



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102008901608592
Data Deposito	13/03/2008
Data Pubblicazione	13/09/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	01	H		

Titolo

PROCEDIMENTO PER LA PRODUZIONE DI UNA PROTEINA UMANA IN PIANTA, IN PARTICOLARE UN ENZIMA LISOSOMIALE UMANO RICOMBINANTE IN ENDOSPERMA DI CEREALI

Classe Internazionale: A 01 H 001 / 0000

Descrizione del trovato avente per titolo:

"PROCEDIMENTO PER LA PRODUZIONE DI UNA PROTEINA UMANA  
IN PIANTA, IN PARTICOLARE UN ENZIMA LISOSOMIALE UMANO  
5 RICOMBINANTE IN ENDOSPERMA DI CEREALI"

a nome Transactiva S.r.l. di nazionalità italiana con  
sede legale in Parco Scientifico e Tecnologico "Luigi  
Danieli", via Linussio 51, ZIU, 33100 Udine

dep. il al n.

10

\* \* \* \* \*

#### CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente trovato riguarda la produzione di una  
proteina umana, in particolare dell'enzima lisosomia-  
le umano ricombinante beta-glucosidasi acida (EC  
15 3.2.1.45) attraverso trasformazione e modificazione  
genetica di piante, in particolare di specie cereali.  
La specie su cui si applica in via preferenziale det-  
ta invenzione è *Oryza sativa* L. (riso coltivato) per  
la possibilità di attuare una lavorazione industriale  
20 del seme con allontanamento del germe ed eliminazione  
dello strato aleuronico contenente numerose proteine  
contaminanti.

La medesima tecnologia può essere utilizzata per  
l'espressione endosperma-specifica di altri enzimi  
25 lisosomiali umani la cui assenza o incompleta funzio-

nalità genera stati patologici.

#### STATO DELLA TECNICA

Le malattie rare sono un gruppo eterogeneo di patologie accomunate dalla bassa incidenza e prevalenza  
5 nella popolazione.

Esse manifestano un decorso cronico e conseguenze gravemente invalidanti, determinando non di rado la morte dei pazienti.

Tra le malattie rare rientrano le malattie lisosomiali, causate dal deficit di specifici enzimi lisosomiali, o proteine carrier.  
10

Più in particolare, nella classe delle malattie lisosomiali ricadono le seguenti sfingolipidosi: malattia di Gaucher, glicogenosi 2, malattia di Fabry, malattia di Niemann-Pick B, Mucopolisaccaridosi I, II, IV.  
15

Un approccio terapeutico condiviso in campo medico è quello della terapia enzimatica di sostituzione.

Ad esempio la terapia enzimatica sostitutiva della  
20 malattia di Gaucher si fonda sulla regolare somministrazione al paziente di beta-glucosidasi acida umana. Si ha, tuttavia, un elevato costo della terapia e una difficoltà di accesso al farmaco da parte di tutti i pazienti. Ciò a causa delle difficoltà di produzione della beta-glucosidasi acida umana, solitamente  
25

tramite linee cellulari umane o mammifere.

Le piante geneticamente modificate possono costituire una soluzione alternativa alle linee cellulari umane o mammifere nella produzione di enzimi lisosomiali, in particolare beta-glucosidasi acida umana ricombinante, anche dal punto di vista strettamente economico poiché la loro coltivazione richiede materiali di consumo poco costosi e l'impiego di infrastrutture agricole già esistenti sul territorio.

10 In WO-A-97/10353 (WO'353) è descritta la sintesi di enzimi lisosomiali, tra cui beta-glucosidasi acida umana, esclusivamente in foglia e, in particolare, in foglie di specie da biomassa, quali il tabacco (*Nicotiana tabacum* L.).

15 Tuttavia, WO'353 presenta inconvenienti legati all'elevato contenuto in acqua dei tessuti fogliari e alla presenza di un numero elevato di proteine contaminanti, nonché di polifenoli, gomme, essudati, alcaloidi tossici, che contribuiscono, assieme  
20 all'elevata dispersione della proteina ricombinante, a complicare i processi di estrazione e purificazione. Inoltre, si possono avere fenomeni di fitotossicità dovuti a un'alterazione del normale metabolismo cellulare, che si manifestano talvolta in modo inatteso e non possono essere risolti in maniera prevedi-  
25

bile.

In WO'353, l'espressione di beta-glucosidasi acida segue la trasformazione di tabacco con vettori di espressione contenenti il promotore MeGA (inducibile da ferita, derivato dal promotore HMG2 di pomodoro) o, alternativamente, il promotore CaMV35S (dal virus del mosaico del cavolfiore); quest'ultimo è un elemento di controllo della trascrizione genica di tipo costitutivo, molto noto e utilizzato in campo vegetale, oltre che rappresentativo di promotori costitutivi diversi.

In WO'353, oltre ai promotori esemplificati, i promotori utilizzati possono essere costitutivi o inducibili.

Per quanto riguarda i promotori inducibili da ferita, in WO'353 essi hanno un impiego esclusivo in foglia e le piante devono essere preventivamente ferite per realizzare l'espressione di beta-glucosidasi acida. Ciò comporta un aggravio dei costi, maggiori difficoltà di gestione del processo produttivo, la degradazione parziale dell'enzima a seguito della liberazione di proteinasi normalmente confinate nel vacuolo o in altri compartimenti cellulari, nonché la possibilità di contaminazioni aggiuntive del materiale ferito con batteri e funghi.

I promotori indotti dalla luce di WO'353 non risultano efficacemente espressi in tessuti diversi dal mesofillo fogliare, come ad esempio in seme, in particolare nei semi di piante cereali, per la mancanza  
5 di radiazione luminosa trasmessa e/o per la mancanza di fattori di trascrizione presenti invece nei classici tessuti fotosintetizzanti.

In relazione ai promotori costitutivi, tutti gli esempi sono forniti utilizzando CaMV35S, anche a motivo della sua rappresentatività. Tuttavia, esperimenti hanno dimostrato che nel seme l'efficienza di  
10 trascrizione determinata da CaMV35S è marginalmente bassa, al punto da escludere qualunque interesse al suo impiego nella sintesi di proteine eterologhe. Tale  
15 affermazione è ancor più valida nel caso di piante monocotiledoni come i cereali, dove tale promotore appare in generale meno adatto a dirigere elevati livelli di espressione genica anche nei tessuti fogliari di elezione.

20 Nella domanda di brevetto WO-A-03/073839 (WO'839) è stato riportato che il gene codificante una beta-glucosidasi mutata posto sotto il controllo del promotore CaMV35S non viene espresso in seme a livelli tali da rendere rilevabile la proteina in saggi immunologici condotti con un anticorpo specifico. Pertan-  
25

to, è possibile concludere, in analogia con quanto  
affermato in WO'839, che WO'353 non fornisce in real-  
tà insegnamenti su come effettuare la produzione di  
beta-glucosidasi acida umana, né di altri enzimi li-  
5 sosomiali in tessuti diversi dal mesofillo fogliare  
e, più specificatamente, nel seme.

Va inoltre rilevato che, da successivi esperimenti  
(Reggi et al. 2005, Plant Molec Biol 57:101-113), gli  
insegnamenti di WO'353 per la produzione di beta-  
10 glucosidasi acida in foglie di tabacco consentono so-  
lo l'ottenimento di ridotti quantitativi di enzima,  
tali da escludere un reale interesse a livello indu-  
striale. Peraltro, da WO'353 la quantità di enzima  
purificabile dalla biomassa fogliare è bassa, qualora  
15 espressa in termini di attività enzimatica, suggeren-  
do l'esistenza di limiti nella tecnologia di produ-  
zione fondata sull'espressione in foglia, in partico-  
lare con sistemi di tipo costitutivo.

In WO'839 si afferma che la produzione di enzimi  
20 lisosomiali è possibile in seme e che i livelli di  
espressione ottenibili sono tali da rendere economi-  
camente conveniente il sistema. Si afferma inoltre  
che gli enzimi vengono accumulati nell'apoplasto, il  
che garantirebbe la loro stabilità nel lungo termine  
25 a causa dei valori subacidi di pH.

Tuttavia, in WO'839 non sono presenti insegnamenti per la produzione di enzimi lisosomiali, e in particolare della beta-glucosidasi acida, in seme di piante monocotiledoni, né per eludere, attenuare o superare le problematiche connesse, e le limitazioni conseguenti, alla espressione tissutale e alla localizzazione subcellulare di detti enzimi, e in particolare della beta-glucosidasi acida, all'interno del seme, non essendo note o, alternativamente, essendo state trascurate tali problematiche.

Infatti, in WO'839 gli esempi forniti relativamente alla costruzione di vettori di espressione di enzimi lisosomiali riportano sempre l'impiego di promotori per proteine di riserva di piante dicotiledoni. Gli esempi riguardanti l'effettiva espressione di enzimi lisosomiali sono limitati a una beta-glucosidasi acida umana modificata e la pianta ospite utilizzata è sempre il tabacco (*Nicotiana tabacum* L.).

Nella descrizione di WO'839, non viene fatto alcun accenno a effetti fitotossici derivanti alle piante di tabacco trasformate e/o alle loro progenie dall'accumulo di beta-glucosidasi acida nel seme sicché il procedimento potrebbe sembrare efficace nel fornire una soluzione ai problemi produttivi di tali enzimi e, specificatamente, della beta-glucosidasi

acida. Tuttavia, esperimenti successivi condotti sul  
seme di piante di tabacco trasformate proprio con il  
costrutto citato in WO'839 hanno svelato che  
l'accumulo di beta-glucosidasi ha importanti riper-  
5 cussioni sulla capacità di germinazione del seme me-  
desimo. In particolare, è stato dimostrato che, già a  
concentrazioni dell'enzima prossime a 200 U/kg di se-  
me (1 U=quantità di enzima in grado di demolire 1  $\mu$ M  
4-metilumbelliferil beta-D-glucopiranoside in 1 minu-  
10 to a 37 °C, pH 5.9), si manifestano anomalie ripro-  
duttive dovute a scarsa germinazione e forte riduzio-  
ne dell'energia germinativa. Inoltre, concentrazioni  
superiori a 500 U/kg di seme si riflettono in una  
perdita totale di germinabilità.

15 In esperimenti successivi eseguiti dalla Richieden-  
te, è emerso che la germinabilità del seme di tabacco  
trasformato con il costrutto citato in WO'839 non può  
essere restaurata in alcun modo noto.

Ulteriori indagini condotte al microscopio elettro-  
20 nico a trasmissione hanno consentito di accertare una  
disorganizzazione e destrutturazione del sistema cel-  
lulare di membrane nel seme non germinabile, confer-  
mando l'impossibilità di ottenimento di una progenie  
vitale dalle linee transgeniche utilizzabili a livel-  
25 lo industriale per la produzione dell'enzima. Sempre

attraverso microscopia elettronica a trasmissione è stato verificato che il sito di deposizione della beta-glucosidasi ricombinante ottenibile con il costruito descritto in WO'839 non corrisponde in realtà  
5 a quello atteso in WO'839 (spazio apoplastico) ma ai vacuoli di riserva proteica interni alle cellule parenchimatiche dell'embrione.

Anche la domanda di brevetto WO-A-00/04146 (WO'146), che descrive l'espressione di lattoferrina  
10 umana ma anche di proteine con attività generalmente enzimatica nel seme, è in realtà silente per ciò che concerne la produzione di enzimi funzionalmente attivi, ancor più di enzimi lisosomiali.

In WO'146 non viene fornito alcun dato a supporto  
15 della validità del procedimento esposto per la produzione di enzimi ed in esso, non essendo diretto alla produzione di proteine enzimatiche, sono trascurati problemi di fondamentale rilievo relativi alla loro stabilità, conformazione e funzionalità.

In generale, benché in linea teorica le piante necessarie alla produzione dei quantitativi di seme necessari alla estrazione e purificazione industriale dell'enzima possano essere ottenute attraverso micropropagazione in vitro di piante élite, il ricorso a  
20 tale sistema è imprescindibilmente connesso a notevo-

li difficoltà di gestione del processo produttivo per  
la necessità di garantirsi l'approvvigionamento di un  
gran numero di piante da mettere a dimora in un tempo  
relativamente breve. Per programmare una produzione  
5 di 600 q di seme di tabacco transgenico teoricamente  
necessario al soddisfacimento della domanda nazionale  
di enzima, sarebbe necessario un investimento in su-  
perficie almeno pari a 150 ettari, ma soprattutto la  
produzione in vitro, l'abituazione in serra e il tra-  
10 pianto di almeno 9 milioni di piantine, una situazio-  
ne ben diversa da un punto di vista organizzativo ed  
economico dalla semina diretta a spaglio o a file  
ravvicinate della linea di tabacco transgenica;  
quest'ultima operazione, effettuabile solo con seme  
15 normalmente germinabile, garantirebbe non solo un  
sensibile risparmio in termini di costi diretti e di  
gestione ma consentirebbe anche una produzione di se-  
me per unità di superficie superiore di 4-6 volte e  
ciò a motivo della maggiore densità delle piante.

20 Ottenere, mediante trapianto, densità di impianto  
simili a quelle realizzate con la semina diretta non  
è concepibile, poiché il costo di ciascuna pianta  
trapiantata sarebbe ancor meno remunerato in termini  
produttivi: esiste infatti una relazione di propor-  
25 zionalità inversa tra produzione per pianta e numero

Il mandatario

STEFANO LIGI

(per sé e per gli altri)

STUDIO GLP S.r.l.

P.le Cavallotti, 6/2 - 33100 UDINE

di piante per unità di superficie. Dal lato dei costi di micropropagazione, va rilevato che ciascuna pianta dovrebbe essere lavorata singolarmente e manualmente e questo fatto, unito alla scarsissima quantità di  
5 seme (pochi grammi) prodotta da ciascuna pianta di tabacco ridurrebbe di fatto in modo drastico i benefici derivanti dall'impiego di piante come organismi ospite per la produzione di enzimi lisosomiali.

Scopo del presente trovato è mettere a punto un  
10 procedimento per la produzione di una proteina umana in pianta, in particolare in pianta monocotiledone, in particolare di un enzima lisosomiale umano ricombinante in endosperma di cereali che superi gli inconvenienti di cui alla tecnica nota, in particolare  
15 che:

- consenta un'efficace espressione tissutale e localizzazione subcellulare di detti enzimi, e in particolare della beta-glucosidasi acida, all'interno del seme;
- 20 - agevoli i processi di estrazione e purificazione;
- elimini il rischio di fenomeni di fitotossicità;
- mantenga un'efficace germinabilità del seme;
- abbia costi ridotti;
- abbia maggiore facilità di gestione del processo  
25 produttivo;

- elimini il rischio di degradazione parziale dell'enzima e di contaminazioni con batteri e funghi.

Per ovviare agli inconvenienti della tecnica nota e per ottenere questi ed ulteriori scopi e vantaggi, la  
5 Richiedente ha studiato, sperimentato e realizzato il presente trovato.

#### ESPOSIZIONE DEL TROVATO

Il presente trovato è espresso e caratterizzato nelle rivendicazioni indipendenti.

10 Le relative rivendicazioni dipendenti espongono altre caratteristiche del presente trovato o varianti dell'idea di soluzione principale.

In accordo con i suddetti scopi, un procedimento per la produzione di una proteina umana in pianta, in  
15 particolare un enzima lisosomiale umano ricombinante in endosperma di pianta, comprende:

- una prima fase di trasformazione delle piante mediante la quale realizzare il confinamento della proteina in un endosperma non assorbito dall'embrione e  
20 permettere che la presenza di elevati quantitativi della proteina nell'endosperma del seme non determini effetti negativi sulla germinabilità e sull'energia germinativa del seme;

- l'utilizzazione, nella prima fase di trasformazione  
25 zione delle piante, di un promotore endosperma-

specifico a monte del gene codificante detta proteina e di un peptide segnale per l'invio cotraduzionale della proteina nascente nel lume del reticolo endoplasmico delle cellule componenti il tessuto  
5 dell'endosperma e per il suo accumulo tissutale;

- una seconda fase d'accumulo della proteina all'interno dell'endosperma del seme delle piante.

Il presente trovato permette, così, di accumulare proteine eterologhe in tessuti di riserva esterni  
10 all'embrione del seme.

Inoltre, con il presente trovato si ha la possibilità di accumulare proteine con elevato potenziale fitotossico/destrutturante in tessuti di riserva esterni all'embrione del seme che al termine dello  
15 sviluppo intraprendono spontaneamente un processo di morte cellulare programmata.

Ulteriormente, si può accumulare proteine potenzialmente dannose in tessuti di riserva non vitali che vengono investiti da un'intensa attività degradativa di tipo idrolitico che subentra all'atto della  
20 imbibizione e germinazione del seme.

Tali proteine potenzialmente dannose possono essere accumulate all'interno dei vacuoli di riserva proteica o dei corpi proteici senza che dette proteine ven-  
25 gano necessariamente in contatto o debbano attraver-

sare la membrana cellulare.

Il presente trovato permette di produrre esattamente la sequenza amminoacidica desiderata anziché varianti non autentiche della medesima caratterizzate  
5 dalla presenza di residui amminoacidici aggiuntivi inutili e per ciò stesso potenzialmente dannosi in termini di localizzazione, stabilità, attività biologica e, non ultimo, impiego della proteina per scopi terapeutici.

10 Vantaggiosamente, la proteina prodotta viene accumulata nell'endosperma all'interno dei vacuoli di riserva proteica (Protein Storage Vacuoles, PSV) o nei corpi proteici (Protein Bodies, PB).

Poiché l'estraibilità delle proteine dai PSV e dai  
15 PB mostra differenze di poco conto, la localizzazione dell'enzima nell'uno o nell'altro compartimento subcellulare è indifferente ai fini del presente trovato.

Una forma d'esecuzione del presente trovato prevede  
20 di realizzare un vettore di espressione in pianta per la trasformazione di dette piante, comprendente una sequenza nucleotidica contenente i seguenti elementi:

- i) un promotore endosperma-specifico di origine naturale o artificiale;
- 25 ii) una regione 5' UTR di origine naturale o arti-

ficiale;

iii) una sequenza nucleotidica di origine naturale o artificiale codificante un peptide segnale per l'invio della proteina ricombinante all'interno del lume del reticolo endoplasmico delle cellule componenti il tessuto dell'endosperma e per il suo accumulo tissutale;

iv) una sequenza nucleotidica di origine naturale o artificiale codificante la forma matura della proteina umana;

v) una regione 3' UTR di origine naturale o artificiale;

e prevede di impiegare il vettore d'espressione così realizzato per la trasformazione delle piante.

Vantaggiosamente, la sequenza nucleotidica contenuta nel vettore d'espressione è come indicata in SEQ ID NO: 1.

Secondo una forma d'esecuzione, il vettore d'espressione viene introdotto in ceppi batterici, i quali sono utilizzati, direttamente od indirettamente, per la trasformazione delle piante.

Vantaggiosamente, il ceppo batterico è scelto in un gruppo comprendente le specie *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*.

Preferibilmente, le piante trasformate sono cerea-

li.

Secondo una forma realizzativa preferita, il ceppo batterico viene utilizzato per la trasformazione di calli embriogenici di riso (*Oryza sativa* ssp. japonica, varietà CR W3).

Secondo una variante vantaggiosa, l'enzima lisosomiale è la beta-glucosidasi acida umana.

Secondo un'altra variante, l'enzima lisosomiale è l'alfa-glucosidasi acida umana.

Infatti, il presente trovato è egualmente efficace nella sintesi, estrazione e purificazione di quantità significative del precursore dell'alfa-glucosidasi acida umana, la quale ha massa, struttura e funzione nettamente diversa da quelle della beta-glucosidasi acida.

In accordo con una forma d'esecuzione, il presente trovato comprende una terza fase di lavorazione industriale del seme delle piante.

Secondo una soluzione, la lavorazione industriale prevede di sottoporre i semi maturi raccolti dalle piante di cereali trasformate ad operazioni di sbramatura e sbiancatura per l'allontanamento della componente fibrosa, del germe, e dello strato aleuronico contenente proteine contaminanti.

In accordo con una forma d'esecuzione ulteriore, il

presente trovato comprende una quarta fase di purificazione della proteina ottenuta.

La fase di purificazione prevede nell'ordine una cromatografia a interazioni idrofobiche, una cromatografia a scambio ionico e una gel-filtrazione.

La fase di purificazione può prevedere, inoltre, in alternativa od aggiunta, l'applicazione di resine cromatografiche affini per composizione chimica e/o struttura e/o funzione, di parziale modificazione dei parametri di eluizione, di duplicazione di un passaggio per ricarico dell'eluato in colonna.

Con il presente trovato l'enzima viene completamente purificato in quantitativi facilmente superiori a 100 U/kg di seme, fino anche a 500 U/Kg di seme.

Inoltre, l'enzima prodotto è spiccatamente attivo, non porta delezioni, addizioni o sostituzioni amminoacidiche, risultando in ciò identico alla controparte nativa umana.

Inoltre, tale enzima non determina alcuna alterazione della germinabilità o della energia germinativa del seme.

La cassetta molecolare di espressione con cui si realizza la produzione dell'enzima viene normalmente ereditata dalla progenie e, al pari di un qualsiasi fattore mendeliano, può essere portata in omozigosi

od essere trasferita per incrocio ad altre linee trasformate, ottenendo in entrambi i casi un ulteriore aumento della produttività.

Il procedimento oggetto del presente trovato, contrariamente alle tecniche note nello stato dell'arte, è evidentemente innovativo e vantaggioso in quanto consente di ottenere linee transgeniche, ad esempio di riso, in grado di produrre quantità industrialmente rilevanti di beta-glucosidasi acida umana senza per questo manifestare alcuna alterazione del normale fenotipo, a livello tanto macroscopico quanto microscopico, e in particolare alcuna anomalia riproduttiva o alterazione della capacità germinativa del seme, anche a concentrazioni superiori a 500 U/Kg di seme; di estrarre e purificare detto enzima in forma pienamente attiva, mantenendo inalterata l'identità della sequenza amminoacidica rispetto alla controparte nativa umana.

Rientra nel presente trovato una sequenza nucleotidica atta all'utilizzo per la trasformazione di una pianta per l'espressione di una proteina umana in pianta, in particolare un enzima lisosomiale umano ricombinante in endosperma di pianta, che comprende i seguenti elementi:

i) un promotore endosperma-specifico di origine

naturale o artificiale;

ii) una regione 5' UTR di origine naturale o artificiale;

iii) una sequenza nucleotidica di origine naturale  
5 o artificiale codificante un peptide segnale per  
l'invio della proteina ricombinante all'interno del  
lume del reticolo endoplasmico delle cellule compo-  
nenti il tessuto dell'endosperma e per il suo accumu-  
lo tissutale;

10 iv) una sequenza nucleotidica di origine naturale o  
artificiale codificante la forma matura della protei-  
na umana;

v) una regione 3' UTR di origine naturale o artifi-  
ciale.

15 Secondo una forma realizzativa, il promotore i) è  
il promotore della glutelina 4 di riso (GluB4), la  
cui sequenza è indicata in SEQ ID NO: 2.

Secondo una forma realizzativa vantaggiosa, la re-  
gione 5' UTR ii) è la sequenza 5' UTR nota come LL-  
20 TCK, riportata nella domanda di brevetto internazio-  
nale PCT/EP2007/064590 ed indicata in SEQ ID NO: 3.

In accordo con un ulteriore forma realizzativa, la  
sequenza nucleotidica dell'elemento iii) è la sequen-  
za PSGluB4, come indicata in SEQ ID NO: 4, codifican-  
25 te il peptide segnale utilizzato in riso per veicola-

re il precursore della glutelina 4 all'interno del reticolo endoplasmico.

Secondo un'altra realizzazione, la sequenza nucleotidica dell'elemento iv) è la sequenza GCCase codificante la forma umana matura della beta-glucosidasi acida, come indicata in SEQ ID NO: 5.

In accordo con una realizzazione vantaggiosa del trovato, la regione 3' UTR dell'elemento v) è il terminatore NOS, la cui sequenza è indicata in come indicata in SEQ ID NO: 6. Alternativamente, si può impiegare il terminatore del gene Glub4.

Tipicamente, la sequenza nucleotidica complessiva della cassetta d'espressione è come indicata in SEQ ID NO: 1.

Rientrano nel presente trovato le sequenze complementari alle sequenze nucleotidiche sopra espresse.

Rientrano nel presente trovato le sequenze derivanti da processi di mutazione, quali delezioni, inserzioni, transizioni, trasversioni di uno o più nucleotidi delle sequenze sopra espresse o delle sequenze ad esse complementari.

Rientrano nel presente trovato le combinazioni delle sequenze nucleotidiche sopra espresse codificanti la forma matura della beta-glucosidasi acida umana con elementi promotore, sequenze per l'invio nel re-

Il mandatario

STEFANO LIGI

(per sé e per gli altri)

STUDIO GLP S.r.l.

P.le Cavallotti, 6/2 - 33100 UDINE

ticolo endoplasmico e regioni non tradotte in 5' e 3' diverse da quelle presenti nella sequenza come indicata in SEQ ID NO: 1, adatte a ottenere la sintesi e l'accumulo dell'enzima specificamente nell'endosperma  
5 del seme o con sequenze nucleotidiche complementari a dette sequenze.

Fanno parte del presente trovato anche la combinazioni degli elementi i), ii), iii), iv) e v) come sopra espressi, con sequenze codificanti l'enzima maturo diverse da quella riportata nella sequenza come  
10 indicata in SEQ ID NO: 1 per la presenza di mutazioni sinonime o polimorfismi rinvenibili all'interno della specie umana o combinazioni realizzate con sequenze nucleotidiche complementari a dette sequenze.

15 Inoltre, rientrano nell'ambito del presente trovato anche la combinazioni degli elementi di sequenze nucleotidiche i), ii), iii), iv) e v) come sopra espressi con sequenze codificanti le forme mature o i precursori di altri enzimi lisosomiali, o combinazioni  
20 ni realizzate con sequenze nucleotidiche complementari a dette sequenze.

Inoltre, fanno parte del presente trovato anche le combinazioni sopra espresse, in cui l'enzima è l'alfa-glucosidasi acida umana.

25 Fa parte del presente trovato anche una sequenza

come sopra espressa, in cui le piante trasformate sono cereali.

Rientra nel presente trovato un vettore molecolare di espressione di proteina umana in pianta, in particolare di un enzima lisosomiale umano in endosperma di pianta, comprendente la suddetta sequenza nucleotidica. Tipicamente, il vettore molecolare d'espressione è un plasmide.

Secondo una soluzione vantaggiosa, l'enzima lisosomiale è la beta-glucosidasi acida umana.

Alternativamente, l'enzima lisosomiale è l'alfa-glucosidasi acida umana.

Rientra nel presente trovato anche l'uso del vettore d'espressione come sopra indicato per la trasformazione di una pianta per la produzione di una proteina, in particolare un enzima lisosomiale umano.

Rientra nel presente trovato anche un ceppo batterico comprendente vettori di espressione sopra descritti.

Vantaggiosamente, tale ceppo batterico può essere scelto in un gruppo comprendente le specie *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*.

Fanno parte del presente trovato anche cellule vegetali trasformate con vettori di espressione come

sopra descritti.

Secondo una soluzione del trovato, tali cellule sono cellule di cereali, preferibilmente appartenenti alla specie del riso coltivato (*Oryza sativa* L.). Si ha preferenza per le varietà di riso inadatte all'impiego alimentare.

Rientra nel trovato, così, l'utilizzo di tipi waxy, sfruttati industrialmente per l'estrazione e la produzione d'amido e suoi derivati.

Alternativamente, le cellule sono appartenenti alla famiglia delle Graminaceae (*Poaceae*) quali ad esempio mais (*Zea mays* L.), orzo (*Hordeum vulgare* L.) e frumento (*Triticum spp.*).

Fa parte del presente trovato anche un seme di pianta trasformata per l'espressione di una proteina umana, in particolare un enzima lisosomiale umano, che contiene un vettore di espressione come sopra descritto.

Secondo una soluzione del trovato, il seme è di una pianta trasformata appartenente ai cereali, preferibilmente la pianta trasformata è appartenente alla specie del riso coltivato (*Oryza sativa* L.).

Rientra nell'ambito di tutela del presente trovato anche una pianta trasformata per l'espressione di una proteina umana, in particolare un enzima lisosomiale

umano, la quale viene trasformata mediante un vettore di espressione come sopra descritto.

Vantaggiosamente, tale pianta è un cereale, preferibilmente appartenente alla specie del riso coltivato (Oryza sativa L.).

Fanno parte del presente trovato anche le progenie ottenute per autofecondazione o incrocio, oppure linee trasformate selezionate a partire da una pianta trasformata come sopra descritta.

10 Il presente trovato è relativo anche ad un seme come sopra descritto per l'uso nel trattamento terapeutico.

Inoltre, il trovato è riferito anche all'uso del suddetto seme per la produzione di un medicamento per un trattamento terapeutico enzimatico di sostituzione.

In particolare, si fa riferimento ad un trattamento terapeutico enzimatico di sostituzione nelle seguenti malattie: malattia di Gaucher, glicogenosi 2, malattia di Fabry, malattia di Niemann-Pick B, Mucopolisaccaridosi I, II, IV.

Il trovato è relativo anche ad un seme come sopra espresso per l'uso nel trattamento terapeutico enzimatico di sostituzione.

25 In particolare, il trovato si riferisce ad un seme

come sopra indicato per l'uso nel trattamento terapeutico enzimatico di sostituzione nelle seguenti malattie: malattia di Gaucher, glicogenosi 2, malattia di Fabry, malattia di Niemann-Pick B, Mucopolisaccaridosi I, II, IV.

#### ILLUSTRAZIONE DEI DISEGNI

Queste ed altre caratteristiche del presente trovato appariranno chiare dalla seguente descrizione di una forma preferenziale di realizzazione, fornita a titolo esemplificativo, non limitativo, con riferimento agli annessi disegni in cui:

- la fig. 1 è uno schema del vettore finale di espressione pSV2006[GluB4pro/LL-TCK/PSGluB4/GCase/NOSter] utilizzato per la produzione endosperma specifica dell'enzima beta-glucosidasi acida umana;
- la fig. 2A rappresenta uno schema sperimentale della procedura di sintesi del leader LL-TCK a valle del promotore GluBs4 attraverso recursive PCR;
- la fig. 2B rappresenta i risultati di una corsa elettroforetica di prodotti PCR-duplex ottenuti con primer specifici per l'amplificazione dei geni GCase e HPT II

5 su DNA genomico estratto da piante di  
riso putativamente trasformate. Corsia  
1: Ladder 1 Kb (NEB); corsia 2: CN, DNA  
genomico da pianta non trasformata; cor-  
s  
sia 3: CP, vettore pSV2006[GluB4pro/LL-  
TCK/PSGluB4/GCase/NOster]; corsie 4-16:  
piante saggiate;

10 - le figg. 3A e 3B rappresentano i risultati ottenuti  
su estratti proteici prodotti in prove  
di estrazione mediante SDS-PAGE (A) e  
analisi Western blot (B). In A e B le  
corsie 1,2,3,4,5 corrispondono a estra-  
zioni consecutive di uno stesso campione  
di riso sbiancato, le corsie 6 e 7 a  
15 due estrazioni consecutive di uno stesso  
campione di farinaccio. CP: controllo  
positivo per Western blot corrispondente  
a 100 ng imiglucerasi. Come risulta evi-  
denziato, gran parte della beta-  
20 glucosidasi acida umana è recuperabile  
nelle prime tre estrazioni da seme di  
riso sbiancato;

25 - la fig. 4A raffigura i risultati ottenuti in anali-  
si Western blot condotte su estratti  
proteici totali da seme. Corsia 1:

- marker Precision Plus Protein standard (BioRad); Corsia 2: CP (100 ng imiglucerasi); Corsia 3: CN (estratto proteico da seme non trasformato della var. di
- 5 riso CR W3); Corsie 4-10: estratti proteici da seme prodotto da diversi trasformati primari;
- la fig. 4B mostra le 3 glicoforme di beta-glucosidasi acida umana evidenziate mediante Western blotting successivamente
- 10 a elettroforesi 2-D di un estratto proteico da seme di riso trasformato;
- le figg. 5A e 5B riportano un'immagine ottenuta al microscopio elettronico a trasmissione
- 15 (ingr. 12500x) dell'immunolocalizzazione eseguita su sezioni di seme di riso non trasformato (A) e trasformato (B). E' evidente come l'accumulo di beta-glucosidasi acida umana avvenga esclusi-
- 20 vamente nei vacuoli proteici di riserva. PSV: Protein Storage Vacuole;
- le figg. 6A e 6B riportano i cromatogrammi delle cromatografie HIC (A) e IEC (B). In evidenza, i picchi di eluizione contenenti
- 25 la beta-glucosidasi acida umana;

- 5 - la fig. 7 riporta il grafico delle fluorescenze registrate per le aliquote cromatografiche ottenute da CN (pianta non trasformata) e da pianta transgenica, e il corrispondente Western blot. ES: estratto grezzo; R: flow through; E: aliquote di eluizione. L'attività enzimatica di Gcase (E2-E3) viene distinta da quella endogena (E6); ciò trova conferma nell'analisi WB: solo i campioni contenenti Gcase (E2-E3) danno una banda dal peso molecolare atteso; CP: imiglucerasi;
- 10 - le figg. 8A e 8B mostrano i risultati dell'analisi SDS-PAGE (A) sul campione purificato di beta-glucosidasi acida umana ottenuto da gel-filtrazione e il corrispondente segnale in Western blot (B);
- 15 - la fig. 9 riporta lo spettro delle masse ottenuto dall'analisi MALDI-TOF di un campione purificato mediante cromatografie HIC e IEC di beta-glucosidasi acida umana.
- 20

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DEL PRESENTE TROVATO

Il presente trovato è, in particolare, relativo ad un procedimento per la produzione di una beta-glucosidasi acida umana in endosperma di riso (*Oryza*

25

sativa L.) che comprende:

- una prima fase di trasformazione delle piante mediante la quale realizzare il confinamento della beta-glucosidasi in un endosperma non assorbito  
5 dall'embrione e permettere che la presenza di elevati quantitativi della proteina nell'endosperma del seme non determini effetti negativi sulla germinabilità e sull'energia germinativa del seme;

- l'utilizzazione, nella prima fase di trasformazione  
10 zione delle piante, di un promotore endosperma-specifico a monte del gene codificante detta proteina e di un peptide segnale per l'invio cotraduzionale della beta-glucosidasi nascente nel lume del reticolo endoplasmico delle cellule componenti il tessuto  
15 dell'endosperma e per il suo accumulo tissutale nell'endosperma all'interno dei vacuoli di riserva proteica (Protein Storage Vacuoles, PSV) o nei corpi proteici (Protein Bodies, PB);

- una seconda fase d'accumulo della beta-glucosidasi all'interno dell'endosperma del seme delle  
20 piante.

Il procedimento prevede di trasformare le piante mediante un vettore di espressione comprendente una sequenza nucleotidica contenente i seguenti elementi:

25 i) un promotore endosperma-specifico di origine

naturale o artificiale;

ii) una regione 5' UTR di origine naturale o artificiale;

iii) una sequenza nucleotidica di origine naturale  
5 o artificiale codificante un peptide segnale per  
l'invio della beta-glucosidasi ricombinante  
all'interno del lume del reticolo endoplasmico delle  
cellule componenti il tessuto dell'endosperma e per  
il suo accumulo tissutale;

10 iv) una sequenza nucleotidica di origine naturale o  
artificiale codificante la forma matura della beta-  
glucosidasi umana;

v) una regione 3' UTR di origine naturale o artificiale.

15 La sequenza nucleotidica contenuta nel vettore  
d'espressione è, ad esempio, come indicata in SEQ ID  
NO: 1.

Tra i possibili noti promotori endosperma-specifici  
di piante graminacee e di riso in particolare, il  
20 presente trovato impiega vantaggiosamente il promotore  
della proteina GluB4, la cui sequenza è indicata  
in SEQ ID NO: 2, in quanto tale proteina GluB4 presenta  
una distribuzione più uniforme all'interno  
dell'endosperma del seme.

25 Inoltre, il promotore di GluB4 è contraddistinto da

un'attività trascrizionale più elevata, qualora com-  
parato con i promotori di geni codificanti altre pro-  
teine di riserva presenti nell'endosperma di riso,  
quali globuline, prolamine o gluteline diverse da  
5 GluB4.

Il promotore di GluB4 è stato isolato mediante PCR  
dalla varietà waxy CR W3 (Ente Nazionale Risi) unita-  
mente alla regione leader. Tuttavia, quest'ultima è  
apparsa piuttosto breve e scarsamente dotata di ele-  
10 menti CAA e CT ripetuti in grado di rafforzare  
l'espressione genica ed è stata conseguentemente so-  
stituita con la sequenza 5' UTR nota come LL-TCK (De  
Amicis et al. 2007, Transgenic Research) e riportata  
nella domanda di brevetto internazionale  
15 PCT/EP2007/064590 ed indicata in SEQ ID NO: 3.

La sequenza GluB4pro/LL-TCK è stata saldata con  
PSGluB4/GCase dove:

- PSGluB4 è la sequenza (come indicata in SEQ ID  
NO: 4) codificante il peptide segnale utilizzato in  
20 riso per veicolare il precursore della glutelina 4  
all'interno del reticolo endoplasmico;

- GCase è la sequenza (come indicata in SEQ ID NO:  
5) codificante la forma umana matura della beta-  
glucosidasi acida, intendendo per forma matura il  
25 tratto polipeptidico che risulta a seguito di rimo-

zione del peptide segnale nativo. Per evitare l'aggiunta di amminoacidi estranei al terminale amminico dell'enzima maturo conseguente all'addizione di siti di riconoscimento per endonucleasi di restrizione  
5 ne utilizzate nell'unione delle due sequenze, è stato prodotto per sintesi artificiale un tratto di DNA comprendente la sequenza PSgluB4 e la regione iniziale di GCCase fino al sito Hind III naturalmente presente all'interno di detta sequenza.

10 La sequenza PSgluB4 presente entro tale tratto, pur essendo totalmente sinonima, non corrisponde a quella naturale di riso, poiché essa è stata ridisegnata allo scopo di favorire il riconoscimento del codone di inizio traduzione in associazione alla sequenza LL-  
15 TCK e di evitare l'impiego di codoni rari o generanti contesti intercodonici sfavorevoli.

Al contrario, la regione iniziale di GCCase è stata mantenuta inalterata rispetto alla sequenza umana nativa, sicché l'intera sequenza GCCase corrisponde e-  
20 sattamente a quella contraddistinta dal n. di accessione GenBank M16328 nel tratto compreso tra le posizioni 553 e 2046.

Dopo aver fuso mediante impiego del sito Hind III la sequenza sintetica con il tratto codificante la  
25 parte rimanente dell'enzima, l'intero complesso è

Il mandatario  
STEFANO LIGI  
(per sé e per gli altri)  
STUDIO GLP S.r.l.  
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

stato a sua volta legato al terminale 3' di GluB4pro/LL-TCK precedentemente clonato all'interno del vettore binario pSV2006. Tale vettore è stato sviluppato dalla Richiedente a partire dal plasmide  
5 pCAMBIA 1301 (www.cambia.org); il segnale di poliadenilazione utilizzato nel costrutto relativo alla beta-glucosidasi acida umana è stato NOSTer, ovvero il terminatore del gene codificante la nopalina sintasi di *Agrobacterium tumefaciens*. La sequenza del terminatore NOS è indicata in SEQ ID NO: 6.  
10

Dopo aver provveduto a una verifica di tutte le sequenze utilizzate nella costruzione del vettore finale pSV2006[GluB4pro/LL-TCK/PSGluB4/GCase/NOSTer] (fig. 1), esso è stato introdotto mediante elettroporazione in *Agrobacterium tumefaciens* ceppo EHA 105.  
15 Successivamente a controllo, il ceppo ingegnerizzato è stato utilizzato per la trasformazione di calli embriogenici di riso (*Oryza sativa* ssp. *japonica*, varietà CR W3). L'intera procedura di trasformazione e rigenerazione di plantule su substrato selettivo si è  
20 svolta regolarmente. Allo stesso modo, non è stata osservata alcuna anomalia di sviluppo nelle piante allevate alle condizioni di luce, temperatura e umidità dell'aria normalmente applicate per il riso nelle celle climatiche di confinamento. La fertilità de-  
25

gli organi maschile e femminile e la percentuale di aborto florale sono risultate comparabili a quelle rilevate in piante non trasformate della varietà CR W3. Tutti i trasformati primari hanno fornito seme  
5 con germinabilità superiore al 95%, indipendentemente dal livello di espressione della beta-glucosidasi acida. L'energia germinativa ha inoltre mostrato i valori massimi della specie (entro 4-6 giorni, la quasi totalità del seme germinabile aveva emesso le radici  
10 primarie e il coleottilo). Al pari dei trasformati primari, anche le loro progenie si sono sviluppate normalmente e hanno prodotto seme contenente beta-glucosidasi acida. La presenza del gene codificante l'enzima è stata verificata mediante analisi PCR su  
15 tutte le piante putativamente trasformate e su oltre 150 piante campionate a caso entro le popolazioni di piante derivate per autofecondazione dai migliori trasformati primari. In tali analisi, si è fatto uso di controlli negativi costituiti da estratti di DNA  
20 totale ottenuti da piante non trasformate della varietà CR W3 e positivi (estrazioni in miniprep del vettore plasmidico di espressione). Inoltre, è stata verificata l'effettiva amplificabilità del DNA totale estratto da ciascuna pianta conducendo PCR con una  
25 coppia di primer in grado di appaiarsi al DNA cloro-

Il mandatario  
STEFANO LIGI  
(per sé e per gli altri)  
STUDIO GLP S.r.l.  
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

plastico di riso. Nel complesso, le analisi PCR hanno dimostrato l'effettiva trasformazione del riso con il gene per la beta-glucosidasi acida umana e il passaggio di detto gene alla progenie. La trasmissione ereditaria del carattere è stata dimostrata non solo  
5 nelle progenie ottenute a seguito di autofecondazione ma anche in quelle derivanti da incrocio tra piante trasformate e controllo negativo o tra una pianta trasformata e l'altra.

10 Per accertare la produzione di RNA messaggero per la beta-glucosidasi acida umana, cariossidi di riso allo stadio di maturazione latteo-cerosa sono state raccolte e utilizzate per l'estrazione di RNA totale. Sull'RNA totale dei campioni sono state effettuate le  
15 seguenti analisi: a. assenza di contaminazione con DNA genomico a mezzo PCR; b. amplificazione con RT-PCR del messaggero per la beta-glucosidasi acida umana; c. amplificazione con RT-PCR del messaggero per la glutelina 4. In tutti i casi, il gene per la beta-  
20 glucosidasi acida è apparso regolarmente espresso e ha manifestato il medesimo profilo di espressione del gene per la proteina di riserva glutelina 4. Come atteso, utilizzando l'RNA totale estratto dal controllo negativo, è stata ottenuta unicamente  
25 l'amplificazione del gene GluB4.

Facendo uso di cariossidi allo stadio di maturazione cerosa, è stata inoltre identificata mediante immunoelettromicroscopia a trasmissione l'esatta localizzazione della proteina ricombinante nel seme.

5 Quest'ultima è risultata presente unicamente nei vacuoli di riserva proteica interni alle cellule dell'endosperma. Impiegando le medesime tecniche, nei campioni prelevati da piante CR W3 non trasformate non è comparso alcun segnale, a dimostrazione

10 dell'efficacia dell'analisi e della assoluta specificità dell'anticorpo utilizzato.

La disponibilità di un buon anticorpo unitamente alla possibilità di misurare attraverso un saggio fluorimetrico affidabile e sensibile l'attività beta-

15 glucosidasica sono state entrambe sfruttate per la definizione di un metodo di purificazione della proteina all'omogeneità e per la selezione delle migliori linee transgeniche. In relazione al primo punto, sono stati sviluppati protocolli per la prima lavorazione

20 zione del seme, per l'ottenimento di estratti proteici crudi e per l'isolamento e la purificazione della beta-glucosidasi umana ricombinante. Quest'ultimo protocollo è composto da tre passaggi seriali: cromatografia a interazioni idrofobiche, cromatografia a

25 scambio cationico, gel-filtrazione. La sbramatura e

sbiancatura del seme sono risultate adatte a rimuovere gran parte delle proteine contaminanti con una perdita contenuta dell'enzima desiderato; scarse sono anche risultate le perdite in fase di estrazione. La rimozione dell'enzima endogeno avente attività beta-glucosidasica è stata ottenuta con un procedimento di eluizione frazionata applicato al termine della cromatografia a scambio cationico; questo passaggio ha consentito di diminuire alquanto il numero delle proteine contaminanti assegnando alla successiva gel-filtrazione il ruolo di finitura del campione.

In SDS-PAGE, la proteina purificata ha manifestato una mobilità del tutto paragonabile a imiglucerasi (Cerezyme, Genzyme Corp.) e un peso molecolare apparente attorno a 60 kDa. In Western blotting, la proteina purificata è apparsa fortemente e specificamente segnalata da un anticorpo anti-imiglucerasi appositamente prodotto in coniglio. Sottoponendo la proteina purificata a saggio fluorimetrico per la determinazione dell'attività beta-glucosidasica, essa ha dimostrato di demolire efficacemente il substrato fluorogenico 4-metilumbelliferil beta-D-glucoside manifestando la stessa cinetica di reazione di imiglucerasi e un'attività specifica comparabile. Effettuando una elettroforesi 2-D, la banda unica eviden-

ziata in analisi Western successive a SDS-PAGE è apparsa in realtà composta da almeno 3 glicoforme della proteina. Ulteriori analisi hanno inteso provare l'integrità della beta-glucosidasi acida umana ricombinante prodotta in endosperma di riso e la piena identità di sequenza amminoacidica tra quest'ultima e la controparte umana nativa. Il microsequenziamento del terminale amminico della proteina prodotta in pianta ha dimostrato che l'ottapeptide iniziale corrisponde a ARPCIPKSF ovvero al medesimo N-terminale delle beta-glucosidasi acida umana. Inoltre, analisi condotte in MALDI-TOF su digesto triptico di beta-glucosidasi acida umana ricombinante prodotta in endosperma di riso hanno stabilito che anche il terminale carbossilico corrisponde esattamente alla beta-glucosidasi acida umana. La tecnica di peptide mass fingerprinting eseguita in MALDI-TOF ha non solo definitivamente confermato l'identità di sequenza amminoacidica tra le due proteine ma anche dimostrato che il quinto sito di N-glicosilazione non è occupato da glicani. Al contrario, il primo, secondo, terzo e quarto sito di N-glicosilazione della proteina sono apparsi glicosilati. La presenza di N-glicani a livello del primo sito assume particolare significato in vista dell'importanza che quest'ultimi rivestono

nell'acquisizione di attività enzimatica da parte della proteina.

#### ESEMPI

##### Esempio 1: costruzione della cassetta molecolare di

##### 5 espressione

Viene di seguito riportata una procedura atta a dirigere l'espressione endosperma-specifica della beta-glucosidasi acida umana in riso. Procedure analoghe possono essere utilizzate per la realizzazione di vari  
10 rianti del costrutto caratterizzate dalla presenza di altri promotori endosperma-specifici e/o sequenze per l'invio nel reticolo endoplasmico.

##### Isolamento del promotore della Glutelina 4 (GluB4pro)

Per isolare il promotore della glutelina 4 di Oryza  
15 sativa, è stata effettuata una PCR sul DNA genomico estratto dalla var. CR W3. In detta PCR, sono stati utilizzati i seguenti primer disegnati sulla base della sequenza del promotore depositata in banca dati (GenBank acc. n° AY427571):

20 Primer GluB4pro for: come indicato nelle sequenza SEQ ID NO: 7.

Primer GluB4pro rev: come indicato nelle sequenza SEQ ID NO: 8.

Al fine di favorire le successive operazioni di  
25 clonazione, il primer GluB4 for inserisce al termina-

le 5' i siti di restrizione Sph I ed Eco RI, il primer GluB4 rev il sito Xba I in 3'.

Ciclo: 95°C per 2', 40x(95°C per 45", 63°C per 40", 72°C per 2'), 72°C per 5'.

5 L'amplificato ottenuto è stato quindi clonato nel vettore pGEM-T (Promega) e interamente sequenziato. Sostituzione del leader nativo con il leader sintetico LL-TCK nel promotore GluB4pro

Per effettuare la sostituzione del leader nativo  
10 del promotore della glutelina 4 (GluB4pro) di riso con il leader sintetico LL-TCK (De Amicis et al., 2007), sono state eseguite tre PCR seriali utilizzando primer disegnati ad hoc (un primer forward e tre primer reverse) secondo lo schema rappresentato in  
15 fig. 2A.

Nella prima PCR è stato utilizzato come stampo il plasmide pGEM-T[GluB4pro], nelle due PCR successive il prodotto della reazione precedente. Il primer forward 1 inizia con il sito di restrizione Bfr I e appaia  
20 con un tratto di sequenza di GluB4pro che si trova al terminale 3' dello stesso, in posizione precedente al leader. Il primer reverse 1 appaia nella sua porzione 3' con il tratto di sequenza interna a GluB4pro immediatamente a monte dell'inizio del  
25 leader nativo. La parte che non appaia porta alla

creazione del tratto iniziale di LL-TCK. Il primer reverse 2 appaia con il nuovo tratto aggiunto e incorpora a sua volta un altro tratto, proseguendo nella sintesi della sequenza leader desiderata. Infine, 5 il primer reverse 3 codifica per l'ultimo tratto di sequenza del leader sintetico LL-TCK e introduce in 3' il sito di restrizione Xba I. Le miscele di reazione sono state allestite utilizzando Accu Taq (Sigma) e il seguente ciclo: 98°C per 2', 15(I e II PCR)- 10 25(III PCR)x(94°C per 30", 65°C per 30", 68°C per 1'), 68°C per 10'.

Il prodotto finale di PCR è stato clonato in pGEM-T e verificato tramite analisi PCR, digestione enzimatica e sequenziamento.

15 Si è quindi eseguita la sostituzione del leader nativo presente in GluB4pro con il leader sintetico LL-TCK appena costruito. Per far ciò, il tratto terminale di GluB4pro (contenente il leader nativo) è stato rimosso mediante digestione con gli enzimi Bfr 20 I e Xba I, e al suo posto è stata introdotta la nuova sequenza sintetizzata, digerita a sua volta con Bfr I e Xba I. Vettore e inserto sono stati saldati mediante T4 DNA ligasi e il vettore risultante pGEM-T[GluB4pro/LL-TCK] è stato verificato tramite analisi 25 PCR e digestione enzimatica.

Sostituzione del PS nativo con il PSgluB4 ottimizzato per l'espressione in riso

Per migliorare il costrutto di espressione, si è deciso di anteporre alla sequenza codificante la forma matura della beta-glucosidasi acida (GCase) quella  
5 relativa al peptide segnale della glutelina 4 ottimizzato per l'espressione in riso (PSgluB4). Per evitare l'aggiunta di amminoacidi estranei al terminale amminico dell'enzima maturo conseguente all'addizione  
10 di siti di riconoscimento per endonucleasi di restrizione utilizzate nell'unione delle due sequenze, è stato prodotto per sintesi artificiale un tratto di DNA comprendente la sequenza PSgluB4 munita al terminale 5' del sito Xba I e la regione iniziale di GCase  
15 fino al sito Hind III. La sequenza codificante PSgluB4 è stata disegnata tenendo conto della preferenza codonica di riso. L'intero tratto è stato sintetizzato artificialmente e clonato all'interno di pUC57 (Fermentas). Dopo essere stato verificato me-  
20 diante sequenziamento, esso è stato clonato in sostituzione della sequenza codificante il PS nativo all'interno di pGEM-T[GCase] ovvero del plasmide contenente l'intera sequenza codificante la beta-glucosidasi acida umana così come depositata al numero  
25 di accessione GenBank M16328. Entrambi i vettori

pUC57[PSGluB4] e pGEM-T[GCCase] sono stati digeriti con Xba I e Hind III in modo da generare rispettivamente l'inserito e il vettore da sottoporre a saldatura con T4 DNA ligasi per la realizzazione di pGEM-T[PSGluB4/GCase]. Tale vettore è stato opportunamente controllato mediante digestioni enzimatiche.

Assemblaggio della cassetta molecolare di espressione della beta-glucosidasi acida umana

Le regioni corrispondenti a GluB4pro/LL-TCK e PSGluB4/GCase sono state introdotte con due distinte subclonazioni nel plasmide pUC18[NOSter] derivato da pUC18 (Pharmacia) per inclusione della sequenza di poliadenilazione del gene NOS di *Agrobacterium tumefaciens*. A tal fine, sono stati sfruttati i siti di restrizione introdotti ai terminali 5' e 3' di ciascuna regione, in particolare Sph I e Xba I per GluB4pro/LL-TCK, Xba I e Sac I per PSGluB4/GCase.

Realizzazione del vettore pSV2006[GluB4pro/LL-TCK/PSGluB4/GCase/NOSter]

Per l'ottenimento del vettore finale di espressione è stato utilizzato il plasmide pSV2006, derivato da pCAMBIA 1300. Mediante digestione con Eco RI, è stata rimossa: da pSV2006 una precedente cassetta di espressione; da pUC18[GluB4pro/LL-TCK/PSGluB4/GCase/NOSter] il costruito molecolare di

interesse. Si è proceduto quindi alla saldatura dei frammenti per l'ottenimento del vettore finale (fig. 1), il quale è stato sottoposto a specifiche verifiche (fig. 2B) prima di essere movimentato per elettroporazione in *Agrobacterium tumefaciens*, ceppo EHA 5 105. Il ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* ingegnerizzato è stato impiegato per la trasformazione di *Oryza sativa* ssp. *japonica*, var. CR W3.

Esempio 2: trasformazione di riso mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Per la trasformazione di riso si è utilizzato il protocollo di Hiei et al. (1994), modificato da Hoge (Rice Research Group, Institute of Plant Science, Leiden University) e Guiderdoni (programma Biotrop, 15 Cirad, Montpellier, France). Qui di seguito sono brevemente descritte le fasi principali della procedura.

Sviluppo di calli embrionici

La trasformazione di riso è avvenuta su calli embrionici derivati da scutello.

20 Per indurre la proliferazione di calli da tessuto scutellare, è stata dapprima eseguita la sbramatura dei semi di riso. Per eliminare potenziali patogeni e saprofiti contaminanti, si è proceduto quindi alla disinfezione delle cariossidi e a una serie di lavaggi in acqua sterile. Successivamente, i semi sono 25

stati asciugati su carta bibula sterile e depositati su piastre Petri contenenti il substrato per l'induzione a callo (CIM, callus-induction medium).

Le piastre così ottenute sono state incubate al buio, a una temperatura di 28 °C per 21 giorni; dopo 5  
1 settimana di incubazione si è proceduto all'eliminazione dell'endosperma e della radichetta per favorire lo sviluppo del callo proveniente dallo scutello.

10 Terminate le 3 settimane di induzione, si è operato il trasferimento del callo su substrato CIM rinnovato, a cui ha fatto seguito la frammentazione delle masse callose. La sub-coltura è stata fatta proseguire per altri 10 giorni in modo da sviluppare il callo  
15 embriogenico e renderlo idoneo alla trasformazione.

Co-coltura dei calli con *Agrobacterium tumefaciens*

Per ottenere quantità sufficienti di *Agrobacterium tumefaciens* per la trasformazione, il ceppo portante il vettore di espressione è stato incubato per 3  
20 giorni a 30°C in LB agar.

Ottenute le colture di agrobatterio, le relative patine di crescita batterica sono state prelevate e sospese nel mezzo liquido di co-coltivazione (CCML, co-cultivation medium liquid), fino ad ottenere una  
25 O.D.<sub>600</sub> di circa 1.0, corrispondente a  $3-5 \cdot 10^9$  cellu-

le/mL.

I calli migliori, cioè quelli con un diametro di circa 2 mm, compatti e dal colore tendente al bianco, sono stati incubati con la sospensione. Dopo asciugatura, i calli, in numero massimo di 20 per piastra Petri high-edge (Sarstedt), sono stati depositati sul substrato solido per la co-coltura (CCMS, co-cultivation medium solidified) e incubati in ambiente buio, a una temperatura di 25°C per 3 giorni.

10 Selezione di calli resistenti all'antibiotico igromicina

I calli provenienti dalla co-coltura sono stati trasferiti su substrato selettivo I (SMI, selection medium I) e incubati al buio, a una temperatura di 15 28°C per 2 settimane.

In seguito, i calli sono stati trasferiti su piastre Petri high-edge contenenti il substrato di selezione II (SMII, selection medium II) e incubati alle stesse condizioni sopraindicate per un'ulteriore settimana.

20 Rigenerazione di piantine di riso da calli trasformati

La rigenerazione delle piantine transgeniche è avvenuta grazie a un'opportuna stimolazione ormonale del callo trasformato.

I calli embriogenici di riso resistenti all'igromicina sono stati selezionati, trasferiti su piastre Petri high-edge contenenti il substrato per la pre-rigenerazione (PRM, pre-regeneration medium) e  
5 incubati per 1 settimana a 28°C. I calli sono stati quindi trasferiti sul substrato per la rigenerazione (RM, regeneration medium) nel numero massimo di 8-10 unità per piastra Petri high-edge. La rigenerazione delle piantine è avvenuta in presenza di luce, a 28°C  
10 per 3-4 settimane.

Quando le piantine sono risultate sufficientemente grandi da poter essere separate dal callo ( $\geq 3$  cm di altezza), si è proceduto al loro trasferimento in tubi di coltura contenenti 25 mL del substrato per la  
15 radicazione (ROM, rooting medium). La sub-coltura all'interno di tubi è proseguita per circa 3 settimane sempre a 28°C alla luce.

A conclusione del processo rigenerativo, le piante sono state trasferite in torba e allevate in fitotrone a 24°C, umidità relativa 85%, con illuminazione  
20 fornita da lampade ad alogenuri metallici Osram Powerstar® HQI®-BT 400 W/D (fotoperiodo 16 h luce/8 h buio).

Esempio 3: estrazione di proteine totali da semi di  
25 riso

I semi di riso trasformati sono stati inizialmente sbramati e sbiancati con sbiancatrice Satake TO-92 (Satake Corporation, Japan). I semi sbiancati sono stati poi macinati e la farina risultante è stata omogeneizzata in tampone di estrazione (50 mM sodioacetato, 350 mM NaCl, pH = 5.5), utilizzando un rapporto tra volume di tampone (mL) e peso della farina (g) pari a 10:1.5. Dopo incubazione a 4°C per un'ora, si è eseguita una centrifugazione a 14000xg per 45 minuti. Dopo il recupero del surnatante, il pellet residuo è stato sottoposto a due ulteriori estrazioni applicando la medesima procedura.

Gli estratti proteici ottenuti da seme sbiancato e da farinaccio sono stati analizzati in SDS-PAGE (figg. 3A e 3B) e Western blot; queste analisi hanno dimostrato che gran parte della beta-glucoosidasi acida è contenuta nel seme sbiancato e che essa può essere recuperata efficacemente con tre estrazioni consecutive.

20 Esempio 4: analisi Western-Blot ed elettroforesi 2-D su estratti proteici totali

Gli estratti proteici totali sono stati separati in elettroforesi SDS-PAGE (Laemmli, 1970) utilizzando l'apparato Mini Protean II (BioRad), con uno spessore del gel di 0.75 mm e una percentuale di acrilammide

pari al 10%. Prima del caricamento, i campioni sono stati denaturati a 100°C per 5 min in assenza di beta-mercaptoetanololo.

Le proteine separate sono state trasferite su  
5 membrana di polivinilidene difluoride (PVDF, Immobilon-PSQ-Millipore) utilizzando l'apparato Trans-BLOT® SD (BioRad) a 15V per 30 minuti.

I campioni sono stati quindi ibridati con un anticorpo policlonale (anti-GCase) prodotto  
10 immunizzando due conigli con l'analogo commerciale imiglucerasi (Genzyme Corp.). Sono state applicate le seguenti condizioni di ibridazione: un'ora di incubazione a temperatura ambiente utilizzando una diluizione 1:1000 in soluzione di blocking (7.5% p/v  
15 latte scremato in polvere-Oxoid in PBS). Dopo i lavaggi in PBS Tween 0.1% v/v, è stata effettuata un'incubazione di 1 ora in anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato con HRP (Sigma, diluizione 1:10000). In tutti i casi è stato utilizzato il  
20 sistema di rilevazione ECL Plus™ (GE Healthcare).

Per la determinazione dei pesi molecolari è stato usato il marker Precision Plus Protein standard (BioRad) in abbinamento all'anticorpo Precision Streptactin coniugato con HRP (BioRad). (fig. 4A)

25 Due campioni contenenti circa 200 µg di proteine

totali estratte da seme di una pianta trasformata, sono stati sottoposti a isoelettrofocusing e SDS-PAGE. La prima analisi è stata condotta utilizzando l'apparato PROTEAN IEF focusing system (BioRad) e le  
5 strip ReadyStrip IPG di 7 cm con un range di pH non lineare compreso tra 3 e 10 (BioRad). Gli estratti proteici sono stati precipitati mediante il sistema 2D Clean-Up Kit (GE Healthcare) e risospesi in 130  $\mu$ L di DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare), a  
10 cui è stato aggiunto lo 0.6% di amfoliti Bio-Lytes 3-10 (BioRad). Sono state applicate le seguenti condizioni di corsa:

step1: 250 V per 15 minuti

step2: 4000 V per 2 ore

15 step3: 20000 V-ora in 24 ore circa.

A fine corsa, le strip sono state sottoposte a due lavaggi di equilibratura: 15 minuti nel tampone di equilibratura I (2% DTT, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 30% glicerolo e 0.002% blu di bromofenolo, pH =  
20 8.8) e 20 minuti nel tampone di equilibratura II (2.5% iodoacetamide, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 30% glicerolo e 0.002% blu di bromofenolo, pH = 8.8). Per entrambi i campioni, è stata quindi eseguita la corsa della seconda dimensione in SDS-PAGE secondo protocollo standard.  
25

A fine corsa, il gel è stato colorato mediante una soluzione di Colloidal Coomassie Blue (0.08% Coomassie Blue R-250, 1.6% acido orto-fosforico, 8% ammonio solfato, 20% metanolo), mentre il secondo è stato sottoposto ad analisi Western blot (fig. 4B). L'intera procedura è stata eseguita in parallelo anche per due campioni proteici ottenuti da semi di CR W3 non trasformati.

Esempio 5: determinazione del sito di accumulo mediante immunolocalizzazione

Cariossidi di riso trasformato in fase di maturazione latteata avanzata sono state raccolte, private delle glume, tagliate in frammenti di circa 1 mm<sup>s</sup> e fissate in glutaraldeide 0.2% per 1 ora a temperatura ambiente. E' seguita una fase di lavaggio in tampone fosfato 0.15 M e la disidratazione in gradiente di etanolo assoluto (da 25 a 100%). I campioni disidratati sono state infiltrati in resina LR White (London Resin Co.) e infine polimerizzati a 60°C per 24 ore.

Le sezioni (spessore 2-3 µm) sono state tagliate con un microtomo LKB Nova (Reichert), depositate su retini di nichel (Electron Microscopy Sciences), incubate in una soluzione di siero normale di capra (Aurion), diluito 1:30 in buffer C (0.05 M Tris-HCl pH 7.6, 0.2% BSA), per 15 min e successivamente ibri-

date con l'anticorpo primario (anti-GCase), diluito 1:500 in buffer C, per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo una serie di lavaggi in buffer B (0.5 M Tris-HCl pH 7.6, 0.9% NaCl) con Tween 20 0.1% p/v (6 x 5 minuti), le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario coniugato con oro colloidale (15 nm, Aurion) diluito 1:40 in buffer E (0.02 M Tris-HCl, pH 8.2 contenente 0.9% NaCl e 1% BSA) per 1 ora a temperatura ambiente.

10 Terminata l'ibridazione, le sezioni sono state sottoposte a una serie di lavaggi e a colorazione con acetato di uranile e piombo citrato (Reynolds, 1963) e infine osservate al microscopio ottico a trasmissione (TEM) Philips CM10.

15 I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare la presenza di GCase nei soli vacuoli proteici di riserva (PSV, acronimo di Protein Storage Vacuole) presenti nell'endosperma della cariosside: l'anticorpo policlonale anti-GCase ha permesso di identificare GCase in maniera molto evidente grazie a un segnale intenso e privo di rumore di fondo.

La prova eseguita con la medesima procedura su cariossidi di riso non trasformato ha confermato la mancanza di siti di legame aspecifici per l'anticorpo anti-GCase, evidenziando quindi un'elevata specificità.

tà della IgG nei confronti dell'enzima (figg. 5A e 5B).

Esempio 6: purificazione all'omogeneità di beta-glucosidasi acida umana

5 Per la purificazione di GCase, è stato messo a punto un protocollo scalabile industrialmente basato su una prima fase di capturing eseguita con una cromatografia a interazioni idrofobiche (HIC) (fig. 6A); una fase intermedia attuata con una cromatografia a scambio ionico (IEC) (fig. 6B); una fase finale di polishing realizzata mediante gel-filtrazione. Tutte le  
10 cromatografie sono state effettuate con il cromatografo AKTA Prime (GE Healthcare).

Cromatografia a interazioni idrofobiche (HIC)

15 E' stata utilizzata una colonna preimpaccata HiTrap Octyl FF da 5 mL (GE Healthcare). Inizialmente la colonna è stata equilibrata con 1 volume di tampone di carico (50 mM sodio acetato, 350 mM NaCl e 100 mM ammonio solfato, pH=5.5); prima del carico, mediante  
20 una soluzione di 3 M ammonio solfato, l'estratto di proteine totali è stato portato a una concentrazione finale di 100 mM ammonio solfato e filtrato mediante filtri da 0.2 µm (Millipore). Il carico in colonna è stato eseguito a una velocità di 1 mL/minuto. La  
25 colonna è stata quindi lavata con 3 volumi di tampone

di carico e con 50 mM sodio acetato, pH = 5.5 fino a  
ottenere un cromatogramma piatto. L'eluizione è stata  
eseguita con 66% di etilen glicole in 50 mM sodio a-  
cetato. Alla fine della procedura, la colonna è stata  
5 lavata e rigenerata con 20% etanolo.

Cromatografia a scambio ionico (IEC)

E' stata utilizzata una colonna preimpaccata HiTrap  
SP FF da 5 mL (GE Healthcare), contenente una resina  
a scambio cationico equilibrata in tampone 50 mM so-  
10 dio acetato, pH = 5.5; è seguito il carico  
dell'eluato derivato da cromatografia HIC diluito 1:1  
con il suddetto tampone. Dopo opportuni lavaggi, è  
stata impostata un'eluizione basata su un gradiente  
discontinuo con percentuali crescenti di NaCl pari a  
15 15, 20 e 100%. La procedura si è conclusa mediante  
lavaggio e rigenerazione della resina con 20% etano-  
lo. Le analisi immunologiche condotte su aliquote  
prelevate da ciascuna fase della cromatografia hanno  
dimostrato che la beta-glucosidasi acida umana viene  
20 eluita con il 20% NaCl.

Prove di attività enzimatica condotte su eluati de-  
rivati da estratti di seme non trasformato hanno di-  
mostrato che la separazione della beta-glucosidasi  
acida umana dalla componente responsabile  
25 dell'attività beta-glucosidasica endogena si realizza

in questo passaggio cromatografico.

In particolare, è stato chiarito che, alla concentrazione di 20% NaCl, l'analogo endogeno viene efficacemente trattenuto in colonna (fig. 7).

## 5 Gel-filtrazione

E' stata utilizzata una colonna preimpaccata HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution (GE Healthcare) e il tampone di eluizione costituito da 20 mM sodio acetato e 200 mM NaCl, pH = 5.5. La colonna è stata  
10 inizialmente equilibrata con due volumi di tampone a cui è seguito il carico in colonna dell'eluato concentrato prodotto mediante cromatografia IEC. L'intera procedura è stata eseguita a una velocità di flusso pari a 0.3 mL/minuto. Il picco di interesse è  
15 stato sottoposto a SDS-PAGE e Western blotting (figg. 8A e 8B).

### Esempio 7: determinazione dell'attività enzimatica

E' stata utilizzata una soluzione di saggio contenente 75 mM tampone K-fosfato, 0.125% (p/v) taurocolato e 3 mM 4-metilumbelliferil beta-D-glucopiranoside (4-MUG), pH = 5.9; la reazione enzimatica è stata condotta a 37°C per 1 ora aggiungendo  
20 10 µL di campione a 300 µL di soluzione di saggio. La reazione è stata quindi bloccata innalzando il pH a  
25 valori prossimi a 10 con 1690 µL di stop buffer, co-

stituito da 0.1 M glicina e 0.1 M NaOH, pH = 10.0.

L'attività enzimatica è stata misurata mediante fluorimetro a una lunghezza d'onda di eccitazione pari a  $365 \pm 7$  nm e una di emissione pari a  $460 \pm 15$  nm. Una unità enzimatica (U) è stata definita come la  
5 quantità di enzima che degrada una micromole di substrato per minuto.

Esempio 8: determinazione della sequenza N-terminale

La sequenza amminoacidica N-terminale di Gcase è stata determinata per microsequenziamento della proteina trasferita su membrana.  
10

A tal fine, dopo la separazione elettroforetica dell'eluato cromatografico ottenuto dalla duplice purificazione mediante HIC e IEC, il campione è stato trasferito dal gel alla membrana PVDF (Millipore) utilizzando l'apparato Trans-Blot Semi-Dry (BioRad)  
15 (trasferimento: 25 V costanti per 30 min in tampone 10 mM CAPS e 10% metanolo, pH 11).

Dopo il trasferimento, la membrana PVDF è stata colorata con una soluzione 0.25% (w/v) Coomassie-blue R-250 in 50% metanolo per 5 minuti, lavata con acqua e decolorata con una soluzione 50% metanolo per 10 minuti al fine di visualizzare la banda proteica di interesse.  
20

Il microsequenziamento è stato condotto secondo la  
25

chimica di Edman (Edman, 1950). L'analisi ha permesso di ottenere una sequenza di 9 amminoacidi (ARPCIPKSF) perfettamente coincidente con quella attesa per la forma matura della beta-glucosidasi acida umana. Il  
5 microsequenziamento ha quindi dimostrato che il peptide segnale della glutelina 4 di riso viene riconosciuto e rimosso correttamente.

Esempio 9: analisi MALDI-TOF

Digestione della proteina mediante tripsina

10 Dopo corsa elettroforetica e colorazione del gel con una soluzione contenente 0.25% (w/v) Coomassie blue R-250 in acqua, 50% metanolo, 10% acido acetico glaciale, la banda corrispondente a GCase è stata tagliata dal gel e lavata a 37°C con 300 µL di una soluzione  
15 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e acetonitrile (ACN) in rapporto 50:50, pestellata e disidratata con ulteriori 100 µL ACN.

La proteina è stata quindi sottoposta a riduzione dei ponti disolfuro mediante trattamento con 50 µL 10  
20 mM DTT a 56°C per un'ora e ad alchilazione per 30 minuti con 50 µL 50 mM IAA (iodoacetamide) in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Il frammento di gel è stato inoltre lavato con 300 µL 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e con 300 µL di una soluzione 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e ACN in rapporto 50:50, e disidratato  
25 nuovamente aggiungendo 100 µL ACN.

Infine, la banda è stata reidratata con 5-10  $\mu\text{L}$  di un buffer di digestione contenente 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e 50 ng/ $\mu\text{L}$  di tripsina (Promega), cui sono stati aggiunti dopo 30 minuti 20  $\mu\text{L}$  20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Dopo una notte a 37°C, il buffer contenente i peptidi è stato rimosso e si è effettuata un'ulteriore estrazione dei peptidi aggiungendo al gel 10  $\mu\text{L}$  di una soluzione 2% acido formico e 60% ACN (50:50). I due surnatanti, nei quali sono diluiti i peptidi, sono stati riuniti e utilizzati per l'analisi MALDI-TOF (Perkin Elmer).

Purificazione dei peptidi mediante resina C18

Prima di essere sottoposti ad analisi, il digerito proteico è stato purificato con zip-tip C18 (Millipore) per eliminare contaminanti e sali in eccesso.

Sui puntali zip-tip è impaccata una resina che supporta una fase inversa (C18) sulla quale si legano i peptidi presenti nel digerito.

Le punte sono state lavate 4 volte con 10  $\mu\text{L}$  di 100% ACN e 3 volte con 10  $\mu\text{L}$  0.1% TFA (acido trifluoroacetico). Alle punte attivate è stato quindi aggiunto il campione; dopo 3 lavaggi con 0.1% TFA, i peptidi legati alla resina sono stati eluiti con 10  $\mu\text{L}$  ACN e 0.1% TFA in rapporto 70:50.

Identificazione della proteina in spettrometria di massa MALDI-TOF mediante Peptide Mass Fingerprinting

Il mandatario

STEFANO LIGI

(per sé e per gli altri)

STUDIO GLP S.r.l.

P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

La preparazione del campione per l'analisi MALDI-TOF è stata ottenuta aggiungendo a 1 µL di soluzione concentrata di matrice CHCA (acido α-ciano-4-idrossicinnamico) posta su un supporto metallico, 1  
5 µL della soluzione contenente i peptidi purificati.

L'analisi (fig. 9) ha dimostrato che la proteina purificata con la procedura descritta nell'esempio 6 corrisponde alla beta-glucosidasi acida umana; in particolare, l'identificazione dell'enzima è avvenuta  
10 con un punteggio pari a  $10^{-32}$  e una percentuale di copertura dei peptidi riconosciuti pari al 53%. Si tratta di risultati di assoluta garanzia, se si considera che risultano significativi valori che presentano un punteggio  $\leq$  a  $10^{-6}$  e una copertura  $\geq$  a 30%.  
15 Nell'elenco dei peptidi generati con tripsina e riconosciuti come appartenenti alla beta-glucosidasi acida umana rientrano anche i frammenti N- e C-terminale della proteina (si veda tabella 1 seguente).

Tab. 1: evidenziazione delle principali assegnazioni dei peptidi triptici analizzati in MALDI-TOF per il campione purificato di GCCase

$M_{teorica}$	$\Delta M$	assegnazione
840.464	-0.010	1-7 N-terminale
883.451	+0.104	322-329
932.472	+0.122	426-433

Il mandatario  
STEFANO LIGI  
(per sé e per gli altri)  
STUDIO GLP & s.r.l.  
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

950.461	+0.102	347-353
976.586	+0.073	286-293
988.655	+0.045	156-163
1002.517	+0.084	278-285
1086.628	+0.209	464-473
1281.585	+0.008	121-131
1459.792	-0.023	396-408
1527.722	+0.006	199-211
1630.818	+0.995	263-277
1646.794	+0.018	107-120
1664.806	+0.038	347-359
1714.937	-0.087	426-441
1870.896	+0.120	330-346
2099.099	+0.170	304-321
2304.190	+0.074	442-463
2562.432	+0.205	164-186
2846.256	+1.025	132-155
3087.435	+1.005	132-157
3139.530	+0.325	199-224
3217.641	+1.521	258-285
3424.784	+1.007	506-535
C-terminale		

È chiaro che al procedimento per la produzione di una proteina umana in pianta, in particolare un enzima lisosomiale umano ricombinante in endosperma di cereali fin qui descritto possono essere apportate  
5 modifiche e/o aggiunte di parti e/o fasi, senza per questo uscire dall'ambito del presente trovato.

È anche chiaro che, sebbene il presente trovato sia stato descritto con riferimento ad alcuni esempi specifici, una persona esperta del ramo potrà senz'altro  
10 realizzare molte altre forme equivalenti di procedimento per la produzione di una proteina umana in pianta, in particolare un enzima lisosomiale umano

ricombinante in endosperma di cereali, aventi le caratteristiche espresse nelle rivendicazioni e quindi tutte rientranti nell'ambito di protezione da esse definito.

5

LISTA DI SEQUENZE

<110> Transactiva S.r.l.

<120> PROCEDIMENTO PER LA PRODUZIONE DI UNA PROTEINA UMANA IN PIANTA,  
5 IN PARTICOLARE UN ENZIMA LISOSOMIALE UMANO RICOMBINANTE IN  
ENDOSPERMA DI CEREALI

<130> U3-2601

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

10 <210> 1

<211> 3357

<212> DNA

<213> Artificiale

<220>

15 <223> Cassetta di espressione

<400> 1

gaattctaca gggttccttg cgtgaagaag ggtggcctgc ggttcaccat taacggtcac 60

gactacttcc agctagtact ggtgaccaac gtcgcggcgg caggggtcaat caagtccatg 120

gaggttatgg gttccaacac agcggattgg atgccgatgg cacgtaactg gggcgcccaa 180

20 tggcactcac tggcctacct caccgggtcaa ggtctatcct ttaggggtcac caacacagat 240

gaccaaacgc tcgtcttcac caacgtcgtg ccaccaggat ggaagtttgg ccagacattt 300

gcaagcaagc tgcagttcaa gtgagaggag aagcctgaat tgataccgga gcgtttcttt 360

tgggagtaac atctctggtt gcctagcaaa catatgattg tatataagtt tcgttgtgcg 420

tttattcttt cgggtgtgtaa aataacatac atgcttttct gatattttct tgtatatatg 480

25 tacacacaca cgacaaatcc ttccatttct attattattg aacaatttaa ttgcgagggc 540

gagtacttgt ctgtttacct ttttttttc agatggcatt ttatagtta acctttcatg 600  
gaccggcagt agttotaacc atgaatgaaa agaaatcata gtccacacca cgcagggaca 660  
ttgtggatcat tttagacaag acgatttgat taatgtottg tatgatatgg tcgacagtga 720  
ggactaacia acatatggca tattttatta ccggcgagtt aaataaattt atgtcacagt 780  
5 aataaactgc ctaataaatg cacgccagaa aatataatga taaaaaaaaag aaaagataca 840  
taagtccatt gcttctactt ttttaaaaat taaatccaac attttctatt ttttggata 900  
aacttggag tactagttgg atatgcaaaa tcatctaacc tccatatatt tcatcaattt 960  
gtttacttta catatgggag aggatagtat gtcaaagaaa atgacaacia gttacaagt 1020  
ttcttatttt aaaagttccg ctaacttata aagcatagtg tgccacgcaa aactgacaac 1080  
10 aaaccaacia atttaaggag cgcctaactt atcatctatg acataccgca caaatgata 1140  
acatactaga gaaactttat tgcacaaaag gaaatttata cataaggcaa aggaacatct 1200  
taaggctttg gatatacatt taccaacaag cattgtttgt attacccta aagcgcaaga 1260  
catgtcatcc atgagtcata gtgtgtatat ctcaacattg caagctacc tttttctat 1320  
tatacttttc gcattatagg ctagatatta tctatacatg tcaaciaact ctatccctac 1380  
15 gtcatatctg aagattcttt tcttactat ataagttggc ttccctgtca ttgaactcac 1440  
atcaaccagc ccaacacgta tttttacaac aataccaaca acaaciaaa caaaciaaat 1500  
tacaattacg tatttctctc tctagaatgg ccaccattgc gttctcccg ctgtccatct 1560  
acttctgctg gctgctgctg tgccacggct ccatggccgc ccgcccctgc atccctaaaa 1620  
gcttcggcta cagctcggtg gtgtgtgtct gcaatgccac atactgtgac tcctttgacc 1680  
20 ccccgacctt tctgcccctt ggtaccttca gccgctatga gagtacacgc agtggggcagc 1740  
ggatggagct gagtatgggg cccatccagg ctaatcacac gggcacaggc ctgctactga 1800  
ccctgcagcc agaacagaag ttccagaaag tgaaggatt tggaggggccc atgacagatg 1860  
ctgctgctct caacatcctt gcctgtcac ccctgcca aaatttgcta cttaaactcgt 1920  
acttctctga agaaggaatc ggatataaca tcatccgggt acccatggcc agctgtgact 1980  
25 tctccatccg cacctacacc tatgcagaca ccctgatga tttccagttg cacaacttca 2040

gcctcccaga ggaagatacc aagctcaaga taccctgat tcaccgagcc ctgcagttgg 2100  
cccagcgtcc cgtttcactc cttgccagcc cctggacatc acccacttgg ctcaagacca 2160  
atggagcggg gaatgggaag gggcactca agggacagcc cggagacatc taccaccaga 2220  
cctggggccag atactttgtg aagttcctgg atgcctatgc tgagcacaag ttacagttct 2280  
5 gggcagtgac agctgaaaat gagccttctg ctgggctggt gagtggatac cccttccagt 2340  
gcctgggctt caccctgaa catcagcgag acttcattgc ccgtgaccta ggtcctacce 2400  
tcgccaacag tactcaccac aatgtccgcc tactcatgct ggatgaccaa cgcttgctgc 2460  
tgccccactg ggcaaagggtg gtactgacag acccagaagc agctaaatat gttcatggca 2520  
ttgctgtaca ttggtacctg gactttctgg ctccagccaa agccacccta ggggagacac 2580  
10 accgcctggt ccccaacacc atgctotttg cctcagagcc ctgtgtgggc tccaagttct 2640  
gggagcagag tgtgccccta ggctcctggg atcgagggat gcagtacagc cacagcatca 2700  
tcacgaacct cctgtaccat gtggtoggct ggaccgactg gaaccttgcc ctgaaccccc 2760  
aaggaggacc caattgggtg cgtaactttg tcgacagtcc catcattgta gacatcacca 2820  
aggacacggt ttacaaacag cccatgttct accaccttgg ccacttcagc aagttcattc 2880  
15 ctgagggctc ccagagagtg gggctgggtg ccagtcagaa gaacgacctg gacgcagtgg 2940  
cactgatgca tcccgatggc tctgctggtg tggctgtgct aaaccgctcc tctaaggatg 3000  
tgctcttac catcaaggat cctgctgtgg gcttctgga gacaatctca cctggctact 3060  
ccattcacac ctacctgtgg catgccagt gagagctoga tcggtcaaac atttggcaat 3120  
aaagtttctt aagattgaat cctggtgccg gtcttgcgat gattatcata taatttctgt 3180  
20 tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgat gacgttattt atgagatggg 3240  
tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatagc gatagaaaac aaaatatagc 3300  
gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgcatctat gttactagat cgaattc 3357

<210> 2

25 <211> 1448

<212> DNA  
<213> Oryza sativa  
<220>  
<223> Sequenza GluB4pro  
5 <400> 2  
tacagggttc cttgcgtgaa gaagggtggc ctgcggttca ccattaacgg tcacgactac 60  
ttccagctag tactggtgac caacgtcgcg gcggcagggt caatcaagtc catggaggtt 120  
atgggttcca acacagcggg ttggatgccg atggcacgta actggggcgc ccaatggcac 180  
tcaactggcct acctcaccgg tcaaggtcta tcctttaggg tcaccaacac agatgaccaa 240  
10 acgctcgtct tcaccaacgt cgtgccacca ggatggaagt ttggccagac atttgcaagc 300  
aagctgcagt tcaagtgaga ggagaagcct gaattgatac cggagcgttt cttttgggag 360  
taacatctct ggttgccctag caaacatatg attgtatata agtttcggtg tgcgtttatt 420  
ctttcgggtg gtaaaataac atacatgctt tcoctgatatt ttcttgata tatgtacaca 480  
cacacgacaa atccttccat ttctattatt attgaacaat ttaattgcga gggcgagtac 540  
15 ttgtctgttt accttttttt tttcagatgg cattttatag ttttaacctt catggaccgg 600  
cagtagttct aacctgaat gaaaagaaat catagtccac accacgcagg gacattgtgg 660  
tcattttaga caagacgatt tgattaatgt cttgtatgat atggtcgaca gtgaggacta 720  
acaacatat ggcataatatt attaccggcg agttaaataa atttatgtca cagtaataaa 780  
ctgcctaata aatgcacgcc agaaaatata atgataaaaa aaagaaaaga tacataagtc 840  
20 cattgcttct acttttttaa aaattaaatc caacattttc tatttttttg tataaacttg 900  
gaagtactag ttggatatgc aaaatcatct aacctcata tatttcatca atttgtttac 960  
tttacaatag ggagaggata gtatgtcaaa gaaaatgaca acaagcttac aagtttctta 1020  
ttttaaaagt tccgctaact tatcaagcat agtgtgccac gcaaaaactga caacaaacca 1080  
acaatttaa ggagcgccta acttatcatc tatgacatac cgcacaaaat gataacatac 1140  
25 tagagaaact ttattgcaca aaaggaaatt tatccataag gcaaaggaac atcttaaggc 1200

tttggatata catttaccaa caagcattgt ttgtattacc cctaaagcgc aagacatgtc 1260  
atccatgagt catagtgtgt atatctcaac attgcaaagc tacctttttt ctattatact 1320  
tttcgcatta taggctagat attatctata catgtcaaca aactctatcc ctacgtcata 1380  
tctgaagatt cttttottca ctatataagt tggcttcocct gtcattgaac tcacatcaac 1440  
5 cagcccaa 1448

<210> 3  
<211> 73  
<212> DNA  
10 <213> Artificiale  
<220>  
<223> Sequenza leader LL-TCK  
<400> 3  
acacgtatatt ttacaacaat accaacaaca acaacaacaa acaacattac aattacgtat 60  
15 ttctctctct aga 73

<210> 4  
<211> 72  
<212> DNA  
20 <213> Artificiale  
<220>  
<223> Sequenza nucleotidica codificante PSGluB4  
<400> 4  
atggccacca ttgcgttctc cggctgtcc atctacttct gcgtgctgct gctgtgccac 60  
25 ggctccatgg cc 72

Il mandatario  
STEFANO LIGI  
(per sé e per gli altri)  
STUDIO GLP S.r.l.  
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

<210> 5

<211> 1494

<212> DNA

5 <213> Sequenza nucleotidica codificante la forma matura della beta-glucosidasi acida umana

<400> 5

gcccgccct gcatocctaa aagcttcggc tacagctcgg tgggtgtgtg ctgcaatgcc 60  
acatactgtg actoccttga cccccgacc tttcctgccc ttggtacctt cagccgctat 120  
10 gagagtacac gcagtgggcg acggatggag ctgagtatgg ggcccatcca ggctaatacac 180  
acgggacacag gcctgctact gaccctgcag ccagaacaga agttccagaa agtgaaggga 240  
tttgaggggg ccatgacaga tgctgctgct ctcaacatcc ttgccctgtc acccctgcc 300  
caaaatttgc tacttaaate gtactttctct gaagaaggaa tcggatataa catcatccgg 360  
gtacccatgg ccagctgtga cttctccatc cgcacctaca cctatgcaga caccctgat 420  
15 gatttccagt tgcacaactt cagcctccca gaggaagata ccaagctcaa gataccctg 480  
attcaccgag ccctgcagtt ggcccagcgt cccgtttcac tccttgccag cccctggaca 540  
tcaccactt ggctcaagac caatggagcg gtgaatggga aggggtcaact caagggacag 600  
cccggagaca tctaccacca gacctgggcc agatactttg tgaagttcct ggatgcctat 660  
gctgagcaca agttacagtt ctgggcagtg acagctgaaa atgagccttc tgctgggctg 720  
20 ttgagtggat accccttcca gtgctgggc ttcaccctg aacatcagcg agacttcatt 780  
gcccgtagacc taggtcctac cctcgccaac agtactcacc acaatgtccg cctactcatg 840  
ctggatgacc aacgcttgct gctgccccac tgggcaaagg tggtaactgac agaccagaa 900  
gcagctaaat atgttcatgg cattgctgta cattggtacc tggactttct ggctccagcc 960  
aaagccacc taggggagac acaccgctg ttccccaaca ccatgctott tgctcagag 1020  
25 gcctgtgtgg gctccaagtt ctgggagcag agtgtgcggc taggctcctg ggatcgaggg 1080

atgcagtaca gccacagcat catcacgaac ctctgtacc atgtggtcgg ctggaccgac 1140  
tggaaccttg ccotgaacco cgaaggagga cccaattggg tgcgtaactt tgtcgacagt 1200  
cccatcattg tagacatcac caaggacacg ttttacaac agcccatggt ctaccacctt 1260  
ggccacttca gcaagttcat tcttgagggc tcccagagag tggggctggt tgccagtcag 1320  
5 aagaacgacc tggacgcagt ggcactgatg catcccgatg gctctgctgt tgtggtcgtg 1380  
ctaaaccgct cctctaagga tgtgcctctt accatcaagg atcctgctgt gggcttcctg 1440  
gagacaatct cacctggcta ctccattcac acctacctgt ggcacgcca gtga 1494

<210> 6

10 <211> 253

<212> DNA

<213> Sequenza terminatore NOS

<400> 6

gatcgttcaa acatttgga ataaagtttc ttaagattga atcctggtgc cggctttgag 60  
15 atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120  
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180  
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240  
atgttactag atc 253

20 <210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificiale

<220>

25 <223> Sequenza primer sintetizzata artificialmente

<400> 7

gcatgcgaat tctacagggg tctttgcgtg

30

<210> 8

5 <211> 30

<212> DNA

<213> Artificiale

<220>

<223> Sequenza primer sintetizzata artificialmente

10 <400> 8

tctagaagct attgaggat gttattggaa

30

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di una proteina umana in pianta, in particolare un enzima lisosomiale umano ricombinante in endosperma di pianta, **caratte-**

5 **rizzato dal fatto che** comprende:

- una prima fase di trasformazione delle piante mediante la quale realizzare il confinamento della proteina in un endosperma non assorbito dall'embrione e permettere che la presenza di elevati quantitativi  
10 della proteina nell'endosperma del seme non determini effetti negativi sulla germinabilità e sull'energia germinativa del seme;

- l'utilizzazione, nella prima fase di trasformazione delle piante, di un promotore endosperma-specifico a  
15 monte del gene codificante detta proteina e di un peptide segnale per l'invio cotraduzionale della proteina nascente nel lume del reticolo endoplasmico delle cellule componenti il tessuto dell'endosperma e per il suo accumulo tissutale;

20 - una seconda fase d'accumulo della proteina all'interno dell'endosperma del seme delle piante.

2. Procedimento come nella rivendicazione 1, **caratterizzato dal fatto che** la proteina viene accumulata nell'endosperma all'interno dei vacuoli di riserva .  
25 proteica (Protein Storage Vacuoles, PSV) o nei corpi

proteici (Protein Bodies, PB).

3. Procedimento come nella rivendicazione 1 o 2, **caratterizzato dal fatto che** prevede di realizzare un vettore di espressione in pianta per la trasformazione di dette piante, comprendente una sequenza nucleotidica contenente i seguenti elementi:

i) un promotore endosperma-specifico di origine naturale o artificiale;

ii) una regione 5' UTR di origine naturale o artificiale;

iii) una sequenza nucleotidica di origine naturale o artificiale codificante un peptide segnale per l'invio della proteina ricombinante all'interno del lume del reticolo endoplasmico delle cellule componenti il tessuto dell'endosperma e per il suo accumulo tissutale;

iv) una sequenza nucleotidica di origine naturale o artificiale codificante la forma matura della proteina umana;

v) una regione 3' UTR di origine naturale o artificiale;

**e che** prevede di impiegare il vettore d'espressione così realizzato per la trasformazione delle piante.

4. Procedimento come nella rivendicazione 3, **caratterizzato dal fatto che** la sequenza nucleotidica conte-

nuta nel vettore d'espressione è come indicata in SEQ ID NO: 1.

5. Procedimento come nella rivendicazione 3 o 4, **caratterizzato dal fatto che** il vettore d'espressione viene introdotto in ceppi batterici, i quali sono utilizzati, direttamente od indirettamente, per la trasformazione delle piante.

6. Procedimento come nella rivendicazione 5, **caratterizzato dal fatto che** il ceppo batterico è scelto in un gruppo comprendente le specie *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*.

7. Procedimento come in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, **caratterizzato dal fatto che** le piante trasformate sono cereali.

8. Procedimento come nella rivendicazione 5 e 7 o 6 e 7, **caratterizzato dal fatto che** il ceppo batterico viene utilizzato per la trasformazione di calli embriogenici di riso (*Oryza sativa* ssp. *japonica*, varietà CR W3).

9. Procedimento come in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, **caratterizzato dal fatto che** l'enzima lisosomiale è la beta-glucosidasi acida umana.

10. Procedimento come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 8, **caratterizzato dal fatto che**

l'enzima lisosomiale è l'alfa-glucosidasi acida umana.

11. Procedimento come in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, **caratterizzato dal fatto che** comprende una terza fase di lavorazione industriale del  
5 seme delle piante.

12. Procedimento come nella rivendicazione 11, **caratterizzato dal fatto che** la lavorazione industriale prevede di sottoporre i semi maturi raccolti dalle  
10 piante di cereali trasformate ad operazioni di sbramatura e sbiancatura per l'allontanamento della componente fibrosa, del germe, e dello strato aleuronico contenente proteine contaminanti.

13. Procedimento come in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, **caratterizzato dal fatto che** comprende una quarta fase di purificazione della proteina  
15 ottenuta.

14. Procedimento come nella rivendicazione 13, **caratterizzato dal fatto che** la fase di purificazione prevede nell'ordine una cromatografia a interazioni idrofobiche, una cromatografia a scambio ionico e una  
20 gel-filtrazione.

15. Procedimento come nella rivendicazione 13 o 14, **caratterizzato dal fatto che** la fase di purificazione  
25 prevede l'applicazione di resine cromatografiche af-

fini per composizione chimica e/o struttura e/o funzione, di parziale modificazione dei parametri di eluizione, di duplicazione di un passaggio per ricarico dell'eluato in colonna.

- 5 16. Sequenza nucleotidica atta all'utilizzo per la trasformazione di una pianta per l'espressione di una proteina umana in pianta, in particolare un enzima lisosomiale umano ricombinante in endosperma di pianta, **caratterizzata dal fatto che** comprende i seguenti
- 10 elementi:
- i) un promotore endosperma-specifico di origine naturale o artificiale;
  - ii) una regione 5' UTR di origine naturale o artificiale;
  - 15 iii) una sequenza nucleotidica di origine naturale o artificiale codificante un peptide segnale per l'invio della proteina ricombinante all'interno del lume del reticolo endoplasmico delle cellule componenti il tessuto dell'endosperma e per il suo accumu-
  - 20 lo tissutale;
  - iv) una sequenza nucleotidica di origine naturale o artificiale codificante la forma matura della proteina umana;
  - v) una regione 3' UTR di origine naturale o artifi-
  - 25 ciale.

17. Sequenza come nella rivendicazione 16, **caratterizzata dal fatto che** il promotore i) è il promotore della glutelina 4 di riso (GluB4).
18. Sequenza come nella rivendicazione 16 o 17, **caratterizzato dal fatto che** la regione 5' UTR ii) è la sequenza 5' UTR nota come LL-TCK.
19. Sequenza come nella rivendicazione 16, 17, o 18, **caratterizzata dal fatto che** la sequenza nucleotidica dell'elemento iii) è la sequenza PSGluB4 codificante il peptide segnale utilizzato in riso per veicolare il precursore della glutelina 4 all'interno del reticolo endoplasmico.
20. Sequenza come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 16 alla 19, **caratterizzata dal fatto che** la sequenza nucleotidica dell'elemento iv) è la sequenza GCase codificante la forma umana matura della beta-glucosidasi acida.
21. Sequenza come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 16 alla 20, **caratterizzata dal fatto che** la regione 3' UTR dell'elemento v) è il terminatore NOS o il terminatore del gene Glub4.
22. Sequenza nucleotidica come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 16 alla 21, come indicata in SEQ ID NO: 1.
23. Sequenze complementari alle sequenze nucleotidi-

che come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla  
16 alla 22.

24. Sequenze derivanti da processi di mutazione, qua-  
li delezioni, inserzioni, transizioni, trasversioni  
5 di uno o più nucleotidi delle sequenze come in una  
qualsiasi delle rivendicazioni dalla 16 alla 22 o  
delle sequenze ad esse complementari come nella ri-  
vendicazione 23.

25. Combinazioni delle sequenze nucleotidiche come in  
10 una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 16 alla 22  
codificanti la forma matura della beta-glucosidasi  
acida umana con elementi promotore, sequenze per  
l'invio nel reticolo endoplasmico e regioni non tra-  
dotte in 5' e 3' diverse da quelle presenti nella se-  
15 quenza come indicata in SEQ ID NO: 1, adatte a otte-  
nere la sintesi e l'accumulo dell'enzima specifica-  
mente nell'endosperma del seme o con sequenze nucleo-  
tidiche complementari a dette sequenze.

26. Combinazioni degli elementi i), ii), iii), iv) e  
20 v) come nella rivendicazione 16 con sequenze codifi-  
canti l'enzima maturo diverse da quella riportata  
nella sequenza come indicata in SEQ ID NO: 1 per la  
presenza di mutazioni sinonime o poliformismi rinve-  
nibili all'interno della specie umana o combinazioni  
25 realizzate con sequenze nucleotidiche complementari a

dette sequenze.

27. Combinazioni degli elementi di sequenze nucleotidiche i), ii), iii), iv) e v) come nella rivendicazione 16 con sequenze codificanti le forme mature o i  
5 precursori di altri enzimi lisosomiali, o combinazioni realizzate con sequenze nucleotidiche complementari a dette sequenze.

28. Combinazioni come nella rivendicazione 27, in cui l'enzima è l'alfa-glucosidasi acida umana.

10 29. Sequenza come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 16 alla 28 **caratterizzata dal fatto che** le piante trasformate sono cereali.

30. Vettore molecolare di espressione di proteina umana in pianta, in particolare di un enzima lisosomiale umano in endosperma di pianta, comprendente la  
15 sequenza nucleotidica come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 16 alla 29.

31. Vettore come nella rivendicazione 30, **caratterizzato dal fatto che** l'enzima lisosomiale è la beta-glucosidasi acida umana.  
20

32. Vettore come nella rivendicazione 30, **caratterizzato dal fatto che** l'enzima lisosomiale è l'alfa-glucosidasi acida umana.

33. Vettore come nella rivendicazione 30, 31 o 32,  
25 **caratterizzato dal fatto che** è un plasmide.

34. Uso del vettore d'espressione come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 30 alla 33 per la trasformazione di una pianta per la produzione di una proteina, in particolare un enzima lisosomiale umano.
- 5 35. Ceppo batterico comprendente vettori di espressione come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 30 alla 33.
36. Ceppo batterico come nella rivendicazione 35 scelto in un gruppo comprendente le specie *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*.
- 10 37. Cellule vegetali trasformate con vettori di espressione come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 30 alla 33.
- 15 38. Cellule come nella rivendicazione 37 **caratterizzate dal fatto che** sono cellule di cereali.
39. Cellule come nella rivendicazione 38 appartenenti alla specie del riso coltivato (*Oryza sativa* L.).
40. Cellule come nella rivendicazione 38 appartenenti  
20 alla famiglia delle Graminaceae (Poaceae) quali ad esempio mais (*Zea mays* L.), orzo (*Hordeum vulgare* L.) e frumento (*Triticum* spp.).
41. Seme di pianta trasformata per l'espressione di una proteina umana, in particolare un enzima lisosomiale umano, **caratterizzato dal fatto che** contiene un  
25

vettore di espressione come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 30 alla 33.

42. Seme come nella rivendicazione 41, **caratterizzato dal fatto che** la pianta trasformata è appartenente ai  
5 cereali.

43. Seme come nella rivendicazione 41 o 42, **caratterizzato dal fatto che** la pianta trasformata è appartenente alla specie del riso coltivato (*Oryza sativa* L.).

10 44. Pianta trasformata per l'espressione di una proteina umana, in particolare un enzima lisosomiale umano, **caratterizzata dal fatto che** viene trasformata mediante un vettore di espressione come in una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 30 alla 33.

15 45. Pianta trasformata come nella rivendicazione 44, **caratterizzata dal fatto che** è un cereale.

46. Pianta trasformata come nella rivendicazione 44 o 45 appartenente alla specie del riso coltivato (*Oryza sativa* L.).

20 47. Progenie ottenute per autofecondazione o incrocio, oppure linee trasformate selezionate a partire da una pianta trasformata come nella rivendicazione 44, 45 o 46.

25 48. Seme come nella rivendicazione 41, 42 o 43 per l'uso nel trattamento terapeutico.

49. Uso del seme come nella rivendicazione 41, 42 o 43 per la produzione di un medicamento per un trattamento terapeutico enzimatico di sostituzione.

50. Uso del seme come nella rivendicazione 49 per la  
5 produzione di un medicamento per un trattamento terapeutico enzimatico di sostituzione nelle seguenti malattie: malattia di Gaucher, glicogenosi 2, malattia di Fabry, malattia di Niemann-Pick B, Mucopolisaccaridosi I, II, IV.

10 51. Seme come nella rivendicazione 41, 42 o 43 per l'uso nel trattamento terapeutico enzimatico di sostituzione.

52. Seme come nella rivendicazione 51 per l'uso nel  
15 trattamento terapeutico enzimatico di sostituzione nelle seguenti malattie: malattia di Gaucher, glicogenosi 2, malattia di Fabry, malattia di Niemann-Pick B, Mucopolisaccaridosi I, II, IV.

53. Procedimento per la produzione di una proteina  
20 umana ricombinante in endosperma di cereali, sostanzialmente come descritto, con riferimento agli annessi disegni.

p. Transactiva S.r.l.

LF 13.03.2008

25

1/4

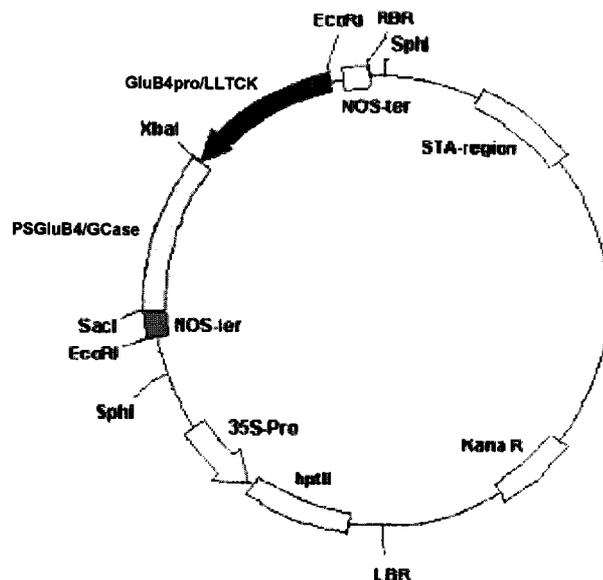


Fig. 1

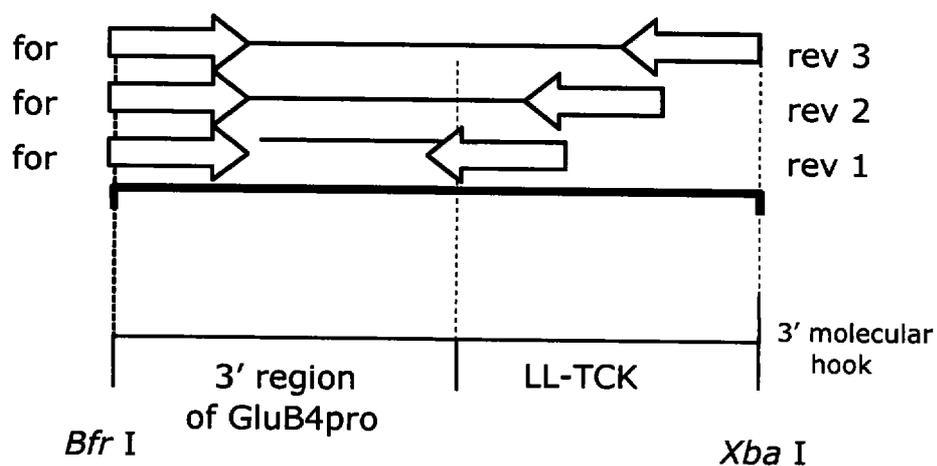


Fig. 2A

2/4

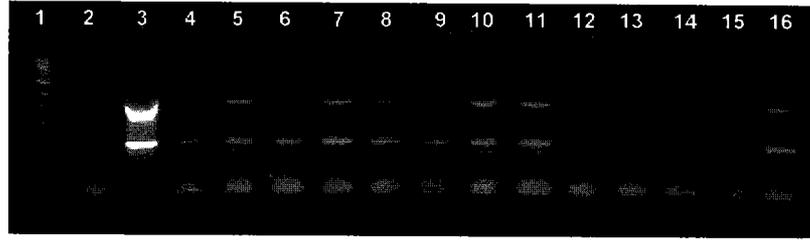


Fig. 2B

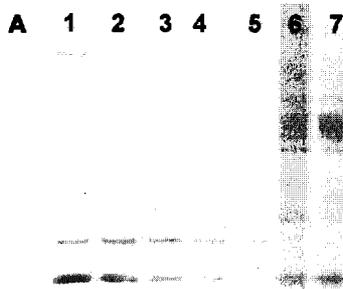


Fig. 3A

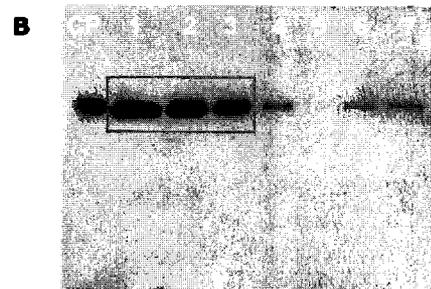


Fig. 3B

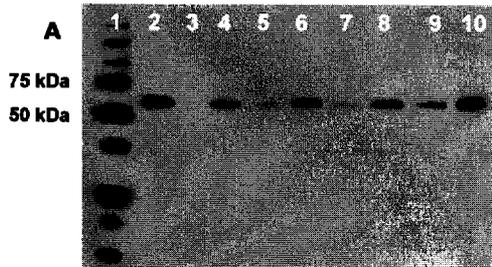


Fig. 4A

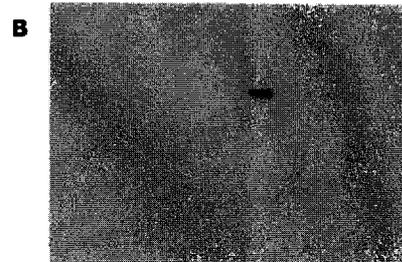


Fig. 4B

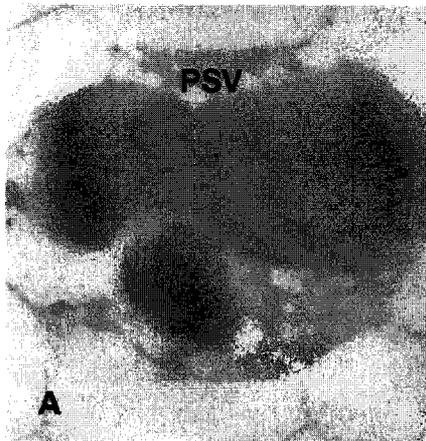


Fig. 5A

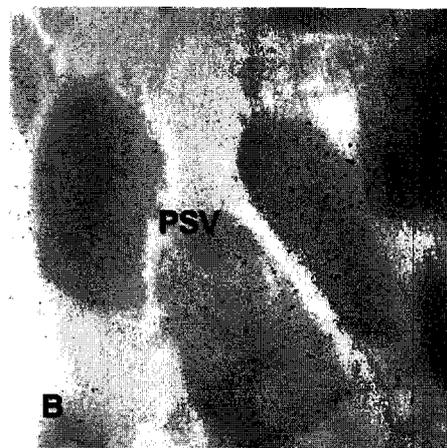


Fig. 5B

3/4

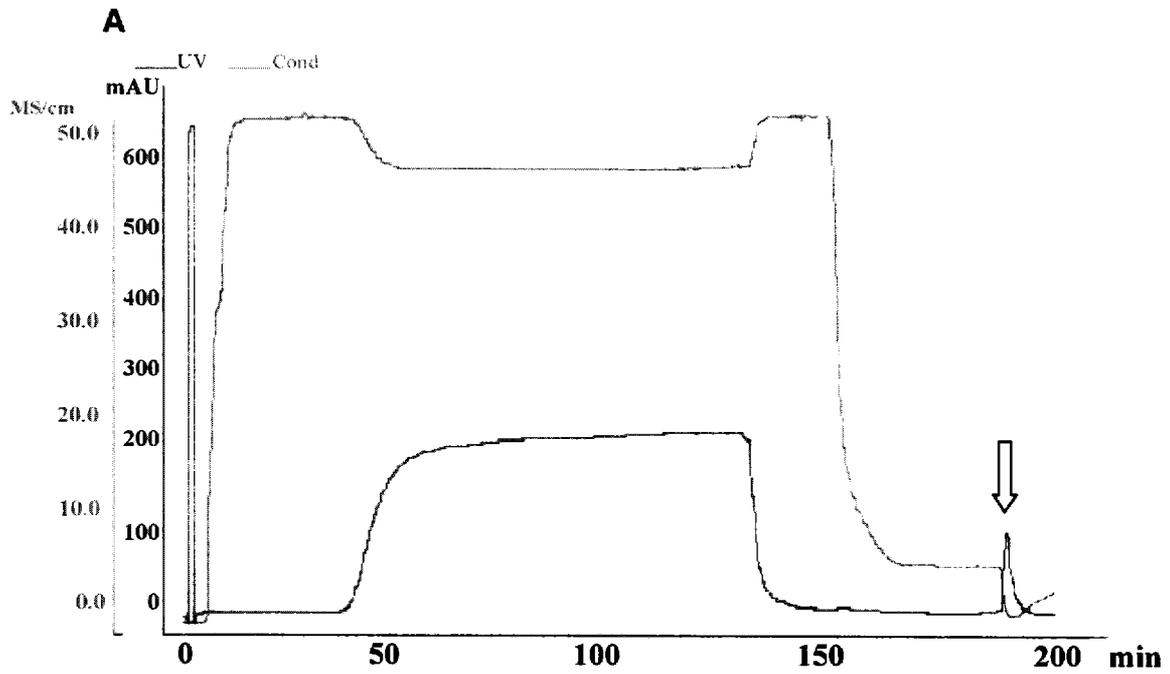


Fig. 6A

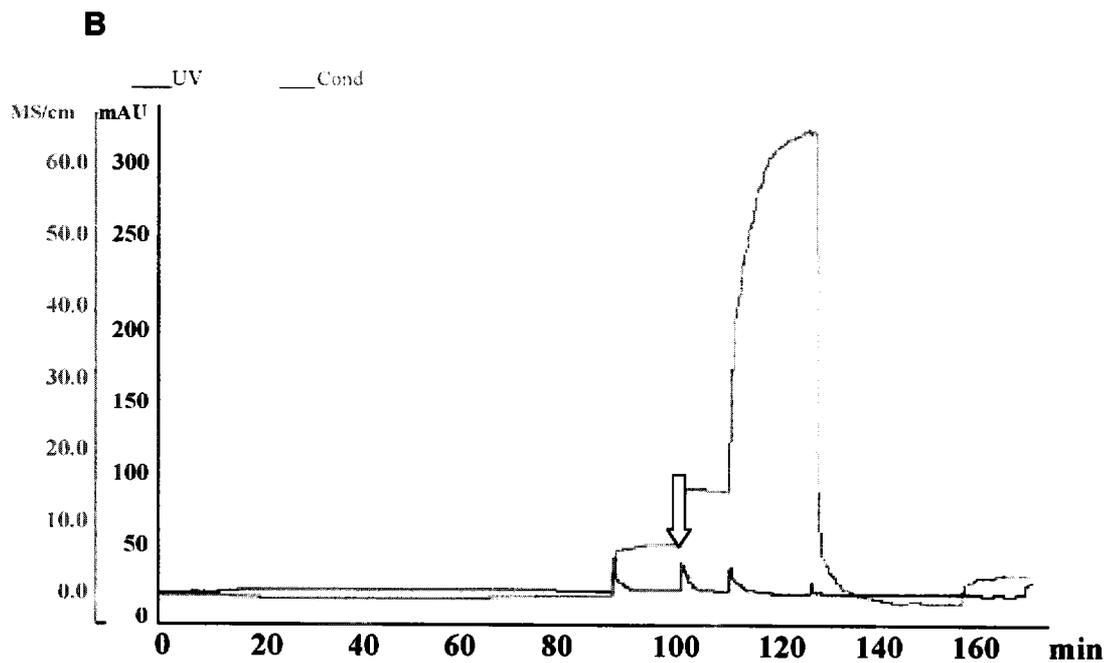


Fig. 6B

4/4

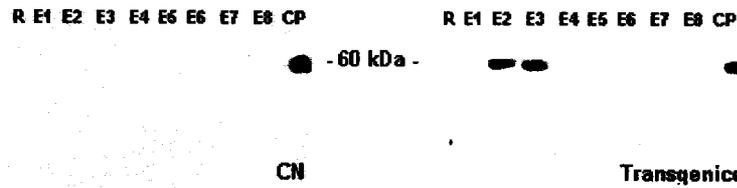
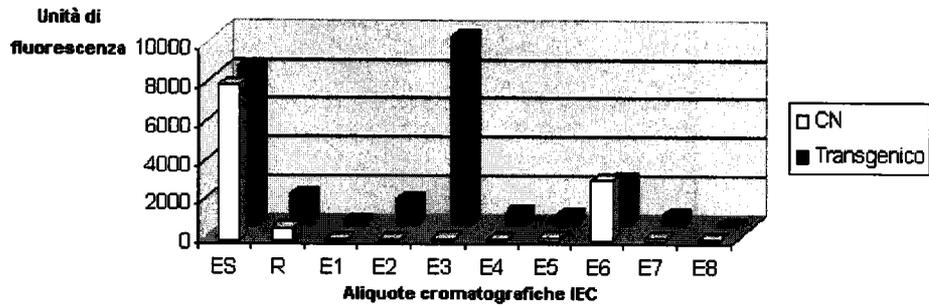


Fig. 7

Fig. 8A A B Fig. 8B

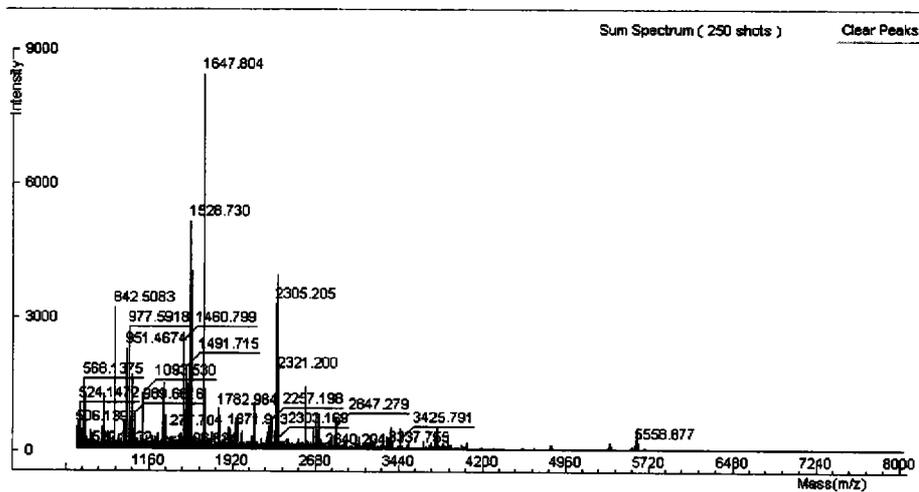


Fig. 9