpos de proteína grandes y pequeños, algunos altamente enriquecidos con lisozima y otros en glutelina. Se observó una distribución comparable en las células de la parte central del endospermo. Los resultados sugieren que la lisozima distorsiona el direccionamiento/clasificación de la proteína natural de almacenamiento cuando está bajo el control del promotor *Gt1*/péptido señal GT, produciendo una alta expresión de lisozima, pero no cuando está bajo el control del promotor *Glb*/péptido señal GLB con una menor expresión de lisozima.

Para determinar si la acumulación de proteína natural se veía afectada en el endospermo de las plantas transgénicas, se analizaron las cantidades de las proteínas glutelina, globulina y lisozima en dos líneas transgénicas y TP309 mediante transferencia de Western. Los resultados mostraron que la proteínas glutelina se redujo en 159-1-53-16-1, pero aumentó en 264-92-6 en comparación con TP309. Las cantidades de la proteína globulina se redujeron tanto en 264-92-6 como en 159-1-53-16-1. Este cambio es particularmente significativo en la línea transgénica 159-1-53-16-1 con su mayor nivel de expresión de lisozima. Los resultados demuestran que la globulina se ve más afectada que la glutelina, independientemente del péptido señal empleado.

Basándose en los resultados, se llega a la conclusión de que la lisozima se dirigía a los cuerpos de proteína y que el péptido señal desempeñaba una función importante en la expresión de lisozima. Las plantas con altos niveles de expresión de la proteína recombinante mostraron una expresión y transporte de proteína natural distorsionados.

Por tanto, la combinación del promotor *Gt1* y el péptido señal *Gt1* fue más eficaz que la combinación del promotor *Glb* y el péptido señal *Glb*, teniendo la combinación del promotor *Glb* y péptido de señal *Gt1* un nivel de actividad intermedio. Los resultados mostraron que el alto nivel de expresión de la proteína recombinante distorsionó el transporte y clasificación de las proteínas de almacenamiento natural y afectaban a la expresión de la proteína de almacenamiento natural. Los resultados también indican que la proteína lisozima humana madura contiene un determinante reconocido en la célula de planta para la clasificación de vacuola de almacenamiento de proteína (PSV) después de la escisión del péptido señal, y que la lisozima también se clasifica en los cuerpos de proteína de Tipo II.

B. Comparación de siete promotores y péptido señal Gt1 en la regulación de la expresión de lisozima

Se compararon los plásmidos API159 (promotor Gt1) (Figura 1), API228 (promotor Glb) (Figura 39), API230 (Figura 35), API229 (promotor RP-6) (Figura 38), API225 (promotor GT3), un plásmido que lleva el promotor Glub-2 y otro plásmido que lleva el promotor Club-1 en cuento a su capacidad para efectuar la expresión de lisozima en semillas T1 de arroz transgénico. Los resultados mostrados en la Figura 41 indican que para la expresión de la lisozima, Gt1 fue el promotor más fuerte, seguido de Glb, Glub-2, Bx7, Gt3, Glub-1 y Rp6 en orden de fuerza del promotor.

EJEMPLO 8

Cotransformación de polipéptido heterólogo y gen Reg en plantas de arroz transgénicas

A. Expresión potenciada de lisozima en semilla de arroz transgénico cotransformada con Reb

El gen de lisozima humana cooptimizado por codones se unión al promotor *Glb* y al péptido señal *Glb* para generar el plásmido *Glb-Lys* (API264) como se muestra en la Figura 36B, que se usó para transformar arroz con o sin *Reb Natural*, como se ha descrito con anterioridad y se describe en el documento WO 01/83792. Se obtuvieron fenotipos de plantas normales entre transformantes que contenían solo *Glb-Lys* o con *Reb-Natural*. Para determinar la presencia del gen *Reb* y *Glb-Lys* en el genoma de arroz transgénico, se emplearon un cebador diseñado a partir de la secuencia del vector y otro diseñado a partir del terminador 3' del gen Reb para identificar estas líneas. En este caso, solo pudo amplificarse el gen Reb recombinante. Un análisis PCR confirmó la presencia de transgenes en el genoma de arroz. Diez de 11 plantas de acontecimientos de transformación independientes contenían los transgenes tanto *Reb* como lisozima. La proteína REB de semillas inmaduras de cinco líneas transgénicas seleccionadas al azar se detectó por transferencia de Western. El nivel de expresión de la proteína REB en líneas transgénicas estaba aumentada entre el 25 % y el 71 % en comparación con el TP309 no transformado. Esto demuestra que el gen *Reb* transgénico estaba activo en plantas transgénicas.

Las semillas de plantas de arroz transgénicas confirmadas se recogieron al llegar a la madurez, y se analizó la actividad de la lisozima. Como se observa en la Figura 19, la expresión de lisozima en las semillas de 30

acontecimientos de transformación independientes que contenían tanto el *Reg Natural* como el *Glb-Lys* variaron de 30,57 a 279,61 μg/mg de PTS con un promedio de 125,75 ± 68,65 μg/mg de PTS. Las semillas de 17 acontecimientos transgénicos que solo contenían el gen *Glb-Lys* expresaron lisozima en cantidades que variaban de 7 a 76 μg/mg PTS con un promedio de 33,95 ± 20,55 μg/mg de PTS. No se detectó actividad de lisozima en semillas de arroz no transformadas. Los resultados muestran que el nivel de expresión de la lisozima aumentó un promedio de 3,7 veces cuando las semillas eran transgénicas en tanto en el gen *Reb* como *Glb-Lys.* El análisis estadístico (prueba t) mostró que la cantidad de lisozima en semillas de las plantas transgénicas para el gen *Reb* y *Glb-Lys* es significativamente mayor en comparación con las plantas transgénicas para solo *Glb-Lys* ($p < 0,001$).

B. Expresión potenciada de lisozima humana en semillas de arroz transgénicas cotransformadas con el factor transcripcional de maíz, factor de unión a la caja de prolamina (PBF)

Se ensayaron tres factores transcripcionales: proteína bZIP de endospermo de arroz (REB), Opaque2 (O2) y PBF. Los factores transcripcionales y el gen de lisozima humana bajo el control del promotor glutelina 1 (Gt1) o de globulina (Glb) de arroz se cobombardearon en callos de arroz. Se obtuvieron granos de R_1 transgénicos que portaban ambos genes. Se monitorizó el efecto de factores transcripcionales sobre la expresión de la lisozima humana. Bajo el control del promotor Glb, REB aumentó la expresión de Lys aproximadamente 3 veces. REB no mostró ningún efecto sobre un promotor más fuerte, Gt1. El factor de transcripción aumentó la expresión de *Lys*, pero no significativamente. PBF aumento la expresión de *Lys* un promedio de 1,5 veces sobre *Gt1-Lys* solo. Las líneas que expresaban Lys en mayor cantidad se seleccionaron y se desarrollaron a la generación R_2 en el invernadero. Como se muestra en la siguiente Tabla 8, el nivel de expresión de *Lys* de una línea de R2, 265/159-41-5, fue aproximadamente 190 μg por grano y 9,5 mg/gramo de harina integral de arroz (equivalente a un 0,8 % de peso de grano). El nivel de expresión fue aproximadamente 1,5 veces mayor que el de la línea de expresión más alta sin el factor de transcripción. Además, los dos muestran que PBF no solo aumenta la expresión de *Lys,* sino también aumenta la expresión de las proteínas de almacenamiento natural tales como glutelina y globulina, y la proteína relacionada con el transporte de proteínas. Esto implica que PBF puede actuar sobre los promotores de genes múltiples para aumentar la expresión de aquellas proteínas en el endospermo de arroz.

Tabla 8.

Número de línea	R_1* (μg/grano)	R_2* (μg/gramo)	R_2 lisozima (mg/g de arroz marrón)	Homocigoto
285/159-41	150,23	190,00	9,5	homocigotos
285/159-43	114,30	155,00	9,0	homocigotos
285/159-81	103,58	175,59		homocigotos
285/159-286	152,07	180,00		homocigotos

* Se realizó el promedio de los datos de expresión de 10 semillas en R_1 y de 10 líneas en R_2.

EJEMPLO 9

Producción de extracto de arroz que contiene proteínas recombinantes y su uso en alimentos

A. Procedimiento general para producción de extracto de arroz

Se puede convertir arroz transgénico que contiene polipéptidos heterólogos en extractos de arroz mediante un proceso de molienda en seco o un proceso de molienda en húmedo. En el proceso de molienda en seco, las semillas de arroz transgénico con cáscara que contenía los polipéptidos heterólogos, tales como lisozima o lactoferrina humana recombinante se descascarillaron con un descascarillador. El arroz se molió en una harina fina mediante un proceso de molienda en seco , por ejemplo, en un experimento, a una velocidad 3 de un Kitchen Mill modelo 91 de K-TEC. Se añadió solución salina tamponada con fosfato ("PBS"), que contenía NaCl 0,135 N, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,7 mM a pH 7,4, con o sin NaCl adicional, tal como NaCl 0,35 N, a la harina de arroz. En algunos experimentos, se utilizaron aproximadamente 10 ml de tampón de extracción por cada 1 g de harina. En otros experimentos, la proporción inicial de harina/tampón varió en torno a un intervalo tal como 1 g/40 ml a 1g/10 ml. La mezcla se incubó a temperatura ambiente con suave agitación durante 1 hora. En otros experimentos, la temperatura de incubación fue mayor o menor, tal como de aproximadamente 22 ºC a aproximadamente 60 ºC, y un tiempo de incubación fue mayor o menor, tal como de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 24 horas. Se utilizó un mezclador de plataforma Thermolyne VariMix ajustado a una alta velocidad para mantener las partículas suspendidas.

En algunos experimentos se utilizaron otros tampones en lugar de PBS, tal como bicarbonato de amonio. En una realización, se añadieron 10 litros de bicarbonato amónico a 1 kg de harina de arroz.

El homogeneizado resultante se aclaró bien por filtración o por centrifugación. Para el método de filtración, se dejó sedimentar la mezcla durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual el homogeneizado se recogió y se filtró. Los filtros en tres configuraciones diferentes se adquirieron en Pall Gemansciences y se usaron. Estos fueron: una cápsula plegada de 3 μm, una cápsula de suero 1,2 μm y una cápsula Suporcap 50 (0,2 μm). Para la centrifugación, se utilizó una centrífuga Beckman J2-HC y la mezcla se centrifugó a 30.000 g a 4 ºC durante aproximadamente 1 hora. El sobrenadante se conservó y se eliminó el sedimento.

En una realización, el filtrado y sobrenadante se procesaron adicionalmente, por ejemplo por ultrafiltración o diálisis o ambas cosas para eliminar los componentes tales como lípidos, azúcares y sales.

El filtrado del procedimiento de filtración anterior, que también se denomina extracto aclarado, se concentró posteriormente usando un filtro de flujo tangencial de bobina en espiral que funciona en un modo de recirculación de lote. En una realización, se usaron membranas de límite de peso molecular de 3000-4000 de PES (poliétersulfona) para esta etapa. Estos extractos concentrados finales se mantuvieron durante una noche en una sala fría.

Los extractos concentrados se deshidrataron a continuación en un polvo por liofilización. Durante la carga de las bandejas del liofilizador, los extractos no se sometieron a una filtración final de 0,2 o 0,45 micrómetros de profundidad para minimizar la pérdida de proteínas diana. El material liofilizado se raspó de las bandejas de liofilizador y se combinó en una bolsa de plástico. El material deshidratado se comprimió mediante provocando el vacío en la bolsa y después el material se mezcló y el tamaño de partícula se redujo por amasado manual a través del plástico.

Los materiales liofilizados eran entonces adecuados para su uso directo como extracto o en una mezcla con otros alimentos. En un experimento, los materiales liofilizados se mezclaron con diferentes ingredientes para producir preparado para lactantes de ensayo y control. Los ingredientes se mezclaron usando un mezclador Hobart (tamaño 140 quart) equipado con un agitador de paleta. Estas mezclas finales se envasaron en bolsas Mylar dobles de 1 kg y el espacio del cabezal se cargó con nitrógeno antes de sellar.

La Tabla 9 muestra la recuperación de lactoferrina humana recombinante a partir de 105 kg de harina de arroz transgénico durante cada etapa de extracción. La cantidad de LF humana recombinante presente se determinó cuantitativamente como se describe en el Ejemplo 4.

Tabla 9.

	Lactoferrina	
Fase del proceso	Masa Lac	% de máx
Producción de extracción en línea basal	4,0 mg/g harina	
Máximo esperado	420 g	100 %
Extracto inicial	338 g	80
Extracto aclarado	373 g	89
Extracto concentrado	343 g	82
Extracto deshidratado	340 g	81

El extracto de arroz también se puede producir empleando un procedimiento de molienda en húmedo. Las semillas de arroz transgénico con cáscara que contiene lisozima humana recombinante se rehidrataron durante un periodo de 0 a 288 horas a 30 ºC. Las semillas rehidratadas se molieron en tampón de extracción PBS. La proporción inicial de semilla/tampón varió sobre un intervalo tal como 1 g/40 ml a 1 g/10 ml. La Tabla 10 muestra la recuperación de lisozima humana de semillas de arroz remojadas durante 0 a 288 horas.

Tabla 10.

Tiempo de rehidratación (h)	Lisozima (ug/grano)	Recuperación (%)
0	87	100
48	69	79
60	79	91
168	60	69
216	56	64
288	58	67

Se recuperó más del 60 % de lisozima humana mediante el proceso de molienda en húmedo. El resultado de la molienda en húmedo se convierte en el extracto inicial que puede almacenarse congelado hasta su uso. El procesamiento del extracto inicial para obtener extracto seco fue el mismo que el descrito para la molienda en seco en esta sección.

B. Concentración y diafiltración de lisozima recombinante y extractos de arroz control

Las condiciones usadas en la concentración y diafiltración variaron dependiendo del volumen, velocidad, costes, etc. Todas estas condiciones son rutinarias en la técnica basándose en la descripción del presente documento. El extracto inicial congelado se descongeló en una sala fría (aproximadamente 2-8 ºC) durante seis horas. El material descongelado se aclaró a través de un filtro de 0,45 μm y se concentró usando una membrana de Límite de Peso Molecular Nominal 5000 de Poliétersulfona.

Se concentraron 90 ml del filtrado del extracto de control a 10 ml y se añadieron 10 ml adicionales de agua desionizada al filtrado concentrado. El filtrado diluido se diafiltró una vez más usando agua. El precipitado comenzó a formarse a 16 mS y aumentó a medida que disminuía la fuerza iónica. Se añadió bicarbonato amónico 1 M al retenido para añadir fuerza iónica. La turbidez disminuyó aunque no desapareció por completo. El material se diafiltró múltiples veces, en una realización tres veces, con agua y múltiples veces, en una realización tres veces con bicarbonato amónico 0,1 M. Se concentró a 9 ml y la membrana se aclaró con bicarbonato amónico 0,1 M. El concentrado se filtró a través de diversos filtros de botón de 0,2 μm. En una realización, se liofilizaron 2,3 ml del filtrado tal como se encontraba; 2,3 ml del filtrado se diluyeron a 12 ml con agua desionizada y se liofilizaron y 2,3 ml del filtrado se diluyeron a 25 ml con agua desionizada y se liofilizaron. El resto se quedaron transparentes.

Se concentraron un total de 89 ml del filtrado de extracto LisHr a 10 ml, y se añadieron 10 ml más de bicarbonato amónico 0,1 M. La mezcla resultante se concentró de nuevo a 10 ml y se añadieron otros 10 ml de bicarbonato amónico 0,1 M. El retenido comenzó a enturbiarse. El material se diafiltró varias veces, en una realización tres veces, con bicarbonato amónico 0,1 M. Se concentró a 9 ml y la membrana se aclaró con bicarbonato amónico 0,1 M. El concentrado se filtró a través de diversos filtros de botón de 0,45 μm. En una realización, se liofilizaron 2,0 ml del filtrado tal como se encontraba; se diluyeron 2,0 ml del filtrado a 12 ml con agua desionizada donde se formó turbidez, y se liofilizó, y 2,0 ml del filtrado se diluyeron a 12 ml con bicarbonato amónico 0,1 M que permaneció transparente y se liofilizaron.

C. Comparación de los ensayos de extracción de lisozima recombinante de arroz con PBS y bicarbonato amónico

Las condiciones empleadas en la concentración y diafiltración variaron dependiendo del volumen, velocidad, coste, etc. Todas estas condiciones son rutinarias en la técnica basándose en la descripción del presente documento. La harina de arroz LisHr se mezcló con tampón de extracción a aproximadamente 100 g/l durante aproximadamente 1 horas usando una barra de agitación magnética. En un matraz de 2 litros, el tampón de extracción era PBS, pH 7,4 más NaCl 0,35 M. En otro matraz de 2 litros, el tampón de extracción era bicarbonato amónico 0,5 M. Un buchner de 15 cm se prerecubrió con aproximadamente 6 g de Cel-pure C300 antes de añadir otros 20 g de Cel-pure C300. La mezcla se filtró a aproximadamente 3-4 Hg. Después se lavó dos veces con aproximadamente 100 ml de tampón de extracción respectivo. El filtrado extraído se recogió y se concentró con cartuchos de ultrafiltración: celulosa regenerada 5K, PES 5K, y celulosa regenerada 1K. Los concentrados se liofilizaron y se analizó el contenido de LisHr. El bicarbonato amónico y el PBS, pH 7,4 más NaCl 0,35 M extrajeron aproximadamente la misma cantidad de LisHr. Hubo escasa pérdida de unidades de lisozima en el infiltrado con cualquiera de las unidades de filtración que se utilizaron.

También puede usarse otro tampón de extracción para extraer proteínas recombinantes expresadas en granos de arroz transgénicos, por ejemplo tampón Tris, acetato amónico dependiendo de las aplicaciones. Por ejemplo, para usar LF humana recombinante para complemento de hierro, se añade hierro al tampón de extracción y el tampón se establece a un pH de manera que la apo-LF puede captar hierro durante el proceso de extracción. En esta condición, la LF puede llegar a saturarse con hierro (holo-LF). En otro ejemplo, se usa un tampón que carece de hierro a un pH que da como resultado una liberación de hierro de LF para producir apo-LF.

D. Producción de extractos de arroz que contienen proteínas recombinantes

Las condiciones usadas en la concentración y diafiltración variaron dependiendo del volumen, velocidad, coste, etc. Todas estas condiciones son rutinarias en la técnica basándose en la descripción del presente documento. Todo el equipo se sumergió en NaOH 0,1 M caliente a una temperatura inicial de aproximadamente 55 ºC. Se añadió harina de arroz a un tanque de acero inoxidable de aproximadamente 250-500 gal que contenía bicarbonato amónico 0,5 M a aproximadamente 95-105 g/l. Esto se mezcló durante aproximadamente 60-80 minutos a aproximadamente 9 ºC.

Se pre recubrieron 12 placas de filtro de prensa de 36 pulgadas C300 con aproximadamente 3-6 kg de Cel-pure C300. Se añadieron aproximadamente 19-26 g/l de Cel-pure al extracto y se mezcló exhaustivamente. La mezcla se prensó a una presión de aproximadamente 22 psi a un caudal de aproximadamente 82 litros/minuto. El filtrado se recogió en un tanque de acero inoxidable de 250 gal y se lavó con bicarbonato amónico 0,5 M. La prensa se secó por soplado. El proceso se realizó a aproximadamente 10 ºC.

Las membranas del límite de NMW 300 (Polisulfona) que se habían aclarado y conservado con NaOH 0,1 M después de desarrollar el control se lavaron exhaustivamente con agua desionizada. El extracto se concentró y bombeó a un tanque de acero inoxidable de 100 gal. La membrana y el tanque de concentración se enjuagaron con bicarbonato amónico 0,1 M para recuperar todos los productos. El producto se recubrió con plástico y se dejó en el tanque de 100 gal durante la noche a temperatura ambiente. El concentrado se filtró a través de un filtro de 1 μm de bobina en espiral y en un recipiente polivinílico de 5 gal. El concentrado se liofilizó. Se recuperaron aproximadamente el 81 % de lactoferrina y aproximadamente el 58 % de lisozima de los granos de arroz transgénicos, respectivamente.

E. Mezcla de extracto de arroz que contiene proteínas recombinantes en preparado para lactantes

Los tres tipos de extracto seco liofilizado que contienen proteínas de arroz (control) o proteínas de arroz con lisozima o lactoferrina se combinaron con preparado para lactantes convencional. La mezcla se realizó de tal manera que el preparado final para lactantes contenía aproximadamente 1 gramo de lactoferrina y 0,1 gramos de lisozima por litro de preparado para lactantes. Los ingredientes se mezclaron usando una mezcladora Hobart (tamaño 140 quart) equipado con un agitador de paleta. Estas combinaciones finales se envasaron en bolsas doble Mylar de 1 kg y el espacio de cabeza se rellenó con nitrógeno antes de sellar.

Las muestras de preparado para lactantes que contenían lisozima y lactoferrina humana se cuantificaron usando los procedimientos descritos en los Ejemplos 3 y 4.

Tabla 11 muestra lisozima y lactoferrina humana en preparado para lactantes

Tabla 11.

Preparado para lactantes	Lactoferrina (mg/ml)	Lisozima (mg/ml)
Con extracto de arroz control	0,0	0,0
Con extracto de arroz transgénico	1,03	0,13

El uso del extracto como un método de suministro de proteína recombinante tiene claras ventajas sobre la forma purificada o del grano entero. La estrategia convencional, tal como en forma de grano entero, tiene limitaciones tales como estabilidad de la proteína durante procesamiento a alta temperatura y presión. Además, la estrategia de purificación es costosa. Por tanto, la estrategia de extracto 1) mantiene un bajo coste en comparación con la estrategia de purificación; 2) requiere un volumen mucho más pequeño, por ejemplo aproximadamente 1-10 % de peso de grano entero; 3) aumenta la concentración de proteína recombinante de aproximadamente 0,05-0,5 % en forma de grano entero a aproximadamente 10 a 20 % en forma de extracto. Alguna forma de extracto incluso alcanza el 40 % dependiendo del nivel de expresión de la proteína recombinante. Por lo tanto, la estrategia de extracción permitirá una aplicación más extensiva de las proteínas recombinantes en comparación con la estrategia de grano entero. Además, la estrategia de extracción elimina los gránulos de almidón, que requiere una temperatura de gelificación elevada, por ejemplo aproximadamente 75 ºC. Por consiguiente, la estrategia de extracción proporciona más flexibilidad en el procesamiento del grano de arroz y las proteínas recombinantes en alimentos y dieta, y similares, sin preocuparse del uso de altas temperaturas para desnaturalizar los gránulos de almidón. Los gránulos de almidón no desnaturalizados no pueden digerirse por el intestino humano sin gelatinización por ejemplo a alta temperatura.

Breve descripción de las secuencias

Descripción	**SEC ID Nº**
Secuencia codificante de lisozima optimizada por codones: AAAGTCTTCGAGCGGTGCGAGCTGGCCCGCACGCTCAAGCGGCTCGGCAT GGACGGCTACCGGGGCATCAGCCTCGCCAACTGGATGTGCCTCGCCAAGT GGGAGTCGGGCTACAACACCCGCGCAACCAACTACAACGCCGGCGACCGC TCCACCGACTACGGCATCTTCCAGATCAACTCCCGCTACTGGTGCAACGAC GGCAAGACGCCCGGGGCCGTCAACGCCTGCCACCTCTCCTGCTCGGCCCT GCTGCAAGACAACATCGCCGACGCCGTCGCGTGCGCGAAGCGCGTCGTCC GCGACCCGCAGGGCATCCGGGCCTGGGTGGCCTGGCGCAACCGCTGCCA GAACCGGGACGTGCGCCAGTACGTCCAGGGCTGCGGCGTCTGA	1

Descripción	SEC ID Nº
Secuencia de aminoácidos basada en la secuencia codificante de lisozima optimizada por codones: KVFERCELARTLKRLGMDGYRGISLANWMCLAKWESGYNTRATNYNAGDRST DYGIFQINSRYWCNDGKTPGAVNACHLSCSALLQDNIADAVACAKRVVRDPQGI RAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGCGV	2
Secuencia codificante de lactoferrina optimizada por codones: GGGCGGCGGCGGCGCTCGGTGCAGTGGTGCGCCGTGTCCCAGC CCGAGGCGACCAAGTGCTTCCAGTGGCAGCGCAACATGCGGAAGGTGCGC GGCCCGCCGGTCAGCTGCATCAAGCGGGACTCCCCCATCCAATGCATCCAG GCCATCGCGGAGAACCGCGCCGACGCGGTCACCCTGGACGGCGGGTTCAT CTACGAGGCGGGGCTCGCCCCGTACAAGCTCCGCCCGGTGGCGGCGGAG GTGTACGGCACCGAGCGCCAGCCGCGCACGCACTACTACGCGGTGGCCGT CGTCAAGAAGGGCGGGTCCTTCCAGCTCAACGAGCTGCAGGGCCTGAAGT CGTGCCACACGGGCCTCCGGCGGACGGCGGGCTGGAACGTGCCCATCGG CACCCTGCGCCCCTTCCTGAACTGGACCGGCCCGCCGGAGCCGATCGAGG CCGCCGTGGCCCGCTTCTTCAGCGCCTCCTGCGTCCCCGGCGCCGACAAG GGCCAGTTCCCGAACCTCTGCCGGCTCTGCGCCGGGACGGGCGAGAACAA GTGCGCCTTCTCCTCGCAGGAGCCGTACTTCTCCTACTCGGGCGCGTTCAA GTGCCTCCGCGACGGGGCCGGCGACGTGGCGTTCATCCGCGAGTCCACCG TGTTCGAGGACCTCTCCGACGAGGCGGAGCGGGACGAGTACGAGCTGCTG TGCCCCGACAACACCCGCAAGCCGGTGGACAAGTTCAAGGACTGCCACCTG GCGCGGGTGCCCTCGCACGCGGTCGTCGCCCGCAGCGTCAACGGCAAGGA GGACGCGATCTGGAACCTCCTCCGCCAGGCCCAGGAGAAGTTCGGCAAGG ACAAGTCCCCCAAGTTCCAGCTCTTCGGGAGCCCCAGCGGCCAGAAGGACC TCCTCTTCAAGGACTCCGCGATCGGCTTCTCCCGCGTCCCCCCGCGCATCG ACTCCGGCCTGTACCTCGGCTCCGGGTACTTCACCGCGATCCAGAACCTCC GGAAGAGCGAGGAGGAGGTGGCGGCGCGGCGGGCCCGCGTCGTGTGGTG CGCCGTGGGCGAGCAGGAGCTGCGGAAGTGCAACCAGTGGAGCGGCCTGA GCGAGGGGTCGGTGACCTGCTCGTCCGCCAGCACCACCGAGGACTGCATC GCGCTCGTCCTCAAGGGGGAGGCCGACGCGATGAGCCTCGACGGGGGGTA CGTCTACACCGCCGGCAAGTGCGGCCTGGTCCCGGTCCTGGCGGAGAACT ACAAGTCGCAGCAGTCCAGCGACCCCGACCCGAACTGCGTGGACCGCCCC GTCGAGGGCTACCTCGCCGTGGCCGTCGTGCGCCGGTCCGACACCTCCCT GACGTGGAACAGCGTCAAGGGCAAGAAGAGCTGCCACACCGCCGTGGACC GCACCGCCGGCTGGAACATCCCGATGGGCCTCCTCTTCAACCAGACCGGCT CCTGCAAGTTCGACGAGTACTTCTCCCAGTCCTGCGCCCCCGGCTCGGACC CCCGCTCCAACCTGTGCGCCCTCTGCATCGGGGACGAGCAGGGCGAGAAC AAGTGCGTGCCCAACAGCAACGAGCGGTACTACGGCTACACGGGGGCCTT CCGCTGCCTGGCGGAGAACGCCGGGGACGTCGCGTTCGTGAAGGACGTGA CCGTGCTGCAAAACACGGACGGGAACAACAACGAGGCGTGGGCGAAGGAC CTCAAGCTCGCCGACTTCGCCCTGCTGTGCCTCGACGGCAAGCGCAAGCCC GTCACCGAGGCGCGGTCCTGCCACCTGGCGATGGCCCCCAACCACGCCGT CGTCTCCCGCATGGACAAGGTCGAGCGCCTCAAGCAGGTGCTCCTGCACCA GCAGGCCAAGTTCGGCCGGAACGGCAGCGACTGCCCGGACAAGTTCTGCC TGTTCCAGTCGGAGACCAAGAACCTCCTCTTCAACGACAACACCGAGTGCCT GGCGCGCCTCCACGGCAAGACCACCTACGAGAAGTACCTCGGCCCGCAGT ACGTCGCCGGCATCACCAACCTCAAGAAGTGCTCCACCTCCCCCCTCCTGG AGGCGTGCGAGTTCCTCCGCAAGTGA	3

Descripción	SEC ID Nº
Secuencia de aminoácidos basada en la secuencia codificante de lactoferrina optimizada por codones: GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQAIAEN RADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEVYGTERQPRTHYYAVAVVKKGGSFQL NELQGLKSCHTGLRRTAGWNVPIGTLRPFLNWTGPPEPIEAAVARFFSASCVPG ADKGQFPNLCRLCAGTGENKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIREST VFEDLSDEAERDEYELLCPDNTRKPVDKFKDCHLARVPSHAVVARSVNGKEDAI WNLLRQAQEKFGKDKSPKFQLFGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLG SGYFTAIQNLRKSEEEVAARRARVVWCAVGEQELRKCNQWSGLSEGSVTCSS ASTTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVYTAGKCGLVPVLAENYKSQQSSDPDPN CVDRPVEGYLAVAVVRRSDTSLTWNSVKGKKSCHTAVDRTAGWNIPMGLLFNQ TGSCKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCVPNSNERYYGYTGAF RCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNNEAWAKDLKLADFALLCLDGKRKPVTE ARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQAKFGRNGSDCPDKFCLFQSE TKNLLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLGPQYVAGITNLKKCSTSPLLEACEFLRK	4
Cebador MV-Gt1-F1: 5' ATC GAA GCT TCA TGA GTA ATG TGT GAG CAT TAT GGG ACC ACG 3'	5
Cebador Xba-Gt1-R1: 5' CTA GTC TAG ACT CGA GCC ATG GGG CCG GCT AGG GAG CCA TCG CAC AAG AGG AA 3'	6
Secuencia codificante de lactoferricina optimizada por codones: ACCAAGTGCTTCCAGTGGCAGCGCAACATGCGGAAGGTGCGCGGCCCGCC GGTCAGCTGCATCAAGCGGGAC	7
Secuencia codificante de EGF optimizada por codones: AACTCCGACTCGGAGTGCCCCCTCTCCCACGACGGTTACTGCCTCCACGAC GGGGTCTGCATGTACATCGAGGCCCTCGACAAGTACGCCTGCAACTGCGTC GTGGGCTACATCGGCGAGCGGTGCCAGTACCGCGACCTCAAGTGGTGGGA GCTGCGCTGA	8
Secuencia codificante de IGF-1 optimizada por codones: GGCCCGGAGACCCTCTGCGGCGCCGAGCTCGTGGACGCCCTCCAGTTCGT GTGCGGCGACCGCGGCTTCTACTTCAACAAGCCGACCGGCTACGGCAGCA GCAGCCGCCGCGCCCCGCAGACCGGCATCGTGGACGAGTGCTGCTTCCGC AGCTGCGACCTCCGCCGCCTGGAGATGTACTGCGCCCCGCTCAAGCCCGC CAAGAGCGCCTGA	9

Descripción	SEC ID Nº
Secuencia codificante de lactadherina optimizada por codones: CTGGACATCTGCTCGAAGAACCCGTGCCACAACGGCGGGCTCTGCGAGGA GATCAGCCAGGAGGTGCGGGGCGACGTGTTCCCCTCGTACACCTGCACCT GCCTGAAGGGCTACGCCGGGAACCACTGCGAGACGAAGTGCGTGGAGCCC CTGGGGATGGAGAACGGCAACATCGCCAACTCCCAGATCGCCGCCTCCTCC GTGCGGGTGACCTTCCTCGGCCTCCAGCACTGGGTCCCGGAGCTGGCCCG GCTCAACCGGGCGGGCATGGTGAACGCGTGGACCCCCTCGTCCAACGACG ACAACCCGTGGATCCAAGTGAACCTGCTCCGCCGCATGTGGGTCACCGGCG TGGTCACCCAAGGCGCCAGCCGCCTGGCCAGCCACGAGTACCTCAAGGCC TTCAAGGTCGCCTACAGCCTCAACGGCCACGAGTTCGACTTCATCCACGAC GTCAACAAGAAGCACAAGGAGTTCGTGGGCAACTGGAACAAGAACGCGGTC CACGTGAACCTCTTCGAGACCCCCGTCGAGGCCCAGTACGTCCGCCTCTAC CCCACGAGCTGCCACACCGCCTGCACGCTCCGCTTCGAGCTGCTGGGGTG CGAGCTGAACGGGTGCGCGAACCCGCTGGGGCTCAAGAACAACAGCATCC CCGACAAGCAGATCACGGCCTCGTCGTCGTACAAGACCTGGGGCCTGCACC TCTTCTCGTGGAACCCGAGCTACGCCCGGCTGGACAAGCAGGGCAACTTCA ACGCCTGGGTCGCCGGGAGCTACGGGAACGACCAGTGGCTCCAGGTGGAC CTCGGCAGCTCCAAGGAGGTCACCGGCATCATCACGCAGGCGGCCCGCAA CTTCGGCTCCGTGCAGTTCGTGGCCTCCTACAAGGTGGCCTACTCGAACGA CAGCGCCAACTGGACCGAGTACCAGGACCCGCGCACCGGGTCCAGCAAGA TCTTCCCCGGCAACTGGGACAACCACAGCCACAAGAAGAACCTGTTCGAGA CCCCCATCCTCGCCCGGTACGTCCGCATCCTCCCCGTCGCTTGGCACAACC GGATCGCGCTCCGGCTGGAGCTCCTCGGCTGCTGA	10
Secuencia codificante de kappa caseína optimizada por codones: GAGGTCCAAAACCAGAAGCAGCCCGCCTGCCACGAGAACGACGAGCGCCC CTTCTACCAGAAGACCGCACCCTACGTCCCGATGTACTACGTCCCGAACAG CTACCCCTACTACGGTACGAACCTGTACCAGCGCCGCCCGGCCATCGCTAT CAACAACCCCCTACGTCCCCCGGACCTACTACGCGAACCCGGCCGTGGTGC GGCCCCACGCGCAGATCCCGCAGCGGCAGTACCTGCCAAACAGCCACCCC CCCACCGTGGTGCGGCGGCCCAACCTCCACCCGAGCTTCATCGCTATCCCC CCCAAGAAGATCCAGGACAAGATCATCATCCCGACCATCAACACCATCGCCA CCGTGGAGCCGACGCCAGCCCCCGCGACCGAGCCCACGGTGGACAGCGT CGTGACCCCAGAGGCGTTCTCCGAATCGATCATCACCTCCACCCCCGAGAC CACCACGGTGGCCGTCACGCCGCCGACGGCATGA	11

Descripción	SEC ID Nº
Secuencia codificante de haptocorrina optimizada por codones: GAGATCTGCGAGGTCTCCGAGGAGAACTACATCCGCCTCAAGCCCCTCCTG AACACCATGATCCAGAGCAACTACAACCGGGGCACGTCGGCCGTGAACGTC GTGCTCTCCCTGAAGCTCGTGGGCATCCAGATCCAGACCCTCATGCAGAAG ATGATCCAGCAGATCAAGTACAACGTGAAGAGCCGCCTCTCGGACGTGTCC AGCGGCGAGCTGGCGCTCATCATCCTCGCGCTCGGCGTGTGCCGGAACGC GGAGGAGAACCTCATCTACGACTACCACCTCACGGACAAGCTGGAGAACAA GTTCCAGGCCGAGATCGAGAACATGGAGGCCCACAACGGCACCCCGCTGA CCAACTACTACCAGCTCAGCCTGGACGTCCTCGCGCTCTGCCTGTTCAACG GGAACTACTCCACCGCCGAGGTGGTCAACCACTTCACCCCCGAGAACAAGA ACTACTACTTCGGCTCGCAGTTCTCCGTGGACACCGGGGCCATGGCCGTCC TGGCCCTCACCTGCGTGAAGAAGTCCCTCATCAACGGCCAGATCAAGGCCG ACGAGGGCTCCCTGAAGAACATCTCGATCTACACCAAGAGCCTCGTGGAGA AGATCCTCAGCGAGAAGAAGGAGAACGGGCTGATCGGCAACACCTTCTCGA CCGGCGAGGCGATGCAGGCCCTGTTCGTGAGCAGCGACTACTACAACGAG AACGACTGGAACTGCCAGCAGACCCTCAACACGGTCCTGACCGAGATCAGC CAGGGCGCGTTCAGCAACCCCAACGCCGCCGCCCAGGTCCTGCCGGCCCT GATGGGCAAGACCTTCCTCGACATCAACAAGGACAGCTCCTGCGTGTCCGC GAGCGGCAACTTCAACATCTCCGCCGACGAGCCGATCACGGTGACGCCGC CCGACAGCCAGTCGTACATCTCCGTGAACTACAGCGTGCGGATCAACGAGA CCTACTTCACGAACGTGACGGTCCTCAACGGCTCGGTCTTCCTGAGCGTGA TGGAGAAGGCGCAGAAGATGAACGACACGATCTTCGGCTTCACGATGGAGG AGCGCAGCTGGGGCCCCTACATCACCTGCATCCAGGGCCTCTGCGCCAACA ACAACGACCGCACCTACTGGGAGCTGCTGAGCGGCGGCGAGCCGCTGAGC CAGGGGGCCGGCAGCTACGTGGTCCGCAACGGCGAGAACCTGGAGGTCCG GTGGAGCAAGTACTGA	12

Descripción	SEC ID Nº
Secuencia codificante de lactoperoxidasa optimizada por codones: CAAACGACCCGGACGTCGGCGATCTCCGACACGGTCTCGCAGGCCAAGGT GCAAGTCAACAAGGCATTCCTGGATTCGCGCACGCGGCTGAAGACCGCGAT GTCGTCCGAGACCCCGACGAGCCGGCAGCTGAGCGAGTACCTCAAGCACG CGAAGGGGCGGACGCGCACCGCCATCCGCAATGGCCAAGTGTGGGAGGAA TCCCTGAAGCGGCTGCGGCAGAAGGCGTCGCTCACCAACGTGACCGACCC GTCCCTCGACCTGACCAGCCTCTCCCTGGAGGTCGGCTGCGGCGCCCCGG CGCCCGTCGTGCGCTGCGACCCCTGCTCGCCATACCGCACGATCACGGGC GACTGCAACAACCGGCGGAAGCCGGCACTGGGGGCTGCGAACCGCGCCCT CGCGCGCTGGCTCCCCGCCGAGTACGAGGACGGCCTCAGCCTCCCCTTCG GTTGGACCCCCGGCAAGACGCGCAACGGCTTCCCGCTCCCGCTCGCTCGC GAGGTCAGCAACAAGATCGTCGGTTACCTGAACGAGGAGGGGGTCCTCGAC CAAAACCGCTCCCTCCTCTTCATGCAGTGGGGGCAGATCGTGGACCACGAC CTGGACTTCGCCCCGGACACGGAGCTGGGCTCCAGCGAGTACAGCAAGAC CCAGTGCGACGAATACTGCATCCAGGGCGACAACTGCTTCCCGATCATGTT CCCCCCGAACGACCCGAAGGCGGGCACCCAGGGCAAGTGCATGCCGTTCT TCCGGGCAGGCTTCGTCTGCCCGACCCCCCCGTACAAGTCCCTCGCGCGC GAGCAGATCAACGCGCTCACGTCCTTCCTCGACGCCAGCTTCGTCTACAGC AGCGAGCCGTCCCTCGCCAGCCGCCTCCGCAACCTCAGCAGCCCCCTCGG CCTCATGGCGGTCAACCAGGAGGTGTCGGACCACGGCCTCCCATACCTGCC GTACGACAGCAAGAAGCCGTCCCCCTGCGAGTTCATCAACACCACCGCGCG CGTCCCGTGCTTCCTCGCCGGCGATTCGCGGGCGAGCGAGCACATCCTCC TCGCCACGAGCCACACCCTGTTCCTCCGCGAGCACAACCGCCTCGCCCGG GAGCTGAAGCGCCTCAACCCGCAGTGGGACGGCGAGAAGCTCTACCAGGA GGCCCGGAAGATCCTCGGCGCTTTCGTCCAGATCATCACCTTCCGGGACTA CCTCCCCATCCTGCTCGGTGACCACATGCAGAAGTGGATCCCCCCCTACCA AGGCTACTCCGAGAGCGTGGACCCGCGCATCTCCAACGTCTTCACGTTCGC GTTCCGCTTCGGGCACCTGGAGGTGCCGTCGTCGATGTTCCGCCTCGACGA GAACTACCAGCCCTGGGGCCCAGAGCCGGAGCTGCCGCTCCACACCCTGT TCTTCAACACCTGGCGGATGGTCAAGGACGGCGGCATCGACCCGCTCGTGC GCGGGCTCCTGGCTAAGAAGTCGAAGCTCATGAAGCAGAACAAGATGATGA CCGGCGAGCTGCGCAACAAGCTGTTCCAGCCCACCCACCGCATCCACGGG TTCGACCTGGCTGCAATCAACACCCAGCGGTGCCGCGACCACGGCCAGCC CGGCTACAACTCGTGGCGCGCGTTCTGCGACCTCTCCCAGCCACAGACGCT GGAGGAGCTCAACACCGTGCTCAAGAGCAAGATGCTCGCCAAGAAGCTGCT CGGGCTCTACGGCACGCCCGACAACATCGACATCTGGATCGGGGCCATCG CGGAGCCGCTCGTGGAGCGCGGGCGCGTCGGCCCGCTGCTCGCGTGCCT CCTGGGCAAGCAATTCCAACAGATCCGCGACGGGGACCGGTTCTGGTGGG AGAACCCCGGCGTGTTCACCAACGAGCAGAAGGATTCGCTCCAAAAGATGA GCTTCTCCCGCCTGGTGTGCGACAACACCCGCATCACCAAGGTCCCGCGCG ACCCATTCTGGGCCAACTCCTACCCGTACGACTTCGTGGACTGCTCCGCCA TCGACAAGCTCGACCTGTCCCCCTGGGCATCGGTGAAGAACTGA	13

Descripción	SEC ID Nº
Secuencia codificante de alfa-1-antitripsina optimizada por codones: GAGGACCCGCAGGGCGACGCCGCCCAGAAGACCGACACCAGCCACCACGA CCAGGACCACCCGACGTTCAACAAGATCACCCCGAATTTGGCCGAATTCGC CTTCAGCCTGTACCGCCAGCTCGCGCACCAGTCCAACTCCACCAACATCTTC TTCAGCCCGGTGAGCATCGCCACCGCCTTCGCCATGCTGTCCCTGGGTACC AAGGCGGACACCCACGACGAGATCCTCGAAGGGCTGAACTTCAACCTGACG GAGATCCCGGAGGCGCAGATCCACGAGGGCTTCCAGGAGCTGCTCAGGAC GCTCAACCAGCCGGACTCCCAGCTCCAGCTCACCACCGGCAACGGGCTCTT CCTGTCCGAGGGCCTCAAGCTCGTCGATAAGTTCCTGGAGGACGTGAAGAA GCTCTACCACTCCGAGGCGTTCACCGTCAACTTCGGGGACACCGAGGAGGC CAAGAAGCAGATCAACGACTACGTCGAGAAGGGGACCCAGGGCAAGATCGT GGACCTGGTCAAGGAATTGGACAGGGACACCGTCTTCGCGCTCGTCAACTA CATCTTCTTCAAGGGCAAGTGGGAGCGCCCGTTCGAGGTGAAGGACACCGA GGAGGAGGACTTCCACGTCGACCAGGTCACCACCGTCAAGGTCCCGATGAT GAAGAGGCTCGGCATGTTCAACATCCAGCACTGCAAGAAGCTCTCCAGCTG GGTGCTCCTCATGAAGTACCTGGGGAACGCCACCGCCATCTTCTTCCTGCC GGACGAGGGCAAGCTCCAGCACCTGGAGAACGAGCTGACGCACGACATCA TCACGAAGTTCCTGGAGAACGAGGACAGGCGCTCCGCTAGCCTCCACCTCC CGAAGCTGAGCATCACCGGCACGTACGACCTGAAGAGCGTGCTGGGCCAG CTGGGCATCACGAAGGTCTTCAGCAACGGCGCGGACCTCTCCGGCGTGAC GGAGGAGGCCCCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCACAAGGCGGTGCTCA CGATCGACGAGAAGGGGACGGAAGCTGCCGGGGCCATGTTCCTGGAGGCC ATCCCCGTGTCCATCCCGCCCGAGGTCAAGTTCAACAAGCCCTTCGTCTTCC TGATGATCGAGCAGAACACGAAGAGCCCCCTCTTCATGGGGAAGGTCGTCA ACCCCACGCAGAAGTGA Secuencia codificante de inmunoglobulina A optimizada por codones	14
Promotor Gt1 de arroz y secuencia codificante líder Gt1 CATGAGTAATGTGTGAGCATTATGGGACCACGAAATAAAAAGAACATTTTGAT GAGTCGTGTATCCTCGATGAGCCTCAAAAGTTCTCTCACCCCGGATAAGAAA CCCTTAAGCAATGTGCAAAGTTTGCATTCTCCACTGACATAATGCAAAATAAG ATATCATCGATGACATAGCAACTCATGCATCATATCATGCCTCTCTCAACCTA TTCATTCCTACTCATCTACATAAGTATCTTCAGCTAAATGTTAGAACATAAACC CATAAGTCACGTTTGATGAGTATTAGGCGTGACACATGACAAATCACAGACT CAAGCAAGATAAAGCAAAATGATGTGTACATAAAACTCCAGAGCTATATGTCA TATTGCAAAAAGAGGAGAGCTTATAAGACAAGGCATGACTCACAAAAATTCA CTTGCCTTTCGTGTCAAAAAGAGGAGGGCTTTACATTATCCATGTCATATTGC AAAAGAAAGAGAGAAAGAACAACACAATGCTGCGTCAATTATACATATCTGTA TGTCCATCATTATTCATCCACCTTTCGTGTACCACACTTCATATATCATAAGA GTCACTTCACGTCTGGACATTAACAAACTCTATCTTAACATTTAGATGCAAGA GCCTTTATCTCACTATAAATGCACGATGATTTCTCATTGTTTCTCACAAAAAG CGGCCGCTTCATTAGTCCTACAACAACATGGCATCCATAAATCGCCCCATAG TTTTCTTCACAGTTTGCTTGTTCCTCTTGTGCGATGGCTCCCTAGCC Secuencia codificante de alfa-1-antitripsina optimizada por codones	15

Descripción	SEC ID Nº
Promotor Glb de arroz y secuencia codificante líder Gt1 CTGCAGGGAGGAGAGGGGAGAGATGGTGAGAGAGGAGGAAGAAGAGGAG GGGTGACAATGATATGTGGGGCATGTGGGCACCCAATTTTTTAATTCATTCT TTTGTTGAAACTGACATGTGGGTCCCATGAGATTTATTATTTTTCGGATCGAA TCGCCACGTAAGCGCTACGTCAATGCTACGTCAGATGAAGACCGAGTCAAAT TAGCCACGTAAGCGCCACGTCAGCCAAAACCACCATCCAAACCGCCGAGGG ACCTCATCTGCACTGGTTTTGATAGTTGAGGGACCCGTTGTATCTGGTTTTTC GATTGAAGGACGAAAATCAAATTTGTTGACAAGTTAAGGGACCTTAAATGAA CTTATTCCATTTCAAAATATTCTGTGAGCCATATATACCGTGGGCTTCCAATC CTCCTCAAATTAAAGGGCCTTTTTAAAATAGATAATTGCCTTCTTTCAGTCAC CCATAAAAGTACAAAACTACTACCAACAAGCAACATGCGCAGTTACACACATT TTCTGCACATTTCCGCCACGTCACAAAGAGCTAAGAGTTATCCCTAGGACAA TCTCATTAGTGTAGATACATCCATTAATCTTTTATCAGAGGCAAACGTAAAGC CGCTCTTTATGACAAAAATAGGTGACACAAAAGTGTTATCTGCCACATACATA ACTTCAGAAATTACCCAACACCAAGAGAAAAATAAAAAAAAATCTTTTTGCAA GCTCCAAATCTTGGAAACCTTTTTCACTCTTTGCAGCATTGTACTCTTGCTCT TTTTCCAACCGATCCATGTCACCCTCAAGCTTCTACTTGATCTACACGAAGCT CACCGTGCACACAACCATGGCCACAAAAACCCTATAAAACCCCATCCGATCG CCATCATCTCATCATCAGTTCATTACCAACAAACAAAAGAGGAAAAAAAACAT ATACACTTCTAGTGATTGTCTGATTGATCATCAATCTAGAGGCGGCCGCATG GCTAGCAAGGTCGTCTTCTTCGCGGCGGCGCTCATGGCGGCCATGGTGGC CATCTCCGGC	16

Promotor Gt1 de arroz y secuencia codificante líder Gt1	
Otras secuencias promotoras específicas de maduración de monocotiledóneas	17-23

Sec Nº 17 sec promotora Bx7

CTGCAGGCCAGGGAAAGACAATGGACATGCAAAGAGGTAGGGGCAGGGAA
GAAACACTTGGAGATCATAGAAGAACATAAGAGGTTAAACATAGGAGGGCAT
AATGGACAATTAAATCTACATTAATTGAACTCATTTGGGAAGTAAACAAAATC
CATATTCTGGTGTAAATCAAACTATTTGACGCGGATTTACTAAGATCCTATGT
TAATTTTAGACATGACTGGCCAAAGGTTTCAGTTAGTTCATTTGTCACGGAAA
GGTGTTTTCATAAGTCCAAAACTCTACCAACTTTTTTGCACGTCATAGCATAG
ATAGATGTTGTGAGTCATTGGATAGATATTGTGAGTCAGCATGGATTTGTGTT
GCCTGGAAATCCAACTAAATGACAAGCAACAAAACCTGAAATGGGCTTTAGG
AGAGATGGTTTATCAATTTACATGTTCCATGCAGGCTACCTTCCACTACTCGA
CATGGTTAGAAGTTTTGAGTGCCGCATATTTGCGGAAGCAATGGCACTACTC
GACATGGTTAGAAGTTTTGAGTGCCGCATATTTGCGGAAGCAATGGCTAACA
GATACATATTCTGCCAAACCCCAAGAAGGATAATCACTCCTCTTAGATAAAAA
GAACAGACCAATGTACAAACATCCACACTTCTGCAAACAATACACCAGAACT
AGGATTAAGCCCATTACGTGGCTTTAGCAGACCGTCCAAAAATCTGTTTTGC
AAGCACCAATTGCTCCTTACTTATCCAGCTTCTTTTGTGTTGGCAAACTGCCC
TTTTCCAACCGATTTTGTTTCTTCTCACGCTTTCTTCATAGGCTAAACTAACCT
CGGCGTGCACACAACCATGTCCTGAACCTTCACCTCGTCCCTATAAAAGCCC
ATCCAACCTTACAATCTCATCATCACCCACAACACCGAGCACCCCAATCTAC
AGATCAATTCACTGACAGTTCACTGATCTAGA

Sec Nº 18 sec promotora Glub-2

CTGCAGTAATGGATACCTAGTAGCAAGCTAGCTTAAACAAATCTAAATTCCAA
TCTGTTCGTAAACGTTTTCTCGATCGCAATTTTGATCAAAACTATTGAAAACC
TCAATTAAACCATTCAAAATTTTTAATATACCCAACAAGAGCGTCCAAACCAA
ATATGTAAATATGGATGTCATGATAATTGACTTATGACAATGTGATTATTTCAT
CAAGTCTTTAAATCATTAATTCTAGTTGAAGGTTTATGTTTTCTTATGCTAAAG
GGTTATGTTTATATAAGAATATTAAAGAGCAAATTGCAATAGATCAACACAAC
AAATTTGAATGTTTCCAGATGTGTAAAAATATCCAAATTAATTGTTTTAAAATA
GTTTTAAGAAGGATCTGATATGCAAGTTTGATAGTTAGTAAACTGCAAAAGGG
CTTATTACATGGAAAATTCCTTATTGAATATGTTTCATTGACTGGTTTATTTTA
CATGACAACAAAGTTACTAGTATGTCAATAAAAAAATACAAGGTTACTTGTCA
ATTGTATTGTGCCAAGTAAAGATGACAACAAACATACAAATTTATTTGTTCTTT
TATAGAAACACCTAACTTATCAAGGATAGTTGGCCACGCAAAAATGACAACAT
ACTTTACAATTGTATCATCATAAAGATCTTATCAAGTATAAGAACTTTATGGTG
ACATAAAAAATAATCACAAGGGCAAGACACATACTAAAAGTATGGACAGAAAT
TTCTTAACAAACTCCATTTGTTTTGTATCCAAAAGCATAAGAAATGAGTCATG
GCTGAGTCATGATATGTAGTTCAATCTTGCAAAATTGCCTTTTTGTTAAGTATT
GTTTTAACACTACAAGTCACATATTGTCTATACTTGCAACAAACACTATTACC
GTGTATCCCAAGTGGCCTTTTCATTGCTATATAAACTAGCTTGATCGGTCTTT
CAACTCACATCAATTAGCTTAAGTTTCCATTAGCAACTGCTAATAGCT

Sec Nº 19 sec promotora Gt3

GTGGTTATGACTTATTCACTTTTTGTGACTCCAAAATGTAGTAGGTCTAACTG
ATTGTTTAAAGTGATGTCTTACTGTAGAAGTTTCATCCCAAAAGCAATCACTA
AAGCAACACACACGTATAGTCCACCTTCACGTAATTCTTTGTGGAAGATAACA
AGAAGGCTCACTGAAAAATAAAAGCAAAGAAAAGGATATCAAACAGACCATT
GTGCATCCCATTGATCCTTGTATGTCTATTTATCTATCCTCCTTTTGTGTACCT
TACTTCTATCTAGTGAGTCACTTCATATGTGGACATTAACAAACTCTATCTTAA
CATCTAGTCGATCACTACTTTACTTCACTATAAAAGGACCAACATATATCATC
CATTTCTCACAAAAGCATTGAGTTCAGTCCCACAAAATCTAGA

Promotor Gt1 de arroz y secuencia codificante líder Gt1	
Sec Nº 20 se promotora Glub-1 CTGCAGAGATATGGATTTTCTAAGATTAATTGATTCTCTGTCTAAAGAAAAAA AGTATTATTGAATTAAATGGAAAAAGAAAAAGGAAAAAGGGGATGGCTTCTG CTTTTTGGGCTGAAGGCGGCGTGTGGCCAGCGTGCTGCGTGCGGACAGCG AGCGAACACACGACGGAGCAGCTACGACGAACGGGGGACCGAGTGGACCG GACGAGGATGTGGCCTAGGACGAGTGCACAAGGCTAGTGGACTCGGTCCC CGCGCGGTATCCCGAGTGGTCCACTGTCTGCAAACACGATTCACATAGAGC GGGCAGACGCGGGAGCCGTCCTAGGTGCACCGGAAGCAAATCCGTCGCCT GGGTGGATTTGAGTGACACGGCCCACGTGTAGCCTCACAGCTCTCCGTGGT CAGATGTGTAAAATTATCATAATATGTGTTTTTCAAATAGTTAAATAATATATAT AGGCAAGTTATATGGGTCAATAAGCAGTAAAAAGGCTTATGACATGGTAAAA TTACTTACACCAATATGCCTTACTGTCTGATATATTTTACATGACAACAAAGTT ACAAGTACGTCATTTAAAAATACAAGTTACTTATCAATTGTAGTGTATCAAGTA AATGACAACAAACCTACAAATTTGCTATTTTGAAGGAACACTTAAAAAAATCA ATAGGCAAGTTATATAGTCAATAAACTGCAAGAAGGCTTATGACATGGAAAAA TTACATACACCAATATGCTTTATTGTCCGGTATATTTTACAAGACAACAAAGTT ATAAGTATGTCATTTAAAAATACAAGTTACTTATCAATTGTCAAGTAAATGAAA ACAAACCTACAAATTTGTTATTTTGAAGGAACACCTAAATTATCAAATATAGCT TGCTACGCAAAATGACAACATGCTTACAAGTTATTATCATCTTAAAGTTAGAC TCATCTTCTCAAGCATAAGAGCTTTATGGTGCAAAAACAAATATAATGACAAG GCAAAGATACATACATATTAAGAGTATGGACAGACATTTCTTTAACAAACTCC ATTTGTATTACTCCAAAAGCACCAGAAGTTTGTCATGGCTGAGTCATGAAATG TATAGTTCAATCTTGCAAAGTTGCCTTTCCTTTTGTACTGTGTTTTAACACTAC AAGCCATATATTGTCTGTACGTGCAACAAACTATATCACCATGTATCCCAAGA TGCTTTTTTTATTGCTATATAAACTAGCTTGGTCTGTCTTTGAACTCACATCAAT TAGCTTAAGTTTCCATAAGCAAGTACAAATAGCTCTAGA **Sec Nº 21 sec promotora prolamina de arroz** CTGCAGCATCGGCTTAGGTGTAGCAACACGACTTTATTATTATTATTATTATT ATTATTATTATTTTACAAAAATATAAAATAGATCAGTCCCTCACCACAAGTAGA GCAAGTTGGTGAGTTATTGTAAAGTTCTACAAAGCTAATTTAAAAGTTATTGC ATTAACTTATTTCATATTACAAACAAGAGTGTCAATGGAACAATGAAAACCAT ATGACATACTATAATTTTGTTTTTATTATTGAAATTATATAATTCAAAGAGAATA AATCCACATAGCCGTAAAGTTCTACATGTGGTGCATTACCAAAATATATATAG CTTACAAAACATGACAAGCTTAGTTTGAAAAATTGCAATCCTTATCACATTGA CACATAAAGTGAGTGATGAGTCATAATATTATTTTTCTTGCTACCCATCATGT ATATATGATAGCCACAAAGTTACTTTGATGATGATATCAAAGAACATTTTTAG GTGCACCTAACAGAATATCCAAATAATATGACTCACTTAGATCATAATAGAGC ATCAAGTAAAACTAACACTCTAAAGCAACCGATGGGAAAGCATCTATAAATAG ACAAGCACAATGAAAATCCTCATCATCCTTCACCACAATTCAAATATTATAGT TGAAGCATAGTAGTAGAATCCAACAACAATCTAGAG **Sec Nº 22 sec promotora cisteína peptidasa de arroz** CCAGGCTTCATCCTAACCATTACAGGCAAGATGTTGTATGAAGAAGGGCGAA CATGCAGATTGTTAAACTGACACGTGATGGACAAGAATGACCGATTGGTGAC	

Promotor Gt1 de arroz y secuencia codificante líder Gt1	
CGGTCTGACAATGGTCATGTCGTCAGCAGACAGCCATCTCCCACGTCGCGC CTGCTTCCGGTGAAAGTGGAGGTAGGTATGGGCCGTCCCGTCAGAAGGTGA TTCGGATGGCAGCGATACAAATCTCCGTCCATTAATGAAGAGAAGTCAAGTT GAAAGAAAGGGAGGGAGAGATGGTGCATGTGGGATCCCCTTGGGATATAAA AGGAGGACCTTGCCCACTTAGAAAGGAGAGGAGAAAGCAATCCCAGAAGAA TCGGGGGCTGACTGGCACTTTGTAGCTTCTTCATACGCGAATCCACCAAAAC ACAGGAGTAGGGTATTACGCTTCTCAGCGGCCCGAACCTGTATACATCGCC CGTGTCTTGTGTGTTTCCGCTCTTGCGAACCTTCCACAGATTGGGAGCTTAG AACCTCACCCAGGGCCCCCGGCCGAACTGGCAAAGGGGGGCCTGCGCGGT CTCCCGGTGAGGAGCCCCACGCTCCGTCAGTTCTAAATTACCCGATGAGAA AGGGAGGGGGGGGGGGGGAAATCTGCCTTGTTTATTTACGATCCAACGGATT TGGTCGACACCGATGAGGTGTCTTACCAGTTACCACGAGCTAGATTATAGTA CTAATTACTTGAGGATTCGGTTCCTAATTTTTTACCCGATCGACTTCGCCATG GAAAATTTTTTATTCGGGGGAGAATATCCACCCTGTTTCGCTCCTAATTAAGA TAGGAATTGTTACGATTAGCAACCTAATTCAGATCAGAATTGTTAGTTAGCGG CGTTGGATCCCTCACCTCATCCCATCCCAATTCCCAAACCCAAACTCCTCTT CCAGTCGCCGACCCAAACACGCATCCGCCGCCTATAAATCCCACCCGCATC GAGCCTATCAAGCCCAAAAAACCACAAACCAAACGAAGAAGGAAAAAAAAAG GAGGAAAAGAAAAGAGGAGGAAAGCGAAGAGGTTGGAGAGAGACGCTCGT CTCCACGTCGCCGCC **Sec Nº 23 promotor D-Hordeina de Cebada** CTTCGAGTGCCCGCCGATTTGCCAGCAATGGCTAACAGACACATATTCTGCC AAAACCCCAGAACAATAATCACTTCTCGTAGATGAAGAGAACAGACCAAGAT ACAAACGTCCACGCTTCAGCAAACAGTACCCCAGAACTAGGATTAAGCCGAT TACGCGGCTTTAGCAGACCGTCCAAAAAAACTGTTTTGCAAAGCTCCAATTC CTCCTTGCTTATCCAATTTCTTTTGTGTTGGCAAACTGCACTTGTCCAACCGA TTTTGTTCTTCCCGTGTTTCTTCTTAGGCTAACTAACACAGCCGTGCACATAG CCATGGTCCGGAATCTTCACCTCGTCCCTATAAAAGCCCAGCCAATCTCCAC AATCTCATCATCACCGAGAACACCGAGAACCACAAAACTAGAGATCAATTCA TTGACAGTCCACCG	
Otras secuencias líder de cuerpos de almacenamiento **Bx7 Nº 24 sec péptido señal bx7** ATGGCTAAGCGCCTGGTCCTCTTTGCGGCAGTAGTCGTCGCCCTCGTGGCT CTCACCGCC **Sec Nº 25 sec péptido señal Glub-2** ATGGCAACTACCATTTTCTCTCGTTTTTCTATATACTTTTGTGCTATGCTATTA TGCCAGGGTTCTATGGCC **Sec Nº 26 sec péptido señal Gt2** ATGTGGACATTAACAAACTCTATCTTAACATCTAGTCGATCACTACTTTACTTC ACTATAAAAGGACCAACATATATCATCCATT **Sec Nº 27 sec péptido señal Glub-1** ATGGCGAGTTCCGTTTTCTCTCGGTTTTCTATATACTTTTGTGTTCTTCTATTA TGCCATGGTTCTATGGCC **Sec Nº 28 sec péptido señal proalmina** ATGAAGATCATTTTCGTATTTGCTCTCCTTGCTATTGTTGCATGCAACGCTTC TGCACGGTTTGATGCT	**24-30**

Promotor Gt1 de arroz y secuencia codificante líder Gt1	
Sec Nº 29 sec péptido señal cisteína peptidasa de arroz ATGGCCGCCCGCGCCGCCGCCGCCGCGTTCCTGCTGCTGCTCATCGTCGT TGGTCACCGCGCC **Sec Nº 30 péptido señal D-Hordeina** ATGGCTAAGCGGCTGGTCCTCTTTGTGGCGGTAATCGTCGCCCTCGTGGCT CTCACCACCGCC **Otras secuencias promotoras específicas de maduración de monocotiledóneas**	
Secuencia del factor de transcripción O2 ATGGAGCACGTCATCTCAATGGAGGAGATCCTCGGGCCCTTCTGGGAGCTG CTACCACCGCCAGCGCCAGAGCCAGAGCGAGAGCAGCCTCCGGTAACCGG CATCGTCGTCGGCAGTGTCATAGACGTTGCTGCTGCTGGTCATGGTGACGG GGACATGATGGATCAGCAGCACGCCACAGAGTGGACCTTTGAGAGGTTACT AGAAGAGGAGGCTCTGACGACAAGCACACCGCCGCCGGTGGTGGTGGTGC CGAACTCTTGTTGCTCAGGCGCCCTAAATGCTGACCGGCCGCCGGTGATGG AAGAGGCGGTAACTATGGCGCCTGCGGCGGTGAGTAGTGCCGTAGTAGGT GACCCCATGGAGTACAATGCCATACTGAGGAGGAAGCTGGAGGAGGACCTC GAGGCCTTCAAAATGTGGAGGGCGGCCTCCAGTGTTGTGACCTCAGATCAA CGTTCTCAAGGCTCAAACAATCACACTGGAGGTAGCAGCATCAGGAATAATC CAGTGCAGAACAAGCTGATGAACGGCGAAGATCCAATCAACAATAACCACG CTCAAACTGCAGGCCTTGGCGTGAGGCTTGCTACTAGCTCTTCCTCGAGAG ATCCTTCACCATCAGACGAAGACATGGACGGAGAAGTAGAGATTCTGGGGT TCAAGATGCCTACCGAGGAAAGAGTGAGGAAAAGAAAGGAATCCAATAGAG AATCAGCCAGACGCTCGAGATACAGGAAAGCCGCTCACCTGAAAGAACTGG AAGACCAGGTAGCACAGCTAAAAGCCGAGAATTCTTGCCTGCTGAGGCGCA TTGCCGCTCTGAACCAGAAGTACAACGACGCTAACGTCGACAACAGGGTGC TGAGAGCGGACATGGAGACCCTAAGAGCTAAGGTGAAGATGGGAGAGGACT CTCTGAAGCGGGTGATAGAGATGAGCTCATCAGTGCCGTCGTCCATGCCCA TCTCGGCGCCGACCCCCAGCTCCGACGCTCCAGTGCCGCCGCCGCCTATC CGAGACAGCATCGTCGGCTACTTCTCCGCCACAGCCGCAGACGACGATGCT TCGGTCGGCAACGGTTTCTTGCGACTGCAAGCTCATCAAGAGCCTGCATCC ATGGTCGTCGGTGGAACTCTGAGCGCCACAGAGATGAACCGAGTAGCAGCA GCCACGCATTGCGCGGGGGCCATGGAGCACATCCAGACGGCGATGGGATC CATGCCGCCGACCTCCGCCTCCGGATCTACACCGCCGCCGCAGGATTATGA GCTGCTGGGTCCAAATGGGGCCATACACATGGACATGTATTAG	**31**
Secuencia del factor de transcripción PBF	**32**

Promotor Gt1 de arroz y secuencia codificante líder Gt1	
ATGGACATGATCTCCGGCAGCACTGCAGCAACATCAACACCCCACAACAAC CAACAGGCGGTGATGTTGTCATCCCCCATTATAAAGGAGGAAGCTAGGGAC CCAAAGCAGACACGAGCCATGCCCCAAATAGGTGGCAGTGGGGAGCGTAA GCCGAGGCCGCAACTACCTGAGGCGCTCAAGTGCCCACGCTGCGACTCCA ACAACACCAAGTTTTGCTACTACAACAATTATAGCATGTCACAACCACGCTAC TTTTGCAAGGCTTGCCGCCGCTATTGGACACATGGTGGTACCCTCCGCAAT GTCCCCATTGGTGGTGGGTGTCGCAAGAACAAACATGCCTCTAGATTTGTCT TGGGCTCTCACACCTCATCGTCCTCATCTGCTACCTATGCACCATTATCCCC TAGCACCAACGCTAGCTCTAGCAATATGAGCATCAACAAACATATGATGATG GTGCCTAACATGACGATGCCTACCCCAACGACAATGGGCTTATTCCCTAATG TGCTCCCAACACTTATGCCGACAGGTGGAGGCGGGGGCTTTGACTTCACTA TGGACAACCAACATAGATCATTGTCCTTCACACCAATGTCTCTACCTAGCCA GGGGCCAGTGCCTATGCTGGCTGCAGGAGGGAGTGAGGCAACACCGTCTT TCCTAGAGATGCTGAGAGGAGGGATTTTTCATGGTAGTAGTAGCTATAACAC AAGTCTCACGATGAGTGGTGGCAACAATGGAATGGACAAGCCATTTTCGCTG CCATCATATGGTGCAATGTGCACAAATGGGTTGAGTGGCTCAACCACTAATG ATGCCAGACAACTGGTGGGGCCTCAGCAGGATAACAAGGCCATCATGAAGA GCAGTAATAACAACAATGGTGTATCATTGTTGAACCTCTACTGGAACAAGCA CAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAG GGACAATAA	
Secuencia del factor de transcripción Reb	**33**

Promotor Gt1 de arroz y secuencia codificante líder Gt1	
ATGGAGCGGGTGTTCTCCGTGGAGGAGATCTCCGACCCATTCTGGGTCCCG CCTCCGCCGCCGCAGTCGGCGGCGGCGGCCCAGCAGCAGGGCGGCGGCG GCGTGGCTTCGGGAGGTGGTGGTGGTGTAGCGGGGGGCGGCGGCGGCGG GAACGCGATGAACCGGTGCCCGTCGGAGTGGTACTTCCAGAAGTTTCTGGA GGAGGCGGTGCTCGATAGCCCCGTCCCGAACCCTAGCCCGAGGGCCGAAG CGGGAGGGATCAGGGGCGCAGGAGGGGTGGTGCCGGTCGATGTTAAGCA GCCGCAGCTCTCGGCGGCGGCGACGACGAGCGCGGTGGTGGACCCCGTG GAGTACAACGCGATGCTGAAGCAGAAGCTGGAGAAGGACCTCGCCGCGGT CGCCATGTGGAGGGTACAGCCATTCTCCCCCCCTCTAGTACTCGAGAGCTT ACTGAGATCGGCAATGCTAGCTACTGTTTGCATCGAATGTTTATAGGTATTTA GATCGGGCATTTCTATAGACCAATGGCGTCCATGGTCTTGCAATGCGCTCTG TTGAGTGTCGGTGGTTGGTTCGACTCATAGTATGTAGGGTTGTGCGTATGTA CAAACGGAAGCTTCATAGACCTCGGTATTGAGATTGCGATATCGATGCAACC TGCGAATTGGCGATGTAATCAGTCATATTCTTACTAAACTGCGAGACAGTGG TTTGTTTGCAATTGCAATATTTTTGTATGGGGCTGCTTAAACTGTCATTGCCT TTTTAGATTGGCAATATGTGACTTTATGCAAGTATTTGATTGGGCGGATCCAG GAACAAAAAGTTGGGGGGATTCAACATACCGAGTACACTGGCATAAACACAT CATCTCAGTATTAAACTATGCTAAAATGCTATTAAGAGACCTTTAGCACCTCT TATCTTATCAACCATGGTGAAAAAATTGAAGGGGGGACTCAGGGGGGTATCC ATGGGTCCGATGGGTGCAGGGGGGACTGAGTCCCCCCTGCACCCACGTTG AATCCGCCCTGGCATGCGTATAAGCTGTCACAGCCATTTCTAGGTGCTTGTG CTTAGTTGGGTGATGTCAGCTTAATTTGTCTTTTCTATGTCGTCATCGATTTT CTAAGAAACGAAAAATAGCCTATTTATGTGCTCCAGAATTTGATGATCCCTGG CCCTTCATTTGCTGAAATTAGCCTATTTGTTGGTTGCCCTTCAGTTTTTTCCC AGCTTATGTTGTTGCAATGTGTGGCTATGCCTCGTTTTGTGCCCTATAATTTA TTATTTGCAATTCATTTTTGTACATGACTTAAAATGACACTAGAGCAACATGCA CTGATTGGTTATCCTATAATCATTTATGTAGTTCTGTTCATTTTATCATGCTAG CTCATGTCATTTTCATCTTCAGGCCTCTGGCACAGTTCCACCTGAGCGTCCT GGAGCTGGTTCATCCTTGCTGAATGCAGATGTTTCACACATAGGCGCTCCTA ATTCCATCGGAGGTACTTATCTTATCTGGTTACATTTTCAGATTGTTATGAAA CTACCCAAATATCCTGCACAATTGCATGGGATTAAATTTTAGTTTCTTTGAAAT AGAAGTAGAGTTGTATTGCTGTCACGTCATCAAATAGTTCTGAAGCTATGAAT AAATAAGTTCCGCATTTGTTAGTGATTCTTTGAACATTAGAATTGTTATGCTTA AGTAGATAGGGTTATGTTTGTTTGGAGTTCCCTTAAATCATTTCATTGCTGAC TGCCAGCTGGCAGGAGCATTTGTTGTTGCCTTGACCATGAATGAAGACCTTC CTGTTCTGAGTGCTCACAAGAAAACATATTTTGATTAATGCACCTTGAATCCT TAGGATCTTGCAAAGATGGGCACTTAGCTTTAGAATTGAGTAGTACTTAAATA GCTGTTGTTATCATGATTTGTCCTGTAGTGAAATGTCGACAAAACAGGAATG CTACTTTTGACTTCTGATATTTCATGCCTGGCTTTACTTATGCTCTGTTTGGAA CATGGGCACATATCAGGCAATGCTACTCCAGTTCAAAACATGCTAAGTGGCC CAAGTGGGGGATCGGGCTCACAGTTGGTACAGAATGTTGATGTCCTTGTAAA GCAGCCCACCAGCTCTTCATCAAGGGAGCAGTCAGATGATGATGACATGAA GGGAGAAGCTGAGACCACTGGAACTGCAAGACCTGCTGATCAAAGATTACA ACGAAGGTGATCATTCATTGCTTCCTTGTAATATAGATTCTGTACATAATTAA CCTACCTCGTCATGCATGCATGTGTCCTATTTTCACCTTAGCCCTTTCAGTTG GATTTCCACTTTCATCCGGTAGCCTTTCAGTTTCCTATTGCATCGCATATATG ATCTTTTACCTACCATATTAGTTCTCTGTGTGCCATACTCAGTGCTTAGTGTC TCGAGCAAGAGAGGAATTTGTATGGCTATTACACGTAGCACTTTGCTCTCTA CTTGTTTATTGACATAAGCAATTTGGGATGAATTAAATCTGAGTTCACATCAT ATTCCTTATGTCACAAGTTTCTGAAACCGATTGTATCTAGTATCTGGTTGATG CACCCCCATCTTGGATTTGCAAATCAAAGTTATACTCCCTAGAGAGCTTTACC	

Promotor Gt1 de arroz y secuencia codificante líder Gt1	
TTTCATAAAGCAATTACCCCAATAAACCACGGATTTGATAGCTATTGACTATG ATTACCAGAATTCATTTGGCAGCTATTTTCTCAATTTAAGTTTGGTATTAGTCT CAGTTGGCTGTAAAATAATGTCACGGTAGGGTACATGTATGTGCAGCATACA AGGTATGGGTGAGTTATGATATGGACAGTGTGTACACCCCACATTTGCTCAC TAAAATCAAAATATTCAAACGTCACGTGATGATATGGTGGATTGCATTATACC TTGTATTGTTTATTATGTTACTTGTGCTAGACAATAATATAGGCTGTTCTTTTG GGTGATTTTGTATGAAGATGTTGAGCAAGCACTTCTCGATATAATGCTAGTTT TGTTGACCTGTTCCAGGAAGCAATCCAATCGGGAGTCAGCCAGGCGCTCAA GAAGCAGAAAGGCAGCTCACTTGAATGAGCTGGAGGCACAGGTGTGATAGT TCACATAGTTATTTTCGATAAGACATAAAATCCTAAATTACTGGCTACTGACTT CAGTTATGGATTTACTTGTTACAGGTATCGCAATTAAGAGTCGAGAACTCCTC GCTGTTAAGGCGTCTTGCTGATGTTAACCAGAAGTACAATGATGCTGCTGTT GACAATAGAGTGCTAAAAGCAGATGTTGAGACCTTGAGAGCAAAGGTATGCT ATATATGCCTTTTGCAATATGCATCCCATGGATTGCTACTTTGGCTTGTTTCA AACTTTCAACGTGACTTGTGTACCCTGTTATTAGAAGAATAATCCCGCCTACC ATTATACTCTATAAATCACCATTTGGCCAGTCCAAACATGATTATTAAATCAG GTCAATCTGAACATTGAAATGTATCAAAAATTCGCAGGTGAAGATGGCAGAG GACTCGGTGAAGCGGGTGACAGGCATGAACGCGTTGTTTCCCGCCGCTTCT GATATGTCATCCCTCAGCATGCCATTCAACAGCTCCCCATCTGAAGCAACGT CAGACGCTGCTGTTCCCATCCAAGATGACCCGAACAATTACTTCGCTACTAA CAACGACATCGGAGGTAACAACAACTACATGCCCGACATACCTTCTTCGGCT CAGGAGGACGAGGACTTCGTCAATGGCGCTCTGGCTGCCGGCAAGATTGG CCGGCCAGCCTCGCTGCAGCGGGTGGCGAGCCTGGAGCATCTCCAGAAGA GGATGTGCGGTGGGCCGGCTTCGTCTGGGTCGACGTCCTGA	

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ventria Bioscience

<120> Expresión de proteínas de la leche humana en plantas transgénicas

<130> 50665-8022.WO00

<140> Sin asignar aún
<141> Presentada con esta

<150> US 60/269.199.
<151> 14-02-2001

<150> US 09/847.232
<151> 02-05-2001

<160> 33

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 393
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
aaagtcttcg agcggtgcga gctggcccgc acgctcaagc ggctcggcat ggacggctac      60
cggggcatca gcctcgccaa ctggatgtgc ctcgccaagt gggagtcggg ctacaacacc     120
cgcgcaacca actacaacgc cggcgaccgc tccaccgact acggcatctt ccagatcaac     180
tcccgctact ggtgcaacga cggcaagacg cccggggccg tcaacgcctg ccacctctcc     240
tgctcggccc tgctgcaaga caacatcgcc gacgccgtcg cgtgcgcgaa gcgcgtcgtc     300
cgcgacccgc agggcatccg ggcctgggtg gcctggcgca accgctgcca gaaccgggac     360
gtgcgccagt acgtccaggg ctgcggcgtc tga                                  393
```

<210> 2
<211> 130
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Lys Val Phe Glu Arg Cys Glu Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg Leu Gly
 1               5                  10                  15
Met Asp Gly Tyr Arg Gly Ile Ser Leu Ala Asn Trp Met Cys Leu Ala
            20                  25                  30
Lys Trp Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Arg Ala Thr Asn Tyr Asn Ala Gly
        35                  40                  45
Asp Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Phe Gln Ile Asn Ser Arg Tyr Trp
    50                  55                  60
Cys Asn Asp Gly Lys Thr Pro Gly Ala Val Asn Ala Cys His Leu Ser
65                  70                  75                  80
Cys Ser Ala Leu Leu Gln Asp Asn Ile Ala Asp Ala Val Ala Cys Ala
                85                  90                  95
Lys Arg Val Val Arg Asp Pro Gln Gly Ile Arg Ala Trp Val Ala Trp
            100                 105                 110
Arg Asn Arg Cys Gln Asn Arg Asp Val Arg Gln Tyr Val Gln Gly Cys
        115                 120                 125
Gly Val
    130
```

<210> 3
<211> 2079
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```
gggcggcggc ggcgctcggt gcagtggtgc gccgtgtccc agcccgaggc gaccaagtgc      60
ttccagtggc agcgcaacat gcggaaggtg cgcggcccgc cggtcagctg catcaagcgg     120
gactccccca tccaatgcat ccaggccatc gcggagaacc gcgccgacgc ggtcaccctg     180
gacggcgggt tcatctacga ggcggggctc gccccgtaca agctccgccc ggtggcggcg     240
gaggtgtacg gcaccgagcg ccagccgcgc acgcactact acgcggtggc cgtcgtcaag     300
aagggcgggt ccttccagct caacgagctg cagggcctga agtcgtgcca cacgggcctc     360
cggcggacgg cgggctggaa cgtgcccatc ggcaccctgc gccccttcct gaactggacc     420
ggcccgccgg agccgatcga ggccgccgtg gccccgttct tcagcgcctc ctgcgtcccc     480
ggcgccgaca agggccagtt cccgaacctc tgccggctct gcgccgggac gggcgagaac     540
aagtgcgcct tctcctcgca ggagccgtac ttctcctact cgggcgcgtt caagtgcctc     600
cgcgacgggg ccggcgacgt ggcgttcatc cgcgagtcca ccgtgttcga ggacctctcc     660
gacgaggcgg agcgggacga gtacgagctg ctgtgccccg acaacacccg caagccggtg     720
gacaagttca aggactgcca cctggcgcgg gtgccctcgc acgcggtcgt cgcccgcagc     780
gtcaacggca aggaggacgc gatctggaac ctcctccgcc aggcccagga gaagttcggc     840
aaggacaagt cccccaagtt ccagctcttc gggagcccca gcggccagaa ggacctcctc     900
ttcaaggact ccgcgatcgg cttctcccgc gtcccccccgc gcatcgactc cggcctgtac     960
ctcggctccg ggtacttcac cgcgatccag aacctccgga agagcgagga ggaggtggcg    1020
gcgcggcggg cccgcgtcgt gtggtgcgcc gtgggcgagc aggagctgcg gaagtgcaac    1080
cagtggagcg gcctgagcga ggggtcggtg acctgctcgt ccgccagcac caccgaggac    1140
tgcatcgcgc tcgtcctcaa gggggaggcc gacgcgatga gcctcgacgg ggggtacgtc    1200
tacaccgccg gcaagtgcgg cctggtcccg gtcctggcgg agaactacaa gtcgcagcag    1260
tccagcgacc ccgacccgaa ctgcgtggac cgccccgtcg agggctacct cgccgtggcc    1320
gtcgtgcgcc ggtccgacac ctccctgacg tggaacagcg tcaagggcaa gaagagctgc    1380
cacaccgccg tggaccgcac cgccggctgg aacatcccga tgggcctcct cttcaaccag    1440
accggctcct gcaagttcga cgagtacttc tcccagtcct gcgcccccgg ctcggacccc    1500
cgctccaacc tgtgcgccct ctgcatcggg gacgagcagg gcgagaacaa gtgcgtgccc    1560
aacagcaacg agcggtacta cggctacacg ggggccttcc gctgcctggc ggagaacgcc    1620
ggggacgtcg cgttcgtgaa ggacgtgacc gtgctgcaaa acacggacgg gaacaacaac    1680
gaggcgtggg cgaaggacct caagctcgcc gacttcgccc tgctgtgcct cgacggcaag    1740
cgcaagcccg tcaccgaggc gcggtcctgc cacctggcga tggcccccaa ccacgccgtc    1800
gtctcccgca tggacaaggt cgagcgcctc aagcaggtgc tcctgcacca gcaggccaag    1860
ttcggccgga acggcagcga ctgcccggac aagttctgcc tgttccagtc ggagaccaag    1920
aacctcctct tcaacgacaa caccgagtgc ctggcgcgcc tccacggcaa gaccacctac    1980
gagaagtacc tcggcccgca gtacgtcgcc ggcatcacca acctcaagaa gtgctccacc    2040
tccccctcc tggaggcgtg cgagttcctc cgcaagtga                            2079
```

<210> 4
<211> 690
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```
Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu
 1               5                  10                  15
Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly
            20                  25                  30
Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln
        35                  40                  45
Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Gly Gly Phe
    50                  55                  60
Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro Val Ala Ala
65                  70                  75                  80
Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr Tyr Ala Val
                85                  90                  95
Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu Leu Gln Gly
            100                 105                 110
Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly Trp Asn Val
        115                 120                 125
Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly Pro Pro Glu
    130                 135                 140
Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser Cys Val Pro
145                 150                 155                 160
```

```
Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu Cys Ala Gly
                165                 170                 175
Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro Tyr Phe Ser
            180                 185                 190
Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala
        195                 200                 205
Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp Glu Ala Glu
    210                 215                 220
Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val
225                 230                 235                 240
Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ser His Ala Val
                245                 250                 255
Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp Ala Ile Trp Asn Leu Leu
            260                 265                 270
Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp Lys Ser Pro Lys Phe Gln
        275                 280                 285
Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser
    290                 295                 300
Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg Ile Asp Ser Gly Leu Gly
305                 310                 315                 320
Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg Lys Ser Glu Glu Glu
                325                 330                 335
Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly Glu Gln
            340                 345                 350
Glu Leu Arg Lys Cys Asn Gln Trp Ser Gly Leu Ser Glu Gly Ser Val
        355                 360                 365
Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Leu Val Leu
    370                 375                 380
Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Tyr Val Tyr Thr
385                 390                 395                 400
Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Lys Ser
                405                 410                 415
Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys Val Asp Arg Pro Val Glu
            420                 425                 430
Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser Asp Thr Ser Leu Thr
        435                 440                 445
Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Asp Arg
    450                 455                 460
Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu Phe Asn Gln Thr Gly
465                 470                 475                 480
Ser Cys Lys Phe Asp Glu Tyr Phe Ser Gln Ser Cys Ala Pro Gly Ser
                485                 490                 495
Asp Pro Arg Ser Asn Leu Cys Ala Leu Cys Ile Gly Asp Glu Gln Gly
            500                 505                 510
Glu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser Asn Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Thr
        515                 520                 525
Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
    530                 535                 540
Lys Asp Val Thr Val Leu Gln Asn Thr Asp Gly Asn Asn Asn Glu Ala
545                 550                 555                 560
Trp Ala Lys Asp Leu Lys Leu Ala Asp Phe Ala Leu Leu Cys Leu Asp
                565                 570                 575
Gly Lys Arg Lys Pro Val Thr Glu Ala Arg Ser Cys His Leu Ala Met
            580                 585                 590
Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Met Asp Lys Val Glu Arg Leu
        595                 600                 605
Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Lys Phe Gly Arg Asn Gly Ser
    610                 615                 620
Asp Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Gln Ser Glu Thr Lys Asn Leu
625                 630                 635                 640
Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Arg Leu His Gly Lys Thr
                645                 650                 655
Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Pro Gln Tyr Val Ala Gly Ile Thr Asn
            660                 665                 670
Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu Ala Cys Glu Phe Leu
```

675 680 685

Arg Lys
690

<210> 5
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
atcgaagctt catgagtaat gtgtgagcat tatgggacca cg 42

<210> 6
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 6
ctagtctaga ctcgagccat ggggccggct agggagccat cgcacaagag gaa 53

<210> 7
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de lactoferricina optimizada por codones basada en la secuencia de *Homo sapiens*

<400> 7

accaagtgct tccagtggca gcgcaacatg cggaaggtgc gcggcccgcc ggtcagctgc 60
atcaagcggg ac 72

<210> 8
<211> 162
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante del EGF optimizada por codones basada en la secuencia de *Homo sapiens*

<400> 8

aactccgact cggagtgccc cctctcccac gacggttact gcctccacga cggggtctgc 60
atgtacatcg aggccctcga caagtacgcc tgcaactgcg tcgtgggcta catcggcgag 120
cggtgccagt accgcgacct caagtggtgg gagctgcgct ga 162

<210> 9
<211> 213
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante del IGF-1 optimizada por codones basada en la secuencia de *Homo sapiens*

<400> 9

```
ggcccggaga ccctctgcgg cgccgagctc gtggacgccc tccagttcgt gtgcggcgac      60
cgcggcttct acttcaacaa gccgaccggc tacggcagca gcagccgccg cgccccgcag     120
accggcatcg tggacgagtg ctgcttccgc agctgcgacc tccgccgcct ggagatgtac     180
tgcgccccgc tcaagcccgc caagagcgcc tga                                  213
```

<210> 10
<211> 1095
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de lactadherina optimizada por codones basada en la secuencia de *Homo sapiens*

<400> 10

```
ctggacatct gctcgaagaa cccgtgccac aacggcgggc tctgcgagga gatcagccag      60
gaggtgcggg gcgacgtgtt cccctcgtac acctgcacct gcctgaaggg ctacgccggg     120
aaccactgcg agacgaagtg cgtggagccc ctggggatgg agaacggcaa catcgccaac     180
tcccagatcg ccgcctcctc cgtgcgggtg accttcctcg gcctccagca ctgggtcccg     240
gagctggccc ggctcaaccg ggcgggcatg gtgaacgcgt ggaccccctc gtccaacgac     300
gacaacccgt ggatccaagt gaacctgctc cgccgcatgt gggtcaccgg cgtggtcacc     360
caaggcgcca gccgcctggc cagccacgag tacctcaagg ccttcaaggt cgcctacagc     420
ctcaacggcc acgagttcga cttcatccac gacgtcaaca agaagcacaa ggagttcgtg     480
ggcaactgga acaagaacgc ggtccacgtg aacctcttcg agaccccgt cgaggcccag      540
tacgtccgcc tctaccccac gagctgccac accgcctgca cgctccgctt cgagctgctg     600
gggtgcgagc tgaacgggtg cgcgaacccg ctggggctca agaacaacag catccccgac     660
aagcagatca cggcctcgtc gtcgtacaag acctggggcc tgcacctctt ctcgtggaac     720
ccgagctacg cccggctgga caagcagggc aacttcaacg cctgggtcgc cgggagctac     780
gggaacgacc agtggctcca ggtggacctc ggcagctcca aggaggtcac cggcatcatc     840
acgcaggggg cccgcaactt cggctccgtg cagttcgtgg cctcctacaa ggtggcctac     900
tcgaacgaca gcgccaactg gaccgagtac caggacccgc gcaccgggtc cagcaagatc     960
ttccccggca actgggacaa ccacagccac aagaagaacc tgttcgagac ccccatcctc    1020
gcccggtacg tccgcatcct ccccgtcgct tggcacaacc ggatcgcgct ccggctggag    1080
ctcctcggct gctga                                                     1095
```

<210> 11
<211> 489
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante de kappa-caseína optimizada por codones basada en la secuencia de *Homo sapiens*

<400> 11

```
gaggtccaaa accagaagca gcccgcctgc cacgagaacg acgagcgccc cttctaccag      60
aagaccgcac cctacgtccc gatgtactac gtcccgaaca gctacccctа ctacggtacg     120
aacctgtacc agcgccgccc ggccatcgct atcaacaacc cctacgtccc ccggacctac     180
tacgcgaacc cggccgtggt gcggccccac gcgcagatcc cgcagcggca gtacctgcca     240
aacagccacc ccccaccgt ggtgcggcgg cccaacctcc acccgagctt catcgctatc      300
ccccccaaga agatccagga caagatcatc atcccgacca tcaacaccat cgccaccgtg     360
gagccgacgc cagcccccgc gaccgagccc acggtggaca gcgtcgtgac cccagaggcg     420
ttctccgaat cgatcatcac ctccaccccc gagaccacca cggtggccgt cacgccgccg     480
acggcatga                                                            489
```

<210> 12
<211> 1233
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante del haptocorrina optimizada por codones basada en la secuencia de *Homo sapiens*

<400> 12

```
gagatctgcg aggtctccga ggagaactac atccgcctca agcccctcct gaacaccatg      60
atccagagca actacaaccg gggcacgtcg gccgtgaacg tcgtgctctc cctgaagctc     120
gtgggcatcc agatccagac cctcatgcag aagatgatcc agcagatcaa gtacaacgtg     180

aagagccgcc tctcggacgt gtccagcggc gagctggcgc tcatcatcct cgcgctcggc     240
gtgtgccgga acgcggagga gaacctcatc tacgactacc acctcacgga caagctggag     300
aacaagttcc aggccgagat cgagaacatg gaggcccaca acggcacccc gctgaccaac     360
tactaccagc tcagcctgga cgtcctcgcg ctctgcctgt tcaacgggaa ctactccacc     420
gccgaggtgg tcaaccactt caccccgag aacaagaact actacttcgg ctcgcagttc     480
tccgtggaca ccggggccat ggccgtcctg gccctcacct gcgtgaagaa gtccctcatc     540
aacggccaga tcaaggccga cgagggctcc ctgaagaaca tctcgatcta caccaagagc     600
ctcgtggaga agatcctcag cgagaagaag gagaacgggc tgatcggcaa caccttctcg     660
accggcgagg cgatgcaggc cctgttcgtg agcagcgact actacaacga gaacgactgg     720
aactgccagc agaccctcaa cacggtcctg accgagatca gccagggcgc gttcagcaac     780
cccaacgccg ccgcccaggt cctgccggcc ctgatgggca agaccttcct cgacatcaac     840
aaggacagct cctgcgtgtc cgcgagcggc aacttcaaca tctccgccga cgagccgatc     900
acggtgacgc cgcccgacag ccagtcgtac atctccgtga actacagcgt gcggatcaac     960
gagacctact tcacgaacgt gacggtcctc aacggctcgg tcttcctgag cgtgatggag    1020
aaggcgcaga agatgaacga cacgatcttc ggcttcacga tggaggagcg cagctggggc    1080
ccctacatca cctgcatcca gggcctctgc gccaacaaca acgaccgcac ctactgggag    1140
ctgctgagcg gcggcgagcc gctgagccag ggggccggca gctacgtggt ccgcaacggc    1200
gagaacctgg aggtccggtg gagcaagtac tga                                 1233
```

<210> 13
<211> 2061
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante del lactoperoxidasa optimizada por codones basada en la secuencia de *Homo sapiens*

<400> 13

```
caaacgaccc ggacgtcggc gatctccgac acggtctcgc aggccaaggt gcaagtcaac      60
aaggcattcc tggattcgcg cacgcggctg aagaccgcga tgtcgtccga gaccccgacg     120
agccggcagc tgagcgagta cctcaagcac gcgaaggggc ggacgcgcac cgccatccgc     180
aatggccaag tgtgggagga atccctgaag cggctgcggc agaaggcgtc gctcaccaac     240
gtgaccgacc cgtccctcga cctgaccagc ctctccctgg aggtcggctg cggcgccccg     300
gcgcccgtcg tgcgctgcga cccctgctcg ccataccgca cgatcacggg cgactgcaac     360
aaccggcgga agccggcact gggggctgcg aaccgcgccc tcgcgcgctg gctccccgcc     420
gagtacgagg acggcctcag cctcccccttc ggttggaccc ccggcaagac gcgcaacggc     480
ttcccgctcc cgctcgctcg cgaggtcagc aacaagatcg tcggttacct gaacgaggag     540
ggggtcctcg accaaaaccg ctccctcctc ttcatgcagt gggggcagat cgtggaccac     600
gacctggact tcgccccgga cacggagctg ggctccagcg agtacagcaa gacccagtgc     660
gacgaatact gcatccaggg cgacaactgc ttcccgatca tgttcccccc gaacgacccg     720
aaggcgggca cccagggcaa gtgcatgccg ttcttccggg caggcttcgt ctgcccgacc     780
cccccgtaca agtccctcgc gcgcgagcag atcaacgcgc tcacgtcctt cctcgacgcc     840
agcttcgtct acagcagcga gccgtccctc gccagccgcc tccgcaacct cagcagcccc     900
ctcggcctca tggcggtcaa ccaggaggtg tcggaccacg gcctcccata cctgccgtac     960
gacagcaaga agccgtcccc ctgcgagttc atcaacacca ccgcgcgcgt cccgtgcttc    1020
ctcgccggcg attcgcgggc gagcgagcac atcctcctcg ccacgagcca caccctgttc    1080
ctccgcgagc acaaccgcct cgcccgggag ctgaagcgcc tcaacccgca gtgggacggc    1140
gagaagctct accaggaggc ccggaagatc ctcggcgctt tcgtccagat catcaccttc    1200
cgggactacc tccccatcct gctcggtgac cacatgcaga agtggatccc ccctaccaa     1260
ggctactccg agagcgtgga cccgcgcatc tccaacgtct tcacgttcgc gttccgcttc    1320
gggcacctgg aggtgccgtc gtcgatgttc cgcctcgacg agaactacca gccctggggc    1380
ccagagccgg agctgccgct ccacaccctg ttcttcaaca cctggcggat ggtcaaggac    1440
ggcggcatcg acccgctcgt gcgcgggctc ctggctaaga agtcgaagct catgaagcag    1500
aacaagatga tgaccggcga gctgcgcaac aagctgttcc agcccaccca ccgcatccac    1560
gggttcgacc tggctgcaat caacacccag cggtgccgcg accacggcca gcccggctac    1620
aactcgtggc gcgcgttctg cgacctctcc cagccacaga cgctggagga gctcaacacc    1680
gtgctcaaga gcaagatgct cgccaagaag ctgctcgggc tctacggcac gcccgacaac    1740
atcgacatct ggatcggggc catcgcggag ccgctcgtgg agcgcgggcg cgtcggcccg    1800
ctgctcgcgt gcctcctggg caagcaattc caacagatcc gcgacgggga ccggttctgg    1860
tgggagaacc ccggcgtgtt caccaacgag cagaaggatt cgctccaaaa gatgagcttc    1920
tcccgcctgg tgtgcgacaa cacccgcatc accaaggtcc cgcgcgaccc attctgggcc    1980
aactcctacc cgtacgactt cgtggactgc tccgccatcg acaagctcga cctgtccccc    2040
tgggcatcgg tgaagaactg a                                              2061
```

<210> 14
<211> 1185
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia codificante del alfa-1-antitripsina optimizada por codones basada en la secuencia de *Homo sapiens*

<400> 14

```
gaggacccgc agggcgacgc cgcccagaag accgacacca gccaccacga ccaggaccac      60
ccgacgttca acaagatcac cccgaatttg gccgaattcg ccttcagcct gtaccgccag     120
ctcgcgcacc agtccaactc caccaacatc ttcttcagcc cggtgagcat cgccaccgcc     180
ttcgccatgc tgtccctggg taccaaggcg gacacccacg acgagatcct cgaagggctg     240
aacttcaacc tgacggagat cccggaggcg cagatccacg agggcttcca ggagctgctc     300
aggacgctca accagccgga ctcccagctc cagctcacca ccggcaacgg gctcttcctg     360
tccgagggcc tcaagctcgt cgataagttc ctggaggacg tgaagaagct ctaccactcc     420
gaggcgttca ccgtcaactt cggggacacc gaggaggcca agaagcagat caacgactac     480
gtcgagaagg ggacccaggg caagatcgtg gacctggtca aggaattgga cagggacacc     540
gtcttcgcgc tcgtcaacta catcttcttc aagggcaagt gggagcgccc gttcgaggtg     600
aaggacaccg aggaggagga cttccacgtc gaccaggtca ccaccgtcaa ggtcccgatg     660
atgaagaggc tcggcatgtt caacatccag cactgcaaga agctctccag ctgggtgctc     720
ctcatgaagt acctggggaa cgccaccgcc atcttcttcc tgccggacga gggcaagctc     780
cagcacctgg agaacgagct gacgcacgac atcatcacga agttcctgga gaacgaggac     840
aggcgctccg ctagcctcca cctcccgaag ctgagcatca ccggcacgta cgacctgaag     900
agcgtgctgg gccagctggg catcacgaag gtcttcagca acggcgcgga cctctccggc     960
gtgacggagg aggccccctt gaagctctcc aaggccgtgc acaaggcggt gctcacgatc    1020
gacgagaagg ggacggaagc tgccggggcc atgttcctgg aggccatccc cgtgtccatc    1080
ccgcccgagg tcaagttcaa caagcccttc gtcttcctga tgatcgagca gaacacgaag    1140
agccccctct tcatggggaa ggtcgtcaac cccacgcaga agtga                    1185
```

<210> 15
<211> 786
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor de Gt1 de arroz y secuencia codificante líder de Gt1

<400> 15

```
catgagtaat gtgtgagcat tatgggacca cgaaataaaa agaacatttt gatgagtcgt      60
gtatcctcga tgagcctcaa aagttctctc accccggata agaaaccctt aagcaatgtg     120
caaagtttgc attctccact gacataatgc aaaataagat atcatcgatg acatagcaac     180
tcatgcatca tatcatgcct ctctcaacct attcattcct actcatctac ataagtatct     240
tcagctaaat gttagaacat aaacccataa gtcacgtttg atgagtatta ggcgtgacac     300
atgacaaatc acagactcaa gcaagataaa gcaaaatgat gtgtacataa aactccagag     360
ctatatgtca tattgcaaaa agaggagagc ttataagaca aggcatgact cacaaaaatt     420
cacttgcctt tcgtgtcaaa aagaggaggg ctttacatta tccatgtcat attgcaaaag     480
aaagagagaa agaacaacac aatgctgcgt caattataca tatctgtatg tccatcatta     540
ttcatccacc tttcgtgtac cacacttcat atatcataag agtcacttca cgtctggaca     600
ttaacaaact ctatcttaac atttagatgc aagagccttt atctcactat aaatgcacga     660
tgatttctca ttgtttctca caaaaagcgg ccgcttcatt agtcctacaa caacatggca     720
tccataaatc gccccatagt tttcttcaca gtttgcttgt tcctcttgtg cgatggctcc     780
ctagcc                                                               786
```

<210> 16
<211> 1055
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor de Glb de arroz y secuencia codificante líder de Gt1

<400> 16

```
ctgcagggag gagaggggag agatggtgag agaggaggaa gaagaggagg ggtgacaatg      60
```

```
atatgtgggg catgtgggca cccaattttt taattcattc ttttgttgaa actgacatgt     120
gggtcccatg agatttatta ttttttcggat cgaatcgcca cgtaagcgct acgtcaatgc     180
tacgtcagat gaagaccgag tcaaattagc cacgtaagcg ccacgtcagc caaaaccacc     240
atccaaaccg ccgagggacc tcatctgcac tggttttgat agttgaggga cccgttgtat     300
ctggtttttc gattgaagga cgaaaatcaa atttgttgac aagttaaggg accttaaatg     360
aacttattcc atttcaaaat attctgtgag ccatatatac cgtgggcttc caatcctcct     420
caaattaaag ggccttttta aaatagataa ttgccttctt tcagtcaccc ataaaagtac     480
aaaactacta ccaacaagca acatgcgcag ttacacacat tttctgcaca tttccgccac     540
gtcacaaaga gctaagagtt atccctagga caatctcatt agtgtagata catccattaa     600
tcttttatca gaggcaaacg taaagccgct ctttatgaca aaaataggtg acacaaaagt     660
gttatctgcc acatacataa cttcagaaat tacccaacac caagagaaaa ataaaaaaaa     720
atctttttgc aagctccaaa tcttggaaac ctttttcact ctttgcagca ttgtactctt     780
gctctttttc caaccgatcc atgtcaccct caagcttcta cttgatctac acgaagctca     840
ccgtgcacac aaccatggcc acaaaaaccc tataaaaccc catccgatcg ccatcatctc     900
atcatcagtt cattaccaac aaacaaaaga ggaaaaaaaa catatacact tctagtgatt     960
gtctgattga tcatcaatct agaggcggcc gcatggctag caaggtcgtc ttcttcgcgg    1020
cggcgctcat ggcggccatg gtggccatct ccggc                               1055
```

<210> 17
<211> 976
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor Bx7

<400> 17

```
ctgcaggcca gggaaagaca atggacatgc aaagaggtag gggcagggaa gaaacacttg      60
gagatcatag aagaacataa gaggttaaac ataggagggc ataatggaca attaaatcta     120
cattaattga actcatttgg gaagtaaaca aaatccatat tctggtgtaa atcaaactat     180
ttgacgcgga tttactaaga tcctatgtta attttagaca tgactggcca aaggtttcag     240
ttagttcatt tgtcacggaa aggtgttttc ataagtccaa aactctacca acttttttgc     300
acgtcatagc atagatagat gttgtgagtc attggataga tattgtgagt cagcatggat     360
ttgtgttgcc tggaaatcca actaaatgac aagcaacaaa acctgaaatg ggctttagga     420
gagatggttt atcaatttac atgttccatg caggctacct tccactactc gacatggtta     480
gaagttttga gtgccgcata tttgcggaag caatggcact actcgacatg gttagaagtt     540
ttgagtgccg catatttgcg gaagcaatgg ctaacagata catattctgc caaaccccaa     600
gaaggataat cactcctctt agataaaaag aacagaccaa tgtacaaaca tccacacttc     660
tgcaaacaat acaccagaac taggattaag cccattacgt ggctttagca gaccgtccaa     720
aaatctgttt tgcaagcacc aattgctcct tacttatcca gctttcttttg tgttggcaaa     780
ctgccctttt ccaaccgatt ttgtttcttc tcacgctttc ttcataggct aaactaacct     840
cggcgtgcac acaaccatgt cctgaacctt cacctcgtcc ctataaaagc ccatccaacc     900
ttacaatctc atcatcaccc acaacaccga gcaccccaat ctacagatca attcactgac     960
agttcactga tctaga                                                    976
```

<210> 18
<211> 1009
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor Glub-2

<400> 18

```
ctgcagtaat ggatacctag tagcaagcta gcttaaacaa atctaaattc caatctgttc      60
gtaaacgttt tctcgatcgc aattttgatc aaaactattg aaaacctcaa ttaaaccatt     120
caaaattttt aatataccca acaagagcgt ccaaaccaaa tatgtaaata tggatgtcat     180
gataattgac ttatgacaat gtgattattt catcaagtct ttaaatcatt aattctagtt     240
gaaggtttat gttttcttat gctaaagggt tatgtttata taagaatatt aaagagcaaa     300
ttgcaataga tcaacacaac aaatttgaat gtttccagat gtgtaaaaat atccaaatta     360
attgttttaa aatagtttta agaaggatct gatatgcaag tttgatagtt agtaaactgc     420
aaaagggctt attacatgga aaattcctta ttgaatatgt ttcattgact ggtttatttt     480
acatgacaac aaagttacta gtatgtcaat aaaaaaatac aaggttactt gtcaattgta     540
ttgtgccaag taaagatgac aacaaacata caaatttatt tgttctttta tagaaacacc     600
taacttatca aggatagttg gccacgcaaa aatgacaaca tactttacaa ttgtatcatc     660

ataaagatct tatcaagtat aagaacttta tggtgacata aaaaataatc acaagggcaa     720
gacacatact aaaagtatgg acagaaattt cttaacaaac tccatttgtt ttgtatccaa     780
aagcataaga aatgagtcat ggctgagtca tgatatgtag ttcaatcttg caaaattgcc     840
tttttgttaa gtattgtttt aacactacaa gtcacatatt gtctatactt gcaacaaaca     900
ctattaccgt gtatcccaag tggccttttc attgctatat aaactagctt gatcggtctt     960
tcaactcaca tcaattagct taagtttcca ttagcaactg ctaatagct                1009
```

<210> 19
<211> 839
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor Gt3

<400> 19

```
ctgcagtgta agtgtagctt cttatagctt agtgctttac tatcttcaca agcacatgct      60
atagtattgt tccaagatga aagaataatt catccttgct accaacttgc atgatattat     120
atttgtgaat atcctatctc ttggcttata atgaaatgtg ctgctgggtt attctgacca     180
tggtatttga gagcctttgt atagctgaaa ccaacgtata tcgagcatgg aacagagaac     240
aaaatgcaag gatttttta ttctggttca tgccctggat gggttaatat cgtgatcatc     300
aaaaaagata tgcataaaat taaagtaata aatttgctca taagaaacca aaaccaaaag     360
cacatatgtc ctaaacaaac tgcattttgt ttgtcatgta gcaatacaag agataatata     420
tgacgtggtt atgacttatt cacttttttgt gactccaaaa tgtagtaggt ctaactgatt     480
gtttaaagtg atgtcttact gtagaagttt catcccaaaa gcaatcacta aagcaacaca     540
cacgtatagt ccaccttcac gtaattcttt gtggaagata acaagaaggc tcactgaaaa     600
ataaaagcaa agaaaaggat atcaaacaga ccattgtgca tcccattgat ccttgtatgt     660
ctatttatct atcctccttt tgtgtacctt acttctatct agtgagtcac ttcatatgtg     720
gacattaaca aactctatct taacatctag tcgatcacta ctttacttca ctataaaagg     780
accaacatat atcatccatt tctcacaaaa gcattgagtt cagtcccaca aaatctaga      839
```

<210> 20
<211> 1302
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor Glub-1

<400> 20

```
ctgcagagat atggattttc taagattaat tgattctctg tctaaagaaa aaaagtatta      60
ttgaattaaa tggaaaaaga aaaaggaaaa aggggatggc ttctgctttt tgggctgaag     120
gcggcgtgtg gccagcgtgc tgcgtgcgga cagcgagcga acacacgacg gagcagctac     180
gacgaacggg ggaccgagtg gaccggacga ggatgtggcc taggacgagt gcacaaggct     240
agtggactcg gtccccgcgc ggtatcccga gtggtccact gtctgcaaac acgattcaca     300
tagagcgggc agacgcggga gccgtcctag gtgcaccgga agcaaatccg tcgcctgggt     360
ggatttgagt gacacggccc acgtgtagcc tcacagctct ccgtggtcag atgtgtaaaa     420
ttatcataat atgtgttttt caaatagtta aataatatat ataggcaagt tatatgggtc     480
aataagcagt aaaaaggctt atgacatggt aaaattactt acaccaatat gccttactgt     540
ctgatatatt ttacatgaca acaaagttac aagtacgtca tttaaaaata caagttactt     600
atcaattgta gtgtatcaag taaatgacaa caaacctaca aatttgctat tttgaaggaa     660
cacttaaaaa aatcaatagg caagttatat agtcaataaa ctgcaagaag gcttatgaca     720
tggaaaaatt acatacacca atatgctttа ttgtccggta tattttacaa gacaacaaag     780
ttataagtat gtcatttaaa aatacaagtt acttatcaat tgtcaagtaa atgaaaacaa     840
acctacaaat ttgttatttt gaaggaacac ctaaattatc aaatatagct tgctacgcaa     900
aatgacaaca tgcttacaag ttattatcat cttaaagtta gactcatctt ctcaagcata     960
agagctttat ggtgcaaaaa caaatataat gacaaggcaa agatacatac atattaagag    1020
tatggacaga catttcttta acaaactcca tttgtattac tccaaaagca ccagaagttt    1080
gtcatggctg agtcatgaaa tgtatagttc aatcttgcaa agttgccttt ccttttgtac    1140
tgtgttttaa cactacaagc catatattgt ctgtacgtgc aacaaactat atcaccatgt    1200
atcccaagat gctttttttat tgctatataa actagcttgg tctgtctttg aactcacatc    1260
aattagctta agtttccata agcaagtaca aatagctcta ga                       1302
```

<210> 21
<211> 675
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor de prolamina de arroz

<400> 21

```
ctgcagcatc ggcttaggtg tagcaacacg actttattat tattattatt attattatta      60
ttattttaca aaaatataaa atagatcagt ccctcaccac aagtagagca agttggtgag     120
ttattgtaaa gttctacaaa gctaatttaa aagttattgc attaacttat ttcatattac     180
aaacaagagt gtcaatggaa caatgaaaac catatgacat actataattt tgtttttatt     240
attgaaatta tataattcaa agagaataaa tccacatagc cgtaaagttc tacatgtggt     300
gcattaccaa aatatatata gcttacaaaa catgacaagc ttagtttgaa aaattgcaat     360
ccttatcaca ttgacacata aagtgagtga tgagtcataa tattattttt cttgctaccc     420
atcatgtata tatgatagcc acaaagttac tttgatgatg atatcaaaga acatttttag     480
gtgcacctaa cagaatatcc aaataatatg actcacttag atcataatag agcatcaagt     540
aaaactaaca ctctaaagca accgatggga aagcatctat aaatagacaa gcacaatgaa     600
aatcctcatc atccttcacc acaattcaaa tattatagtt gaagcatagt agtagaatcc     660
aacaacaatc tagag                                                     675
```

<210> 22
<211> 1098
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor de cisteína peptidasa de arroz

<400> 22

ccaggcttca tcctaaccat tacaggcaag atgttgtatg aagaagggcg aacatgcaga 60
ttgttaaact gacacgtgat ggacaagaat gaccgattgg tgaccggtct gacaatggtc 120
atgtcgtcag cagacagcca tctcccacgt cgcgcctgct tccggtgaaa gtggaggtag 180
gtatgggccg tcccgtcaga aggtgattcg gatggcagcg atacaaatct ccgtccatta 240
atgaagagaa gtcaagttga aagaaaggga gggagagatg gtgcatgtgg gatccccttg 300
ggatataaaa ggaggacctt gcccacttag aaaggagagg agaaagcaat cccagaagaa 360
tcgggggctg actggcactt tgtagcttct tcatacgcga atccaccaaa acacaggagt 420
agggtattac gcttctcagc ggcccgaacc tgtatacatc gcccgtgtct tgtgtgtttc 480
cgctcttgcg aaccttccac agattgggag cttagaacct cacccagggc ccccggccga 540
actggcaaag gggggcctgc gcggtctccc ggtgaggagc cccacgctcc gtcagttcta 600
aattacccga tgagaaaggg agggggggggg gggaaatctg ccttgtttat ttacgatcca 660
acggatttgg tcgacaccga tgaggtgtct taccagttac cacgagctag attatagtac 720
taattacttg aggattcggt tcctaatttt ttacccgatc gacttcgcca tggaaaattt 780
tttattcggg ggagaatatc caccctgttt cgctcctaat taagatagga attgttacga 840
ttagcaacct aattcagatc agaattgtta gttagcggcg ttggatccct cacctcatcc 900
catcccaatt cccaaaccca aactcctctt ccagtcgccg acccaaacac gcatccgccg 960
cctataaatc ccacccgcat cgagcctatc aagcccaaaa aaccacaaac caaacgaaga 1020
aggaaaaaaa aaggaggaaa agaaaagagg aggaaagcga agaggttgga gagagacgct 1080
cgtctccacg tcgccgcc 1098

<210> 23
<211> 432
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor de D-Hordeína de cebada

<400> 23

cttcgagtgc ccgccgattt gccagcaatg gctaacagac acatattctg ccaaaacccc 60
agaacaataa tcacttctcg tagatgaaga gaacagacca agatacaaac gtccacgctt 120
cagcaaacag taccccagaa ctaggattaa gccgattacg cggctttagc agaccgtcca 180
aaaaaactgt tttgcaaagc tccaattcct ccttgcttat ccaatttctt ttgtgttggc 240
aaactgcact tgtccaaccg attttgttct tcccgtgttt cttcttaggc taactaacac 300
agccgtgcac atagccatgg tccggaatct tcacctcgtc cctataaaag cccagccaat 360
ctccacaatc tcatcatcac cgagaacacc gagaaccaca aaactagaga tcaattcatt 420
gacagtccac cg 432

<210> 24
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido señal de bx7

<400> 24
atggctaagc gcctggtcct ctttgcggca gtagtcgtcg ccctcgtggc tctcaccgcc 60

<210> 25
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido señal de Glub-2

<400> 25

atggcaacta ccattttctc tcgtttttct atatactttt gtgctatgct attatgccag 60
ggttctatgg cc 72

<210> 26
<211> 85

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido señal de Gt3

<400> 26

atgtggacat taacaaactc tatcttaaca tctagtcgat cactacttta cttcactata 60
aaaggaccaa catatatcat ccatt 85

<210> 27
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido señal de Glub-2

<400> 27

atggcgagtt ccgttttctc tcggttttct atatactttt gtgttcttct attatgccat 60
ggttctatgg cc 72

<210> 28
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido señal de prolamina

<400> 28

atgaagatca ttttcgtatt tgctctcctt gctattgttg catgcaacgc ttctgcacgg 60
tttgatgct 69

<210> 29
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido señal de cisteína peptidasa de arroz

<400> 29

atggccgccc gcgccgccgc cgccgcgttc ctgctgctgc tcatcgtcgt tggtcaccgc 60
gcc 63

<210> 30
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del péptido señal de D-Hordeína

<400> 30

atggctaagc ggctggtcct ctttgtggcg gtaatcgtcg ccctcgtggc tctcaccacc 60
gcc 63

<210> 31
<211> 1314

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del factor de transcripción O2

<400> 31

atggagcacg tcatctcaat ggaggagatc ctcgggccct tctgggagct gctaccaccg 60
ccagcgccag agccagagcg agagcagcct ccggtaaccg gcatcgtcgt cggcagtgtc 120
atagacgttg ctgctgctgg tcatggtgac ggggacatga tggatcagca gcacgccaca 180
gagtggacct ttgagaggtt actagaagag gaggctctga cgacaagcac accgccgccg 240
gtggtggtgg tgccgaactc ttgttgctca ggcgccctaa atgctgaccg gccgccggtg 300
atggaagagg cggtaactat ggcgcctgcg gcggtgagta gtgccgtagt aggtgacccc 360
atggagtaca atgccatact gaggaggaag ctggaggagg acctcgaggc cttcaaaatg 420
tggagggcgg cctccagtgt tgtgacctca gatcaacgtt ctcaaggctc aaacaatcac 480
actggaggta gcagcatcag gaataatcca gtgcagaaca agctgatgaa cggcgaagat 540
ccaatcaaca ataaccacgc tcaaactgca ggccttggcg tgaggcttgc tactagctct 600
tcctcgagag atccttcacc atcagacgaa gacatggacg gagaagtaga gattctgggg 660
ttcaagatgc ctaccgagga aagagtgagg aaaagaaagg aatccaatag agaatcagcc 720
agacgctcga gatacaggaa agccgctcac ctgaaagaac tggaagacca ggtagcacag 780
ctaaaagccg agaattcttg cctgctgagg cgcattgccg ctctgaacca gaagtacaac 840
gacgctaacg tcgacaacag ggtgctgaga gcggacatgg agaccctaag agctaaggtg 900
aagatgggag aggactctct gaagcgggtg atagagatga gctcatcagt gccgtcgtcc 960
atgcccatct cggcgccgac ccccagctcc gacgctccag tgccgccgcc gcctatccga 1020
gacagcatcg tcggctactt ctccgccaca gccgcagacg acgatgcttc ggtcggcaac 1080
ggtttcttgc gactgcaagc tcatcaagag cctgcatcca tggtcgtcgg tggaactctg 1140
agcgccacag agatgaaccg agtagcagca gccacgcatt gcgcgggggc catggagcac 1200
atccagacgg cgatgggatc catgccgccg acctccgcct ccggatctac accgccgccg 1260
caggattatg agctgctggg tccaaatggg gccatacaca tggacatgta ttag 1314

<210> 32
<211> 987
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia del factor de transcripción PBF

<400> 32

atggacatga tctccggcag cactgcagca acatcaacac cccacaacaa ccaacaggcg 60
gtgatgttgt catcccccat tataaaggag gaagctaggg acccaaagca gacacgagcc 120
atgccccaaa taggtggcag tggggagcgt aagccgaggc cgcaactacc tgaggcgctc 180
aagtgcccac gctacgactc caacaacacc aagttttgct actacaacaa ttatagcatg 240
tcacaaccac gctacttttg caaggcttgc cgccgctatt ggacacatgg tggtaccctc 300
cgcaatgtcc ccattggtgg tgggtgtcgc aagaacaaac atgcctctag atttgtcttg 360
ggctctcaca cctcatcgtc ctcatctgct acctatgcac cattatcccc tagcaccaac 420
gctagctcta gcaatatgag catcaacaaa catatgatga tggtgcctaa catgacgatg 480
cctaccccaa cgacaatggg cttattccct aatgtgctcc caacacttat gccgacaggt 540
ggaggcgggg gctttgactt cactatggac aaccaacata gatcattgtc cttcacacca 600
atgtctctac ctagccaggg gccagtgcct atgctggctg caggagggag tgaggcaaca 660
ccgtctttcc tagagatgct gagaggaggg atttttcatg gtagtagtag ctataacaca 720
agtctcacga tgagtggtgg caacaatgga atggacaagc cattttcgct gccatcatat 780
ggtgcaatgt gcacaaatgg gttgagtggc tcaaccacta atgatgccag acaactggtg 840
gggcctcagc aggataacaa ggccatcatg aagagcagta ataacaacaa tggtgtatca 900
ttgttgaacc tctactggaa caagcacaac aacaacaaca acaacaacaa caacaacaac 960
aacaacaaca acaacaaggg acaataa 987

<210> 33
<211> 3902
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia del factor de transcripción Reb

<400> 33

atggagcggg tgttctccgt ggaggagatc tccgacccat tctgggtccc gcctccgccg 60
ccgcagtcgg cggcggcggc ccagcagcag ggcggcggcg gcgtggcttc gggaggtggt 120
ggtggtgtag cgggggggcgg cggcggcggg aacgcgatga accggtgccc gtcggagtgg 180
tacttccaga agtttctgga ggaggcggtg ctcgatagcc ccgtcccgaa ccctagcccg 240
agggccgaag cgggagggat caggggcgca ggaggggtgg tgccggtcga tgttaagcag 300
ccgcagctct cggcggcggc gacgacgagc gcggtggtgg accccgtgga gtacaacgcg 360
atgctgaagc agaagctgga gaaggacctc gccgcggtcg ccatgtggag ggtacagcca 420
ttctcccccc ctctagtact cgagagctta ctgagatcgg caatgctagc tactgtttgc 480
atcgaatgtt tataggtatt tagatcgggc atttctatag accaatggcg tccatggtct 540
tgcaatgcgc tctgttgagt gtcggtggtt ggttcgactc atagtatgta gggttgtgcg 600
tatgtacaaa cggaagcttc atagacctcg gtattgagat tgcgatatcg atgcaacctg 660
cgaattggcg atgtaatcag tcatattctt actaaactgc gagacagtgg tttgtttgca 720
attgcaatat ttttgtatgg ggctgcttaa actgtcattg ccttttttaga ttggcaatat 780
gtgactttat gcaagtattt gattgggcgg atccaggaac aaaaagttgg ggggattcaa 840
cataccgagt acactggcat aaacacatca tctcagtatt aaactatgct aaaatgctat 900
taagagacct ttagcacctc ttatcttatc aaccatggtg aaaaaattga agggggggact 960
caggggggta tccatgggtc cgatgggtgc agggggggact gagtcccccc tgcacccacg 1020
ttgaatccgc cctggcatgc gtataagctg tcacagccat ttctaggtgc ttgtgcttag 1080
ttgggtgatg tcagcttaat ttgtcttttc tatgtcgtca tcgattttct aagaaacgaa 1140
aaatagccta tttatgtgct ccagaatttg atgatccctg gcccttcatt tgctgaaatt 1200
agcctatttg ttggttgccc ttcagttttt tcccagctta tgttgttgca atgtgtggct 1260
atgcctcgtt ttgtgcccta taatttatta tttgcaattc atttttgtac atgacttaaa 1320
atgacactag agcaacatgc actgattggt tatcctataa tcatttatgt agttctgttc 1380
attttatcat gctagctcat gtcattttca tcttcaggcc tctggcacag ttccacctga 1440
gcgtcctgga gctggttcat ccttgctgaa tgcagatgtt tcacacatag gcgctcctaa 1500
ttccatcgga ggtacttatc ttatctggtt acatttttcag attgttatga aactacccaa 1560
atatcctgca caattgcatg ggattaaatt ttagtttctt tgaaatagaa gtagagttgt 1620
attgctgtca cgtcatcaaa tagttctgaa gctatgaata aataagttcc gcatttgtta 1680
gtgattcttt gaacattaga attgttatgc ttaagtagat agggttatgt ttgtttggag 1740
ttcccttaaa tcatttcatt gctgactgcc agctggcagg agcatttgtt gttgccttga 1800
ccatgaatga agaccttcct gttctgagtg ctcacaagaa aacatatttt gattaatgca 1860
ccttgaatcc ttaggatctt gcaaagatgg gcacttagct ttagaattga gtagtactta 1920
aatagctgtt gttatcatga tttgtcctgt agtgaaatgt cgacaaaaca ggaatgctac 1980
ttttgacttc tgatatttca tgcctggctt tacttatgct ctgtttggaa catgggcaca 2040
tatcaggcaa tgctactcca gttcaaaaca tgctaagtgg cccaagtggg ggatcgggct 2100
cacagttggt acagaatgtt gatgtccttg taaagcagcc caccagctct tcatcaaggg 2160
agcagtcaga tgatgatgac atgaagggag aagctgagac cactggaact gcaagacctg 2220
ctgatcaaag attacaacga aggtgatcat tcattgcttc cttgtaatat agattctgta 2280
cataattaac ctacctcgtc atgcatgcat gtgtcctatt ttcaccttag ccctttcagt 2340
tggatttcca ctttcatccg gtagcctttc agtttcctat tgcatcgcat atatgatctt 2400
ttacctacca tattagttct ctgtgtgcca tactcagtgc ttagtgtctc gagcaagaga 2460
ggaatttgta tggctattac acgtagcact ttgctctcta cttgtttatt gacataagca 2520

```
atttgggatg aattaaatct gagttcacat catattcctt atgtcacaag tttctgaaac    2580
cgattgtatc tagtatctgg ttgatgcacc cccatcttgg atttgcaaat caaagttata    2640
ctccctagag agctttacct ttcataaagc aattacccca ataaaccacg gatttgatag    2700
ctattgacta tgattaccag aattcatttg gcagctattt tctcaattta agtttggtat    2760
tagtctcagt tggctgtaaa ataatgtcac ggtagggtac atgtatgtgc agcatacaag    2820
gtatgggtga gttatgatat ggacagtgtg tacaccccac atttgctcac taaaatcaaa    2880
atattcaaac gtcacgtgat gatatggtgg attgcattat accttgtatt gtttattatg    2940
ttacttgtgc tagacaataa tataggctgt tcttttgggt gattttgtat gaagatgttg    3000
agcaagcact tctcgatata atgctagttt tgttgacctg ttccaggaag caatccaatc    3060
gggagtcagc caggcgctca agaagcagaa aggcagctca cttgaatgag ctggaggcac    3120
aggtgtgata gttcacatag ttatttttcga taagacataa aatcctaaat tactggctac    3180
tgacttcagt tatggattta cttgttacag gtatcgcaat taagagtcga gaactcctcg    3240
ctgttaaggc gtcttgctga tgttaaccag aagtacaatg atgctgctgt tgacaataga    3300
gtgctaaaag cagatgttga gaccttgaga gcaaaggtat gctatatatg ccttttgcaa    3360
tatgcatccc atggattgct actttggctt gtttcaaact ttcaacgtga cttgtgtacc    3420
ctgttattag aagaataatc ccgcctacca ttatactcta taaatcacca tttggccagt    3480
ccaaacatga ttattaaatc aggtcaatct gaacattgaa atgtatcaaa aattcgcagg    3540
tgaagatggc agaggactcg gtgaagcggg tgacaggcat gaacgcgttg tttcccgccg    3600
cttctgatat gtcatccctc agcatgccat tcaacagctc cccatctgaa gcaacgtcag    3660
acgctgctgt tcccatccaa gatgacccga acaattactt cgctactaac aacgacatcg    3720
gaggtaacaa caactacatg cccgacatac cttcttcggc tcaggaggac gaggacttcg    3780
tcaatggcgc tctggctgcc ggcaagattg gccggccagc ctcgctgcag cgggtggcga    3840
gcctggagca tctccagaag aggatgtgcg gtgggccggc ttcgtctggg tcgacgtcct    3900
ga                                                                  3902
```

REIVINDICACIONES

1. Una semilla o planta de arroz transgénica madura transformada de manera estable con un gen quimérico que tiene

(i) una secuencia de ADN líder que codifica una secuencia de tránsito específica de semilla de monocotiledónea capaz de dirigirse a un polipéptido unido a un orgánulo de célula de endospermo unida operativamente a una región reguladora transcripcional de un gen de monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semilla, en el que dicha región reguladora transcripcional y secuencia de ADN líder unida operativamente se representan en la SEC ID Nº: 15 o 16; y

(ii) una secuencia codificante de proteína optimizada por codones que codifica una proteína normalmente presente en leche humana.

2. La semilla de la reivindicación 1, en la que la proteína de leche humana se selecciona del grupo que consiste en lactoferrina, lisozima, lactoferricina, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa y alfa-1-antitripsina.

3. La semilla de la reivindicación 2, en la que la proteína de leche humana se selecciona del grupo que consiste en lisozima, lactoferrina, alfa-1-antitripsina y kappa caseína.

4. La semilla de la reivindicación 2 o 3, en la que la proteína de leche humana es lactoferrina o lisozima.

5. Un método para producir una proteína de leche humana recombinante en semillas de plantas de arroz que comprende las etapas de:

(a) obtener una planta de arroz transformada de manera estable con un gen quimérico que contiene

(i) una secuencia de ADN líder que codifica una secuencia de tránsito específica de semilla monocotiledónea capaz de dirigir a un polipéptido unido a un orgánulo de célula de endospermo unido operativamente a una región reguladora transcripcional de un gen de monocotiledónea que tiene un promotor específico de maduración de semilla, en la que dicha región reguladora transcripcional y secuencia de ADN líder unida operativamente se representan en la SEC ID Nº: 15 o 16; y

(ii) una secuencia codificante de proteína optimizada por codones que codifica una proteína normalmente presente en leche humana.

(b) cultivar la planta en condiciones de maduración de semilla;

(c) recoger las semillas de la planta cultivada; y

(d) extraer de las semillas cultivadas una harina, extracto o composición de malta que contiene la proteína de leche humana en forma no purificada.

6. El método de la reivindicación 5, en el que la planta monocotiledónea transformada comprende adicionalmente un ácido nucleico que codifica al menos un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en Reb, O2 y PBF, y un fragmento activo de los mismos.

7. El método de la reivindicación 6, en el que el factor de transcripción es O2 y/o PBF.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la secuencia codificante de proteína es una secuencia codificante de una proteína de leche humana seleccionada del grupo que consiste en lactoferrina, lisozima, lactoferricina, lactadherina, kappa caseína, haptocorrina, lactoperoxidasa, alfa-1-antitripsina e inmunoglobulinas.

9. El método de la reivindicación 8, en el que la secuencia codificante de proteína se selecciona del grupo de secuencias optimizadas por codones identificadas por las SEC ID Nº: 1, 3 y 7-14.

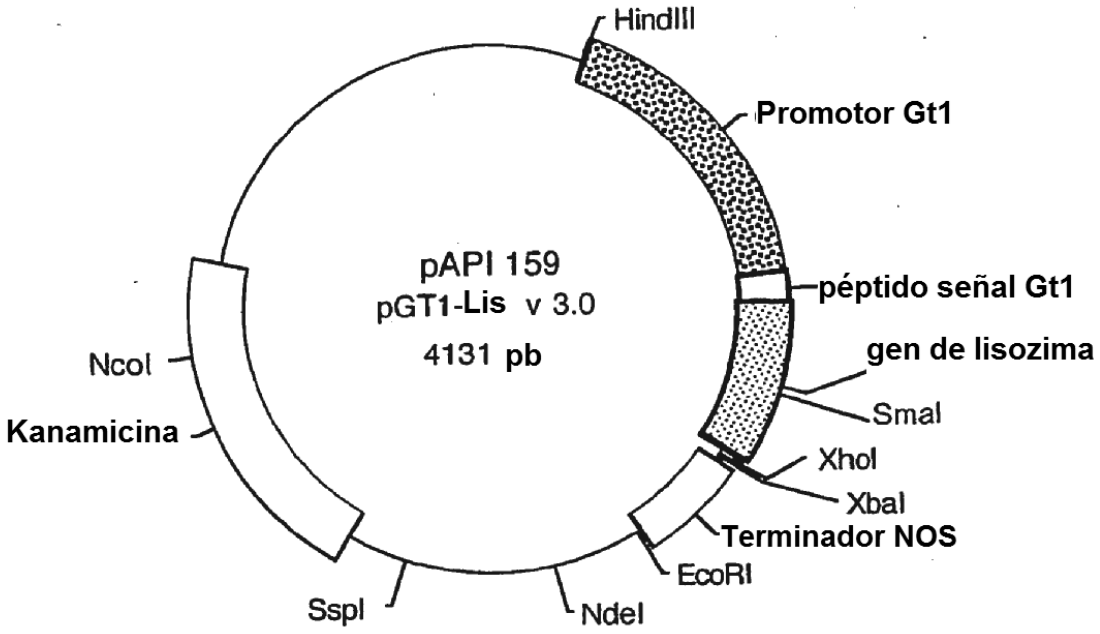

HindIII
Promotor Gt1
pAPI 159
pGT1-Lis v 3.0
4131 pb
péptido señal Gt1
gen de lisozima
SmaI
XhoI
XbaI
Terminador NOS
EcoRI
NdeI
SspI
Kanamicina
NcoI

Fig. 1

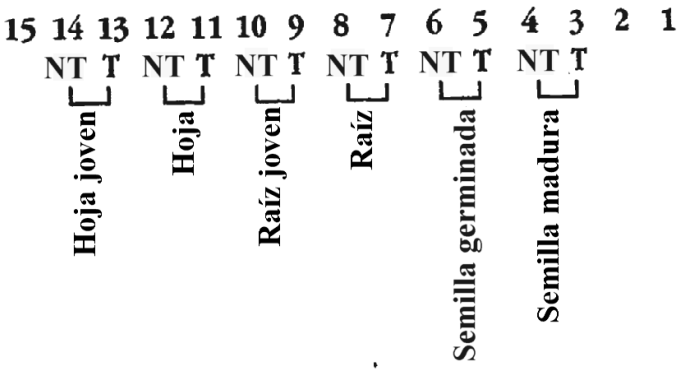

15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
NT T NT T NT T NT T NT T NT T
Hoja joven
Hoja
Raíz joven
Raíz
Semilla germinada
Semilla madura

Fig. 2

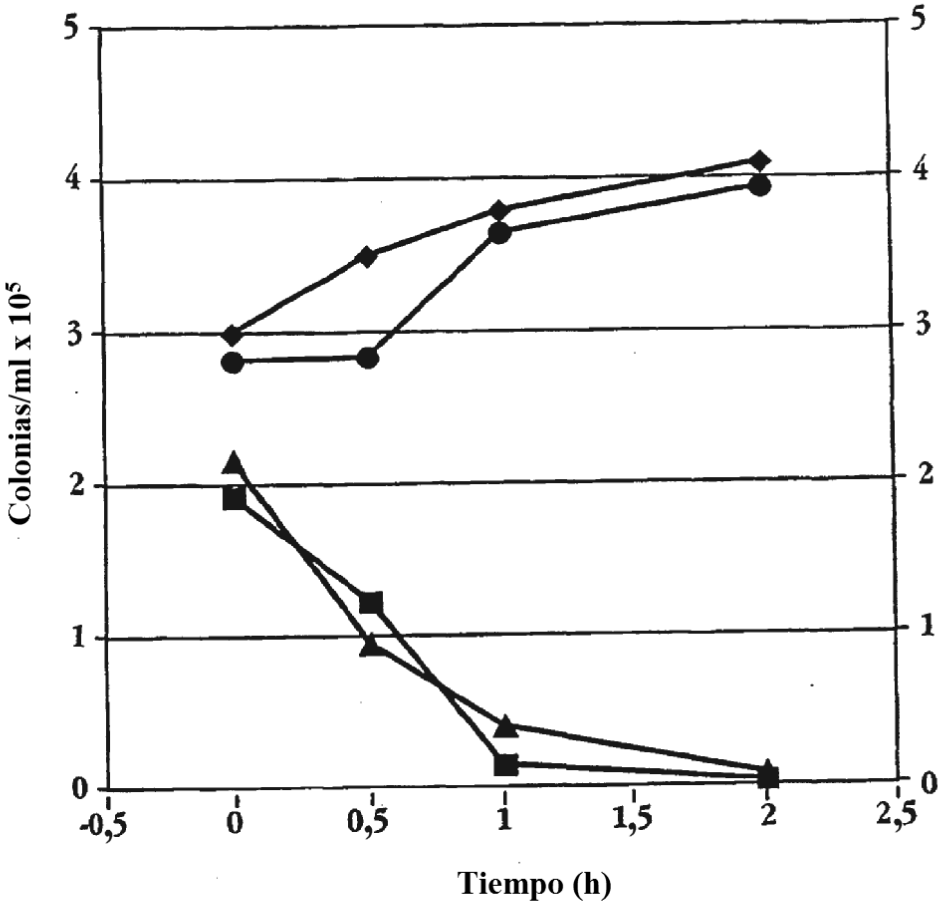

Colonias/ml x 10⁵
5
4
3
2
1
0
-0,5
0
0,5
1
1,5
2
2,5
Tiempo (h)
PO4 20 mM, EDTA 5 mM
Extracto de semilla de arroz no transformada
Lisozima humana (30 μg/ml)
Lisozima recombinante (30 μg/ml)

Fig. 3

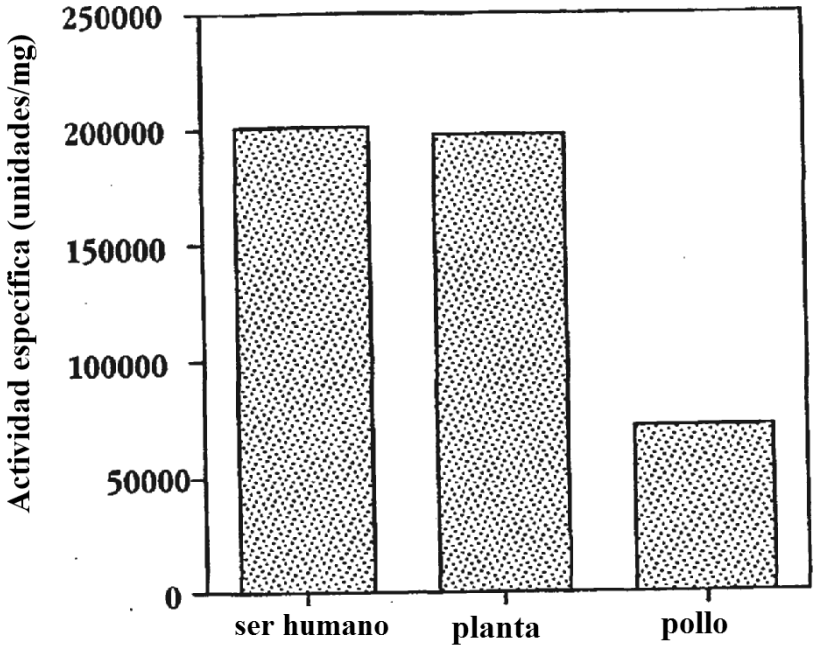

Actividad específica (unidades/mg)
250000
200000
150000
100000
50000
0
ser humano
planta
pollo

Fig. 4

Fig. 5A

Fig. 5B

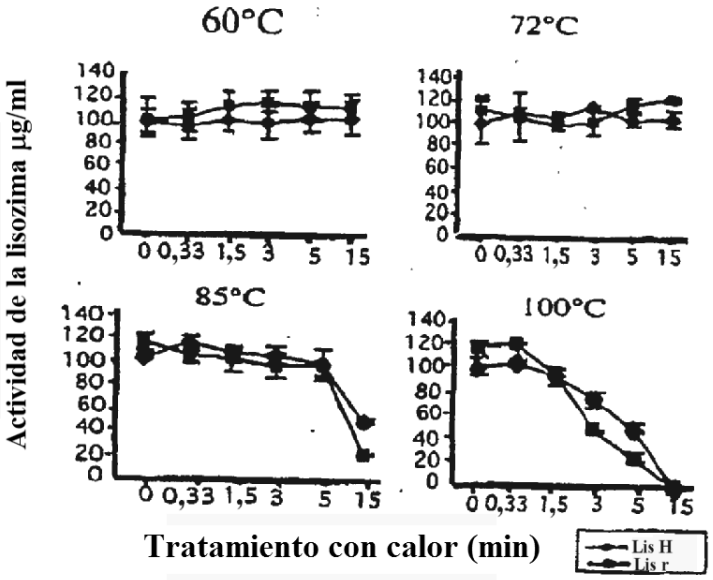


Fig. 5C

Fig. 5D

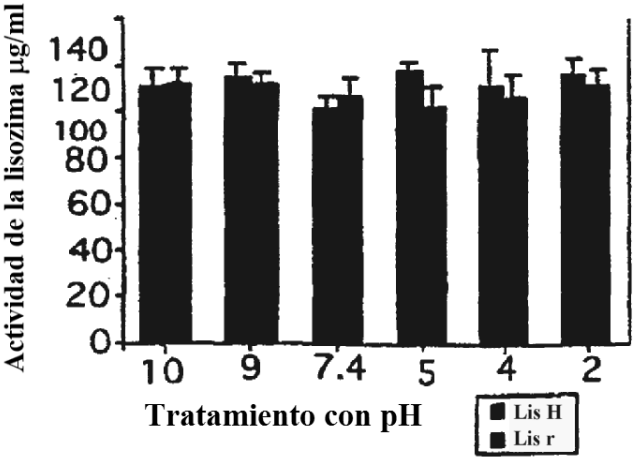


Fig. 5E

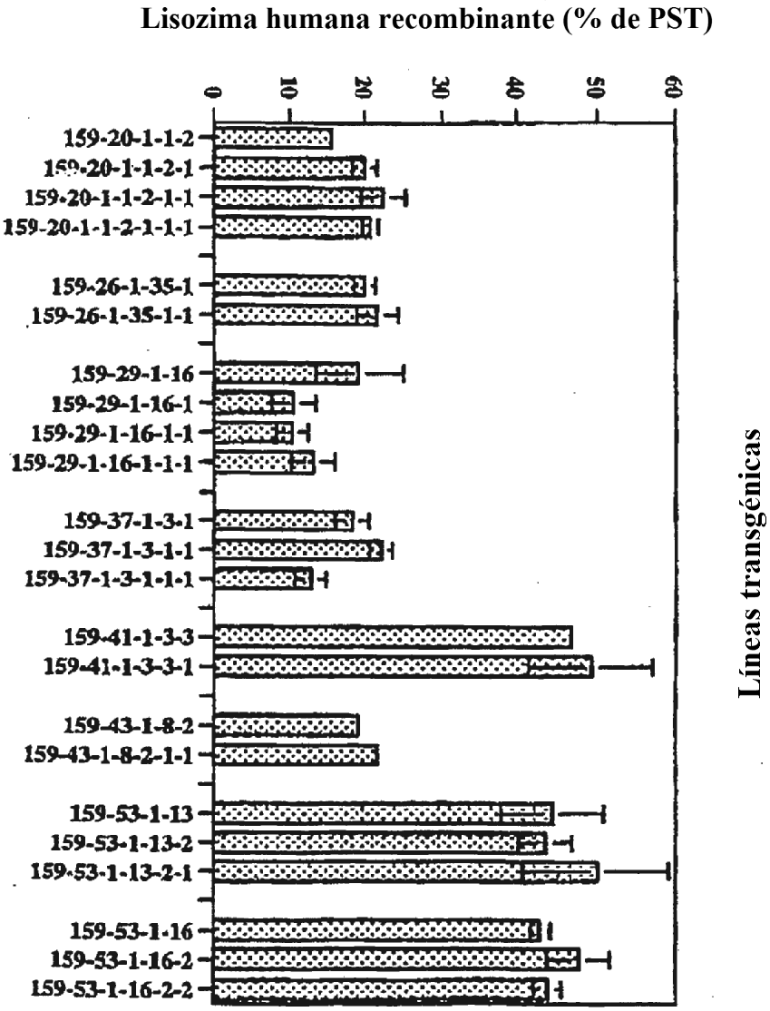

Lisozima humana recombinante (% de PST)
0
10
20
30
40
50
60
159-20-1-1-2
159-20-1-1-2-1
159-20-1-1-2-1-1
159-20-1-1-2-1-1-1
159-26-1-35-1
159-26-1-35-1-1
159-29-1-16
159-29-1-16-1
159-29-1-16-1-1
159-29-1-16-1-1-1
159-37-1-3-1
159-37-1-3-1-1
159-37-1-3-1-1-1
159-41-1-3-3
159-41-1-3-3-1
159-43-1-8-2
159-43-1-8-2-1-1
159-53-1-13
159-53-1-13-2
159-53-1-13-2-1
159-53-1-16
159-53-1-16-2
159-53-1-16-2-2
Líneas transgénicas

Fig. 6

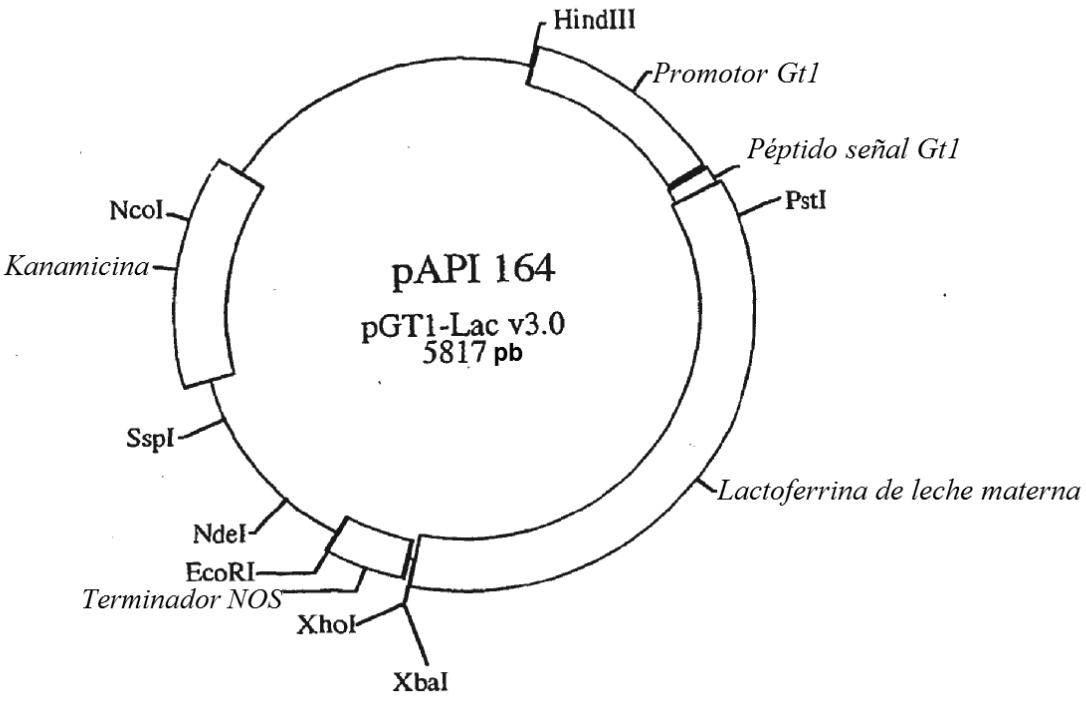

HindIII
Promotor Gt1
Péptido señal Gt1
PstI
Lactoferrina de leche materna
XbaI
XhoI
Terminador NOS
EcoRI
NdeI
SspI
Kanamicina
NcoI
pAPI 164
pGT1-Lac v3.0
5817 pb

Fig. 7

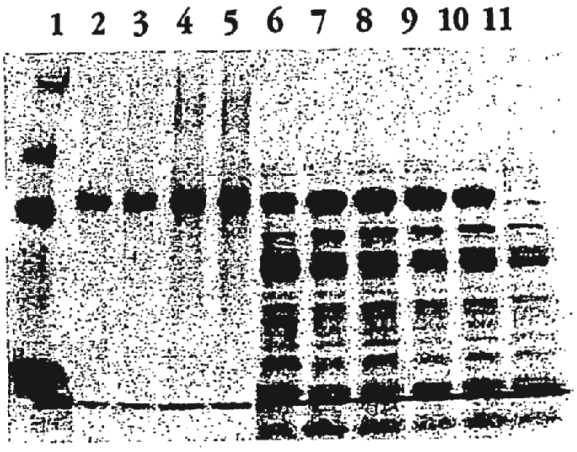


Fig. 8

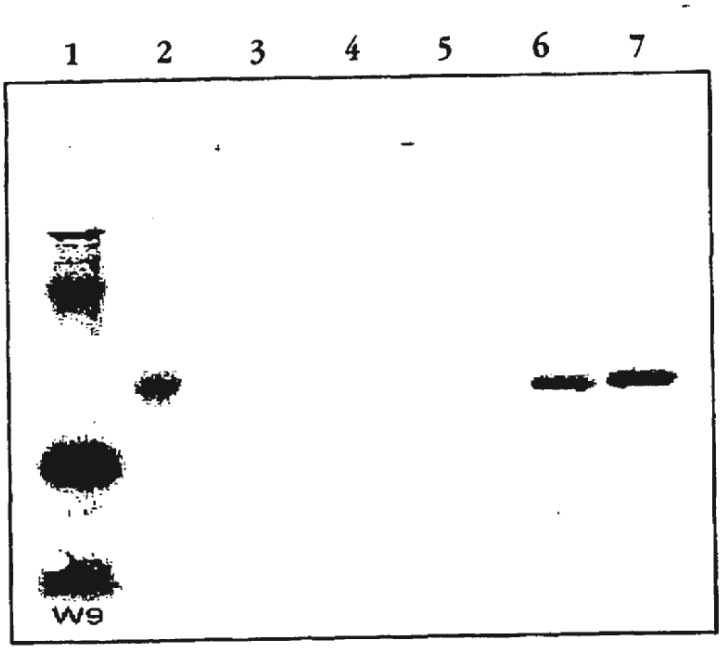


Fig. 9

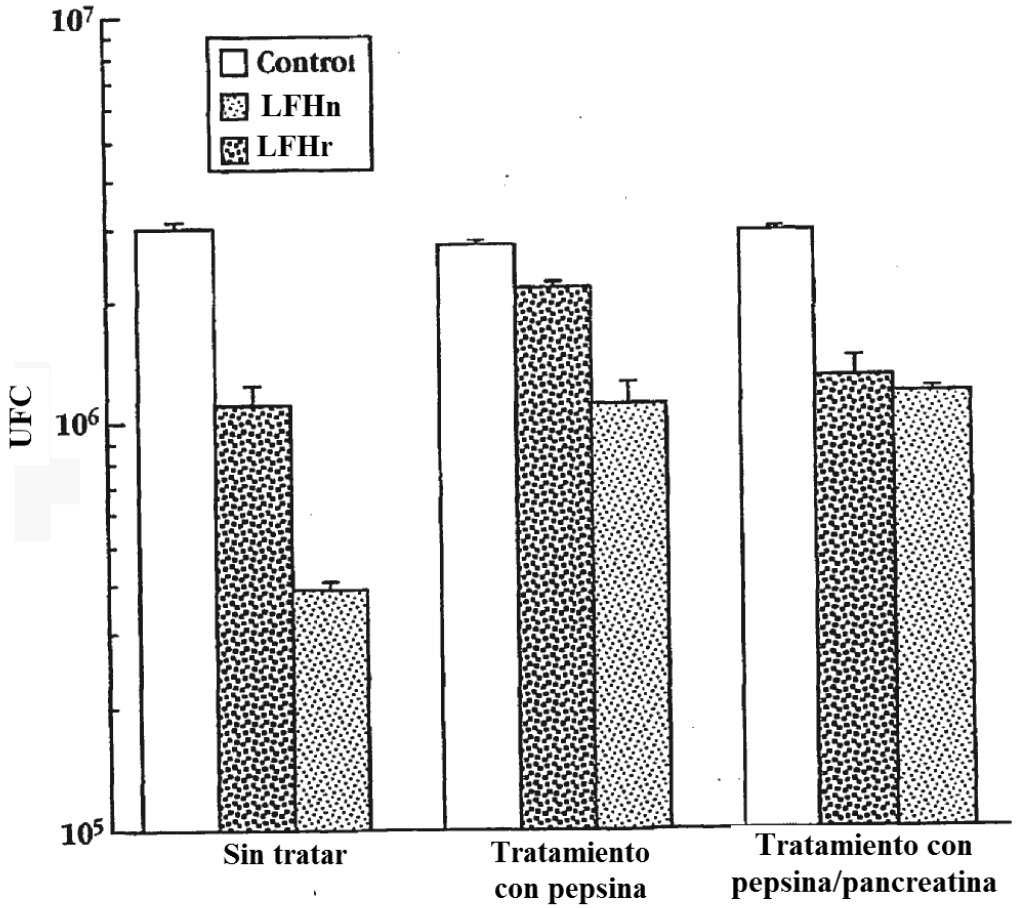

10^7
10^6
10^5
UFC
Control
LFHn
LFHr
Sin tratar
Tratamiento con pepsina
Tratamiento con pepsina/pancreatina

Fig. 10

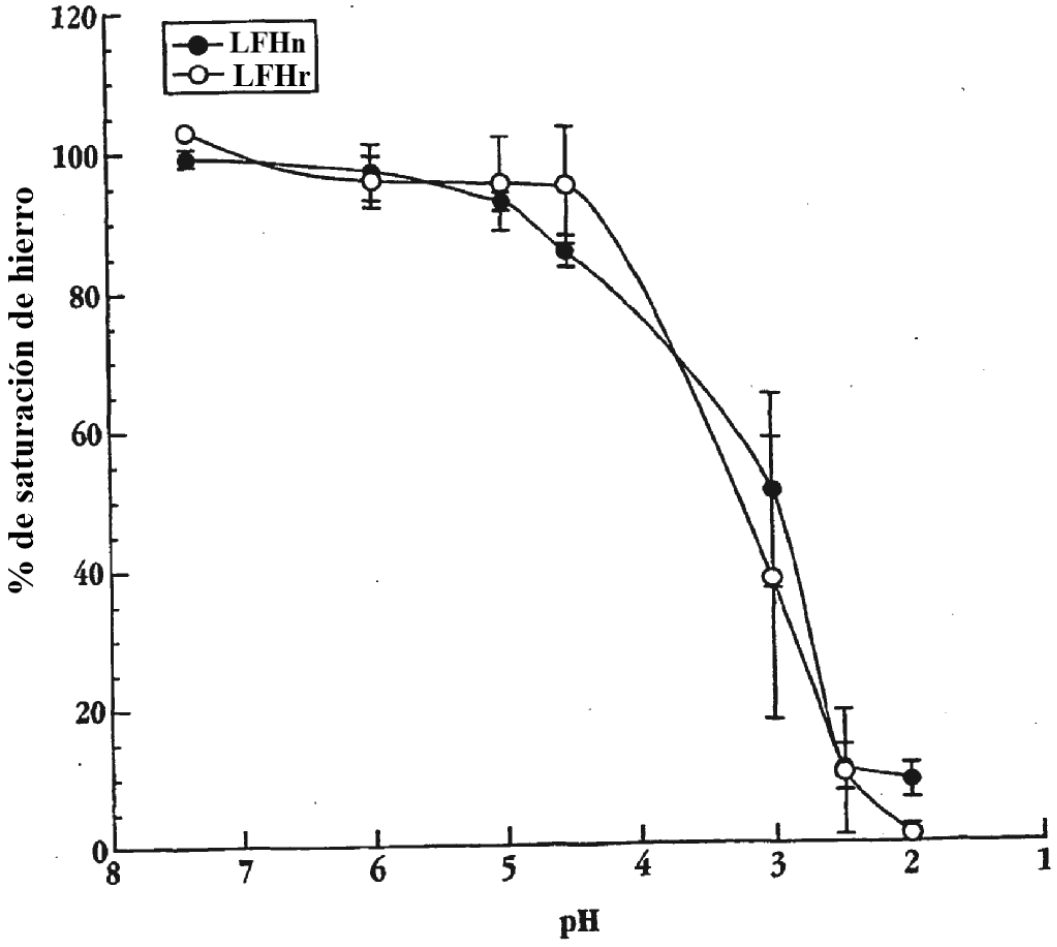
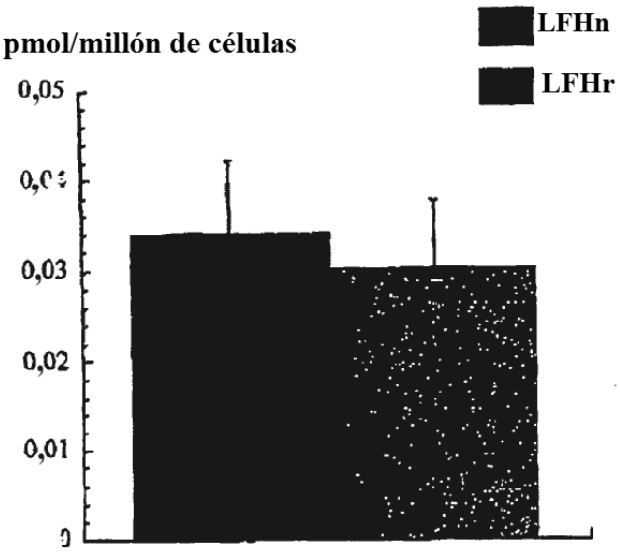
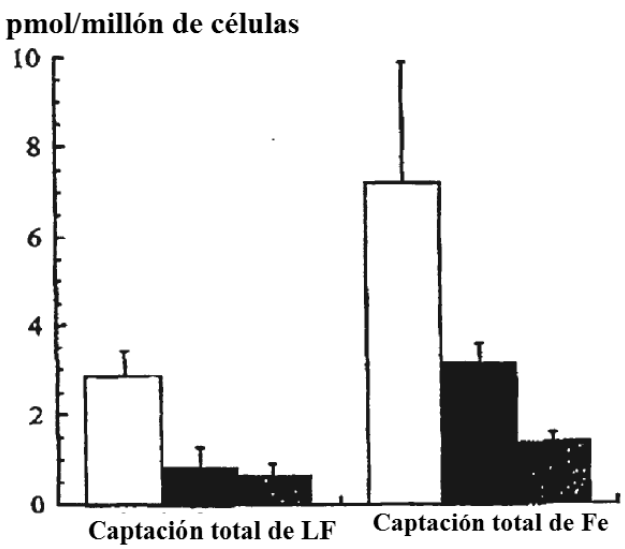

LFHn
LFHr
% de saturación de hierro
120
100
80
60
40
20
0
8
7
6
5
4
3
2
1
pH

Fig. 11

Fig. 12A

Fig. 12B





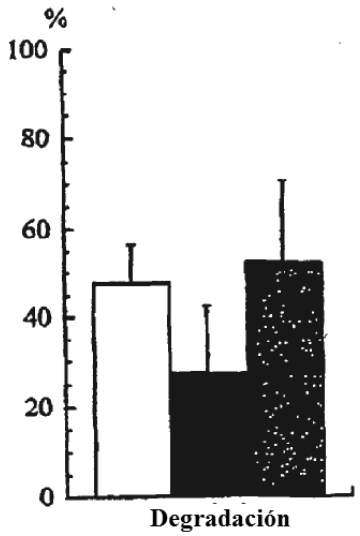


Fig. 12C Fig. 12D

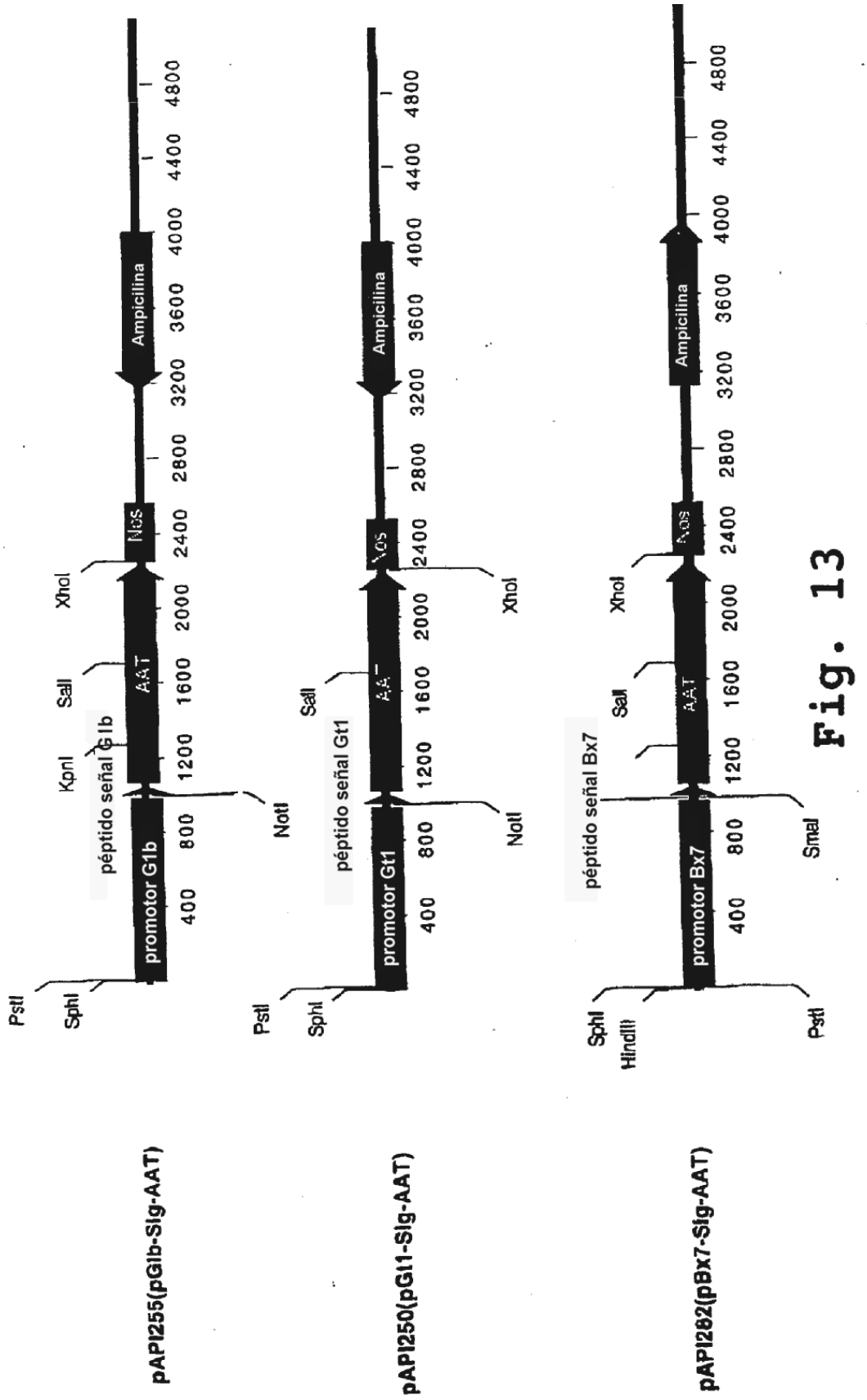

pAPI255(pG1b-Sig-AAT)
PstI
SphI
promotor G1b
400
800
péptido señal G1b
KpnI
SalI
AAT
1200
1600
2000
XhoI
NOS
2400
2800
3200
3600
4000
4400
4800
Ampicilina
NotI
pAPI250(pGt1-Sig-AAT)
PstI
SphI
promotor Gt1
400
800
péptido señal Gt1
SalI
AAT
1200
1600
2000
XhoI
NOS
2400
2800
3200
3600
4000
4400
4800
Ampicilina
NotI
pAPI282(pBx7-Sig-AAT)
SphI
HindIII
promotor Bx7
400
800
péptido señal Bx7
SalI
AAT
1200
1600
2000
XhoI
NOS
2400
2800
3200
3600
4000
4400
4800
Ampicilina
SmaI
PstI

Fig. 13

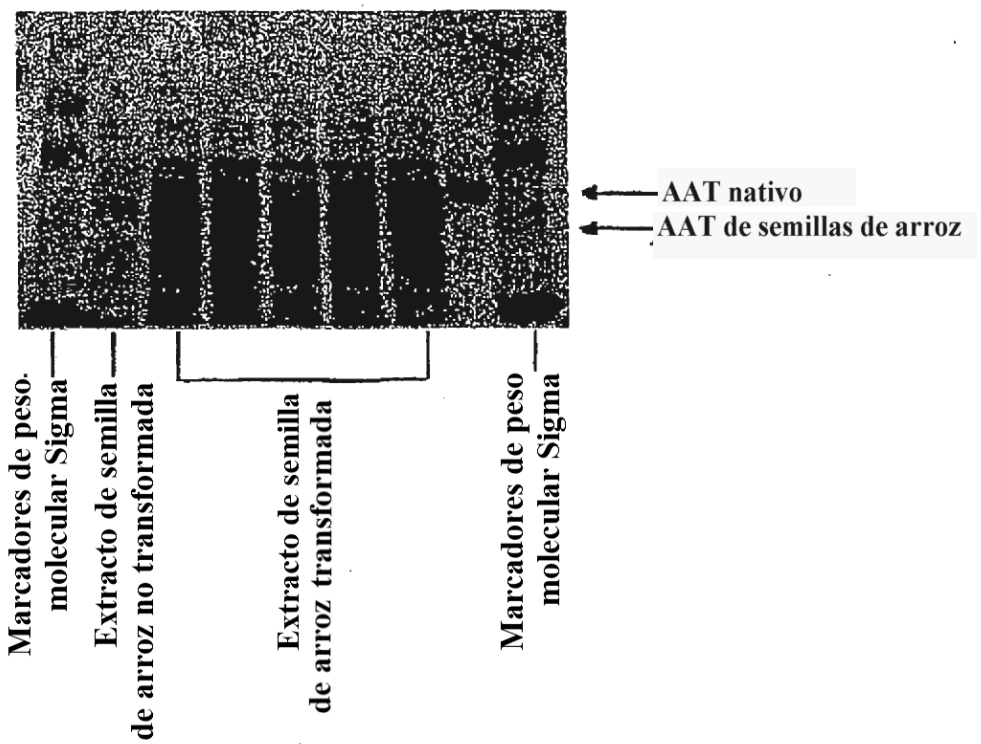

AAT nativo
AAT de semillas de arroz
Marcadores de peso molecular Sigma
Extracto de semilla de arroz no transformada
Extracto de semilla de arroz transformada
Marcadores de peso molecular Sigma

Fig. 14

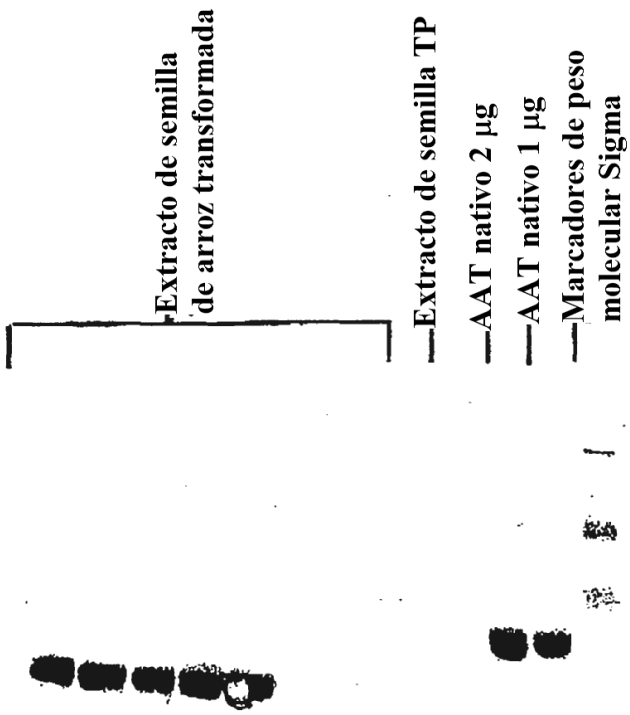

Extracto de semilla de arroz transformada
Extracto de semilla TP
AAT nativo 2 µg
AAT nativo 1 µg
Marcadores de peso molecular Sigma

Fig. 15

Fig. 16A

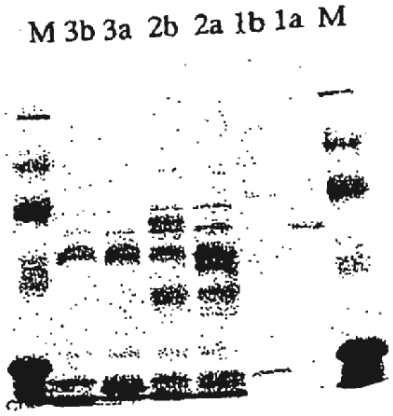
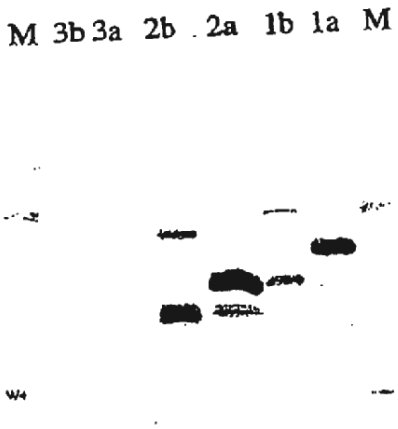


Fig. 16B



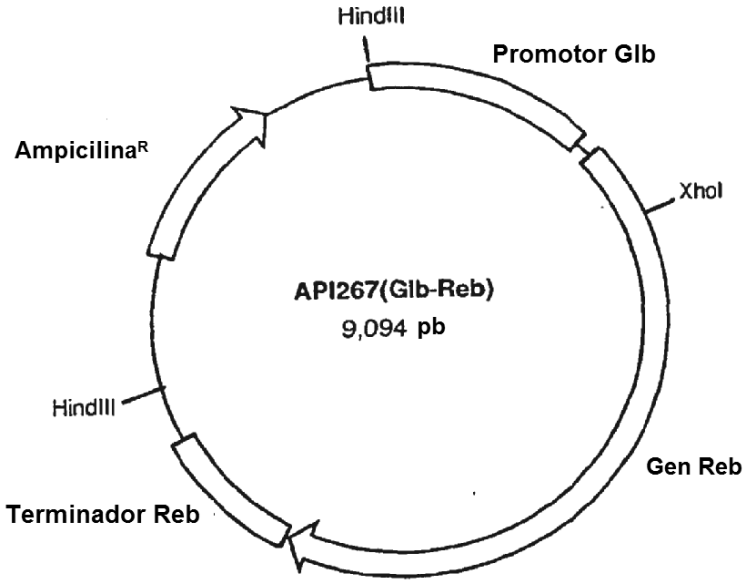

HindIII
Promotor Glb
Ampicilina^R
XhoI
API267(Glb-Reb)
9,094 pb
HindIII
Gen Reb
Terminador Reb

Fig. 17A

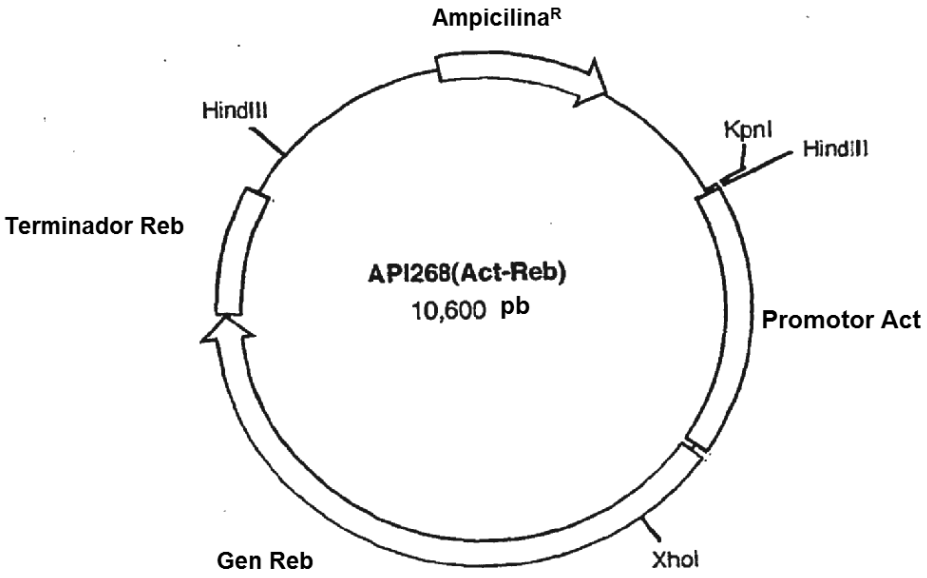

Ampicilina^R
HindIII
KpnI
HindIII
Terminador Reb
API268(Act-Reb)
10,600 pb
Promotor Act
Gen Reb
XhoI

Fig. 17B

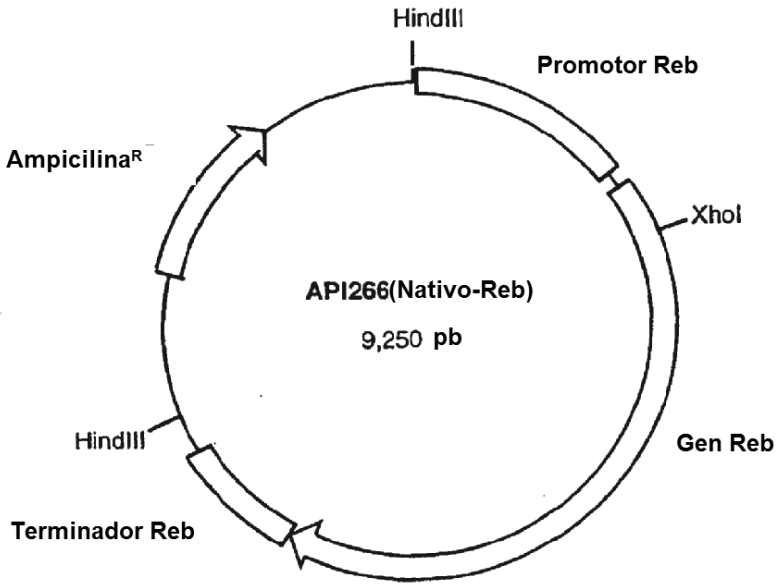

HindIII
Promotor Reb
Xhol
Gen Reb
Terminador Reb
HindIII
Ampicilina^R
API266(Nativo-Reb)
9,250 pb

Fig. 17C

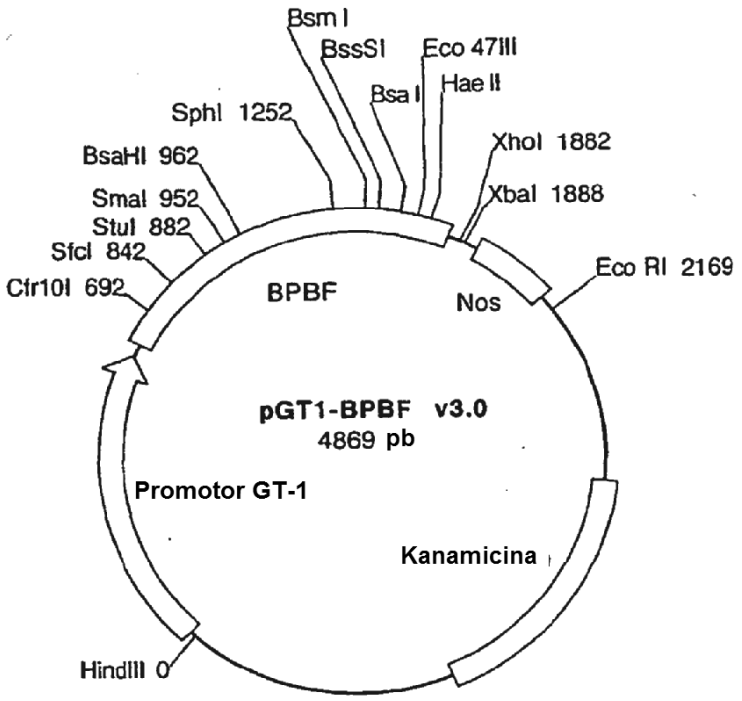

Bsm I
BssSI
Eco 47III
Hae II
Bsa I
SphI 1252
XhoI 1882
BsaHI 962
XbaI 1888
SmaI 952
StuI 882
SfcI 842
Eco RI 2169
Cfr10I 692
BPBF
Nos
pGT1-BPBF v3.0
4869 pb
Promotor GT-1
Kanamicina
HindIII 0

Fig. 18A

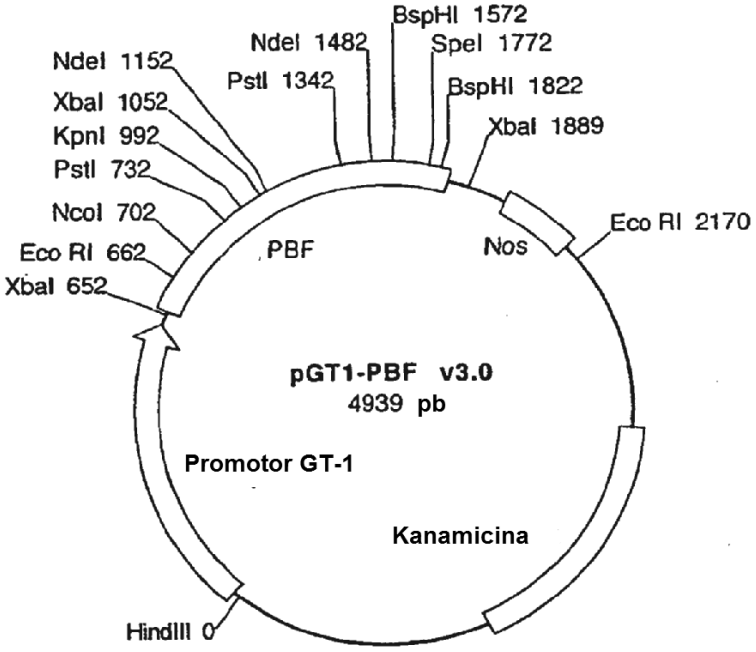

BspHI 1572
NdeI 1482
SpeI 1772
NdeI 1152
PstI 1342
BspHI 1822
XbaI 1052
XbaI 1889
KpnI 992
PstI 732
NcoI 702
Eco RI 2170
Eco RI 662
PBF
Nos
XbaI 652
pGT1-PBF v3.0
4939 pb
Promotor GT-1
Kanamicina
HindIII 0

Fig. 18B

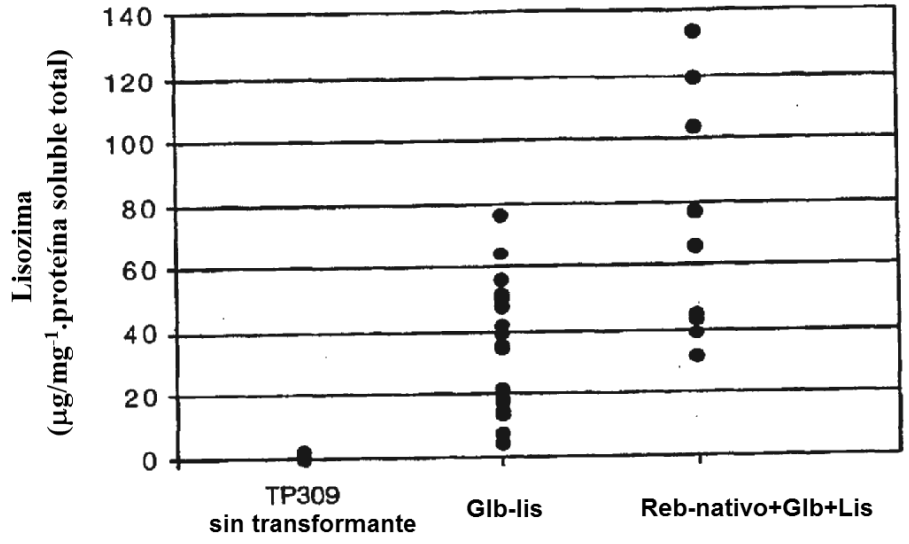

Lisozima
(µg/mg-1.proteína soluble total)
140
120
100
80
60
40
20
0
TP309
sin transformante
Glb-lis
Reb-nativo+Glb+Lis

Fig. 19

Intervalo de secuencia del factor cE: de 4 a 165

```
                  10          20          30          40          50
Factor cE  AAC TCC GAC TCG GAG TGC CCC CTC TCC CAC GAC GGT TAC TGC CTC CAC GAC GGG
             N   S   D   S   E   C   P   L   S   H   D   G   Y   C   L   H   D   G>

                        3360        3370        3380        3390        3400
Gen nativo AAT GGT GAC TCT GAA TGT CCC CTG TCC CAC GAT GGG TAC TGC CTC CAT GAT GGT
           ||     ||| ||  ||  ||  ||| ||  ||| ||| ||  ||  ||| ||| ||| ||  ||  ||
Factor cE  AAC TCC GAC TCG GAG TGC CCC CTC TCC CAC GAC GGT TAC TGC CTC CAC GAC GGG

            60          70          80          90          100         110
Factor cE  GTC TGC ATG TAC ATC GAG GCC CTC GAC AAG TAC GCC TGC AAC TGC GTC GTG GGC
             V   C   M   Y   I   E   A   L   D   K   Y   A   C   N   C   V   V   G>

                  3410        3420        3430        3440        3450
Gen nativo GTG TGC ATG TAT ATT GAA GCA TTG GAC AAG TAT GCA TGC AAC TGT GTT GTT GGC
           ||  ||| ||| ||  ||  ||  ||  |   ||| ||| ||  ||  ||| ||| ||  ||  ||  |||
Factor cE  GTC TGC ATG TAC ATC GAG GCC CTC GAC AAG TAC GCC TGC AAC TGC GTC GTG GGC

                  120         130         140         150         160
Factor cE  TAC ATC GGC GAG CGG TGC CAG TAC CGC GAC CTC AAG TGG TGG GAG CTG CGC TGA
             Y   I   G   E   R   C   Q   Y   R   D   L   K   W   W   E   L   R   *>

             3460        3470        3480        3490        3500
Gen nativo TAC ATC GGG GAG CGA TGT CAG TAC CGA GAC CTG AAG TGG TGG GAA CTG CGC
           ||| ||| ||  ||| ||  ||  ||| ||| ||  ||| ||  ||| ||| ||| ||  ||| |||
Factor cE  TAC ATC GGC GAG CGG TGC CAG TAC CGC GAC CTC AAG TGG TGG GAG CTG CGC TGA
```

Factor de crecimiento epidérmico

Número de codones en el péptido maduro:	53
Número de codones cambiados:	27 (51%)
Número de nucleótidos cambiados:	30 (19%)

Fig. 20

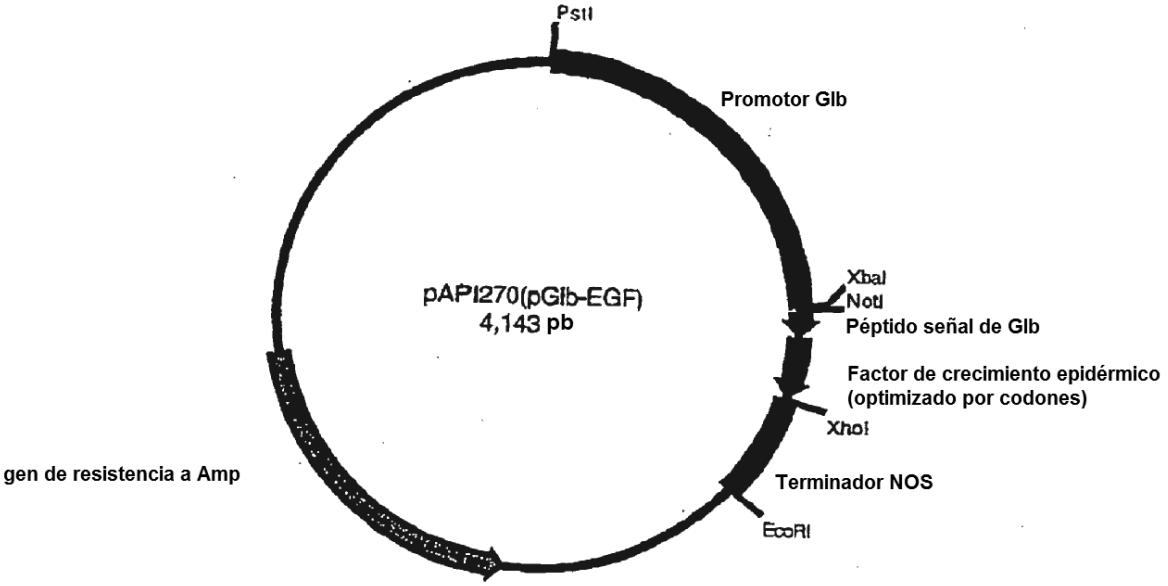

PstI
Promotor Glb
pAPI270(pGlb-EGF)
4,143 pb
XbaI
NotI
Péptido señal de Glb
Factor de crecimiento epidérmico
(optimizado por codones)
XhoI
gen de resistencia a Amp
Terminador NOS
EcoRI

Fig. 21

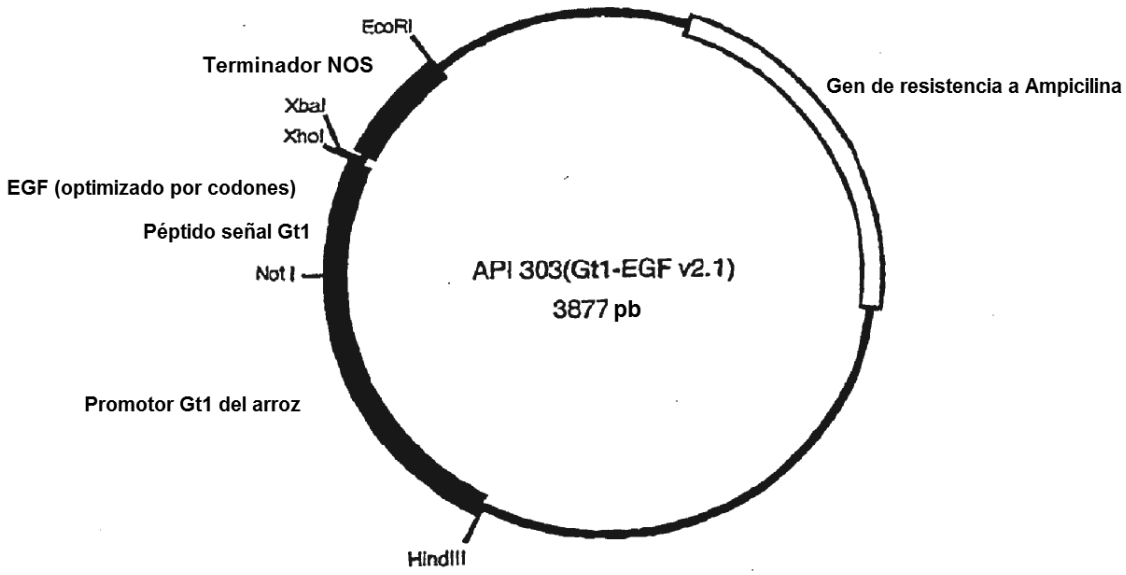

EcoRI
Terminador NOS
XbaI
XhoI
EGF (optimizado por codones)
Péptido señal Gt1
Not I
Promotor Gt1 del arroz
HindIII
Gen de resistencia a Ampicilina
API 303(Gt1-EGF v2.1)
3877 pb

Fig. 22

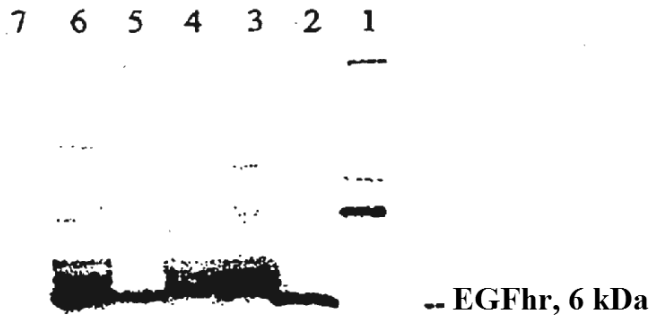


Fig. 23

Intervalo de secuencia: de 4 a 216

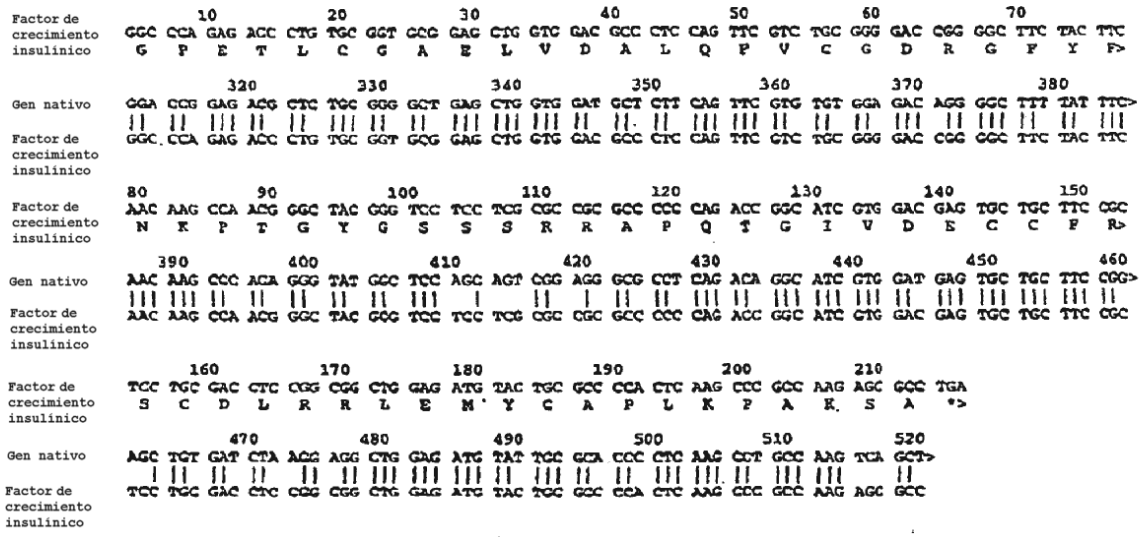


Fig. 24

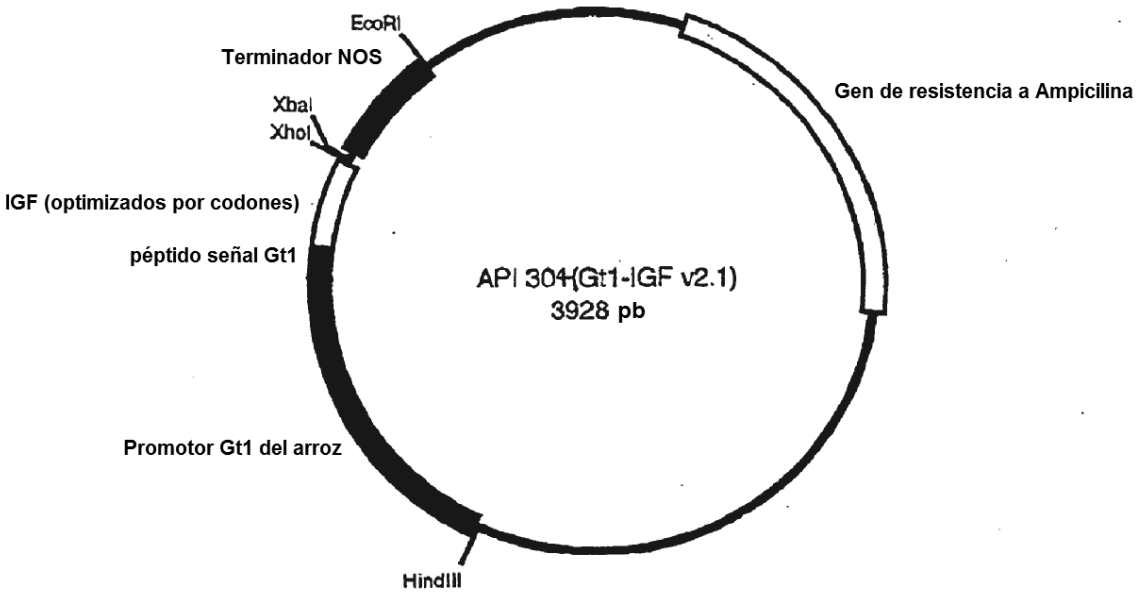

EcoRI
Terminador NOS
XbaI
XhoI
IGF (optimizados por codones)
péptido señal Gt1
Promotor Gt1 del arroz
HindIII
Gen de resistencia a Ampicilina
API 304(Gt1-IGF v2.1)
3928 pb

Fig. 25

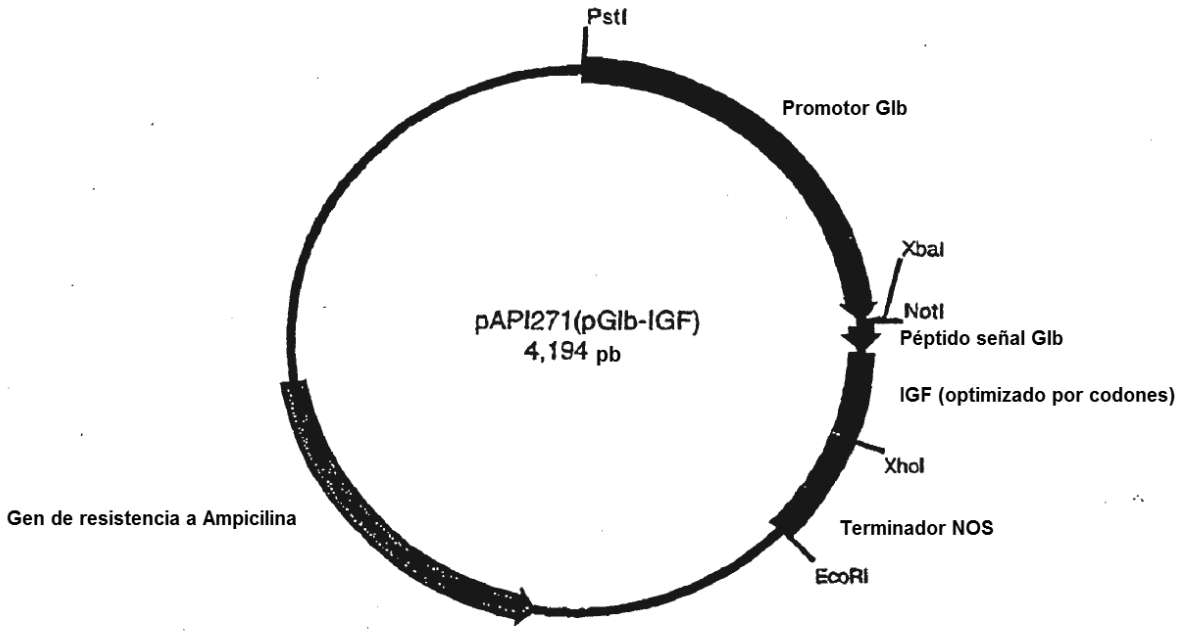

PstI
Promotor Glb
XbaI
NotI
Péptido señal Glb
IGF (optimizado por codones)
XhoI
Terminador NOS
EcoRI
Gen de resistencia a Ampicilina
pAPI271(pGlb-IGF)
4,194 pb

Fig. 26

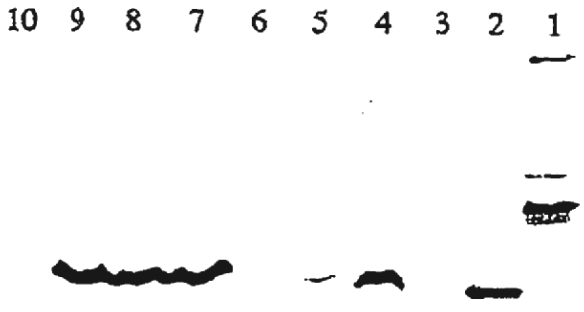


Fig. 27

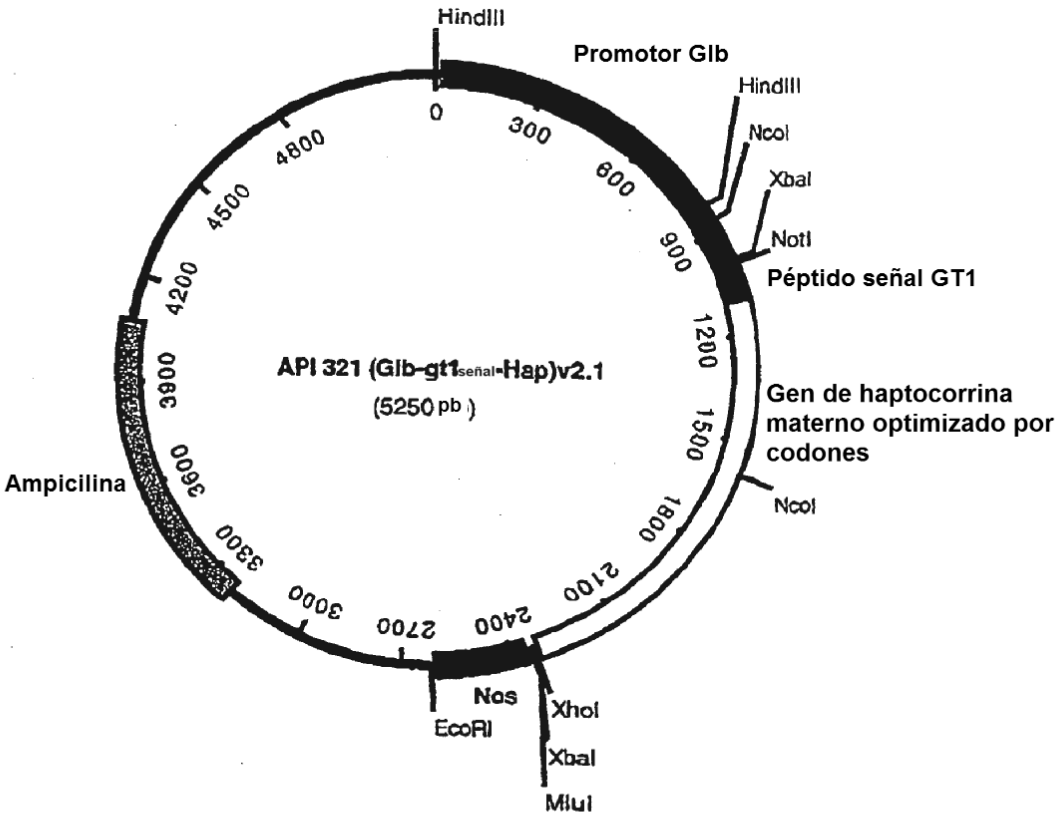

HindIII
Promotor Glb
HindIII
NcoI
XbaI
NotI
Péptido señal GT1
Gen de haptocorrina materno optimizado por codones
NcoI
XhoI
XbaI
MluI
Nos
EcoRI
Ampicilina
API 321 (Glb-gt1señal-Hap)v2.1
(5250 pb)
0
300
600
900
1200
1500
1800
2100
2400
2700
3000
3300
3600
3900
4200
4500
4800

Fig. 28

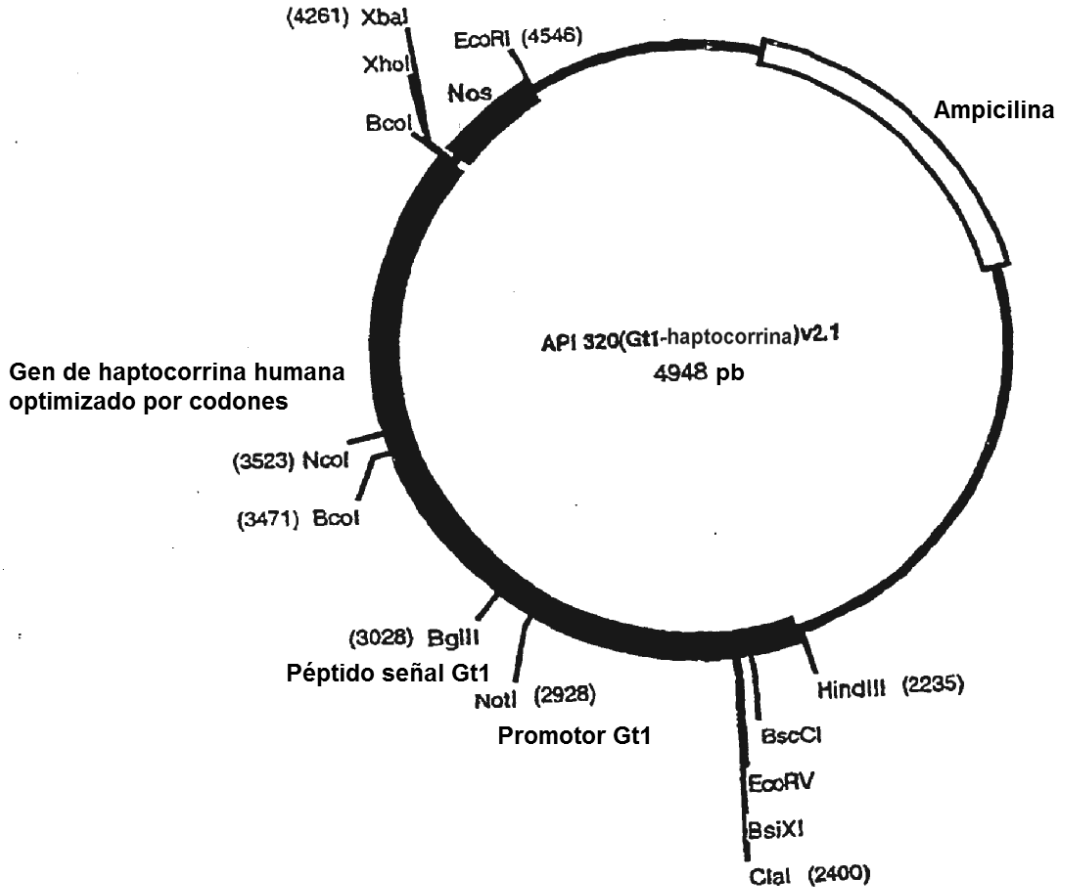

(4261) XbaI
XhoI
BcoI
EcoRI (4546)
Nos
Ampicilina
API 320(Gt1-haptocorrina)v2.1
4948 pb
Gen de haptocorrina humana
optimizado por codones
(3523) NcoI
(3471) BcoI
(3028) BglII
Péptido señal Gt1
NotI (2928)
Promotor Gt1
HindIII (2235)
BscCI
EcoRV
BsiXI
ClaI (2400)

Fig. 29

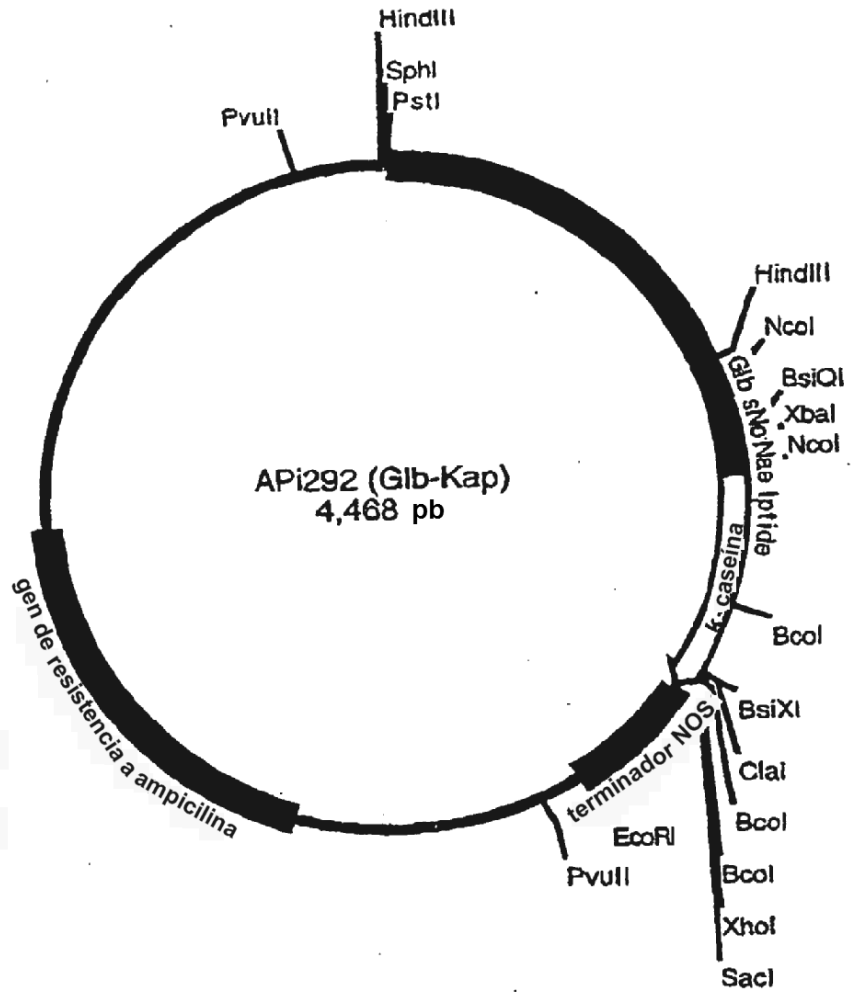

HindIII
SphI
PstI
PvuII
HindIII
NcoI
BsiQI
XbaI
NcoI
Glb sNot
Nae Iptide
k-caseina
BcoI
BsiXI
ClaI
BcoI
BcoI
XhoI
SacI
terminador NOS
EcoRI
PvuII
gen de resistencia a ampicilina
APi292 (Glb-Kap)
4,468 pb

Fig. 30

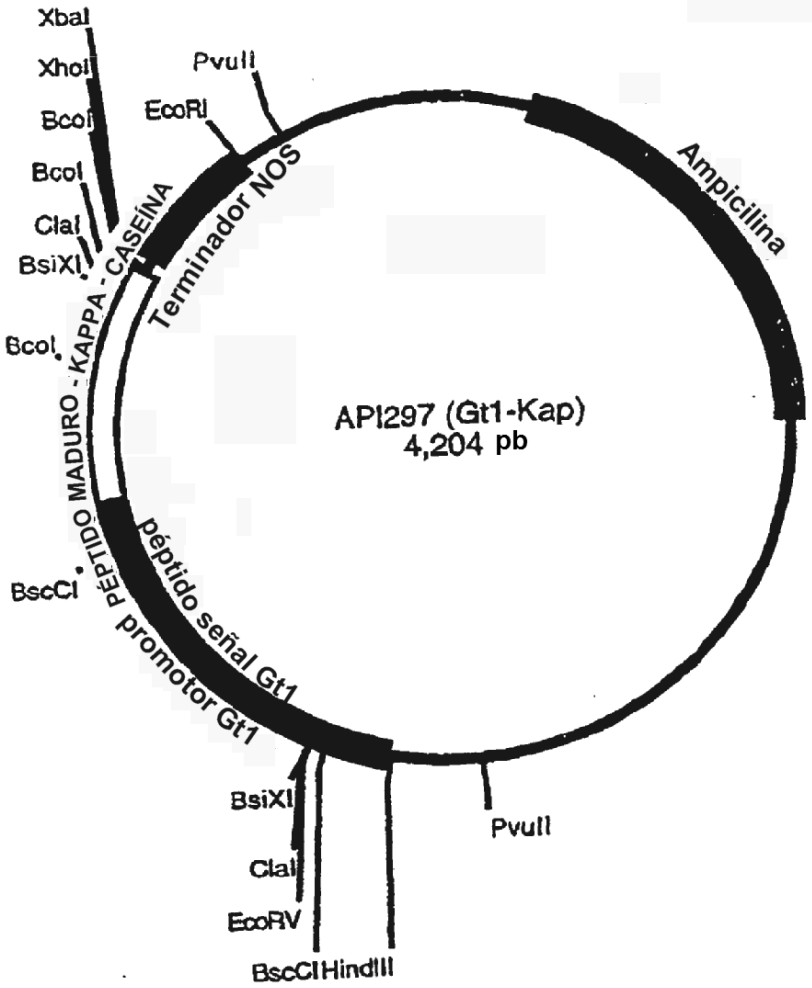

XbaI
XhoI
BcoI
BcoI
ClaI
BsiXI
BcoI
BscCI
PvuII
EcoRI
Terminador NOS
Ampicilina
API297 (Gt1-Kap)
4,204 pb
PÉPTIDO MADURO - KAPPA - CASEÍNA
péptido señal Gt1
promotor Gt1
BsiXI
ClaI
EcoRV
BscCI HindIII
PvuII

Fig. 31

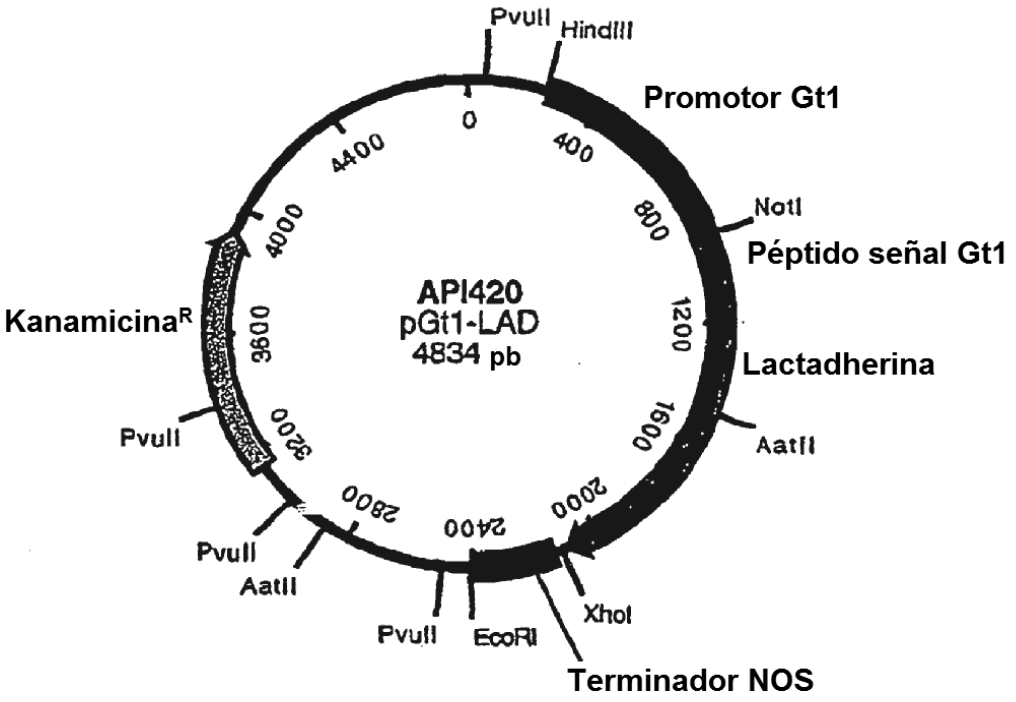

PvuII
HindIII
Promotor Gt1
NotI
Péptido señal Gt1
Lactadherina
AatII
XhoI
Terminador NOS
EcoRI
PvuII
AatII
PvuII
PvuII
Kanamicina^R
API420
pGt1-LAD
4834 pb
0
400
800
1200
1600
2000
2400
2800
3200
3600
4000
4400

Fig. 32

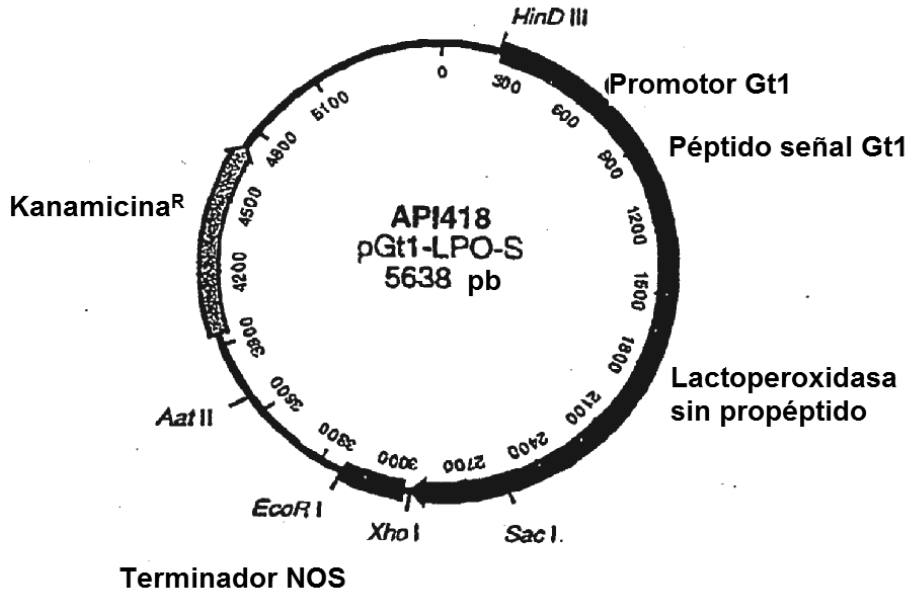

HinD III
Promotor Gt1
Péptido señal Gt1
Lactoperoxidasa
sin propéptido
Terminador NOS
Kanamicina^R
API418
pGt1-LPO-S
5638 pb
Aat II
EcoR I
Xho I
Sac I.
0
300
600
900
1200
1500
1800
2100
2400
2700
3000
3300
3600
3900
4200
4500
4800
5100

Fig. 33

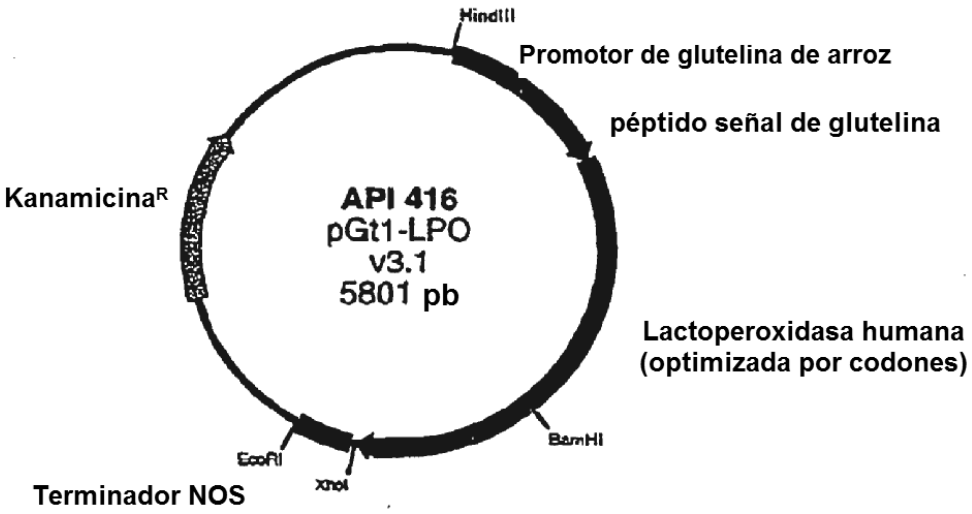

HindIII
Promotor de glutelina de arroz
péptido señal de glutelina
Kanamicina^R
API 416
pGt1-LPO
v3.1
5801 pb
Lactoperoxidasa humana
(optimizada por codones)
BamHI
EcoRI
XhoI
Terminador NOS

Fig. 34

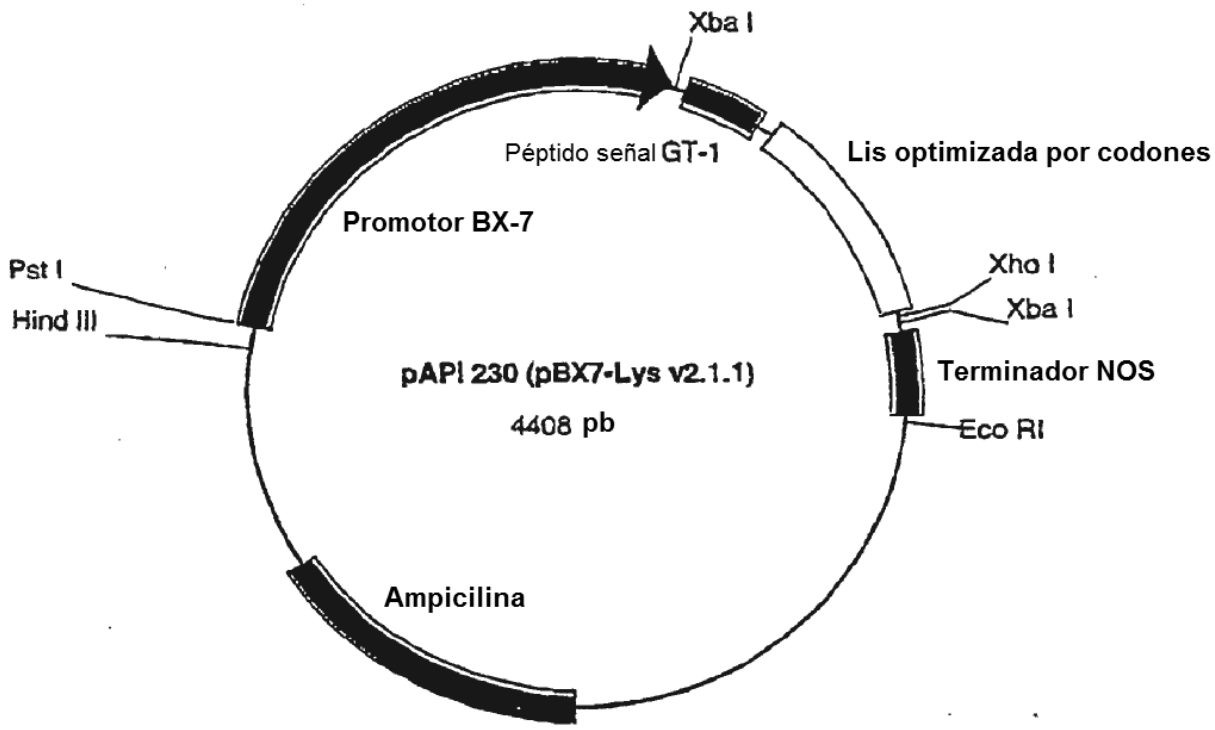

Xba I
Péptido señal GT-1
Lis optimizada por codones
Promotor BX-7
Pst I
Hind III
Xho I
Xba I
pAPI 230 (pBX7-Lys v2.1.1)
4408 pb
Terminador NOS
Eco RI
Ampicilina

Fig. 35

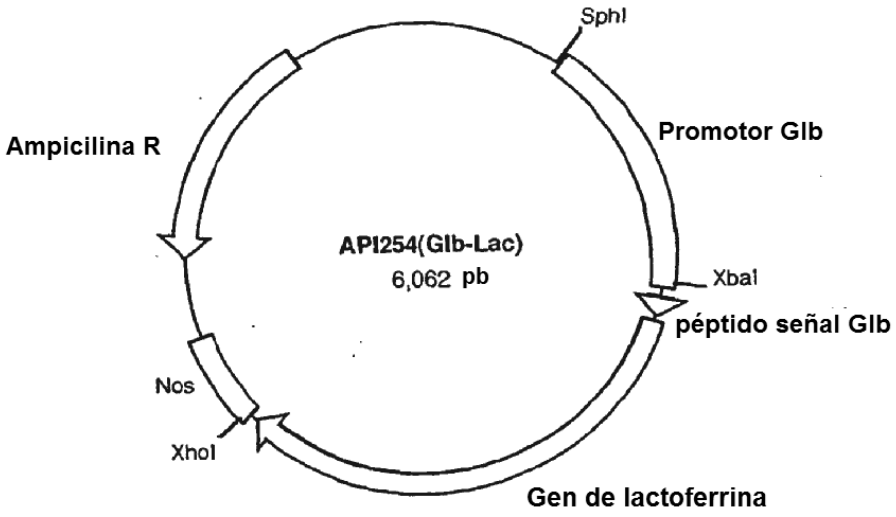

SphI
Promotor Glb
Ampicilina R
API254(Glb-Lac)
6,062 pb
XbaI
péptido señal Glb
Nos
XhoI
Gen de lactoferrina

Fig. 36A

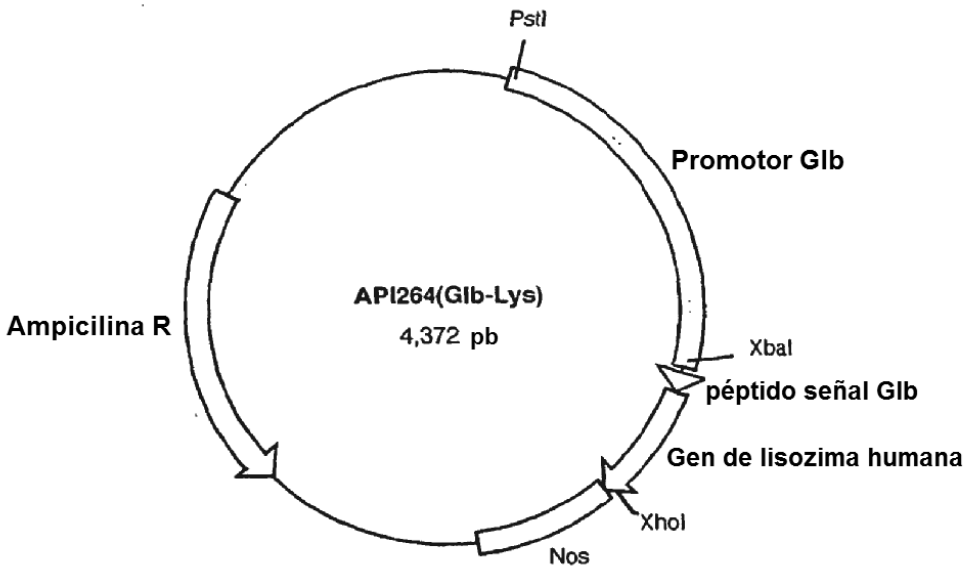

PstI
Promotor Glb
API264(Glb-Lys)
4,372 pb
Ampicilina R
XbaI
péptido señal Glb
Gen de lisozima humana
XhoI
Nos

Fig. 36B

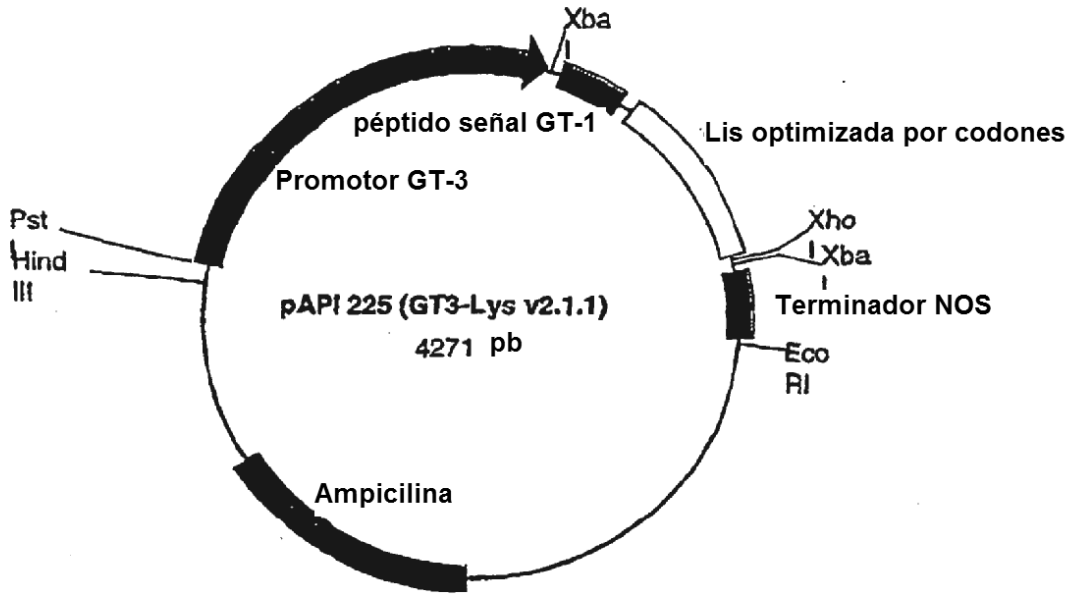

Xba I
péptido señal GT-1
Lis optimizada por codones
Promotor GT-3
Pst I Hind III
Xho I Xba I
pAPI 225 (GT3-Lys v2.1.1)
4271 pb
Terminador NOS
Eco RI
Ampicilina

Fig. 37

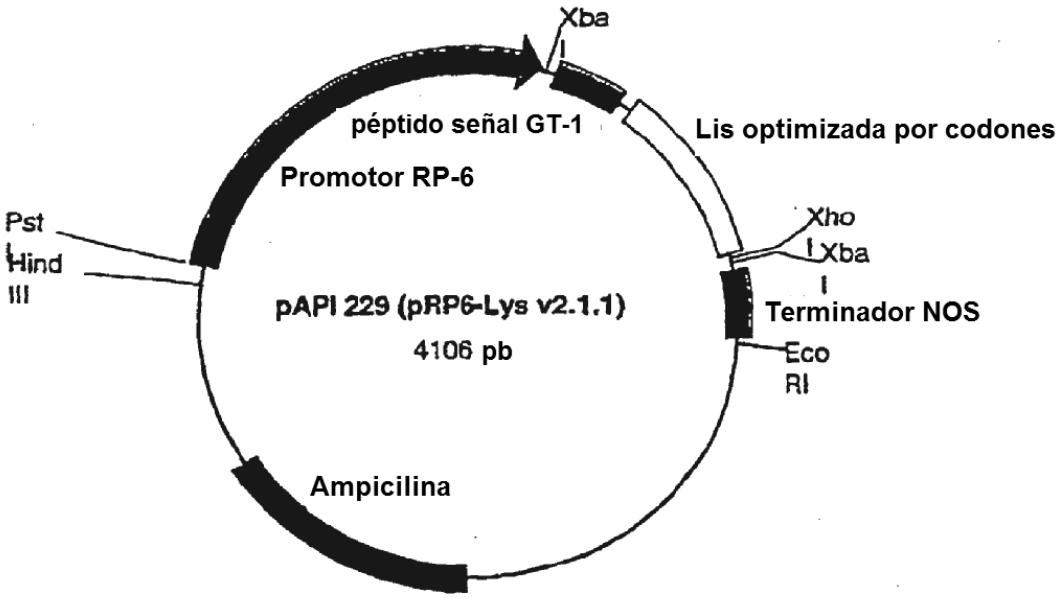

Xba
I
péptido señal GT-1
Lis optimizada por codones
Promotor RP-6
Pst
I
Hind
III
Xho
I
Xba
I
pAPI 229 (pRP6-Lys v2.1.1)
4106 pb
Terminador NOS
Eco
RI
Ampicilina

Fig. 38

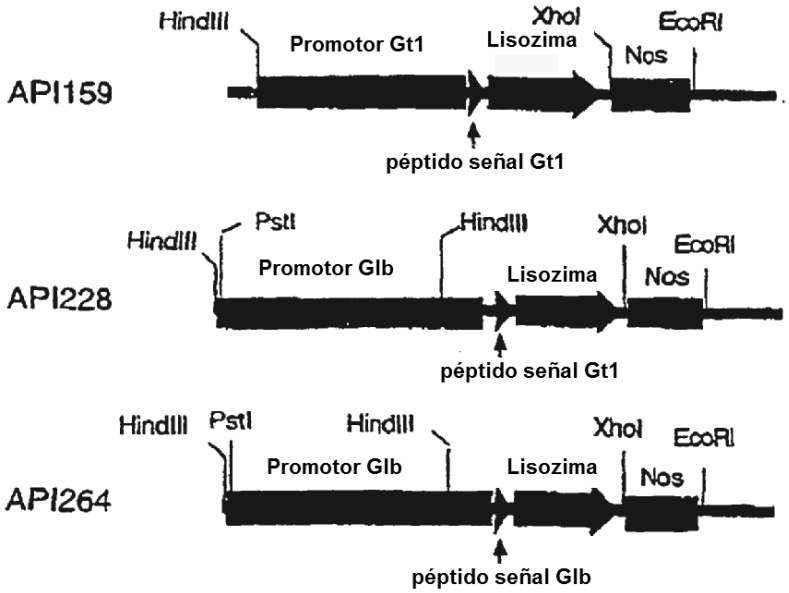


Fig. 39A

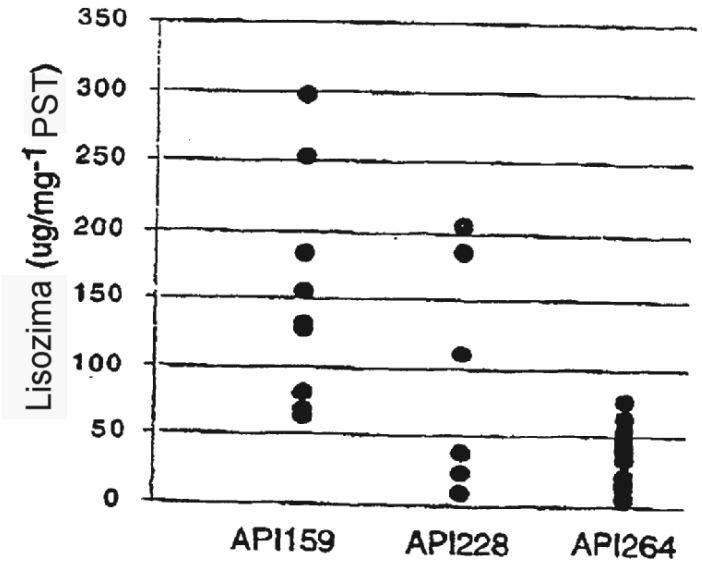


Fig. 39B

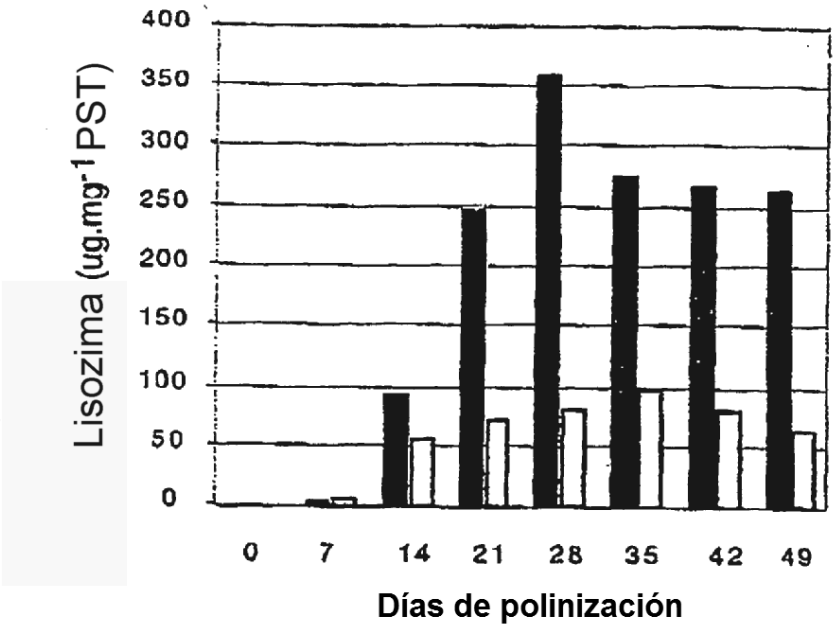

Lisozima (ug.mg-1PST)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
7
14
21
28
35
42
49
Días de polinización

Fig. 40

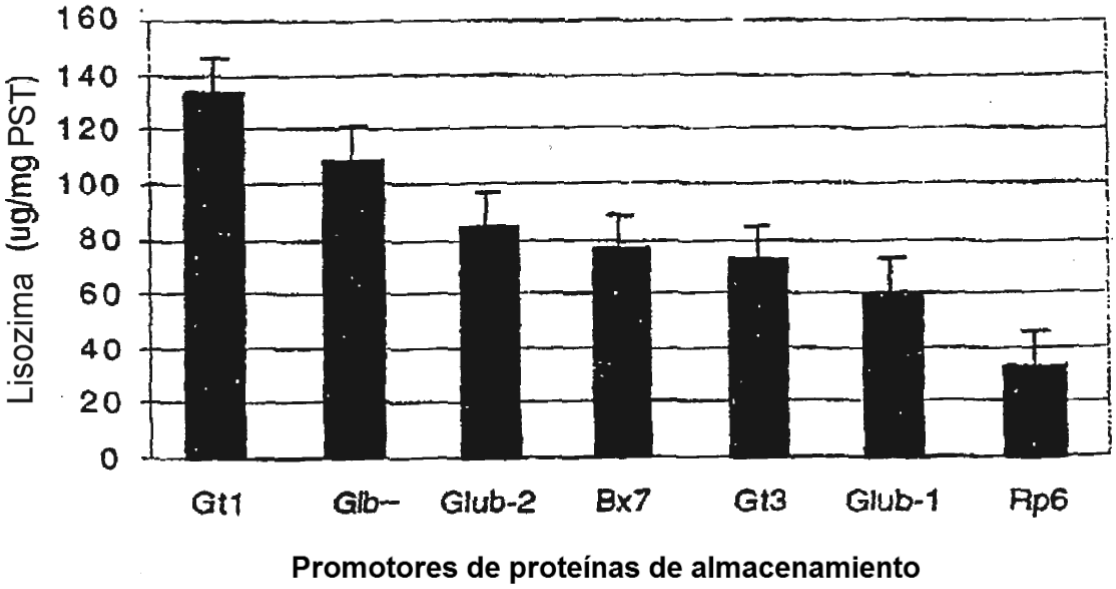

160
140
120
100
80
60
40
20
0
Lisozima (ug/mg PST)
Gt1
Glb–
Glub-2
Bx7
Gt3
Glub-1
Rp6
Promotores de proteínas de almacenamiento

Fig. 41