



(11) **MX 337326 B**

(12)

## SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **29/01/2016** (51) Int. Cl: **C12N 15/00** (2006.01)  
(22) Fecha de presentación: **15/02/2008**  
(21) Número de solicitud: **2008002751**

(71) Solicitante:  
**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACION  
CIENTIFICA Y TECNOLOGICA, A.C.  
Camino a la Presa San Jose 2055 78126 SAN LUIS  
POTOSI San Luis Potosí MX**

(72) Inventor(es):  
**RUTH ELENA SORIA GUERRA  
Azalea 191 SAN LUIS POTOSI San Luis Potosí 78436  
MX  
SERGIO ROSALES MENDOZA  
RUBEN HIPOLITO LOPEZ REVILLA  
CRISOFORO MERCADO MARQUEZ  
ANGEL GABRIEL ALPUCHE SOLIS**

(74) Representante:  
**RIOS JARA, David  
Camino a la Presa San Jose 2055 SAN LUIS POTOSI  
San Luis Potosí 78216 MX**

(54) Título: **PLANTAS TRANSGENICAS QUE EXPRESAN UN POLIPEPTIDO NOVEDOSO CODIFICADO POR UN GEN SINTETICO QUE CONTIENE SECUENCIAS INMUNOPROTECTORAS DE LAS EXOTOXINAS DE CORINEBACTERIUM DIPHTERIAE, BORDETELLA PERTUSSIS Y CLOSTRIDIUM TETANI.**

(54) Title: **TRANSGENIC PLANTS EXPRESSING A NOVEL POLYPEPTIDE WHICH IS ENCODED BY A SYNTHETIC GENE THAT CONTAINS IMMUNOPROTECTIVE SEQUENCES FROM CORINEBACTERIUM DIPHTERIAE, BORDETELLA PERTUSSIS AND CLOSTRIDIUM TETANI EXOTOXINS.**

(57) Resumen

La presente invención se refiere a una vacuna producida en plantas contra difteria tos ferina y tétanos conocida como vacuna triple DPT. La vacuna incluye un complejo inmunogénico a partir de la transformación de jitomate con un gen quimérico optimizado para expresarse en plantas, que codifica un nuevo polipéptido recombinante el cual no existe en la naturaleza y que contiene los principales epítomos inmunoprotectores de difteria, tos ferina y tétanos. También se describen los métodos para construir el vector de transformación genética y los métodos de regeneración mediante cultivo de tejidos vegetales. Asimismo se presentan los resultados de la producción de anticuerpos en pruebas realizadas en ratones los cuales pueden ser útiles para la inmunización de mamíferos.

(57) Abstract

Provided is a plant produced vaccine acting against diphtheria, pertussis and tetanus, which is best known as DPT vaccine. The vaccine includes an immunogenic complex resulting from the transformation of tomatoe with a chimeric gene optimised to be expressed in plants, which encodes a novel recombinant polypeptide that is not available in nature and which contains the main immunoprotective epitopes of diphtheria, pertussis and tetanus. In addition, methods for building the genetic transformation vector are described, as well as regeneration methods based on the culture of vegetable tissues. The results of the antibody production in tests performed to mice are also shown, which may be useful for the mammals immunisation.



## TÍTULO DE PATENTE NO. 337326

**Titular(es):** INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.  
**Domicilio:** Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4ª Sección, 78126, San Luis Potosí, San Luis Potosí, MÉXICO  
**Denominación:** PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE EXPRESAN UN POLIPÉPTIDO NOVEDOSO CODIFICADO POR UN GEN SINTÉTICO QUE CONTIENE SECUENCIAS INMUNOPROTECTORAS DE LAS EXOTOXINAS DE CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE, BORDETELLA PERTUSSIS Y CLOSTRIDIUM TETANI  
**Clasificación:** Int.Cl.8: C12N15/00

**Inventor(es):** RUBÉN ANGEL CRISÓFORO MORALES BRIEL  
**Fecha de presentación:** 15 de febrero de 2008  
**Horario:** 13:42  
**Prioridad:**  
**Fecha:**  
**Vigencia:** Veinte años  
**Fecha de Vencimiento:** 15 de febrero de 2028

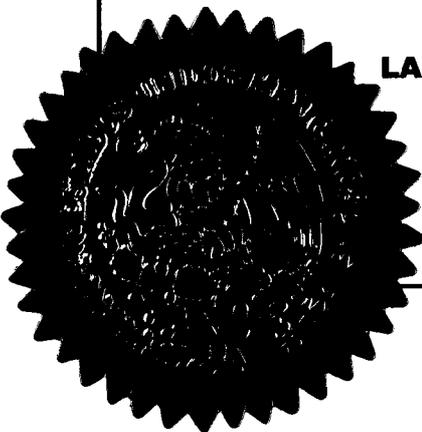
La patente de referencia se otorga con fundamento en el artículo 173, fracción V; 5ª fracción III, de la Ley de Propiedad Industrial. De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, el presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estaremos pagando de la tarifa por los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 173 y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 20/01/1996, 20/01/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/07/2004, 18/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5ª fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 29 de enero de 2016

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES

NAHANNY CANAL REYES



**Plantas transgénicas que expresan un polipéptido novedoso codificado por un gen sintético que contiene secuencias inmunoprotectoras de las exotoxinas de *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* y *Clostridium tetani***



5

**Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a una vacuna contra difteria, tos ferina y tétanos conocida como vacuna triple DPT producida en plantas. La vacuna incluye un complejo inmunogénico a partir de la transformación de jitomate con un gen quimérico optimizado para expresarse en plantas, que codifica un nuevo polipéptido recombinante el cual no existe en la naturaleza y que contiene los principales epítomos inmunoprotectores de difteria, tos ferina y tétanos. También se describen los métodos para construir el vector de transformación y producir la vacuna producida en jitomate mediante transformación genética y los métodos de regeneración mediante cultivo de tejidos vegetales. Asimismo se presentan los resultados de la producción de anticuerpos en pruebas realizadas en ratones los cuales pueden ser útiles para la inmunización de mamíferos.

El presente invento se relaciona a la producción de vacunas contra difteria, tos ferina y tétanos y a plantas productoras de vacunas contra estas tres enfermedades de mucosas. La vacuna puede ser usada profilácticamente para prevenir las tres enfermedades.

**Antecedentes**

Las vacunas han constituido uno de los avances más trascendentales de la medicina moderna. La aparición de la vacuna contra la tos ferina en la década de los 1950's, combinada con la vacuna contra la difteria y tétanos, disminuyó en forma espectacular la incidencia de estas enfermedades.

El éxito de la vacunación contra la difteria, tos ferina y tétanos (DPT) deriva de que los principales factores patogénicos de cada enfermedad, tales como las

exotoxinas, al ser químicamente inactivados y con ello llegar a convertirse en toxoides, conservan aún la capacidad de inducir inmunidad protectora. Sin embargo, la reactogenicidad a las preparaciones realizadas con células completas ha conducido a resistencia contra las campañas de vacunación, así lo reportado Gerathy K.C. en la revista *J Pediatr* vol. 105 en 1984, en su trabajo "DPT Immunization and SIDS", pags. 169-170, y en algunos países se ha interrumpido la inmunización resultando en nuevos brotes de tos ferina según un reporte por el grupo de Hinman, A.R. y Koplan, J. en la revista *JAMA* vol. 251, en 1984, en el artículo "Pertussis and pertussis vaccine: Reanalysis of benefits, risks, and costs" pag. 3109-3113.

La biotecnología recombinante ofrece la posibilidad de generar fragmentos de proteínas, los cuales pueden ser estructuralmente organizados como dominios exentos de toxicidad. Varios estudios han sido realizados en esta área. Urieto, J.O., Liu, T., Black, J.H., Cohen, K.A., Hall, P.D., Willingham, M.C., Pennell, L.K., Hogge, D.E., Kreitman, R.J. y Frankel, A.E., en la revista *Protein Expr Purif* vol. 33 en el 2004, mencionan en su artículo "Expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DT388IL3 for phase I clinical trials", pags.:123-133, que expresaron una fusión modificada genéticamente de los primeros 388 aminoácidos de la toxina diftérica (DT) a la interleucina-3 humana en *Escherichia coli*, los ensayos biológicos confirmaron la actividad funcional de esa proteína de fusión. El grupo de Frankel, A.E., Ramage, J., Latimer, A., Feely, T., Delatte, S., Hall, P., Tagge, E., Kreitman, R., y Willingham, M., en la revista *Protein Express Purif* vol. 16, en 1999, en su trabajo "High level synthesis and maximal purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DTGM for phase I clinical trials" pags. 190-201, producen una proteína de fusión compuesta por el dominio catalítico y el dominio de translocación de DT fusionado al factor estimulador de granulocitos y macrófagos humano en *E. coli*. Sin embargo, en los ensayos biológicos se encontró una eficiencia limitada y toxicidad en el hígado al administrarse varias dosis. DT ha sido fusionada por ingeniería genética usando dominios repetidos de unión de inmunoglobulina (Ig) a la proteína A y expresada en *E. coli* por el grupo de Lobeck, K., Drevet, P., Leonetti, M., Fromen-Romano, C., Ducancel, F., Lajeunesse, C., Lemaire, C., y Menz, A. en su trabajo publicado en revista *Infect*

Immun vol. 66, en 1998, titulado "Towards a recombinant vaccine against diphtheria toxin" pags. 418-423. Ellos usaron ensayos *in vivo* y demostraron que la fusión proteica estimula la producción de anticuerpos en conejos, sin embargo, es necesario purificar la proteína por cromatografía de afinidad.

5

Boucher, P., Sato, H., Sato, Y., y Loch, C. en Infect Immun vol. 62 en 1994, en su trabajo "Neutralizing antibodies and immunoprotection against pertussis and tetanus obtained by use of a recombinant pertussis toxin-tetanus toxin fusion protein" pags. 449-456 y el grupo de Dalla-Pozza, T., Yan, H., Meek, D., Guzman, C.A., y Walker, M.J. en la revista Vaccine vol. 16 en 1998, en su artículo "Construction and characterization of *Salmonella typhimurium* aroA *Salmonella typhimurium* aroA simultaneously expressing the five pertussis toxin subunits" pags. 522-529, clonaron y expresaron la sub unidad S1 de la toxina pertúsica en bacterias gram-negativas, tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Después aparecieron reportes en bacterias gram-positivas, como en *Bacillus subtilis*, publicado por el grupo de Runeberg-Nyman, K., Engstrom, O., Lofdahl, S., Ylostalo, S., y Sarvas, M. en la revista Microb Pathog, Vol 3 en 1987, en el trabajo "Expression and secretion of pertussis toxin S1 in *Bacillus subtilis*" pags. 461-468, en donde se demostró que S1 es inmunogénica en animales, sin embargo no se ha podido demostrar que los anticuerpos que se produjeron fueran protectores.

Por otro lado, el fragmento C de la toxina tetánica (TetC) ha sido expresado en *E. coli* por el grupo de Makoff, A.J., Ballantine, S.P., Smallwood, A.E., y Fairweather, N.F., trabajo que apareció en la revista Biotechnology vol. 7 en 1989, titulado "Expression of tetanus toxin fragment C in *E. coli*: its purification and potential use as a vaccine" pags. 1043-1046, sin embargo, la expresión de TetC en *E. coli* es limitada por el desfavorable uso de codones que tiene una mayor tendencia en *C. tetani* a secuencias ricas en AT. Ya que las proteínas expresadas en *E. coli* pueden contener pirógenos tóxicos, se ha intentado expresar TetC en hospederos no tóxicos tales como *Saccharomyces cerevisiae*, pero ha habido algunos problemas debido a la presencia de varios sitios fortuitos de poliadenilación ocasionando mRNAs trucados, lo cual dificulta su expresión en

levaduras, tal como lo ha reportado el grupo de Romanos, M.A., Makoff, A.J., Fairweather, N.F., Beesley, K.M., Slater, D.E., Rayment, F.B., Payne, M.M., y Clare, J.J. en la revista *Nucleic Acids Res.*, vol. 19 en 1991, en el trabajo "Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA", pags. 1461-1467.

Como la ingeniería genética de plantas a "avanzado", los dominios activos cruciales de las toxinas y enzimas se han definido y "mejorado" de tal modo que la fuente original de la proteína del organismo vivo es apenas reconocible.

10

La toxina tetánica esta compuesta de dos sub unidades, la cadena pesada (H) y la cadena ligera (L), con 3 dominios funcionales. El dominio Hc o fragmento C (TetC) es un buen candidato para generar vacunas por sub unidades por que no es tóxico, es altamente inmunogénico e induce respuesta protectora según lo reportado por Tregoning, J.S., Clare, S., Bowe, F., Edwards, L., Fairweather, N., Qazi, O., Nixon, P.J., Maliga, P., Dougan, G., y Hussell, T., en la revista *Eur J Immunol* vol. 35 en 2005 en el trabajo "Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine", pags. 320-326.

La toxina pertúsica (PT) es uno de los factores de virulencia más importantes de *B. pertussis* y ha sido usado en las formulaciones de vacunas acelulares. PT esta compuesta de 5 sub unidades, entre las cuales S1 es la más inmunodominante. Lee, S.F., Halperin, S.A., Knight, J.B., y Tait, A. mencionan en la revista *Appl Env Microbiol*, vol. 68 en 2002, en el trabajo "Purification and immunogenicity of a recombinant *Bordetella pertussis* S1S3FHA fusion protein expressed by *Streptococcus gordonii*.", pags. 4253-4258, que los anticuerpos anti-S1 neutralizan la toxina *in vitro* y se protegen ratones ante el desafío con *B. pertussis*. La toxina diftérica esta compuesta de una sub unidad A, la cual contiene el dominio catalítico C, y la sub unidad B, la cual incluye el dominio transmembranal y el dominio de unión al receptor. El dominio C participa en las interacciones membranales y translocación, haciéndolo buen candidato para la producción de vacunas por sub unidades según lo reportan Tortorella, D., Sesardic, D., Dawes, C.S., y London, E. en la revista, *J Biol Chem* vol. 17 n

1995 en el trabajo "Immunochemical analysis of the structure of diphtheria toxin shows all three domains undergo structural changes at low pH", pags. 27439-27445.

5           La nueva vacuna acelular está compuesta de uno o más componentes inmunogénicos de *B. pertussis*. Esta vacuna ha demostrado ser eficiente y menos reactogénica que la vacuna DPT preparada con células completas. Sin embargo, la vacuna acelular aún requiere múltiples dosis para alcanzar su máxima eficiencia además de que involucra altos costos de producción. El desarrollo a

10 bajo costo de una vacuna contra la tos ferina, que inmunice eficientemente con solo una dosis, es particularmente importante para países en desarrollo, donde es difícil acceder a centros de salud y se dificulta completar el esquema de vacunación de los infantes.

15           Muchos de los esfuerzos actuales en el desarrollo de vacunas están enfocados a la producción de vacunas por sub unidades, las cuales son consideradas seguras en su producción (se elimina la necesidad de cultivar el organismo patogénico) y aún más importante, en su uso. Mientras que las vacunas por sub unidades son efectivas, actualmente dependen de tecnología

20 basada en fermentación en reactores controlados lo cual eleva su precio y además requieren de una red fría para su distribución. El grupo de Daniell, H., Streatfield, S.J., Wycoff, K., publicaron en la revista Trends Plant Sci, vol.6 en el 2001, un artículo "Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants" pags. 219-226, donde afirman

25 que ambos factores restringen su uso en países en desarrollo, donde las vacunas se necesitan más.

Los avances en biotecnología han permitido manipular el ADN de los organismos, lo cual ha acelerado el proceso de mejoramiento de plantas. Hoy día

30 la biotecnología esta siendo usada como una herramienta para generar plantas con nuevas características que benefician la producción agrícola, el ambiente, la nutrición humana y la salud.

El uso de plantas como sistema de producción de proteínas es muy amplio y variado. Por otro lado, la producción de vacunas recombinantes en plantas puede superar algunas de las principales dificultades con las que se tropieza cuando se generan vacunas tradicionales o por sub unidades en países desarrollados y en desarrollo. En países en desarrollo, entre las dificultades se incluyen disponibilidad, la necesidad de una "red fría" desde el sitio donde se produce al sitio donde se va a usar la vacuna y la dependencia a la inyección. Las vacunas derivadas de plantas no enfrentan estas cuestiones.

Con el mejoramiento de las técnicas de biología molecular en los 80's, se han desarrollado nuevas estrategias para la producción de vacunas por sub unidades en plantas. La producción de antígenos en plantas modificadas genéticamente proporciona una fuente económica de vacunas comestibles que podrían ayudar en la lucha contra enfermedades infecciosas tales como cólera, hepatitis B, rabia, rotavirus, virus del papiloma humano y sida, según lo reportado por Moffat, A.S., en la revista Science vol. 268, en 1995, en el trabajo "Exploring transgenic plants as a new vaccine source" pags. 658-660.

Se ha demostrado que las plantas transgénicas tienen un potencial considerable para la producción económica de proteínas, los ensayos clínicos recientes con proteínas producidas en plantas son muy alentadores. Sin embargo, las proteínas foráneas en plantas se acumulan en niveles relativamente bajos (>0.01-2% del total de proteína total soluble). El grupo de Daniell, H., Streatfield, S.J., Wycoff, K., publicaron en la revista Trends Plant Sci, vol.6, en el 2001, un artículo "Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants" pags. 219-226, donde reportan algunas técnicas para mejorar la acumulación de antígenos en los tejidos vegetales.

Los genes sintéticos consisten en secuencias sintéticas de ADN que pueden ser modificados para maximizar la producción de proteínas foráneas en plantas. Los genes sintéticos son empleados ya que los genes que son expresados eficazmente en bacterias o humanos no son expresados eficientemente en células vegetales. El principal objetivo del gen sintético es

ajustar el código de ADN y adaptarlo a las secuencias típicamente expresadas por la planta o al organismo donde valla a ser expresado. Para una óptima expresión del código genético del gen sintético o transgén frecuentemente se necesita reescribirlo para alcanzar una interpretación adecuada. Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L., Fischhoff, D.A. en la revista Proc Natl Acad Sci USA vol. 88: en 1991 publicaron el trabajo "Modification of the coding sequence enhances plants expression of insect control protein genes", pags. 3324-3328, donde mostraron el efecto positivo de optimizar codones y por otro lado Huang, J., Wu, L., Yalda, D., Adkins, Y., Seller, S.L., Crane, M., Lonnerdal, B., Rodriguez, R.L., y Huang, N. en la revista Transgenic Res vol. 11 en 2002 en el trabajo "Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic rice cell culture", pags. 229-239 demostraron las ventajas de optimizar las secuencias.

Recientemente, han surgido las plantas como candidatos para la expresión de antígenos foráneos. El uso de vegetales transgénicos y frutos para la expresión y desarrollo de proteínas antigénicas como vacunas comestibles ha llegado a ser una alternativa atractiva según lo reporta Kim, T.G., y Langridge, W.H. en la revista Plant Cell Rep, Vol. 21 en el 2003, en el trabajo "Assembly of cholera toxin B subunit full-length rotavirus NSP4 fusion protein oligomers in transgenic potato" pags. 884-890.

Las plantas son una fuente potencial de proteínas antigénicas que no dependen de un proceso tecnológico independiente para asegurar el plegamiento de la proteína y/o ensamblaje de esta. Moffat, A.S., en la revista Science vol. 268, en 1995, en el trabajo "Exploring transgenic plants as a new vaccine source" pags. 658-660 y el grupo de Horn, M.E., Pappu, K.M., Bailey, M.R., Clough, R.C., Barker, M., Jilka, J.M., Howard, J.A., y Streatfield, S.J., en la revista J Drug Target vol. 11 en 2003 en el trabajo "Advantageous features of plant-based systems for the development of HIV vaccines" pags. 539-545, mencionan las ventajas de usar plantas para la producción de proteínas antigénicas, entre las que se incluyen: un ahorro en los costos de producción respecto a los sistemas tradicionales como producción en bacterias, levaduras y células animales ya que se pueden producir grandes volúmenes de biomasa a costos menores, ya que se haría uso de infraestructura ya existente, aunado a lo anterior, no se requeriría d

una red fría para su conservación, se evitarían problemas de contaminación por uso de agujas contaminadas, además, al ser las plantas organismos eucariontes se lograría un plegamiento correcto de la proteína además de glicosilaciones. Varios trabajos, como los reportados por Haq, T.A., Mason, H.S., Clements, J.D., y Arntzen, C.J., en la revista. Science vol. 268 en 1995, con el título "Oral Immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants", pags. 714-716, y el del grupo de Tacket, C.O., Mason, H.S., Losonsky, G., Clements, J.D., Wasserman, S.S., Levine, M.M., y Arntzen, C.J. en la revista. Nat Med vol. 4 en 1998 titulado "Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial-antigen delivered in transgenic potato", pags. 607-609, y el de Kong, Q., Richter, L., Yang, Y.F., Arntzen, C.J., Mason, H.S., y Thanavala, Y., en la revista Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 98 en el 2001, titulado "Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants" pags. 1539-11544, han confirmado el potencial de usar la tecnología de transformación de plantas como un medio para generar vacunas comestibles, logrando inmunizar por vía oral a animales al alimentarse con los tejidos transformados.

En países desarrollados las vacunas derivadas de plantas ofrecen seguridad (Patentes de Estados Unidos 5,654,184; 5,686,079 y solicitudes de patente 20050232949 y 20050129704).

Tacket, C.O., y Mason, H.S. en la revista Microbes Infect vol.1, en 1999, mencionan en su artículo "A review of oral vaccination with transgenic vegetables" pags. 777-783, que se prevé bajo costo en los programas de vacunación masivos y un amplio uso para fines veterinarios al producir vacunas en plantas. La empresa norteamericana Dow AgroSciences es pionera en este campo y ha conseguido la autorización de la FDA para producir una vacuna contra un virus respiratorio de aves en células vegetales en el 2006.

El presente invento presenta el desarrollo de vacunas por sub unidades en plantas, basada en la fusión de epítomos de *Corynebacterium difteriae*, *Bordetella pertussis* y *Clostridium tetani* (DPT). El polipéptido antigénico de la presente invención, el cual no existe en la naturaleza, es producido en plantas de tomate

transgénicas expresado a partir de un gen sintético. El gen sintético optimizado para plantas fue diseñado para hacer eficiente la traducción en plantas y contiene secuencias codificantes para los epítomos inmunoprotectores de las exotoxinas diftérica, pertúsica y tetánica y dos adyuvantes unidos por péptidos conectores para preservar la inmunogenicidad de los epítomos de las exotoxinas.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Diagrama de la construcción pBI-DPT, el cual contiene el gen sintético que codifica para los principales epítomos de *C. diphtheriae*, *B. pertussis* y *C. tetani*, dos adyuvantes y una señal de retención (RE) en el retículo endoplásmico. La construcción pBI-DPT fue usada para la transformación de plantas de tomate.

Figura 2.- Desarrollo de callos, brotes y plantas de tomate. (A) Formación d callos después de 5 semanas de la transformación mediada por *Agrobacterium*, (B) Brotes regenerados en medio de selección, (C) Plantas transgénicas en el invernadero, (D) Frutos de plantas transformadas.

Figura 3.- Amplificación del gen sintético DPT por PCR. Productos de amplificación a partir de DNA genómico de las transformantes usando los oligonucleótidos DPT-F y DPT-R, el plásmido pBI-DPT fue usado como control positivo (carril 12); una planta sin transformar se incluyó como control negativo (carril 13); carriles 1-11, plantas regeneradas en medio de selección, carril 14: Marcador de peso molecular de 1 Kb.

Figura 4.- Análisis por Southern blot que confirman la integración del gen DPT al genoma del tomate. 40 µg de ADN genómico de una planta sin transformar (WT) y plantas transgénicas (1-11) fueron digeridos con *EcoRI* e hibridados, utilizando como sonda el producto de PCR del gen DPT marcado con digoxigenina.

Figura 5.- Análisis por RT-PCR para la detección de un transcrito específico para DPT. Las plantas transgénicas que están transcribiendo muestran una banda de 570 bp (carriles 1-11), esta banda no se observa en una planta sin transformar

(WT); como control de carga se amplificó una región de  $\beta$ -actina (banda de 610 bp) la cual se presenta en las transgénicas y la WT.

5 Figura 6.- Análisis de ELISA para la cuantificación en  $\mu\text{g/g}$  de epítomos de los toxoides diftérico y tetánico en hojas, producidos en las diferentes líneas de plantas transgénicas de tomate..

Figura 7.- Análisis de ELISA para la cuantificación en  $\mu\text{g/g}$  del epítomo pertúsico producido en las hojas de diferentes líneas de plantas transgénicas de tomate.

10

Figura 8.- Análisis de ELISA para la cuantificación en  $\mu\text{g/g}$  de epítomos de los toxoides diftérico y tetánico en frutos, producidos en las diferentes líneas de plantas transgénicas de tomate.

15

Figura 9.- Análisis de ELISA para la cuantificación en  $\mu\text{g/g}$  del epítomo pertúsico producido en frutos de diferentes líneas de plantas transgénicas de tomate.

20 Figura 10.- Detección por ELISA de inmunoglobulinas (IgG) en suero de ratones BALB/c alimentados por vía oral con tomates transgénicos conteniendo la vacuna contra DPT. Se administraron 270 mg de tomate liofilizado solo (T-DPT) o co-administrado con 5  $\mu\text{g}$  de toxina de cólera (T-DPT/CT) o 5  $\mu\text{g}$  de zanahoria transgénica conteniendo la toxina termolábil de *E. coli* LTB (T-DPT/LTB). También se administró tomate silvestre sin transformar (WT). Las muestras se diluyeron 1:10 y se corrieron por duplicados. Se registra el valor medio  $A_{492}$ , de cada grupo  
25 experimental (n=5). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre grupos. TT: Toxoide tetánico, DT: Toxoide diftérico, PT: Toxoide pertúsico.

30 Figura 11.- Detección por ELISA de tipos de inmunoglobulinas IgG1/ IgG2a producidas en suero de ratones alimentados con tomates transgénicos conteniendo la vacuna contra DPT. Se administraron 270 mg de tomate liofilizado solo (T-DPT) o co-administrado con 5  $\mu\text{g}$  de toxina de cólera (T-DPT/CT) o 5  $\mu\text{g}$  de zanahoria transgénica conteniendo la toxina t rmolábil de *E. coli* LTB (T-

DPT/LTB). También se administró tomate silvestre sin transformar (WT). Las muestras fueron diluidas 1:10. Se registra el valor medio  $A_{492}$ , de cada grupo experimental ( $n=5$ ). Subclases de IgG para el toxoide tetánico (TT), (El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre grupos.

5

Figura 12.- Detección por ELISA de tipos de inmunoglobulinas IgG1/ IgG2a producidas en suero de ratones alimentados con tomates transgénicos conteniendo la vacuna contra DPT. Se administraron 270 mg de tomate liofilizado solo (T-DPT) o co-administrado con 5  $\mu$ g de toxina de cólera (T-DPT/CT) o 5  $\mu$ g de zanahoria transgénica conteniendo la toxina termolábil de *E. coli* LTB (T-DPT/LTB). También se administró tomate silvestre sin transformar (WT). Las muestras fueron diluidas 1:10. Se registra el valor medio  $A_{492}$ , de cada grupo experimental ( $n=5$ ). Subclases de IgG para el toxoide diftérico (DT), El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre grupos.

10

15

Figura 13.- Detección por ELISA de tipos de inmunoglobulinas IgG1/ IgG2a producidas en suero de ratones alimentados con tomates transgénicos conteniendo la vacuna contra DPT. Se administraron 270 mg de tomate liofilizado solo (T-DPT) o co-administrado con 5  $\mu$ g de toxina de cólera (T-DPT/CT) o 5  $\mu$ g de zanahoria transgénica conteniendo la toxina termolábil de *E. coli* LTB (T-DPT/LTB). También se administró tomate silvestre sin transformar (WT). Las muestras fueron diluidas 1:10. Se registra el valor medio  $A_{492}$ , de cada grupo experimental ( $n=5$ ). Subclases de IgG para el toxoide pertúsico (PT). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre grupos.

20

25

Figura 14.- Análisis de ELISA para detección de anticuerpos anti-DPT (IgA), en líquidos traqueopulmonares de ratones alimentado con tomates transgénicos conteniendo la vacuna contra DPT. Las muestras fueron diluídas 1:2. Se registra el valor medio  $A_{492}$ , de cada grupo experimental ( $n=5$ ). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre grupos. TT: Toxoide tetánico, DT: Toxoide diftérico, PT: Toxoide pertúsico.

30

Figura 15.- Análisis de ELISA para detección de anticuerpos anti-DPT (IgG), en líquidos traqueopulmonares de ratones alimentado con tomates transgénicos conteniendo la vacuna contra DPT. Las muestras fueron diluídas 1:2. Se registra el valor medio  $A_{492}$ , de cada grupo experimental (n=5). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre grupos. TT: Toxoide tetánico, DT: Toxoide diftérico, PT: Toxoide pertúsico.

Figura 16.- Análisis de ELISA para detección de anticuerpos anti-DPT (IgA), en fluidos intestinales de ratones alimentado con tomates transgénicos conteniendo la vacuna contra DPT. Las muestras fueron diluídas 1:2. Se registra el valor medio  $A_{492}$ , de cada grupo experimental (n=5). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre grupos. TT: Toxoide tetánico, DT: Toxoide diftérico, PT: Toxoide pertúsico.

Figura 17.- Análisis de ELISA para detección de anticuerpos anti-DPT (IgG), en fluidos intestinales de ratones alimentado con tomates transgénicos conteniendo la vacuna contra DPT. Las muestras fueron diluídas 1:2. Se registra el valor medio  $A_{492}$ , de cada grupo experimental (n=5). El asterisco indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre grupos. TT: Toxoide tetánico, DT: Toxoide diftérico, PT: Toxoide pertúsico.

### Descripción detallada del invento

El presente invento describe la construcción del polipéptido antigénico codificado con genes sintéticos, para lo cual los inventores tomaron secciones de las sub unidades antigénicas de las diferentes toxinas de DPT reportadas en la sección de antecedentes. Se escogieron dos de los epítomos más antigénicos de cada una de las exotoxinas diftérica, pertúsica y tétanica, se diseñó el polipéptido multi epítomo usando el software Antheprot (disponible en <http://antheprot-pbil.ibcp.fr>). Péptidos conectores fueron añadidos para mantener las secuencias de los epítomos expuestas como se muestra en la Tabla 1.

Los péptidos antigénicos seleccionados se describen en detalle a continuación: 26 aminoácidos (posición 312-337) y 32 aminoácidos (posición 975-826) de la cadena pesada de la toxina tetánica; los primeros 17 aminoácidos y otros 17 aminoácidos adicionales (posición 99-115) de la sub unidad 1 de la toxina pertúsica, y 16 aminoácidos (posición 186-201) y 27 aminoácidos adicionales (posición 221-247) de la sub unidad A de la toxina diftérica (Tabla 1 y Figura 1). Dos secuencias de la toxina tetánica que codifican para adyuvantes fueron incluidas en el extremo C- Terminal, además de añadir una señal de retención en el retículo endoplásmico (SEKDEL).

10

En la Tabla 1 se muestran los nucleótidos en grupo de tres (codones) con letras minúsculas, y los aminoácidos con letras mayúsculas. Resaltadas en mayúsculas en "negritas" y subrayadas se señalan los aminoácidos usados como conectores o "linkers" para poder exponer los epítomos de las diferentes toxinas bacterianas. Los primeros y últimos codones son sitios de restricción usados para las manipulaciones en las clonaciones.

15

20

25

30

cca tgg gat ccc atg cac cat cac cac cat cat gaa cag atc gct gat	1-48
<b>M H H H H H H E Q I A D</b>	
gaa ata aat aac ttg aag aac aag ttg gag gag aag gcc aac aag gct	49-96
<b>E I N N L K N K L E E K A N K A</b>	
atg att aat att aat tca gta caa ctt aag ttg tat gac gac aag aat	97-144
<b>M I N I N S V Q L K L Y D D K N</b>	
gct tct ctt gga ctt gtt gga aca cat aat ggt caa att ggt aac gac	145-192
<b>A S L G L V G T H N G Q I G N D</b>	
cca aat aga gat atc gat gat cca cct gcc act gtg tat agg tac gat	193-240
<b>P N R D I D D P P A T V Y R Y D</b>	
tca aga cct cct gaa gat gga gca gca tct agt tat ttt gaa tac gtg	241-288
<b>S R P P E D G A A S S Y F E Y V</b>	
gat aca tac ggt gat aac gct tgc gca gga aac cgt gtt aga agg tct	289-336
<b>D T Y G D N A C A G N R V R R S</b>	
gtt ggc tca agt tta tca tgt aaa gaa cat ggt cct att aaa aac aaa	337-384
<b>V G S S L S C K E H G P I K N K</b>	
atg tca gag tca cca aat aag act gtt tct gaa gag aaa gca aaa caa	385-432
<b>M S E S P N K T V S E E K A K Q</b>	
tac ttg cag tat att aag gct aat agt aag ttc atc ggg ata acc gag	433-480
<b>Y L Q Y I K A N S K F I G I T E</b>	
ttt aat aat ttc act gtt tct ttt tgg ctt aga gtg cca aaa gtc agt	481-528
<b>F N N F T V S F W L R V P K V S</b>	
gct tct cat ctc gag agt gaa aaa gat gag ttg tag taa gag ctc tct	529-576
<b>A S H L E S E K D E L</b>	

Tabla 1.- Secuencia de nucleótidos optimizada para expresarse en plantas, la cual codifica los principales epítomos de DPT. En letras minúsculas se muestran los nucleótidos y con letras mayúsculas los aminoácidos. En "negritas" y subrayadas se señalan los aminoácidos usados como conectores o "linkers" En la columna derecha se enumeran los nucleótidos.

En la Figura 1 se muestra la organización esquemática del gen sintético conteniendo los epítomos DPT y parte del vector binario pBI121 donde fue clonado para su transformación de células vegetales y obtención de plantas transgénicas.

### Construcción del plásmido pBI-DPT

El gen sintético DPT diseñado (sDPT) por los inventores se envió a sintetizar a la compañía Entelechon (Regensburg, Germany) conteniendo los sitios de restricción *Bam*HI y *Sac*I, en el sitio 5' y 3', respectivamente como se muestra en

la Figura 1. El gen DPT fue clonado en el vector pCR4-TOPO, el cual fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I para liberar un fragmento de 570 bp. El fragmento liberado (gen DPT) fue ligado al vector binario pBI121 previamente digerido con las mismas enzimas. El vector binario pBI121 contiene el gen de selección *npt* II que confiere resistencia a kanamicina cuando se expresa en las células vegetales transformadas. El plásmido resultante fue nombrado pBI-DPT. Figura 1.

El plásmido pBI-DPT fue introducido a la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación, las clonas positivas fueron verificadas por análisis de restricción, una clona positiva fue usada para la transformación de tomate. Todos los procedimientos fueron realizados bajo técnicas estándar reportadas por Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Manatis, T. en 1989, en el Manual "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

15

#### **Transformación de tomate (*Lycopersicon esculentum*)**

Esta sección del invento se basó en lo reportado por Cortina C., y Culiañez-Macia F.A. en la revista *Plant Cell Tissue and Organ Culture* vol., 76 en el 2004 en el trabajo titulado "Tomato transformation and transgenic plant production", pags. 269-275. Las semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. AC) fueron esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 50% por 10 minutos, después fueron enjuagadas con 100 mL de agua destilada estéril por 4 ó 5 veces y germinadas en medio MS (4.6 g/L) reportado por Murashige, T., y Skoog, F. en *Physiol Plant*, vol. 15 en 1962, en el trabajo titulado "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture", pags. 473-479. El medio fue suplementado con sacarosa (30 g/L) y agar (8 g/L) a pH 5.7 y crecidas a 25° C con un fotoperíodo de 16 h luz, 8 h oscuridad.

Después de una semana, los cotiledones fueron cortados y las puntas fueron removidas y seccionadas transversalmente con un bisturí en dos fragmentos. Se colocaron los explantes con el lado abaxial en contacto con el medio de precultivo (MS, sacarosa 30 g/L, agar 8 g/L, ácido indolacético (IAA))

0.87 mg/L, y zeatina 1.75 mg/L) en cajas de Petri e incubadas por 2 días a 25° C en la oscuridad.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el plásmido pBI-DPT fue crecida a 0.2-0.3 OD<sub>600</sub> previo al co-cultivo. Los explantes de tomate fueron removidos del medio de precultivo y transferidos a la suspensión bacteriana por 15 min, luego los explantes fueron incubados por 2 días a 25° C en la oscuridad, en las placas de precultivo, asegurando que los explantes estuvieran en contacto con la superficie del medio.

10

Después de dos días, los explantes fueron sumergidos en el medio de lavado (MS, sacarosa 30 g/L; cefotaxima 300 mg/L) colocados sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de bacteria y transferidos a medio de regeneración a través de organogénesis (MS, sacarosa 30 g/L, agar 8 g/L, ácido indol acético (IAA) 0.87 mg/L; zeatina 1.75 mg/L; cefotaxima 300 mg/L y kanamicina 100 mg/L). Varias líneas independientes resistentes a kanamicina fueron obtenidas después de la transformación mediada por *Agrobacterium* del cultivar de tomate AC. Cuatro meses después, cuando las plántulas regeneradas alcanzaron 2-3 cm de altura, fueron separadas del callo y colocadas en medio de enraizamiento (MS, sacarosa 30 g/L; cefotaxima 300 mg/L) en contenedores estériles. Un mes después las plantas fueron transferidas a tierra en una cámara bioclimática con condiciones controladas de 16 h iluminación y 24 ° C, hasta que alcanzaron el estado adulto y se cosecharon frutos como se muestra en la Figura 2. La progenia fue fértil y se obtuvieron plantas de la generación T1. El invento demuestra que es posible regenerar plantas adultas productoras de frutos fértiles a partir de explantes heridos y co-cultivados con *Agrobacterium*.

25

### Amplificación por PCR del transgén sDPT

ADN genómico fue extraído de hojas como describen Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. en la revista Plant Mol Biol Rep, vol. 1, en 1983 en el trabajo titulado "A plant DNA minipreparation: version I", pags. 19-21.

30

El programa de ciclado empleado fue: 5 minutos a 94° C (desnaturalización inicial): 35 ciclos a 94° C/30 s, 61° C/30 s, 72° C/45 s y una extensión final a 72° C por 5 min. Para el PCR se utilizaron los oligonucleótidos DPT-F (5' ATG CAC CAT CAC CAC CAT C 3') y DPT-R (5' GCA ACT CAT CTT TTT CAC TCT CG 3'); la  
5 mezcla de reacción de 25 µl fue preparada como se indica a continuación: MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleótidos 0.5 µM, Taq DNA polimerasa 0.5 U. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Como resultado del PCR una banda fue detectada en la posición correspondiente a 570 bp para el caso de las plantas transgénicas que integraron  
10 el gen sintético a su genoma como se muestra en la Figura 3. Este resultado nos indica que el vector binario usado que contenía la construcción, transfirió el T-DNA a la planta y permitió su integración.

#### **Análisis de integración del transgén por Southern blot**

15 La integración estable de la construcción pBI-DPT fue corroborada adicional al ensayo de PCR por ensayos de hibridación de ADN genómico. 40 µg de ADN genómico de las plantas transformadas y además de una planta no transformada fue digerido con la enzimas *EcoRI* para analizar el número de copias del transgén  
20 introducido. El ADN digerido fue separado en un gel de agarosa al 1% y luego transferido a una membrana de nylon (Hybond-N+ Amercham Pharmacia Biotech) siguiendo el procedimiento estándar descrito por Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Manatis, T. en 1989, en el Manual "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. El gen DPT  
25 usado como sonda fue marcado con digoxigenina, de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). La membrana fue hibridada usando el kit "Dig Detection Kit" (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las plantas de tomate transgénicas muestran de 1 a 4 copias del gen sDPT en el  
30 tejido vegetal como se muestra en la Figura 4. El invento demuestra que la construcción fue integrada en el genoma de la planta y se puede detectar en todos los tejidos.

## **Análisis de expresión del transgén por RT-PCR**

Para verificar si el gen insertado fue propiamente transcrito en ARN mensajero, un análisis por RT-PCR fue realizado con ARN total aislado de plantas de tomat  
5 transgénicas. ARN total de hojas de plantas transgénicas de tomate fue extraído utilizando el reactivo Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

El ADN complementario se sintetizó a 37° C con la enzima transcriptasa  
10 reversa Multi-Scribe (Applied Biosystem, Roche), en una mezcla de reacción conteniendo oligonucleótidos hexámeros 2.5  $\mu$ M,  $MgCl_2$  5.5 mM, dNTPs 500  $\mu$ M, inhibidor de RNasa 0.4 U/ $\mu$ l, Transcriptasa Reversa MultiScribe 3.125 U/L y 250 ng total RNA como plantilla. Una región de  $\beta$ -actina fue amplificada como control de carga utilizando los oligonucleótidos 5'- AACTGGGATGACATGGAGAA y 3'-  
15 ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA. Los fragmentos amplificados correspondientes al gen DPT y gen de la  $\beta$ -actina, cuyos tamaños son 570 bp y 610 bp respectivamente, fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%. Todas las 11 plantas analizadas mostraron la señal de transcripción, claramente detectada, aunque los niveles variaron ligeramente de una planta a otra como  
20 puede verse en la Figura 5. El invento demuestra que la construcción con su promotor CaMV 35S y terminador nos es funcional y que además de haberse integrado se transcribe en la planta produciendo un ARN mensajero detectable.

## **Extracción de proteína total soluble y análisis por ELISA**

25 Las hojas del tejido vegetal fueron congeladas, molidas y homogenizadas con amortiguador de extracción frío (NaCl 100 mM, Triton X-100 0.5%, leupeptina 10  $\mu$ g/ $\mu$ L en PBS ( $Na_2PO_4$  0.01 M,  $KH_2PO_4$  0.003 M, NaCl 0.1 M, pH 7.2). El homogenado se centrifugó a 8, 000 x g por 15 minutos a 4° C y se recuperó el  
30 sobrenadante y fue evaluado para determinar la cantidad de proteína total soluble por el método de Bradford, M.M. publicado en Anal Biochem, vol. 72 en 1979, con el título "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", págs. 248-254.

Para determinar la acumulación de la proteína DPT en las plantas transgénicas, se analizaron los extractos de hojas y frutos por ELISA. Placas de 96 pozos (Nunc-Immuno Plate, Brand, USA) fueron cubiertas con los extractos de plantas disueltos en buffer de carbonatos.

La detección de epítomos de *C. tetani*, *C. diphtheriae* y *B. pertussis* fue realizada usando los siguientes anticuerpos específicos: antisuero policlonal de cabra anti-toxina tetánica diluido 1:20000 en PBS (USBIOLOGICAL T2962-07 Swampscott, MA, US), antisuero policlonal de cabra anti-toxina diftérica diluido 1:400 en PBS donado por el Dr. Lee (Lee, S.F., Halperin, S.Aa, Knight, J.B. y Tait, A. en la revista *Appl Env Microbiol*, vol. 68 publicado en 2002, con el título "Purification and immunogenicity of a recombinant *Bordetella pertussis* S1S3FHA fusion protein expressed by *Streptococcus gordonii*", pags. 4253-4258), y un antisuero policlonal de cabra anti-toxina diftérica diluido 1: 5000 en PBS (USBIOLOGICAL D-8065-51 USBiological, Swampscott, MA, US). Las placas lavadas fueron incubadas con el anti-anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ig de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (diluido 1:20,000). Finalmente, fue añadida una solución recién preparada de p-nitrofenil fosfato (1 mg/L) y las placas fueron leídas a 450 nm en un lector de microplacas (Bio Rad, Hayward, CA, US). El contenido de proteínas en hojas y frutos de plantas transformadas fueron medidos  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco. Cada muestra fue evaluada por duplicado.

El rango de producción de proteína en  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco de hoja para el epítomo diftérico varía desde 1.9-5.8 (Fig. 6), para el epítomo tetánico, desde 4.5-17 (Fig. 6) y para el epítomo pertúsico varía desde  $6.6 \times 10^{-4}$ - $1530 \times 10^{-4}$  (Fig. 7). El rango de producción de proteína en  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco de fruto varía para el epítomo diftérico desde 1-2.1 (Fig. 8), para el epítomo tetánico, desde 2.25-6.8 (Fig. 8) y para el epítomo pertúsico varía desde  $3.4 \times 10^{-4}$ - $291 \times 10^{-4}$  como puede verse en la Figura 9.

Se realizó una curva estándar utilizando la vacuna comercial DPT (S cr taría de Salud, México, clave 3805) para la cuantificación de los toxoides

diftérico y tetánico y la vacuna comercial Quadracel<sup>TM</sup> (Pasteur Mérieux Connaught, Rhone-Poulenc Group) para la cuantificación del toxoide pertúsico. El invento demuestra que el péptido es funcionalmente reconocido *in vitro* por anticuerpos específicos a las toxinas de difteria, tos ferina y tétanos y que

5 mayoritariamente se producen los epítomos diftérico y tetánico como se muestra en las figuras Figuras 7, 8 y 9. Por otro lado, los valores de proteína total soluble al compararlos con lo publicado para un gen nativo LTB por Haq, T.A., Mason, H.S., Clements, J.D., y Arntzen, C.J., en la revista Science, vol. 268 en 1995, con el título "Oral Immunization with a recombinant bacterial antigen produced in

10 transgenic plants", pags. 714-716, es mayor, por lo que el uso de genes sintéticos es recomendable. Además la secuencia SEKDEL puede estar ayudando a reducir pérdidas por degradación de la proteína. Este experimento demuestra que un extracto vegetal contiene un complejo antigénico DPT.

#### 15 **Evaluación de la inmunogenicidad de la proteína de fusión DPT**

Para analizar si la proteína recombinante expresada en plantas de tomate es inmunogénica, los inventores evaluaron la producción de anticuerpos específicos en ratones inmunizados por vía oral con las plantas de tomate transgénicas.

20

En esta sección para facilitar la interpretación de los resultados y con base a que los ensayos inmunológicos de cuantificación de toxoides diftéricos y tetánicos se presentan usualmente como unidades de floculación (Lf) y el pertúsico en ng, se usarán las citadas unidades en el resto del escrito. En todos

25 los experimentos se usaron ratones Balb/c de 12-14 semanas. Los ratones fueron inmunizados por vía oral con 270 mg de tejido vegetal (tomate liofilizado) de la línea 17, esta cantidad de tejido contiene 5.5 Lf, 23.8 Lf y 73 ng de epítomos diftérico, tetánico y pertúsico respectivamente, para establecer si la presencia de un adyuvante adicional externo potencia la respuesta, se incluyeron otros 2

30 grupos, uno de ellos recibió 270 mg de tejido vegetal coadministrado con 5 µg de toxina de cólera (CT) (Sigma Aldrich Chemical Co., St Louis, MO), mientras que otro grupo recibió además de los 270 mg de tejido vegetal 5 µg de toxina termolábil de *E. coli* (LTB) expresada en zanahoria por Rosales-Mendoza, S.,

Soria-Guerra, R.E., Olivera-Flores, M.J., López-Revilla, R., Argüello-Astorga, G., Jiménez-Bremont, J.F., García-de la Cruz, R.F., Loyola-Rodríguez J.P. y Alpuche-Solís, A.G. en la revista *Plant Cell Rep*, vol. 26 en 2007, con el título "Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin b subunit (LTB) in carrot (*Daucus carota* L.)", pags. 969-976.

Como control negativo se incluyó un grupo que fue alimentado con 270 mg de tejido sin transformar. Los animales fueron sacrificados siete días después de la última inmunización para obtener muestras de suero, lavados intestinales y traqueopulmonares y la respuesta fue cuantificada por ELISA usando toxoide diftérico, 0.5 Lf/ml por pozo (NIBSC 02/176), toxoide tetánico 0.5 Lf/ml por pozo (NIBSC 02/126,) o toxoide pertúsico 0.23 UI/ml (NIBSC 66/303). El suero fue diluido 1:10 en PBST (Tween-20 0.05% v/v en PBS), los fluidos intestinales y traqueopulmonares fueron diluidos 1:2 en PBST. Los siguientes anticuerpos (conjugados a peroxidasa) fueron usados como anticuerpos secundarios: anti-IgG (Pierce Laboratories) dilución 1:1000, anti-IgA dilución 1:1000 (Zymed Laboratories) o anti-IgG1 e IgG2a (Zymed Laboratorios) (conjugados a biotina). Para el uso de anticuerpos biotinilados se agregó streptoavidina peroxidada (dilución 1:1000). Como solución reveladora se utilizó o-fenilendiamina 10 mg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% en buffer de fosfato-citrato 50 mM pH 5.2, después del desarrollo de color, la reacción se detuvo con 25 µl de ácido sulfúrico 2N. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA).

El suero evaluado para anticuerpos IgG hacia los epítomos tetánicos, diftéricos y pertúsicos, confirmaron el éxito de la inmunización oral al estimular respuesta hacia el antígeno foráneo en todos los grupos, como se puede observar en la Figura 10. En este experimento ni CT ni LTB tienen efecto adyuvante adicional a los adyuvantes propios de la construcción en DPT en la respuesta sérica a IgG; los ratones inmunizados con el tomate no transgénico mostraron una respuesta de IgG muy baja ( $P < 0.05$ ) con diferencia estadísticamente significativa respecto a los inmunizados con el tomate conteniendo DPT como puede verse en la Figura 10. Asimismo se observó una mayor respuesta sérica del tipo IgG1

comparada con IgG2a (Fig. 11). CT presenta un efecto adyuvante sobre la respuesta a IgG1 pero no sobre IgG2a para los toxoides diftérico y pertúsico ( $P < 0.05$ ) Figuras 12 y 13.

5           La respuesta más alta registrada hacia IgG1 fue alcanzada en el grupo donde se administró el tomate transgénico con el adyuvante CT para los tres toxoides como se aprecia en las Figs. 11, 12 y 13. Estos resultados indican que el invento de producir una vacuna en tomate que genere una respuesta inmune en mamíferos es efectivo. La respuesta es principalmente del tipo Th2 o humoral lo  
10       cual es deseado en las vacunas.

          Debido a que estos patógenos atacan mucosas, los inventores analizaron el líquido traqueopulmonar y los fluidos intestinales para la detección de IgA e IgG.

15           En el líquido traqueopulmonar, la respuesta de IgA a los epítomos diftéricos, tetánicos y pertúsicos fue más alta en todos los grupos respecto a la IgG (Figs. 14 y 15). Los adyuvantes externos como CT y LTB no parecen tener un efecto aditivo en la producción de IgA en el líquido traqueopulmonar, aunque todas las  
20       muestras con DPT muestran diferencias estadísticamente significativa respecto a la planta sin transformar (Fig. 14). La respuesta de IgA hacia el epítomo tetánico de la proteína de fusión fue más evidente y muestran una respuesta menor a IgA hacia los epítomos diftéricos y pertúsicos (como puede observarse en la Figura 14.

25           La respuesta a IgA en el líquido traqueopulmonar de ratones inmunizados por ruta oral con el tomate transgénico con o sin adyuvantes adicionales CT o LTB, fue menor que la respuesta de IgA en fluidos intestinales ( $P < 0.05$ ) como se muestra en la Figura 16. En los fluidos intestinales, de nuevo todos los grupos de toxoides respondieron con valores mayores hacia IgA en comparación a IgG ( $P < 30$  0.05). Se observó una respuesta baja en el toxoide pertúsico para IgA respecto a los otros toxoides como se observa en la Figura 16.

En la Figura 17 se observa que CT tiene efecto adyuvante en los tres toxoides sobre la respuesta hacia IgG ( $P < 0.05$ ); en contraste, la co-administración de LTB no mostró efecto adyuvante en la respuesta a IgG. Niveles de respuesta similares fueron inducidas en los ratones inmunizados con las plantas transgénicas DPT sin adyuvante adicional LTB.

El invento incluye plantas, semillas y tejidos de plantas capaz de expresar la secuencia que codifica al polipéptido de DPT con regiones adyuvantes y de retención en retículo endoplásmico, útiles para estimular una respuesta inmune en un mamífero contra estas tres enfermedades.

Los resultados demuestran que este polipéptido codificado por un gen sintético conteniendo secuencias antigénicas de *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* y *Clostridium tetani* expresadas en un sistema vegetal (Soria-Guerra, R.E., Soria-Guerra, R.E., Rosales-Mendoza, S., López-Revilla, R., Mercado-Márquez, C., Castillo-Collazo, R. y Alpuche-Solís, A.G., publicado en Plant Cell Reports, vol. 26 en el 2007, con el título "Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene" pags. 961-968.), prenda la respuesta inmune en mamíferos sentando las bases para el desarrollo de vacunas basadas en plantas contra difteria, tos ferina y tétanos.

25

30

## NOVEDAD DE LA INVENCION

### REIVINDICACIONES

- 1.- Un polinucleótido que es un gen sintético para expresión en plantas,  
5 caracterizado porque comprende una secuencia como se describe en  
SEQ ID NO: 1.
- 2.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 1,  
caracterizado además porque codifica en plantas para un polipéptido  
que presenta epítomos de las toxinas de *Corynebacterium diphtheriae*,  
10 *Bordetella pertussis* y *Clostridium tetani*.
- 3.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 1,  
caracterizado además porque está optimizado para ser expresado por  
la maquinaria de síntesis de proteínas de plantas.
- 4.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 1,  
15 caracterizado además porque está clonado en un vector binario.
- 5.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 4,  
caracterizado además porque comprende un promotor funcional en  
plantas.
- 6.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 5,  
20 caracterizado además porque dicho promotor funcional es CaMV 35S.

- 7.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 3,  
caracterizado además porque comprende seis uniones de aminoácidos  
que unen los seis diferentes epítomos de las toxinas y dos secuencias que  
codifican para péptidos adyuvantes en la región 3', así como la  
5 secuencia de retención en retículo endoplásmico SEKDEL en el extremo  
3', y un terminador de plantas de nopalina sintasa.
- 8.- Un polipéptido codificado a partir de la secuencia del polinucleótido  
que se reclama en la reivindicación 1, caracterizado porque  
comprende una secuencia como se describe en SEQ ID NO: 2.
- 10 9.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado  
además porque comprende epítomos de las toxinas de  
*Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* y *Clostridium tetani*.
- 10.- Un vector de expresión, caracterizado porque contiene una  
secuencia de nucleótidos como se describe en SEQ ID NO: 1.
- 15 11.- Una célula transgénica vegetal, caracterizada porque contiene la  
secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO:1.
- 12.- La célula transgénica vegetal de conformidad con la reivindicación  
11, caracterizada además porque ha sido transformada con un vector  
de expresión como el que se reclama en la reivindicación 10.

13.- La célula transgénica vegetal de conformidad con la reivindicación

11, caracterizada además porque expresa un polipéptido como el que se reclama en la reivindicación 8.

14.- La célula transgénica vegetal de conformidad con la reivindicación

5 11, caracterizada además porque es una célula de *Lycopersicon sp.*

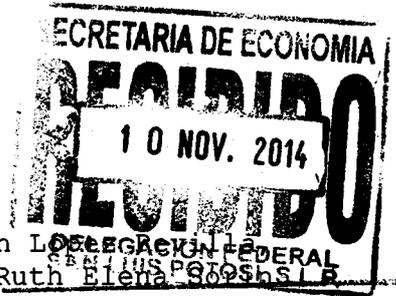
15.- El uso del polipéptido como se reclama en la reivindicación 8, para preparar una composición o vacuna para la prevención de difteria, tos ferina y tétanos.

16.- El uso de células transgénicas vegetales como las que se reclaman  
10 en la reivindicación 11, para preparar un producto, composición o vacuna para la prevención de difteria, tos ferina y tétanos.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

Se presenta una vacuna producida en plantas contra difteria tos ferina y tétanos conocida como vacuna triple DPT. La vacuna incluye un complejo  
5 inmunogénico a partir de la transformación de jitomate con un gen quimérico optimizado para expresarse en plantas, que codifica un nuevo polipéptido recombinante el cual no  
existe en la naturaleza y que contiene los principales epítomos inmunoprotectores de difteria, tos ferina y tétanos. También se describen los  
10 métodos para construir el vector de transformación y producir la vacuna producida en jitomate mediante transformación genética y los métodos de regeneración mediante cultivo de tejidos vegetales. Asimismo se presentan los resultados de la producción de anticuerpos en pruebas realizadas en ratones los cuales pueden ser útiles para la inmunización de mamíferos.

## LISTADO DE SECUENCIAS



## (1) INFORMACION GENERAL

(i) SOLICITANTES: Angel Gabriel Alpuche, Ruben Lopez Guerra, Sergio Rosales Mendoza, Crisoforo Mercado Marquez, Ruth Elena Potosi.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: "Plantas transgénicas expresan un polipéptido novedoso codificado por un gen que contiene secuencias inmunoprotectoras de las exotoxinas de Corynebacterium diphtheriae, Bordetella pertussis y Clostridium tetani"



(iv) NUMERO DE SECUENCIAS 2

(v) FORMA QUE PUEDE SER LEIDA EN COMPUTADORA: PatentIn Ver.

2.0

## (2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO.1

## (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 576 pb
- (B) TIPO: ADN
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGIA: lineal

## (ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico

(A) DESCRIPCION: Gen sintético DPT

## (ix) CARACTERISTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: DPT
- (B) LOCALIZACION:

## (xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 1

```
ccatgggatc ccatgcacca tcaccacat catgaacaga tcgctgatga aataaataac 60
ttgaagaaca agttggagga gaaggccaac aaggctatga ttaatattaa ttcagtacaa 120
cttaagttgt atgacgacaa gaatgcttct cttggacttg ttggaacaca taatgggtaa 180
attggtaacg acccaaatag agatatgat gatccacctg ccaactgtgta taggtacgat 240
tcaagacctc ctgaagatgg agcagcatct agttattttg aatacgtgga tacatacggg 300
gataacgctt gcgcaggaaa ccgtggttaga aggtctgttg gctcaagttt atcatgtaa 360
gaacatggtc ctattaaana caaatgtca gagtcaccaa ataagactgt ttctgaagag 420
aaagcaaac aataactgca gtatattaag gctaatagta agttcatcgg gataaccgag 480
tttaataatt tcaactgttc tttttgctt agagtgcaa aagtcagtgc ttctcatctc 540
gagagtgaaa aagatgagtt gtagtaagag ctctct 576
```

## (2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO.2

## (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

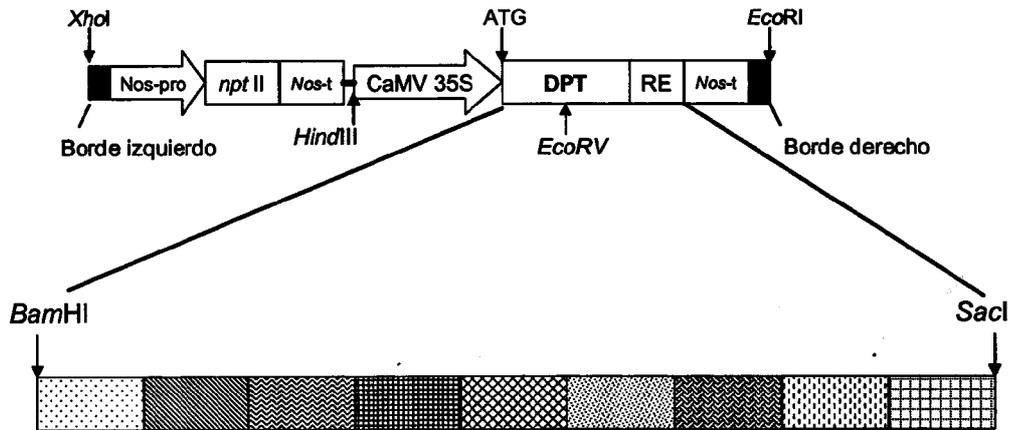
- (A) LONGITUD: 183 aminoácidos
- (B) TIPO: péptido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla

- (D) TOPOLOGIA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido  
    (A) DESCRIPCION: proteína sintética DPT  
(ix) CARACTERISTICAS:  
    (A) NOMBRE/CLAVE: **DPT**  
    (B) LOCALIZACION:

(xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 2

MHHHHHEQI	ADEINNLKKN	LEEKANKAMI	NINSVQLKLY	DDKNASLGLV	GTHNGQIGND	60
PNRDIDDPPA	TVYRYDSRPP	EDGAASSYFE	YVDTYGDNAC	AGNRVRRSVG	SSLSCKEHGP	120
IKNKMESPN	KTVSEEKAKQ	YLQYIKANSK	FIGITEFNNF	TVSFWLRVPK	VSASHLESEK	180
DEL						183

**Figura 1**



	Toxina tetánica (cadena pesada)	EQIADEINNLNKLNKLEEKANKAMININ
	Toxina tetánica(cadena pesada)	SVQLKLYDDKNASLGLVGTHNGQIGNDPNRDI
	Toxina pertúsica (subunidad 1)	DDPPATVYRYDSRPPED
	Toxina pertúsica (subunidad 1)	GAASSYFEYVDTYGDNA
	Toxina diftérica (cadena A)	CAGNRVRRSVGSSLSC
	Toxina diftérica (cadena A)	KEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYL
	Adyuvante (Toxina tetánica)	QYIKANSKFIGITE
	Adyuvante (Toxina tetánica)	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
	Señal de retención RE	SEKDEL

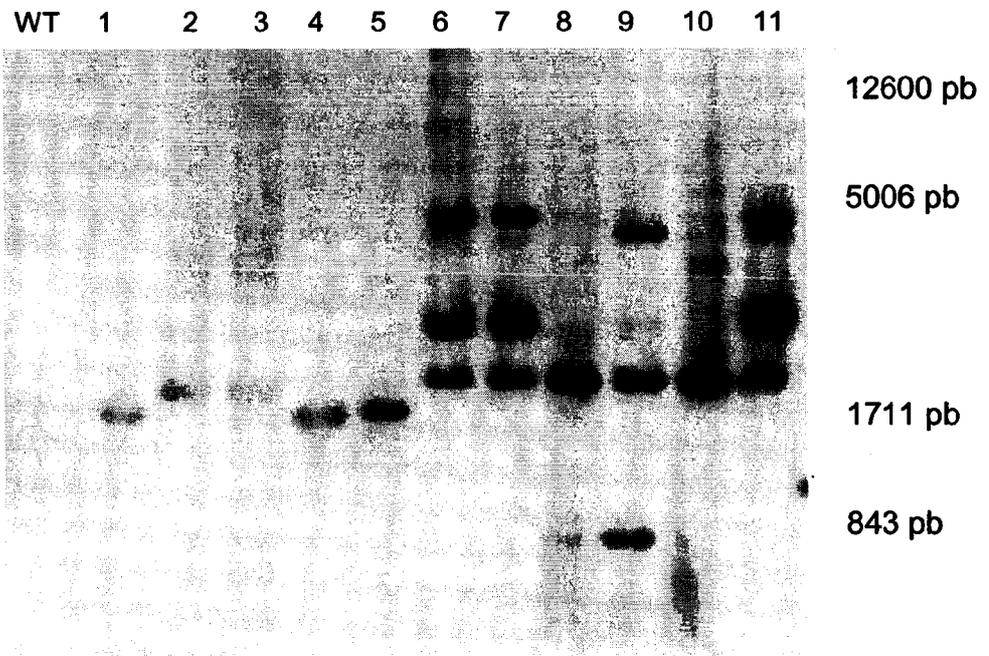
**Figura 2**



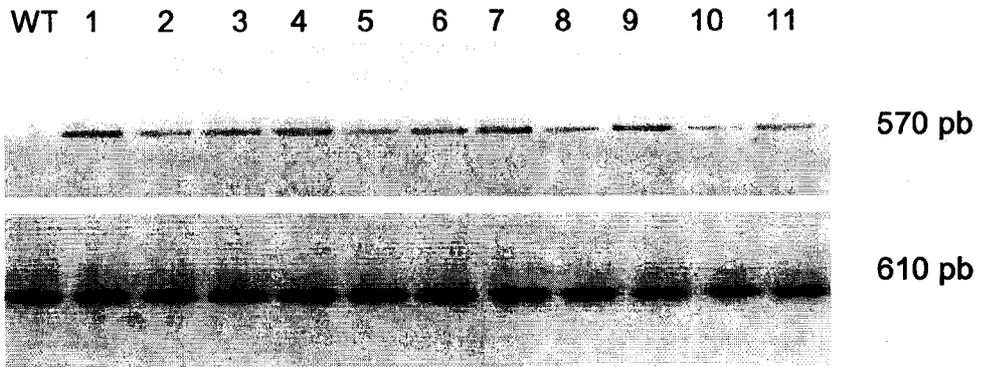
**Figura 3**



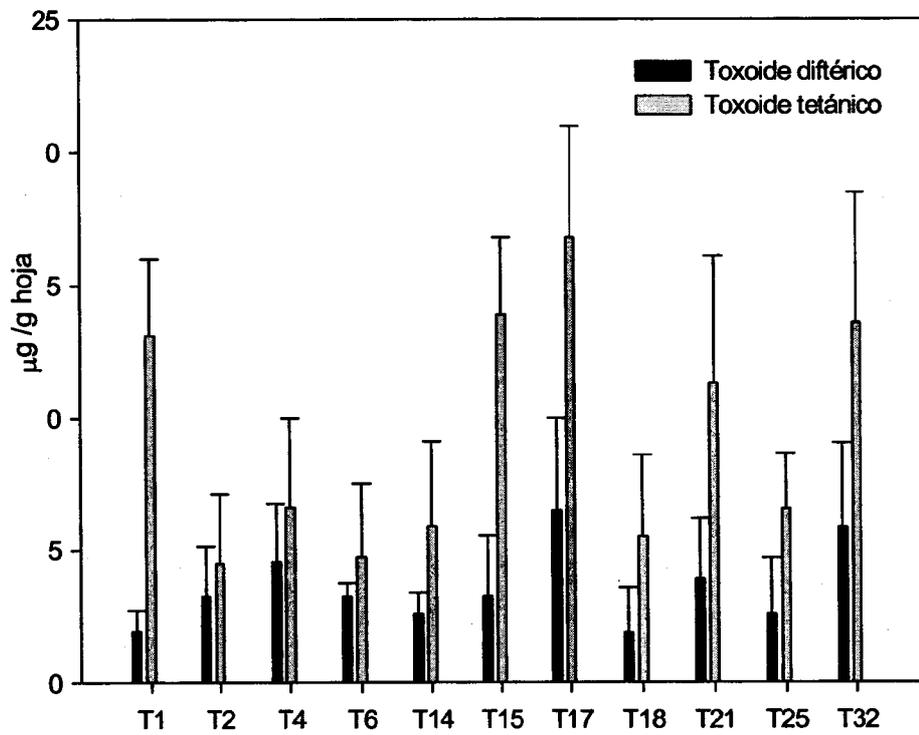
**Figura 4**



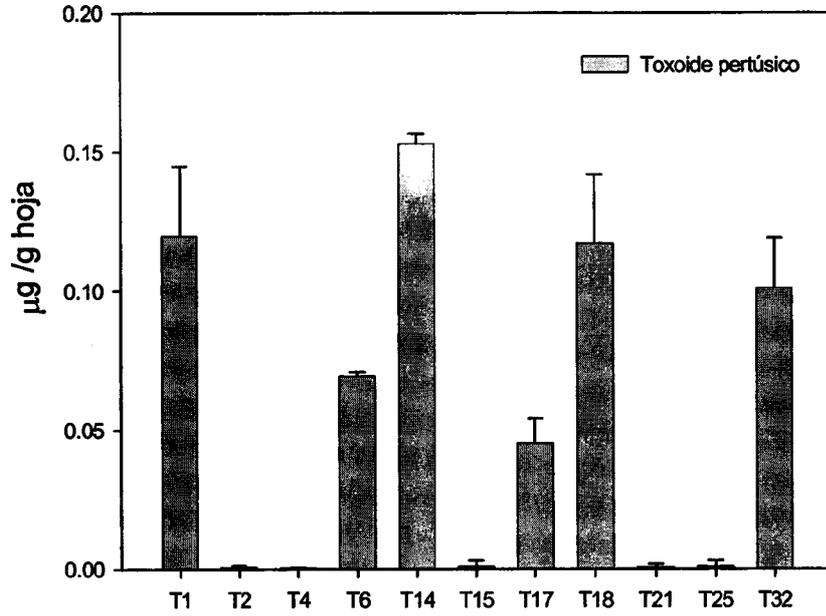
**Figura 5**



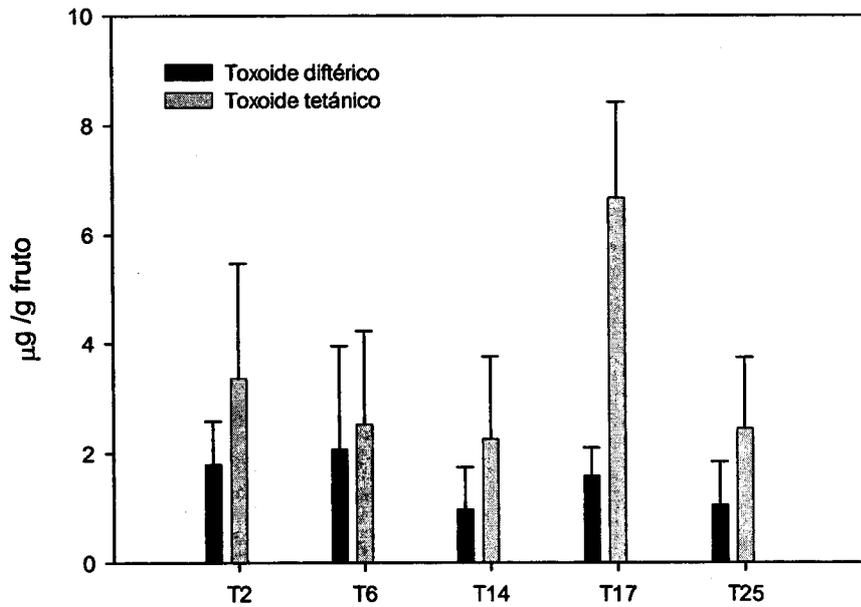
**Figura 6**



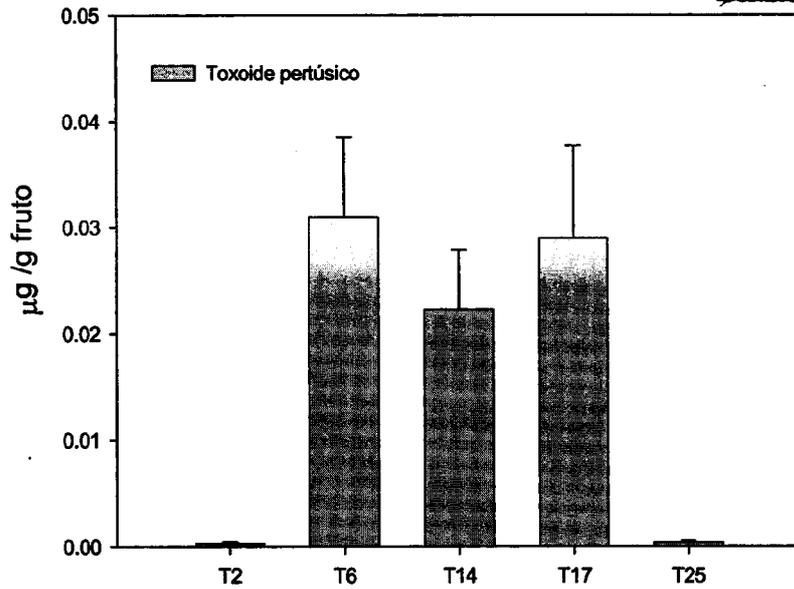
**Figura 7**



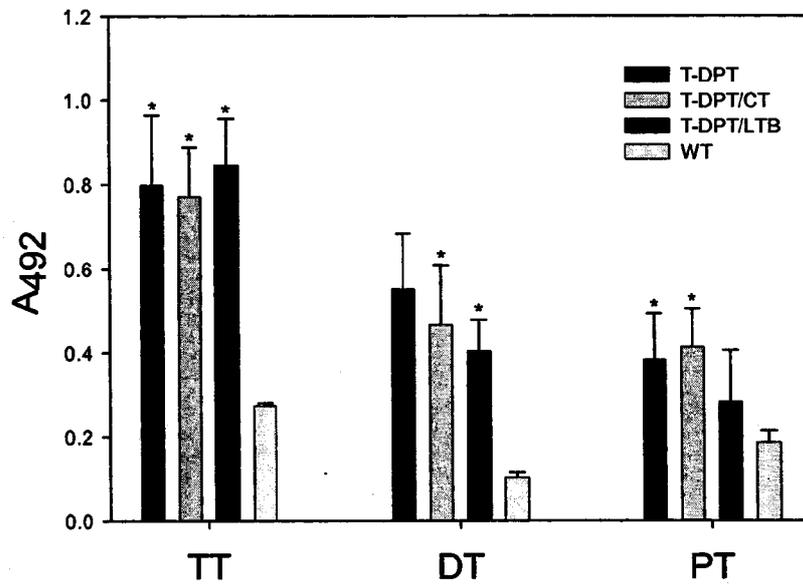
**Figura 8**



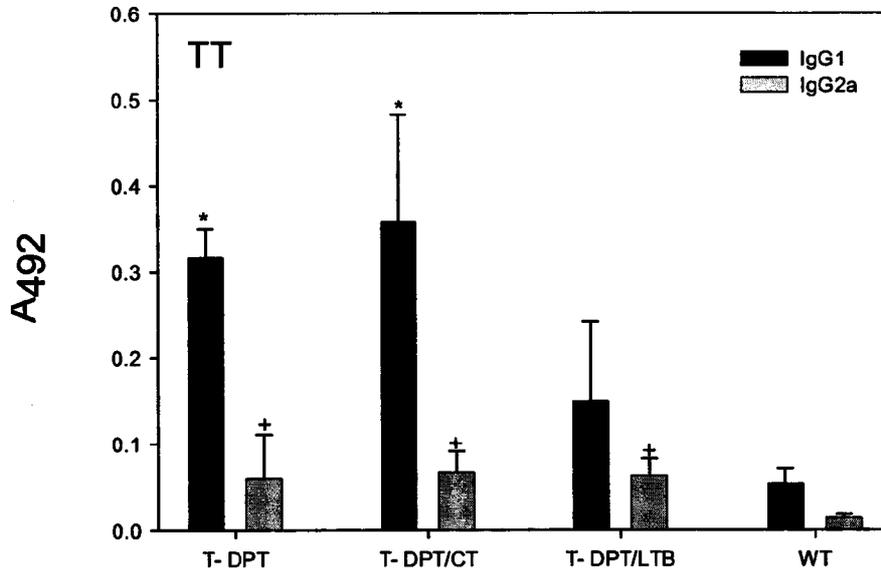
**Figura 9**



**Figura 10**



**Figura 11**



**Figura 12**

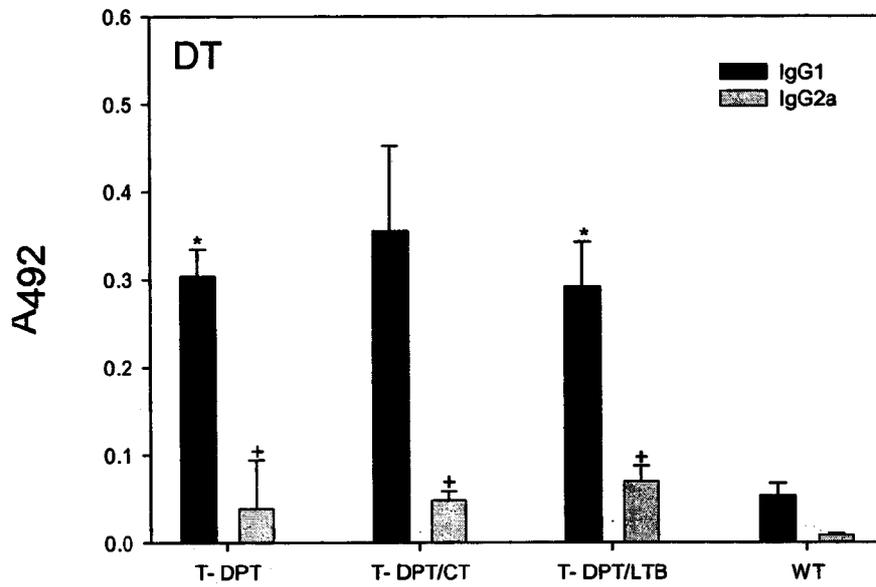


Figura 13

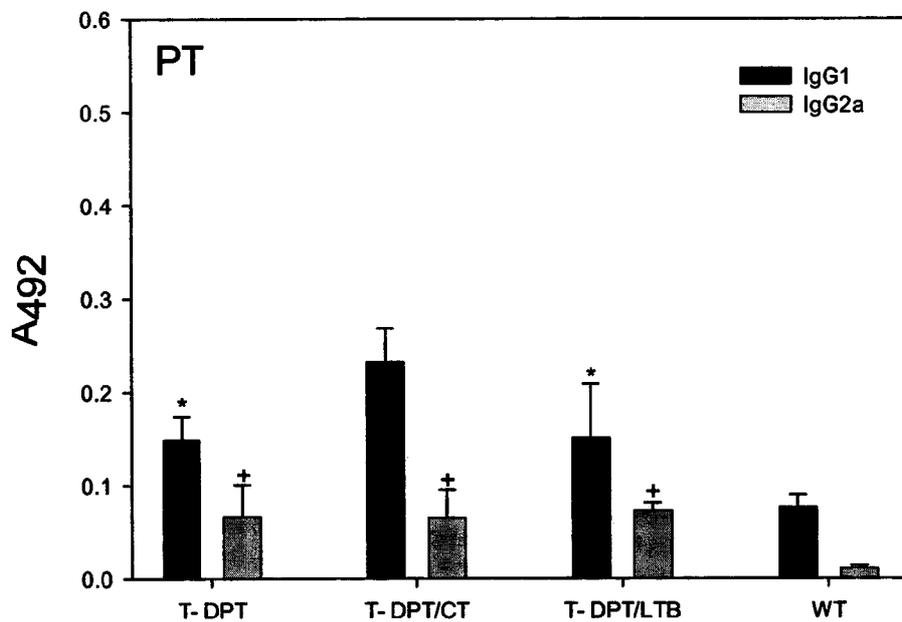


Figura 14

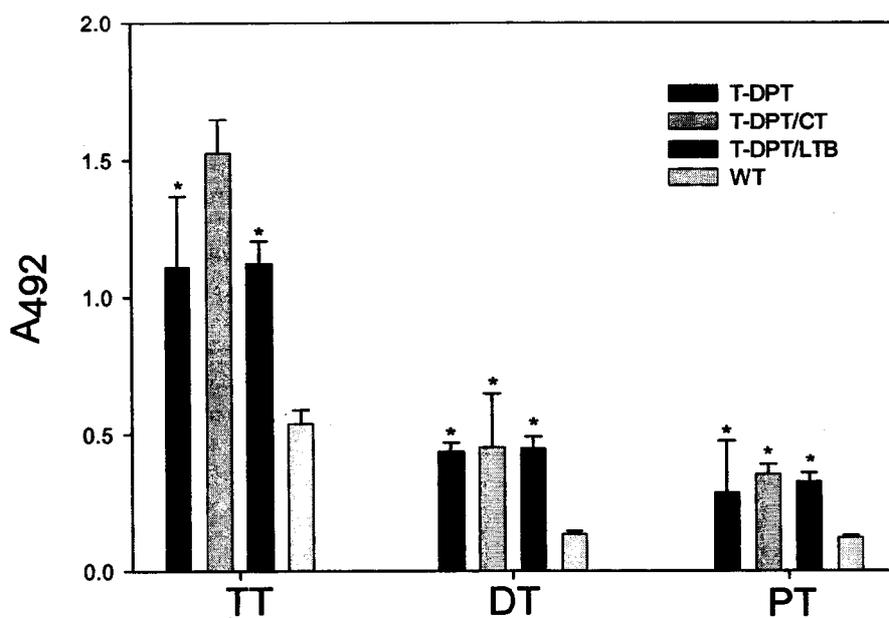


Figura 15

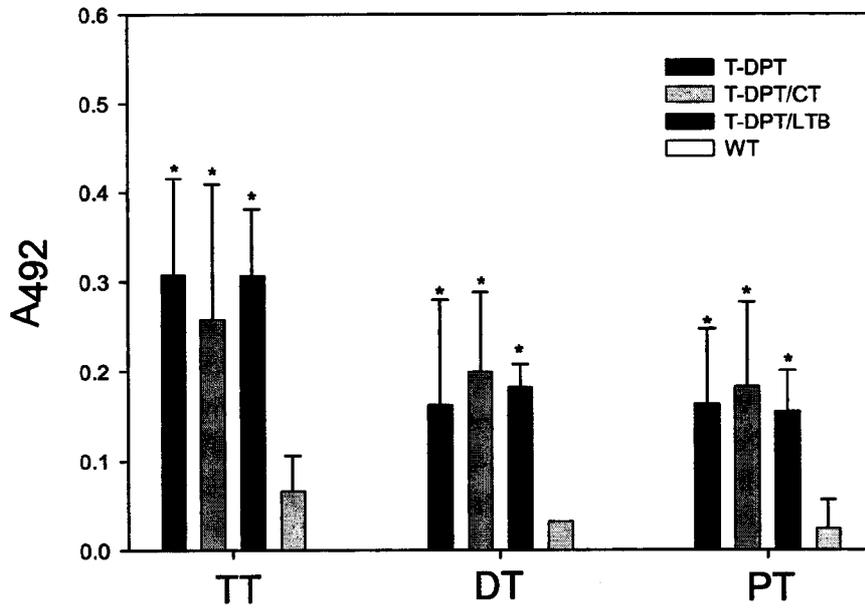


Figura 16

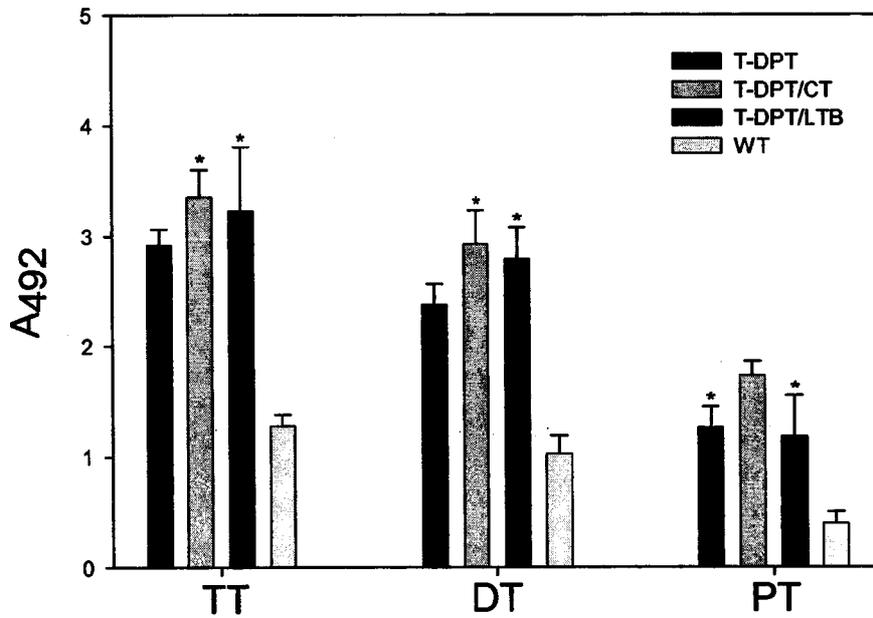




Figura 17

