

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 859**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/38** (2006.01)

**C12N 5/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2010 PCT/US2010/053795**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11050286**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 10825758 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2491113**

54 Título: **Métodos y composiciones para aumentar la producción de polipéptido**

30 Prioridad:

**23.10.2009 US 254522 P**

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

**04.08.2017**

73 Titular/es:

**ARKANSAS STATE UNIVERSITY (100.0%)  
P.O. Box 2760 State University  
Jonesboro, AR 72467, US**

72 Inventor/es:

**DOLAN, MAUREEN, C.;  
LORENCE, ARGELIA y  
MEDRANO, GIULIANA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 628 859 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para aumentar la producción de polipéptido

### 5 Introducción

En los últimos años se han identificado un gran número de proteínas recombinantes con potencial farmacéutico, terapéutico o industrial. Una limitación de introducir estas proteínas recombinantes en el uso comercial son las dificultades asociadas a la expresión de la proteína a partir del hospedador recombinante en cantidades bastantes grandes para ser útiles. Muchos de los sistemas usados para la expresión de la proteína recombinante también requieren que la proteína se purifique antes de ser usada como terapéutico. Estas etapas requieren mucho tiempo, dan como resultado pérdida de proteína e incrementan los costes de producción. Por lo tanto, son necesarios nuevos métodos para incrementar más la producción y la recuperación de proteínas recombinantes a partir de sistemas de expresión heterólogos.

### 15 Compendio

En el presente documento se proporcionan métodos para incrementar la producción, la estabilidad o la actividad de un polipéptido diana. Los métodos incluyen incrementar el nivel de antioxidante en una célula que comprende un polinucleótido codificante del polipéptido diana bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido. La célula incrementa la producción del polipéptido diana en comparación con la producción del polipéptido en una célula control. La estabilidad y/o actividad del polipéptido diana en las células también se puede incrementar en comparación con la estabilidad y actividad del polipéptido diana producido en células control. Los métodos de la invención están definidos en las reivindicaciones.

En otro aspecto, se describen células que incluyen un primer polinucleótido codificante de un polipéptido diana y un segundo polinucleótido codificante de un segundo polipéptido capaz de incrementar antioxidantes en la célula. La producción del segundo polipéptido permite producción incrementada del polipéptido diana en comparación con células que no expresan el segundo polipéptido.

En otro aspecto más, se proporcionan métodos de tratamiento de un sujeto con una afección. El método incluye administrar las células que expresan polipéptido diana incrementado a un sujeto con una afección tratable con el polipéptido diana.

En otro aspecto más, los métodos de tratamiento de un sujeto con una afección incluyen recolectar, aislar y/o purificar el polipéptido diana de las células que expresan polipéptido diana incrementado y administrar el polipéptido diana recolectado a un sujeto con una afección tratable con el polipéptido diana.

En un aspecto adicional, los métodos de uso de los polipéptidos diana incluyen recolectar el polipéptido diana de las células que expresan polipéptido diana incrementado para preparar un polipéptido diana recolectado y usar el polipéptido diana recolectado en un ensayo.

En otro aspecto más, se proporcionan métodos para incrementar los niveles antioxidantes intracelulares por infiltración al vacío de una planta o células vegetales con un medio que comprende al menos un antioxidante. También se proporcionan composiciones adecuadas para la infiltración al vacío de antioxidantes.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa las cuatro realizaciones generales en las que el incremento de antioxidantes en el sistema de bioproducción conduce a la producción de proteína recombinante aumentada en plantas.

La Figura 2 es una representación gráfica que muestra el método de transformar transitoriamente plantas (Fig. A) y las construcciones de expresión de polipéptido diana modelo para hacerlo (Fig. 2B).

La Figura 3A es una fotografía de una transferencia tipo Western (*Western blot*) que muestra mejorada cantidad y calidad de proteína hIL-12 que es dependiente del tiempo y la dosis cuando la vitamina C se introduce durante la infiltración, etapa del sistema de expresión vegetal transitorio. Los paréntesis resaltan la región sobre la transferencia tipo Western correspondiente a las formas oligoméricas de alto peso molecular de hIL-2.

La Figura 3B es una gráfica que muestra el análisis densitométrico de la transferencia tipo Western. Se vio un incremento de aproximadamente 25 % en la expresión de hIL-12 en presencia de vitamina C infiltrada conjuntamente.

La Figura 4 es una fotografía de una transferencia tipo Western (Fig. 4B) y análisis de densitometría semicuantitativo (Fig. 4A) que muestra incremento de otra proteína, chIL-12, cuando se expresa en plantas utilizando el sistema transitorio e infiltración conjunta de vitamina C.

La Figura 5 es una fotografía de una transferencia tipo Western que muestra la expresión de una glicoproteína humana a 48 y 72 horas después de la transformación con o sin la adición de vitamina C.

La Figura 6A es una fotografía de una transferencia tipo Western y análisis de densitometría semicuantitativo que muestra el impacto de la dosis de vitamina C infiltrada conjuntamente sobre los niveles de proteína hIL-12 en los

sistemas de expresión vegetales transitorios.

La Figura 6B representa un gráfico de barras que muestra que un efecto dependiente de la dosis de la vitamina C incrementa los niveles de proteína solubles totales en hojas de planta infiltrada 48 horas después.

La Figura 7A representa un efecto dependiente de la dosis de la vitamina C infiltrada sobre las concentraciones de vitamina C foliares *in planta* totales de plantas hospedadoras del sistema transitorio.

La Figura 7B es un conjunto de fotografías que muestran el efecto dependiente de la dosis de la vitamina C sobre los niveles de peróxido de hidrógeno *in situ* en plantas hospedadoras del sistema transitorio.

La Figura 8A es una fotografía de una transferencia tipo Western que muestra el impacto sobre la producción de proteína hIL-12 cuando se utilizan diversas dosis de vitamina E infiltrada conjuntamente en el sistema de expresión vegetal transitorio.

La Figura 8B es una fotografía de una transferencia tipo Western que muestra el impacto sobre la producción de proteína hIL-12 cuando se utilizan concentraciones incrementadas de vitamina K infiltrada conjuntamente en sistema de expresión vegetal transitorio.

La Figura 8C es una fotografía de una transferencia tipo Western que muestra el impacto de la infiltración conjunta con antioxidantes múltiples -vitamina E y vitamina C- sobre la producción de proteína hIL-12 en el sistema vegetal transitorio.

La Figura 9 es una gráfica que muestra que la adición de la vitamina C también aumenta la recuperación de la hIL-12 activa purificada utilizando un ELISA específico para IL-12.

La Figura 10 es una fotografía de una transferencia tipo Western que muestra el impacto de la vitamina C infiltrada sobre los niveles de proteína IL-12 humana de líneas de planta de *Nicotiana tabacum* transgénicas.

La Figura 11 es una fotografía que muestra una línea de planta de *Arabidopsis* que expresa de manera estable hIL-12 y otra que sobreexpresa de manera estable *myo*-inositol oxigenasa 4 (*MIOX4*), un gen en la ruta biosintética de la vitamina C, y que sobreexpresa vitamina C.

La Figura 12A representa los casetes de expresión codificantes de los transgenes de *MIOX4* de *Arabidopsis* o de L-gulonolactona oxidasa (*GLOasa*) de rata que se insertaron en el locus T5 de una línea celular de arroz utilizando una estrategia de integración mediada por Cre-loxP.

La Figura 12 B es una gráfica que muestra el contenido de vitamina C incrementado de las líneas celulares de arroz y un análisis de transferencia tipo Western que muestra un incremento correspondiente en los niveles celulares del polipéptido de *MIOX4* en líneas celulares de arroz selectas.

La Figura 13 es una gráfica que muestra el contenido de vitamina C incrementado de líneas de arroz transgénico en dos trasfondos de arroz (Taipei y Nipponbare) que sobreexpresan los genes *MIOX4* o *rGLOasa* (Fig. 13B) y una fotografía que muestra la fase de desarrollo de una planta de arroz transformante en la cual se midió el contenido de vitamina C *in planta* (Fig. 13A).

### Descripción detallada

Los inventores han descubierto que elevar los niveles intracelulares de la vitamina C, un antioxidante, *in situ* incrementa la tolerancia al estrés y baja el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las plantas, así como otros tipos celulares. Véase la solicitud de Patente americana Nº 11/908.551. Como se demuestra en los ejemplos, los inventores han descubierto además que los niveles de antioxidante incrementados dentro de una célula dan como resultado la producción, estabilidad y actividad incrementada de polipéptidos no nativos recombinantes. Por tanto, se describen los métodos para incrementar la producción, estabilidad o actividad de un polipéptido diana. Los métodos incluyen incrementar el nivel de un antioxidante en una célula que expresa un polipéptido diana de modo que la producción, estabilidad y/o actividad del polipéptido diana se incrementa en comparación con el de en una célula control.

El polipéptido diana puede ser cualquier polipéptido incluyendo aquellos que tienen potencial terapéutico, farmacéutico, nutracéutico o utilidad industrial. Los polipéptidos diana generalmente son polipéptidos no nativos, pero también pueden ser polipéptidos nativos recombinantemente expresados. Los polipéptidos diana pueden ser de un tipo celular heterólogo y se pueden expresar por la célula o bien transitoriamente o por un transgen integrado de manera estable en el genoma hospedador de expresión. Los polipéptidos diana incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo, una interleuquina, un factor de crecimiento, una citoquina, una enzima o un polipéptido terapéutico.

El polipéptido diana puede ser cualquier polipéptido de interés capaz de ser expresado en la célula. Adecuadamente el polipéptido diana es un polipéptido no nativo. Por ejemplo, el polipéptido diana puede ser una proteína no nativa o ajena (heteróloga) tal como, interleuquina-12 humana ("hIL-12"), interleuquina-12 de ratón ("mIL-12"), interleuquina-12 de pollo ("chIL-12"). La proteína de interés o el polipéptido diana se pueden sobreexpresar utilizando un sistema de expresión recombinante, tal como un sistema de expresión recombinante basado en planta. Para incrementar la biosíntesis de IL-12, el medio infiltrado en la planta (para la entrada en sus células) puede incluir *A. tumefaciens* con IL-12:pBK como se usa en los ejemplos.

Debido a la capacidad de expresar mayores cantidades de estos polipéptidos diana en sistemas celulares más complejos tales como células vegetales o animales, los polipéptidos que requieren modificaciones después de la transducción para la actividad se pueden producir para uso comercial mediante los métodos descritos en el presente documento. Las modificaciones después de la traducción pueden incluir, pero no se limitan a, escisión de proteasa, carbonilación, glicosilación, miristoilación, fosforilación, formación de enlaces disulfuro, carbamoilación, acetilación,

ubiquitinación, citrulinación, sumolación y palmitoilación. Se pueden requerir modificaciones después de la traducción para el correcto plegamiento, activación y estabilidad de la proteína.

Los ejemplos se llevaron a cabo en plantas y células vegetales, pero se esperan resultados similares en otros tipos de células que incluyen, pero no se limitan a, células de bacterias, hongos, algas, levaduras, insectos o mamíferos. También se pueden utilizar en los métodos sistemas multicelulares u organismos que incluyen, pero no se limitan a, insectos o mamíferos no humanos, tales como ratones. También se pueden utilizar en los métodos tejidos, órganos o cultivos celulares derivados de organismos multicelulares que incluye, pero no se limitan a, células de insecto, células vegetales, callos, u órganos, células de mamíferos o tejidos. En los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar tanto células monocotas como dicotas. Plantas útiles incluyen, pero no se limitan a, *Nicotiana ssp.*, que incluyen, pero no se limitan a, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana excelsior*, así como *Arabidopsis thaliana*, u otras especies vegetales hospedadoras capaces de consumir medio de inducción que contiene un antioxidante además de un polinucleótido codificante del polipéptido diana. Plantas útiles en los métodos también pueden incluir arroz, maíz, lino, lechuga, lenteja de agua, tomate, zanahoria, soja, cártamo, u otros cereales o colza. Estas plantas se pueden cultivar en cámaras de plantas, habitaciones de cultivo, invernaderos, hidropónicamente, o como cultivo en el campo. Las hojas se pueden recolectar en cualquier momento durante el cultivo que sea óptimo para la expresión del polipéptido diana.

Ejemplos de sistemas basados en célula animal incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO); mielomas de ratón (NS0 y Sup2/0), células de riñón de cría de hámster (BHK-21); y células de riñón embrionario humano (HEK-293). Otros sistemas basados en célula eucariota incluyen, por ejemplo, levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*), otras células de hongo e insecto (por ejemplo, aislados de *Spodoptera frugiperda* Sf9 y Sf21; *Trichoplusia ni*; *Drosophila*). Ejemplos de sistemas basados en procariontes incluyen, pero no se limitan a, bacterias tales como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Klebsiella*.

Las células se pueden transformar de manera estable de modo que el polinucleótido codificante del polipéptido diana se incorpora en el genoma tal como el núcleo o plasto de una planta o célula vegetal. Alternativamente, las células se pueden transformar transitoriamente o someter a transfección de modo que la expresión de polipéptido se puede mediar por un vector vírico, plásmido o infiltración por Agrobacterias en una planta o célula vegetal. Métodos de expresión de manera estable o transitoria de polipéptidos diana en una amplia diversidad de células son bien conocidos por los expertos en la técnica. Vectores de expresión que permiten expresión constitutiva o inducible de polipéptidos diana también son bien conocidos por los expertos en la técnica y dependerán en gran medida del tipo celular, especie y polipéptido elegido. Tal experimentación está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Para la transformación transitoria, se pueden utilizar métodos conocidos por los expertos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, infiltración al vacío, administración mediada por liposoma, transfección, choque térmico (calor), bombardeo de partículas, electroporación, permeabilización de membrana reversible, microinyección, fusiones de proteína vírica (tal como VP22) u otros métodos de transformación o transfección químicos o mecánicos. Una cepa bacteriana preferida para la transformación de plantas es la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 que porta el plásmido Ti pAL4404 desactivado que soporta la región *vir* y el marcador seleccionable de estreptomycin, aunque se puede utilizar cualquier cepa apropiada. Se han usado cepas alternativas de *A. tumefaciens* para la expresión transitoria y estable que incluyen, pero no se limitan a, EHA105, EHA101, GV3101, AGL1 y AGLO con el requerimiento antibiótico apropiado para la cepa de *A. tumefaciens* utilizada. El polinucleótido diana se puede insertar dentro de la región de ADN-T de un vector de transformación vegetal. Un vector de transformación útil es el vector de expresión binaria vegetal pBIB-Kan, sin embargo, se pueden sustituir otros sistemas de casete de expresión familiares a los expertos en la técnica. También puede ser ventajoso construir la cepa control negativo apropiada para el ensayo transitorio (por ejemplo, *A. tumefaciens* LBA4404 transformada con el vector "vacío" pBIB-Kan). En los ejemplos los vectores se introdujeron en la célula utilizando un método de infiltración al vacío similar al descrito por Medrano y col., 2009. Se pueden utilizar métodos similares para integrar de manera estable el polinucleótido en el genoma de la célula hospedadora. Por ejemplo, se pueden añadir secuencias de integración vírica al vector del polinucleótido diana, el vector se puede preparar para recombinación homóloga en el genoma; también se pueden utilizar transposones, integración mediada por Cre-loxP o bombardeo de partículas utilizando administración basada en biolística.

Antioxidantes o derivados de los mismos incluyen cualquier sustancia capaz de reducir o prevenir la oxidación de moléculas, especialmente en reacciones intracelulares, que incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes enzimáticos solubles en agua, lipófilos y/o enzimáticos. Ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, vitamina C (ácido ascórbico, ascorbato y AsA), vitamina E, vitamina D y vitamina K y cualquiera de sus derivados y glutatión. Derivados incluyen formas más o menos estables de estos antioxidantes con solubilidad variante tal como palmitato de ascorbilo, ascorbil fosfato de magnesio y ascorbatos lipófilos tetrasustituidos. Los antioxidantes adicionales que pueden ser adecuados para su uso en los métodos incluyen, pero no se limitan a, ácido lipoico, ácido úrico, carotenos, coenzima Q, melatonina, polifenoles, miméticos de superóxido dismutasa, miméticos de catalasa o miméticos de peroxidasa (es decir, miméticos incluyen antioxidantes catalíticos o enzimáticos similares a los encontrados en la célula hospedante). También se pueden utilizar combinaciones de antioxidantes. En particular, los ejemplos demuestran que la combinación de un antioxidante soluble en agua (vitamina C) y uno lipófilo (vitamina E)

pueden dar como resultado incrementos adicionales en la producción, estabilidad o actividad de la proteína. Tal combinación puede tener efectos aditivos, más que aditivos o sinérgicos.

Los niveles de antioxidantes en la célula se pueden incrementar de diversas maneras. Primero, muchas células son capaces de transportar algunos antioxidantes o sus derivados a través de la membrana celular de modo que la adición del antioxidante al medio en el cual se cultivan las células es suficiente para incrementar los niveles intracelulares del antioxidante y permitir incrementada producción de polipéptido diana.

Alternativamente, los antioxidantes se pueden introducir directamente en la célula utilizando una infiltración transitoria o sistema de administración dando como resultado un incremento no permanente en antioxidantes dentro de la célula. Por ejemplo, los antioxidantes se pueden introducir directamente en las células por métodos disponibles a los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, infiltración al vacío, administración mediada por liposoma, transfección, sonicación, choque térmico (calor), bombardeo de partículas, electroporación, permeabilización de membrana reversible, microinyección, fusiones de proteína vírica (tales como VP22) u otros métodos de transformación o transfección químicos o mecánicos. Muchos de estos métodos son similares a los utilizados para incorporar un polinucleótido en una célula. En dos de las realizaciones representadas como n.<sup>o</sup> 1 y n.<sup>o</sup> 3 en la Fig. 1, se empleó un método de infiltración vegetal transitoria que utiliza una bomba de vacío regulada. Este método permitió administración rápida y eficaz de antioxidantes en las células vegetales. La infiltración al vacío de las plantas se ha usado en la administración de vectores de expresión de base vírica y bacteriana con el fin de producción proteica en diversas plantas hospedadoras (Kapila y col., 1997; Joh y col., 2005; Schillberg y col., 2005; Sainsbury y Lomonosoff, 2008). Los detalles del método de infiltración al vacío se perfilan en una revisión reciente (Medrano y col., 2009). Se realizaron modificaciones para acomodar la administración de antioxidantes como se perfila en los ejemplos.

También se pueden incrementar los niveles celulares de antioxidantes utilizando métodos de modificación por ingeniería genética. Estos métodos pueden dar como resultado biosíntesis antioxidante incrementada, reciclado incrementado de antioxidantes oxidados o degradación disminuida. Como se muestra en los Ejemplos, incrementar la expresión de una enzima implicada en la ruta biosintética de la vitamina C, tal como MIOX o GLOasa da como resultado síntesis incrementada de la vitamina C en la planta. Igualmente, se espera que la expresión incrementada de otras enzimas en la ruta biosintética de la vitamina C y/u otros antioxidantes también daría como resultado síntesis incrementada del antioxidante. Además, la sobreproducción de enzimas implicadas en el reciclado de antioxidantes oxidados se espera que dé como resultado niveles incrementados de antioxidantes y, por tanto, producción, estabilidad y/o actividad incrementada del polipéptido diana. Finalmente, el descenso de expresión de un regulador negativo de la ruta biosintética de un antioxidante también puede ser un medio de incremento de los niveles del antioxidante en la célula.

Los niveles celulares incrementados de tales enzimas se pueden alcanzar utilizando o bien sistemas de transfección/transformación transitorios o estables similares a los anteriormente discutidos para los polipéptidos diana. Las enzimas dirigidas a la sobreproducción pueden estar implicadas en cualquiera de las rutas biosintéticas que conducen a síntesis de antioxidante que incluyen, pero no se limitan a, la ruta de manosa-galactosa, la ruta de galacturonato, la ruta de gulosa y la ruta de *myo*-inositol. Enzimas adecuadas implicadas en la biosíntesis de la vitamina C incluyen, pero no se limitan a, fosfomanosa isomerasa (PMI) 1 ó 2, fosfomanosa mutasa (PMM), GDP-D-manosa pirofosforilasa (VTC1), GDP-D-manosa-3,5-epimerasa (GME), GDP-L-galactosa fosforilasa (VTC2 o 5), L-galactosa-1-phosphato fosfatasa (VTC4), L-galactosa-deshidrogenasa (GalDH), L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH), metil esterasa, D-galacturonato reductasa, aldono-lactonasa, fitasa, *myo*-inositol oxigenasa (MIOX), 1-5, ácido glucurónico reductasa (GlcUR), gulonolactonasa (GNL), y L-gulono-1,4-lactona oxidasa (GLOasa). La vitamina C además se puede manipular por sobreexpresión de las siguientes enzimas de reciclado: mono deshidroascorbato reductasa (MDAR), y deshidroascorbato reductasa (DHAR). Una proteína que se ha mostrado que regula las enzimas biosintéticas múltiples implicadas en la síntesis de vitamina C es "el regulador 1 de la ruta de la ácido ascórbico manosa" (también conocido como AMR; Zhang y col., 2009). Particularmente, AMR1 es un regulador negativo de la biosíntesis de la vitamina C de modo que extrayendo el gen codificante de esta enzima o de lo contrario interfiriendo con la síntesis del polipéptido utilizando un ARNi u otro planteamiento de silenciamiento de gen se esperaría que diera como resultado incrementada producción de vitamina C en la célula. Las rutas y enzimas implicadas en la biosíntesis de otros antioxidantes son conocidas o pueden ser identificadas por los expertos en la técnica.

Con el fin de los métodos descritos en el presente documento los niveles de antioxidante en las células se deberían incrementar en relación a aquellos en una célula control. El nivel de antioxidantes se debería incrementar a un nivel que no dé como resultado toxicidad grave a la célula o el organismo o tejido que comprende la célula. En los ejemplos, se muestra que la vitamina C incrementa la producción, estabilidad y actividad del polipéptido diana cuando se añade a células a niveles entre 2 y 60 mM. A 80 y 100 mM en las plantas ensayadas los niveles de vitamina C llegan a ser perjudiciales a las células (como se muestra por necrosis en la Fig. 4D). Por tanto, la vitamina C es probablemente eficaz si se añade vitamina C 0,1 mM a 80 mM a las células, adecuadamente se añade al menos 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM o 40 mM. Adecuadamente se añade menos de 100 mM, 80 mM o 60 mM. Mientras que a concentración 1.000 veces menor y en el intervalo de concentración de  $\mu$ M, el antioxidante lipófilo, la vitamina K mostró similares cinéticas de dosis que la vitamina C (véase Fig. 8 B). Se

mostró que la vitamina K incrementa la producción y estabilidad del polipéptido diana cuando se añade a las células a niveles entre 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ . A 100  $\mu\text{M}$ , se mostró que la vitamina K llega a ser perjudicial a las células. La vitamina E mostró un intervalo de dosis eficaz similar a la vitamina K en la escala de  $\mu\text{M}$ , pero con cinéticas de dosis ligeramente diferentes que las vitaminas C y K como se muestra en los ejemplos (véase Fig. 8A). Basándose en las concentraciones de vitamina lipófila mostradas en los ejemplos, se utilizan adecuadamente al menos 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  y adecuadamente menos de 55  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$  o 100  $\mu\text{M}$  de los antioxidantes lipófilos.

Como se muestra en la Fig. 1, la producción incrementada del polipéptido diana se puede alcanzar utilizando al menos cuatro métodos distintos abarcados por las enseñanzas en el presente documento. Una metodología representada en la Fig. 1, n.º 1 implica la introducción de los antioxidantes directamente en las células utilizando un método transitorio y utilizando un método transitorio para administrar el polinucleótido codificante del polipéptido diana a la célula. En esta realización el antioxidante y el polinucleótido codificante del polipéptido diana se pueden introducir en la célula juntos, es decir, por el mismo proceso, o el polinucleótido se puede introducir antes o después del antioxidante.

Una segunda metodología también mostrada en la Fig. 1 n.º 2 implica introducir los antioxidantes directamente en la célula como anteriormente utilizando métodos tales como técnicas de infiltración al vacío para permitir la entrada del medio que contiene un antioxidante en las células o sistemas multicelulares u organismos, tales como plantas transgénicas. En esta realización, las células se han modificado por ingeniería genética para expresar el polipéptido diana, tal como interleuquina-12 (o un nivel elevado del mismo). El polinucleótido codificante del polipéptido diana se puede integrar en el genoma de la célula o puede ser llevado de manera estable por la célula sobre una construcción no genómica tal como plásmido o un cromosoma artificial.

Una tercera metodología mostrada en la Fig. 1 n.º 3 implica usar células modificadas por ingeniería genética para producir niveles intracelulares elevados de antioxidantes. Células hospedadoras adecuadas o sistemas multicelulares tales como plantas modificadas por ingeniería genética para expresar niveles incrementados de polipéptidos implicados en la ruta biosintética antioxidante y que producen niveles elevados de antioxidantes en comparación con las células que no sobreexpresan los polipéptidos. En esta realización, como en la n.º 1, el polinucleótido codificante del polipéptido diana se introduce en la célula de manera transitoria.

Una cuarta realización mostrada en la Fig. 1 n.º 4 implica obtener una célula modificada por ingeniería genética para expresar niveles incrementados de antioxidantes y también para expresar el polipéptido diana de manera estable. Una manera para conseguir este método es cruzando dos grupos de la misma especie de planta o animal transgénico, un grupo modificado por ingeniería para expresar niveles de antioxidante elevados y un grupo modificado por ingeniería para expresar el polipéptido diana. La población resultante debería tener individuos que expresen niveles incrementados del antioxidante y que porten el polinucleótido diana de modo que se producen niveles incrementados del polipéptido diana.

En los métodos representados como n.º 1 y n.º 2, el antioxidante se puede incrementar introduciendo el propio antioxidante en las células directamente. En los ejemplos esto se consiguió por infiltración al vacío de un antioxidante químico, tal como vitamina C, directamente en las células de la planta. Los expertos en la técnica comprenderán que el método elegido para introducir el antioxidante en la célula dependerá del tipo de célula y de si la célula es parte de un sistema multicelular u organismo. Alternativamente, un polinucleótido codificante de un polipéptido capaz de incrementar los niveles antioxidantes en una célula incrementando la producción antioxidante, reciclando o limitando la degradación también se puede introducir y expresar transitoriamente en la célula.

En los métodos representados en n.º 3 y n.º 4, los niveles de antioxidante en la célula se incrementan generando líneas celulares estables u organismos transgénicos que poseen antioxidantes incrementados en las células. En los ejemplos esto se consigue sobreexpresando polipéptidos en la ruta biosintética de la vitamina C, tal como MIOX o GLOasa. La ruta biosintética de la vitamina C es conocida por los expertos en la técnica, de modo que otros polipéptidos implicados en la ruta se pueden sobreexpresar (o subexpresar si el polipéptido es un regulador negativo) para alcanzar niveles incrementados de antioxidante en la célula.

Para valorar los niveles de antioxidantes y polipéptidos diana producidos en una célula se pueden utilizar los métodos perfilados en los ejemplos. Los expertos en la técnica también serán capaces de utilizar métodos alternativos. En los ejemplos, generalmente se recolectaron hojas a 48, 72 y 96 h después de la infiltración dependiendo de las cinéticas de expresión específicas de cada polipéptido diana dado y se almacenaron a -80 °C para posteriores análisis cualitativos y cuantitativos. El tejido foliar congelado se machacó con mortero y mano de mortero con nitrógeno líquido y se sometió a extracción para análisis de proteína o ascorbato (vitamina C). Un ensayo inicial para valorar rápidamente y comparar el impacto de diversos antioxidantes sobre la producción proteica se llevó a cabo extrayendo proteína de las hojas utilizando un tampón de extracción SDS estándar (Medrano y col., 2009) que solubilizó todas las proteínas. A continuación, se resolvieron las muestras por SDS-PAGE (corrida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras) y análisis de inmunotransferencia tipo Western realizado para el polipéptido diana dado. Por ejemplo, la expresión de hIL-12 requería anticuerpo primario antihumano IL-12 (1:1.000 v/v; R&D Systems) y anticuerpo secundario conjugado anti-IgG de cabra-alcalina

fosfatasa de (1:10.000 v/v; Bio-Rad) utilizado en combinación con un agente de detección quimioluminiscente patrón para visualizar niveles de expresión de hIL-12. Se empleó densitometría que utiliza el paquete de programas informáticos Bio-Rad VersDoc4000 y Quant-1 estableciendo expresión proteica relativa del polipéptido diana en la evaluación del impacto de antioxidantes sobre su expresión en plantas. Alternativamente, los tejidos foliares vegetales se sometieron a extracción en tampones de extracción fisiológicos estándar tales como tampón fosfato salino (PBS) para mantener la conformación proteica para análisis *in vitro* que incluyen la determinación de la proteína soluble total (PST) de cada muestra (utilizando generalmente un ensayo basado en método Bradford estándar), métodos basados en ELISA (véase más adelante) y purificación de polipéptido diana.

En el caso de análisis de vitamina C *in planta*, rápidamente se extirparon de las plantas tejidos foliares de una localización definida en la planta (para crear muestras emparejadas espacialmente y temporalmente para estudios de comparación) y se congelaron rápido en nitrógeno líquido. El tejido foliar machacado en presencia de nitrógeno líquido con mortero/mano de mortero se sometió a extracción. Se determinó el contenido de vitamina C foliar por el ensayo de ascorbato oxidasa como previamente se describió (Lorence y col., 2004). En resumen, las muestras de tejido se recolectaron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta análisis. Las muestras se machacaron en ácido *meta*-fosfórico al 6% (p/v), y se centrifugaron a 15.000 x g durante 10 min. Se determinó la vitamina C reducida (también conocida como ascorbato) midiendo el descenso en  $A_{265}$  (coeficiente de extinción de  $14,3 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) después de la adición de 1 unidad de ascorbato oxidasa (Sigma) a 1 ml de la mezcla de reacción que incluía extracto de tejido y fosfato potásico 100 mM (pH 6,9). Se determinó el ascorbato oxidado (también conocido como deshidroascorbato) en 1 ml de mezcla de reacción que incluía 1  $\mu\text{l}$  de ditiotreitól 20 mM después de incubar a temperatura ambiente durante 20 min. El AsA total era la suma de AsA reducido y oxidado.

Para aumentar la producción de un polipéptido diana particular de interés, será necesario determinar la optimización del mejor momento para la introducción del antioxidante en el sistema y la composición y concentraciones de antioxidante óptimas. En algunos casos, el(los) antioxidante(s) puede(n) funcionar lo más apropiadamente cuando se introducen antes o posterior a la activación o transfección del polinucleótido o polipéptido diana de la construcción codificante del polipéptido diana. En otros casos, tanto el(los) oxidante(s) como la construcción codificante del polipéptido diana se administran conjuntamente. En casos donde se consiguen antioxidantes elevados por planteamientos genéticos que transfieren genes que dirigen la producción incrementada de antioxidantes de manera endógena, las cinéticas de expresión de los polinucleótidos relacionados con el antioxidante pueden necesitar ser optimizadas con respecto a las cinéticas del polipéptido diana. Las variaciones en las cinéticas de la expresión génica de los polipéptidos relacionados con el antioxidante y el polipéptido diana se pueden conseguir utilizando promotores constitutivos o inducibles e inductores apropiados tales como los que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Utilizando los métodos descritos en el presente documento, se puede incrementar la producción de polipéptido diana en al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 % o más en comparación con una célula control que no tiene antioxidante adicional. Adecuadamente, la producción del polipéptido diana se puede incrementar 2 veces, 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces o más después de que se incremente el nivel de antioxidante en la célula en comparación con una célula control. Una célula control puede ser una célula capaz de expresar el polipéptido diana, pero no modificada por ingeniería para tener niveles de antioxidante incrementados, una célula no tratada o antes del tratamiento con un antioxidante químico o una célula con un antioxidante inducible en el estado no inducido. Una célula control también puede ser una célula que expresa de manera transitoria o estable un segundo polipéptido que no incrementa los niveles de antioxidante en la célula o se somete a transfección o se transforma de manera transitoria o estable con un vector vacío.

Los ejemplos enseñados en el presente documento, representan producciones aumentadas mediadas por antioxidante de glicoproteínas de mamífero complejas (tales como IL-12) que se sintetizan dentro del sistema de endomembrana de una célula hospedadora eucariota. Realizaciones adicionales pueden incluir polipéptidos diana que se sintetizan dentro del citosol, mitocondria o cloroplastos (plastos). Los métodos se pueden utilizar para aumentar la síntesis de polipéptidos diana cuyo sitio de acumulación incluye el núcleo, lisosomas, glioxomas, vacuolas, mitocondrias, plastos, cuerpos proteicos, retículo endoplasmático (RE), membranas y compartimentos extracelulares incluyendo secreción dentro del medio de cultivo. Además de incrementar la producción total del polipéptido diana, también se muestra que el polipéptido diana resultante es más estable y tiene mayor actividad que un polipéptido diana producido en células sin incrementar el nivel de antioxidante. Como se muestra en los Ejemplos, se mostró que IL-12 y otra glicoproteína son más estables, para mantener su conformación funcional medida por un ensayo ELISA sensible a conformación, y para reducir la oligomerización. La actividad y la estabilidad se puede incrementar si las proteínas se pliegan apropiadamente o se pliegan de modo que sus conformaciones secundarias y terciarias sean estables.

Las células producidas por los métodos descritos en el presente documento y que comprenden niveles elevados de al menos un polipéptido diana también son apropiadas. En una realización, las células pueden expresar más de un polipéptido diana. Por ejemplo, las células pueden comprender polinucleótidos codificantes de 1, 2, 3, 4, 5 o más polipéptidos diana. En una realización, los polipéptidos diana están relacionados o realizan una función integrada. Las células pueden comprender un primer polinucleótido codificante de un polipéptido diana y un segundo

polinucleótido codificante de un segundo polipéptido capaz de incrementar antioxidantes en la célula. La producción del segundo polipéptido permite producción, estabilidad o actividad incrementada del polipéptido diana en comparación con las células que no expresan el segundo polipéptido. Las células pueden estar dentro de un sistema multicelular o un organismo multicelular, tal como un animal no humano o planta.

5 Los polipéptidos diana producidos por los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para una amplia diversidad de fines o en diversos ensayos. Los polipéptidos producidos recombinantes (polipéptidos diana) se pueden utilizar en una amplia diversidad de aplicaciones clínicas e industriales, que incluyen, pero no se limitan a, producción enzimática industrial, conversión y creación de biocombustibles, uso en biorremediación, producción de  
10 enzimas para su uso en alimentos, papel, detergente, o producción textil, ensayos basados en anticuerpo o enzimáticos para diagnósticos médicos, y antimicrobianas a fijar pero unos pocos de los usos potenciales de los polipéptidos diana producidos por los métodos descritos en el presente documento.

15 Las células que expresan el polipéptido diana se pueden administrar directamente a un sujeto con una afección receptiva al polipéptido diana. En una realización, las células vegetales, plantas o material vegetal (es decir, frutas, hojas, raíces, semillas de la planta) se pueden suministrar directamente al sujeto para tratar la afección o aliviar los síntomas asociados con la afección. En una realización alternativa, se puede recolectar el polipéptido diana de las células y administrar al sujeto por algún medio conocido por los expertos en la técnica que incluye, pero no se limita a, intranasalmente, mucosamente, intradérmicamente, parenteralmente, subcutáneamente, oralmente, por aerosol o  
20 intramuscularmente. La administración por colirio o adición a alimentos o agua es aún más adecuada. Las condiciones tratables por administración de un polipéptido diana incluyen, pero no se limitan a, enfermedad autoinmune, cáncer, una enfermedad infecciosa, o el polipéptido diana se puede utilizar como antígeno de vacuna.

25 El polipéptido diana se puede recolectar de las células utilizando cualquier método incluyendo los disponibles para los expertos en la técnica. La recolección puede incluir recoger una fracción secretada de las células, tejidos u organismos que contienen el polipéptido diana (por ejemplo, centrifugando las células y recogiendo la fracción sobrenadante) o haciendo una preparación bruta del polipéptido diana deshaciendo las células, pero también incluye aislar el polipéptido diana de la célula en una forma más o menos purificada. Una preparación bruta puede incluir la lisis de las células y la separación del sobrenadante y la fracción de membrana de las células. El polipéptido diana  
30 será más abundante en una o la otra fracción y se puede usar en métodos posteriores como polipéptido diana recolectado. El polipéptido diana además se puede aislar o purificar de las células utilizando técnicas bioquímicas estándar. El nivel de aislamiento o purificación requerido variará dependiendo del tipo celular utilizado en el método, el polipéptido diana y su uso posterior o método de administración.

35 También se proporciona una composición y método para incrementar los niveles de antioxidante en una célula transitoriamente. La composición de los medios incluye agua o una solución tamponada ligeramente ácida y un antioxidante, adecuadamente vitamina C o un derivado de vitamina C. El antioxidante puede estar presente en una cantidad que oscila desde 0,1 a 100 mM, adecuadamente 1 a 50 mM, más adecuadamente desde 2 a 40 mM. La solución tamponada es adecuadamente un medio en el cual la célula puede sobrevivir, tal como una solución isotónica o moderadamente hipotónica. Para las plantas y células vegetales descritas en el presente documento la solución tamponada adecuadamente está comprendida de 0,3 a 0,6X sales de medio basal Murashige and Skoog,  
40 0,7 a 1,2X vitaminas MS, sacarosa al 1 a 8 %, 0,7 a 1,2X bencilaminopurina. Más adecuadamente el tampón incluye 0,5X sales de medio basal Murashige and Skoog, 1X vitaminas MS, sacarosa al 5 %, 1X bencilaminopurina. La solución tamponada puede tener un pH ácido, adecuadamente el pH es entre 4,0 y 7,0, más adecuadamente el pH es entre 5,0 y 6,5, más adecuadamente el pH es entre 5,5 y 6,0.

50 Los siguientes resultados están en apoyo de las cuatro aplicaciones generales (véase Figura 1) en las que el incremento de antioxidantes en el sistema de bioproducción seleccionado conduce a aumentada producción de proteína recombinante en plantas. Los siguientes datos específicamente se dirigen a la aplicación de esta invención a plantas, sin embargo, su utilidad a otras plataformas de producción de proteína recombinante no requerirá excesiva experimentación para los familiarizados con la técnica.

Los siguientes ejemplos basados en una serie de datos experimentales se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

## 55 Ejemplos

Materiales y métodos

### 60 *Material vegetal*

Se sembraron plantas de *N. benthamiana* o *N. tabacum* de cuatro a cinco semanas de edad sobre un suelo Promix BX/Mycorise Pro estándar (Premier Horticulture) y se cultivaron en una cámara de cultivo ambiental (Conviron) bajo condiciones controladas como las siguientes: 16 h de luz (12.000 lux)/8 h de oscuridad, humedad relativa al 65 % y un ciclo de temperatura de 25 °C (día)/21 °C (noche).  
65

*Vectores bacterianos para la expresión de proteína basada en planta*

Se desarrollaron IL-12 humana (obtenida del laboratorio del Dr. Richard Mulligan, Children's Hospital Boston) y chIL-12 (sintetizada y proporcionada por BioStrategies LLC, Jonesboro, AR) que codifican ambas subunidades de la interleuquina-12 como un polipéptido de cadena sencilla separado con un conector (*linker*) gly-ser [(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>; L] y etiquetado con un epítipo de 6X histidina (6Xhis) en el terminal C como previamente se describió (Medrano y col., 2010). Véase Fig. 2B. Los casetes de hIL-12 y chIL-12 se introdujeron en sitios de restricción *KpnI* y *SacI* de la región de ADN-T de un vector de transformación/expresión pBIB-Kan vegetal (Becker, 1990) que proporciona el promotor 35S aumentado doble (35S-pro ad; Kay y col., 1987), un potenciador de traducción del virus del grabado del tabaco (VGT), y un terminador de gen vegetal (NOS-ter) y se movilizó dentro de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 utilizando un método de congelar/descongelar modificado (Holsters y col., 1978). Véase Fig. 2B. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformada con el vector "vacío" pBIB-Kan se utilizó como control negativo (pBK).

15 *Infiltración transitoria*

La infiltración transitoria se hizo según Medrano y col., (2009), con algunas modificaciones como sigue. En resumen, se cultivó un inóculo de *A. tumefaciens* integrado con el vector binario pBIB-Kan codificante de IL-12 bajo condiciones estándar durante 2 días a 28 °C. Los cultivos bacterianos se centrifugaron y se resuspendieron a una DO<sub>600</sub> final de 0,2 a 0,8, en 400 ml de un medio de inducción ("MI"; 0,5X sales de medio basal Murashige and Skoog, 1X vitaminas MS, sacarosa al 5 %, 1X bencilaminopurina, acetosiringona 200 µM, pH 5,5). Los cultivos se incubaron en MI durante ≥ 3 h a 28 °C. La infiltración al vacío de *N. benthamiana* de 4 a 5 semanas de edad se consiguió invirtiendo una planta en un matraz de vidrio de 400 ml que contenía MI, asegurándose de que todas las hojas de la planta estuvieran inmersas en el medio. El matraz se colocó en una unidad desecador por vacío (diámetro interno de 240 mm) y utilizando una bomba de vacío, se aplicó una presión máxima (aproximadamente 25 in. Hg) durante 2 min y, a continuación, se liberó rápidamente. Plantas adicionales se sometieron a infiltración utilizando el mismo cultivo de construcción/antioxidante, o se recolocaron con un nuevo matraz de MI que contenía otro cultivo construcción/antioxidante. Se usó un único cultivo de MI para infiltrar generalmente 3 pero hasta 10 plantas independientes sin efecto adverso sobre la cantidad del producto de transgen expresado y la presencia de antioxidante introducido de manera exógena *in planta* respectivamente. Las plantas infiltradas se volvieron a la cámara ambiental a condiciones establecidas previamente durante el cultivo de la planta. En el caso de ambas construcciones de transgen modelos, las hojas se recolectaron de las plantas a 48 h después de la infiltración y se almacenaron a -80 °C para análisis posteriores.

35 *Introducción de antioxidantes y construcciones de expresión dentro de las plantas por infiltración al vacío*

Se preparó una solución madre fresca de vitamina C (AsA) (Sigma, St. Louis, MO) en agua destilada y se mantuvo en hielo y se cubrió con papel de aluminio hasta su uso para limitar la degradación potencial. Se añadieron cantidades apropiadas de la solución madre de AsA a un matraz que contenía los medios de inducción (en presencia o ausencia de *A. tumefaciens* inducido que contiene construcción de expresión de transgen) inmediatamente antes de la infiltración de la planta. El intervalo de concentración final de AsA ensayado era de 2 a 100 mM. La vitamina E y la vitamina K se solubilizaron en cloroformo y se mantuvieron sobre tubo de ámbar en hielo. El intervalo de concentración final de las vitaminas E y K ensayadas eran de 5 a 100 µM.

45 *Extracción de tejido foliar y transferencia tipo western*

Un ensayo inicial para valorar rápidamente y comparar el impacto de diversos antioxidantes sobre la producción de proteína implicó la extracción de proteína de las hojas utilizando un tampón de extracción SDS estándar (Tris-HCl 150 mM pH 6,8, glicerol al 30 %, SDS al 6 %, EDTA 5 mM pH 8,0) que solubilizó todas las proteínas. En el caso de análisis de AsA *in planta*, los tejidos foliares de la localización definida sobre la planta (para crear espacialmente y temporalmente muestras emparejadas para estudios de comparación) rápidamente se extirparon de la planta y se congelaron rápido en nitrógeno líquido. Para la determinación de proteína soluble total (PST), se extrajeron tejidos foliares vegetales en un tampón de extracción fisiológico estándar tal como tampón fosfato salino (PBS) o PBS vegetal para mantener la conformación proteica para los análisis *in vitro*. Se determinó la PST de cada muestra utilizando un Protocolo de Microplaca Estándar según la recomendación del fabricante (Kit de ensayo de proteína Coomassie Bradford, Pierce, Rockford, IL) y se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) para generar la curva patrón.

Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE (corrida bajo condiciones desnaturantes o reductoras) y se realizó análisis de inmunotransferencia tipo Western. Para la detección de hIL-12, se utilizó anticuerpo primario anti-IL-12 humana (1:1.000 v/v; R&D Systems) y anticuerpo secundario conjugado anti-IgG de cabra-alcalina fosfatasa (1:10.000 v/v; Bio-Rad). Para la detección de chIL-12, se utilizó conjugado anti-6Xhis (C-term)-alcalina fosfatasa ((1:2.000 v/v; Invitrogen). La detección sobre inmunotransferencias se llevó a cabo utilizando el sustrato quimioluminiscente CDP-Star para fosfatasa alcalina (Roche, Indianapolis, IN) y NitroBlock Enhancer II (Tropix Inc., Bedford, MA) de acuerdo con los procedimientos de los fabricantes. Se empleó densitometría que utiliza el paquete de programas informáticos BioRad VersDoc4000 y Quant-1 y se determinó la expresión de proteína relativa para evaluar el efecto de los antioxidantes sobre la expresión de proteína producida por la planta.

*ELISA para la cuantificación de proteínas IL-12 recombinantes*

La cantidad de hIL-12 expresada en hojas de *N. benthamiana* en presencia o ausencia de niveles antioxidantes modificados durante la bioproducción se cuantificó utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) de hIL-12 específico a heterodímero comercialmente disponible (R&D Systems). Para analizar hIL-12, las hojas se machacaron en tampón PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1 mM, y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM pH 7,0) a una relación de 1:2 (p/v) y se analizaron extractos del sobrenadante por ELISA. Para la detección de hIL-2, el ELISA utilizó anticuerpos monoclonales específicos para hIL-12p70 para capturar (0,2 µg/ml) y anticuerpo anti-IL-12 humana biotinilado para la detección (4 µg/ml). Se utilizó Estreptavidina-HRP (1:200 v/v) para la quimioluminiscencia y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB; KPL) como sustrato para la detección. Se empleó densitometría que utiliza el paquete de programas informáticos BioRad VersDoc4000 y Quant-1 y se estableció expresión de proteína relativa para evaluar el impacto de antioxidantes sobre su expresión en plantas.

*Mediciones de ascorbato*

Se determinó el contenido de ascorbato foliar por un método basado en el lector de microplaca descrito en el presente documento. En resumen, se recolectaron muestras de tejido e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta análisis. Las muestras se machacaron en ácido *meta*-fosfórico al 6 % (p/v) (Sigma), y se centrifugaron a 15.000 x g durante 10 min. El precipitado se descargó y el sobrenadante se recogió para análisis adicional. Se disolvió oxidasa ascórbica (Sigma) en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 mM, pH 5,6 que contenía BSA al 0,05 % a 40 U/ml y se almacenaron a -20 °C. Se determinó el ascorbato reducido en una reacción de 300 µl por triplicado añadiendo 275 µl de 0,1 M de tampón fosfato de potasio pH 6,9 en una placa de 96 pocillos (UV Flat Bottom Microplate, Thermo Scientific) que contenía 15 µl de sobrenadante muestra. La mezcla se midió a A<sub>265</sub> y se registró. Se midió el descenso en A<sub>265</sub> después de la adición de 10 µl (1U) de ascorbato oxidasa (concentración final de 0,0033 unidades de ascorbato oxidasa, Sigma). Se obtuvo un valor estable después de 1 a 2 min. Se determinó el ascorbato oxidado en 300 µl de una mezcla de reacción que incluía 275 µl de 0,1 M de tampón fosfato de potasio pH 6,9 en una placa de 96 pocillos que contenía 15 µl de sobrenadante muestra. La mezcla se midió a A<sub>265</sub> y se registró. Adición de 10 µl de 1,2 mM de ditiotreitól (DTT) con una concentración final de 40 µM de DTT (Sigma) se añadieron y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Se calculó el ascorbato total como la suma de ascorbato reducido y oxidado, basado en una curva patrón con AsA puro (Sigma) corrido en paralelo en la placa. Se midió A<sub>265</sub> utilizando un lector de placa (model Power Wave XS, software KC Junior, Biotek).

*Detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in situ*

La tinción para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas que se correlaciona con la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) se detecta por un procedimiento de tinción dependiente de peroxidasa endógena, utilizando 3,3-diaminobencidina (DAB). Este ensayo proporciona una medida comparativa *in situ* de los niveles de ROS *in planta* (Thordal-Christensen y col., 1997).

## 40 Resultados

La producción de niveles altos de proteínas recombinantes en cualquier sistema de bioproducción dado (por ejemplo, planta, célula vegetal, célula animal, levadura, bacteria, alga) da como resultado un incremento en moléculas relacionadas con el estrés. En el caso de infiltración mediada por *Agrobacterium* de plantas, no es solamente estresante por la propia producción de proteína recombinante, sino que el ataque mecánico sobre la planta hospedadora debido al acto de vacío contribuye más a los niveles de estrés celular en el sistema. Así los inventores etiquetaron el sistema de expresión vegetal transitorio como un modelo ideal para ensayar inicialmente su hipótesis de que fomentar los niveles de AsA intracelulares incrementados y otros antioxidantes (vitamina E, K) coordinadamente con la expresión de sus proteínas diana (hIL-12 y chIL-12) incrementaría la expresión y acumulación de proteína recombinante plegada apropiadamente y activa en plantas.

*La cantidad y calidad de proteínas animales recombinantes se mejora con la adición de ascorbato al sistema de infiltración vegetal transitorio*

Utilizando el método de transformación transitoria mediada por *Agrobacterium* previamente descrito (Medrano y col., 2009), se infiltraron conjuntamente 0,2 y 20 mM de AsA con la construcción de expresión de hIL-12 (Fig. 2; hIL-12:pBK) en plantas de *N. benthamiana*. Los extractos de proteína de tejido foliar recogido a 24, 48, 72 y 96 h después de la infiltración se evaluaron por análisis de inmunotransferencia tipo Western de anti hIL-12. La Fig. 3A ilustra que AsA 20 mM infiltrado conjuntamente dio como resultado un incremento significativo en hIL-12 de cadena sencilla monomérica en relación a plantas infiltradas con la construcción de expresión de hIL-12 sola. Mediante el método de densitometría semicuantitativo los inventores estiman un incremento del 25 al 30 % en la expresión de hIL-12 con inclusión de AsA 20 mM en medio de inducción Fig. 3B. pBIB-Kan (pBK), vector vacío, utilizado como control negativo no mostró bandas con reacción cruzada de 70 kDa en presencia de AsA en los medios de infiltración. Interestantemente, AsA mantenía hIL-12 *in planta* durante hasta 72 h cuando la construcción era infiltración conjunta de AsA en comparación con hIL-12 expresada en medio MI solo (AsA 0 M). Además, la presencia de AsA en los medios infiltrados conjuntamente aboga la formación de oligómero de hIL-12 observada en

las plantas control (AsA 0 M) tanto a 48 como 72 h después de la infiltración indicado por los paréntesis en la Figura 3A. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que lograr los niveles de AsA intracelulares incrementados antes de la expresión de su proteína modelo diana puede proporcionar un ambiente redox más favorable tanto en el citosol como el RE que da como resultado el incremento observado en la expresión y acumulación de hIL-12 recombinante apropiadamente plegada y activa en plantas.

Para establecer que este efecto positivo observado con AsA infiltrado sobre los niveles de expresión de proteína hIL-12 no era específico a proteína y/o construcción, se ensayó una segunda proteína. El homólogo de pollo de IL-12 (chIL-12) aunque presenta actividad de IL-12 "clásica", (es decir, estimulación de la secreción de interferón-gamma, y unión presumida a su receptor cognitivo) de hecho solamente comparte aproximadamente el 34 % de homología de secuencia con su homólogo mamífero y, por tanto, presenta una proteína distinta y única. La construcción de expresión chIL-12:pBK se infiltró al vacío en plantas de *N. benthamiana* utilizando el sistema transitorio en presencia y ausencia de AsA 20 mM. Véase Fig. 2. A 48 h después de la infiltración, se recogieron hojas, se extrajo la proteína total y se evaluó sobre una transferencia tipo Western. Véase Fig. 4B. En promedio se observó un incremento de aproximadamente 3 veces en la expresión de la proteína chIL-12 cuando se expresaba en presencia de AsA 20 mM (Fig. 4A). Estos datos validan más que el impacto positivo de AsA activamente administrado (en este caso por infiltración al vacío) dentro de las células de producción de proteína hospedadoras sobre la expresión de la proteína recombinante es independiente de la proteína.

Construcciones de proteína adicionales que incluyen una glicoproteína humana larga de 94 kDa también se benefició de la adición de AsA en el sistema de bioproducción transitoria de la planta. Como se muestra en la Fig. 5, se mostró que la presencia de AsA 20 mM infiltrado conjuntamente aumenta la acumulación *in planta* de una glicoproteína humana compleja de importancia terapéutica. Aunque 48 h después de la infiltración muestra expresión similar para +/- AsA infiltrado conjuntamente, la acumulación estable de esta proteína se aumenta en presencia de AsA durante la infiltración de la construcción de expresión de transgen a 72 h después de la infiltración. Por tanto, la semivida de esta proteína se aumentó considerablemente hasta 72 h después de la infiltración en relación a su expresión en ausencia de este antioxidante (Fig. 6)

#### *Dosis-dependencia de AsA infiltrado conjuntamente en el sistema de transformación transitorio*

Para establecer la dosis eficaz de AsA infiltrado en el sistema y definir las cinéticas de este antioxidante sobre la expresión de proteína recombinante en la plataforma de expresión transitoria, se añadieron concentraciones crecientes de AsA al medio de infiltrado a AsA 0, 20, 40, 60 mM y se introdujeron conjuntamente en la planta de *N. benthamiana* con la construcción de expresión hIL-12:pBK. Una transferencia tipo Western de hIL-12 y análisis de densitometría semicuantitativo ilustrados en la Fig. 6A muestran un incremento dependiente de la dosis claro en niveles de expresión de proteína hIL-12 a través de AsA 60 mM. Las hojas de las plantas hospedadoras infiltradas con AsA 80 mM comenzaron a mostrar señales de necrosis y lesiones necróticas significantes a AsA 100 mM. Hasta la fecha los resultados de los estudios de respuesta a la dosis de AsA en el modelo de infiltración transitoria vegetal sugieren que concentraciones de AsA 20 a 60 mM es un intervalo de dosis eficaz para fomentar una producción de proteína recombinante favorable.

En el mismo experimento de respuesta a dosis de AsA, los inventores midieron el impacto de los niveles celulares incrementados de AsA sobre la capacidad sintética de proteína total de la planta hospedadora. La Fig. 6B mostró que AsA incrementó los niveles de proteína soluble totales en hojas de plantas infiltradas 48 h después de nuevo de una manera dependiente de la dosis. Este resultado sugiere que el efecto global de AsA sobre el sistema de expresión recombinante vegetal no solamente favorece la incrementada expresión de proteína recombinante sino que estimula la completa capacidad de producción de proteína de la planta. Para confirmar que este incremento en la expresión de proteína recombinante debido a la presencia de elevado AsA presente en la célula vegetal también impactó la maquinaria biosintética proteica general en la planta, se midieron las concentraciones de AsA foliares en las plantas hospedadoras de sistema transitorio. Concomitante con la expresión de proteína incrementada, se observó el mismo incremento dependiente de dosis *in planta* de los niveles de AsA foliares (Fig. 7A). Un segundo método y la confirmación visual de que la introducción de AsA transitoria incrementó eficazmente el nivel del estado antioxidante en las plantas hospedadoras se mostró utilizando un ensayo DAB (Thordal-Christensen y col., 1997). En este ensayo (Fig. 7B), la producción de peróxido de hidrógeno *in situ* ( $H_2O_2$ ), la principal forma de especie reactiva de oxígeno (ROS) en tejidos foliares, mostró regiones marrones en las hojas de planta infiltrada con AsA 0 M. Ya que el AsA añadido de manera exógena se incrementó desde 20 a 60 mM, la presencia de tinción de  $H_2O_2$  era mínima en hojas de la planta en correlación con niveles inferiores de ROS presente. Aunque se observó alguna tinción a AsA 80 mM, la tinción marrón era claramente detectable a AsA 100 mM sugiriendo que mayores niveles de antioxidante daban como resultado toxicidad a la planta. Tomado en conjunto este dato define que la dosis eficaz para fomentar un fenotipo de planta sano mientras que maximiza la producción de proteína recombinante es AsA 20 a 60 mM en el sistema de infiltración transitorio.

*Antioxidantes lipófilos infiltrados conjuntamente fomentan incrementos similares en la expresión de proteína recombinante*

5 Se evaluó en antioxidantes vegetales adicionales su capacidad de mediar un efecto sobre los niveles de expresión de proteína *in planta* similares a los observados para AsA. La naturaleza lipófila de las vitaminas E y K pronosticaron que su localización celular y posible papel en la producción de proteína recombinante de hecho pueden ser distintos de los de AsA soluble en agua. Muchas de las proteínas recombinantes de interés expresadas en plantas se dirigían al sistema de endomembrana resaltando más la posible importancia de estas vitaminas lipófilas en la expresión de proteína recombinante en plantas. Además, ya que se ha demostrado que dos de los antioxidantes más abundantes son moléculas redox claves en mantener la homeostasis de RE en sistemas de mamíferos (Banhegyi y col., 2007). Por lo tanto, las vitaminas E y/o K pueden jugar un papel clave para asegurar salud de RE prolongada en la planta hospedadora durante el proceso de bioproducción intenso que poco a poco conduce a mejorada calidad y cantidad de proteína recombinante.

15 Los estudios de respuesta a dosis con estos antioxidantes indicaron que concentraciones de vitamina E crecientes en el medio de infiltración mostraban el mayor impacto en la expresión de proteína hIL-12 transitoria a 20  $\mu\text{M}$  con de hecho mejoramiento reducido en la producción de proteína a concentraciones de vitamina E mayores (50 a 100  $\mu\text{M}$ ; Fig. 8A). Además, vitamina E 100  $\mu\text{M}$  parecía ser tóxica a la planta. A la inversa, en el caso de expresión vegetal transitoria de hIL-12, la vitamina E sola no tenía efecto sobre la expresión. La infiltración conjunta de intervalo  $\mu\text{M}$  de vitamina K administró tendencias cinéticas de dosis similares que las observadas con AsA para hIL-12, sugiriendo que los antioxidantes lipófilos también pueden incrementar la producción de hIL-12 (Fig. 8B). Basándose en estas actividades pleiotrópicas de vitaminas solubles en agua y grasa, los inventores se interesaron en la determinación de si la introducción de antioxidantes múltiples tendría efectos aditivos o sinérgicos sobre la expresión de proteína transitoria en las plantas. La transferencia tipo Western en la Fig. 8C representa la infiltración conjunta de la vitamina E y AsA. Sorprendentemente, la infiltración conjunta dio como resultado una expresión incrementada de niveles de proteína hIL-12 por encima de AsA solo. En el caso de la vitamina E, la sinergia con AsA se puede explicar debido al papel de AsA en el "reciclado" de la vitamina E oxidada de vuelta a su estado reducido.

*Aumentar in planta los niveles de AsA impacta favorablemente la recuperación de proteína recombinante*

30 Finalmente, aunque la expresión y acumulación incrementada de proteínas animales complejas en las plantas es sugerente de producto recombinante incrementado, la recuperación del producto purificado es la verdadera medida para el éxito del antioxidante incrementado al sistema de expresión vegetal transitorio. Como se muestra en la Fig. 9, AsA en realidad permitió la recuperación de cantidades mayores de proteína hIL-12 bioactiva que se alineaba con la producción/acumulación proteica incrementada de hIL-12 mostrada en la Fig. 6. La presencia de AsA 20 mM de manera exógena añadido al sistema recuperó aproximadamente 20 a 25 % más de producto cuando se comparó con la expresión en ausencia del antioxidante lo cual es significativo en la consideración de la producción de proteína recombinante a escala.

*Los antioxidantes impactan la producción de hIL-12 expresada en plantas transgénicas estables*

45 Líneas de *N. tabacum* estables modificadas por ingeniería para expresar de manera estable la proteína hIL-12 se sometieron a infiltración al vacío con AsA en medios MI y se recogieron hojas 24 a 48 h después de la infección. Una transferencia tipo Western de hIL-12 en la Fig. 10 mostró que AsA infiltrado también era capaz de incrementar la expresión global de los niveles de proteína hIL-12 donde se integra de manera estable un transgen y se expresa bajo un fuerte promotor constitutivo. Este descubrimiento apoya más el concepto de que el incremento de la capacidad antioxidante de la planta hospedadora aumenta la biosíntesis global de la planta en servir como una fábrica para la producción de proteína recombinante.

*Los niveles de antioxidante también se pueden incrementar en líneas transgénicas estables*

50 Se han desarrollado líneas de plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan enzimas en la ruta sintética de AsA para la recuperación mejorada de proteína hIL-12 recombinante en transgénicos estables. Se han desarrollado líneas de planta de *Arabidopsis* homocigotas que sobreexpresan una enzima biosintética de la ruta de AsA, MIOX4 y los inventores están en el proceso de generar líneas vegetales homocigotas que sobreexpresan la enzima GLOasa. Véase Fig. 11. Ambas enzimas están implicadas en la síntesis de AsA y la sobreexpresión de ambas ha demostrado que da como resultado síntesis de AsA incrementada (Radzio y col., 2003 y Lorence y col., 2004). Las líneas de planta MIOX4 con producción aumentada de AsA están siendo cruzadas con líneas de *Arabidopsis* que expresan de manera estable la proteína recombinante modelo hIL-12 para formar líneas estables transformantes dobles. Véase Fig. 11. Los inventores esperan que estas líneas de planta transformante doble expresarán AsA incrementado y producirán una cantidad incrementada de hIL-12 en comparación con plantas cohorte transgénicas para solamente hIL-12. Estas plantas validarán el planteamiento transgénico estable para mejorar la condición de la planta hospedadora para la expresión incrementada de un transgen.

65 Las células de arroz también se pueden modificar por ingeniería genética para expresar mayores niveles de AsA y concomitantemente mayores niveles de proteínas recombinantes. Como se muestra en la Fig. 12A, los casetes de

expresión codificantes el transgen de *MIOX4* de *Arabidopsis* o de *GLOasa* se insertaron en el locus T5 de una línea de cultivo de célula de arroz utilizando una estrategia de integración de Cre-loxP. Las células de arroz resultantes produjeron cantidades incrementadas de MIOX4 en comparación con células de tipo natural. Véase la transferencia tipo Western añadida en la Fig. 12B. En la Fig. 12B, se muestra la cantidad de AsA producida por diversas líneas diferentes. El contenido de AsA para varias de las líneas era 2 a 4 veces superior que la de las células de arroz control. Como en el caso con la *N. benthamiana* transitoriamente infiltrada con la vitamina C, estas líneas celulares de arroz se pronosticaron que tenían niveles de PST incrementados.

Estas células se utilizarán para someter a transfección de manera estable un polipéptido diana tal como IL-12. Los inventores esperan que la producción de IL-12 será mayor en los transgénicos dobles que en las células control. Las células se pueden usar para producir líneas de plantas que se pueden administrar para tratar una enfermedad o afección receptiva a la administración del polipéptido diana. Alternativamente, la proteína diana se puede recolectar de las células para su uso en la diversidad de aplicaciones potenciales.

Las plantas de arroz transgénicas también se pueden modificar por ingeniería genética para expresar mayores niveles de AsA y concomitantemente mayores niveles de proteínas recombinantes. Como se muestra en la Fig. 13, se establecieron líneas de planta transgénica codificantes de los transgenes de *MIOX4* de *Arabidopsis* o de *GLOasa* de rata en tanto los trasfondos de variedad de cultivo de arroz Taipei como Nipponbare por bombardeo de partículas. La cantidad de AsA foliar en varias líneas de planta transgénica de arroz diferentes se comparó en la Fig. 13. Estas plantas se utilizarán para expresar de manera estable un polipéptido diana tal como IL-12. Los inventores esperan que la producción de IL-12 será mayor en los transgénicos dobles que en las plantas control. Estas plantas de arroz se espera que tengan niveles de PST incrementados. Las plantas pueden ser administradas para tratar una enfermedad o afección receptiva a la administración del polipéptido diana. Alternativamente, la proteína diana se puede recolectar de las plantas para su uso en diversas solicitudes potenciales.

## Referencias

Banhegyi G., Benedetti A., Csala M., Mandl J. (2007) "Stress on redox". *FEBS Lett.* 581: 3.634-3.640.

Becker, D. (1990) "Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes". *Nucleic Acids Res.* 18, 203.

Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., Van Montagu, M., and Schell, J. (1978) "Transfection and transformation of *A. tumefaciens*". *Mol. Gen. Genet.* 163, 181 -187.

Joh L.D., Wroblewski T., Ewing N.N., y VanderGheynst J.S. (2005) "High-level transient expression of recombinant protein in lettuce". *Biotechnol. Bioeng.* 91:861-71.

Kapila J., DeRycke R., VanMontagu M., Angenon G. (1997) "An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves". *Plant Sci* 122:101-108.

Kay, R., Chan, A., Daly, M., y McPherson, J. (1987) "Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes". *Science* 236, 1.299-1.303.

Lisko K.A., Harris R.S., Yactayo-Chang J. y Lorence, A. (2008) "Engineering ascorbate for enhanced growth, nutritional content, and stress tolerance in crops". *In Vitro Cell. Develop. Biol. Animal* 44: S28.

Lorence A., Mendes P., Chevone B.I., y Nessler C.L. (2004) "myo- Inositol Oxygenase Offers a Possible Entry Point into Plant Ascorbate Biosynthesis". *Plant Physiol.* 134: 1.200-1.205.

Medrano G., Reidy M.J., Liu J., Ayala J., Dolan M.C., y Cramer C.L. (2009) "Rapid system for evaluating bioproduction capacity of complex pharmaceutical proteins in plants" In: "Recombinant Proteins from plants", Methods and Protocols Series: Methods in Molecular Biology. L. Faye, and V. Gomord, eds. Humana Press, Totowa, NJ, 483:51-67.

Medrano, G., Dolan, M.C., Stephens, N.T., McMickle, A., Erf, G., Radin, D. y Cramer, C.L. (2010) "Efficient plant-based production of chicken IL-12 yields a strong immunostimulatory cytokine". *J. Interferon Cytokine Res.* 30(3), 21-31.

Radzio J., Lorence A., Chevone B.I., y Nessler C.L. (2003) "L-Gulonono-1,4-lactone Oxidase Expression Rescues Vitamin C Deficient *Arabidopsis* (*vtc*) Mutants". *Plant Molec. Biol.* 53: 837-844.

Sainsbury F. y Lomonosoff G.P. (2008) "Extremely High-Level and Rapid Transient Protein Production in Plants without the Use of Viral Replication". *Plant Physiol.* 148:1.212-1.218.

Schillberg S., Twyman R.M., y Fischer R. (2005) "Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants-technology assessment". *Vaccine* 23: 1764-1769.

5 Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B. (1997) "Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction." *Plant J.* 11:1.187-1.194.

10 Zhang W., Lorence A., Gruszewski H.A., Chevone B.I. y Nessler C.L. (2009) "AMR1, an Arabidopsis gene that coordinately and negatively regulates the mannose/L-galactose ascorbic acid biosynthetic pathway". *Plant Physiol.* 150: 942-950.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de incremento de la producción, la estabilidad o la actividad de un polipéptido diana, que comprende:
    - 5 introducir un antioxidante en una célula por introducción exógena utilizando una infiltración transitoria o un sistema de administración para incrementar el nivel de antioxidante en la célula, comprendiendo la célula un primer polinucleótido heterólogo codificante del polipéptido diana, en donde el antioxidante es un antioxidante soluble en agua o lipófilo; y, cuando el antioxidante es un antioxidante lipófilo, se le añade a 10  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , o
    - 10 cuando el antioxidante es vitamina C, se le añade a 20 mM a 60 mM; y en donde la producción, la estabilidad o la actividad del polipéptido diana en la célula se incrementa en comparación con la producción, la estabilidad o la actividad del polipéptido diana en una célula control.
  2. El método de la reivindicación 1, en el que la célula es una célula vegetal.
  - 15 3. Un método de incremento de la producción, la estabilidad o la actividad de un polipéptido diana en una planta transgénica para el polipéptido diana, que comprende:

incrementar los niveles de antioxidante en células de la planta transgénica, en donde los niveles incrementados de antioxidante incrementan la producción, la estabilidad o la actividad del polipéptido diana en las células en

  - 20 comparación con los niveles en las células de la planta sin antioxidantes incrementados o en células de una planta control, en donde los antioxidantes en las células se introducen por introducción exógena de antioxidantes utilizando una infiltración transitoria o un sistema de administración.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los antioxidantes se seleccionan entre
- 25 vitamina C, vitamina K, vitamina E, vitamina D, glutatión, ácido lipoico, ácido úrico, carotenos, coenzima Q, melatonina, polifenoles, miméticos de superóxido dismutasa y derivados o combinaciones de los mismos.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que un antioxidante soluble en agua y un
- 30 antioxidante lipófilo se introducen en combinación.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido diana es un anticuerpo, una interleuquina, un factor de crecimiento, una enzima, una citoquina o un polipéptido terapéutico.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que para la actividad, el polipéptido diana
- 35 requiere un procesamiento después de la traducción.
8. Un método para incrementar los niveles de antioxidante intracelulares que comprende infiltración al vacío de una planta o una célula vegetal con un medio que comprende al menos un antioxidante, en donde el antioxidante es un
- 40 antioxidante soluble en agua o un antioxidante lipófilo; en donde cuando el antioxidante es vitamina C, se le añade a 20 mM a 60 mM, y cuando el antioxidante es un antioxidante lipófilo se le añade a 10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ .
9. El método de la reivindicación 8, en el que la célula o las células se han modificado por ingeniería genética para expresar el polipéptido diana.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, en el que la infiltración transitoria o el sistema de administración se seleccionan del grupo que consiste en infiltración al vacío, administración mediada por liposoma, transfección, sonicación, choque térmico (calor), bombardeo de partículas, electroporación, permeabilización de membrana reversible y microinyección.

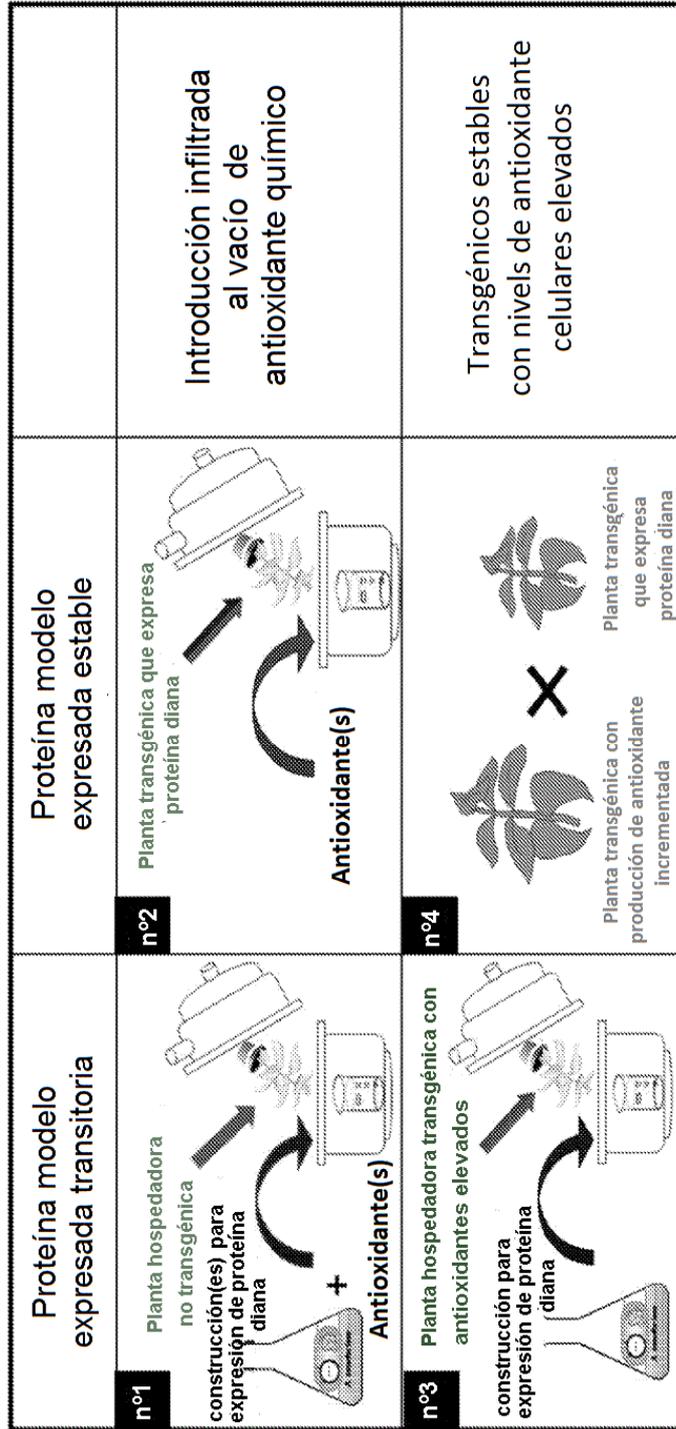


Figura 1

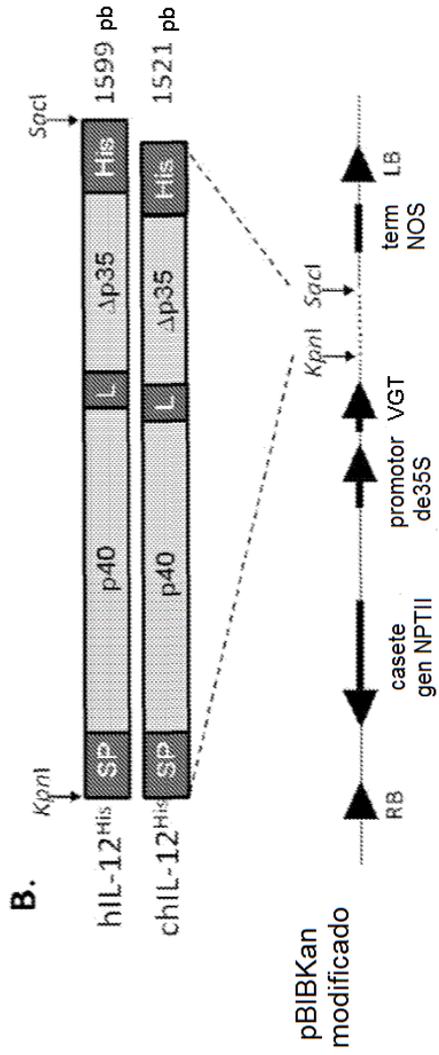


Figura 2

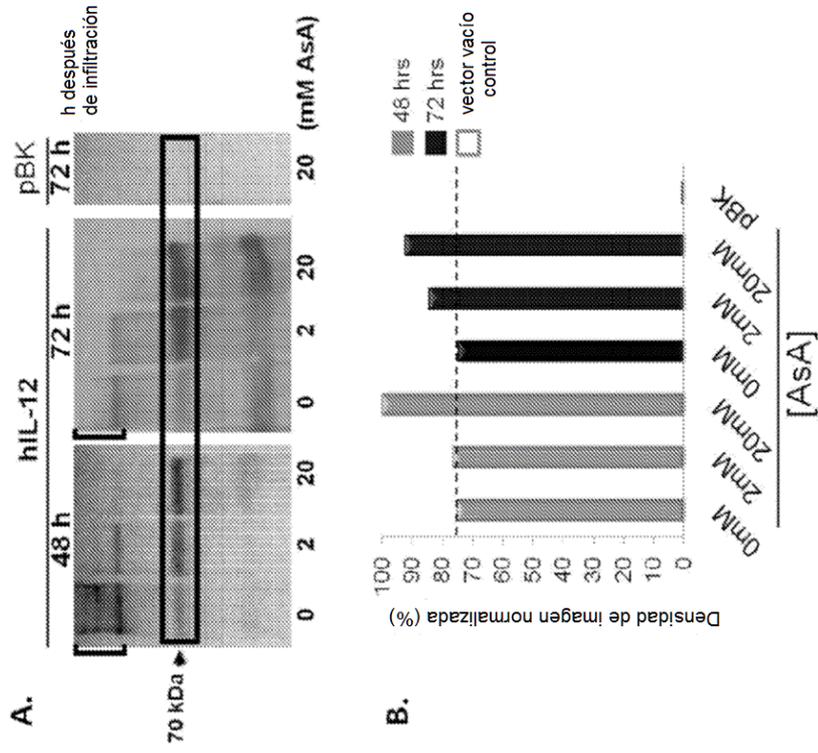


Figura 3

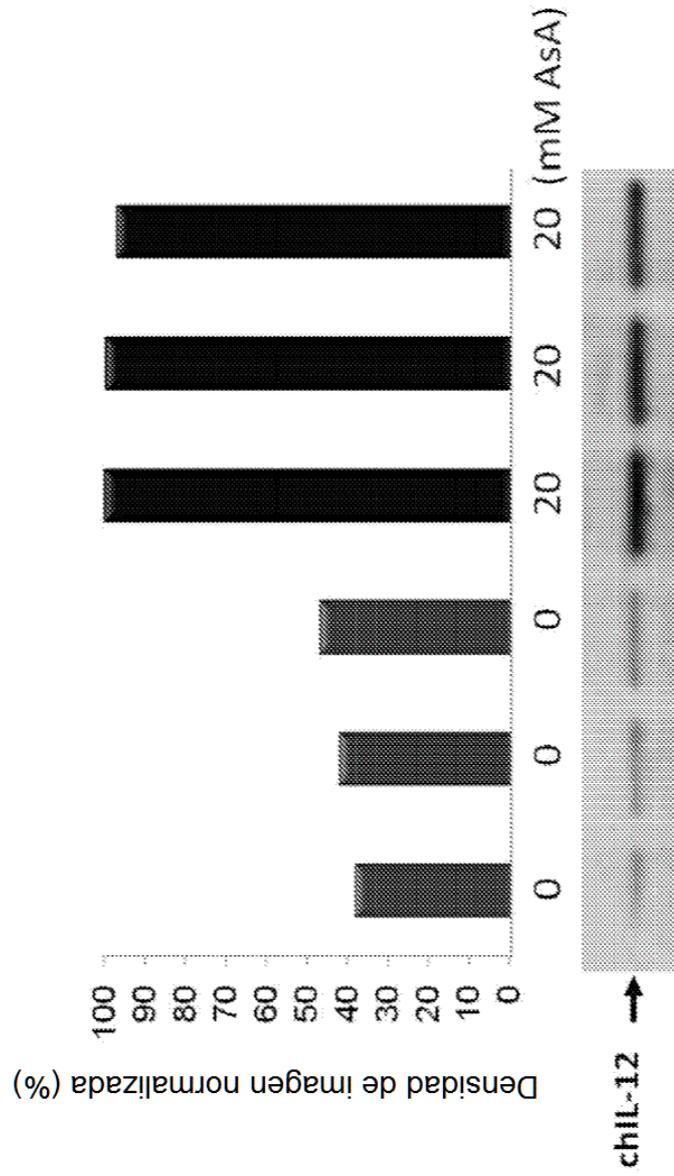
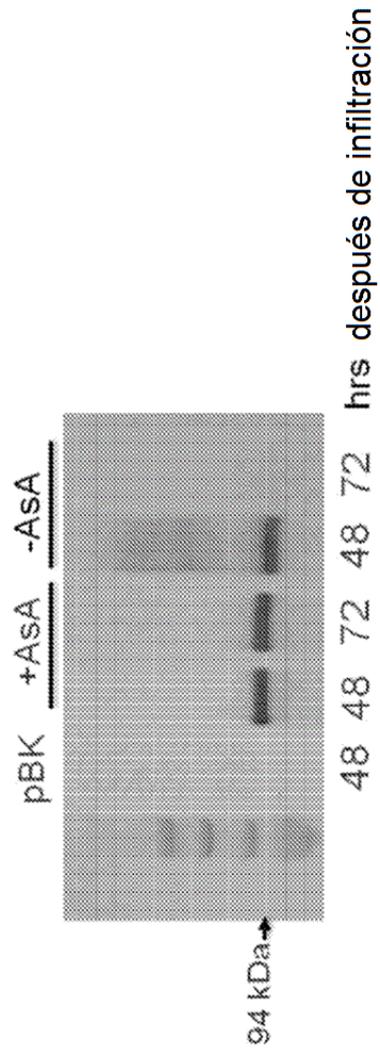


Figura 4



**Figura 5**

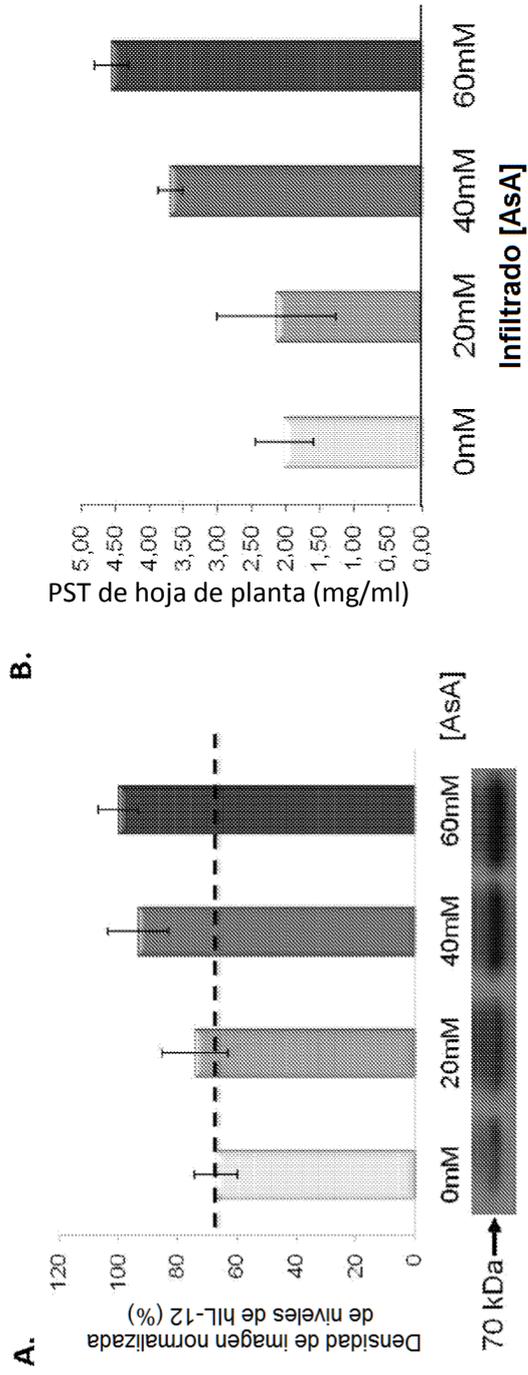


Figura 6

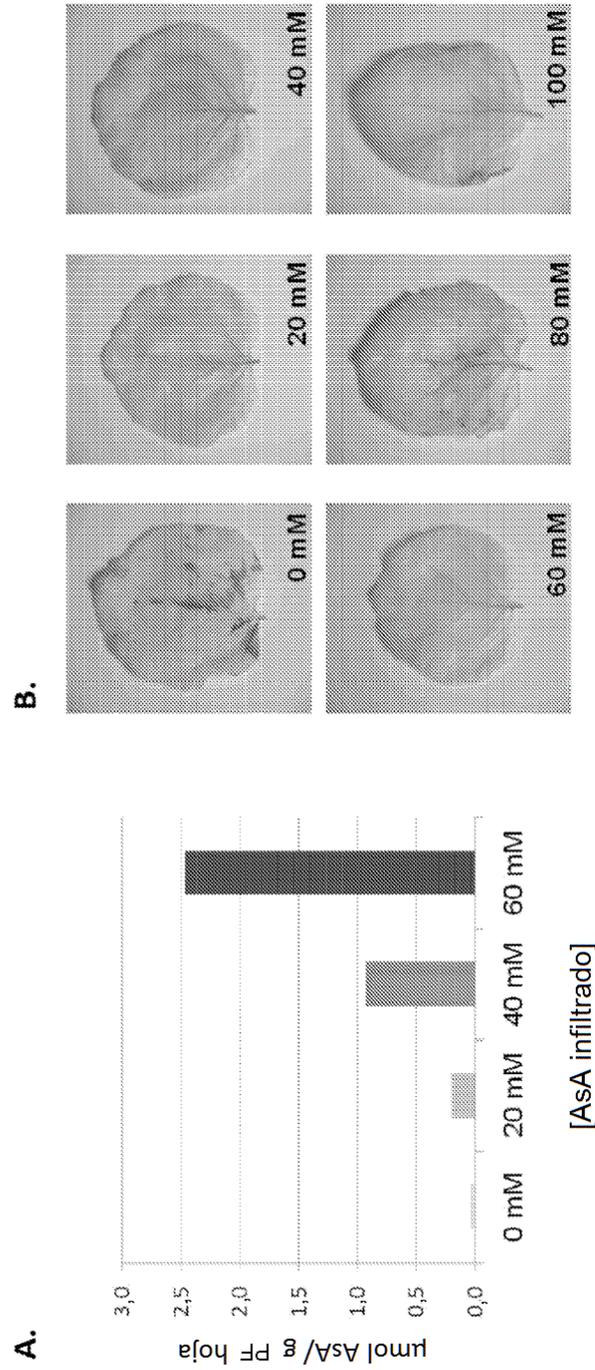


Figura 7

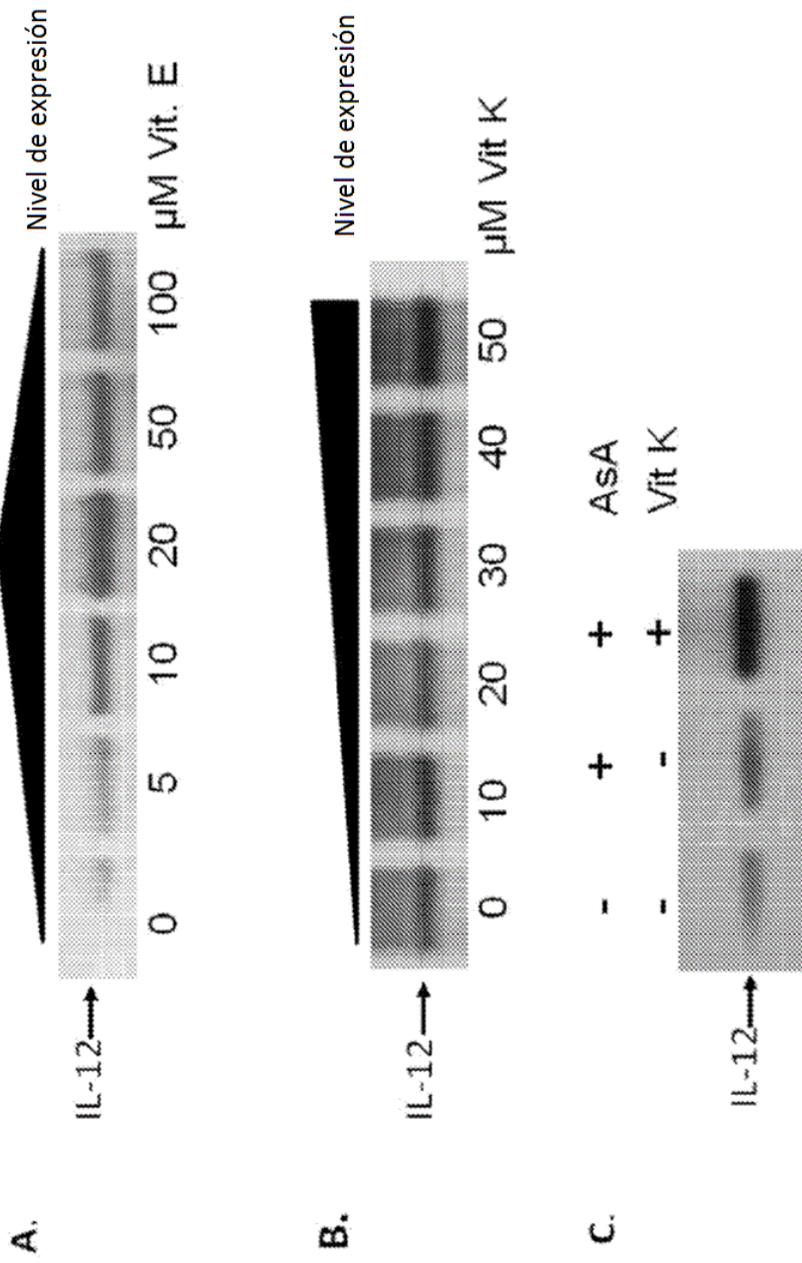


Figura 8

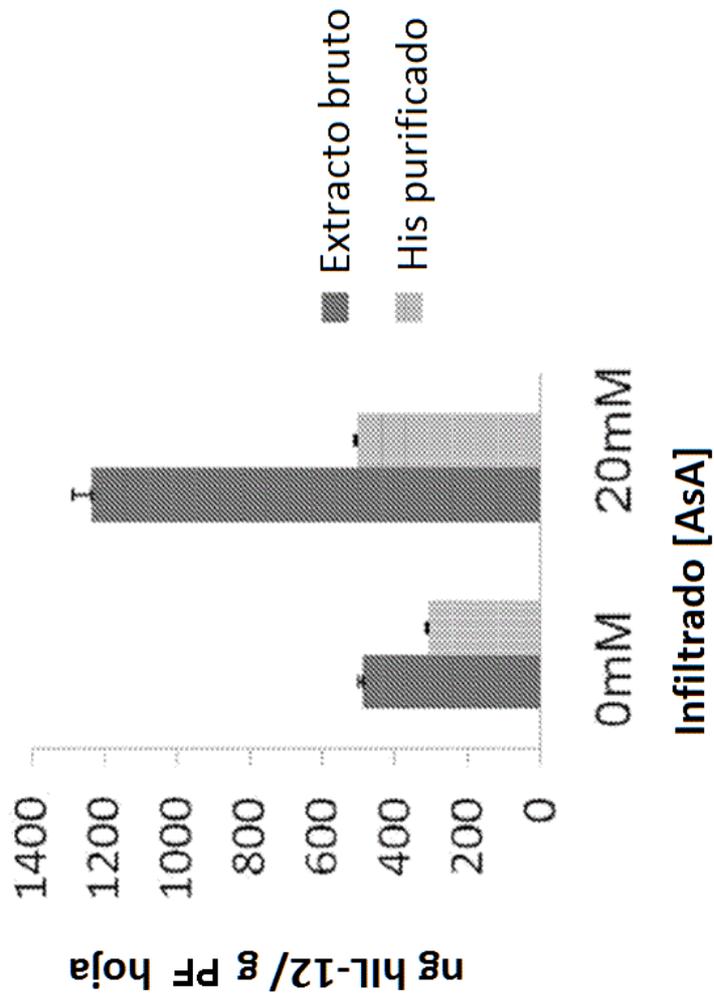


Figura 9

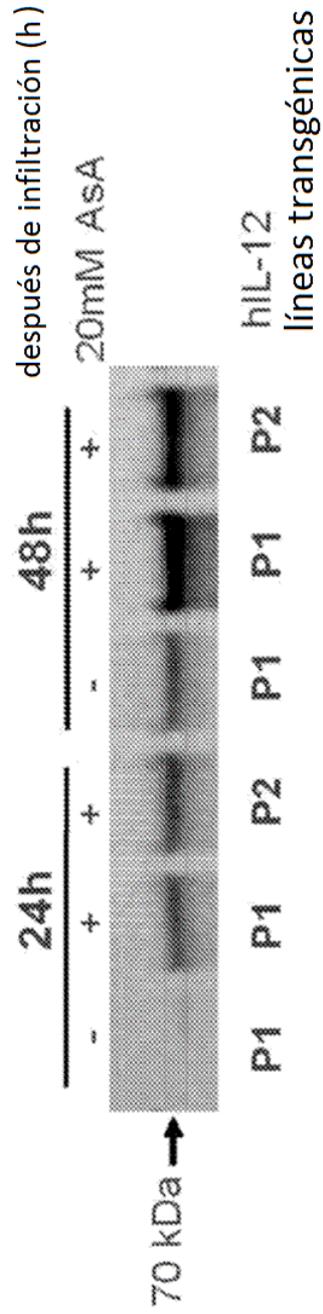


Figura 10

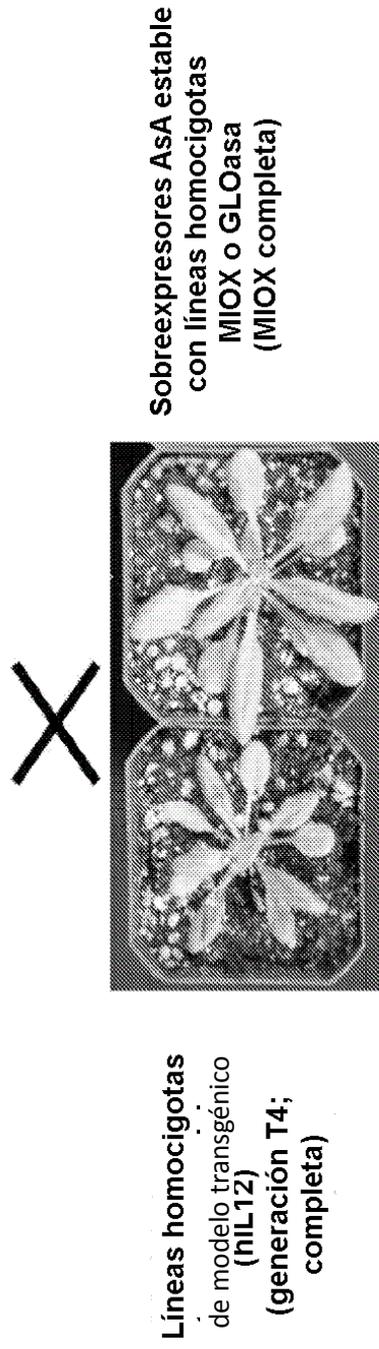


Figura 11

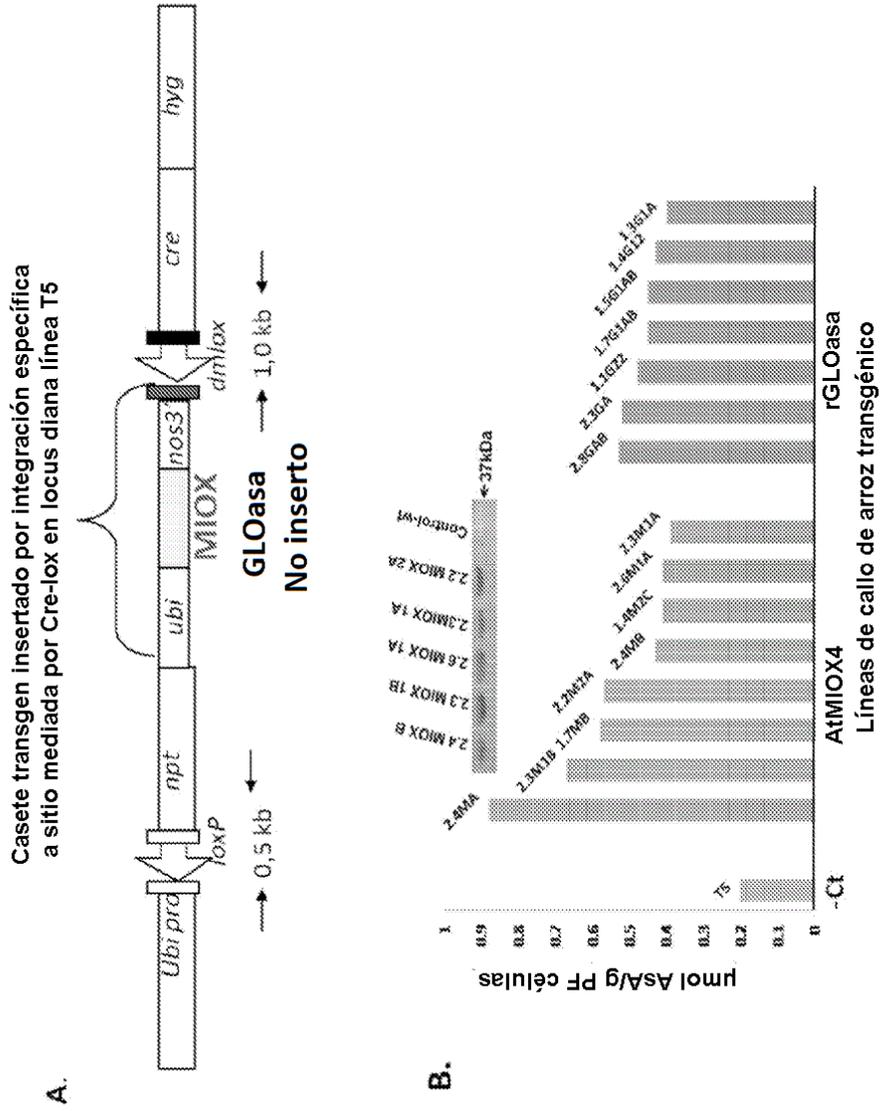


Figura 12

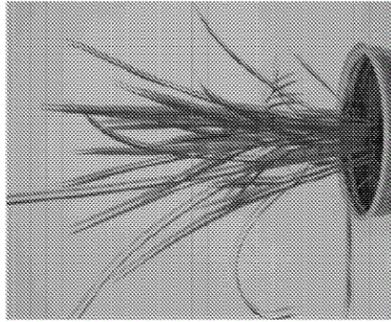
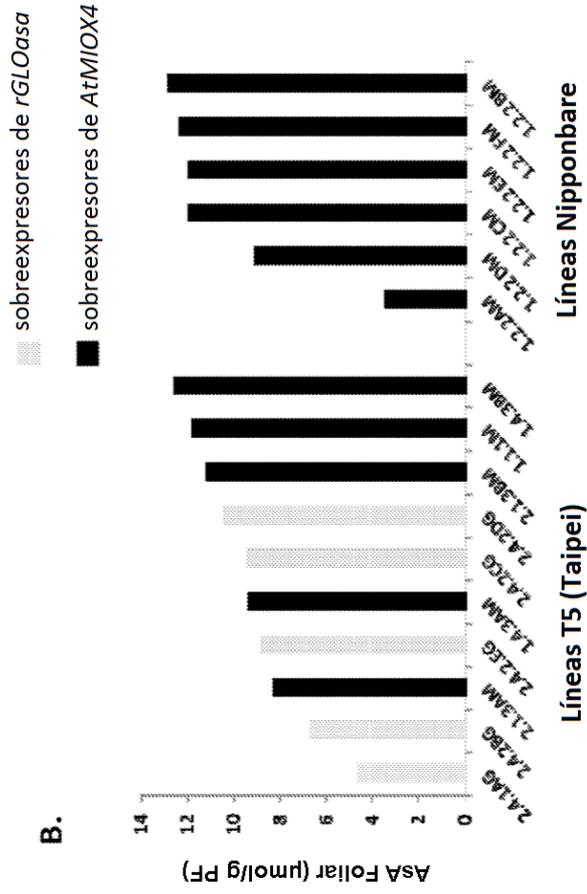


Figura 13