

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038931**(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(15) Информация об исправлении
Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в описании: стр.48

(48) Дата публикации исправления
2022.02.18, Бюллетень №2'2022

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.11

(21) Номер заявки
201791059

(22) Дата подачи заявки
2015.11.19

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ С
МОДИФИЦИРОВАННЫМ ПРОФИЛЕМ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ
РАСТЕНИЙ**

(31) 62/082,204**(32)** 2014.11.20**(33)** US**(43)** 2018.02.28**(86)** PCT/IL2015/051112**(87)** WO 2016/079739 2016.05.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЙИССУМ РИСЕРЧ ДИВЕЛОПМЕНТ
КОМПАНИ ОФ ЗЕ ХЕБРИУ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ИЕРУСАЛИМ
ЛТД. (IL)**

(72) Изобретатель:
**Шосейов Олед, Магриссо Хелена,
Цвирин Цви, Яари Амит (IL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) EP-A1-2090648
O. B. GORBATIUK ET AL.: "Bioaffinity sorbent based on immobilized protein A Staphylococcus aureus: development and application", BIOPOLIMERY I KLETKA, vol. 28, no. 2, 20 March 2012 (2012-03-20), pages 141-148, XP055243440, UK ISSN: 0233-7657, DOI: 10.7124/bc.000041 figure 1

GREG HUSSACK ET AL.: "Purification of Plant-Derived Antibodies through Direct Immobilization of Affinity Ligands on Cellulose", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 58, no. 6, 24 March 2010 (2010-03-24), pages 3451-3459, XP055241347, US ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf9040657 figure 1

WO-A1-0077175
WO-A2-2012122308

FRANCESCA DE MARCHIS ET AL.: "Human[alpha]-mannosidase produced in transgenic

tobacco plants is processed in human [alpha]-mannosidosis cell lines", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 9, no. 9, 7 December 2011 (2011-12-07), pages 1061-1073, XP055243379, GB ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2011.00630.x figure 1

WO-A2-2004096978

WO-A2-2004074498

US-A1-2009203079

WO-A2-2014078475

WO-A2-2008128144

DE-A1-19900635

WO-A2-2004074499

WO-A2-03078637

WO-A1-2012170678

VERONIQUE GOMORD ET AL.: "Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 8, no. 5, 11 June 2010 (2010-06-11), pages 564-587, XP055081186, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x page 571, right-hand column - page 574, left-hand column

OH DOO-BYOUNG ET AL.: "Glycoengineering of the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha for the production of glycoproteins with trimannosyl core N-glycan by blocking core oligosaccharide assembly", BIOTECHNOLOGY JOURNAL, WILEY-VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 3, no. 5, 4 March 2008 (2008-03-04), pages 659-668, XP002532709, ISSN: 1860-6768, DOI: 10.1002/BIOT.200700252 page 666

WILDT S. ET AL.: "THE HUMANIZATION OF N-GLYCOSYLATION PATHWAYS IN YEAST", NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 3, no. 2, February 2005 (2005-02), pages 119-128, XP009064525, ISSN: 1740-1526, DOI: 10.1038/NRMICR01087 page 123, right-hand column - page 124, right-hand column

WO-A1-2010015722

BALEN BIJANA ET AL.: "N-glycosylation of recombinant therapeutic glycoproteins in plant systems", FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SVEUCILISTE U ZAGREBU * PREHRAMBENOBIOTEHNOLOSKI FAKULTET, CROATIA, vol. 45, no. 1,

038931 B9

038931 B9

March 2007 (2007-03), pages 1-10, XP009104146, ISSN: 1330-9862 figure 5

HAMILTON ET AL.: "Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 18, no. 5, 24 October 2007 (2007-10-24), pages 387-392, XP022350908, ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/J.COPBIO.2007.09.001 page 388

LEANDER MEURIS ET AL.: "GlycoDelete engineering of mammalian cells simplifies N-glycosylation of recombinant proteins", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 32, no. 5, 20 April 2014 (2014-04-20), pages 485-489,

XP055207876, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2885 the whole document

WO-A1-2015095037

PIRON ROBIN; SANTENS FRANCIS; DE PAEPE ANNELIES; DEPICKER ANN; CALLEWAERT: "Using GlycoDelete to produce proteins lacking plant-specific N-glycan modification in seeds.", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 33, no. 11, 6 November 2015 (2015-11-06), pages 1135-1137, XP055244492, United States ISSN: 1546-1696, DOI: 10.1038/nbt.3359 the whole document

-
- (57) Предложен способ модификации профиля гликозилирования полипептида, представляющего интерес, в растении или клетке растения. Указанный способ включает экспрессию в растении или клетке растения, трансформированных для экспрессии во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы, последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес, таким образом, что по меньшей мере одна гликозидаза и полипептид, представляющий интерес, являются совместно локализованными во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения, посредством чего модифицируется профиль гликозилирования полипептида, представляющего интерес, в растении или клетке растения.

038931 B9

038931 B9

038931

B9

Область и уровень техники

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к композициям и способам получения полипептидов с модифицированным профилем гликозилирования в клетках растений.

Растения являются весьма перспективными хозяевами для получения терапевтических белков млекопитающих, включая ферменты, факторы роста, структурный белок, такой как коллаген, химерные белки, такие как Энбрел, и мультимерные белки, такие как антитела.

Преимущества использования растений для получения рекомбинантных лекарственных препаратов включают возможность крупномасштабного производства, сниженные затраты на производство, хранение и доставку, а также отсутствие риска того, что полученный в результате продукт будет содержать потенциально вредные контаминанты, такие как вирусы или прионы, которые являются патогенными для человека и других млекопитающих. В растениях, как и в других гетерологичных системах экспрессии, включая клетки млекопитающих, бактерий, дрожжей и насекомых, наблюдаются различия в гликозилировании.

В растениях, как и в других эукариотах, большинство растворимых и мембраносвязанных белков, которые синтезируются на полирибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР), представляют собой гликопротеины, включая те белки, которые впоследствии будут экспортированы в аппарат Гольджи, лизосомы, плазматическую мембрану или внеклеточный матрикс. Гликаны, присоединенные к гликопротеинам, содержат множество остатков сахаров, объединенных в линейные или разветвленные структуры, которые могут принимать множество различных конформаций. Данные гликаны могут играть фундаментальную роль в способствовании правильной укладке и сборке белка и, как следствие, в увеличении стабильности белка. Данные гликаны могут также содержать информацию для нацеливания, или могут быть непосредственно вовлечены в распознавание белков. Три главные посттрансляционные модификации белков, в которых участвуют углеводы, представляют собой N- и O-связанное гликозилирование и присоединение гликозилфосфатидилинозитольных якорей.

Механизмы N-связанного гликозилирования в системах млекопитающих и растений являлись консервативными в процессе эволюции. Однако на конечных этапах моделирования олигосахарида и модификации гликана в аппарате Гольджи наблюдаются различия. В отличие от бактерий, в которых отсутствуют N-связанные гликаны, и дрожжей, содержащих полиманнозные гликаны, растения нарабатывают мультимеры гликопротеинов с комплексными N-связанными гликанами, содержащими кор (ядро), замещенный двумя остатками N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). Данные мультимеры гликопротеинов также обнаружены у млекопитающих. См., например, публикацию Kornfeld and Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* 54:631 (1985). Мультимеры гликополипептидов растений и животных содержат различные концевые углеводы, которые присоединены непосредственно к внешним ветвям присутствующих олигосахаридов. Мультимеры гликополипептидов животных, в том числе мультимеры гликополипептидов млекопитающих, содержат сиаловую кислоту, которая присутствует в качестве концевого углеводного остатка, в то время как мультимеры гликополипептидов растений не содержат сиаловой кислоты. Концевой кор замещен β 1,2-связанной ксилозой (Xyl) и α 1,3-связанной короной фукозой (Fuc) вместо α 1,6-связанной короной фукозы, которая обнаружена у млекопитающих. Более того, в гликопротеинах растений отсутствует характерный комплекс N-гликанов, содержащий галактозу (Gal) и сиаловую кислоту, - (N-ацетилнейраминаовая кислота- α -2-6/3Gal β 1-4), обнаруженный у млекопитающих.

Рекомбинантные белки растительного происхождения характеризуются риском высокой иммуногенности в связи с наличием чужеродных остатков сахаров, т.е. остатков α -1,3 фукозы и β -1,2 ксилозы. С целью уменьшения иммуногенности было разработано множество базовых технологий, некоторые из которых описаны в публикациях Naoko Yamane-Ohnuki and Mitsuo Satoh *MAbs.* 2009 May-Jun; 1(3): 230-236, Strasser et al., *Plant Biotechnology Journal* (2008) 6, pp. 392-402; Matsuo et al., *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2014) 118, 4, pp. 448-454; Matsuo *Plant Biotechnol. J.*, 9, 264-281 (2011), а также в публикациях US 20030159178, US 20120079627, 20070089201 и WO 01/29242.

Краткое описание изобретения

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ модификации профиля гликозилирования полипептида, представляющего интерес, в растении или клетке растения, причем указанный способ включает экспрессию в растении или клетке растения, трансформированных для экспрессии во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы, последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес, таким образом, что указанные по меньшей мере одна гликозидаза и полипептид, представляющий интерес, совместно локализируются в указанном внутриклеточном компартменте растения или клетки растения, посредством чего модифицируется профиль гликозилирования полипептида, представляющего интерес, в растении или клетке растения.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ получения полипептида, представляющего интерес, причем указанный способ включает:

- (а) экспрессию в растении или клетке растения, трансформированных для экспрессии во внутрикле-

точном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы, последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес, таким образом, что по меньшей мере одна гликозидаза и полипептид, представляющий интерес, совместно локализируются во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения; и далее

(b) выделение полипептида, представляющего интерес.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растение или клетка растения, трансформированные для экспрессии во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы, также характеризуются уменьшенным уровнем или активностью по меньшей мере одной гликозилтрансферазы по сравнению с растением или клеткой растения того же вида, экспрессирующими уровни дикого типа или демонстрирующими активность дикого типа по меньшей мере одной гликозилтрансферазы.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гликозилтрансфераза включает бета-(1,2)-ксилозилтрансферазу и/или альфа-(1,3)-фукозилтрансферазу.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растение или клетка растения, трансформированные для экспрессии во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы, также содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует слитый полипептид, содержащий пептид, связывающийся с клеточной стенкой, слитый в результате трансляции с аффинной группой для связывания полипептида, представляющего интерес.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен выделенный полипептид, который содержит пептид, связывающийся с клеточной стенкой, слитый в результате трансляции с гетерологичной аффинной группой.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения пептид, связывающийся с клеточной стенкой, представляет собой целлюлозосвязывающий домен (cellulose binding domain, CBD).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аффинная группа предназначена для связывания с антителом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аффинная группа предназначена для связывания с ферментом, фактором роста или структурным белком.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения аффинная группа, предназначенная для связывания с антителом, содержит белок A/G/L.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полипептид является таковым, как представлено в SEQ ID NO: 10.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенный полинуклеотид является таковым, как представлено в SEQ ID NO: 9.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая выделенный полинуклеотид и действующий в цис-положении регуляторный элемент для направления экспрессии полипептида в клетке растения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения конструкция нуклеиновой кислоты содержит дополнительную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере одну гликозидазу.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложены трансгенное растение или клетка растения, содержащие полинуклеотид конструкции нуклеиновой кислоты, описанный в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансгенное растение или клетка растения являются трансформированными для экспрессии во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения трансгенное растение или клетка растения характеризуются уменьшенным уровнем или активностью по меньшей мере одной гликозилтрансферазы по сравнению с растением или клеткой растения того же вида, экспрессирующими уровни дикого типа или демонстрирующими активность дикого типа по меньшей мере одной гликозилтрансферазы.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гликозилтрансфераза включает бета-(1,2)-ксилозилтрансферазу и/или альфа-(1,3)-фукозилтрансферазу.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ получения трансгенного растения или клетки растения, причем указанный способ включает экспрессию в растении или клетке растения по меньшей мере двух гликозидаз таким образом, что указанные по меньшей мере две гликозидазы совместно локализируются во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения экспрессия по меньшей мере двух гликозидаз включает:

(a) экспрессию первой гликозидазы по меньшей мере из двух гликозидаз во внутриклеточном ком-

партменте первого растения;

(b) экспрессию второй гликозидазы по меньшей мере из двух гликозидаз во внутриклеточном компартменте второго растения; и

(c) скрещивание первого растения и второго растения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения экспрессия по меньшей мере двух гликозидаз включает:

(i) введение в растение или клетку растения конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере две гликозидазы, причем каждая из по меньшей мере двух гликозидаз является слитой в результате трансляции с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения; или

(ii) введение в растение или клетку растения системы конструкций нуклеиновой кислоты, которая содержит:

первую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует первую гликозидазу;

вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует вторую гликозидазу,

причем каждая из первой гликозидазы и второй гликозидазы является слитой в результате трансляции с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ получения трансгенного растения или клетки растения, причем указанный способ включает экспрессию в растении или клетке растения по меньшей мере одной гликозидазы и аффинной группы к полипептиду, представляющему интерес, причем аффинная группа является слитой в результате трансляции с пептидом, связывающимся с клеточной стенкой.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложена система конструкций нуклеиновой кислоты, которая содержит:

(i) первую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере одну гликозидазу;

(ii) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аффинную группу к полипептиду, представляющему интерес, причем указанная аффинная группа является слитой в результате трансляции с пептидом, связывающимся с клеточной стенкой.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения экспрессия последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес, включает скрещивание:

(i) первого трансгенного растения, трансформированного для экспрессии по меньшей мере одной гликозидазы; и

(ii) второго трансгенного растения, трансформированного для экспрессии полипептида, представляющего интерес.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения первое растение трансформировано для экспрессии аффинной группы, слитой в результате трансляции с пептидом, связывающимся с клеточной стенкой, причем указанная аффинная группа предназначена для связывания с полипептидом, представляющим интерес.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере две гликозидазы, причем каждая из по меньшей мере двух гликозидаз является слитой в результате трансляции с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложена система конструкций нуклеиновой кислоты, которая содержит:

(i) первую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует первую гликозидазу по меньшей мере из двух гликозидаз;

(ii) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует вторую гликозидазу из по меньшей мере двух гликозидаз, причем каждая из первой гликозидазы и второй гликозидазы является слитой в результате трансляции с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой вакуолярный сигнальный пептид или апопластный сигнальный пептид.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сигнальный пептид представляет собой вакуолярный сигнальный пептид или апопластный сигнальный пептид, слитый на N-конце первой гликозидазы и второй гликозидазы.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложены трансгенное растение или клетка растения, трансформированные для экспрессии по меньшей мере двух гликозидаз во внутриклеточном компартменте посредством совместной локализации.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес, и по меньшей мере одну гликозидазу, причем как полипептид, представляющий интерес, так и по меньшей мере одна гликозидаза являются слитыми в результате трансляции с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложена система конструкций нуклеиновой кислоты, которая содержит:

(i) первую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес;

(ii) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует и по меньшей мере одну гликозидазу, причем каждая из по меньшей мере одной гликозидазы является слитой в результате трансляции с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует гликозидазу, слитую в результате трансляции с сигнальным пептидом для локализации во внутриклеточном компартменте, представляющем интерес.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность белка A/G/L, трансляционным способом слитую с гетерологичным трансмембранным доменом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения слияние трансляционным способом осуществляют посредством линкера.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложены трансгенное растение или клетка растения, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящей заявке.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ модификации профиля гликозилирования полипептида, представляющего интерес, в растении или клетке растения, причем указанный способ включает введение в растение или клетку растения конструкции нуклеиновой кислоты или системы конструкций нуклеиновой кислоты, описанных в настоящей заявке, посредством чего модифицируется профиль гликозилирования полипептида, представляющего интерес, в растении или клетке растения.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ получения полипептида, представляющего интерес, причем указанный способ включает:

(a) введение в растение или клетку растения конструкции нуклеиновой кислоты или системы конструкций нуклеиновой кислоты, описанных в настоящей заявке; и впоследствии

(b) выделение полипептида, представляющего интерес.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложены трансгенное растение или клетка растения, которые рекомбинантным способом экспрессируют:

(i) полипептид, представляющий интерес; и

(ii) по меньшей мере одну гликозидазу,

причем как полипептид, представляющий интерес, так и по меньшей мере одна гликозидаза являются слитыми в результате трансляции с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложены трансгенное растение или клетка растения, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты или систему конструкций нуклеиновой кислоты, описанные в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере две гликозидазы включают фукозидазу и ксилозидазу.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна гликозидаза выбрана из группы, состоящей из фукозидазы и ксилозидазы.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения внутриклеточный компартмент выбран из группы, состоящей из вакуоли, апопласта, эндоплазматического ретикулаума и комплекса Гольджи.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения внутриклеточный компартмент представляет собой вакуоль.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растение или клетка растения представляют собой растение или клетку растения табака.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка растения представляет собой клетку корня.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из вакуолярного нацеливающего сигнала, эндоплазматического нацеливающего сигнала, апопластного нацеливающего сигнала, митохондриального нацеливающего сигнала и пластидного нацеливающего сигнала.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растение или клетка растения, трансформированные для экспрессии во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы, также трансформированы для экспрессии во внутриклеточном компартменте дополнительной гликозидазы.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сигнальный пептид является слитым в результате трансляции с С-концом полипептида, представляющего интерес, или указанной гликозидазы.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложен выделенный полипептид, полученный согласно способу, описанному в настоящей заявке.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует гликозидазу, слитую в результате трансляции с сигнальным пептидом для локализации во внутриклеточном компартменте, представляющем интерес.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложены трансгенное растение или клетка растения, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, представляет собой полипептид человека.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, представляет собой лекарственный препарат.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, выбран из группы, состоящей из антитела, вакцины, фермента, фактора роста, гормона и структурного белка.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, представляет собой антитело или фрагмент антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой бевацизумаб или адалимумаб.

Согласно аспекту некоторых вариантов реализации настоящего изобретения предложено семя трансгенного растения, описанного в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения семя представляет собой гибридное семя.

Если не указано обратное, все технические и/или научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют те же значения, которые обычно понимаются средним специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что при реализации на практике или исследовании вариантов реализации настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные таковым, описанным в настоящей заявке, ниже описаны иллюстративные способы и/или материалы. В случае противоречий преимущество имеет описание изобретения, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для обязательного ограничения.

Краткое описание некоторых вариантов на чертежах

Некоторые варианты реализации настоящего изобретения описаны в настоящей заявке исключительно в качестве примера со ссылкой на прилагаемые чертежи. Теперь с конкретной ссылкой на подробные чертежи следует подчеркнуть, что представленные данные приведены в качестве примера и с целью иллюстративного обсуждения вариантов реализации настоящего изобретения. В связи с этим описание, приведенное с чертежами, делает очевидным для специалистов в данной области техники то, как варианты реализации настоящего изобретения можно реализовать на практике.

На чертежах фиг. 1А-В представляют собой схематические изображения, демонстрирующие клонирование легкой и тяжелой цепей Авастина и Хумиры в касете Rubisco-vas в векторе pUC18. Фиг. 1А - фрагменты ДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи MAT (моноклонального антитела) (SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7), и плазмиду pUC18, несущую касету экспрессии Rubisco-vas, разрежали рестрикционными ферментами MunI и NotI. Фиг. 1В - получали четыре различные плазмиды pUC18: pUC18 Rb-тяжелая цепь Хумиры, pUC18 Rb-легкая цепь Хумиры, pUC18 Rb-тяжелая цепь Авастина и pUC18 Rb-легкая цепь Авастина.

Фиг. 2А-С представляют собой схематические изображения клонирования плазмиды pBINPLUS-

Хумира, кодирующей легкую цепь и тяжелую цепь в одной плазмиде. Фиг. 2А - кассету Rubisco-vas с легкой цепью Хумира клонировали в векторе pBINPLUS с применением рестрикционного фермента HindIII. Фиг. 2В - кассету Rubisco-vas с тяжелой цепью Хумира клонировали в векторе pBINPLUS Rb-легкая цепь Хумира с применением ферментов EcoRI и SacI. Фиг. 2С - итоговая конструкция pBINPLUS Хумира.

Фиг. 3А-С представляют собой схематические изображения клонирования плазмиды pBINPLUS-Авастин, кодирующей легкую цепь и тяжелую цепь в одной плазмиде. Фиг. 3А - кассету Rubisco-vas с тяжелой цепью Авастина клонировали в векторе pBINPLUS с применением рестрикционного фермента HindIII. Фиг. 3В - кассету Rubisco-vas с легкой цепью Авастина клонировали в векторе pBINPLUS Rb-тяжелая цепь Авастина с применением ферментов EcoRI и SacI. Фиг. 3С - итоговая конструкция pBINPLUS Авастин.

Фиг. 4А-В представляют собой схематические изображения, демонстрирующие конструкцию двойной кассеты Хумира в pUC18. Фрагмент синтетической ДНК (SEQ ID NO: 25), содержащий терминатор Rubisco, вакуолярный SP1 (signal peptide, сигнальный пептид, SEQ ID NO: 18), тяжелую цепь Хумира (SEQ ID NO: 15), промотор Rubisco, вакуолярный SP2 (SEQ ID NO: 19) и легкую цепь Хумира (SEQ ID NO: 16), клонировали в кассете Rubisco с помощью ферментов NcoI и NotI в pUC18, получая двойную кассету с обеими цепями MAT.

Фиг. 5А-С представляют собой схематические изображения, демонстрирующие клонирование CBD-PrtA (целлюлозосвязывающий домен - белок А, SEQ ID NO: 9) в плазмиде pBINPLUS. Фиг. 5А - ДНК, содержащая промотор 35S, кодирующую область вакуолярного сигнала, CBD и белок А и терминатор Nos, клонировали в плазмиде pUC18. Фиг. 5В - кассету 35S с CBD-PrtA клонировали в плазмиде pBINPLUS с помощью фермента EcoRI и получали pBINPLUS CBD-PrtA (фиг. 5С).

Фиг. 6А-С представляют собой схематические изображения, демонстрирующие клонирование ксилозидазы и фукозидазы в плазмиде pBINPLUS. Фиг. 6А - ДНК, кодирующую ксилозидазу (2344 п.о., пар оснований, SEQ ID NO: 11) или фукозидазу (1564 и.о., SEQ ID NO: 13), разрежали рестрикционными ферментами MunI и NotI и клонировали в кассете 35S после того, как CBD-PrtA вырезали с применением тех же ферментов. Фиг. 6В - ксилозидазу или фукозидазу в кассете 35S клонировали в векторе pBINPLUS с применением рестрикционных ферментов SdaI и SacI. Фиг. 6С - конструировали две плазмиды: pBINPLUS ксилозидаза (15496 п.о.) и pBINPLUS фукозидаза (14716 п.о.).

Фиг. 7А-В представляют собой изображения, полученные в результате анализа методом вестерн-блоттинга, которые демонстрируют, что CBD-PrtA (SEQ ID NO: 10) экспрессируется в растениях табака. Фиг. 7А демонстрирует скрининг рекомбинантного табака методом вестерн-блоттинга с применением антитела против CBD. Фиг. 7В демонстрирует результаты слот-блоттинга: указанное количество коммерческой Хумира добавляли к осадку от 100 мг ткани табака ДТ (дикого типа) и табака, экспрессирующего CBD-PrtA. После того как осадок инкубировали и промывали несколько раз, антитело элюировали слабой кислотой и наносили на нитроцеллюлозную мембрану. МАТ обнаруживали с помощью антитела против IgG человека, меченного АФ (аллофикоцианином).

Фиг. 8 представляет собой столбчатую диаграмму, демонстрирующую активность гликозидаз, измеренную в растениях табака, экспрессирующих фукозидазу (левая часть) и ксилозидазу (правая часть). Продукт ферментативной реакции (4- метилумбеллиферон) измеряли при pH 10. Высвободившийся 4-метилумбеллиферон измеряли с применением длины волны возбуждения 355 нм и длины волны испускания 460 нм.

Фиг. 9 представляет собой изображение, демонстрирующее стабильную экспрессию и очистку адалимумаба, экспрессированного в апопласте растения табака.

Фиг. 10 представляет собой график, демонстрирующий анализ связывания адалимумаба, который был экспрессирован в апопласте растения табака и очищен из указанного растения, с ФНО (фактором некроза опухоли), методом ELISA.

Фиг. 11А-В представляют собой схематические изображения, демонстрирующие конструкцию кассет экспрессии, кодирующих легкую и тяжелую цепи указанных антител с апопластным сигнальным пептидом Cell1. Цепи МАТ (Авастин/Хумира) встраивали в кассету экспрессии, содержащую промотор Rubisco, сигнальный пептид Cell1 и терминатор Rubisco. Полученные в результате конструкции представляли собой: pBINPLUS-Rubisco-Cell1-тяжелая цепь Хумира, pBINPLUS-Rubisco-Cell1-легкая цепь Хумира, pBINPLUS-Rubisco-Cell1-тяжелая цепь Авастина, pBINPLUS-Rubisco-Cell1-легкая цепь Авастина. Кассетами с тяжелой и легкой цепью того же МАТ котрансформировали растения табака для получения экспрессии полного МАТ в апопласте.

Фиг. 12А-Д представляют собой схемы и результаты очистки с применением трансмембраносвязанного белка А, экспрессируемого на клеточной мембране клеток, экспрессирующих полипептид, представляющий интерес, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения.

Фиг. 13 демонстрирует отщепление ксилозы и фукозы в адалимумабе растительного происхождения. Сокращения: 2 ч, 3 ч и 4ч - продолжительность обработки в часах (2, 3 и 4 ч, соответственно); Н - необработанный адалимумаб; К - коммерческая Хумира. Для обнаружения использовали 3 различные группы антител: против ксилозы, против фукозы и против IgG человека.

Фиг. 14 демонстрирует результаты анализа методом вестернблоттинга, проведенного с использованием антител против IgG человека; наблюдаются полосы молекулярной массой приблизительно 55 кДа, соответствующие тяжелой цепи адалимумаба, и молекулярной массой приблизительно 25 кДа, соответствующие легкой цепи адалимумаба.

Фиг. 15 демонстрирует результаты анализа биологической активности адалимумаба растительного происхождения (plant derived adalimumab, PDA) *in vitro* методом ELISA, проведенного на предварительно сенсibilизированных ФНО α планшетах ELISA, которые инкубировали с адалимумабом растительного происхождения из 3 (1-3) различных линий трансгенных растений табака. Затем связывание МАТ с мишенью обнаруживали с применением антител против IgG человека, меченных ПХ (пероксидазой хрена). Средняя концентрация PDA показана в нг (МАТ)/мг (свежих листьев).

Фиг. 16 демонстрирует нейтрализацию ФНО α с применением PDA: проводили анализ коммерческой Хумиры (показана кружками, эталонное соединение) по сравнению с адалимумабом растительного происхождения (показан квадратами, исследуемое соединение). Биологическую активность нейтрализации рчФНО α исследовали на линии клеток L929.

Фиг. 17А-С демонстрируют результаты анализа методом ДСН-ПААГ (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и вестернблоттинга. Фиг. 17А - окрашивание антителом против белка А; фиг. 17В - окрашивание осадка антителом против IgG человека; фиг. 17С - окрашивание растворимой фракции антителом против IgG человека. Комм. - контроль, коммерческая Хумира; PDA - адалимумаб растительного происхождения. Подготовку образца проводили в 2 различных буферах: в буфере для связывания и буфере для измельчения.

Фиг. 18А-Д демонстрируют клонирование РНКи (РНК-интерференции) GMD (ГДФ-маннозо-4,6-дегидратазы) в плазмиде pUC18. Фиг. 18А - плазида pUC18, содержащая промотор 35S, сигнальный пептид Cell1, вставку гена, которая будет заменена ДНК, кодирующей РНКи GMD, и терминатор Nos; фиг. 18В - Этап 1: ДНК, кодирующую антисмысловую цепь GMD (423 п.о.), встраивали посредством разрезания рестрикционными ферментами NotI и BamHI; фиг. 18С - Этап 2: ДНК, кодирующую интрон β -ксилозотрансферазы (ХуIT) (242 п.о.), встраивали посредством разрезания рестрикционными ферментами BamHI и MfeI; фиг. 18D - Этап 3: ДНК, кодирующую смысловую цепь GMD (442 п.о.), встраивали посредством разрезания рестрикционными ферментами MfeI и NcoI.

Фиг. 19А-В демонстрируют клонирование РНКи GMD. Фиг. 19А: вектор pBINPLUS; кассету 35S РНКи GMD (1747 п.о.) клонировали с применением рестрикционных ферментов HindII и SacI с получением фиг. 19В: плазида pBIN 35S GMD РНКи (14094 п.о.).

Фиг. 20А-Д демонстрируют клонирование ХуIT в плазмиде pBINPLUS. Фиг. 20А, плазида pUC18: промотор RUBISCO, сигнальный пептид Cell1, ДНК, кодирующая тяжелую цепь адалимумаба, и терминатор RUBISCO; фиг. 20В, замещение ДНК, кодирующей тяжелую цепь адалимумаба (1362 п.о.), ХуIT (617 п.о.) с применением рестрикционных ферментов NcoI и NotI; фиг. 20С, плазида pBINPLUS; фиг. 20D, кассету RUBISCO ХуIT (2569 п.о.) клонировали в векторе pBINPLUS с применением рестрикционного фермента HindII с получением плазмиды pBINPLUS RUBISCO ХуIT (14965 п.о.).

Описание конкретных вариантов реализации настоящего изобретения

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к композициям и способам получения полипептидов с модифицированным профилем гликозилирования в клетках растений.

Перед подробным объяснением по меньшей мере одного варианта реализации настоящего изобретения следует отметить, что настоящее изобретение не обязательно ограничено в его применении данными, изложенными в нижеследующем описании или проиллюстрированными примерами. Настоящее изобретение предполагает возможность других вариантов реализации или реализации на практике либо осуществления различными способами.

Растения являются перспективными хозяевами для получения рекомбинантных лекарственных препаратов благодаря отсутствию риска вирусной инфекции животного происхождения и экономической эффективности производства биофармацевтической продукции. Высшие растения обладают путями N-гликозилирования, аналогичными путям млекопитающих и, главным образом, нарабатывают гликаны комплексного типа с остатком α -1,3 фукозы, присоединенным к самому внутреннему GlcNAc, и с остатком β -1,2 ксилозы, присоединенным к соединяющей маннозе триманнозильного кора, ни один из которых не обнаружен у людей. Иммуногенность гликозилирования, отличного от гликозилирования человека, - α -1,3 фукозилирования и β -1,2 ксилозилирования, - вызывает беспокойство регуляторных органов.

Вследствие этого ключевой целью для успешной разработки терапевтических средств нового поколения стало создание применимого в промышленности процесса получения белка, который обеспечивал бы постоянные выходы полностью нефукозилированных и/или нексилозилированных белковых терапевтических препаратов стабильного качества.

На сегодняшний день авторы настоящего изобретения предлагают новую платформу для получения белка в клетках растений, в которой рекомбинантный полипептид, представляющий интерес, экспресси-

руется таким образом, что данный полипептид является совместно локализованным с по меньшей мере одной гликозидазой во внутриклеточном компартменте клетки растения. Полипептид, полученный таким способом, не несет α -1,3 фукозу или β -1,2 ксилозу на N-гликанах. Процесс является простым и экономически эффективным, поскольку не требует послепроизводственной обработки посредством воздействия на экспрессированный полипептид ферментативного процессинга *in vitro*. Следующее преимущество данного процесса заключается в его направленном характере, иными словами, механизмы гликозилирования растения не подвергаются воздействию, и, вследствие этого, мощность и жизнеспособность растений не нарушаются.

Как проиллюстрировано в настоящей заявке ниже и в нижеследующем разделе примеров, авторы настоящего изобретения внедрили данную платформу для получения двух одобренных Управлением по контролю над качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США моноклональных антител: Авастина® (бевацизумаба) и Хумиры® (адалимумаба). Авторы настоящего изобретения коэкспрессировали данные антитела в вакуоли или апопласте табака посредством совместной локализации с экспрессированными рекомбинантным способом ксилозидазой и фукозидазой и продемонстрировали увеличенные уровни гликозидазной активности в данных растениях.

В частности, количественное определение нацеленного в апопласт адалимумаба, также называемого в настоящей заявке специфичной конфигурацией адалимумаба растительного происхождения (PDA), которое проводили методом ELISA, продемонстрировало, что было получено 4,9 мг PDA/кг листьев. Обе субъединицы тяжелой и легкой цепи антитела были обнаружены методом вестернблоттинга (ВВ) при правильном соотношении. Растения представляли собой поколение F1 трансформированного растения, и, как ожидается, в результате гомозиготизации выходы будут, по существу, увеличены.

Очистка адалимумаба растительного происхождения из двойного трансгенного растения, экспрессирующего оба белка, на основе CBD-белка А зарекомендовала себя как практически возможная. Были установлены подходящие условия реакции, при которых CBD связывается с целлюлозой, а белок А связывается с Fc-областью антитела. Вследствие этого антитело эффективно поддерживается в нерастворимой фракции, содержащей целлюлозу, сразу после стадии измельчения ткани растения. Связывание является достаточно сильным для того, чтобы обеспечить возможность вымывания белка, связанного с нерастворимой фракцией, без потерь.

Экспрессия рекомбинантной фукозидазы и ксилозидазы позволила успешно удалить остатки ксилозы и фукозы из рекомбинантного антитела, например, адалимумаба. Увеличенное снижение концентрации Fuc и Xyl наблюдалось при совместном использовании ксилозидазы и фукозидазы.

В целом, значительных различий между исследуемым антителом (адалимумабом) и эталонным антителом (Хумирой) обнаружено не было. Анализ активности адалимумаба продемонстрировал, что до концентрации 62,5 нг/мл клетки, защищенные Хумирой, были незначительно более жизнеспособными, чем клетки, защищенные PDA (незначимо). Впоследствии, когда концентрации увеличивали до 125, а затем до 250 нг/мл, адалимумаб растительного происхождения, как оказалось, обеспечил получение лучших результатов.

Таким образом, согласно аспекту настоящего изобретения предложен способ модификации профиля гликозилирования полипептида, представляющего интерес, в растении или клетке растения, причем указанный способ включает экспрессию в растении или клетке растения, трансформированных для экспрессии во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы, последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес, таким образом, что указанные по меньшей мере одна гликозидаза и полипептид, представляющий интерес, являются совместно локализованными в указанном внутриклеточном компартменте растения или клетки растения, в результате чего модифицируется профиль гликозилирования полипептида, представляющего интерес, в растении или клетке растения.

В настоящей заявке термин "модификация" означает изменение природного посттрансляционного (*in vivo*) гликозилирования полипептида по сравнению с тем же полипептидом, экспрессированным в клетке растения, которая содержит путь гликозилирования дикого типа.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения модификация означает уменьшение или полное устранение по меньшей мере одного вида гликозида, например, β -1,2-присоединенной ксилозы (Xyl) или α -1,3-присоединенной коровой фукозы (Fuc). Уменьшение вида гликозида означает по меньшей мере устранение на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или даже 100% (т.е. полное устранение) вида гликозида из полипептида, представляющего интерес, после экспрессии *in vivo*, описанной в настоящей заявке.

В настоящей заявке термин "гликозид" означает любое соединение, содержащее молекулу углевода (сахар), в частности, любой такой природный продукт в растениях, который в результате гидролитического расщепления преобразуется в сахар и компонент, отличный от сахара.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гликозид содержит β -1,2-связанную ксилозу (Xyl) или α -1,3-связанную коровую фукозу (Fuc).

Таким образом, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения модификация

профиля гликозилирования приводит к получению полипептида, в котором отсутствует Fuc или Xyl, также называемого нефукозилированным или нексилозилированным полипептидом, соответственно.

Согласно другому конкретному варианту реализации настоящего изобретения модификация профиля гликозилирования приводит к получению полипептида, в котором отсутствует Fuc и Xyl, также называемого нефукозилированным и нексилозилированным полипептидом, соответственно.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модификация может также включать посттрансляционный процессинг полипептида для введения видов гликозида, которые отсутствуют в клетках растений, таких как характерный комплекс N-гликанов, содержащий галактозу (Gal) и сиаловую кислоту (N-ацетилнейраминавая кислота- α -2-6/3Gal β 1-4).

"Профиль гликозилирования" означает один (например, Fuc) или множество видов гликозидов (например, Fuc, Xyl и необязательно сиаловую кислоту или галактозу), а также относительное изобилие данных видов в полипептиде или препарате полипептида.

Термин "растение" в настоящей заявке охватывает целые растения, предков и потомков растений, а также части растений, в том числе семена, побеги, стебли, корни (включая клубневые и корневые запасы), а также клетки, ткани и органы растений. Растение может находиться в любой форме, включая сус-пензионные культуры, зародыши,

Acacia spp., *Acer* spp., *Actinidia*

spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* spp., *Arachis* spp, *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorrhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* spp, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens*, *Chacoomeles* spp., *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colophospermum mopane*, *Coronillia varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*, *Dibeteropogon amplectens*, *Dioclea* spp, *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehraffia* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrestis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalypfus* spp., *Euclea schimperii*, *Eulalia villosa*, *Pagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp, *Freycinetia banksli*, *Geranium thunbergii*, *Ginkgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp, *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma*, *Hedysarum* spp., *Hemaffhia altissima*, *Heteropogon contoffus*, *Hordeum vulgare*, *Hyparrhenia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hypeffhelia dissolute*, *Indigo incamata*, *Iris* spp., *Leptarrhena pyrolifolia*, *Lespediza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Loudetia simplex*, *Lotonus bainesli*, *Lotus* spp., *Macrotyloma axillare*, *Malus* spp., *Manihot esculenta*, *Medicago saliva*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Musa sapientum*, *Nicotianum* spp., *Onobrychis* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp., *Peltophorum africanum*, *Pennisetum* spp., *Persea gratissima*, *Petunia* spp., *Phaseolus* spp., *Phoenix canadensis*, *Phormium cookianum*, *Photinia* spp., *Picea glauca*, *Pinus* spp., *Pisum sativum*, *Podocarpus totara*, *Pogonarthria fleckii*, *Pogonaffhria squarrosa*, *Populus* spp., *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Rhaphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis sapida*, *Rhus natalensis*, *Ribes grossularia*, *Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia*, *Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum*, *Sciadopitys vefficillata*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Sporobolus fimbriatus*, *Stiburus alopecuroides*, *Stylosanthos humilis*, *Tadehagi* spp, *Taxodium distichum*, *Themeda triandra*, *Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tsuga heterophylla*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp.,

Vitis vinifera, *Watsonia pyramidata*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zea mays*,

меристемные области, ткань каллуса, листья, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры. Растения, которые являются в особенности пригодными в способах согласно настоящему изобретению, включают все растения, принадлежащие к суперсемейству Viridiplantae, в частности, однодольные и двудольные растения, включая кормовые или фуражные бобовые, декоративные растения, продовольст-

венные культуры, деревья или кустарники, которые выбраны из перечня, состоящего из амаранта, артишока, спаржи, брокколи, брюссельской капусты, капусты, канолы, моркови, цветной капусты, сельдерея, листовой капусты, льна, кормовой капусты, чечевицы, масличного рапса, окры, лука, картофеля, риса, сои, соломы, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, томатов, чая, деревьев. В качестве альтернативы, в способах согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно использовать водоросли и другие растения, отличные от Viridiplantae.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения растение или клетка растения представляют собой растение или клетку растения табака (например, *N. tabacum* и *N. benthamiana*).

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения клетка растения представляет собой клетку корня, такую как клетка, которая выбрана из группы, состоящей из: клетки корня, клетки сельдерея, клетки имбиря, клетки хрена и клетки моркови, трансформированных *Agrobacterium* *rhizogenes*.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения растение или клетка растения представляют собой растение или клетку растения ряски (например, *Lemna*).

Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения растение или клетка растения представляют собой растение или клетку растения маиса, люцерны, арабидопсиса, томата, листовой капусты, салата, табака, сои, риса и картофеля.

В настоящей заявке термин "гликозидаза" означает фермент, который расщепляет O-, S- или N-связанные гликозильные соединения, например, EC 3.2.1, например, маннозидазу, фукозидазу и ксилозидазу.

Фермент может являться существующим в природе (например, растительного, бактериального или грибкового происхождения) или синтетическим.

В настоящей заявке термин "фукозидаза" означает EC 3.2.1.111 1,3- α -L-фукозидазу.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения альфа-1,3/4-фукозидаза [*Streptomyces* sp.] представляет собой последовательность согласно идентификационному номеру: gbIAAD 10477.11 (SEQ ID NO: 13, 14).

В настоящей заявке термин "ксилозидаза" означает бета-(1-2) ксилозидазу (β -D-ксиланксило-гидролаза, EC 3.2.1.37), которая расщепляет ксилозу, связанную β (1-2)-гликозидной связью. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения фермент представляет собой экзо-1,4-бета-ксилозидазу xlnD [*Aspergillus niger* CBS 513.88], последовательность согласно идентификационному номеру: ref|XP_001389416.11 (SEQ ID NO: 11, 12).

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения клетка растения является трансформированной по меньшей мере одной гликозидазой (например, по меньшей мере двумя гликозидазами, т.е. неидентичными гликозидазами, причем каждая гликозидаза направлена на различные гликозильные соединения, например, α -1,3 Fuc и β -1,2 Xyl).

Таким образом, согласно аспекту настоящего изобретения предложен способ получения трансгенного растения или клетки растения, причем указанный способ включает экспрессию в растении или клетке растения во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы или по меньшей мере двух гликозидаз, причем в последнем случае по меньшей мере две гликозидазы являются совместно локализованными во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

В настоящей заявке термин "внутриклеточный компартмент клетки растения" означает любую ограниченную область клетки, в которой может накапливаться полипептид, представляющий интерес, например, в качестве конечного продукта. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения внутриклеточный компартмент относится к системе внутренних мембран. Примеры внутриклеточных компартментов включают, но не ограничены указанными, вакуоль, апопласт, эндоплазматический ретикулум (ЭР), комплекс Гольджи, белковые тельца, образованные из ЭР и вакуоли, а также масляные тельца. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения белки накапливаются во внутриклеточной органелле после посттрансляционного процессинга (например, в случае апопласта, масляных телец) или одновременно с посттрансляционным процессингом, т.е. гликозилированием (например, в случае ЭР, комплекса Гольджи и вакуоли).

Следует отметить, что выбор внутриклеточного компартмента в значительной степени зависит от типа полипептида и активности конечного продукта.

Например, для получения коллагена человека в клетках растений требуется гидроксирование пролинов ферментом человека для обеспечения активности конечного продукта. В публикации WO2006/035442 описана коэкспрессия коллагена и пролил-4-гидроксилазы (P4H) во внутриклеточном компартменте, таком как вакуоль или апопласт. В данном случае гликозидазу (например, фукозидазу и/или ксилозидазу) также экспрессируют в вакуоли или апопласте, чтобы обеспечить совместную локализацию с экспрессированным коллагеном.

В альтернативном примере оканчивающиеся маннозой гликаны, как полагают, являются доминирующими комплексными гликанами вакуолярных гликопротеинов и считаются подходящими для активности лизосомальных белков, которые облегчают улучшенное поглощение и лизосомальную доставку

белков, вводимых пациентам (см., например, публикацию WO 2004/096978). В данном случае гликозидазу (например, фукозидазу и/или ксилозидазу) также экспрессируют в вакуоли, чтобы обеспечить совместную локализацию с экспрессированным полипептидом (например, обогащенным маннозой белком, например, лизосомальным белком).

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения накопления гликозидазы (и полипептида, представляющего интерес, далее называемых "белки") во внутриклеточном компартменте достигают посредством введения сигнальной последовательности для нацеливания экспрессированного белка во внутриклеточный компартмент, такой как вакуоль, эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, митохондрия и апопласт.

Сигнальный пептид, сигнальная последовательность, последовательность локализации или последовательность сортировки (термины используются взаимозаменяемо) представляет собой нуклеотидную последовательность, которая транслируется с получением аминокислотной последовательности, используемой клеткой для нацеливания белка или полипептида, представляющего интерес, для размещения данного белка в конкретном местоположении в пределах или за пределами эукариотической клетки. В данной области техники известно множество сигнальных последовательностей. См., например, публикации Becker et al., *Plant Mol. Biol.* 20:49 (1992), Close, P. S., Master's Thesis, Iowa State University (1993), Knox, C., et al., "Structure and Organization of Two Divergent Alpha-Amylase Genes from Barley", *Plant Mol. Biol.* 9:3-17 (1987), Lerner et al., *Plant Physiol.* 91:124-129 (1989), Fontes et al., *Plant Cell* 3:483-496 (1991), Matsuoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:834 (1991), Gould et al., *J. Cell. Biol.* 108:1657 (1989), Creissen et al., *Plant J.* 2:129 (1991), Kalderon, et al., A short amino acid sequence able to specify nuclear location, *Cell* 39:499-509 (1984), Steifel, et al., Expression of a maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular differentiation, *Plant Cell* 2:785-793 (1990).

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения сигнальная последовательность является гетерологичной в отношении белка.

В настоящей заявке "слияние трансляционным способом" означает слияние в рамке считывания последовательности или последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют нацеливающую последовательность, и последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок (т.е. гликозидазу или полипептид, представляющий интерес), таким образом, что экспрессируется единый полипептид, который содержит как нацеливающую последовательность (последовательности), так и белок. Слияние в рамке считывания может представлять собой непосредственное слияние или слияние посредством линкера (т.е. посредством последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотный линкер). Линкер и/или сигнальный пептид могут являться отщепляемыми.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения белки (например, гликозидаза (гликозидазы) и полипептид, представляющий интерес) экспрессируются в эндомембранной системе, которая включает эндоплазматический ретикулум (ЭР), вакуоль и белковые тельца, образованные в ЭР или вакуолях.

Для экспрессии в эндомембранной системе белки содержат (в результате слияния трансляционным способом) N-концевой сигнальный пептид, который является критически важным для поступления секретированных белков и всех белков просвета, которые впоследствии направляются в различные эндомембранные компартменты. N-концевые сигнальные пептиды являются, как правило, взаимозаменяемыми. Данный сигнал представляет собой не определенную последовательность, а паттерн или мотив, который, как правило, содержит один или несколько положительно заряженных остатков аминокислот на N-конце, за которыми следует фрагмент из 6 - 12 гидрофобных аминокислот и сайт расщепления. Данный сигнальный пептид, как правило, составляет 20 - 30 аминокислот в длину. Инструменты прогнозирования и базы данных сигнальных пептидов являются общедоступными по электронному адресу: www.cbs.dtu.dk/services/SignalP; ссылки, приведенные по электронному адресу: www.signalpeptide.de/index.php?m=links, можно использовать для определения предполагаемых сигнальных пептидов и сайта отщепления сигнального пептида.

Для экспрессии гетерологичных белков, в данном случае, например, полипептида, представляющего интерес, и гликозидазы, часто используют сигнальные пептиды (SP), специфичные к растениям. Общепринятые сигнальные последовательности растений включают сигнальные пептиды экстенсина, PR-S и осмотина табака, SP α -амилазы ячменя и SP пататина картофеля.

Во многих случаях сигнальный пептид гетерологичного белка (например, полипептида человека, представляющего интерес), эффективно направляет белок в ЭР растения и распознается сигнальной пептидазой растения для образования правильного N-конца зрелого продукта, наблюдаемого в нативном организме, такого как ИЛ-2, интерферон β и β -казеин человека; фитаза грибов; и ксиланаза. Однако экспрессию во внутриклеточной локализации, представляющей интерес, можно усилить посредством применения сигнального пептида растения.

Накопление в ЭР.

Для удержания белков в ЭР, как правило, необходим специфичный белковый мотив.

Примеры последовательностей включают наиболее широко используемый мотив, KDEL, SEKDEL

или HDEL, все из которых представляют собой мотивы удержания в ЭР. Белки, содержащие С-концевой KDEL или HDEL, взаимодействуют с рецептором KDEL, трансмембранным белком, который выполняет функцию при переносе везикул, главным образом, между ЭР и комплексом Гольджи.

Накопление в белковых тельцах (БТ), образованных в ЭР.

Белки, направленные в ЭР, могут либо удерживаться в ЭР, либо отпочковываться в отдельные органеллы. Белки, которые хранятся в образованных в ЭР БТ, по сравнению с БТ, образованными в вакуоли, отличаются составом своих гликанов (прохождение через комплекс Гольджи облегчает процессинг N-гликанов с высоким содержанием маннозы с получением комплексных гликанов).

Примеры сигналов для БТ, образованных в ЭР, включают обогащенный пролином N-концевой домен у-зеина (запасного белка маиса), содержащий последовательность с высоким содержанием повторов (VHLPPP)_n, которая образует амфипатическую полипролиновую спираль и является критически важной для агрегации белка зеина в мембране ЭР (Kogan et al., 2001, J. Mol. Biol. 312:907-913). В публикации Mainieri et al. (2004) Plant Physiol. 136:3447-3456 продемонстрировано, что слияние с 89 остатками аминокислот у-зеина является достаточным, чтобы опосредовать сборку целевого белка в БТ. Синтетическая последовательность, состоящая из (PPPVHL)₈, была разработана в качестве нацеливающей метки (названной Zera®) для облегчения сборки и восстановления рекомбинантных белков (Torrent et al., 2009 BMC Biology 7, 5).

Накопление в вакуоли или в белковых тельцах (БТ), образованных в вакуоли.

Для вакуолярного нацеливания белка, который кодируется ядерным геном, требуется двойной нацеливающий сигнал. Сначала необходима сигнальная последовательность ЭР (описанная выше) для поступления в эндомембранную систему. Второй сигнал становится активным после того, как белок продвинулся через сеть ЭР и комплекса Гольджи, из которого данный белок переносится в везикулах в вакуоль. Рецепторы к данным последовательностям обеспечивают возможность связывания и доставки в органеллу. Сигналы вакуолярного нацеливания определены менее четко по сравнению с N-концевыми сигнальными пептидами ЭР и были обнаружены на С-конце (С-концевой пропептид, C-terminal pro-peptide, СТРР; например, лектин ячменя, фазеолин, хитиназа табака) и в N-концевой области "зрелого" белка (N-концевой пропептид, N-terminal pro-peptide, НТРР, расположенный непосредственно выше сигнальной последовательности ЭР; например, спорамин, алеураин); также были обнаружены внутренние домены, направляющие вакуолярное нацеливание (например, фитогемагглютинин, легумин, рицин). НТРР и СТРР, как правило, удаляются протеазами в вакуоли. В некоторых случаях (например, токсины растения А-В, такие как рицин и абрин) внутренние вакуолярные нацеливающие последовательности также удаляются в вакуоли в ходе процессинга белка. Было показано, что все три типа сигналов вакуолярного нацеливания (С, N и внутренний) являются необходимыми и достаточными для сортировки модельных белков из пути секреции по умолчанию в вакуоль.

Накопление в апопласте.

Секреция представляет собой путь по умолчанию эндомембранной системы растения, и без добавления специфичных сигналов сортировки или удержания белки (например, по меньшей мере одна гликозидаза и полипептид, представляющий интерес) секретируются во внеклеточное пространство и, как правило, накапливаются в апопласте - области между плазматической мембраной и клеточной стенкой. Поскольку диффузия через матрикс клетки ограничена размером, данную стратегию используют, когда полипептид, представляющий интерес, является достаточно большим, чтобы не диффундировать из клеточной стенки. В качестве альтернативы или дополнительно, полипептид, представляющий интерес, и необязательно глюкозидаза иммобилизованы в апопласте или на клеточной стенке посредством гетерологичного полипептида, экспрессированного в клетке растения, который содержит пептид, связывающийся с клеточной стенкой, трансляционным способом слитый с гетерологичной аффинной группой.

Накопление в клеточной стенке.

Для накопления в клеточной стенке как полипептид, представляющий интерес, так и по меньшей мере одна гликозидаза могут быть экспрессированы посредством слияния трансляционным способом с целлюлозосвязывающим доменом pfam00942: CBM_3.

Накопление в масляных тельцах.

Масляные тельца представляют собой органеллы, которые содержат масла (например, триглицериды) в однослойной фосфолипидной мембране, содержащей в высокой степени гидрофобный белок олеозин. Гетерологичные белки были экспрессированы в качестве слияний с олеозином. Олеозины, низкомолекулярные полипептиды (молекулярной массой 16-24 кДа), состоят из гидрофобного домена, фланкированного двумя гидрофильными доменами. Олеозины изначально нацелены на мембраны ЭР, несмотря на то, что оба С- и N-конца данных белков остаются в цитозоле, и белки впоследствии переносятся в масляные тельца. Таким образом, слитый полипептид, представляющий интерес, и гликозидаза по существу покрывают масляные тельца и размещаются на поверхности цитозоля. Для обеспечения возможности посттрансляционных модификаций нацеливание белка, представляющего интерес, и гликозидазы осуществляют посредством эндомембранных систем, например, также посредством домена возвращения в ЭР, а затем - возвращения белка на поверхности маслянистых телец посредством связывания с одноцепочечным антителом против олеозина (scFv). Таким образом, продукт переносится и накапливается в

эндоплазматической системе для посттрансляционного процессинга, но связывается с маслянистыми тельцами после разрушения клетки, что обеспечивает преимущества флотационного центрифугирования на основе маслянистых телец и сочетает преимущества обеих систем.

Конкретные варианты реализации подходов сортировки, которые можно использовать в соответствии с принципами настоящего изобретения, обобщены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Целевая органелла	Расположение в белке (например, в полипептиде, представляющем интерес, и/или глюкозидазе)	Природа сигнала	Сигнал удаляется
Эндоплазматическая система (просвет)	N-конец	1 – 3 основных АК, за которыми следуют 6 – 12 гидрофобных АК	Да
Удержание в ЭР	C-конец	KDEL; HDEL; SEKDEL	Нет
Вакуоль	N-конец	NPR-консервативный домен	Да
	C-конец	Консенсусная последовательность не выявлена	Да
	Внутренний	Консенсусная последовательность не выявлена	Варьирует

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения для экспрессии в клеточной стенке используют сигнальную последовательность альфа-амилазы ячменя (Rogers, J. C. 1985. Two barley alpha-amylase gene families are regulated differently in aleurone cells. *J. Biol. Chem.* 260: 3731-3738).

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения сигнальный пептид для секрети в апопласт представляет собой сигнальный пептид cel-1 (SEQ ID NO: 21, 22).

Нацеливание фермента в вакуоль представляет собой другой вариант реализации настоящего изобретения. Сигнальные последовательности для реализации данного подхода хорошо известны. Например, Raikhel в патенте США № 5,360,726 демонстрирует вакуолярную сигнальную последовательность, равно как и Warren et al. в патенте США № 5,889,174. Сигналы вакуолярного нацеливания могут присутствовать в аминоконцевой части (Holwerda et al., *The Plant Cell*, 4:307-318 (1992), Nakamura et al., *Plant Physiol.*, 101:1-5(1993)), в карбоксиконцевой части или во внутренней последовательности нацеливаемого белка. (Tague et al., *The Plant Cell*, 4:307-318 (1992), Saalbach et al. *The Plant Cell*, 3:695-708 (1991)). Дополнительно, аминоконцевые последовательности в сочетании с карбоксиконцевыми последовательностями отвечают за вакуолярное нацеливание продуктов генов (Shinshi et al. *Plant Molec. Biol.* 14:357-368 (1990)).

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения сигнальный пептид для вакуолярного накопления представляет собой SP (SEQ ID NO: 20), который кодируется SP (SEQ ID NO: 17), SP1 (SEQ ID NO: 18) или SP2 (SEQ ID NO: 19), как описано в публикации Wei et al. (2004) *Plant Biotechnol. J. Fluorescent Screening of Transgenic Arabidopsis Seeds without Germination Plant Physiol Plant Physiol.* Jun 2004; 135(2): 709-714. В данной статье упоминается сигнальный пептид Cell1.

С целью оптимизации выхода продукции для первичной оценки стратегий производства исследовали множество SP. При применении в фармацевтике часто требуется точное отщепление сигнального пептида вне зависимости от того, являются ли источником данного пептида животные, грибы или растения, которое, как правило, подтверждают посредством N-концевого секвенирования конечного очищенного продукта.

В настоящей заявке термин "полипептид, представляющий интерес", означает по меньшей мере один (например, 2, 3, 4, более) рекомбинантный полипептид, модифицированное гликозилирование которого имеет ценность. Такой полипептид можно широко использовать в исследовательском и промышленном применении, например, для получения терапевтических средств, вакцин, диагностических средств, в совокупности называемых лекарственными препаратами, и во многих других применениях,

представляющих интерес.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, представляет собой мультимерный белок, например, коллаген, или антитело (т.е. тяжелую цепь и легкую цепь).

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, представляет собой полипептид человека.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, представляет собой существующий в природе полипептид.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, представляет собой синтетический полипептид.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, представляет собой химерный полипептид.

Полипептид, представляющий интерес, может являться эндогенным или экзогенным по отношению к клетке растения. Полипептиды могут представлять собой внутриклеточные полипептиды (например, цитозольный белок), трансмембранные полипептиды или секретируемые полипептиды.

Примеры терапевтических белков, которые можно получить посредством применения заявленных композиций и способов, включают, но не ограничены указанными, гормоны человека (например, инсулин, гормон роста, инсулиноподобный фактор роста 1, фолликулостимулирующий гормон и хорионический гонадотропин), гематопоэтические белки (например, эритропоэтин, Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и ИЛ-11), тромботические и гематостатические белки (например, активатор тканевого плазминогена и активированный белок С), иммунологические белки (например, интерлейкин), антитела и другие ферменты (например, дезоксирибонуклеаза I). Примеры вакцин, которые можно получить посредством применения заявленных композиций и способов, включают, но не ограничены указанными, вакцины против различных вирусов гриппа (например, типов А, В и С и различных серотипов каждого типа, таких как H5N2, H1N1, H3N2 в случае вирусов гриппа типа А), ВИЧ, вирусов гепатита (например, гепатита А, В, С или D), болезни Лайма и вируса папилломы человека (ВПЧ). Примеры полученных гетерологичным способом диагностических средств на основе белка включают, но не ограничены указанными, секретин, тиреостимулирующий гормон (ТСГ), антигены ВИЧ и антигены гепатита С.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения примеры полипептида, представляющего интерес, включают, но не ограничены указанными, цитокины, хемокины, лимфокины, лиганды, рецепторы, гормоны, ферменты, структурные белки, антитела и фрагменты антител, а также факторы роста. Неограничивающие примеры рецепторов включают рецептор ФНО типа I, рецептор ИЛ-1 типа II, антагонист рецептора ИЛ-1, рецептор ИЛ-4 и любые растворимые рецепторы, модифицированные химическим или генетическим способом. Примеры ферментов включают ацетилхолинэстеразу, лактазу, активированный белок С, фактор VII, коллагеназу (например, поставляемую на рынок компанией Advance Biofactures Corporation под названием Сантил; агалсидазу бета (например, поставляемую на рынок компанией Genzyme под названием Фабразим); дорназу альфа (например, поставляемую на рынок компанией Genentech под названием Пульмозим); алтеплазу (например, поставляемую на рынок компанией Genentech под названием Активаз); пегилированную аспарагиназу (например, поставляемую на рынок компанией Enzon под названием Онкаспар); аспарагиназу (например, поставляемую на рынок компанией Merck под названием Элспар); и имиглюцеразу (например, поставляемую на рынок компанией Genzyme под названием Цередаза). Примеры конкретных полипептидов или белков включают, но не ограничены указанными, гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ), колониестимулирующий фактор (КСФ), интерферон бета (ИФН бета), интерферон гамма (ИФН гамма), фактор, индуцирующий интерферон гамма, I (ФИИГ), трансформирующий фактор роста бета (ТФР бета), RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and presumably secreted, хемокин, регулируемый при активации, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками), макрофагальные воспалительные белки (например, MIP-1 альфа и MIP-1 бета), фактор инициации элонгации Leishmania (Leishmania elongation initiating factor, LEIF), фактор роста тромбоцитов (ФРТ), фактор некроза опухоли (ФНО), факторы роста, например, эпидермальный фактор роста (ЭФР), фактор роста сосудистого эндотелия (ФРСЭ), фактор роста фибробластов (ФРФ), фактор роста нервов (ФРН), нейротрофический фактор головного мозга (НТФГМ), нейротрофин-2 (НТ-2), нейротрофин-3 (НТ-3), нейротрофин-4 (НТ-4), нейротрофин-5 (НТ-5), глиальный нейротрофический фактор (ГНТФ), цилиарный нейротрофический фактор (ЦНТФ), рецептор ФНО альфа типа II, эритропоэтин (ЕРО), инсулин и растворимые гликопротеины, например, гликопротеины gp120 и gp160. Гликопротеин gp120 представляет собой белок оболочки вируса иммунодефицита человека (WIV, whole inactivated virus, инактивированный цельный вирус), а гликопротеин gp160 представляет собой известный предшественник гликопротеина gp120. Другие примеры включают секретин, несиририд (натрийуретический пептид человека В-типа (human B-type natriuretic peptide, hBNP)) и GYP-I.

Другие продукты могут включать рецепторы, сопряженные с G-белком, в том числе, но не ограни-

чиваясь указанными, родопсиноподобные рецепторы класса А, такие как мускариновый (муск.) ацетилхолиновый рецептор позвоночных типа 1, муск. ацетилхолиновый рецептор позвоночных типа 2, муск. ацетилхолиновый рецептор позвоночных типа 3, муск. ацетилхолиновый рецептор позвоночных типа 4; адренорецепторы (альфа-адренорецепторы типа 1, альфа-адренорецепторы типа 2, бета-адренорецепторы типа 1, бета-адренорецепторы типа 2, бета-адренорецепторы типа 3), дофаминовый рецептор позвоночных типа 1, дофаминовый рецептор позвоночных типа 2, дофаминовый рецептор позвоночных типа 3, дофаминовый рецептор позвоночных типа 4, гистаминовый рецептор типа 1, гистаминовый рецептор типа 2, гистаминовый рецептор типа 3, гистаминовый рецептор типа 4, серотониновый рецептор типа 1, серотониновый рецептор типа 2, серотониновый рецептор типа 3, серотониновый рецептор типа 4, серотониновый рецептор типа 5, серотониновый рецептор типа 6, серотониновый рецептор типа 7, серотониновый рецептор типа 8, серотониновые рецепторы других типов, рецепторы следовых аминов, рецептор ангиотензина типа 1, рецептор ангиотензина типа 2, рецептор бомбезина, брадикфина, анафилатоксина C5a, Finet-leu-rhe, APJ-подобный рецептор, рецептор интерлейкина-8 типа А, интерлейкина-8 типа В, интерлейкина-8 других типов, С-СС хемокинов типа 1 - 11 и других типов, С-Х-С хемокинов (типов 2 - 6 и других), хемокина С-Х3-С, холецистокинина ССК, ССК типа А, ССК типа В, других ССК, эндотелина, меланокортина (меланоцитостимулирующего гормона, адренокортикотропного гормона, гормона меланокортина), антиген Даффи, рецептор пролактин-высвобождающего пептида (GPR10), нейропептида Y (типа 1-7), нейропептида Y, других нейропептидов Y, нейротензина, опиоида (типа D, K, M, X), соматостатина (типы 1-5), тахикинина (вещества P(NK1)), вещества K(NK2), нейромедина K(NK3), тахикинин-подобный рецептор 1, тахикинин-подобный рецептор 2, рецептор вазопрессина/вазотоцина (типы 1-2), вазотоцина, окистоцина/мезотоцина, конопрессина, галанин-подобный рецептор, рецептор, подобный рецепторам, активируемым протеиназами, рецептор орексина и нейропептидов FF, QRFP, хемокин-подобный рецептор, нейромедин U-подобный рецептор (нейромедин U, PRX-амид), рецепторы белковых гормонов (фолликулостимулирующего гормона, лютропин-хориогонадотропного гормона, тиреотропина, гонадотропина типа I, гонадотропина типа II), (род)опсин, родопсин позвоночных (типы 1 - 5), родопсин позвоночных типа 5, родопсин членистоногих, родопсин членистоногих типа 1, родопсин членистоногих типа 2, родопсин членистоногих типа 3, родопсин моллюсков, родопсин, обонятельный рецептор (обонятельный рецептор семейства 11 с 1 по 13), рецептор простагландина (простагландина E2 подтипа EP 1, простагландина E2/D2 подтипа EP2, простагландина E2 подтипа EP3, простагландина E2 подтипа EP4, простагландина F2-альфа), простаглицлина, тромбоспандина, аденозина типов с 1 по 3, пуриnergические рецепторы, пуриnergический рецептор P2RY1-4,6,11 GPR91, пуриnergический рецептор P2RY5,8,9,10 GPR35,92,174, пуриnergический рецептор P2RY12-14 GPR87 (JDP-глюкоза), каннабиноидные рецепторы, рецептор фактора активации тромбоцитов, гонадотропин-высвобождающего гормона, гонадотропин-высвобождающего гормона типа I, гонадотропин-высвобождающего гормона типа II, рецептор, подобный рецептору адипокинетического гормона, рецептор коразонина, тиреотропин-высвобождающего гормона и стимулятора секреции, тиреотропин-высвобождающего гормона, стимулятора секреции гормона роста, рецептор, подобный рецептору стимулятору секреции гормона роста, рецептор гормона, запускающего линьку (Ecdysis-triggering hormone, ETHR), рецептор мелатонина, рецепторы лизосфинголипида и лизофосфатидной кислоты (LPA) (EDG), сфингозин 1-фосфата Edg-1, лизофосфатидиловой кислоты Edg-2, сфингозин 1-фосфата Edg-3, лизофосфатидиловой кислоты Edg4, сфингозин 1-фосфата Edg-5, сфингозин 1-фосфата Edg-6, лизофосфатидиловой кислоты Edg-7, сфингозин 1-фосфата Edg-8, другие рецепторы Edg лейкотриена B4, рецептор лейкотриена B4 BLT1, рецептор лейкотриена B4 BLT2, орфанные/другие рецепторы класса А, рецепторы предполагаемых нейротрансмиттеров, рецепторы SREB, рецепторы протоонкогена Mas и Mas-связанные рецепторы (Mas-related, MRG), GPR45-подобный рецептор, рецептор цистеинил-лейкотриена, связанный с G-белком рецептор желчных кислот, рецептор свободных жирных кислот (GP40, GP41, GP43), рецепторы класса В секретин-подобных рецепторов, рецепторы кальцитонина, высвобождающего фактора кортикотропина, гастроингибиторного пептида, глюкагона, рилизинг-гормона гормона роста, паратиреоидного гормона, PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, полипептида, активирующего аденилатциклазу гипофиза), секретина, вазоактивного полипептида кишечника, латрофилина, латрофилина типа 1, латрофилина типа 2, латрофилина типа 3, рецепторы ETL, рецепторы специфичного к головному мозгу ингибитора ангиогенеза (Brain-specific angiogenesis inhibitor, BAI), рецепторы подобных мафусаиловым белкам (Methuselah-like proteins, MTH), кадгерина EGF LAG (CELSR), очень большой рецептор, сопряженный с G-белком, метаболитные рецепторы глутамата/феромонов класса С, метаболитный рецептор глутамата группы I-III, рецептор, подобный кальций-чувствительному рецептору, внеклеточный кальций-чувствительный рецептор, рецептор феромона, другие рецепторы, подобные кальций-чувствительному рецептору, предполагаемые рецепторы феромонов, рецепторы ГАМК-В (гаммааминомасляной кислоты), ГАМК-В подтипа 1, ГАМК-В подтипа 2, ГАМК-В-подобный рецептор, орфанный рецептор GPRC5, орфанный рецептор GPCR6, белки BOSS (Bride of sevenless), вкусовые рецепторы (T1R), рецепторы феромонов грибов класса D, рецептор феромонов грибов, подобный фактору А (STE2, STE3), рецептор феромонов грибов, подобный В (BAR, VBR, RCB, PRA), рецепторы цАМФ класса Е, белки глазного альбинизма, семейство завитых/сглаженных белков, завитые белки группы А (Fz 1, 2, 4, 5, 7-9), завитые белки группы В (Fz 3 и 6),

завитые белки группы С (другие), сошниково-носовые рецепторы, хеморецепторы нематод, одорантные рецепторы насекомых и опсины класса Z архебактерий/бактерий/грибов.

Также можно получать биологически активные пептиды. Примеры включают: BOTOX, Миоблок, Нейроблок, Диспорт (или другие серотипы ботулинических нейротоксинов), алглокозидазу альфа, даптомицин, УН-16, хориогонадотропин альфа, филграстим, цетрореликс, интерлейкин-2, альдеслейкин, тецелеулин, денилейкин-дифтитокс, интерферон альфа-n3 (инъекционный), интерферон альфа-n1, DL-8234, интерферон, Сантори (гамма-1a), интерферон гамма, тимозин альфа 1, тазонермин, DigiFab, Viper-aTAb, EchiTAb, CroFab, несиритид, абатацепт, алекацепт, Ребиф, эптотермин альфа, терипаратид (остеопороз), инъекционный кальцитонин (заболевание костей), кальцитонин (назальный, остеопороз), этанерцепт, гемоглобин глутамер 250 (бычий), дротрекогин альфа, коллагеназу, карперитид, рекомбинантный эпидермальный фактор роста человека (гель для местного применения, заживление ран), DWP401, дарбэпозтин альфа, эпозтин омега, эпозтин бета, эпозтин альфа, десирудин, лепирудин, бивалирудин, нонаког альфа, Мононин, эптаког альфа (активированный), рекомбинантный фактор VIII + фактор фон Виллебранда, Рекомбинат, рекомбинантный фактор VIII, фактор VIII (рекомбинантный), Альфимат, октоког альфа, фактор VIII, палифермин, Индикиназу, тенектеплазу, альтеплазу, памитеплазу, ретеплазу, натеплазу, монтеплазу, фоллитропин альфа, рекомбинантный ФСГ (фоликуллостимулирующий гормон), высокоочищенный ФСГ, микафунгин, пэгфилграстим, ленограстим, нартограстим, серморелин, глюкоагон, эксенатид, прамлинтид, иниглюцеразу, галсульфазу, Лейкотропин, молграмостим, трипторелина ацетат, гистерелин (подкожный имплантат, Нудрон), деслорелин, гистерелин, нафарелин, лейпрорелин в форме состава-депо с замедленным высвобождением (ATRIGEL), лейпрорелин в форме имплантата (DUROS), гозерелин, соматропин, Эутропин, программу KP-102, соматропин, соматропин, меказермин (нарушение роста), энлфавиртид, Otg-33408, инсулин гларгин, инсулин глулизин, инсулин (для ингаляций), инсулин лизпро, инсулин детернир, инсулин (буккальный, RapidMist), меказермина ринфабат, анакинру, целмолейкин, 99 mTc-апцитид для инъекций, миелопид, Бетасерон, глатирамера ацетат, Гепон, сарграмостим, опрелвекин, альфа-интерфероны человека, полученные из лейкоцитов, Билив, инсулин (рекомбинантный), рекомбинантный инсулин человека, инсулин аспарт, меказенин, Роферон-А, интерферон-альфа 2, Альфаферон, интерферон альфакон-1, интерферон альфа, Авонекс, рекомбинантный лютеинизирующий гормон человека, дорназу альфа, трафермин, зиконотид, талтирелин, диботермин альфа, атозибан, бекалпермин, эптифибатид, Земаиру, STC-111, Шанвак-В, вакцину против ВПЧ (четырёхвалентную), октреотид, ланреотид, анцестирн, агалзидазу бета, агалзидазу альфа, ларонидазу, презатида меди ацетат (гель для местного применения), расбуриказу, ранибизумаб, Актиммун, ПЭГ-Интрон, Трикомин, антианафилактические инъекции рекомбинантного клещевого аллергена домашней пыли, рекомбинантный паратиреоидный гормон человека (ПТГ) 1-84 (подкожный, остеопороз), эпозтин дельта, трансгенный антиромбин III, Грандитропин, Витразу, рекомбинантный инсулин, интерферон альфа (таблетки для рассасывания для перорального применения), GEM-21S, вапреотид, идурсульфазу, омнапатрилат, рекомбинантный сывороточный альбумин, цертолизумаб пегол, глюкокарпидазу, рекомбинантный ингибитор С1-эстеразы человека (ангионевротический отек), ланотеплазу, рекомбинантный гормон роста человека, энфувирид (безыгольные инъекции, Biojector 2000), VGV-1, интерферон (альфа), луцинактант, авиптадил (для ингаляций, заболевание легких), икатибант, экалантанд, омиганан, Ауурограб, пексиганан ацетат, ADI-PEG-20, LDI-200, дегареликс, цинтрелидинбесудотокс, FavId, MDX-1379, ISAtx-247, лираглутид, терипаратид (остеопороз), тифакогин, AA4500, липосомальный лосьон T4N5, катумаксамаб, DWP413, ART-123, Кризалин, десмотеплазу, амедиплазу, корифоллитропин альфа, TH-9507, тедуглутид, Диамид, DWP-412, гормон роста (инъекции с замедленным высвобождением), рекомбинантный Г-КСФ, инсулин (для ингаляций, AIR), инсулин (для ингаляций, Techno sphere), инсулин (для ингаляций, AERx), RGN-303, DiaPer277, интерферон бета (инфекция вирусного гепатита С (ВГС)), интерферон альфа-n3 (пероральный), белатацепт, трансдермальные пластыри с инсулином, AMG-531, MBP-8298, Ксероцепт, опебакан, AIDS VAX, GV-1001, ЛимфоСкан, ранпирназу, Липоксисан, лузупултид, MP52 (переносчик бета-трикальцийфосфата, регенерация кости), вакцину против меланомы, сипулейцел-Т, СТР-37, Инсегию, витеспен, тромбин человека (замороженный, хирургическое кровотечение), тромбин, TransMID, альфимепразу, Пурикейс, терлипрессин (внутривенный, печеночно-почечный синдром), EUR-1008M, рекомбинантный ФРФ-1 (инъекционный, сосудистое заболевание), BDM-E, ротигаптид, ETC-216, P-113, MBI-594AN, дурамицин (для ингаляций, кистозный фиброз), SCV-07, OPI-45, эндостатин, ангиостатин, АВТ-510, концентрат ингибиторов Bowman Birk, XMP-629, 99 mTc-Нупис-Аннексин V, кахалалид F, СТСЕ-9908, тевереликс (пролонгированного высвобождения), озареликс, рорнидипсин, BAY-504798, интерлейкин 4, PRX-321, Пепскан, ибоктадекин, рекомбинантный лактоферрин человека, TRU-015, ИЛ-21, АТН-161, циленгитид, Албуферон, Бифазикс, IRX-2, омега интерферон, РСК-3145, CAP-232, пасиретид, huN901-DM1, иммунотерапевтическую вакцину против рака яичников, SB-249553, Онковакс-CL, Онковакс-Р, BLP-25, ЦерВакс-16, мультиэпитопную пептидную вакцину против меланомы (MART-1, gp100, тирозиназа), немифитид, гААТ (для ингаляций), гААТ (дерматологический), CGRP (calcitonin gene related peptide, пептид, связанный с геном кальцитонина, для ингаляций, астма), пегсунерцепт, тимозин бета 4, плитидепсин, GTP-200, рамопланин, GRASPA, OBI-1, AC-100, кальцитонин лосося (пероральный, элиген), кальцитонин (пероральный, остеопороз), экзаморелин, капроморелин, Кардеву, велафермин,

1311-ТМ-601, КК-220, Т-10, уларитид, депелестат, гематид, Кризалин (для местного применения), rNAPc2, рекомбинантный фактор VIII (пегилированный липосомальный), основной ФРФ, пегилированный рекомбинантный вариант стафилокиназы, V-10153, СоноЛизис Проллиз, НейроВакс, CZEN-002, терапию для регенерации островковых клеток, rGLP-BIM-51077, LY-548806, экзенатид (с контролируемым высвобождением, Медисорб), AVE-0010, GA-GCB, аворелин, AOD-9604, линаклотида ацетат, CETi-1, Гемоспан, VAL (инъекционный), быстродействующий инсулин (инъекционный, Виadel), интраназальный инсулин, инсулин (для ингаляций), инсулин (пероральный, элиген), рекомбинантный метиониллептин человека, питракину для подкожных инъекций, экзема), питракину (сухой порошок для ингаляций, астма), Мультикин, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org-39141, Cpn10 (аутоиммунные заболевания/воспаление), талактоферрин (для местного применения), rEV-131 (офтальмологический), rEV-131 (заболевание дыхательной системы), пероральный рекомбинантный инсулин человека (диабет), RPI-78M, опрелвекин (пероральный), CYT-99007 CTLA4-Ig, DTU-001, валатеграст, интерферон альфа-п3 (для местного применения), IRX-3, RDP-58, Тауферон, липазу, стимулируемую солями желчных кислот, Мериспазу, аланинофатазу, EP-2104R, Меланотан-II, бремеланотид, ATL-104, рекомбинантный микроплазмин человека, AX-200, SEMAX, ACV-1, Xen-2174, CJC-1008, диноρφин А, SI-6603, LAB GHRH, AER-BGC-728, вакцину против малярии (вирусомы, ReviPRO), ALTU-135, вакцину против парвовируса В19, вакцину против гриппа (рекомбинантная нейраминидаза), вакцину против малярии/ВГВ, вируса гепатита В, вакцину против сибирской язвы, Vacc-5q, Vacc-4x, вакцину против ВИЧ (пероральную), вакцину против ВПЧ, Тат Токсоид, YPSL, CHS-13340, липосомальный крем ПТГ(1-34) (Новасома), Остаболлин-С, аналог ПТГ (для местного применения, псориаз), MBRI-93.02, вакцину МТВ72F (туберкулез), вакцину MVA-Ag85A (туберкулез), FARA04, BA-210, рекомбинантную противочумную вакцину F1V, AG-702, OхSODrol, rBetVI, противоаллергенную вакцину Der-p1/Der-p2/Der-p7 (аллергия на пылевого клеща), пептидный антиген PR1 (лейкоз), вакцину на основе мутантного gas, вакцину на основе липопептида E7 ВПЧ-16, лабиринтную вакцину (аденокарцинома), вакцину CML, вакцину на основе пептида WT1 (рак), IDD-5, CDX-110, Пентрис, Норелин, CytoFab, P-9808, VT-111, икрокапид, телбермин (дерматологический, язвы при диабетической стопе), рупинтривир, ретикулозу, rGRF, P1A, альфа-галактозидазу А, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, терапевтическую вакцину на основе ангиотензина, D-4F, ETC-642, APP-018, rhMBL, SCV-07 (пероральная, туберкулез), DRF-7295, АВТ-828, ErbB2-специфичный иммунотоксин (противораковый), DT3SSIL-3, TST-10088, PRO-1762, Комботокс, хелоцистокинин-В/рецептор гастриина-связывающие пептиды, 111In-hEGF, АЕ-37, транснизумаб-DM1, Антагонист G, ИЛ-12 (рекомбинантный), PM-02734, IMP-321, rhIGF-BP3, BLX-883, CUV-1647 (для местного применения), радиоиммунотерапевтические средства на основе L-19 (рак), Re-188-P-2045, AMG-386, вакцину DC/1540/KLH (рак), VX-001, AVE-9633, AC-9301, вакцину NY-ESO-1 (пептиды), пептиды NA17.A2, вакцину против меланомы (терапевтическое средство на основе пульсирующего антигена), вакцину против рака предстательной железы, CBP-501, рекомбинантный лактоферрин человека (сухой глаз), FX-06, AP-214, WAP-8294A (инъекционный), ACP-PIP, SUN-11031, пептид YY [3-36] (ожирение, интраназальный), FGLL, атацицепт, BR3-Fc, BN-003, BA-058, паратиреоидный гормон 1-34 человека (интраназальный, остеопороз), F-18-CCR1, AT-1100 (целиакция/диабет), JPD-003, липосомальный крем ПТГ(7-34) (Новасома), дурамицин (офтальмологический, сухой глаз), CAB-2, CTCE-0214, гликопегилированный эритропозтин, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, фактор XIII, аминокандин, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318, BAY-73-7977, тевереликс (немедленного высвобождения), EP-51216, hGH (с контролируемым высвобождением, Biosphere), OGP-I, сифувиртид, TV4710, ALG-889, Org-41259, rhCCIO, F-991, тимопентин (заболевание легких), r(m)CRP, гепатоселективный инсулин, субалин, слитый белок L19-ИЛ-2, элафин, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, агонист рецептора тромбозептина (тромбоцитопенические нарушения), AL-108, AL-208, антагонисты фактора роста нервов (боль), SLV-317, CGX-1007, INNO-105, пероральный терипаратид (элиген), GEM-OS1, AC-162352, PRX-302, слитую вакцину LFn-p24 (Терапор), EP-1043, детскую вакцину против S. pneumonia, вакцину против малярии, вакцину против Neisseria meningitidis группы В, вакцину против неонатального стрептококка группы В, вакцину против сибирской язвы, вакцину против ВГС, вируса гепатита С (gpE1+gpE2+MF-59), терапию отита среднего уха, вакцину против ВГС (коровый антиген + ISCOMATRIX), ПТГ человека (1-34) (трансдермальный, ВиаДерм), 768974, SYN-101, PGN-0052, авискумнин, BIM-23190, вакцину против туберкулеза, мультиэпитопный пептид тирозиназы, вакцину против рака, энкастим, APC-8024, GI-5005, ACC-001, TTS-CD3, ФНО, нацеленный на сосуды (солидные опухоли), десмопрессин (буккальный, с контролируемым высвобождением), онерцепт и TP-9201.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения белок, полученный гетерологичным способом, представляет собой фермент или биологически активные фрагменты указанного фермента. Подходящие ферменты включают, но не ограничены указанными: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения белок, полученный гетерологичным способом, представляет собой фермент класса ЕС (Enzyme Commission, комиссии по ферментам) 1, например, фермент из любого класса ЕС с 1.1 по 1.21, или 1.97. Фермент также может представлять собой фермент из ЕС класса 2, 3, 4, 5 или 6. Например, фермент может быть выбран из любого класса ЕС с 2.1 по 2.9, ЕС с 3.1 по 3.13, ЕС с 4.1 по 4.6, ЕС 4.99, ЕС с 5.1

по 5.11, ЕС 5.99 или ЕС 6.1 - 6.6. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения фермент представляет собой фермент с высоким содержанием маннозы, такой как лизосомальный белок, например, глюкоцереброзидаза и альфа-галактозидаза.

В настоящей заявке термин "антитело" означает по существу интактную молекулу антитела. Термин означает моноспецифичное антитело, а также би- и триспецифичные антитела.

В настоящей заявке фраза "фрагмент антитела" означает функциональный фрагмент антитела (такой как Fab, F(ab')₂, Fv или однодоменные молекулы, такие как VH и VL), который способен к связыванию с эпитопом на антигене.

Примеры антител, полученных в клетках согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничены указанными, абциксимаб (РеоПро^{RTM}), адалимумаб (Хумира^{RTM}), алемтузумаб (Кэмпас^{RTM}), базиликсимаб (Симулект^{RTM}), бевацизумаб (Авастин^{RTM}), цетуксимаб (Эрбитукс^{RTM}), даклизумаб (Зенапакс^{RTM}), дацетузумаб, экулизумаб (Солирис^{RTM}), эфализумаб (Раптив^{RTM}), эдреколомаб (Панорекс^{RTM}), эспратузумаб, ибритумомаб (Зевалин^{RTM}), тиуксетан, инфликсимаб (Ремикейд^{RTM}), муромонаб-CD3 (ОКТ3), натализумаб (Тизабри^{RTM}), омализумаб (Ксолар^{RTM}), паливизумаб (Синагис^{RTM}), панитутумаб (Вектибикс^{RTM}), ранибизумаб (Луцентис^{RTM}), гемтузумаб озогамидин (Милотарг^{RTM}), ореговумаб (Оварекс^{RTM}), ритуксимаб (Ритуксан^{RTM}), тозитумомаб (Бексар^{RTM}), трастузумаб (Герцептин^{RTM}), MetMab, окрелизумаб, пертузумаб, Раптив^{RTM} (эфализумаб), hu M195Mab, MDX-210, BEC2, антитело против Abeta, антитело против CD4, антитело против ИЛ-13, антитело против oxLDL, трастузумаб-DM1, арамаб, rhuMab бета 7, rhuMab ИФНальфа, GA101, антитело против OX40L, ипилимумаб, Валортим, устекинумаб, голимумаб, офатумумаб, залутумумаб, тремелимумаб, мотавизумаб, митумомаб, экроексимаб, АВХ-EGF, MDX010, XTL 002, HII SCFV, 4B5, XTL001, MDX-070, TNX-901, IDEC-114 и любые фрагменты антител, специфичные к антигенам, включая, но не ограничиваясь указанными, комплемент C5, CBL, CD 147, gp 120, VLA4, CD11a, CD18, ФРСЭ, CD40L, anti-Id, ICAM1, CD2, РЭФР (рецептор эпидермального фактора роста), ТФР бета 2, ФНО альфа, рецептор ФНО, Е-селектин, FactII, Her2/neu, F gp, CD11/18, CD14, CD80, ICAM3, CD4, CD23, бета 2-интегрин, альфа4бета7, CD52, CD22, OX40L, рецептор ИЛ-5, рецептор ГМ-КСФ, ГМ-КСФ, HLA-DR, oxLDL, CD64 (FcR), рецептор Т-клеток альфа-бета, CD3, Her B, CD 125, DR5, ЕрСАМ, gpIIbIIIa, IgE, интегрин бета 7, CD20, ИЛ-1 бета, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-12/ИЛ-23, ИЛ-15, ИФН альфа, ИФН бета, ИФН гамма, рецептор ФРЭС-1 (фактора роста сосудистого эндотелия), рецептор фактора роста тромбоцитов альфа (ФРТР альфа), белок сосудистой адгезии 1 (vascular adhesion protein 1, VAP1), фактор роста соединительной ткани (ФРСТ), Apo2/TRAIL, CD25, CD33, HLA, F gp, IgE, CTLA-4, IP-10, антитело против токсина А и токсина В *S. difficile*, протективный антиген В. anthracis, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), рецептор маннозы/hCG бета, рецепторы-интегрины, PD1, PDL-1, CD 19, CD70 и интегрин VNR.

Примеры структурных белков, которые можно получить согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничены указанными, коллаген, проколлаген, альбумин, фибриноген или производные указанных белков.

При получении мультимерного белка может быть предпочтительно экспрессировать все субъединицы на одной конструкции нуклеиновой кислоты для обеспечения стехиометрической наработки. Однако также можно достичь экспрессии из множества конструкций нуклеиновой кислоты (систем конструкций) в одной клетке растения или во множестве клеток.

Белки, описанные в настоящей заявке, кодируются выделенным полинуклеотидом (полинуклеотидами) для рекомбинантной экспрессии в клетках растений. Каждая из открытых рамок считывания, кодирующих белки (например, полипептид, представляющий интерес, и по меньшей мере одну гликозидазу), трансляционным способом слита с сигнальным пептидом, таким как описанный выше. Несмотря на то, что оба белка направляются в один и тот же внутриклеточный компартмент, сигналы не обязательно должны быть одинаковыми.

Фраза "выделенный полинуклеотид" означает последовательность одно- или двухцепочечной нуклеиновой кислоты, которая является выделенной и предоставленной в форме последовательности РНК (т.е. содержит рибонуклеотиды), комплементарной полинуклеотидной последовательности (кДНК), геномной полинуклеотидной последовательности (т.е. содержит дезоксирибонуклеотиды) и/или комбинации полинуклеотидных последовательностей (например, комбинации последовательностей, указанных выше).

В настоящей заявке фраза "комплементарная полинуклеотидная последовательность" означает последовательность, которая была получена в результате обратной транскрипции матричной РНК с применением обратной транскриптазы или любой другой РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Такую последовательность можно затем амплифицировать *in vivo* или *in vitro* с применением ДНК-зависимой ДНК-полимеразы.

В настоящей заявке фраза "геномная полинуклеотидная последовательность" означает последовательность, полученную (выделенную) из хромосомы, и, таким образом, данная последовательность представляет собой непрерывную часть хромосомы.

В настоящей заявке фраза "комбинированная полинуклеотидная последовательность" означает последовательность, которая, по меньшей мере, частично является комплементарной и по меньшей мере

частично является геномной. Комбинированная последовательность может содержать некоторые последовательности экзонов, необходимые для кодирования полипептида согласно настоящему изобретению, а также некоторые последовательности интронов, расположенные между последовательностями экзонов. Последовательности интронов могут быть получены из любого источника, включая другие гены, и, как правило, будут содержать консервативные сигнальные последовательности сплайсинга. Такие последовательности интронов могут также содержать действующие в цис-положении регуляторные элементы экспрессии.

Примеры последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют белки согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничены указанными, SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 20, 30.

В случае гетерологичной экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют каждый из вышеуказанных полипептидов (а также другие полипептиды, такие как описанные далее ниже), лигированы в конструкции нуклеиновой кислоты или в системы конструкций.

В настоящей заявке спецификатор "гетерологичный" в отношении белков согласно настоящему изобретению указывает на то, что белки кодируются последовательностью или последовательностями нуклеиновой кислоты, которые являются чужеродными по отношению к экспрессирующей клетке (не присутствуют в экспрессирующей клетке в природе).

Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере две гликозидазы, причем каждая по меньшей мере из двух гликозидаз трансляционным способом слита с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно дополнительному или альтернативному варианту реализации настоящего изобретения предложена система конструкций нуклеиновой кислоты, которая содержит:

(i) первую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует первую гликозидазу из по меньшей мере двух гликозидаз;

(ii) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует вторую гликозидазу из по меньшей мере двух гликозидаз,

причем каждая из первой гликозидазы и второй гликозидазы трансляционным способом слита с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно дополнительному или альтернативному варианту реализации настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес, и по меньшей мере одну гликозидазу, причем как полипептид, представляющий интерес, так и по меньшей мере одна гликозидаза трансляционным способом слита с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно дополнительному или альтернативному варианту реализации настоящего изобретения предложена система конструкций нуклеиновой кислоты, которая содержит:

(i) первую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес (по меньшей мере одну субъединицу или более, например, 2, 3);

(ii) вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует и по меньшей мере одну гликозидазу, причем каждая из по меньшей мере одной гликозидазы трансляционным способом слита с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения.

Согласно дополнительному или альтернативному варианту реализации настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует гликозидазу, трансляционным способом слитую с сигнальным пептидом для локализации во внутриклеточном компартменте, представляющем интерес.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения каждая из вышеуказанных конструкций нуклеиновой кислоты или систем конструкций нуклеиновой кислоты может содержать дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции, такие как таковые, которые кодируют дополнительные гликозидазы или ферменты посттрансляционных модификаций, которые включают, но не ограничены указанными, пролил 4-гидроксилазу или субъединицу указанного фермента, лизилоксидазу, лизилгидроксилазу, С-протеиназу, N-протеиназу, РАСЕ (paired basic amino acid cleaving enzyme, фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот), γ -глутамилкарбоксиазу, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, N-ацетилгалактозаминилтрансферазы, N-ацетилгалактозаминилтрансферазы, сиалил-трансферазы, фукозилтрансферазы, галактозилтрансферазы, маннозилтрансферазы, сульфотрансферазы, гликозидазы, ацетилтрансферазы и маннозидазы, как изложено в публикации WO/2001/029242.

В качестве альтернативы или дополнительно к улучшению афукозилирования и аксилосилирования, растение или клетка растения могут характеризоваться уменьшенным уровнем или активностью по

меньшей мере одной гликозилтрансферазы по сравнению с растением или клеткой растения того же вида, экспрессирующими уровни дикого типа или демонстрирующими активность дикого типа по меньшей мере одной гликозилтрансферазы.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения гликозилтрансфераза включает бета-(1,2)-ксилозилтрансферазу и/или альфа-(1,3)-фукозилтрансферазу.

Способы уменьшения экспрессии или активности гликозилтрансфераз подробно описаны в публикации WO/2001/029242. Как правило, способы подавления экспрессии гена в растениях хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничены указанными, миРНК (малую интерферирующую РНК), дсРНК (двуспиральную РНК), антисмысловую нуклеиновую кислоту, гяРНК (гетероядерную РНК) и химерные нуклеазы, такие как нуклеазы, содержащие ДНК-связывающий домен мегануклеазы, ДНК-связывающий домен "лейциновая застёжка", ДНК-связывающий домен TAL (transcription activator-like, подобный активатору транскрипции), рекомбиназу, CRISPR-Cas9 и ДНК-связывающий домен белка типа "цинковый палец".

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения мишень для сайленсинга представляет собой ген или гены ГДФ-D-маннозо 6,6-дегидразы.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения мишень для сайленсинга представляет собой ксилотрансферазу (ХулТ).

Дополнительные сведения о сайленсинге гена, вовлеченного в фукозилирование/ксилозилирование белка, можно найти в публикации Matsuo et al. 2014 J. Bioscience and Bioengineering 9:264-281.

В качестве альтернативы или дополнительно, растение является трансформированным полинуклеотидом, который обеспечивает признак, эффективный с точки зрения культивирования или сельского хозяйства, например, устойчивость к насекомым, устойчивость к заболеваниям, устойчивость к гербицидам, увеличенную урожайность, увеличенную переносимость к стрессу под влиянием условий окружающей среды, увеличенное или уменьшенное содержание крахмала, масла или белка, например.

В качестве альтернативы или дополнительно, растение является трансформированным полинуклеотидом, который упрощает выделение полипептида, представляющего интерес. Согласно варианту реализации настоящего изобретения растение, таким образом, экспрессирует последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует слитый полипептид, содержащий домен, связывающийся с клеточной стенкой (например, CBD), трансляционным способом слитый (например, гетерологичный, химерный белок) с аффинной группой для связывания полипептида, представляющего интерес.

Примеры целлюлозосвязывающих доменов, которые можно использовать в соответствии с принципами настоящего изобретения, предложены в разделе примеров, а также могут быть получены из следующих белковых источников (см. также публикацию WO2009/069123): β -глюканазы (авицеллазы, СМСазы (карбоксиметилцеллюлазы), целлодекстриназы) экзоглюканазы или целлобиогидролазы, целлюлозосвязывающие белки ксиланазы, смеси ксиланаз/глюканаз эстеразы хитиназы β -1,3-глюканазы, β -1,3-(β -1,4)-глюканазы (β -)маннаназы, β -глюкозидазы/галактозидазы целлюлозосинтазы.

В качестве еще одной альтернативы или дополнительно, растение или клетка растения могут являться трансформированными конструкцией нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая обладает аффинностью в отношении полипептида, представляющего интерес (например, в случае антитела - белок A/G/L), трансляционным способом слитую с гетерологичным трансмембранным доменом. Таким образом, после гомогенизации полипептид, представляющий интерес, может связываться с мембраносвязанной аффинной группой.

Слияние аффинной группы с трансмембранным доменом может являться прямым или осуществляться посредством линкера (например, SEQ ID NO: 31).

Таким образом, в течение культивирования (например, когда полипептид, представляющий интерес, и гликозидаза направляются в апопласт) или после культивирования и лизиса клеток полипептид, представляющий интерес, свяжется с аффинной группой и окажется иммобилизованным в нерастворимой фракции.

Аффинная группа может представлять собой любую аминокислотную последовательность, которая обладает специфичной аффинностью (не к белкам клетки растения), например, приблизительно 10^{-4} М или 10^{-6} М, к полипептиду, представляющему интерес. Согласно иллюстративному варианту реализации настоящего изобретения аффинная группа представляет собой белок А, G или L. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения аффинная группа представляет собой белок А.

Данные продукты экспрессии могут локализоваться совместно с полипептидом, представляющим интерес, или могут не локализоваться совместно с указанным полипептидом.

Конструкции, пригодные в способах согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, можно сконструировать с применением технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалистам в данной области техники. Конструкции нуклеиновой кислоты могут быть разработаны собственными силами либо могут являться коммерчески доступными, подходящими для трансформации растений и подходящими для экспрессии белков в трансформированных клетках. Генетическая конст-

рукция может представлять собой вектор экспрессии, в котором указанная последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, которые обеспечивают возможность экспрессии в клетках растений.

Согласно конкретному варианту реализации некоторых вариантов реализации настоящего изобретения регуляторная последовательность представляет собой промотор, который может экспрессироваться в растении.

В настоящей заявке фраза "который может экспрессироваться в растении" означает последовательность промотора, включая любые дополнительные регуляторные элементы, добавленные к указанной последовательности или содержащиеся в указанной последовательности, которая по меньшей мере способна индуцировать, обеспечивать, активировать или усиливать экспрессию в клетке, ткани или органе растения, предпочтительно, в клетке, ткани или органе однодольного или двудольного растения. Примеры предпочтительных промоторов, пригодных для способов согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, представлены в табл. 2, 3, 4 и 5.

Таблица 2. Примеры конститутивных промоторов для применения при исполнении некоторых вариантов реализации настоящего изобретения

Ген-источник	Профиль экспрессии	Ссылка
Актин	конститутивный	McElroy et al., Plant Cell, 2: 163-171, 1990
35S CaMV	конститутивный	Odell et al., Nature, 313: 810-812, 1985
19S CaMV	конститутивный	Nilsson et al., Physiol. Plant 100:456-462, 1997
GOS2	конститутивный	de Pater et al., Plant J Nov; 2(6):837-44, 1992
Убиквитин	конститутивный	Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992
Циклофилин риса	конститутивный	Bucholz et al., Plant Mol Biol. 25(5):837-43, 1994
Гистон H3 маиса	конститутивный	Lepetit et al., Mol. Gen. Genet. 231: 276-285, 1992
Актин 2	конститутивный	An et al., Plant J. 10(1):107-121, 1996

Таблица 3. Примеры промоторов, предпочтительных для семян, для применения при исполнении некоторых вариантов реализации настоящего изобретения

Ген-источник	Профиль экспрессии	Ссылка
Гены, специфичные к семенам	семя	Simon, et al., Plant Mol. Biol. 5: 191, 1985; Scofield, et al., J. Biol. Chem. 262: 12202, 1987.; Baszczynski, et al., Plant Mol. Biol. 14: 633, 1990.
Альбумин бразильского ореха	семя	Pearson' et al., Plant Mol. Biol. 18: 235- 245, 1992.
Легумин	семя	Ellis, et al. Plant Mol. Biol. 10: 203-214, 1988
Глютелин (риса)	семя	Takaiwa, et al., Mol. Gen. Genet. 208: 15-22, 1986; Takaiwa, et al., FEBS Letts. 221: 43-47, 1987
Зеин	семя	Matzke et al. Plant Mol Biol, 143). 323-32 1990
парА	семя	Stalberg, et al., Planta 199: 515-519, 1996
LMW и HMW, глютеинин-1 пшеницы	эндосперм	Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; NAR 17:461-2,
SPA пшеницы	семя	Albanietal, Plant Cell, 9: 171-184, 1997
а, b и g глиадины пшеницы	эндосперм	EMB03:1409-15, 1984
Промотор 1trf1 ячменя	эндосперм	
Хордеин В1, С, D ячменя	эндосперм	Theor Appl Gen 98:1253-62, 1999; Plant J 4:343-55, 1993; Mol Gen Genet 250:750- 60, 1996
DOF ячменя	эндосперм	Mena et al., The Plant Journal, 116(1): 53-62, 1998
Biz2	эндосперм	EP99106056.7
Синтетический промотор	эндосперм	Vicente-Carbajosa et al., Plant J. 13: 629-640, 1998
Проламин NRP33 риса	эндосперм	Wu et al, Plant Cell

		Physiology 39(8) 885- 889, 1998
-глобулин Glb-1 риса	эндосперм	Wu et al., Plant Cell Physiology 39(8) 885- 889, 1998
OSH1 риса	зародыш	Sato et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 93:8117-8122
Альфа-глобулин REB/ОHP-1 риса	эндосперм	Nakase et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-S22, 1997
АДФ-глюкозофосфорилаза риса	эндосперм	Trans Res 6:157-68, 1997
Семейство гена ESR маиса	эндосперм	Plant J 12:235-46, 1997
Гамма-кафирин сорго	эндосперм	PMB 32:1029-35, 1996
KNOX	зародыш	Postma-Haarsma et al, Plant Mol. Biol. 39:257-71, 1999
Олеозин риса	зародыш и алейрон	Wu et at, J. Biochem., 123:386, 1998
Олеозин подсолнечника	семя (зародыш и сухое семя)	Cummins, etal., Plant Mol. Biol. 19: 873- 876, 1992

Таблица 4. Примеры специфичных к цветкам промоторов для применения при исполнении настоящего изобретения

Ген-источник	Профиль экспрессии	Ссылка
AtPRP4	цветы	salus. medium.edu/mmg/tierney/html
Халенсинтаза (chsA)	цветы	Van der Meer, et al., Plant Mol. Biol. 15, 95-109, 1990.
LAT52	пыльник	Twel et al. Mol. Gen Genet. 217:240-245 (1989)
apetala-3	цветы	

Таблица 5. Альтернативные промоторы риса для применения при исполнении настоящего изобретения

№ промотора	Ген	Экспрессия
PR00001	металлотнионин Mte	переходный слой зародыша + каллус
PR00005	предполагаемая бета-амилаза	переходный слой зародыша
PR00009	предполагаемая целлюлозосинтаза	слабая в корнях
PR00012	липаза (предполагаемая)	
PR00014	трансфераза (предполагаемая)	
PR00016	пептидилпролил цис-транс изомераза (предполагаемая)	
PR00019	неизвестно	
PR00020	белок rgr (предполагаемый)	
PR00029	нодулин (предполагаемый)	
PR00058	ингибитор протеиназы Rgpi9	семя
PR00061	бета-экспанзин EXPB9	слабая в молодых цветах
PR00063	структурный белок	молодые ткани + каллус + зародыш
PR00069	ксилозидаза (предполагаемая)	
PR00075	проламин 10 кДа	сильная в эндосперме
PR00076	аллерген RA2	сильная в эндосперме
PR00077	проламин RP7	сильная в эндосперме
PR00078	CBP80	
PR00079	крахмал-ветвящий фермент I	
PR00080	металлотнионин-подобный ML2	переходный слой зародыша + каллус
PR00081	предполагаемая кофеил-КоА 3-0 метилтрансфераза	проросток
PR00087	проламин RM9	сильная в эндосперме
PR00090	проламин RP6	сильная в эндосперме

PR00091	проламин RP5	сильная в эндосперме
PR00092	аллерген RA5	
PR00095	предполагаемая метионинаминопептидаза	зародыш
PR00098	gas-подобный ГТФ- связывающий белок	
PR00104	бета-экспанзин EXPB1	
PR00105	белок, обогащенный глицином	
PR00108	маталлотионин-подобный белок (предполагаемый)	
PR00110	RCc3	сильная в корнях
PR00111	уклацианин 3-подобный белок	слабая в центре дифференциации/ меристеме проростка
PR00116	не-АТФазная субъединица 11 регуляторной частицы 26S протеасомы	очень слабая меристема- специфичная
PR00117	предполагаемый белок 40S рибосомы	слабая в эндосперме
PR00122	предшественник хлорофилл a/lo-связывающего белка (Cab27)	очень слабая в проростке
PR00123	предполагаемая протохлорофиллидредуктаза	сильная в листьях
PR00126	металлотионеин RiCMT	сильная в центре дифференциации и меристеме проростка
PR00129	GOS2	сильная конститутивная
PR00131	GOS9	
PR00133	хитиназа Cht-3	очень слабая меристема- специфичная
PR00135	альфа-глобулин	сильная в эндосперме
PR00136	аланинаминотрансфераза	слабая в эндосперме

038931

PR00138	циклин A2	
PR00139	циклин D2	
PR00140	циклин D3	
PR00141	циклофиллин 2	проросток и семя
PR00146	сахарозосинтаза SSI (ячменя)	средняя конститутивная
PR00147	ингибитор трипсина ITR1 (ячменя)	слабая в эндосперме
PR00149	убиквитин 2 с интроном	сильная конститутивная
PR00151	WSI18	зародыш и состояние стресса
PR00156	гомолог HVA22 (предполагаемый)	
PR00157	EL2	
PR00169	аквапорин	средняя конститутивная в молодых растениях
PR00170	белок группы с высокой подвижностью	сильная конститутивная
PR00171	обратимо гликозилированный белок RGP1	слабая конститутивная
PR00173	цитозольный MDH	проросток
PR00175	RAB21	зародыш и состояние стресса
PR00176	CDPK7	
PR00177	Cdc2-1	очень слабая в меристеме
PR00197	сахарозосинтаза 3	
PR00198	OsVPI	
PR00200	OSH1	очень слабая в меристеме молодых растений
PR00208	предполагаемая хлорофиллаза	
PR00210	OsNRT1	
PR00211	EXP 3	

PR00216	транспортер фосфата OjPT1	
PR00218	олеозин 18 кД	алейрон + зародыш
PR00219	убиквитин 2 без интрона	
PR00220	RFL	
PR00221	интрон UBI дельта маиса	не обнаружено
PR00223	глутелин-1	
PR00224	фрагмент промотора проламина RP6	
PR00225	4xABRE	
PR00226	глутелин OSLUA3	
PR00227	BLZ-2_short (короткий, ячмень)	
PR00228	BLZ-2_long (длинный, ячмень)	

Последовательности нуклеиновой кислоты полипептидов (например, гликозидазы и полипептида, представляющего интерес) согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно оптимизировать для экспрессии в растении. Примеры таких модификаций последовательности включают, но не ограничены указанными, изменение содержания G/C до более точного соотношения, которое, как правило, обнаруживается в видах растений, представляющих интерес, и удаление кодонов, нетипичных для видов растений; данный процесс обычно называют оптимизацией кодонов.

Фраза "оптимизация кодонов" означает выбор соответствующих нуклеотидов ДНК для применения в структурном гене или фрагменте указанного гена, который приближен к использованию кодона в растении, представляющем интерес. Вследствие этого оптимизированный ген или последовательность нуклеиновой кислоты означает ген, в котором нуклеотидная последовательность нативного или существующего в природе гена была модифицирована с целью применения предпочтительных со статистической точки зрения или благоприятных со статистической точки зрения кодонов в растении. Нуклеотидную последовательность, как правило, изучают на уровне ДНК, и кодирующую область, оптимизированную для экспрессии в видах растений, определяют с применением любой подходящей процедуры, например, описанной в публикации Sardana et al. (1996, *Plant Cell Reports* 15:677-681).

Таким образом, некоторые варианты реализации настоящего изобретения включают последовательности нуклеиновой кислоты, описанные в настоящей заявке выше; фрагменты указанных последовательностей, последовательности, способные гибридизоваться с указанными последовательностями, последовательности, гомологичные указанным последовательностям, последовательности, ортологичные указанным последовательностям, последовательности, которые кодируют аналогичные полипептиды с использованием других кодонов, измененные последовательности, которые характеризуются мутациями, такими как делеции, вставки или замены одного или нескольких нуклеотидов, существующих в природе или созданных человеком, случайным или запланированным образом.

Клетки растения можно стабильно или временно трансформировать конструкциями нуклеиновой кислоты согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения.

Клетки растения можно трансформировать последовательностями нуклеиновой кислоты (конструкцией или системой конструкций), которые кодируют по меньшей мере одну гликозидазу (например, по меньшей мере две гликозидазы), после трансформации конструкцией нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес. В качестве альтернативы клетки растения можно трансформировать последовательностью нуклеиновой кислоты (конструкцией или системой конструкций), которая кодирует по меньшей мере одну гликозидазу (например, по меньшей мере две гликозидазы) и полипептид, представляющий интерес. В качестве альтернативы клетки растения можно трансформировать последовательностью нуклеиновой кислоты (конструкцией или системой конструкций), которая кодирует по меньшей мере одну гликозидазу (например, по меньшей мере две гликозидазы), после трансформации конструкцией нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес.

При стабильной трансформации молекула нуклеиновой кислоты согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения встраивается в геном растения и, вследствие этого, данная молекула представляет стабильный и наследуемый признак. При временной трансформации молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется трансформированной клеткой, но не встраивается в геном, и вследствие этого данная молекула представляет временный признак.

Существует множество способов введения чужеродных генов в однодольные и двудольные растения, которые в совокупности называются в настоящей заявке трансформацией, включая инфицирование

(Potrykus, I, *Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol.* (1991) 42:205-225; Shimamoto et al., *Nature* (1989) 338:274-276).

Принципиальные способы обеспечения стабильного встраивания экзогенной (т.е. гетерологичной) ДНК в геномную ДНК растения включают два основных подхода:

(i) Перенос генов, опосредованный агробактериями: Klee et al. (1987) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:467-486; Klee and Rogers in *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*, eds. Schell, J., and Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, in *Plant Biotechnology*, eds. Kung, S. and Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

(ii) Прямое поглощение ДНК: Paszkowski et al., in *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes* eds. Schell, J., and Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 52-68; включая способы прямого поглощения ДНК в протопласты, Toriyama, K. et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1072-1074. Поглощение ДНК, вызванное кратковременным воздействием на клетки растения удара электрического тока: Zhang et al. *Plant Cell Rep.* (1988) 7:379-384. Fromm et al. *Nature* (1986) 319:791-793. Инъекция ДНК в клетки или ткани растения посредством бомбардировки частицами, Klein et al. *Bio/Technology* (1988) 6:559-563; McCabe et al. *Bio/Technology* (1988) 6:923-926; Sanford, *Physiol. Plant.* (1990) 79:206-209; посредством применения систем микропипетирования: Neuhaus et al., *Theor. Appl. Genet.* (1987) 75:30-36; Neuhaus and Spangenberg, *Physiol. Plant.* (1990) 79:213-217; трансформация культур клеток, зародышей или тканей каллуса стекловолокном или волокном карбида кремния, патент США № 5,464,765, или посредством прямой инкубации ДНК с прорастающей пыльцой, DeWet et al. in *Experimental Manipulation of Ovule Tissue*, eds. Chapman, G. P. and Mantell, S. H. and Daniels, W. Longman, London, (1985) p. 197-209; и Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:715-719.

Системы на основе агробактерий включают использование плазмидных векторов, содержащих определенные сегменты ДНК, которые встраиваются в геномную ДНК растения. Способы инокуляции ткани растения варьируют в зависимости от вида растения и системы доставки агробактерий. Широко используемый подход представляет собой процедуру листового диска, которую можно осуществить с любым эксплантатом ткани, обеспечивающим надлежащий источник для начала дифференциации в целое растение. Horsch et al. in *Plant Molecular Biology Manual A5*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. В дополнительном подходе используют систему доставки агробактерий в сочетании с вакуумной инфльтрацией. Система на основе агробактерий является в особенности целесообразной при получении трансгенных двудольных растений.

Существуют различные способы прямого переноса ДНК в клетки растения. В случае электропорации протопласты на короткое время подвергают воздействию мощного электрического поля. В случае микроинъекции ДНК механическим способом инъецируют непосредственно в клетки с применением очень маленьких микропипеток. В случае бомбардировки микрочастицами ДНК адсорбируют на микрочастицах, таких как кристаллы сульфата магния или частицы вольфрама, и микрочастицы физическим способом вводят с ускорением в клетки или ткани растения.

После стабильной трансформации осуществляют размножение растения. Наиболее распространенным способом размножения растений является семенное размножение. Воспроизведение посредством семенного размножения, однако, характеризуется следующим недостатком: в связи с гетерозиготностью наблюдается отсутствие единообразия урожая, поскольку семена образуются растениями согласно генетической изменчивости, которая регулируется правилами Менделя. В основном, каждое семя является отличным с генетической точки зрения, и каждое семя будет вырастать со своими собственными специфическими признаками. Вследствие этого предпочтительно получить трансформированное растение таким способом, чтобы воспроизведенное растение обладало признаками и характеристиками, идентичными признакам и характеристикам родительского трансгенного растения. Вследствие этого предпочтительно воспроизвести трансформированное растение посредством микроразмножения, которое обеспечивает быстрое и стабильное воспроизведение трансформированных растений.

Микроразмножение представляет собой процесс выращивания растений нового поколения из одного фрагмента ткани, который был вырезан из выбранного родительского растения или сорта культурного растения. Данный процесс обеспечивает массовое размножение растений, содержащих предпочтительную ткань, экспрессирующую слитый белок. Полученные растения нового поколения являются идентичными с генетической точки зрения и обладают всеми характеристиками исходного растения. Микроразмножение обеспечивает возможность массового размножения качественного растительного материала в короткий период времени и обеспечивает быстрое размножение выбранных сортов культурных растений при сохранении характеристик исходного трансгенного или трансформированного растения. Преимуществами клонирования растений являются скорость размножения растения, а также качество и единообразие полученных растений.

Микроразмножение представляет собой многоэтапную процедуру, для которой требуется смена культуральной среды или условий роста между стадиями. Таким образом, процесс микроразмножения включает четыре основных стадии: первую стадию, культивирование исходной ткани; вторую стадию, размножение культуры ткани; третью стадию, дифференциацию и формирование растения; и четвертую

стадию, тепличное культивирование и закаливание. В ходе первой стадии, культивирования исходной ткани, культуру ткани создают и сертифицируют как не содержащую контаминантов. В ходе второй стадии культуру исходной ткани размножают до тех пор, пока не получают достаточное количество образцов ткани, соответствующее производственным задачам. В ходе третьей стадии образцы ткани, выросшие на второй стадии, разделяют и выращивают в отдельные проростки. На четвертой стадии трансформированные проростки переносят в теплицу для закаливания, где постепенно увеличивают устойчивость растений к свету так, чтобы растения можно было выращивать в природных условиях.

Несмотря на то, что стабильная трансформация является на сегодняшний день предпочтительной, некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения также предусмотрена временная трансформация клеток листьев, меристемных клеток или целого растения.

Временную трансформацию можно осуществить любыми способами прямого переноса ДНК, описанными выше, или посредством инфекции вирусом с применением модифицированных вирусов растений.

Вирусы, которые, как было показано, являются пригодными для трансформации хозяев-растений, включают CaMV (cauliflower mosaic virus, вирус мозаики цветной капусты), TMV (tobacco mosaic virus, вирус мозаики табака) и BV. Трансформация растений с применением вирусов растений описана в патенте США № 4,855,237 (BGV), EP-A 67,553 (TMV), опубликованной заявке Японии № 63-14693 (TMV), EPA 194,809 (BV), EPA 278,667 (BV); и публикации Gluzman, Y. et al., *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 172-189 (1988). Псевдовиральные частицы для применения при экспрессии чужеродной ДНК во множестве хозяев, включая растения, описаны в публикации WO87/06261.

Конструирование РНК-вирусов растений для введения и экспрессии последовательностей невирусной экзогенной нуклеиновой кислоты в растениях продемонстрировано в вышеуказанных источниках, а также в публикациях Dawson, W. O. et al., *Virology* (1989) 172:285-292; Takamatsu et al. *EMBO J.* (1987) 6:307-311; French et al. *Science* (1986) 231:1294-1297; и Takamatsu et al. *FEBS Letters* (1990) 269:73-76.

Когда вирус представляет собой ДНК-вирус, подходящие модификации можно вводить в вирус сам по себе. В качестве альтернативы, вирус можно сначала клонировать в бактериальной плазмиде для легкого конструирования желаемого вирусного вектора с чужеродной ДНК. Затем вирус можно вырезать из плазмиды. Если вирус представляет собой ДНК-вирус, бактериальную точку начала репликации можно присоединить к вирусной ДНК, которая затем будет реплицироваться в бактерии. В результате транскрипции и трансляции данной ДНК будет образовываться белок оболочки, который будет заключать в капсид вирусную ДНК. Если вирус представляет собой РНК-вирус, вирус, как правило, клонируют в виде кДНК и встраивают в плазмиду. Затем плазмиду используют для получения всех конструкций. После этого РНК-вирус получают посредством транскрибирования вирусной последовательности плазмиды и трансляции вирусных генов для получения белка или белков оболочки, которые будут заключать в капсид вирусную РНК.

Конструирование РНК-вирусов растений для введения и экспрессии в растениях последовательностей невирусной экзогенной нуклеиновой кислоты, таких как таковые, содержащиеся в конструкциях согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, продемонстрировано в вышеуказанных источниках, а также в патенте США № 5,316,931.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота вируса растения, в которой последовательность, кодирующая нативный белок оболочки, была удалена из вирусной нуклеиновой кислоты, и была встроена последовательность, кодирующая ненативный белок оболочки вируса растения и ненативный промотор, предпочтительно, субгеномный промотор последовательности, кодирующей ненативный белок оболочки, способной к экспрессии в растении-хозяине, упаковке рекомбинантной нуклеиновой кислоты вируса растения и к обеспечению системной инфекции хозяина рекомбинантной нуклеиновой кислотой вируса растения. В качестве альтернативы, ген белка оболочки может быть инактивирован посредством встраивания ненативной последовательности нуклеиновой кислоты в указанный ген, в результате чего будет нарабатываться белок. Рекомбинантная нуклеиновая кислота вируса растения может содержать один или несколько дополнительных ненативных субгеномных промоторов. Каждый ненативный субгеномный промотор способен транскрибировать или экспрессировать прилежащие гены или последовательности нуклеиновой кислоты в растении-хозяине и не способен к рекомбинации между собой и с нативными субгеномными промоторами. Ненативные (чужеродные) последовательности нуклеиновой кислоты можно встраивать рядом с субгеномным промотором вируса растения или с нативными и ненативными субгеномными промоторами вируса растения, если вводят более одной последовательности нуклеиновой кислоты. Ненативные последовательности нуклеиновой кислоты транскрибируются или экспрессируются в растении-хозяине под контролем субгеномного промотора для получения целевых продуктов.

Согласно второму варианту реализации настоящего изобретения предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота вируса растения, как и согласно первому варианту реализации, за исключением того, что последовательность, кодирующая нативный белок оболочки, расположена рядом с одним из ненативных субгеномных промоторов белка оболочки вместо последовательности, кодирующей ненативный

белок оболочки.

Согласно третьему варианту реализации настоящего изобретения предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота вируса растения, в которой ген нативного белка оболочки расположен рядом с его субгеномным промотором, и один или несколько ненативных субгеномных промоторов были встроены в нуклеиновую кислоту вируса. Встроенные ненативные субгеномные промоторы способны транскрибировать или экспрессировать расположенные рядом гены в растении-хозяине и не способны к рекомбинации между собой и с нативными субгеномными промоторами. Последовательности ненативной нуклеиновой кислоты можно встраивать рядом с ненативными субгеномными промоторами вируса растения так, чтобы указанные последовательности транскрибировались или экспрессировались в растении-хозяине под контролем субгеномных промоторов для получения целевого продукта.

Согласно четвертому варианту реализации настоящего изобретения предложена рекомбинантная нуклеиновая кислота вируса растения, как и согласно третьему варианту реализации, за исключением того, что последовательность, кодирующая нативный белок оболочки, заменена последовательностью, кодирующей ненативный белок оболочки.

Вирусные векторы заключаются в капсид белками оболочки, которые кодируются рекомбинантной нуклеиновой кислотой вируса растения, для получения рекомбинантного вируса растения. Рекомбинантную нуклеиновую кислоту вируса растения или рекомбинантный вирус растения используют для инфицирования соответствующих растений-хозяев. Рекомбинантная нуклеиновая кислота вируса растения способна реплицироваться в хозяине, системно распространяться в хозяине и транскрибировать или экспрессировать чужеродный ген или гены (выделенную нуклеиновую кислоту) в хозяине для получения целевого белка.

Помимо сказанного выше, молекулу нуклеиновой кислоты согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения можно также ввести в геном хлоропласта, в результате чего обеспечивается возможность экспрессии в хлоропласте.

Методики введения последовательностей экзогенной нуклеиновой кислоты в геном хлоропластов известны. Данная методика включает в себя следующие процедуры. Сначала клетки растения обрабатывают химическим способом, чтобы уменьшить количество хлоропластов на клетку до приблизительно одного. Затем в клетки посредством бомбардировки частицами вводят экзогенную нуклеиновую кислоту с целью введения в хлоропласта по меньшей мере одной молекулы экзогенной нуклеиновой кислоты. Экзогенную нуклеиновую кислоту выбирают таким способом, чтобы данная нуклеиновая кислота была способна к интеграции в геном хлоропластов посредством гомологичной рекомбинации, что легко осуществляется с помощью собственных ферментов хлоропласта. С данной целью экзогенная нуклеиновая кислота содержит, помимо гена, представляющего интерес, по меньшей мере один фрагмент нуклеиновой кислоты, полученный из генома хлоропластов. Кроме того, экзогенная нуклеиновая кислота содержит селективируемый маркер, который используют в последующих процедурах селекции для подтверждения того, что все или по существу все копии геномов хлоропластов после такой селекции будут содержать экзогенную нуклеиновую кислоту. Дополнительную подробную информацию о данной методике можно найти в патентах США №№ 4,945,050; и 5,693,507, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки. Таким образом, полипептид может нарабатываться с применением системы экспрессии белка хлоропласта и интегрироваться во внутреннюю мембрану хлоропласта.

Таким образом, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия по меньшей мере двух гликозидаз включает введение в растение или клетку растения конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере две гликозидазы, причем каждая по меньшей мере из двух гликозидаз трансляционным способом слита с сигнальным пептидом для совместной локализации во внутриклеточном компартменте растения или клетки растения. Растение или клетку растения можно затем трансформировать полипептидом, представляющим интерес. В качестве альтернативы или дополнительно, клетка растения является трансформированной полипептидом, представляющим интерес, и гликозидазой.

Таким образом, одно растение (трансгенное или нетрансгенное) трансформируют конструкцией нуклеиновой кислоты или системой конструкций, описанными в настоящей заявке.

Однако, поскольку принципы настоящего изобретения относятся к экспрессии множества трансгенов, трансгенные растения или клетки растения могут быть получены посредством скрещивания растений, каждое из которых экспрессирует один трансген (или более), чтобы получить гибридный продукт, содержащий множество трансгенов.

Таким образом, согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения экспрессию трансгенов (например, двух гликозидаз, гликозидазы и полипептида, представляющего интерес, или двух гликозидаз и полипептида, представляющего интерес) осуществляют с применением методик скрещивания и селекции.

Таким образом, экспрессия по меньшей мере двух гликозидаз включает:

(а) экспрессию первой гликозидазы по меньшей мере из двух гликозидаз во внутриклеточном компартменте первого растения;

(b) экспрессию второй гликозидазы по меньшей мере из двух гликозидаз во внутриклеточном ком-

партменте второго растения; и

(с) скрещивание первого растения и второго растения.

В качестве альтернативы, первое растение, экспрессирующее во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одну гликозидазу (например, по меньшей мере две гликозидазы), скрещивают со вторым растением, экспрессирующим полипептид, представляющий интерес.

В качестве альтернативы, первое растение, экспрессирующее во внутриклеточном компартменте слитый полипептид, содержащий связывающийся с клеточной стенкой пептид, трансляционным способом слитый с гетерологичной аффинной группой и необязательно по меньшей мере одной гликозидазой (например, по меньшей мере двумя гликозидазами), скрещивают со вторым растением, экспрессирующим полипептид, представляющий интерес.

Каждое из данных растений может дополнительно содержать последовательности нуклеиновой кислоты для понижающей регуляции активности фукозилтрансферазы или ксилозилтрансферазы в клетке растения.

Скрещивание и размножение можно проводить любыми способами размножения растений, известными в данной области техники, такими как, например, перекрестное опыление первого и второго растений, описанных выше, и селекция растений из последующих поколений, которые экспрессируют и первый, и второй ферменты. Способы размножения растений, используемые в настоящей заявке, хорошо известны специалисту в данной области техники. Обсуждение методик размножения растений см. в руководстве Poehlman (1987) *Breeding Field Crops*. AVI Publication Co., Westport Conn. Множество сельскохозяйственных растений, пригодных для данного способа, размножают посредством методик, в которых используют преимущества способа опыления растения.

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения после трансформации выбирают растение или клетку растения с наивысшим уровнем экспрессии полипептида, представляющего интерес, а также уровнем/активностью гликозидазы (гликозидаз), которые, таким образом, являются пригодными для подтверждения уровней экспрессии в трансформированных клетках растения, трансгенных растениях и тканеспецифичной экспрессии.

Один такой способ заключается в измерении экспрессии полипептида, представляющего интерес, в виде процента от суммарного количества растворимого белка. Один из стандартных анализов представляет собой анализ Брэдфорда, который хорошо

известен специалистам в данной области техники (Bradford, M. 1976. *Anal. Biochem.* 72:248). Биохимическую активность рекомбинантного белка также необходимо измерить и сравнить со стандартом дикого типа. Активность расщепляющих полисахариды ферментов, т.е. гликозидаз, можно определить посредством способов, хорошо известных в данной области техники, таких как использование Fuc-Mu (4-метилумбеллиферил α -L-фукопиранозидазы) и Xyl-Mu (4-метилумбеллиферил-b-D-ксилопиранозидазы) для исследования фукозидазной и ксилозидазной активности, соответственно.

Для обнаружения активности фермента в экстрактах, полученных из каллуса, листьев, фруктов и семян, можно использовать другие анализы активности гликозидазы, которые известны в данной области техники. См. публикации Coughlan et al. ((1988) *J. Biol. Chem.* 263:16631-16636) и Freer ((1993) *J. Biol. Chem.* 268:9337-9342). Кроме того, для оценки целостности белка и уровней экспрессии можно использовать анализ методом вестернблоттинга и ELISA.

Таким образом, в настоящем изобретении предложены трансгенные растения или клетки растения, например, трансгенное растение или клетка растения, трансформированные для экспрессии во внутриклеточном компартменте по меньшей мере двух гликозидаз посредством совместной локализации, или трансгенное растение или клетка растения, трансформированные для экспрессии во внутриклеточном компартменте одной гликозидазы (например, по меньшей мере двух гликозидаз) и полипептида, представляющего интерес, посредством совместной локализации.

В качестве альтернативы или дополнительно, предложены трансгенное растение или клетка растения, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты или систему конструкций нуклеиновой кислоты, описанные в настоящей заявке.

В настоящей заявке трансгенное растение или клетка растения означает растение или клетку растения, содержащего гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая транслируется в по меньшей мере одну гликозидазу и полипептид, представляющий интерес.

После трансформации клетки растения культивируют или растения выращивают в условиях, подходящих для экспрессии трансгена, чтобы получить полипептид, представляющий интерес.

Таким образом, согласно аспекту настоящего изобретения предложен способ получения полипептида, представляющего интерес, причем указанный способ включает: (а) экспрессию в растении или клетке растения, трансформированных для экспрессии во внутриклеточном компартменте по меньшей мере одной гликозидазы, последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, представляющий интерес, таким образом, что указанные по меньшей мере одна гликозидаза и полипептид, представляющий интерес, совместно локализируются в указанном внутриклеточном компартменте растения или клетки растения, и впоследствии (b) выделение полипептида, представляющего интерес.

В качестве альтернативы или дополнительно предложен способ получения полипептида, представ-

ляющего интерес, причем указанный способ включает:

(a) введение в растение или клетку растения конструкций нуклеиновой кислоты, описанных в настоящей заявке; и впоследствии

(b) выделение полипептида, представляющего интерес.

Таким образом, клетки растения могут представлять собой культивируемые клетки, клетки в культивируемой ткани или в культивируемых органах или клетки в растении. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки растения представляют собой культивируемые клетки или клетки в культивируемой ткани или в культивируемых органах. Согласно следующим вариантам реализации настоящего изобретения клетки растения представляют собой клетки любого типа растения, который используют при переносе генов. Клетку растения можно выращивать как часть целого растения или, в качестве альтернативы, в культуре клеток растения.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения клетки растения выращивают в суспензионной культуре клеток растения. В настоящей заявке термин "суспензионная культура" означает выращивание клеток отдельно от организма. Суспензионную культуру можно обеспечить посредством применения жидкой среды ("суспензионной среды"). Суспензионная культура может означать выращивание клеток в трехмерной культуре в жидкой питательной среде, например, но не ограничиваясь указанным, выращивание в суспензионной культуре в биореакторе. Способы и устройства, подходящие для выращивания клеток растения согласно настоящему изобретению в суспензионной культуре клеток растения, подробно описаны, например, в публикации PCT WO2008/135991, патенте США № 6,391,683, заявке на патент США № 10/784,295; международных публикациях патентов PCT №№ WO 2004/091475, WO 2005/080544 и WO 2006/040761, все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Также предусмотрены культуры "бородатых" корней, выращиваемые в суспензионной культуре, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения - в биореакторах.

Таким образом, настоящее изобретение включает растения или культуры растений, экспрессирующие последовательности нуклеиновой кислоты, для получения рекомбинантного полипептида, представляющего интерес. После экспрессии в клетке растения или в целом растении уровень полипептида, представляющего интерес, который кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, можно определить способами, хорошо известными в данной области техники, такими как способы, описанные в настоящей заявке выше или хорошо известные в данной области техники.

Затем полипептид, представляющий интерес, выделяют из растения или клетки растения. Степень выделения зависит от внутриклеточного компартмента, а также от предполагаемого использования. Как правило, получают экстракт клеток, который содержит полипептид, представляющий интерес. Экстракт обычно подвергают осветлению для удаления контаминантов клеток-хозяев и остатков культуры.

После осветления осветленный экстракт можно подвергнуть последующей обработке, использовать без обработки или хранить до последующего использования. Согласно некоторым вариантам реализации некоторых аспектов настоящего изобретения после экстракции и осветления экстракта полипептид, представляющий интерес, можно дополнительно выделить, что также называют очисткой. Очистку можно проводить методом хроматографии, например, ионообменной, гель-фильтрации, ВЭЖХ или ультрафильтрации, противоточного диализа, аффинной очистки, иммунной очистки и т.п. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, представляет собой очищенный полипептид, который характеризуется чистотой по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 91,5%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 92,5%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 93,1%, по меньшей мере 93,2%, по меньшей мере 93,3%, по меньшей мере 93,4%, по меньшей мере 93,5%, по меньшей мере 93,6%, по меньшей мере 93,7%, по меньшей мере 93,8%, по меньшей мере 93,9%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 94,5%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,2%, по меньшей мере 99,3%, по меньшей мере 99,4%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,6%, по меньшей мере 99,7%, по меньшей мере 99,8%, по меньшей мере 99,9%, в диапазоне по меньшей мере 92,0-99,8% или по меньшей мере 95-99%, или по меньшей мере 97-99%, или по меньшей мере 98-99,5 или чистотой 100%. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения чистоту полипептида, представляющего интерес, измеряют методом ВЭЖХ.

Чистоту полипептида, представляющего интерес, экспрессированного в растении, можно выразить в виде массового процента от общего содержания или в виде массового процента примесей. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения суммарный массовый процент всех белков, отличных от полипептида, представляющего интерес, в композиции, которую используют в способах согласно настоящему изобретению, составляет менее 10%, 5%, менее 1% и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, менее 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, а согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения - менее 0,1%. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения в композиции полностью отсутствуют белки клеток-хозяев, отличные от полипептида, представляющего интерес. Таким образом, композиции, которые вводят в способы согласно настоящему изобретению, как правило, содержат в виде массового процента белка по меньшей мере 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, по меньшей мере 99,5%, полипептида, представляющего интерес, или активной части указанного полипептида.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция полипептида, представляющего интерес, экспрессированного в растении, содержит примеси, полученные из клетки растения-хозяина, такие как, но не ограничиваясь указанными, нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды, аминокислоты, олигопептиды и полипептиды, гликаны и другие углеводы, липиды и т.п. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения примеси, происходящие из клетки-хозяина, содержат биологически активные молекулы, такие как ферменты. Белки клетки-хозяина можно контролировать, например, методом ВЭЖХ, с применением антител, специфичных к белку клетки-хозяина, нарботанных против фракций клетки растения из клетки растения, не содержащего гена полипептида, представляющего интерес, которую культивируют в аналогичных условиях, а также с применением других анализов, известных в данной области техники.

Полипептид характеризуется уменьшенной иммуногенностью у субъектов-людей по сравнению с тем же белком, полученным в системе растения, которая содержит систему гликозилирования дикого типа.

Полипептид, полученный таким способом, можно использовать в чистом виде или в фармацевтической композиции, в которой данный пептид смешивают с подходящими носителями или вспомогательными веществами.

В качестве альтернативы, данный полипептид можно упаковать в набор или изделие для исследовательского, косметического или медицинского применения.

Предполагают, что в течение жизни пациента будет разработано множество относящихся к делу полипептидов, представляющих интерес, а также гликозидаз, и объем данных терминов по умолчанию включает все такие новые технологии.

Термины "содержит", "содержащий", "включает", "включая", "имеющий" и термины, родственные указанным терминам, означают "включая, но не ограничиваясь указанными".

Термин "состоящий из" означает "включая, и не ограничиваясь указанными".

Термин "состоящий по существу из" означает, что композиция, способ или структура может содержать дополнительные компоненты, этапы и/или части, но исключительно в том случае, если дополнительные компоненты, этапы и/или части существенно не изменяют основные и новые характеристики заявленной композиции, способа или структуры.

В настоящей заявке формы единственного числа включают упоминания объектов во множественном числе, если контекст однозначно не диктует обратное. Например, термин "соединение" или "по меньшей мере одно соединение" может включать множество соединений, в том числе смеси указанных соединений.

На всем протяжении настоящей заявки различные варианты реализации настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона используется исключительно для удобства и краткости, и его не следует истолковывать как жесткое ограничение объема настоящего изобретения. Соответственно, описание диапазона следует считать конкретно раскрывающим все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах данного диапазона. Например, описание диапазона "от 1 до 6" подразумевает конкретное раскрытие поддиапазонов, таких как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числа в пределах данного диапазона, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Данное правило применяется независимо от ширины диапазона.

Всякий раз, когда в настоящей заявке приводится числовой диапазон, данный диапазон может включать любое процитированное число (целое или дробное) в пределах указанного диапазона. Фразы "находящийся в диапазоне/находится в диапазоне между" первым указанным числом и вторым указанным числом и "находящийся в диапазоне/находится в диапазоне от" первого указанного числа "до" второго указанного числа используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и предназначены включать первое и второе указанные числа, а также все дробные и целые числительные между указанными числами.

В настоящей заявке термин "способ" означает методы, средства, методики и процедуры для осуществления данной задачи, включая, но не ограничиваясь указанными, таковые методы, средства, методики и процедуры, которые являются известными или которые могут легко разработать практикующие специалисты в химической, фармакологической, биологической, биохимической и медицинской областях техники на основании известных методов, средств, методик и процедур.

В настоящей заявке термин "лечение" включает подавление, по существу ингибирование, замедление или обратное развитие прогрессирования состояния, по существу облегчение клинических или эстетических симптомов состояния или по существу предотвращение возникновения клинических или эстетических симптомов состояния.

Когда упоминаются конкретные перечни последовательностей, такое упоминание следует понимать как также включающее последовательности, которые, по существу, соответствуют комплементарной

последовательности указанных последовательностей, поскольку содержат незначительные изменения последовательности, которые являются следствием, например, ошибок секвенирования, ошибок клонирования или других изменений, которые приводят к замене оснований, делеции оснований или добавлению оснований, при условии, что частота таких изменений составляет менее 1 на 50 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее 1 на 100 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее 1 на 200 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее 1 на 500 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее 1 на 1000 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее 1 на 5000 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее 1 на 10000 нуклеотидов.

Следует принимать во внимание, что определенные свойства настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов реализации настоящего изобретения, могут быть также предложены в комбинации в отдельном варианте реализации. И наоборот, различные свойства настоящего изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта реализации настоящего изобретения, могут быть также предложены отдельно или в любой подходящей подкомбинации либо в качестве подходящих в любом другом описанном варианте реализации настоящего изобретения. Определенные свойства, описанные в контексте различных вариантов реализации настоящего изобретения, не следует истолковывать как существенные свойства данных вариантов реализации, если только вариант реализации является нефункциональным без указанных элементов.

Различные варианты реализации и аспекты настоящего изобретения, описанные в настоящей заявке выше и заявленные в разделе формулы изобретения ниже, находят экспериментальное подтверждение в следующих примерах.

Примеры

Сейчас приводится ссылка на следующие примеры, которые вместе с приведенным выше описанием иллюстрируют настоящее изобретения неограничивающим способом.

Как правило, номенклатура, используемая в настоящей заявке, и лабораторные процедуры, применяемые в настоящем изобретении, включают молекулярные, биохимические, микробиологические методики и методики рекомбинантной ДНК. Такие методики подробно объяснены в литературе. См., например, руководства "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); методологии, представленные в патентах США №№ 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 и 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); доступные варианты иммуноанализа подробно описаны в патентной и научной литературе, см., например, патенты США №№ 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 и 5,281,521; руководства "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I, ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) и "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization -A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Другие общие ссылки приведены по тексту данного документа. Процедуры, описанные в настоящей заявке, как считают, являются хорошо известными в данной области техники и приведены для удобства читателя. Вся информация, содержащаяся в настоящей заявке, включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Пример 1. Клонирование Авастина (бевацизумаба) и Хумиры (адалimumаба) в бинарном векторе pBINPLUS для трансформации табака, опосредованной агробактериями.

Рестрикторные ферменты заказывали в компании Thermo Scientific.

Для экспрессии в вакуоли использовали кассету Rubisco-vas, содержащую промотор Rubisco (SEQ ID NO: 26), вакуолярный сигнальный пептид (SEQ ID NO: 17 и 20) и терминатор Rubisco (SEQ ID NO: 27).

I. Сначала коммерческую плазмиду (pUC57 от Genscript), несущую синтетические гены, разрезали рестрикторными ферментами MunI и NotI для получения четырех вставок ДНК которые кодировали: тяжелую цепь Хумиры (SEQ ID NO: 1 и 2), легкую цепь Хумиры (SEQ ID NO: 3 и 4), тяжелую цепь Авастина (SEQ ID NO: 5 и 6) и легкую цепь Авастина (SEQ ID NO: 7 и 8). Затем вставки лигировали в плазмиду pUC18, содержащую кассету Rubisco-vas, которую также разрезали рестрикторными ферментами MunI и NotI (фиг. 1A-B) для получения четырех различных конструкций: pUC18 Rb-тяжелая цепь Хумиры, pUC18 Rb-легкая цепь Хумиры, pUC18 Rb-тяжелая цепь Авастина и pUC18 Rb-легкая цепь Авастина,

в которых сигнал вакуолярного нацеливания размещали с N-конца от кодирующей последовательности (SEQ ID NO: 17).

II. На следующем этапе конструировали бинарные векторы pBINPLUS с обеими, тяжелой и легкой, цепями каждого MAT с промотором и терминатором Rubisco: pBINPLUS-Хумира (фиг. 2А-С) и pBINPLUS-Авастин (фиг. 3А-С).

Для получения pBINPLUS-Хумира применяли два этапа лигирования. На первом этапе pUC18 Rb-легкая цепь Хумира разрезали рестрикционным ферментом HindIII и клонировали в векторе pBINPLUS, который разрезали рестрикционным ферментом HindIII, получая плазмиду pBINPLUS Rb-легкая цепь Хумира. На втором этапе pUC18 Rb-тяжелая цепь Хумира разрезали рестрикционными ферментами EcoRI и SacI и клонировали с применением тех же ферментов в pBINPLUS Rb-легкая цепь Хумира для получения pBINPLUS-Хумира с обеими цепями (фиг. 2С).

Конструирование pBINPLUS-Авастин проводили аналогично конструированию pBINPLUS-Хумира (фиг. 3А-С). Сначала Rb-тяжелая цепь Авастина клонировали в векторе pBINPLUS с помощью HindIII и получали pBINPLUS Rb-тяжелая цепь Авастина (фиг. 3В). Затем Rb-легкая цепь Авастина клонировали в pBINPLUS Rb-тяжелая цепь Авастина с помощью рестрикционных ферментов EcoRI и SacI (фиг. 3С).

Как показано на фиг. 2С и 3С, каждая из кодирующих последовательностей (тяжелой цепи и легкой цепи) трансляционным способом слита на N-конце с вакуолярным сигнальным пептидом, полученным из Rubisco.

III. Кассета Rubisco-vas с Хумирой (кодон-оптимизированной с помощью сервиса Entelechon) - промотором Rubisco, вакуолярным сигнальным пептидом (SEQ ID NO: 18, 19 и 20) и терминатором Rubisco.

Последовательность ДНК тяжелой и легкой цепей Хумира оптимизировали посредством программного обеспечения для оптимизации Leto (с помощью сервиса Entelechon), и гены (SEQ ID NO: 15 и 16) клонировали в кассете Rubisco с вакуолярными сигналами, оптимизированными посредством программного обеспечения Leto (SEQ ID NO: 18 и 19). Синтетический фрагмент ДНК, содержащий вакуолярный SP1 (посл. 18, 20), тяжелую цепь Хумира (SEQ ID NO: 15, 2), терминатор Rubisco, промотор Rubisco, вакуолярный сигнал SP2 (посл. 19, 20), легкую цепь Хумира (посл. 16, 2), встраивали в кассету экспрессии Rubisco с применением ферментов NcoI и NotI, таким образом, получая кассету экспрессии в pUC18 с обеими цепями Хумира (SEQ ID NO: 25) (фиг. 4А-В). Двойную кассету клонировали в pBINPLUS.

IV. Кассета 35S-vas - промотор 35S CaMV, вакуолярный сигнальный пептид (SEQ ID NO: 17 и 20) и терминатор NOS (нопалинсинтаза) (SEQ ID NO: 28).

Гены, кодирующие тяжелую (SEQ ID NO: 1) и легкую цепи (SEQ ID NO: 3) Хумира, клонировали в кассете 35S-vas, в которой данные гены сливали в рамке считывания с вакуолярным сигнальным пептидом, регулируемым промотором 35S. Кассеты экспрессии конструировали в pUC18, а затем трансформировали кассетами бинарную плазмиду pBINPLUS (SEQ ID NO: 1 и 3). Получали конструкции pUC18 35S-vas-тяжелая цепь Хумира, pUC18 35S-vas-легкая цепь Хумира, pBIN 35S-vas-тяжелая цепь Хумира, pBIN 35S-vas-легкая цепь Хумира.

V. Для экспрессии в апопласте использовали кассету Rubisco-Cell, содержащую промотор Rubisco, короткий сигнальный пептид Cell (SEQ ID NO: 21 и 22) и терминатор Rubisco.

В кассете Rubisco, содержащей MAT, вакуолярный сигнальный пептид (фиг. 11А-В) заменяли сигнальным пептидом Cell с помощью рестрикционных ферментов NcoI/MunI и последующего лигирования для получения конструкций, экспрессирующих цепи MAT в апопласте. Кассеты экспрессии конструировали в pUC18, а затем трансформировали кассетами бинарную плазмиду pBINPLUS. Получали конструкции pUC18 RBc-Cell-тяжелая цепь Хумира, pUC18 RBc-Cell-легкая цепь Хумира, pBIN RBc-Cell-тяжелая цепь Хумира, pBIN RBc-Cell-легкая цепь Хумира (SEQ ID NO: 1 и 3).

VI. Кассета 35S-Cell - промотор 35S CaMV, сигнальный пептид Cell (SEQ ID NO: 23 и 24) и терминатор NOS (нопалинсинтаза) (SEQ ID NO: 28).

Гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи Хумира, клонировали в кассете 35S-Cell, в которой данные гены сливали в рамке считывания с сигнальным пептидом Cell ниже от промотора 35S. Кассеты экспрессии конструировали в pUC18, а затем трансформировали кассетами бинарную плазмиду pBINPLUS. Разрабатывали конструкции pUC18 35S-Cell-тяжелая цепь Хумира, pUC18 35S-Cell-легкая цепь Хумира, pBIN 35S-Cell-тяжелая цепь Хумира, pBIN 35S-Cell-легкая цепь Хумира (SEQ ID NO: 1 и 3).

Пример 2. Клонирование CBD-PrtA, β -ксилозидазы, α -фукозидазы в бинарном векторе pBINPLUS для трансформации табака, опосредованной агробактериями.

I. Для вакуолярной экспрессии: кассета 35S-Vas - промотор 35S CaMV, вакуолярный сигнальный пептид (SEQ ID NO: 17 и 20) и терминатор NOS (нопалинсинтаза) (SEQ ID NO: 28). pUC57 с кассетой экспрессии CBD-PrtA (SEQ ID NO: 9 и 10).

Слияние генов домена, кодирующего CBD (SEQ ID NO: 29), и домена, кодирующего белок А (SEQ ID NO: 30), под контролем промотора 35S, вакуолярного сигнального пептида и терминатора Nos разрезали рестрикционными ферментами PstI, SacI и клонировали в плазмиде pUC18 (фиг. 5А-В). Кассету экспрессии в pUC18 разрезали рестрикционными ферментами EcoRI и клонировали в pBINPLUS (фиг.

5B-C). Гены, которые кодируют ксилозидазу (XlnD из *A. Niger*, SEQ ID NO: 11, 12) и фукозидазу (α -1,3/4-фукозидазу из *Streptomyces* sp., SEQ ID NO: 13, 14), разрезанные рестрикционными ферментами *MunI* и *NotI*, клонировали в касете экспрессии вместо CBD-PrtA (фиг. 6A-C). Получали конструкции pUC18 35S-ксилозидаза и pUC18 35S-фукозидаза. Кассеты экспрессии клонировали в бинарной плазмиде pBINPLUS с помощью рестрикционных ферментов *SdaI* и *SacI* для получения плазмид pBINPLUS 35S-ксилозидаза и pBINPLUS 35S-фукозидаза (каждая из которых была направлена в вакуоль посредством вакуолярного SP).

II. Для экспрессии в апопласте: касета 35S-Cell - промотор 35S CaMV, сигнальный пептид Cell (SEQ ID NO: 23 и 24) и терминатор NOS (нопалинсинтаза) (SEQ ID NO: 28).

Получали две конструкции для экспрессии ксилозидазы и фукозидазы в апопласте. Вакуолярный сигнальный пептид заменяли сигнальным пептидом Cell с применением сайтов рестрикции *NcoI*, *MunI* для получения pUC18 35S-Cell-ксилозидаза, pUC18 35S-Cell-фукозидаза, pBINPLUS 35S-Cell-ксилозидаза, pBINPLUS-35S-Cell-фукозидаза.

III. Трансформация *E. Coli*.

Трансформацию осуществляли с применением теплового шока. Для трансформации использовали 50 мкл компетентных клеток DH5 α , и 100 мкл компетентных клеток использовали для лигирования. 50 нг циклической ДНК добавляли в клетки *E. coli*, которые затем оттаивали на льду в течение 20 мин. Тепловой шок осуществляли при температуре 42°C в течение 1 мин, а затем снова переносили клетки на лед на 5 мин. Добавляли 1 мл LB и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C. Клетки бактерий культивировали на чашках с LB (с добавлением соответствующего антибиотика, например, ампициллина или канамицина, в зависимости от гена устойчивости в конструкции), 100 мкл для трансформации и 1000 мкл для лигирования. Клетки инкубировали в течение ночи.

IV. Трансформация агробактериями.

Электропорацию проводили в кюветах с величиной зазора 1 мм с применением компетентных *Agrobacterium tumefaciens* (штамм LBA 4404). Условия электропорации устанавливали следующим образом: 25 мкФ, 2,5 киловольт, 200 Ом. Клетки агробактерий оттаивали на льду. 1 мкл препарата ДНК малого масштаба быстро перемешивали с 80 мкл бактерий и переносили в предварительно охлажденную кювету. После электропорации добавляли 1 мл стерильной среды LB и переносили в исследуемую пробирку. Бактерии инкубировали при температуре 28°C в течение 3-4 ч при роторном вращении. После этого бактерии высевали на селективную среду LB с ампициллином или канамицином.

V. Получение трансгенных растений табака.

Растения табака выращивали в стерильных условиях в течение приблизительно 4-5 недель. Посевной материал агробактерий готовили в 25 мл среды LB с добавлением 50 мг/мл канамицина. Клетки инкубировали в течение 48 ч во встряхивателе-инкубаторе при температуре 28°C до стационарной фазы. Затем посевные материалы центрифугировали в течение 10 мин при 5500 об./мин при комнатной температуре. Верхнюю среду отбрасывали, осадок ресуспендировали в стерильной жидкой среде MS (4,4 г/л среды Мурасиге-Скуга (Murashige and Skoog, MS), содержащей витамины от Duchefa (кат. № M0222.0050), 30 г/л сахарозы от J.T. Baker (кат. №4072-05), pH 5,8), до конечной мутности, которая соответствовала О.П. (оптической плотности) при 600 нм, составляющей 0,5. Приблизительно 10 мл MS, содержащей бактерии, переносили на стерильную чашку Петри. Зеленые листья растений табака отрезали с помощью стерильных пинцета и скальпеля и инкубировали в течение 5 мин с агробактериями в суспензии MS. Затем листья переносили в чашки Петри, которые содержали твердую среду MS (жидкую среду с 0,7% агаром для растений от Duchefa (кат. № P1001.1000)), содержащую 0,8 мл/л IAA (индолилуксусной кислоты) и 2 мл/л кинетина). Чашки инкубировали при температуре 28°C в темноте в течение 48 ч. Через два дня листья переносили в чашки Петри, содержащие селективную среду MS (0,8 мл/л IAA и 2 мл/л кинетина + 400 мг/л карбенициллина и 100 мг/л канамицина). Чашки помещали в освещенное помещение на 3 недели, и среду меняли каждые 10 дней. В течение этого периода времени из листьев образовались проростки. Проростки переносили в чашки Петри, содержащие среду MS с 100 мг/л канамицина и 400 мг/л карбенициллина, в тех же освещенных условиях. Проростки, которые образовали корни, переносили в почву и накрывали нейлоном на два дня. Затем растения переносили в горшки с землей для последующего анализа.

Пример 3. Экспрессия и активность CBD-PrtA в табаке.

Экспрессию CBD-PrtA в табаке анализировали методом вестернблоттинга с применением антитела против CBD.

ДСН-ПААГ и вестернблоттинг.

Анализ методом ДСН-ПААГ проводили с применением системы гелей "Mini protein" (Hercules, Калифорния, США). Анализ методом вестернблоттинга проводили, как описано ранее (Ausubel et al 1987). Образцы белка наносили на систему 12,5% ПААГ с ДСН. После проведения электрофореза белок переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences, Англия) с применением системы "Mini trans blot cell" (Hercules, Калифорния, США) в течение 2 ч в охлажденном буфере с 10% этанола при постоянном токе 150 В. После переноса мембрану блокировали 4% обезжиренным молоком в течение 0,5 ч

при к.т. Мембраны подвергали воздействию первичного антитела в течение ночи при к.т., а затем промывали 3 раза TBST. Воздействие вторичного антитела (конъюгированного со щелочной фосфатазой (ЩФ)) осуществляли в течение 2 ч, после чего проводили три дополнительные промывки. Наконец, мембрану промывали и визуализировали с применением субстратов 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфата (BCIP) и нитроголубого тетразолия (NBT) (Sigma). Раствор субстратов BCIP/NBT получали посредством добавления 33 мл исходного раствора BCIP с концентрацией 50 мг/мл и 66 мкл исходного раствора NBT с концентрацией 50 мг/мл к 10 мл буфера для субстрата (100 мМ Tris, 100 мМ хлорид натрия и 5 мМ MgCl₂, pH 9,5, pH корректировали HCl).

В частности, в случае фиг. 7А - 100 мг ткани растения гомогенизировали в SAB (соотношение масса/объем 1:1), осадок отделяли от жидкости посредством центрифугирования, и 30 мкл жидкости и осадка наносили на ДСН-ПААГ, затем проводили анализ методом вестернблоттинга с применением антитела против CBD. В случае фиг. 7В - 100 мг ткани растения табака, экспрессирующего CBD-PrtA, гомогенизировали в 100 мкл буфера 1 (100 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 250 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, полный ингибитор протеазы) с 5 нг и 10 нг адалимумаба. Осадок растения отделяли от жидкости и промывали. Осадок экстракта наносили на нитроцеллюлозную мембрану, и МАТ обнаруживали с применением антитела против IgG человека, меченного ПХ.

Таким образом, как показано, белок обнаруживали в осадке ткани растения, и размер белка составлял приблизительно 55 кДа, что соответствует размеру слитого белка CBD-PrtA (фиг. 7А). Фиг. 7В демонстрирует, что CBD-PrtA экспрессируется в табаке и связывается с IgG человека (фиг. 7В).

Пример 4.

Ксилозидаза и фукозидаза экспрессируются и являются активными в растениях табака.

I. Анализ активности фукозидазы и ксилозидазы.

Активность фукозидазы и ксилозидазы исследовали в черном 96-лучночном планшете (Nunc). Для каждой реакции отбирали 0,5 мм² ткани свежих листьев табака и немедленно инкубировали в 200 мкл 50 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 5,0. Добавляли 10 мкл 0,15 мМ субстрата, и образцы инкубировали в течение 1 ч при температуре 65°C. 4-метилумбеллиферил β-D-фукопиранозид (Mu-Fuc) (Sigma Aldrich, M5510) и 4-метилумбеллиферил-β-D-ксилопиранозид (MU-Xyl) (Sigma Aldrich, M7008) использовали в качестве субстратов фукозидазы и ксилозидазы, соответственно. Реакцию останавливали добавлением 21 мкл NaOH (конечная концентрация 100 мМ). Флуоресценцию измеряли при длине волны возбуждения 360 нм, эмульсия 460 нм.

II. Количественное определение ферментативной активности.

Ткани растения от линий трансгенного растения, экспрессирующих фукозидазу и ксилозидазу, экстрагировали посредством измельчения листьев в жидком азоте с ацетатным буфером (50 мМ ацетат натрия, 15 мМ метабисульфит калия, полный (Sigma Aldrich) коктейль ингибиторов протеазы (1 таблетка на 100 мл)). Экстракты инкубировали в течение 1 часа при к.т., центрифугировали при 11300 г в течение 10 мин при температуре 4°C, растворимую фракцию отделяли от осадка и фильтровали через фильтр из поливинилидендифторида (PVDF) с размером пор 0,2 мкм. Растворимые фракции разводили в 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,0, до концентраций, варьирующих от 0 до 5,5 мкл/лунку в случае ксилозидазы и от 0 до 70 мкл/лунку в случае фукозидазы. Исследовали способность ферментов гидролизовать 10 мкл Mu-Fuc в случае фукозидазы и 10 мкл MU-Xyl в случае ксилозидазы, и активность рассчитывали с применением калибровочной кривой 4-метилумбеллиферона. Калибровочную кривую 4-метилумбеллиферона получали с применением коммерчески доступного 4-метилумбеллиферона, который разводили до конечного диапазона концентраций 0,01 - 10 мкг/мл. Получали уравнение линии тренда, и рассчитывали единицы флуоресценции (ЕФ) на массу 4-метилумбеллиферона.

Расчет единиц фермента на 1 г ткани растения проводили с применением следующего уравнения:

$$\frac{\text{единицы фермента}}{1 \text{ г ткани листа}} = \frac{\text{активность на 1 г в 1 мин. (ЕФ)}}{\text{флуоресценция 1 мкмоль 4 – метилумбеллиферона (ЕФ)}}$$

Результаты.

Измеряли активность ксилозидазы и фукозидазы в рекомбинантных растениях табака. Было определено количество растений табака с существенной экспрессией рекомбинантных ксилозидазы и фукозидазы (фиг. 8).

Условия для удаления остатков ксилозы и фукозы определяли посредством обработки 1,5 мл экстрактов растения, экспрессирующего β-ксилозидазу и α-фукозидазу, 4,8 мкг антитела адалимумаба растительного происхождения (PDA). Реакции проводили в 15 мМ буфере ФБР (фосфатный буферный раствор), pH 7,5, в течение 2, 3 и 4 ч при к.т. Использовали различные типы обработки: β-ксилозидазу и α-фукозидазу сами по себе (данные не показаны), а также сочетание β-ксилозидазы и α-фукозидазы (фиг. 13). Каждый вариант обработки анализировали с применением трех различных типов антител: против ксилозы, против фукозы и против IgG человека.

Было установлено, что отдельная обработка β-ксилозидазой или α-фукозидазой являлась менее эффективной (не показано), чем совместная обработка обоими ферментами. При совместной обработке наилучшие результаты были получены через 2 часа инкубации (фиг. 13, 2 ч). Почти все остатки ксилозы

и фукозы были отщеплены, в то время как деградация PDA являлась наименьшей (фиг. 13 с антителами против IgG человека). Положительный контроль - не обработанный PDA (H) - демонстрирует однозначное связывание как с антителом против ксилозы, так и с антителом против фукозы. Обнаружение с использованием антител против IgG человека демонстрирует доказательство присутствия PDA при всех вариантах обработки.

Примкр 5. Адалимумаб экспрессируется и является активным в растениях табака.

I. Анализ активности адалимумаба.

Анализ активности адалимумаба проводили в компании Harlan Biotech Ltd., Израиль. Вкратце, активность исследовали посредством нейтрализации антителом цитотоксичности, опосредованной ФНО α , на линии клеток фибробластов L929. Два 96-луночных планшета для культуры тканей заполняли 100 мкл суспензии клеток L929 при плотности $3,5 \times 10^5$ клеток/мл и инкубировали в течение ночи во влажной камере при температуре 37°C и содержании CO $_2$ 5%. Через 12 ч инкубации добавляли рчФНО α и актиномицин D до конечной концентрации 1 нг/мл рчФНО α и 1 мкг/мл актиномицина D, после чего дополнительно инкубировали во влажной камере в течение 2 ч при температуре 37°C и содержании CO $_2$ 5%. Затем первый планшет (экспериментальный планшет) инкубировали с адалимумабом растительного происхождения (PDA) в диапазоне концентраций 0 - 2000 нг/мл, а второй планшет (контрольный планшет) инкубировали с коммерческой Хумирой в конечной концентрации в диапазоне 0-2000 нг/мл. В каждую лунку добавляли раствор МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Мечение проводили в течение 4 ч при температуре 37°C. После инкубации раствор МТТ отбрасывали, и в каждую лунку добавляли 100 мкл изопропанола в течение менее 30 мин. Сигнал поглощения измеряли в спектрофотометре для микропланшетов (Multiscan® FC; Thermo Scientific) с фильтрами длины волны 570-650 нм.

II. Анализ адалимумаба методом ELISA.

Приготовление образца растения проводили следующим образом: шесть листовых дисков отбирали непосредственно в предварительно взвешенную пробирку Eppendorf, содержащую буфер для измельчения (100 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM EDTA, 1 mM PMBS), посредством отсечения листа растения крышечкой пробирки Eppendorf объемом 1,5 мл, и пробирку немедленно помещали на лед. Проводили отбор листьев с нижней, средней и верхней частей растения. Затем образцы взвешивали и перемалывали в течение 30 с с применением пластичного раствора при 500 об./мин. Растворимую фракцию экстрагировали посредством центрифугирования в течение 15 мин при 11000 об./мин при температуре 4°C. Перед нанесением на планшет для ELISA образцы разводили в 500 раз. Калибровочную кривую получали с применением коммерчески доступной Хумиры. Готовили серийные разведения адалимумаба до конечной концентрации в диапазоне 0-100 нг/мл.

ELISA: необработанный 96-луночный планшет сенсibilизировали 100 мкл раствора рчФНО α в концентрации 100 нг/мл, а затем тщательно промывали. Образцы для калибровочной кривой и исследуемые образцы наносили в двух повторах и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C. Планшет промывали 4 раза промывочным раствором TBST, а затем наносили антитела козы против IgG человека, конъюгированные с ПХ, в соотношении 1:50000 и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C. После 4 промывок TBST добавляли 100 мкл раствора субстрата ТМБ (тетраметилбензидина). Реакцию останавливали через 20 минут добавлением 100 мкл 0,5 н H $_2$ SO $_4$. Сигнал поглощения измеряли на считывающем устройстве для микропланшетов при длине волны 450 нм.

Результаты.

Адалимубмаб, экспрессированный в апопласте, очищали из 40 г гомогенизированных листьев табака на колонке с белком А. Дорожки 2-5: 30 мкл элюированных фракций анализировали методом ДСН-ПААГ, две полосы, соответствующие тяжелой (55 кДа) и легкой цепям (25 кДа) антитела, наблюдаются в дорожках 3 и 4 фиг. 9 (промотор и терминатор RUBISCO с сигнальным пептидом Cell (RbCell)).

Фиг. 10: Адалимумаб растительного происхождения демонстрирует активность *in vitro*, аналогичную коммерческим терапевтическим средствам. Планшеты для ELISA, предварительно сенсibilизированные ФНО α , инкубировали с коммерческими терапевтическими средствами (серый график) и адалимумабом растительного происхождения (красный график), связывание МАТ с мишенью обнаруживали с применением антител против IgG человека, меченных ПХ.

В отдельном эксперименте количественно определяли выход адалимумаба, экспрессированного в апопласте. Адалимумаб растительного происхождения (PDA) очищали из трех различных трансгенных линий растений табака со стабильной экспрессией PDA и анализировали методом ДСН-ПААГ и вестернблоттинга, а также ELISA. Вестернблоттинг (фиг. 14) продемонстрировал полосы молекулярной массой приблизительно 55 и 25 кДа, соответствующие тяжелой и легкой цепям адалимумаба, соответственно. Количественное определение методом ELISA (фиг. 15) продемонстрировало, что растения 1, 2 и 3 характеризовались выходом 4,88, 2,21 и 3,56 мг PDA/кг листьев, соответственно. Результаты ВБ и ELISA соответствовали друг другу, при этом полосы ДСН-ПААГ соответствовали по интенсивности результатам количественного определения методом ELISA.

Биологическую активность PDA - нейтрализацию рчФНО α - исследовали по сравнению с биологической активностью коммерчески доступного адалимумаба (Хумиры) на линии клеток L929. PDA демон-

стрирует практически такие же результаты, что и коммерческая Хумира (фиг. 16). В случае PDA наблюдали тенденцию в сторону уменьшения.

Пример 6. Очистка МАТ растительного происхождения в полевых условиях посредством слияния белка А с трансмембранным доменом (transmembrane domain, TMD) или целлюлозосвязывающим доменом (CBD).

Белок А - TMD.

Авторы настоящего изобретения также использовали слияние белка А с заякоряющимся в мембрану доменом для присоединения МАТ к плазматической мембране клеток растений в качестве первого этапа процесса очистки. МАТ связывалось с белком А, который был заякорен в плазматическую мембрану посредством TMD. Таким образом, после сбора растения и отделения осадка от жидкости МАТ обнаруживалось во фракции осадка. - НЕ РАЗРУШИЛИ ЛИ ВЫ КЛЕТКИ? КАКОЙ SP БУДЕТ СОДЕРЖАТЬ АТ? Нет, процедура являлась такой же, как в случае CBD-белок А, но вместо CBD мы использовали TMD, отсоединение МАТ проводили в результате изменения рН. SP представляет собой Cell для нацеливания в апопласт.

Конструкции представлены на фиг. 12А.

Схематичное изображение конструкций представлено на фиг. 12А-С. Трансмембранный домен посредством линкера присоединяли к белку А (SEQ ID NO: 30-36). Полученные в результате последовательности, оптимизированные для экспрессии белка в клетках растений, являются таковыми, как представлено в SEQ ID NO: 35-36.

Сначала конструкцию PrtA-TMD встраивали в cassette экспрессии 35S в плазмиду pUC18 с применением рестрикционных сайтов *MunI* и *SacI*. Затем полную cassette переносили в бинарную плазмиду pBINPLUS.

Белок А - CBD.

С целью получения двойного трансгенного растения, экспрессирующего адалимумаб и CBD-белок А, подходящий трансген, экспрессирующий адалимумаб (экспрессируемый в апопласте), временно трансфицировали конструкцией CBD-белок А. Временную экспрессию проводили, как описано в публикации Li et al., 2008 *Plant Physiol.* 147(4): 1675-1689. Вкратце, в 5 мл LB с 100 мкг/мл канамицина инокулировали одну отдельную колонию агробактерий и выращивали в течение ночи при температуре 28°C. 1 мл культуры, выращиваемой в течение ночи, использовали для инокуляции 25 мл LB (с 100 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл ацетосирингона). Инокулят выращивали в течение ночи при температуре 28°C до конечной О.П. при 600 нм, составляющей 0,4. Фильтрацию проводили с помощью шприца объемом 5 мл.

Приготовление ткани растения для анализа связывания *in vitro*: ткань растения перемалывали в буфере для связывания (20 mM фосфат натрия, pH 7,5) или буфере для измельчения (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM EDTA, 1 mM PMBS), масс./об., с 50 мг целлюлозы. Экстракты инкубировали в течение 1 ч при температуре 4°C для лучшего связывания. Отделение осадка от растворимой фракции проводили посредством центрифугирования в течение 30 мин при 10000 об./мин. Растворимую фракцию отбирали и хранили для последующего анализа. Осадок промывали 1 объемом буфера для связывания, после чего центрифугировали в течение 15 мин при 10000 об./мин. Осадок и растворимые фракции ресуспендировали в буфере для нанесения образца, нагревали в течение 10 мин при температуре 100°C и анализировали методом вестернблоттинга (как описано выше).

Результаты.

PrtA-TMD.

Слитые белки PrtA-TMD временно экспрессировали в растениях табака, экспрессирующих МАТ. В день 6 ткани растения гомогенизировали, жидкость (обозначенную "Ж") отделяли от осадка ("О"), и обе данные фракции анализировали методом вестернблоттинга с АТ против IgG человека и АТ против белка А. Как видно из левой части фиг. (фиг. 12D), большинство МАТ было обнаружено во фракции осадка образца, в которой было обнаружено слияние с белком А (правая часть фигуры).

PrtA-CBD.

В отдельном эксперименте, в котором использовали Prt-CBD, МАТ экстрагировали, очищали из листьев растения и анализировали методом вестернблоттинга с антителом против белка А и антителом против IgG человека по отдельности. В качестве положительного контроля использовали экстракт растений, экспрессирующих CBD-белок А, с добавлением 5 мкг коммерческой Хумиры в тех же условиях. Было показано, что растворимая фракция была практически прозрачной, когда экстракцию проводили буфером для связывания; при этом, когда использовали буфер для измельчения, полосы, соответствующие тяжелой и легкой цепям, были определены в образцах как контроля, коммерческой Хумиры (Комм.), так и адалимумаба растительного происхождения (PDA) (фиг. 17C) в осадке МАТ (фиг. 17B), и CBD-белок А (фиг. 17A) также был выявлен как в контроле (Комм.), так и в образцах PDA, также с применением буфера для связывания. Данные результаты демонстрируют, что наблюдается связывание МАТ с белком А и CBD с целлюлозой, и буфер для связывания является наиболее эффективным.

Пример 7. Подавление гликозилирования ксилозой и фукозой посредством супрессии РНКи (GMD) и супрессии РНК (ХуГТ).

Подавление гликозилирования ксилозой и фукозой проводили согласно публикации Matsuo, et al,

2014. Вкратце, методику сайленсинга с применением РНКи ГДФ-маннозо-4,6-дегидратазы (GMD) выбрали для делетирования растение-специфичных остатков сахара в N-гликанах растения посредством репрессии генов ГДФ-D-маннозо-4,6-дегидратазы. РНКи GMD разрушает остатки α -1,4-фукозы и α -1,3-фукозы посредством препятствования путям α -1,4-фукозо-трансферазы и α -1,3-фукозо-трансферазы.

I. Клонирование РНКи GMD в бинарном векторе pBINPLUS для трансформации табака, опосредованной агробактериями.

Гены, которые кодируют фрагмент РНКи GMD, встраивали в ходе 3-х этапов клонирования в плазмиду pUC18, которая находилась под контролем промотора 35S (фиг. 18A). Этап 1: ДНК, кодирующую антисмысловую цепь GMD, встраивали посредством разрезания рестрикционными ферментами NotI и BamHI (фиг. 18B) с получением структуры шпильки. Этап 2: интрон β -ксилозилтрансферазы (XylT), который кодирует ДНК Arabidopsis, встраивали посредством разрезания рестрикционными ферментами BamHI и MfeI (фиг. 18C) с получением структуры петли. Этап 3: ДНК, кодирующую смысловую цепь GMD, встраивали посредством рестрикции ферментами MfeI и NcoI (фиг. 18D), чтобы завершить структуру шпильки двуспиральной РНК. Затем кассету экспрессии клонировали в бинарной плазмиде pBINPLUS с помощью рестрикционных ферментов HindIII и SacI с получением плазмид pBINPLUS РНКи GMD (фиг. 19A-B).

Затем плазмидами трансформировали штаммы агробактерий LB4404 или EHA105 и растения табака.

II. Клонирование супрессионной конструкции РНК XylT в бинарном векторе pBINPLUS для трансформации табака, опосредованной агробактериями.

ДНК, кодирующую супрессионный фрагмент РНК ксилозилтрансферазы, получали из гена XylT *Nicotiana tabacum*, из предполагаемого экзона 3 β -(1,2)-ксилозилтрансферазы (идентификационный номер последовательности: embIAJ627183.1).

Для супрессии РНК фрагмент ДНК длиной 617 п.о. из экзона 3 гена XylT амплифицировали методом ПНР, и к 5'- и 3'-концам добавляли сайты рестрикции NcoI и NotI, соответственно. Фрагмент клонировали в плазмиде pUC18 под контролем промотора RUBISCO (фиг. 20A). Тяжелую цепь адалимумаба (1362 п.о.) удаляли посредством рестрикции ферментами NcoI и NotI и заменяли фрагментом XylT (фиг. 20B). Затем кассету экспрессии клонировали в бинарной плазмиде pBINPLUS с помощью рестрикционного фермента HindIII с получением плазмиды pBINPLUS XylT (фиг. 20C-D). После этого плазмидами трансформировали штаммы агробактерий LB4404 или EHA105, а затем - растения табака.

Последовательности сайленсерной РНК и РНКи для подавления экспрессии GMD и XylT в табаке (SEQ ID NO: 37-40).

Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в сочетании с конкретными вариантами реализации, очевидно, что множество альтернатив, модификаций и вариаций будут очевидны специалистам в данной области техники. Соответственно, предполагается охватить все такие альтернативы, модификации и вариации, которые относятся к духу и широкому объему прилагаемой формулы изобретения.

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в настоящей заявке, полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки. Кроме того, цитирование или указание любой ссылки в настоящей заявке не следует истолковывать как признание того, что такая ссылка является доступной в качестве предшествующего уровня техники настоящего изобретения. В той части, в которой используются заголовки разделов, данные заголовки не следует истолковывать как необходимое ограничение.

Литературные источники

Bardor M, Faveeuw C, Fitchette AC, Gilbert D, Galas L, Trottein F, Faye L, Lerouge P (2003) Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core a(1,3)- fucose and core xylose. *Glycobiology*. 13:427- 434.

Matsuo K., and T. Matsumura Deletion of fucose residues in plant *N*-glycans by repression of the *GDP-mannose 4,6-dehydratase* gene using virus-induced gene silencing and RNA interference (2011). *Plant Biotechnology Journal*. 9: 264-281.

Svab Z and Maliga P (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(3): 913-917

Wei S., Marton I., Dekel M., Shalitin D., Lewinsohn E., Bravdo B. and Shoseyov O. (2004) Manipulating volatile emission in tobacco leaves by expressing *Aspergillus niger* β -glucosidase in different subcellular compartments. *Plant Biotechnol. J*

Wilson IBH (2002) Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Curr Opin Struct Biol* 12: 569-577

"Biopharmaceuticals in Plants: Toward the Next Century of Medicine" by KATHLEEN LAURA HEFFERON - 2010

Brandizzi F. *et al.* The Destination for Single-Pass Membrane Proteins Is Influenced Markedly by the Length of the Hydrophobic Domain. **The Plant Cell** May 2002 vol. 14 no. 5 1077-1092.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения представляющего интерес полипептида человека, при этом указанный способ включает трансформацию растения или клетки растения

последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей фукозидазу и сигнальный пептид для локализации фукозидазы во внутриклеточном компартменте клеток указанного растения или указанной клетки растения;

последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей ксилозидазу и сигнальный пептид для локализации ксилозидазы во внутриклеточном компартменте клеток указанного растения или указанной клетки растения; и

последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанный представляющий интерес полипептид человека и сигнальный пептид для локализации указанного представляющего интерес полипептида человека во внутриклеточном компартменте клеток указанного растения или указанной клетки растения, причём указанный представляющий интерес полипептид человека выбран из группы, состоящей из цитокина, хемокина, лимфокина, лиганда, рецептора, гормона, фермента, структурного белка, антитела, фрагмента антитела и фактора роста;

таким образом, что в результате экспрессии указанных последовательностей нуклеиновых кислот указанная фукозидаза, указанная ксилозидаза и указанный представляющий интерес полипептид человека совместно локализуются в указанном внутриклеточном компартменте клеток указанного растения или указанной клетки растения.

2. Способ получения представляющего интерес полипептида человека, при этом указанный способ включает

обеспечение первого растения, которое трансформировано для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей фукозидазу и сигнальный пептид для локализации фукозидазы во внутриклеточном компартменте клеток указанного растения; и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ксилозидазу и сигнальный пептид для локализации ксилозидазы во внутриклеточном компартменте клеток указанного растения;

обеспечение второго растения, которое трансформировано для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес полипептид человека и сигнальный пептид для локализации в внутриклеточном компартменте клеток указанного растения, где указанный представляющий интерес полипептид человека выбран из группы, состоящей из цитокина, хемокина, лимфокина, лиганда, рецептора, гормона, фермента, структурного белка, антитела, фрагмента антитела и фактора роста;

скрещивание указанного первого растения с указанным вторым растением с получением потомства растений, которое экспрессирует фукозидазу, ксилозидазу и представляющий интерес полипептид чело-

века, в внутриклеточном компартменте клеток растения.

3. Способ по п.1 или 2, дополнительно включающий выделение указанного представляющего интерес полипептида человека из указанного растения или клетки растения, с получением тем самым нефукозилированного и/или нексилозилированного полипептида.

4. Способ по п.1 или 3, отличающийся тем, что внутриклеточный компартмент представляет собой вакуоль или апопласт.

5. Конструкция нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует представляющий интерес полипептид человека и сигнальный пептид для локализации во внутриклеточном компартменте клеток растения или клетки растения, при этом указанный представляющий интерес полипептид человека выбран из группы, состоящей из цитокина, хемокина, лимфокина, лиганда, рецептора, гормона, фермента, структурного белка, антитела, фрагмента антитела и фактора роста;

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фукозидазу и сигнальный пептид для локализации фукозидазы в внутриклеточном компартменте клеток растения или клетки растения; и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ксилозидазу и сигнальный пептид для локализации ксилозидазы в внутриклеточном компартменте клеток растения или клетки растения.

6. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, отличающаяся тем, что указанный внутриклеточный компартмент представляет собой вакуоль или апопласт.

7. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, отличающаяся тем, что указанная конструкция нуклеиновой кислоты модифицирована посредством включения последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует ксилозидазу, слитую с сигнальным пептидом для локализации в указанном внутриклеточном компартменте.

8. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, отличающаяся тем, что указанная конструкция нуклеиновой кислоты модифицирована посредством включения последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует фукозидазу, слитую с сигнальным пептидом для локализации в указанном внутриклеточном компартменте.

9. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, отличающаяся тем, что указанная конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно модифицирована посредством включения последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует аффинную группу, слитую в результате трансляции с полипептидом, связывающимся с клеточной стенкой, при этом указанная аффинная группа предназначена для связывания указанного полипептида, представляющего интерес.

10. Трансгенное растение или клетка трансгенного растения, которые рекомбинантным образом экспрессируют

(i) полипептид человека, представляющий интерес; и

(ii) ксилозидазу и фукозидазу,

причем как указанный полипептид человека, представляющий интерес, так и указанная ксилозидаза и фукозидаза являются слитыми в результате трансляции с сигнальным пептидом для локализации в вакуоли или апопласте указанного растения или указанной клетки растения, с получением тем самым нефукозилированного и/или нексилозилированного полипептида человека.

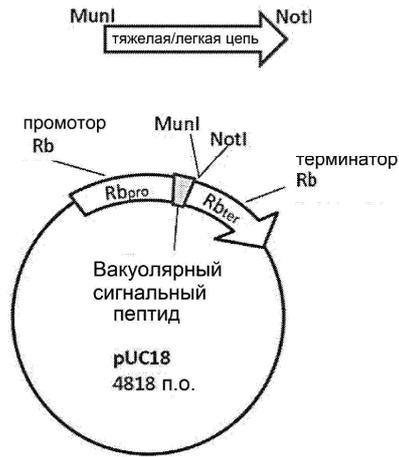
11. Трансгенное растение или клетка трансгенного растения по п.10, отличающиеся тем, что внутриклеточный компартмент представляет собой вакуоль или апопласт.

12. Трансгенное растение или клетка трансгенного растения по п.10, характеризующиеся уменьшенным уровнем или активностью бета-(1,2)-ксилозилтрансферазы, альфа-(1,3)-фукозилтрансферазы и/или ГДФ-D-маннозо-4,6-дегидратазы по сравнению с растением или клеткой растения того же вида, экспрессирующими указанную бета-(1,2)-ксилозилтрансферазу, альфа-(1,3)-фукозилтрансферазу и/или ГДФ-D-маннозо-4,6-дегидратазу на уровне дикого типа или демонстрирующими активность дикого типа указанной бета-(1,2)-ксилозилтрансферазы, альфа-(1,3)-фукозилтрансферазы и/или ГДФ-D-маннозо-4,6-дегидратазы.

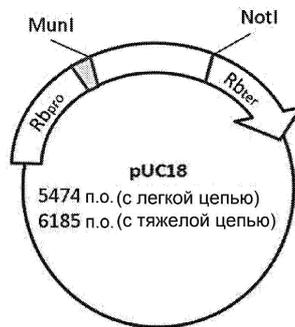
13. Трансгенное растение или клетка трансгенного растения по п.10, которые дополнительно рекомбинантно экспрессируют аффинную группу, которая слита в результате трансляции с пептидом, связывающимся с клеточной стенкой, причем указанная аффинная группа предназначена для связывания с указанным полипептидом человека, представляющим интерес, причем указанная аффинная группа является слитой в результате трансляции с пептидом, связывающимся с клеточной стенкой, кодированным нуклеиновой кислотой, причём указанный пептид, связывающийся с клеточной стенкой, представляет собой целлюлозосвязывающий домен (CBD).

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный полипептид, представляющий интерес, представляет собой антитело или фрагмент антитела, способные связывать эпитоп или антиген.

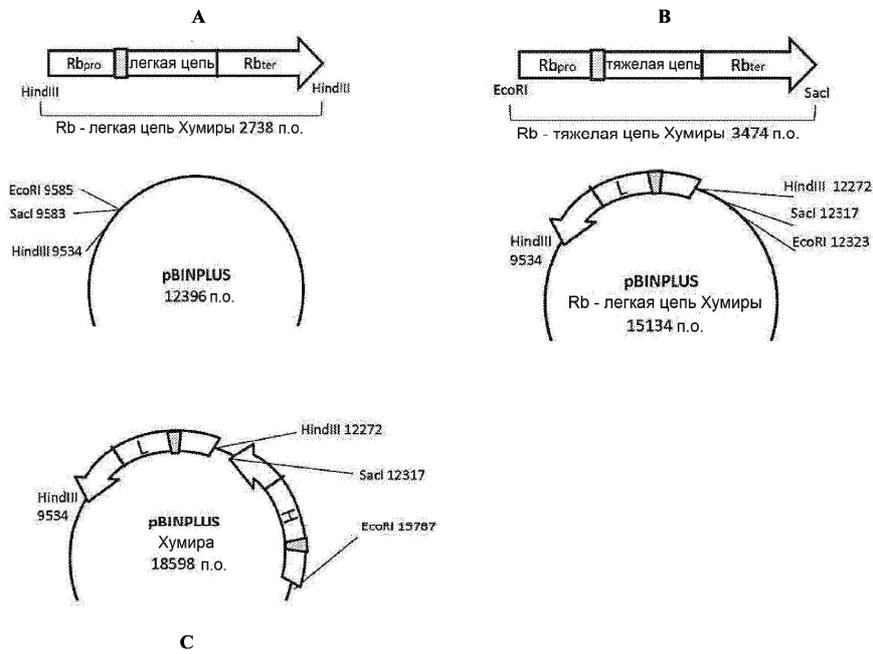
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой бевацизумаб или адалимумаб.



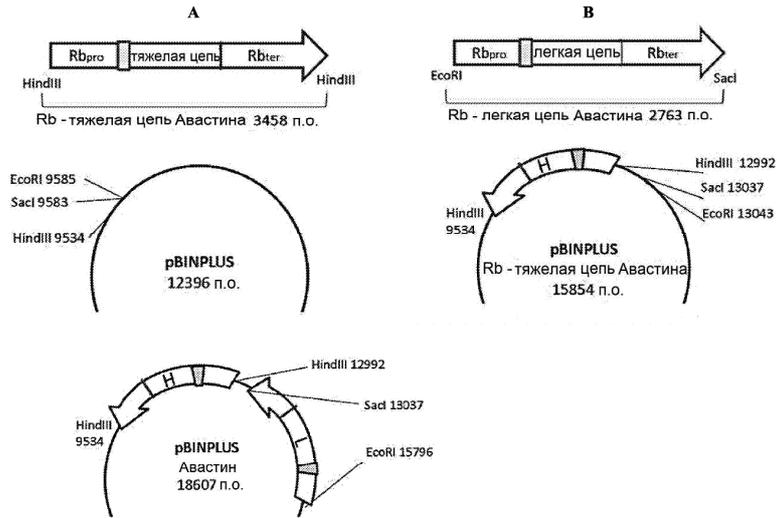
Фиг. 1А



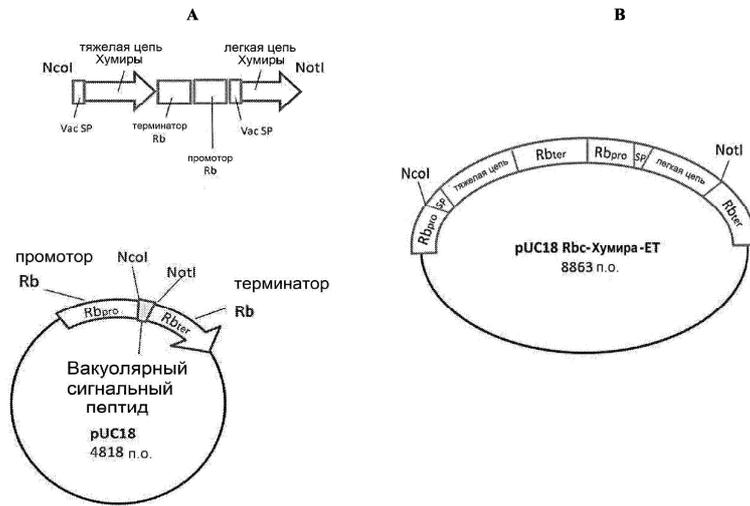
Фиг. 1В



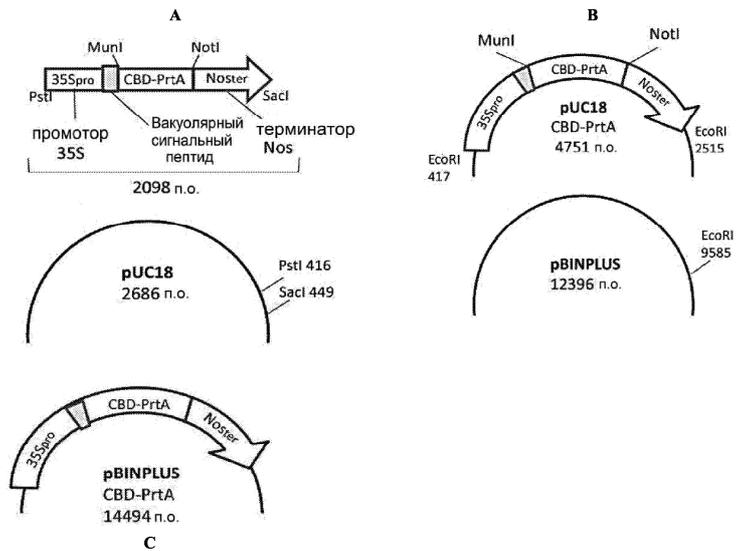
Фиг. 2



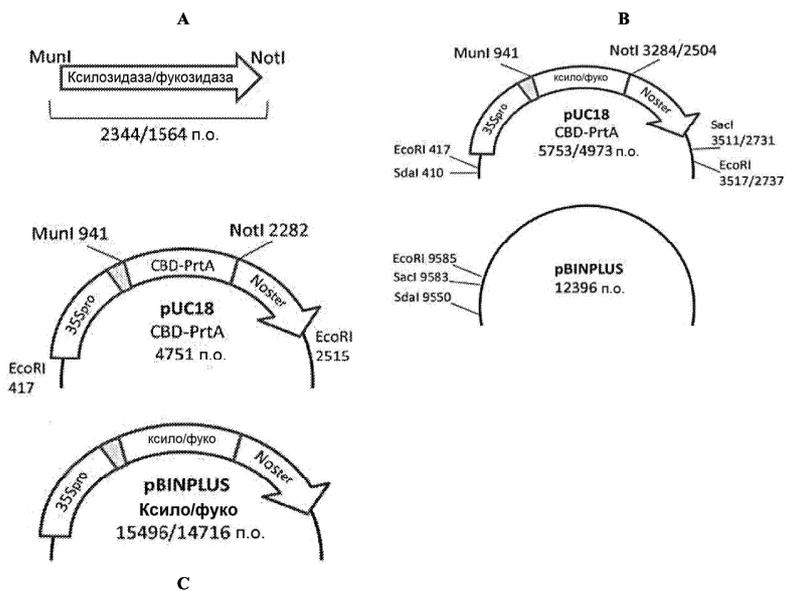
Фиг. 3



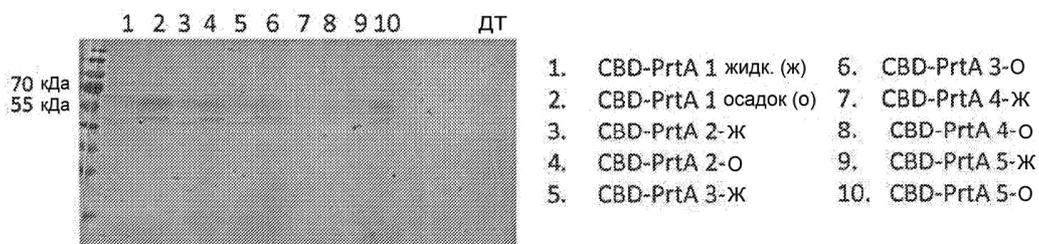
Фиг. 4



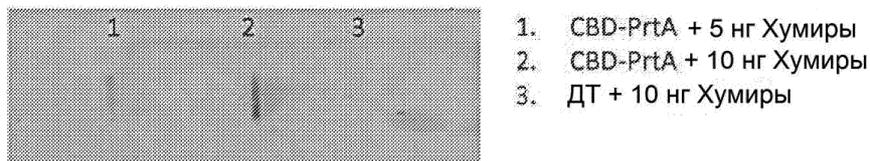
Фиг. 5



Фиг. 6



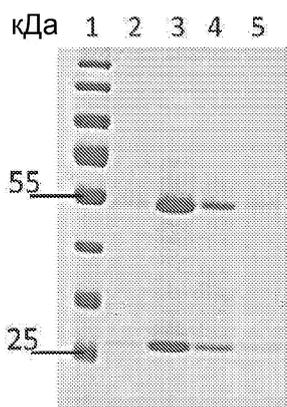
Фиг. 7А



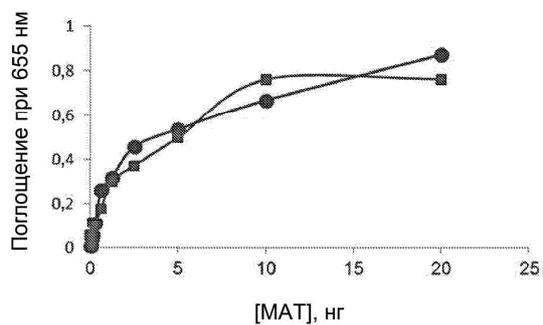
Фиг. 7В



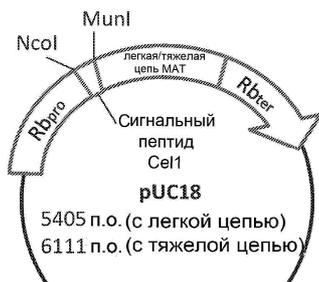
Фиг. 8



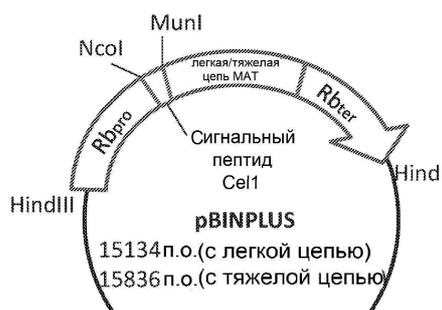
Фиг. 9



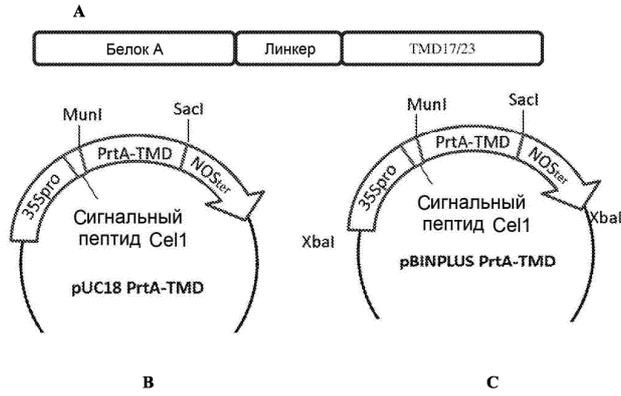
Фиг. 10



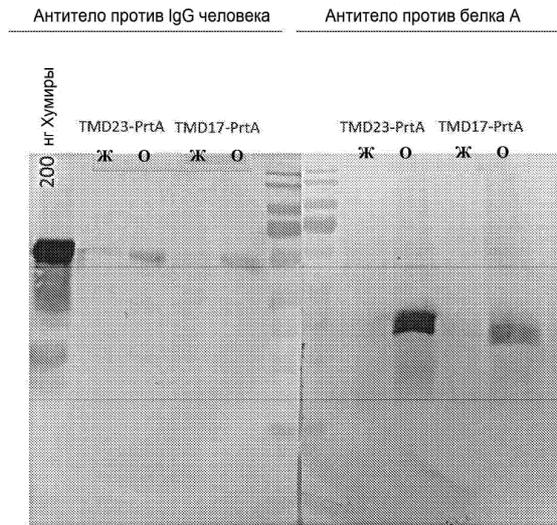
Фиг. 11А



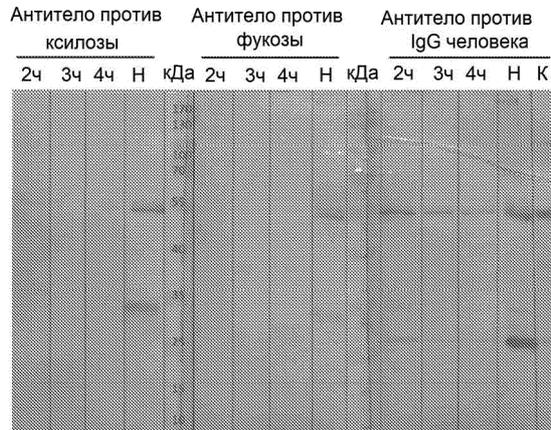
Фиг. 11В



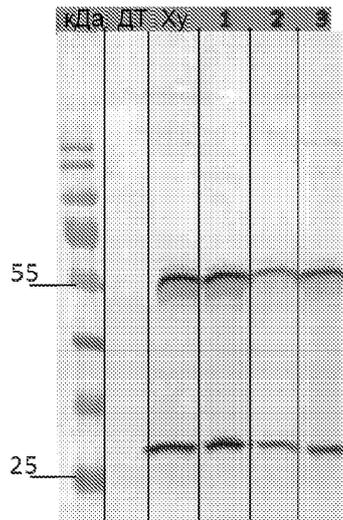
Фиг. 12А-С



Фиг. 12D

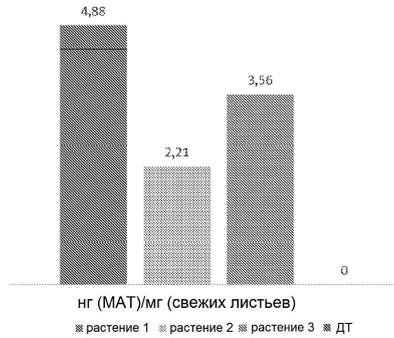


Фиг. 13



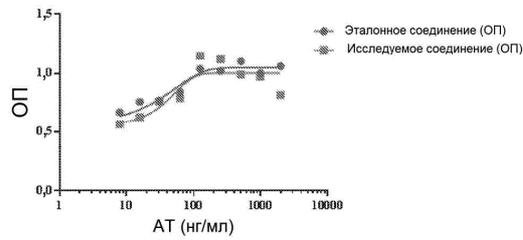
Фиг. 14

Анализ методом ELISA адалимумаба растительного происхождения

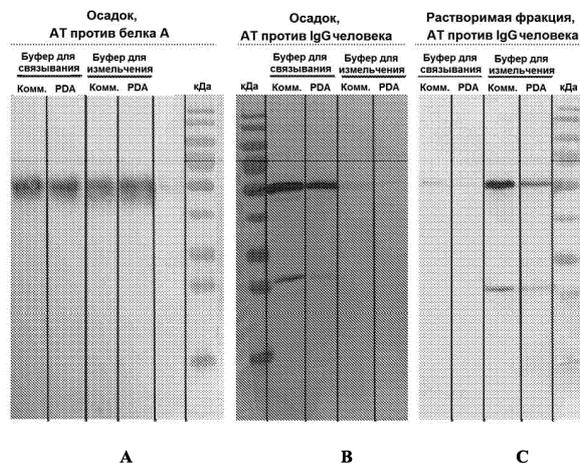


Фиг. 15

Биологическая активность Хумиры по сравнению с исследуемым соединением в отношении рчФНО α на клетках L929



Фиг. 16



Фиг. 17

