

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-537287

(P2004-537287A)

(43) 公表日 平成16年12月16日(2004.12.16)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 B O 3 O
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00	4 B O 1 8
A 2 3 L 1/305	A 2 3 L 1/305	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/78	A 6 1 K 35/78	H 4 B O 6 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 35/78	J 4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 196 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-580877 (P2002-580877)
 (86) (22) 出願日 平成14年4月12日 (2002. 4. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年10月14日 (2003. 10. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/011693
 (87) 国際公開番号 W02002/083072
 (87) 国際公開日 平成14年10月24日 (2002. 10. 24)
 (31) 優先権主張番号 60/283, 884
 (32) 優先日 平成13年4月13日 (2001. 4. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 302069675
 ボイス トンプソン インステイテュート
 フォア プラント リサーチ
 アメリカ合衆国 1 4 8 5 3 - 1 8 0 1
 ニューヨーク州 イサカ タワー ロード
 (番地なし)
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定なトランスジェニック植物医薬品の作製方法および組成物ならびに避妊薬としてのその使用

(57) 【要約】

本発明は、植物中で発現する医薬品タンパク質を保存する処理方法を提供する。本発明では未処理植物組織をタンパク質または薬学的有効性を顕著に喪失することなく安定なホモジネートにする。ホモジネートを、医薬品タンパク質をさらに抽出、精製、または沈殿させることなく薬学的目的に直接使用することができる。本発明は、さらに、動物およびヒトへの適用のための有効な免疫避妊方法を提供する。避妊タンパク質を発現し、処理後にその全部（一部）を動物に送達させて標的種で避妊効果を得ることができるトランスジェニック植物または植物細胞の作製方法を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a. 完全なまたは分割したトランスジェニック植物材料を得るステップと、
- b. 前記トランスジェニック植物材料を脱水するステップと、
- c. 前記トランスジェニック植物材料を前記脱水ステップの前後に混合してホモジネートにするステップと

を含み、異種タンパク質を発現するトランスジェニック植物の安定な乾燥ホモジネートが産生される、異種タンパク質を発現するトランスジェニック植物の安定な乾燥ホモジネートの産生方法。

【請求項 2】

前記脱水を、前記材料の凍結乾燥、風乾、または噴霧乾燥によって行う、請求項 1 の方法。

10

【請求項 3】

前記混合ステップの前に脱水された材料を分割するステップをさらに含む、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

賦形剤を添加するステップをさらに含む、請求項 1 の方法。

【請求項 5】

請求項 1 の安定な乾燥ホモジネート。

【請求項 6】

前記異種タンパク質が、抗原または抗体からなる群から選択される、請求項 5 の安定な乾燥ホモジネート。

20

【請求項 7】

トランスジェニックタンパク質を含む脱水されたトランスジェニック植物材料を含む、安定な乾燥ホモジネート。

【請求項 8】

薬学的に許容可能なキャリアと混合されている、請求項 7 の安定な乾燥ホモジネートを含む医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 8 の医薬組成物を投与するステップを含む、動物の疾患の予防方法。

30

【請求項 10】

請求項 8 の医薬組成物を動物に投与するステップを含む、トランスジェニックタンパク質を動物に送達する方法。

【請求項 11】

前記トランスジェニックタンパク質がワクチンである、請求項 10 の方法。

【請求項 12】

避妊ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック植物材料を動物に投与するステップを含み、前記投与により前記動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも 50% 減少する、避妊方法。

【請求項 13】

避妊誘導有効量の避妊ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック植物材料を動物に投与するステップを含み、前記投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導される、避妊方法。

40

【請求項 14】

避妊ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック植物材料を動物に投与するステップを含む避妊方法であって、前記核酸は植物染色体に組み込まれていて、前記避妊方法により前記トランスジェニック植物材料を投与した前記動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも 50% 減少する、避妊方法。

【請求項 15】

避妊誘導有効量の避妊ポリペプチドをコードする核酸分子を含む食用トランスジェニック

50

植物材料を動物に投与するステップを含む避妊方法であって、前記核酸が植物染色体に組み込まれ、前記投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導される、避妊方法。

【請求項 16】

前記トランスジェニック植物材料が、葉、根、芽、茎、果実、塊茎、花、および種子からなる群から選択される、請求項 1、2、3、または 4 の方法。

【請求項 17】

前記トランスジェニック植物材料が食用である、請求項 1、2、3、または 4 の方法。

【請求項 18】

前記核酸によってコードされる避妊ポリペプチドが、透明帯糖タンパク質、GnRH、LHRH、LH、LDH、および抗精子抗原からなる群から選択される、請求項 1、2、3、または 4 の方法。 10

【請求項 19】

前記透明帯糖タンパク質が、ZP1、ZP2、ZP3、およびZP4からなる群から選択される、請求項 7 の方法。

【請求項 20】

前記透明帯糖タンパク質がZP3である、請求項 7 の方法。

【請求項 21】

前記避妊タンパク質が種特異的である、請求項 1、2、3、または 4 の方法。

【請求項 22】

前記避妊タンパク質をコードする前記核酸が、粘膜標的タンパク質をコードする配列をさらに含む、請求項 1、2、3、または 4 の方法。 20

【請求項 23】

前記粘膜標的タンパク質が、大腸菌エンテロトキシンサブユニットBである、請求項 11 の方法。

【請求項 24】

前記トランスジェニック植物材料を植物体全体として投与する、請求項 1、2、3、または 4 の方法。

【請求項 25】

前記トランスジェニック植物材料を粘膜送達によって投与する、請求項 1、2、3、または 4 の方法。 30

【請求項 26】

前記粘膜投与が、経口、鼻腔、または眼への送達である、請求項 14 の方法。

【請求項 27】

避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジェニック植物材料を動物に投与するステップを含み、前記投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記投与により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%減少する、粘膜免疫応答の誘導方法。

【請求項 28】

前記トランスジェニック植物材料が、葉、根、芽、茎、果実、塊茎、花、および種子からなる群から選択される、請求項 16 の方法。 40

【請求項 29】

前記トランスジェニック植物材料が食用植物の形態である、請求項 16 の方法。

【請求項 30】

前記核酸によってコードされる避妊ポリペプチドが、透明帯糖タンパク質、GnRH、LHRH、LH、LDH、および抗精子抗原からなる群から選択される、請求項 15 または 16 の方法。

【請求項 31】

前記透明帯糖タンパク質が、ZP1、ZP2、ZP3、およびZP4からなる群から選択される、請求項 19 の方法。 50

【請求項 3 2】

前記透明帯糖タンパク質が Z P 3 である、請求項 1 9 の方法。

【請求項 3 3】

前記避妊タンパク質が種特異的である、請求項 1 9 の方法。

【請求項 3 4】

前記避妊ポリペプチドをコードする核酸が、粘膜標的タンパク質をさらにコードする、請求項 1 6 の方法。

【請求項 3 5】

前記粘膜標的タンパク質が、大腸菌エンテロトキシンサブユニット B である、請求項 2 3 の方法。

【請求項 3 6】

トランスジェニック植物材料の動物への投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記投与により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも 5 0 % 減少する、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を発現するトランスジェニック植物材料を含むトランスジェニック植物。

【請求項 3 7】

避妊ポリペプチドをコードする核酸配列がウイルス粒子上では発現されず、前記トランスジェニック植物材料の動物への投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導される、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を発現するトランスジェニック植物材料を含むトランスジェニック植物。

【請求項 3 8】

投与により前記トランスジェニック植物材料を投与した動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも 5 0 % 減少する、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を発現するトランスジェニック植物材料を含むトランスジェニック植物。

【請求項 3 9】

トランスジェニック植物材料の動物への投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記核酸が植物染色体に組み込まれる、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を発現するトランスジェニック植物材料を含む食用トランスジェニック植物。

【請求項 4 0】

前記避妊ポリペプチドが、透明帯糖タンパク質、G n R H、L H R H、L H、L D H、および抗精子抗原からなる群から選択される、請求項 2 5、2 6、2 7、または 2 8 のトランスジェニック植物。

【請求項 4 1】

前記透明帯糖タンパク質が、Z P 1、Z P 2、Z P 3、および Z P 4 からなる群から選択される、請求項 2 9 のトランスジェニック植物。

【請求項 4 2】

前記透明帯糖タンパク質またはそのフラグメントが種特異的である、請求項 2 9 のトランスジェニック植物。

【請求項 4 3】

前記透明帯糖タンパク質が Z P 3 またはそのフラグメントである、請求項 2 9 のトランスジェニック植物。

【請求項 4 4】

前記核酸配列が、粘膜標的タンパク質をさらにコードする、請求項 2 5、2 6、2 7、または 2 8 のトランスジェニック植物。

【請求項 4 5】

前記粘膜標的タンパク質が、大腸菌エンテロトキシンサブユニット B である、請求項 3 3 のトランスジェニック植物。

【請求項 4 6】

前記植物が単子葉植物である、請求項 2 5、2 6、2 7、または 2 8 のトランスジェニック

10

20

30

40

50

ク植物。

【請求項 47】

前記植物が双子葉植物である、請求項 25、26、27、または 28 のトランスジェニック植物。

【請求項 48】

前記植物が、トマト植物、イネ植物、小麦植物、トウモロコシ植物、ニンジン植物、ジャガイモ植物、リンゴ植物、ダイズ植物、アルファルファ植物、ウマゴヤシ属 (medicago) 植物、食用野菜植物、および果実植物からなる群から選択される、請求項 25、26、27、または 28 のトランスジェニック植物。

【請求項 49】

核酸ベクターが避妊ポリペプチドをコードし、前記核酸ベクターが前記植物細胞の染色体に組み込まれて発現し、前記植物細胞の動物への投与により前記動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも 50% 減少する、核酸ベクターを含む植物細胞。

10

【請求項 50】

前記核酸ベクターによってコードされる避妊ポリペプチドが、透明帯糖タンパク質、GnRH、LH、LDH、および抗精子抗原からなる群から選択される、請求項 38 に記載の植物細胞。

【請求項 51】

前記透明帯糖タンパク質が、ZP1、ZP2、ZP3、および ZP4 からなる群から選択される、請求項 39 の植物細胞。

20

【請求項 52】

前記避妊ポリペプチドが種特異的である、請求項 38 の植物細胞。

【請求項 53】

前記透明帯糖タンパク質が ZP3 である、請求項 40 の植物細胞。

【請求項 54】

前記核酸ベクターが、粘膜標的タンパク質をさらにコードする、請求項 38 の植物細胞。

【請求項 55】

前記粘膜標的タンパク質が、大腸菌エンテロトキシンサブユニット B である、請求項 43 の植物細胞。

【請求項 56】

前記植物細胞が単子葉植物から得られる、請求項 38 の植物細胞。

30

【請求項 57】

前記植物細胞が双子葉植物から得られる、請求項 38 の植物細胞。

【請求項 58】

前記植物細胞が、トマト植物細胞、イネ植物細胞、小麦植物細胞、トウモロコシ植物細胞、ニンジン植物細胞、ジャガイモ植物細胞、リンゴ植物細胞、ダイズ植物細胞、食用野菜植物細胞、および果実植物細胞からなる群から選択される、請求項 38 の植物細胞。

【請求項 59】

避妊ポリペプチドをコードする核酸配列と、植物細胞中の避妊ポリペプチドの合成を指示することができる、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結された植物機能性プロモーターとを含み、前記プラスミドベクターを含む植物細胞を動物に投与することにより、動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記投与により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも 50% 減少する、植物細胞を形質転換するためのプラスミドベクター。

40

【請求項 60】

前記核酸配列によってコードされる避妊ポリペプチドが、透明帯糖タンパク質、GnRH、LHRH、LH、LDH、および抗精子抗原からなる群から選択される、請求項 48 のプラスミドベクター。

【請求項 61】

前記透明帯糖タンパク質が、ZP1、ZP2、ZP3、および ZP4 からなる群から選択

50

される、請求項 49 のプラスミドベクター。

【請求項 62】

前記植物細胞が食用植物から得られる、請求項 48 のプラスミドベクター。

【請求項 63】

粘膜標的タンパク質をコードする核酸配列をさらに含む、請求項 48 のプラスミドベクター。

【請求項 64】

前記粘膜標的タンパク質が、大腸菌エンテロトキシンサブユニット B である、請求項 52 のプラスミドベクター。

【請求項 65】

動物が摂取することができる請求項 25、26、27、または 28 のトランスジェニック植物の少なくとも一部を含み、前記摂取により動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記摂取により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも 50% 減少する、食品組成物。

【請求項 66】

請求項 25、26、27、または 28 のトランスジェニック植物の少なくとも一部が、前記トランスジェニック植物の果実、葉、根、芽、茎、塊茎、および種子からなる群から選択される、請求項 54 に記載の食品。

【請求項 67】

請求項 25、26、27、または 28 のトランスジェニック植物の少なくとも一部と、薬学的に許容可能なキャリアとを含み、前記医薬組成物の動物への投与により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも 50% 減少する、医薬組成物。

【請求項 68】

前記請求項 25、26、27、または 28 のトランスジェニック植物の少なくとも一部が、前記植物の果実、葉、根、茎、塊茎、および種子からなる群から選択される、請求項 56 の医薬組成物。

【請求項 69】

投与により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも 50% 減少する、動物への経口投与用に処理したトランスジェニック植物材料を含む混合物中にサポニンアジュバントを含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明は、トランスジェニック植物由来のワクチン、抗体、または他の治療化合物などの薬学的に活性なタンパク質を産生するための処理技術ならびに免疫避妊のためのヒトおよび動物への投与、疾患に対するワクチン接種、または他の免疫反応性化合物の感染に対する治療に関する。植物ベースのワクチンの開発は、ヒトおよび動物のワクチン接種に利用可能なアプローチを有意に進歩させた。ワクチン、抗体、ならびに他のヒトおよび動物治療の開発のためのトランスジェニック植物の使用により、治療タンパク質産生の有効性を増大させるだけでなく、初期産生費用を実質的に減少させた。

【背景技術】

【0002】

植物ベースのワクチンの産生に関して、トランスジェニック植物におけるタンパク質発現が有意に進歩した。例えば、米国特許第 5,679,880 号、同第 5,484,719 号、同第 5,686,079 号、および米国特許出願 2002/0006411 号に記載のように、種々の発現形態、凝集体、または融合物を使用して、ワクチンサブユニット、抗体、および治療または避妊タンパク質の産生が増大されている。しかし、トランスジェニック植物ワクチンテクノロジーの現在の状況では、トランスジェニック植物材料から医薬品タンパク質を精製して取り出すか、画一の未処理粗植物組織を消費することが依然として必要である。不運なことに、投与可能な植物由来の医薬品産生のためのこれらの選択

10

20

30

40

50

肢は、固有の欠点を有する。

【0003】

好ましい植物由来の医薬品は、経口投与することができる標準化植物組織である。より詳細には、植物材料を周囲温度で保存、輸送、および投与することができるのが好ましい。しかし、非精製トランスジェニック植物ベースのワクチンは、以下の固有の問題を有する。i) 植物によってタンパク質発現レベルが変化すること、およびii) 腐敗性(すなわち、タンパク質分解)。果実、塊茎、根、葉、または任意の他の植物組織などの新たに採取した産物は、従来の薬学的要件と比較してその比較的短い貯蔵寿命に制限される。さらに、異なる植物、クローン、または植物組織の間で見出されるトランスジェニックタンパク質の蓄積レベルの変動により薬学的適用で必須である用量の一貫性の達成が非常に困難である。

10

【0004】

従来の薬学的テクノロジーにより、医薬品タンパク質の抽出、精製、および濃縮方法が得られるが、これは高価であり、精製生成物を冷蔵する必要がある、植物細胞自体によってトランスジェニックタンパク質の保護的封入が不可能である。従って、植物によって異なるタンパク質発現の欠点を回避し、元の植物材料からさらに精製する必要のない安定なトランスジェニック植物ベースの医薬品の産生方法が当分野で必要である。本明細書中に記載の処理方法により、広範な種々の適用にわたって使用することができる室温で安定且つ均一な処方物の産生手段が得られる。さらに、環境に対して安定なホモジネートを固有にプールし、バッチベースでバッチの品質管理試験を行うことができる。さらに、記載されたトランスジェニック処理方法により、広範な薬学的処方物を有効且つ費用効果的に産生することができる処理全体にわたってアジュバント、緩衝液、抗酸化剤、安定剤、または抗原粉末を都合よく添加することが可能である。安定な乾燥ホモジネートを、ワクチン接種および疾患治療に使用することができるだけでなく、受精の防止にも使用することができる。

20

【0005】

受精は、精子と卵の表面上での重要な調節分子間の複雑な相互作用である。これらの分子が生殖過程で果たす極めて重要な役割は、哺乳動物種の受胎能の制御をターゲットとできると思われる。

【0006】

全ての哺乳動物の卵は、透明帯(卵の精子受容体を提供する3つの糖タンパク質(ZP1、ZP2、およびZP3)から構成される比較的単純な被覆)で囲まれている。いくつかの非哺乳動物種の透明帯もまた、第4の糖タンパク質(ZP4)を含む。透明帯の糖タンパク質成分は、マウスで十分に定義されている受精および初期発達の際に特定の機能を果たす。ZP1は、ZP2およびZP3のフィラメントと架橋する構造タンパク質である。受精時に、精子は最初にZP3と結合し、精子アクロソーム反応を誘導する。アクロソームの誘導後、ZP2は、精子の透明帯の貫通に必要な第2の精子受容体として作用する。受精後、ZP2のタンパク質分解およびZP3の修飾は、多精阻止に関与すると考えられる。

30

【0007】

受精時の透明帯の重要な役割、卵母細胞の成長におけるその固有の発現、および強力な免疫原性により、透明帯は免疫避妊ワクチンの開発のための魅力的な標的となっている(Epifano and Dean Reprod Fertl Dev、1994、6、319に概説されている)。透明帯の組織全体または構成要素の免疫化により、霊長類、ウサギ、げっ歯類、およびイヌを含むいくつかの種で受精が阻害されることが示されている(Prasadら、1996、J. Reprod Fertl Suppl、50、143に概説されている)。これらの引例に記載の組成物は受精を阻害できる一方で、ダーティングまたは注射により非経口投与しなければならない、したがって、経済的で広範に使用するには実用的ではない。これらの引例に記載の組成物は、本発明と対照的に、摂取用の未処理の餌(すなわち、食物)または処理材料として有効に経口投与すること

40

50

ができない。

【0008】

Fitchenら(1995、Vaccine、13、1051)は、注射による標的またはモデル動物種に精製送達するための植物中の避妊タンパク質の産生を試みた。この例では、タバコモザイクウイルス(TMV)外殻タンパク質配列内でマウスZP3エピトープを操作し、TMV感染時にタバコ中で発現させた。ウイルス粒子(ウイルスの外表面上のZPエピトープを表示する)を、非経口投与のために植物材料から疎精製した。しかし、ウイルス粒子は、マウスモデルの産仔数の減少に有効ではなかった。Fitchenらは、動物の避妊の誘導方法や経口投与によって平均産仔数が少なくとも50%減少するトランスジェニック植物の動物への経口投与方法については言及していない。

10

【0009】

摂取用の未処理の餌または食品として動物に好適に経口投与することができ、投与した動物の産仔数が有意に減少する植物組成物が当分野で必要とされている。発現のための植物ウイルスの使用を回避することが当分野で必要である。従って、植物細胞自体によって直接的に避妊タンパク質を発現し、それにより動物による植物材料の消費の際に粘膜免疫応答が得られることが当分野で必要である。

【0010】

推定人口が60億人の水準を越えて拡大するにつれて、先進国の環境活動によって他の野生動物種の個体数の分布が重大に影響を受けつつけている。20世紀の間に、人類の陸地および水資源の使用は、動物種の個体群動態によりいっそう深刻な影響を与えた。世界自然保護基金は、現在、今後20年以内に世界の1/3もの種が絶滅し得ると予測している。特定の動植物集団の減少による絶滅または生命にかかわる危機に加えて、特定の種の過剰な増加もまた現代人類に影響を受けている。特定の例として、草食動物の生存は、時代を超えて、地理的封じ込め、天敵、気候条件、および食物の利用可能性などの自然力によって利用されている。多すぎて列挙できないが、影響のうち、工業世界は、農業および建築のために森林を伐採し、肉食動物の個体数および天然の範囲を減少させ、地理的障壁を越えて種を導入し、気候極限に対して不自然なシェルターを作製し、動物の権利および人間の利害が対立する文化を生み出した。現在、過剰な草食動物がヒトとの共存および農業生産と直接的に対立している哺乳動物の例が存在する。種々の理由のために、これらの哺乳動物種の個体数抑制が達成できなくなり、代替方法を探されている。

20

30

【0011】

従って、動物種の無計画な増殖に起因する経済的、環境的、または動物の繁栄に対する損害を緩和するための人道的な人口管理技術の開発が必要である。さらに、効率的かつ費用効果的に作製することができる処方物を使用してこれを行うことが必要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、トランスジェニック植物生物医薬品の作製方法を提供する。本明細書中に記載の方法により、室温で安定であり、均一で、薬学的に強力な乾燥トランスジェニック植物材料を産生可能である。一般に、完全な(intact)または分割した(partitioned)トランスジェニック植物のいずれかを、当分野で公知の食物処理技術によって乾燥または凍結乾燥させる。医薬品タンパク質をさらに抽出、精製、または沈殿させることなく、生物医薬品生成物を含む乾燥ホモジネートを治療に使用することができる。安定な乾燥ホモジネートを、ワクチン接種、疾患の治療、および避妊薬として使用することができる。本発明は、さらに、受精および繁殖力を制御するための安全且つ有効なワクチンを提供する。したがって、本発明は、当分野の安定な植物ベースの医薬品の有効な作製方法の要求ならびに家畜、フィードロット種、捕獲動物標本、鳥獣保護区の個体、およびヒトの便利で費用効果のある個体数抑制方法の要求に応えるものである。

40

【0013】

本明細書中に記載の植物ベースの医薬品の産生および使用方法を開示する。

50

【0014】

本発明は、i)完全なまたは分割したトランスジェニック植物材料を得るステップと、ii)前記トランスジェニック植物材料を脱水するステップと、およびiii)前記トランスジェニック植物材料を前記脱水ステップの前後に混合してホモジネートにするステップとを含み、それにより異種医薬品タンパク質を発現するトランスジェニック植物の安定な乾燥ホモジネートが作製される、異種タンパク質を発現するトランスジェニック植物の安定な乾燥ホモジネートの作製方法を提供する。

【0015】

1つの実施形態では、脱水を、前記材料の凍結乾燥、風乾、または噴霧乾燥によって行う。

10

【0016】

別の実施形態では、前記方法は、混合ステップの前に脱水材料を分割するステップをさらに含む。

【0017】

なおさらなる実施形態では、前記方法は、賦形剤を添加するステップをさらに含む。

【0018】

本発明は、さらに、上記方法によって作製された安定な乾燥ホモジネートを提供する。

【0019】

1つの実施形態では、安定な乾燥ホモジネートは抗原または抗体を含む。

【0020】

本発明は、トランスジェニックタンパク質を含む脱水トランスジェニック植物材料を含む安定な乾燥ホモジネートを提供する。

20

【0021】

本発明は、さらに、薬学的に許容可能なキャリアと混合したトランスジェニックタンパク質を任意選択的に含む、脱水トランスジェニック植物材料を含む安定な乾燥ホモジネートを提供する。

【0022】

本発明は、さらに、薬学的に許容可能なキャリアと混合したトランスジェニックタンパク質を任意選択的に含む、脱水トランスジェニック植物材料を含む安定な乾燥ホモジネートを含む医薬組成物を投与するステップを含む、動物の疾患の予防方法を提供する。

30

【0023】

本発明はまた、薬学的に許容可能なキャリアと混合したトランスジェニックタンパク質を任意選択的に含む、脱水トランスジェニック植物材料を含む安定な乾燥ホモジネートを含む医薬組成物を動物に投与するステップを含む、動物にトランスジェニックタンパク質を送達する方法を提供する。

【0024】

1つの実施形態では、安定な乾燥ホモジネート中に存在するトランスジェニックタンパク質はワクチンである。

【0025】

本発明は、さらに、トランスジェニック植物ベースの医薬品を使用した避妊方法を提供する。

40

【0026】

本発明は、ウイルス中間体の非存在下での避妊タンパク質の植物染色体発現を使用する。

【0027】

本発明は、避妊ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック植物材料を動物に投与するステップを含み、および前記投与により前記動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%減少する避妊方法を提供する。

【0028】

本発明はまた、避妊誘導有効量の避妊ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック植物材料を動物に投与するステップを含み、および前記投与により前記避妊タ

50

ンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導される避妊方法を提供する。

【0029】

本発明は、さらに、避妊ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック植物材料を動物に投与するステップと、前記核酸が植物染色体に組み込まれるステップを含み、前記避妊方法により前記トランスジェニック植物材料を投与した前記動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%減少する避妊方法を提供する。

【0030】

本発明は、さらに、避妊誘導有効量の避妊ペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック植物材料を動物に投与するステップと、前記核酸が植物染色体に組み込まれ、前記避妊方法により前記トランスジェニック植物材料を投与した前記動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%減少する避妊方法を提供する。

10

【0031】

好ましい実施形態では、トランスジェニック植物材料は、葉、根、芽 (shoot)、茎、果実、塊茎、花、および種子からなる群から選択される。

【0032】

さらに好ましい実施形態では、トランスジェニック植物材料は食用である。

【0033】

別の好ましい実施形態では、核酸によってコードされる避妊ポリペプチドは、透明帯糖タンパク質、GnRH、LHRH、LH、LDH、および抗精子抗原からなる群から選択される。

20

【0034】

より好ましい実施形態では、透明帯糖タンパク質は、ZP1、ZP2、ZP3、およびZP4からなる群から選択される。

【0035】

より好ましい実施形態では、透明帯糖タンパク質は、ZP3である。

【0036】

好ましい実施形態では、避妊タンパク質は、種特異的である。

【0037】

別の好ましい実施形態では、避妊タンパク質をコードする核酸は、粘膜標的タンパク質をコードする配列をさらに含む。

30

【0038】

より好ましい実施形態では、粘膜標的タンパク質は、大腸菌エンテロトキシンサブユニットBである。

【0039】

別の好ましい実施形態では、トランスジェニック植物材料を完全な植物として投与する。

【0040】

別の好ましい実施形態では、トランスジェニック植物材料を粘膜送達によって投与する。

【0041】

さらに別の好ましい実施形態では、粘膜投与は、経口、鼻腔、または眼への送達である。

【0042】

40

本発明は、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を含むトランスジェニック植物材料を動物に投与するステップを含み、前記投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記投与により動物の繁殖周期あたりの平均出生が数少なくとも50%減少する、粘膜免疫応答の誘導方法を提供する。

【0043】

好ましい実施形態では、トランスジェニック植物材料は、葉、根、芽、茎、果実、塊茎、花、および種子からなる群から選択される。

【0044】

別の好ましい実施形態では、トランスジェニック植物材料が食用植物の形態である。

【0045】

50

さらに別の実施形態では、核酸によってコードされる避妊ポリペプチドは、透明帯糖タンパク質、GnRH、LHRH、LH、LDH、および抗精子抗原からなる群から選択される。

【0046】

好ましい実施形態では、透明帯糖タンパク質は、ZP1、ZP2、ZP3、およびZP4からなる群から選択される。

【0047】

さらに好ましい実施形態では、透明帯糖タンパク質は、ZP3である。

【0048】

別の実施形態では、避妊タンパク質は、種特異的である。

10

【0049】

別の好ましい実施形態では、避妊ポリペプチドをコードする核酸は、粘膜標的タンパク質をさらにコードする。

【0050】

さらに好ましい実施形態では、粘膜標的タンパク質は、大腸菌エンテロトキシンサブユニットBである。

【0051】

本発明は、トランスジェニック植物材料の動物への投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記投与により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%減少する、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を発現するトランスジェニック植物材料を含むトランスジェニック植物を提供する。

20

【0052】

本発明はまた、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列がウイルス粒子上に発現されず、前記トランスジェニック植物材料の動物への投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導される、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を発現するトランスジェニック植物材料を含むトランスジェニック植物を提供する。

【0053】

本発明は、さらに、投与により前記トランスジェニック植物材料を投与した動物による繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%減少する、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を発現するトランスジェニック植物材料を含むトランスジェニック植物を提供する。

30

【0054】

本発明は、さらに、トランスジェニック植物材料の動物への投与により前記避妊タンパク質に対する前記動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記核酸が植物染色体に組み込まれる、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列を発現するトランスジェニック植物材料を含む食用トランスジェニック植物を提供する。

【0055】

1つの実施形態では、避妊ポリペプチドは、透明帯糖タンパク質、GnRH、LHRH、LH、LDH、および抗精子抗原からなる群から選択される。

【0056】

好ましい実施形態では、透明帯糖タンパク質は、ZP1、ZP2、ZP3、およびZP4からなる群から選択される。

40

【0057】

より好ましい実施形態では、透明帯糖タンパク質またはそのフラグメントは、種特異的である。

【0058】

別のより好ましい実施形態では、透明帯糖タンパク質は、ZP3またはそのフラグメントである。

【0059】

1つの実施形態では、核酸配列は、粘膜標的タンパク質をさらにコードする。

50

【0060】

好ましい実施形態では、粘膜標的タンパク質は、大腸菌エンテロトキシンサブユニットBである。

【0061】

別の好ましい実施形態では、植物は、単子葉植物である。

【0062】

さらに別の好ましい実施形態では、植物は、双子葉植物である。

【0063】

さらに別の好ましい実施形態では、植物は、トマト植物、イネ植物、小麦植物、トウモロコシ植物、ニンジン植物、ジャガイモ植物、リンゴ植物、ダイズ植物、アルファルファ植物、ウマゴヤシ属(medicago)植物、食用野菜植物、および果実植物からなる群から選択される。 10

【0064】

本発明は、核酸ベクターが避妊ポリペプチドをコードし、前記核酸ベクターが前記植物細胞の染色体に組み込まれて発現し、前記植物細胞の動物への投与により前記動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%減少する、核酸ベクターを含む植物細胞を提供する。

【0065】

1つの実施形態では、核酸ベクターによってコードされる避妊ポリペプチドは、透明帯糖タンパク質、GnRH、LHRH、LH、LDH、および抗精子抗原からなる群から選択される。 20

【0066】

さらなる実施形態では、透明帯糖タンパク質は、ZP1、ZP2、ZP3、およびZP4からなる群から選択される。

【0067】

なおさらなる実施形態では、避妊ポリペプチドは、種特異的である。

【0068】

好ましい実施形態では、透明帯糖タンパク質は、ZP3である。

【0069】

1つの実施形態では、核酸ベクターは、粘膜標的タンパク質をさらにコードする。 30

【0070】

好ましい実施形態では、粘膜標的タンパク質は、大腸菌エンテロトキシンサブユニットBである。

【0071】

1つの実施形態では、植物細胞は、単子葉植物から得られる。

【0072】

1つの実施形態では、植物細胞は、双子葉植物から得られる。

【0073】

好ましい実施形態では、植物細胞は、トマト植物細胞、イネ植物細胞、小麦植物細胞、トウモロコシ植物細胞、ニンジン植物細胞、ジャガイモ植物細胞、リンゴ植物細胞、ダイズ植物細胞、食用野菜植物細胞、および果実植物細胞からなる群から選択される。 40

【0074】

本発明は、さらに、避妊ポリペプチドをコードする核酸配列と、植物細胞中の避妊ポリペプチドの合成を指示することができる避妊ポリペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結された植物機能性プロモーターとを含み、前記プラスミドベクターを含む植物細胞の動物への投与により動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記投与により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%に減少する、植物細胞を形質転換するためのプラスミドベクターを提供する。

【0075】

1つの実施形態では、核酸配列によってコードされる避妊ポリペプチドは、透明帯糖タン 50

パク質、GnRH、LHRH、LH、LDH、および抗精子抗原からなる群から選択される。

【0076】

好ましい実施形態では、透明帯糖タンパク質は、ZP1、ZP2、ZP3、およびZP4からなる群から選択される。

【0077】

さらなる実施形態では、植物細胞は、食用植物から得られる。

【0078】

1つの実施形態では、プラスミドベクターは、粘膜標的タンパク質をコードする核酸配列をさらに含む。

【0079】

好ましい実施形態では、粘膜標的タンパク質は、大腸菌エンテロトキシンサブユニットBである。

【0080】

本発明は、さらに、動物が摂取することができる上記のトランスジェニック植物の少なくとも一部を含み、前記トランスジェニック植物の摂取により動物の粘膜免疫応答が誘導され、前記摂取により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%減少する、食品組成物を提供する。

【0081】

本発明は、さらに、薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせた上記のトランスジェニック植物の少なくとも一部を含み、前記医薬組成物の動物への投与により動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも50%減少する、医薬組成物を提供する。

【0082】

本発明は、さらに、組成物の投与により動物の繁殖周期あたりの出生数が少なくとも50%減少する、動物への経口投与用に処理したトランスジェニック植物材料を含む混合物中にサポニンアジュバントを含む組成物を提供する。

【0083】

本明細書中で使用される、「避妊薬」は、避妊のために使用される薬剤をいう。「避妊」は、1繁殖周期あたりの動物の出生数の減少または有性生殖における精子による卵母細胞の受精阻止と定義する。受精の「阻止」を、「避妊薬」が下記のように投与された雌動物の出生数の減少によって確認することができる。本明細書中で使用される、「避妊薬」は、最低でも1繁殖周期における記載の受精の減少もしくは受精阻止、または接合子着床の防止をいう。

【0084】

本明細書中で使用される、「有性生殖」は、哺乳動物のための唯一の生殖形態をいう。これは、生殖細胞（配偶子：雌では卵および雄では精子）の一方のタイプが、他方のタイプと受精して、新しい細胞（接合子と呼ばれる）を産生して、新しい生物を発生させることを含む。雌または雄の生殖器官で卵（複数の卵）または精子が産生される。精子が卵と受精した後、1回の有性生殖過程において、通常、受精卵を保有する雌は、子孫が再生する（誕生する）までより成熟した卵を産生することができない。

【0085】

本明細書中で使用される、1「繁殖周期」は、次の生殖を行うことができる前の成熟卵の受精および子孫の誕生を含む有性生殖の1回の過程をいう。本発明の1「繁殖周期」はまた、別の方法で起こり得る避妊によって遮断された潜在的な1回の生殖過程をいう。

【0086】

本明細書中で使用される、「避妊タンパク質」は、繁殖周期あたり動物の出生数を減少させるポリペプチドまたはポリペプチドのフラグメントをいう。同腹子の平均出生数が3匹以上である動物種では、「避妊タンパク質」は、産仔数を少なくとも60%、70%、80%、90%、さらに100%まで減少させるポリペプチドである。同腹子の平均出生数が1匹または2匹である動物種では、「避妊タンパク質」は、産仔数を少なくとも50%

10

20

30

40

50

(すなわち、2匹から1匹に減少)および100%まで(すなわち、1匹または2匹から0匹に減少)減少させるタンパク質またはポリペプチドをいう。あるいは、「避妊タンパク質」は、精子による卵母細胞の受精を防止するか、受精卵の動物の子宮への着床を妨げることににより平均産仔数が上記のように減少するポリペプチドをいうことができる。あるいは、「避妊タンパク質」は、動物の粘膜免疫応答を刺激することができ、免疫応答は「避妊タンパク質」に対して惹起するポリペプチドをいう。抗体は、性ホルモン、卵母細胞、または精母細胞上の部位に結合し、性的成熟、卵母細胞の受精、および/または動物の子宮への受精卵母細胞の着床を防止し、それにより産仔数を減少させることができる。本発明で有用な「避妊タンパク質」の例には、透明帯糖タンパク質、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)、黄体形成ホルモン(LH)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、および抗精子抗原が含まれる。「抗精子抗原」には、SP5、SP56、フェルチリン、PH30、LDH-C4、およびP10が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0087】

本明細書中で使用される、「避妊誘導有効量」は、避妊を誘導するトランスジェニック植物材料の量をいう。好ましくは、「避妊誘導有効量」のトランスジェニック植物材料は、産仔数を10%、30%、60%、80%、および100%まで減少させる植物材料の量である。繁殖周期あたりの同腹子の平均出生数が1匹または2匹である動物種では、「避妊有効量」のトランスジェニック植物材料は、産仔数を少なくとも50%および100%まで減少させる植物材料の量をいう。本明細書中で使用される、「避妊誘導有効量」は、重量で1gの乾燥トランスジェニック植物材料あたり少なくとも約5μgの避妊タンパク質、好ましくは1gの乾燥トランスジェニック植物重量あたり少なくとも10μg、40μg、60μg、80μg、100μg、120μg、140μg、150μg、またはそれ以上の避妊タンパク質であるトランスジェニック植物材料の量をいう。

20

【0088】

本明細書中で使用される、「トランスジェニック植物」は、その細胞が「異種」外来遺伝子を安定に発現し、前記外来遺伝子は植物細胞染色体に組み込まれ、且つウイルスに固有のウイルスベクター配列を保有せず、前記外来遺伝子は植物の次の世代に継承されて宿主植物細胞染色体から発現することができる植物をいう。「トランスジェニック植物」は、「複数のトランスジェニック細胞」を含む。「トランスジェニック植物」は、完全な植物、またはその一部(根、茎、葉、柄、種子、果実、塊茎、花、および花粉などが含まれるが、これらに限定されない)をいう。異種外来遺伝子の例には、ノーウォークウイルスキャプシドタンパク質(NVCP)、トリインフルエンザ血球凝集抗原(AIV-HA)、ニューキャッスル病ウイルスフラミニダーゼ(NDV-HN)、透明帯糖タンパク質3(ZP3)、およびB型肝炎表面抗原(HBsAg)が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0089】

本明細書中で使用される、「異種タンパク質」は、「異種遺伝子」から発現したタンパク質をいう。「異種遺伝子」は、最終的に発現される植物内の植物種のゲノム以外の1つまたは複数の供給源から得られるタンパク質をコードする遺伝子または遺伝子フラグメントである。供給源は天然由来のものであり得る(例えば、遺伝子を、細菌、ウイルス、酵母、および真菌などの生命体または異なる植物種の別の供給源から得ることができる)。供給源はまた、合成物であり得る(例えば、遺伝子または遺伝子フラグメントを、化学合成によってインビトロで調製することができる)。「異種」という語を、遺伝子フラグメントの供給源が最終的に発現する植物ゲノムの他の場所に存在する状況でも使用することができる。「異種タンパク質」は、抗原または他の治療タンパク質(エンドスタチンまたはアンギオスタチンなどが含まれるが、これらに限定されない)でもよい。「異種タンパク質」はまた、抗体または抗体複合体(例えば、「プランチボディ」(plantibody))でもよい。「プランチボディ」は、植物中で作製される抗体である。

40

【0090】

50

本明細書中で使用される、「トランスジェニック植物材料」は、本明細書中に定義されているように処理されているトランスジェニック植物または処理されていないトランスジェニック植物をいう。本発明の「トランスジェニック植物材料」は、完全なトランスジェニック植物またはトランスジェニック植物の一部（「トランスジェニック葉」、「トランスジェニック根」、「トランスジェニック芽」、「トランスジェニック莖」、「トランスジェニック果実」、「トランスジェニック塊莖」、「トランスジェニック花」、および「トランスジェニック種子」が含まれるが、これらに限定されない）でもよい。「トランスジェニック植物材料」はまた、1つまたは複数の「トランスジェニック植物細胞」をいう。「トランスジェニック植物細胞」は、外来遺伝子を安定に発現し、前記外来遺伝子は植物細胞染色体に組み込まれ、且つウイルスに固有のウイルスベクター配列を保有せず、前記外来遺伝子は細胞の次の世代に継承されて宿主植物細胞染色体から発現することができる植物細胞をいう。さらに、「トランスジェニック植物材料」は、周知の細胞培養技術（Street、HE、1973、「植物組織および細胞培養：植物モノグラフ」、第II巻、University of California、Berkeley）によって得られる1つまたは複数の「トランスジェニック植物細胞」を含む「トランスジェニック細胞懸濁液」をいう。

10

【0091】

本明細書中で使用される、「完全な」(intact)トランスジェニック植物材料は、例えば、スライス、ダイスカット、カット、または裏ごしされることによって植物のサイズを減少させるような処理を受けていない完全な植物または植物の一部をいう。一般に、植物材料は、収穫した場合、「完全な」であるか「完全」であるが、単純にトランスジェニック植物の一部であり得る。例えば、完全な「トランスジェニック葉」、「トランスジェニック根」、「トランスジェニック芽」、「トランスジェニック莖」、「トランスジェニック果実」、「トランスジェニック塊莖」、「トランスジェニック花」、または「トランスジェニック種子」である。

20

【0092】

本明細書中で使用される、「分割」トランスジェニック植物材料は、当分野で公知の手段によってサイズが減少した「完全な」植物または「完全な」植物の一部をいう。「分割」手段には、角切り、四分分割、みじん切り、薄切り、ダイスカット、裏ごし、またはパルプ化、ミルでひくこと、粉碎、圧縮、または粗砕が含まれるが、これらに限定されない。カットまたはカットしていない加熱または非加熱のトランスジェニック植物材料を、当業者に公知の任意のプロセス（室温で20分までの調理用ブレンダーでの果汁を絞ること、混合、または裏ごしが含まれるが、これらに限定されない）によってパルプ化することができる。パルプ化した植物材料を、薬学的に許容可能でトランスジェニックタンパク質と適合する適切な賦形剤と混合することができる。トランスジェニック植物材料を、微粉末に「分割する」ことができる。

30

【0093】

本明細書中で使用される、「均一化」は、組織ごとの相同なタンパク質量のばらつきを材料の均一なバッチに組み合わせられる、より大きな植物器官の均一な混合物への変形をいう。したがって、用語「均質な」または「ホモジネート」はまた、組織ごとに異なる量の植物タンパク質および/またはトランスジェニックタンパク質を含み得る植物組織が均一な量のこのようなタンパク質を含む材料のバッチに組み合わせられるように分割または変形された植物材料をいう。

40

【0094】

本明細書中で使用される、「食用植物」は、動物が消費することができ、栄養価が高く、毒性のない植物をいう。「食用植物」は、人または他の動物によって摂取される植物またはこの植物から得られる材料である「食品」であり得る。用語「食品」は、ヒトおよび他の動物が食することができる植物材料またはヒトおよび他の動物が食する加工植物材料を含むことを意図する。植物から得られる材料は、ヒトまたは他の動物によって最終的に摂取される植物成分を含むことを意図する。「食用植物」の例には、トマト植物、イネ植物

50

、小麦植物、トウモロコシ植物、ニンジン植物、ジャガイモ植物、リンゴ植物、ダイズ植物、アルファルファ植物、ウマゴヤシ属植物、食用野菜植物、および果実植物が含まれるが、これらに限定されない。

【0095】

いくつかの場合、「食用植物」は、「栄養価のために摂取することができ」、動物が摂取した場合に代謝エネルギー、補助的もしくは必須のビタミンまたは補因子、繊維質、または他の有益な効果の供給源を提供する植物またはその一部という。したがって、本発明の方法によって処理される動物がセルロースの細菌補助消化を行うことができる草食動物である場合、このような食品は、トランスジェニック草本を意味し得る。他の食用植物には、野菜および果実が含まれる。同様に、例えば、トランスジェニックレタス植物は実質的にエネルギー源、タンパク質、炭水化物、または脂肪などの基礎的要素にも他の必須または補助的なビタミンもしくは補因子とならないにもかかわらず、動物用の食品として使用される本明細書中に記載された核酸分子にトランスジェニックなレタス植物は、動物がレタスのセルロース成分を摂取できない場合でさえも、レタスが動物に有益な繊維質を提供する場合、本明細書中では食品の定義の範囲内に含まれる。したがって、「食用植物」では、タバコは除外される。

10

【0096】

本明細書中で使用される「処理」トランスジェニック植物材料は、「カット」（「カット」は「こま切り」、「みじん切り」、「ダイスカット」、または植物材料を最小サイズ約 1 mm^2 のより小さな一片に縮小する方法をいう）された植物材料をいうことができる。

20

「カット」しているかカットしていないトランスジェニック植物材料を、当分野で公知の任意の技術（ボイル、焼き、およびソテーが含まれるが、これらに限定されない）を使用した、植物材料の温度を少なくとも約5分間および約30分間まで少なくとも140、160、180、および200まで上昇させる植物材料の「加熱」によってさらに処理することができる。「加熱した」植物材料は破壊した植物細胞を含み得るので、本発明で有用な「加熱した」トランスジェニック植物材料を、避妊タンパク質を精製することなく投与する。「カット」している、またはカットしていない「加熱」または非加熱トランスジェニック植物材料を、例えば、混合による植物材料と非トランスジェニック植物もしくは非植物材料との「組み合わせ」によってさらに処理することができ、トランスジェニック植物材料は、トランスジェニック植物材料と非トランスジェニック植物材料または

30

【0097】

あるいは、本発明で有用なトランスジェニック植物材料を、当業者に公知の任意のプロセス（室温で20分までの調理用ブレンダーでの果汁を絞ること、混合、または裏ごしが含まれる）によるカットしているまたはカットしていない加熱または非加熱トランスジェニック植物材料の「液化」によって「処理」することができる。ついで、「液化」植物材料を、動物に直接投与するか、「液化」植物材料と薬学的許容可能で避妊タンパク質と適合する適切な賦形剤との混合によってさらに処理することができる。「液化」植物材料を、液体植物材料と薬学的許容可能なクリーム、軟膏、または軟膏との混合によってさらに「処理」することができる。トランスジェニック植物材料の「液化」の際に、トランスジェニック植物が破壊され、それによりその成分が「液化」混合物中に遊離する可能性がある。この性質の「液化」混合物は、トランスジェニック植物細胞によって発現した避妊タンパク質が「液化」植物材料から精製されない場合、本発明で有用である。

40

【0098】

あるいは、本発明で有用なカットまたはカットしていない加熱または非加熱トランスジェニック植物材料を、植物材料の「凍結乾燥」または「脱水」によって「処理」して、水を

50

除去することができる。風乾、噴霧乾燥、または「凍結乾燥」によって「脱水」を行うことができ、「凍結乾燥」は、急速凍結および凍結状態での脱水（「昇華」という場合もある）による乾燥状態での植物材料の調製をいう。このプロセスを、室温で周囲温度の封入容器を使用した凍結生成物の維持に十分な圧力（好ましくは約500mTorr未満、より好ましくは約200mTorr未満、さらにより好ましくは約1mTorr未満）での真空下で約1時間～72時間行うことができる。植物材料を、約60と200との間の温度で約1時間～72時間オープン中に植物材料を置くことによって「脱水する」ことができる。植物材料の重量が長期間変化しなくなった場合、植物材料が十分に「凍結乾燥された」か「脱水された」とみなす。例えば、上記の温度でオープン中に置かれた植物材料の重量が水の蒸発につれて長期間減少する。重量が変化しなくなり、全ての水が蒸発した場合、植物材料を「脱水した」ということができる。好ましくは、どのような乾燥方法を使用しても、最終材料は全含水量の少なくとも90重量%の除去に十分に脱水される。「凍結乾燥」または「脱水」植物材料を、薬学的に許容可能で避妊ポリペプチドに適合する賦形剤での「凍結乾燥」または「脱水」植物材料の乳化によってさらに「処理する」ことができる。適切な賦形剤には、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、またはエタノールなどおよびその混合物が含まれ、「凍結乾燥」または「脱水」植物材料は、賦形剤混合物の少なくとも40重量%、および好ましくは少なくとも50重量%含まれる。さらに、所望ならば、「凍結乾燥」または「脱水」植物材料は、湿潤剤もしくは乳化剤などの助剤、pH調整剤、または植物材料の効果を高めるアジュバントを含み得る。本明細書中で使用される、「凍結乾燥」または「脱水」植物材料を、薬学的許容可能なクリーム、軟膏、軟膏、または座剤との植物材料の混合によってさらに処理することができる。植物材料は混合物の少なくとも40重量%、好ましくは50重量%含まれる。あるいは、「脱水」植物材料を、液体（フルーツジュース、野菜ジュース、ミルク、水、または多価または多成分ワクチンを形成するための他のワクチン処方物などが含まれるが、これらに限定されない）での植物材料の再構成によってさらに処理することができる。

10

20

【0099】

本明細書中で使用される、「賦形剤」は、任意の処理段階で添加された外来の材料をいう。例えば、賦形剤を、トランスジェニック植物材料の分割時に添加するか、脱水中に添加するか、脱水前後の混合の際に添加することができる。適切な賦形剤には、アジュバント、緩衝液、糖、抗酸化剤、安定剤、または抗原粉末が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0100】

本明細書中に使用される、「ポリペプチド」は、1つのアミノ酸残基のカルボキシル炭素と隣の窒素との間のペプチド結合によって結合した一連のアミノ酸残基をいう。本明細書中で使用される、「ポリペプチド」は、完全なタンパク質、タンパク質のフラグメント、またはタンパク質の免疫抗原エピトープをいうことができる。

【0101】

本明細書中で使用される、「透明帯糖タンパク質」は、哺乳動物の透明帯を含む3つの硫酸化糖タンパク質をいう。透明帯は、さらに、卵母細胞の微絨毛からなる層および濾胞細胞の細胞的作用を含む。1つの「透明帯糖タンパク質」（特に、ZP3）は、哺乳動物の精子の主な結合部位として機能する。透明帯（特に、透明帯糖タンパク質ZP3）を、ZP3特異的抗体および当分野で十分に説明されている標準的な免疫組織化学的技術を使用して同定することができる（Eastら、1985、Dev. Biol.、109、268）。ZP糖タンパク質を記載するために当分野で使用される名称はさまざまである。ZP糖タンパク質の例には、ブタから単離されたZPタンパク質（PZI、PZII、90K、65K、55K、25K、ZP1、ZP2、ZP3（PPZA）、ZP4、87K（ZP1/ZP2）、58K）、ウサギから単離されたZPタンパク質（RZI、RZII、RZIII、ZP1、ZP2、ZP3、RZII）、マウスから単離されたZPタンパク質（ZP1、ZP2、ZP3）、ネコから単離されたZPタンパク質（CZIおよびCZII）、イヌから単離されたZPタンパク質（DZI、DZII、およびDZIII

40

50

)、リスザルから単離されたZPタンパク質(ZP1、ZP2、ZP3、およびZP4)、ヒトから単離されたZPタンパク質(ZP1、ZP2、およびZP3)が含まれるが、これらに限定されない。上記のZPペプチドに加えて、多数の種(例えば、マウス、ヒト、ハムスター、ウサギ)のZP糖タンパク質をコードするヌクレオチド配列が明らかとなっており、ヌクレオチド配列は避妊タンパク質をコードするので本発明で有用である。本発明は、3つのZP糖タンパク質のZP1、2、または3の記号表示を使用する。しかし、当分野の他にZP糖タンパク質をZPA、B、およびCに分類しており、ZPAにはZP1およびZP2と記載のペプチドが含まれ、ZPBにはZP3 およびrc55と記載のペプチドが含まれ、ZPCにはZP3 およびZP3と記載のペプチドが含まれる(例えば、米国特許第5,989,550号を参照のこと)。

10

【0102】

本明細書中で使用される、「免疫避妊」は、避妊タンパク質に対する免疫応答に起因する一過性の可逆的避妊をいい、不変で不可逆的な避妊(すなわち、不妊)もいう。本明細書中で使用される、「免疫避妊」は、平均産仔数が3匹またはそれ以上の動物種について動物の繁殖周期あたりの平均出生数が少なくとも60%、70%、80%、90%、および100%までである場合、「有効」であるとみなされる。平均産仔数が3匹未満である動物種では、「有効な」免疫避妊によって少なくとも50%および100%まで産仔数が減少する。

【0103】

本明細書中で使用される、「免疫応答」は、物質(外来タンパク質または自己タンパク質が含まれるが、これらに限定されない)に対する生物の免疫系による応答をいう。3つの一般的な「免疫応答」型(粘膜、体液性、および細胞性の「免疫応答」が含まれるが、これらに限定されない)が存在する。「粘膜免疫応答」は、気道、胃腸管、および尿生殖路の全粘膜表面を浸す分泌および全分泌腺由来の分泌における分泌型IgA(sIgA)の産生に起因する(McGhee, J. R.ら、1983、Annals NY Acad. Sci., 409)。これらのsIgA抗体は、粘膜表面上の病原体のコロニー形成を防止するように作用し(Williams, R. C.ら、Science, 177、697、1972; McNabb, P. C.ら、Ann. Rev. Microbiol., 35、477、1981)、それにより、コロニー形成または粘膜表面からの侵入を防止するための第1の防衛線として作用する。sIgAの産生を、分泌腺または分泌組織の局所的免疫化または消化管関連リンパ系組織(GALTまたはPeyerパッチ)または気管支関連リンパ系組織(BALT; Cebra, J. J.ら、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 41、210、1976; Bienenstock, J. M., Adv. Exp. Med. Biol., 107、53、1978; Weisz-Carrington, P.ら、J. Immunol., 123、1705、1979; McCaughan, G.ら、Internal Rev. Physiol., 28、131、1983)のいずれかに対する抗原提示によって刺激することができる。膜性マイクロフォールド細胞(M細胞としても知られる)は、GALTおよびBALT表面を覆い、他の分泌性粘膜表面と会合することができる。M細胞は、粘膜表面に隣接する管腔空間由来の抗原サンプリングするように作用し、このような抗原を抗原提示細胞(樹上細胞およびマクロファージ)に移動させ、その後Tリンパ球(T依存性抗原の場合)に抗原を提示し、コミット性B細胞への提示のために抗原をプロセッシングする。次いで、B細胞を、増殖、移動、および最終的には提示された抗原に対する抗体分泌形質細胞産生IgAに形質転換するように刺激する。抗原がGALTおよびBALTに被せられたM細胞によって取り込まれた場合、全身性粘膜免疫により、体内の全分泌組織によって産生された抗原に対してsIgAが得られる(Cebraら、前出; Bienenstockら、前出; Weinz-Carringtonら、前出; McCaughanら、前出)。したがって、経口免疫化は、全身性粘膜免疫応答の重要な刺激経路であり、さらに、口腔および胃腸管における分泌性免疫応答を局所的に刺激する。

20

30

40

【0104】

50

「免疫応答」を、当業者に公知の技術を用いて測定することができる。例えば、血清、血液、または他の分泌物を、「免疫応答」が提示されたと疑われる生物から獲得し、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA、米国特許第5,951,988号; Ausubelら、「分子生物学ショートプロトコール」、第3版、John Wiley & Sons, Inc.、1995) を使用して上記免疫グロブリンの存在についてアッセイすることができる。本発明によれば、ELISAによって検出された避妊タンパク質で処理した動物における免疫グロブリンの定量的測定値が避妊タンパク質で処理されない動物で検出された免疫グロブリンの測定値と統計的に異なり、免疫グロブリンが避妊タンパク質に特異的である場合、本発明の避妊タンパク質を、「免疫応答」を刺激するということができる。当分野で公知の統計的検定 (ANOVAおよび学生t検定 (P値は少なくとも0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、および0.0001未満) など) が含まれるがこれらに限定されない) を使用して、測定した免疫グロブリンレベルの相違を決定することができる。

【0105】

「免疫応答」を、「免疫応答」の際に惹起した免疫グロブリンの一部に特異的な標識抗体を使用した免疫組織化学などの他の技術を使用して測定することができる。本発明にしたがって避妊タンパク質を投与された動物由来の組織 (例えば、卵巣組織) を獲得し、当分野で周知の技術 (Ausubelら、「分子生物学ショートプロトコール」、第3版、John Wiley & Sons, Inc.、1995) を使用して免疫組織化学のために処理することができる。免疫組織化学によって得られた顕微鏡データを、免疫組織化学的に染色した組織サンプルのスキャンおよび当業者に公知のコンピュータソフトウェア (NIH Imageが含まれるが、これに限定されない) (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を使用した染色レベルの定量によって定量することができる。本発明によれば、避妊タンパク質で処理した動物における免疫組織化学的染色の定量的測定値が避妊タンパク質で処理されない動物で検出された免疫組織化学的染色の測定値と統計的に異なり、組織化学的染色が避妊タンパク質に特異的な結合を必要とする場合、本発明の避妊タンパク質を、「免疫応答」を刺激するということができる。当分野で公知の統計的検定 (ANOVAおよび学生t検定 (P値は少なくとも0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、および0.0001未満) など) が含まれるがこれらに限定されない) を使用して、測定した免疫組織化学的染色レベルの相違を決定することができる。

【0106】

「粘膜免疫応答」を、上記の参照技術を使用して「検出する」ことができる。例えば、抗IgA抗体を使用したELISAアッセイを使用して、粘膜特異的免疫グロブリンを検出および測定することができる (Dickinson, B. L. & Clements, J. D.、「ADPリボシルトランスフェラーゼ活性由来の大腸菌熱不安定性エンテロトキシンアジュバント活性の分離」、Infect. Immun.、63、1617~1623、1995)。

【0107】

本明細書中で使用される、「アジュバント」は、抗原と組み合わせて投与した場合に抗原に対する免疫応答が増強する化合物である (Coligan LGら編、「現代の免疫学プロトコール」、New York、John Wiley & Sons、1995)。アジュバントは抗原破壊の遅延および組織中での低い有効なレベルの抗原の持続または炎症反応または免疫感受性を増大させる他の免疫反応の誘発によって有効であり得る。

【0108】

本明細書中で使用される、「種特異的」は、由来する種に固有の核酸またはアミノ酸をいう。例えば、透明帯糖タンパク質をコードする「種特異的」核酸配列は、異なる種由来の対応する透明帯糖タンパク質をコードする核酸配列と少なくとも95~70%ほど配列が同一、80~50%ほど配列が同一、および60~40%ほど配列が同一の核酸配列をいう。特定の核酸配列またはアミノ酸配列の「種特異性」を、BLAST分析を含む当業者

に公知の技術を使用して決定することができる。

【0109】

本明細書中で使用される、「粘膜標的タンパク質」は、第2のペプチドに結合するか第2のペプチドとの融合タンパク質として発現した場合に粘膜免疫応答を誘発するためのペプチドと組み合わせる可能性が増大するポリペプチドをいう。「粘膜標的タンパク質」は、移入される生物に対して内因性ではないポリペプチドであり得る。証拠(Bla ckら、Infect. Immunol.、55、1116、1987)は、「粘膜標的タンパク質」は、抗原(例えば、ZP糖タンパク質)とともに経口投与された場合、保護免疫応答を増強させるためのアジュバントとして作用することを示す。したがって、「粘膜標的タンパク質」は、少なくとも10 μ gの用量、1 μ gの用量、500ngの用量、および1ngの用量で投与した場合に粘膜上皮に対するガングリオシドの結合親和性を有し、それにより粘膜上皮膜を越えてタンパク質が移送されるタンパク質であり、その結果、「粘膜標的タンパク質」は分泌免疫応答の誘発に重要であり得るということである。次いで、避妊タンパク質および「粘膜標的タンパク質」の遺伝子融合産物をより容易に粘膜細胞に輸送して、局所分泌免疫応答が増強されるということを確認することができる。「粘膜標的タンパク質」の例には、大腸菌エンテロトキシンサブユニットBおよびA、コレラ毒素、シガ毒素B(S t x B)、ブドウ球菌エンテロトキシンB(S E B)、ノーウォークウイルスキャプシドタンパク質(N V C P)、およびB型肝炎表面抗原が含まれるが、これらに限定されない。ポリペプチドが第2のペプチドの免疫原性を粘膜に標的する能力を、ペプチドの組み合わせの投与によって刺激し、免疫応答の測定のための上記の統計技術を使用した「粘膜標的タンパク質」を使用しないで第2のペプチドを投与した場合に認められる免疫応答と比較して免疫応答が優位に増加したかどうかを決定する、例えば、E L I S Aまたは免疫組織化学による「粘膜免疫応答」の測定(すなわち、s I g Aレベルの測定)によって試験することができる。

10

20

【0110】

本明細書中で使用される、「動物」は、系統発生界の動物界に分類される生物をいう。本明細書中で使用される、「動物」はまた、哺乳動物をいう。本発明で有用な動物には、哺乳動物、有袋動物、マウス、イヌ、ネコ、牛、ヒト、シカ、ウマ、ヒツジ、カチク、家禽類、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ、魚類、ナガスクジラ、甲殻類が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0111】

本明細書中で使用される、「単子葉植物」は、胚が1つの子葉または子葉を有する植物型をいう。「単子葉植物」の例には、ユリ、イネ、トウモロコシ、穀類(カラスムギ、コムギ、およびオオムギを含む)、ラン、アヤメ、タマネギ、およびヤシが含まれるが、これらに限定されない。

【0112】

本明細書中で使用される、「双子葉植物」は、胚が2つの子葉または子葉を有する植物型をいう。「双子葉植物」の例には、タバコ、トマト、アルファルファを含むマメ科植物、オーク、カエデ、バラ、ミント、スカッシュ、ヒアングク、クルミ、サボテン、スミレ、およびキンポウゲが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0113】

本明細書中で使用される、「核酸ベクター」は、連結した別の核酸を輸送することができる核酸分子をいう。ベクターの1つの型は、さらなる核酸セグメントをライゲーションすることができる環状二本鎖核酸ループと呼ばれる「プラスミド」である。一定のベクターは、移入された宿主細胞で自律複製することができる(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への移入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれて、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、一定のベクターは、作動可能に連結された遺伝子の発現を指示することができる。このようなベクターを、本明細書中では「発現ベクター」という。一般に、組換え核酸技術で使用される発現ベクターは、しばしばプラスミドの

50

形態である。本明細書では、プラスミドはもっとも一般的に使用されるベクター形態であるので、「プラスミド」および「ベクター」を交換可能に使用することができる。

【0114】

本明細書中で使用される、「プロモーター」は、RNAポリメラーゼの認識および結合部位および転写開始に必要であり得る他の因子を提供することによりコード領域の発現を調節するDNA配列（通常、構造遺伝子のコード領域の上流（5'））をいう。プロモーターの選択は、目的の核酸配列に依存する。「植物機能性プロモーター」は、植物細胞における転写開始を支持することができる「プロモーター」をいう。本発明で有用な「植物機能性プロモーター」には、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の35Sプロモーター；Zma10KzまたはZmag12などの種子貯蔵タンパク質のプロモーター；リブローズカルボキシラーゼニリン酸小サブユニット（rbcs）などの光誘導遺伝子、アルコールデヒドロゲナーゼ（Adh1）などのストレス誘導遺伝子、または全細胞で発現される「ハウスキープング遺伝子」（Zmac1（メイズアクチン遺伝子）などの）のプロモーター；タバコE8プロモーター；ユビキチン；マンノピンシターゼ（mas）；イネアクチン1；ダイズ種子タンパク質グリシン（Gy1）；ダイズ植物貯蔵タンパク質（vsp）；および顆粒結合デンブシンターゼ（gbs）が含まれるが、これらに限定されない。他の「植物機能プロモーター」には、食用植物の一部において高発現が得られることが公知の遺伝子プロモーター（ジャガイモ由来のパタチン遺伝子プロモーターなど）が含まれる。

10

【0115】

本明細書中で使用される、「作動可能に連結された」は、記載の成分が意図する様式で機能するような関係で存在する並列をいう。コード配列に「作動可能に連結された」調節配列は、コード配列が調節配列と適合する条件かで発現するような方法でライゲーションされている。遺伝子の転写開始部位が遺伝子転写の制御に十分に近くに存在する場合、プロモーター配列は、遺伝子に「作動可能に連結されている」。

20

【0116】

本明細書中で使用される、「投与された」は、「送達された」材料が投与された動物の粘膜表面に接触することが保証させるような様式での動物への本発明の植物材料、細胞、組成物、および薬学的処方物の送達をいう。本発明で有用な「送達」経路には、経口送達、経鼻送達、直腸もしくは膣送達（例えば、座剤、すなわち局所投与）、または送達した材料が粘膜表面に直接接触する送達経路（すなわち、「粘膜送達」）が含まれるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される、「薬学的に許容可能な」は、有効成分の生物活性の有効性を妨害しない無毒の材料を意味する。キャリアの特徴は、投与経路に依存する。

30

【0117】

本明細書中で使用される、「粘膜表面」、「粘膜」、または「粘膜」は、上皮、固有層、および消化管では平滑筋層の表面または裏打ちであるこれらの構造の周知の医学的定義をいう。「粘膜表面」の例には、気管支の内被、鼓室の粘膜層、結腸の粘膜内被、精管の内層、食道の内被、小腸の粘膜、咽頭の粘膜、舌の粘膜、下垂体膜、口腔の粘膜、咽頭の粘膜、気管の粘膜内層、耳管の裏打ち、卵管の粘膜層、卵管の内層、尿道の内層、子宮内膜、膣の粘膜、胃の粘膜、膀胱の内被、および精囊の粘膜が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0118】

本明細書中で使用される、「種」は、種内の全生物の一般的形態、ボディプラン、発達などの基本的長が密接に類似している生物の属と各生物との間の生物学的区分をいう。

【0119】

本明細書中で使用される、「安定な」は、植物材料が室温で保存されたままであることをいう。本明細書中の「安定なトランスジェニック植物材料」は、「異種」タンパク質または「トランスジェニックタンパク質」が、Elisa、定量ウェスタンブロット、または凝集などのアッセイによって測定された免疫反応性が著しく喪失することなく強力であり

50

つづける植物材料をいう。「異種」タンパク質は、本発明のプロセスによって産生時に認められた免疫反応性の少なくとも40%が少なくとも5ヶ月、および10ヶ月、12ヶ月、または18ヶ月までまたはそれ以上のより長い期間存在したままである場合に安定である。

【0120】

表1は、処理材料の均一性の改良を示す図である。互いにプールした植物の「バッチ」中または特定の植物系統由来の非混合サンプル中に存在する処理または未処理トランスジェニック植物材料の抗原含有量である。

【0121】

【表1】

処理した植物型	目的の抗原	処理後の処理群	サンプル1 抗原含有量	サンプル2 抗原含有量	サンプル3 抗原含有量	平均抗原 含有量	最も高 い分散
トマト果実	HB抗原結合	凍結 室温	89.9 76.1	92.4 90.8	n/a 81	91.1 82.6	3% 19%
トマト果実	HB抗原結合	凍結 室温 室温 室温 凍結 凍結 (+抗酸化剤) 凍結 (+抗酸化剤)	19.8 15.5 13.2 26.8	23.1 15.5 11.4 28.2	n/a 19.4 12.8 n/a	21.5 16.8 12.5 27.5	17% 25% 16% 5%
トマト果実	NVCP結合	凍結 室温 室温 凍結 凍結 (+アジュバント) 凍結 (+アジュバント)	1.34 1.42 1.22 0.95	1.49 1.68 1.13 0.93	n/a n/a n/a n/a	1.4 1.6 1.2 0.9	11% 18% 8% 2%
ジャガイモ塊茎	NVCP結合	なし +抗酸化剤 +抗酸化剤 +アジュバント	16.4 14.3 16.8	17.1 15.7 13.9	15.2 17.1 14.9	16.2 15.7 15.2	13% 20% 21%
ジャガイモ塊茎	NVCP結合	室温 室温 (+抗酸化剤) 凍結 (+抗酸化剤) 室温 (+アジュバント) 凍結 (+アジュバント)	7.2 4.6 11.9 5.1 12.1	5.9 5.1 11.1 5.1 9.9	6.3 3.9 9.8 3.8 10.5	6.5 4.5 10.9 4.7 10.8	22% 31% 21% 34% 22%
ジャガイモ塊茎	NDV-HN-系4	なし 未処理	5.44 0.47	6.63 2.4	7.06 0.95	6.4 1.3	30% 153%
ジャガイモ塊茎	NDV-HN-系6	なし 未処理	27.87 1.16	39.43 2.26	22.62 5.07	30.0 2.8	74% 337%
ジャガイモ塊茎	AIV-HA-系109	なし 未処理	5.6 1.18	6.1 1.81	7 1.91	6.2 1.6	25% 62%
ジャガイモ塊茎	AIV-HA-系73	なし 未処理	5.6 3.64	6 2.26	6.7 2.01	6.1 2.6	20% 81%

TABLE 1

10

20

30

40

50

【0122】

表2は、異なる組織中の抗原の回収率および異なる方法によって得られた抗原の濃度を示す図である。ピューレ化および凍結乾燥によるジャガイモ生物医薬品の処理により、平均4.2倍の抗原濃度を検出可能である。同一の材料を角切りまたは四つ切りおよびその後の凍結乾燥によって処理した場合、検出可能な抗原濃度が平均15.2倍増加する。トランスジェニックトマトなどの他の材料は、凍結前の材料の均一化方法としてピューレ化を

使用した場合に抗原に対して類似の破壊効果を示す。トランスジェニックニンジン材料を凍結乾燥（ピューレ状またはスライスにしない）で処理した場合、未処理材料と適合する抗原の濃度は、質量の減少と直接的に比例し、このプロセスによって検出可能な抗原の保持をさらに示す。

【 0 1 2 3 】

【表 2】

植物供給源 (-抗原)	前処理方法	質量の減少	抗原回収率	全濃度効果
ジャガイモ-NVCP	ピューレ（凍結乾燥）	88%	43%	3.6 倍
ジャガイモ-AIV:HA	ピューレ（凍結乾燥）	89%	52%	4.7 倍
ジャガイモ-NDV:HN	ピューレ（凍結乾燥）	83%	52%	3.1 倍
ジャガイモ-NBsAg	ピューレ（凍結乾燥）	90%	57%	5.7 倍
ジャガイモ-LTB	ピューレ（凍結乾燥）	89%	44%	4.0 倍
トマト-NVCP	ピューレ（凍結乾燥）	94%	43%	7.2 倍
トマト-HBsAg	ピューレ（凍結乾燥）	95%	59%	11.8 倍
トマト-LTB	ピューレ（凍結乾燥）	94%	48%	8.0 倍
ジャガイモ-AIV:HA	立方体（凍結乾燥）	84%	95%	15.2 倍
ジャガイモ-NDV:HN	立方体（凍結乾燥）	84%	95%	15.2 倍
ニンジンの根-LTB	なし（凍結乾燥）	88%	~100%	8.3 倍
ニンジンの根-ZP3	なし（凍結乾燥）	92%	~100%	12.5 倍
ニンジンの葉-LTB	なし（凍結乾燥）	90%	~100%	10.0 倍
ニンジンの葉-ZP3	なし（凍結乾燥）	90%	~100%	10.0 倍

TABLE 2

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 1 2 4 】

本発明は、トランスジェニック生物医薬品の産生方法に関する。本明細書中に記載の方法により、室温において安定かつ均一で、薬学的に強力な乾燥トランスジェニック植物材料を産生可能である。一般に、生物医薬品を産生する完全なまたは分割したトランスジェニ

10

20

30

40

50

ック植物を、当分野で公知の食品処理技術によって凍結/乾燥する。乾燥均一産物を、医薬品タンパク質をさらに抽出、精製、または沈殿することなく治療で使用することができる。

【0125】

得られたトランスジェニック植物材料は、容易に取り扱うことができ、12ヶ月保存した場合に周囲温度で安定な処方粉末を含む。さらに、本明細書中に記載のバッチ処理により、植物または植物組織の間での検出可能な抗原の一貫性が増し、効力が改良された抗原が濃縮される。

【0126】

トランスジェニック植物種

本発明で 사용할 ことができる植物には、双子葉型および単子葉型の両方が含まれる。これらには、ニンジン、ホウレンソウ、トウガラシ、ジャガイモ、トマト、リンゴ、コムギ、ライムギ、ダイズ、イネ、メイズ、トウモロコシ、ベリー類（ストロベリーおよびラズベリーなど）、アルファルファ、およびバナナが含まれるが、これらに限定されない。ヒトの食用または動物飼料の成分として使用される食用植物は双子葉植物であるので、典型的には双子葉植物を使用するが、単子葉植物は動物飼料に有用である。これらの植物ワクチン由来の細胞および種子もまた、本発明で有用である。

【0127】

当分野で公知の任意の手段によって、トランスジェニック植物を産生することができる。1つの実施形態では、トマト、ジャガイモ、およびニンジンを含む種々のトランスジェニック植物種を、いかなる殺虫剤または除草剤を適用しないバイオセーフティレベル1の温室封じ込め条件下で成長させ、成熟するまで成長させた。

【0128】

本発明で有用なトランスジェニック植物は、異種タンパク質を発現する。適切な異種タンパク質の例には、ノーウォークウイルスキャプシドタンパク質（NVCP）、トリインフルエンザ血球凝集抗原（AIV-HA）、ニューキャッスル病ウイルスフラミニダーゼ（NDV-HN）、透明帯糖タンパク質（ZP3）、およびB型肝炎表面抗原（HBsAg）、植物中で作製された抗体（例えば、「プランチボディ」）、および他の治療タンパク質（例えば、エンドスタチンおよびアンギオスタチン）が含まれるが、これらに限定されない。

【0129】

採取

トランスジェニック植物材料を、手もしくは機械または当分野で公知の任意の手段によって採取することができる。採取方法は、植物種によって変化し得る。1つの実施形態では、トランスジェニックジャガイモまたはニンジン、完全なバッチとして採取し、処理まで4で保存することができる。別の実施形態では、中程度の成熟または成熟したと考えられるトランスジェニックジャガイモ果実を6週間にわたり2週間毎に採取し、採取日に処理する。さらなる実施形態では、手によってトマト果実、ジャガイモ塊茎、またはニンジンの根から葉または茎材料を除去し、その後トマト果実、ジャガイモ塊茎、またはニンジンの根を0.1%塩素溶液（1%Clorox）で洗浄して土および生物学的負荷物を除去する。記録保持の目的で、各バッチを計数および秤量し、採取および処理記録シートに書き加える。

【0130】

均一化

乾燥前または乾燥後にトランスジェニック植物材料の均一化を行うことができる。1つの実施形態では、乾燥前に均一化を行い、均一化は、新たに採取した植物材料の粗いパルプ化および混合、その後の混合材料の凍結および凍結乾燥を含む。第1のスライス、混合、または粉碎処理により、未処理植物組織（果実、塊茎、葉、種子など）がパルプ混合物に減少する。この混合物は、完全な植物細胞および粉碎した細胞破片の両方を含むとみなされる。このプロセスの利点は、果実または塊茎などのより大きな植物器官の処理しやすい

10

20

30

40

50

混合物への減少であり、これにより組織間の相同タンパク質含有量のばらつきがより均一な材料のバッチに組み合わされる。全ての植物細胞の完全性を完全に破壊することなく均一なバッチを得る能力により、その後の処理段階において相同タンパク質の安定な保存環境が得られる。別の実施形態では、均一化には、処理前の植物材料を最小に処理する必要がある。スライス、四つ切り、または完全な材料の凍結乾燥後に均一化を行う。得られた材料を、微粉末に砕き、1つのバッチ容器に合わせ、震盪または乾燥混合などの機械的手段によって完全に混合して、均一な混合物を得る。

【0131】

分割 (Partitioning)

分割のために、完全な植物または完全な植物部分を、当分野で公知の手段によってサイズを減少させることができる。分割方法には、角切り、四つ切り、みじん切り、薄切り、ダイスカット、ピューレ化、パルプ化、ミルで挽くこと、破壊、圧縮、または粗砕が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0132】

ピューレ化が好ましい場合、新たに採取した果実、塊茎、または根を、Stephan Industrial Vertical Mixer/Slicerを約1分間使用してピューレ化する。約20lbsの最小体積の材料を1度にピューレ化することが好ましい。ジャガイモをピューレ化する場合、ピューレ化処理を補助するために大量の水(500mlまで)を添加することができる。ピューレ化材料の温度は2を超えないことが好ましい。1つの実施形態では、ホモジネートを明確に標識したフリーザートレイに入れ、 -40 で保存する。任意の遺伝子改変パルプまたは種子の喪失を回避するために、ミキサー/スライサーを、紙タオルでふき取ることができる。

20

【0133】

当分野で公知の任意の手段によって、材料を四つ切りにするか、皮をむくか、薄切りにすることができる。

【0134】

脱水

1つの実施形態では、四つ切りか、皮をむくか、薄切りにしたトランスジェニック植物材料を、フリーザートレイに移し、産業用凍結乾燥機に入れ、 25 の最高シェルフ温度にて -30 で2~6日間凍結乾燥する。次いで、得られた材料を、標識したコンテナに合わせ、完全な採取および処理記録シートに記録する。別の実施形態では、トランスジェニック植物材料を1ガロンのステンレススチール製のWrappingブレンダーで薄切りにし、サンプルを500mlまたは1リットルのフラスコに移し、実験用凍結乾燥機を使用して凍結乾燥する。この場合、材料を -30 の温度で1~6日間乾燥させた。

30

【0135】

抗原濃度の決定

目的の抗原濃度を決定するための植物材料の分析を、植物組織中に服される抗原に適切な酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)または凝集アッセイを使用して行うことができる。未処理および処理材料の両方を評価する場合、特異的抗原のために選択したアッセイ方法を一貫して適用すべきである。

40

【0136】

安定性および賦形剤の使用

周囲温度での処理材料の安定性を評価するために、10~15gの材料サンプルを、凍結乾燥直後に取り出し、密閉バッグに入れ、実験用シェルフでの保存前に第2の容器に入れた。周囲温度を、 23 ± 2 に維持した。残りの処理材料を、 4 または -20 のいずれかで保存した。サンプルを、各条件下で保存した材料から定期的に採取し、適切なアッセイによって抗原含有量を比較して、周囲温度で保存した材料の相対的安定性を決定した。

【0137】

避妊

50

本発明はまた、避妊を誘導することができるタンパク質を発現するトランスジェニック植物が作製され、トランスジェニック植物材料の動物への投与は避妊タンパク質に対する粘膜免疫応答の誘導に十分であり、有効な避妊を達成するという発見に基づく。本発明は、避妊タンパク質を発現するトランスジェニック植物を動物に投与するステップを含み、前記トランスジェニック植物の投与により投与された動物で粘膜免疫応答が誘導される免疫避妊方法を提供する。本発明は、さらに、本発明での動物への投与に有用な避妊タンパク質を発現するトランスジェニック植物の作製方法、および動物に投与した際にその動物で避妊を誘導することができるトランスジェニック植物を提供する。

【0138】

避妊タンパク質

本発明は、トランスジェニック植物材料を提供し、その細胞は、植物材料を投与した動物で避妊を誘導することができるタンパク質またはポリペプチドを発現する。本発明で有用な避妊タンパク質には、透明帯糖タンパク質、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH)、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH RH)、黄体形成ホルモン (LH)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、および抗精子抗原が含まれるが、これらに限定されない。

【0139】

透明帯糖タンパク質

透明帯は、卵母細胞を包む、丈夫で、屈折性のある細胞外糖タンパク質基質である。その特徴的な溝のある外観は、透明帯を貫通する多数の細管に起因する。濾胞細胞由来の細胞質突起は ZP を通り抜けて伸長し、時折卵母細胞の原形質膜に陥入している。濾胞細胞の細胞質突起はまた、卵母細胞表面に栄養物を輸送する。さらに、卵母細胞の微絨毛は ZP に伸長し、卵母細胞表面での吸収能力を増大させる (一般に、W. J. Hamilton 編、「Hamilton, Boyd および Mossman のヒト胎生学」、27 ~ 32 頁および 54 ~ 64 頁、1972 ; J. B. Warshaw 編、「生殖の生物学的基礎および薬物開発」、1973 を参照のこと)。本発明で避妊タンパク質として有用な透明帯 (ZP) 糖タンパク質には、ZP に対する抗体を誘発することができる全糖タンパク質基質形態 (ZP 糖タンパク質 1、2、3、および 4 が含まれる) が含まれる。これらは、腔および排卵前の時期に卵発達の後期で認められる ZP エピトープならびに排卵後に発現するエピトープを含む。

【0140】

好ましい実施形態では、本発明の避妊タンパク質は、ZP 3 糖タンパク質またはそのエピトープである。本発明の避妊タンパク質の「エピトープ」は、少なくとも 6、8、10、12、14、20、および 30 までのアミノ酸長である。本明細書中で使用される、本発明で有用な避妊タンパク質の「エピトープ」は、粘膜免疫応答を刺激することができる避妊タンパク質の一部である。避妊タンパク質のエピトープが粘膜免疫応答を刺激する能力を、避妊エピトープを当業者に公知の技術を使用して投与した動物に存在する分泌型 Ig A 量の測定によって決定することができる。例えば、避妊エピトープが投与された動物に存在する分泌型 Ig A 量を、抗 Ig A 抗体を使用し、エピトープを投与していない動物における s Ig A レベルと比較する ELISA によって測定することができる。当分野で公知の統計的検定を使用して測定した 2 つの動物の s Ig A レベル間の統計的に有意な相違は、エピトープによる粘膜免疫応答の刺激の指標である。本発明で有用な統計的検定の P 値は、少なくとも 0.1 未満、0.05 未満、0.01 未満、0.005 未満、0.001、0.0005 であり、好ましくは 0.0001 である。

【0141】

異なる種の ZP の形態学的特性が共通しているにもかかわらず、異なる動物種の ZP は、免疫学的に異なる領域または「エピトープ」を有する (Timmons ら、「免疫生殖の見通し：概念および避妊」、Mathur ら編、Hemisphere Publ.、242 ~ 260 頁、1988)。多数の ZP タンパク質が異なる動物種から単離されており、本発明の避妊タンパク質として有用である。

【0142】

10

20

30

40

50

ブタから単離された透明帯タンパク質には、以下が含まれる。Dunbarら、*Biol. Reprod.*、24、1111、1981によって単離された、PZI(40から10kDのタンパク質)；Dunbarら(*Biol. Reprod.*、32、619、1985)によって単離された、PZII(70~110kDのタンパク質)、PZIII(95~118kDのタンパク質)、およびPZIV(18~25kDのタンパク質)；Hedrick, J. L. and Wardrip, N. J. (*Biochem.*、157、63、1986)によって単離された、90K(89~119kDのタンパク質)、65K(61~83kDのタンパク質)、55K(47~66kDのタンパク質)、および25K(18~26kDのタンパク質)、；Subramanianら(*Biol. Reprod.*、24、933、1981)によって単離された、ZP1(82~118kDのタンパク質)、ZP2(58~96kDのタンパク質)、ZP3(PPZA)(40~74kDのタンパク質)、およびZP4(21kDのタンパク質)；Yurewiczら(*Biol. Reprod.*、29、511、1983)によって単離された、87K(ZP1/ZP2)(77~97kDのタンパク質)、58K(40~70kDのタンパク質)；Skinner and Dunbar(「避妊および受精能の促進への免疫学的アプローチ」、G. P. Talwar編、New York、Plenum、251~268頁、1986)によって単離された、脱グリコシル化PZ1(35kDのタンパク質)、PZII(55kDのタンパク質)、およびPZIII(80kDのタンパク質)；ならびにSaccoら(*J. Reprod. Fert.*、76、575、1986)によって単離された、分子量45kDの脱グリコシル化ZP3。

【0143】

単離ウサギ透明帯タンパク質には、以下が含まれる。Dunbarら(*Biol. Reprod.*、24、1111、1981)によって単離された、PZI、RZII、およびRZIII(分子量はそれぞれ68~125kD、80~100.5kD、および100~132kD)；Saccoら(*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*、167、318、1981)によって単離された、ZP1、ZP2、およびZP3(分子量はそれぞれ100~118kD、83~110kD、および80~92kD)；Skinner and Dunbar(「避妊および受精能の促進への免疫学的アプローチ」、G. P. Talwar編、New York、Plenum、251~268頁、1986)によって単離された、脱グリコシル化RZIおよびRZII(分子量はそれぞれ65kDおよび80kD)；ならびにTimmons and Dunbar(*Biol. Reprod.*、36、1275、1987)によって単離された、脱グリコシル化RZII(90kDのタンパク質)。

【0144】

以下を含む多数のマウス透明帯タンパク質が単離されている。Wassarman(*Dev. Biol.*、76、185、1980)によって単離されたZP1、ZP2、およびZP3(分子量はそれぞれ200kD、120kD、および83kD)；ならびにSaccoら(*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*、167、318、1981)によって単離された、ZP1およびZP2(分子量はそれぞれ166~122kDおよび90~92kD)。BleilらおよびSaccoらによって報告されたマウスZP1およびZP2の分子量の相違は、Bleilが非還元条件下で二次元PAGEを使用したのに対し、Saccoは還元条件下で二次元PAGEを使用したという事実によるのである。

【0145】

ネコ透明帯タンパク質CZIおよびCZIIは、Mareash and Dunbar(*J. Exp. Zool.*、244、299、1987)によって単離され、分子量はそれぞれ50~110kDおよび90~110kDである。

【0146】

Mareash and Dunbar(*J. Exp. Zool.*、244、299、1987)はまた、イヌ透明帯タンパク質DZI、DZII、およびDZIII(分子量はそ

れぞれ50~110kD、70~95kD、および90~100kD)を単離した。

【0147】

Saccoら(Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 167, 318, 1981)は、リスザルZP1、ZP2、ZP3、およびZP4(分子量はそれぞれ63~78kD、63~70kD、47~51kD、および43~47kD)を記載していた。同一の刊行物では、Saccoらは、ヒトZP1、ZP2、およびZP3(分子量はそれぞれ80~120kD、73kD、および59~65kD)を記載していた。

【0148】

上記のZPペプチドに加えて、多数の種のZP糖タンパク質をコードするヌクレオチド配列が解明されており、これらは避妊タンパク質をコードするので本発明で有用である。例えば、Ringuetteら(Dev. Biol., 1988, 127, 287~295)およびLiangら(Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 1507~1515)は、透明帯タンパク質ZP3およびZP2をそれぞれコードするマウスDNAのクローニングを報告していた。抗ZP3抗体および抗ZP2抗体を使用したマウスcDNAライブラリーのスクリーニングによって、クローンを得た。マウスZP3とZP2との間で配列相同性は認められなかった。

10

【0149】

Ringuetteら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 4341~4345)は、マウスZP3の部分的cDNAクローンの単離を報告しており、ハイブリッド形成が非常に低いストリンジェンシーで行われたい限り、クローンは、マウス、ラット、イヌ、ウシ、およびヒトの全ゲノムDNAとハイブリッド形成するが、ブタまたはウサギのゲノムDNAとはハイブリッド形成しない。Ringuette(Dev. Biol., 1988, 127, 287~295)によって特徴付けられた全長ZP3 cDNAは、比較的短い5'および3'非翻訳領域ならびに200~300個のヌクレオチドポリAテールを含む約1317ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを有する生殖系列特異的mRNAを示す。Ringuetteはまた、ラット、ウサギ、イヌ、およびウシの卵巣はマウスZP3 cDNAとハイブリッド形成するmRNAを転写し、ZP3転写物はより低い分子量を有することを見出した。Liangら(Mol. Cell. Biol., 1990, 10, 1507~1515)は、ZP2の核酸配列および推定アミノ酸配列がZP3のそれらと明らかに異なるにもかかわらず、5'および3'非翻訳領域の同一の短いモチーフを有することを示した。ZP2 mRNAは、713個のアミノ酸を示す80,217ダルトンのポリペプチドをコードする2,139個のヌクレオチドの1つのオープンリーディングフレームを有することが報告されている。

20

30

【0150】

Chamberlin and Dean(Dev. Biol., 1989, 131, 207~214)およびKinloch, R. A.ら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 6409~6413)は、マウスZP3遺伝子のクローニングを報告している。マウスZP3遺伝子は、8.6kbpの転写単位中に8個のエクソンおよび7個のイントロンを有すると報告されている。

【0151】

Kinlochら(Dev. Biol., 1990, 142, 414~421)は、プローブとしてマウスZP3 DNAを使用してスクリーニングしたハムスターゲノムDNAライブラリー由来のハムスターゲノムZP3 DNAのクローニングを報告していた。ハムスターZP3遺伝子は、7900ヌクレオチドの転写単位を有し、7個のイントロンおよび8個のエクソンを含むことが見出された。ハムスターZP3タンパク質は、マウスZP3タンパク質と約81%相同である。ハムスター転写物は、マウスZP3のmRNAより6個少ない1266個のヌクレオチドを含んでいた。

40

【0152】

Chamberlin and Dean(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 6014~6018)は、プローブとしてマウスZP3のcDN

50

Aを使用したヒトゲノムDNAライブラリー由来のヒトZP3のクローニングを報告していた。ヒトZP3遺伝子は、8個のエクソンを含む18.3kbpの転写単位から構成されている。エクソンはマウスZP3の8個のエクソンとサイズがほぼ同一であり、コード領域のヌクレオチド配列は、74%相同である。ヒトZP3転写物は、マウスZP3のmRNAと非常に類似している。これらはともに短い5'および3'非翻訳領域を有し、424個のアミノ酸を含むタンパク質をコードする1272個のヌクレオチドの1つのオープンリーディングフレームを有する。

【0153】

Dunbarに付与された米国特許第4,996,297号は、スクリーニングプローブとして抗ZP1抗体および抗ZP2抗体を使用したウサギZP1およびZP2タンパク質をコードする3つのウサギ透明帯クローンの単離を報告していた。Dunbarに付与された特許の図4でP2およびP3と命名された配列は、それぞれ812および1705ヌクレオチドのウサギZPcDNAを示す。

10

【0154】

Schwoebelら(J. Biol. Chem., 1991, 266, 7214~7219)は、異種間親和性精製抗血清を使用した55kDのウサギ透明帯タンパク質をコードする全長cDNA(rc55と命名)を単離および特徴付けていた。このcDNAによってコードされるタンパク質は、Liangによって記載されたマウスZP2タンパク質とある程度類似性を有する。しかし、rc55とマウスZP3タンパク質との比較により、相同性がないことが明らかになった。

20

【0155】

本発明で有用な他のZP糖タンパク質のヌクレオチド配列には、ヒト黄体ホルモン放出ホルモン(LHRH、Genbankアクセッション番号X01059)、ヒトZP3A糖タンパク質(Genbankアクセッション番号XM004616)、ヒトZPB糖タンパク質(Genbankアクセッション番号XM001779)、ウシZPAおよびB糖タンパク質(Genbankアクセッション番号AB042653; AB042652)、ニワトリZP1および3糖タンパク質(Genbankアクセッション番号AJ289697; AB031033)、マウスZP1、2、および3糖タンパク質(Genbankアクセッション番号NM011776; NM011775; NM009580)、ハリネズミZP3糖タンパク質(Genbankアクセッション番号AF304487)、ポッサムZPA(Genbankアクセッション番号AF263025)、フクロギツネZPAおよびB(Genbankアクセッション番号AF263014; AF263013)、フクロギツネZP2および3(Genbankアクセッション番号AF079525; AF079524)、ブタZP1、2、および3糖タンパク質(Genbankアクセッション番号S74651; E07737; D45064)、ラットZP1、2、および3糖タンパク質(Genbankアクセッション番号D78482; AB000929; AB000928)、マーモセットZP1および2糖タンパク質(Genbankアクセッション番号Y10822; Y10767)、ネコZP2および3(Genbankアクセッション番号E07930; E06506)、イヌZP2および3(Genbankアクセッション番号D45064; D45070)、およびワラビーZP3糖タンパク質(オーストラリア特許番号AU78554/98)、が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0156】

本明細書中で使用される、用語「透明帯糖タンパク質」には、完全なZPタンパク質、ZPの酵素分解または化学的変性形態、またはその組み合わせが含まれる。さらに、透明帯糖タンパク質には、本来免疫原性を示さないが、下記の免疫原性キャリア分子(例えば、LT-B)と化学的に結合した場合に免疫原として使用することができる単離ZP抗原決定基が含まれる。ZP抽出物には、完全な抽出物またはZPを含む1つまたは複数の3つの各糖タンパク質画分が含まれる。

【0157】

50

他の避妊タンパク質

上記のZP糖タンパク質またはそのフラグメントに加えて、他のタンパク質が本発明の避妊タンパク質として有用である。例えば、1つの実施形態では、避妊タンパク質を、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)、黄体形成ホルモン(LH)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、および抗精子抗原からなる群から選択することができるが、決してこれらに限定されない。これらの避妊タンパク質に加えて、本発明で有用な避妊タンパク質をコードするヌクレオチド配列もまた、コードされた避妊タンパク質を発現するトランスジェニック植物の作製で有用である。例えば、本発明で有用なGnRHをコードするヌクレオチド配列には、ヒトGnRH11(Genbankアクセッション番号XM005041)、ラットGnRH11(Genbankアクセッション番号M31670)、フクロギツネGnRH(Genbankアクセッション番号AF193516)、およびトガリネズミGnRH(Genbankアクセッション番号AF107315)が含まれるが、これらに限定されない。本発明で有用なLHをコードするヌクレオチド配列には、ラットLH(Genbankアクセッション番号D00576)、ブタLH(Genbankアクセッション番号D00579)、サイLH(Genbankアクセッション番号AF024521)、バクLH(Genbankアクセッション番号AF047606)、ウマLH(Genbankアクセッション番号Y16326; Y16265)、ウシLH(Genbankアクセッション番号M11506)、およびイヌLH(Genbankアクセッション番号Y00518)が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0158】

1つの実施形態では、本発明の避妊タンパク質には、抗精子抗原が含まれる。完全な精子抽出物での雄および雌動物の免疫化により、不妊症を発症することが以前に示されている(Tungら、1979、J. Reprod. Immunol.、20、931)。したがって、本発明の避妊タンパク質は、精子関連タンパク質またはこのようなタンパク質をコードする核酸配列(PH30(米国特許第5,935,578号)、PH34(米国特許第5,723,305号)、SP17(米国特許第5,814,456号)、SP22(米国特許第6,197,940号)、SP56(マウスSP56:Genbankアクセッション番号U17108、LDHC₄(ヒトLDHC₄:Genbankアクセッション番号J02938;米国特許第5,891,992号;Goldburg、「精子特異的抗原としてのLDH-X」、T. Wegmann and T. J. Gill編、「生殖免疫学」、Oxford University Press、1981)、フェルチリン(マウスフェルチリン:Genbankアクセッション番号AF167406;ヒトフェルチリン:Genbankアクセッション番号AJ133005;ツバイフェルチリン:Genbankアクセッション番号Y15965;ヒビフェルチリン:Genbankアクセッション番号Y15520;ゴリラフェルチリン:Genbankアクセッション番号Y15492;タマリンフェルチリン:Genbankアクセッション番号Y15512;ウシフェルチリン:Genbankアクセッション番号AF086808;およびラットフェルチリン:Genbankアクセッション番号Y08616)が含まれるが、これらに限定されない)を含み得る。

【0159】

粘膜を標的とするタンパク質

本発明の1つの実施形態では、トランスジェニック植物を動物に投与し、前記植物は1つまたは複数の上記避妊タンパク質の一部またはエピトープを発現する。免疫原性物質の粘膜標的は、M細胞の確実な認識に十分な程度の粒子サイズまたは天然の結合親和性に非常に依存することが当分野で認識される。さらに、粘膜免疫系を、低用量の一定のタンパク質クラスrの供給により刺激することができることを見出された。特に、粘膜上の細胞表面に存在する種々の糖脂質および糖タンパク質に特異的に結合することができる性質を共有するタンパク質を使用してこれを行うことができる。したがって、本発明は、複雑な免疫避妊タンパク質または所望ならば避妊エピトープの免疫原性を増強するためのそのより小さな可溶性避妊抗原(ZP3エピトープまたはGnRHなど)に融合した補助的免疫原性

タンパク質を含む融合タンパク質を提供する。

【0160】

本発明の粘膜免疫応答の刺激に有用な補助タンパク質には、シガ毒素B (StxB) (Genbankアクセッション番号AJ132761)、ブドウ球菌エンテロトキシンB (SEB) (Genbankアクセッション番号M11118)、大腸菌易熱性エンテロトキシンB (LT-B) (Genbankアクセッション番号AB011677)、大腸菌易熱性エンテロトキシンAサブユニット (LT-A) (Genbankアクセッション番号AB011677)、ノーウォークウイルスキャプシドタンパク質 (NVCP) (Genbankアクセッション番号AF093797)、およびB型肝炎表面抗原 (HBsAg) (Genbankアクセッション番号AF090842)が含まれる。免疫原性の付与に会合が必要な場合、このような抗原タンパク質が抗原粒子および/または複合体として会合することが好ましい。本発明で有用な避妊タンパク質および粘膜免疫原性を増強するタンパク質を含む融合タンパク質の構築を、以下に記載する。

【0161】

B型肝炎表面抗原 (HBsAg)

植物中でのウイルス様粒子 (VLP) としてのHBsAgを発現可能性が示されている (Masonら、1992)。VLPは、非経口投与が許可されている組換え酵母由来ワクチンに類似している。HBsAg粒子の形成には、4つの膜貫通ドメインを含む小胞体 (ER) 膜へのペプチドの挿入およびその後のER管腔への粒子の出芽が必要である。植物由来のHBsAgは、マウスモデルで研究した場合、B細胞およびT細胞エピトープの両方を保持する (Thanavalaら、1995)。植物細胞が免疫原性HBsAgを産生することができるという所見は、植物が複合体構造に組み立てられる動物、ウイルス、または細菌タンパク質の可能な発現系であることを示す。したがって、免疫原性HBsAg粒子に必要な遺伝子エレメントを同定した。これらのエレメント (例えば、調節領域およびコード領域) を、本明細書中に記載の避妊タンパク質をコードするベクターに組み込んで、植物中でのこの抗原の発現を増幅する方法を提供することができる。

【0162】

ノーウォークウイルスキャプシドタンパク質 (NVCP)

NVCPの植物中での発現およびVLPアセンブリおよびマウス中でのその経口免疫原性が報告されている (Masonら、1996)。NVCPは全タンパク質の0.3%であり、タバコ葉およびジャガイモ塊茎中で約60%の有効性でVLPに構築される。ネガティブ染色電子顕微鏡で観察した場合、空のキャプシドは昆虫細胞系で産生されたキャプシドと事実上区別することができない。さらに、各回が10μgほどで4回の強制飼養で投与するか、各回が50μgほどで4回のジャガイモ塊茎スライスの直接採餌によって投与した場合、マウスでは材料は経口免疫原性であった。血清IgGおよび腸粘膜IgAは共に植物ワクチンによって刺激された。したがって、免疫原性量のNVCP抗原のVLPの作製手段を同定した。本発明と共にこれらを使用して、本明細書中に記載の遺伝子増幅方法によって植物中でより高い免疫原レベルを得ることができる。

【0163】

大腸菌易熱性エンテロトキシン (LT)

LTは、同時投与抗原に対する免疫応答を刺激する強力な粘膜免疫原およびアジュバントである (Clementsら、1988)。植物中で発現するLTのBサブユニット (LT-B) を、ガングリオシドC_{M1}結合能力を保有する活性オリゴマーに構築する (Haqら、1995)。LT-Bのカルボキシル末端でのミクロソーム保持配列 (SEKDEL) の付加により、植物組織中でのその蓄積が増加する一方で、C_{M1}結合および免疫原性が可能であることが見出された。マウスに投与した植物由来のLT-Bを使用した経口試験では、強制飼養または未調製 (スライス以外) のジャガイモ塊茎の採餌によって投与したいずれのタバコ葉抽出物も、LT-Bに対する血清および腸粘膜抗体を刺激した (Haqら、1995)。これらの動物由来の血清抗LT-BはLT活性の阻害を示し、保護ワクチンとしてのその潜在的な価値を示す。

10

20

30

40

50

【0164】

避妊タンパク質発現用のワクチン

本発明の使用の中心は、避妊タンパク質をコードする核酸配列および任意選択的に粘膜標的タンパク質をコードする核酸配列を含み、目的の植物細胞に移入して避妊タンパク質を発現するトランスジェニック植物を産生することができる核酸構築物の作製および/または使用である。好ましい実施形態では、核酸構築物は、植物発現ベクター（植物細胞中で調製および増殖することができるプラスミド）である。構築物の核酸配列は、当分野で公知のDNA、RNA、合成核酸、またはその組み合わせを含み得る。核酸構築物が避妊タンパク質および粘膜標的タンパク質の両方を含む実施形態では、各成分をコードする配列を必要な他の配列（例えば、調節配列）と共に散在し得る。

10

【0165】

本発明で有用な核酸配列を、本発明の植物細胞中での避妊タンパク質発現を媒介するために使用することができる当業者に公知のプラスミド骨格を使用して作製することができる。出発材料として使用することができる適切なベクターは、当分野で公知である。植物組織の形質転換に適切なベクターは、deFramondら（Biotechnology、1983、263）、Anら（EMBO、1985、277）、およびRothsteinら（Gene、1987、53）に記載されており、pBluescript（Stratagene、La Jolla、CA）、pIBT210（Haqら、1995、Science、268、714）、pGEM（Promega、Madison、WI）、pGPTV.kan（Beckerら、1992、Plant Mol. Biol.、20、1195~1197）、アグロバクテリウム-Tiプラスミド（Whiteら、「植物バイオテクノロジー」、Kung and Arntzen編、Butterworth Pub.、Boston、MA、1989）が含まれるが、これらに限定されない。これらのベクターに加えて、本発明での使用に適切な哺乳動物他のベクターが当分野で産生されている。

20

【0166】

本発明で有用なベクター構築物は、好ましくは、避妊タンパク質をコードするDNA配列を含む。従来手段によって避妊タンパク質をコードするDNA配列を獲得し、植物形質転換に適切なベクターに挿入する。例えば、DNA配列を、ゲノムクローンの遺伝子バンクから単離することができる。あるいは、DNA配列を、逆転写によって調製することができる。次いで、細胞、組織、および植物を形質転換する下記の公知の種々の技術によって、ベクターを植物に移入する。

30

【0167】

避妊タンパク質またはその一部のアミノ酸配列中に化学合成することができるDNA配列は公知である。いくつかの先行技術を使用して、避妊タンパク質のアミノ酸配列を決定することができる（例えば、Ausubelら、「分子生物学ショートプロトコール」、第3版、John Wiley & Sons, Inc.、1995を参照のこと）。

【0168】

避妊タンパク質またはその一部をコードするDNA配列を、避妊タンパク質が性格に発現される様式で適切なベクターに挿入する。言い換えれば、植物組織中でのDNA配列の発現時に正確なアミノ酸配列が産生されるように、DNA配列を適切な方向およびオープンリーディングフレームに位置させる。従来技術によれば、一般に、植物組織で作動可能なプロモーターおよび避妊タンパク質をコードするDNA配列を含むキメラDNA配列を構築する。DNA配列は、さらに、植物組織中で作動可能な3'非コード配列を含み得る。1つの実施形態では、キメラDNA配列は、さらに、発現時に融合タンパク質が産生されるようにLT-Bなどの避妊タンパク質の粘膜標的を増強することができるポリペプチドのコード配列を含み得る。キメラDNA配列を、公知の植物形質転換ベクターの制限部位への避妊タンパク質またはその一部をコードするDNA配列の挿入によって適切なベクター内にインサイチュで調製することができる。あるいは、キメラ遺伝子を最初に構築し、その後ベクターに挿入して、植物形質転換ベクターを産生することができる。一般に、

40

50

本発明で有用なベクターを、大腸菌などの原核生物宿主細胞に挿入し、ベクター数を複製によって増幅させる。次いで、ベクターを、当分野で公知の技術（例えば、Ausubelら、前出を参照のこと）を使用して原核生物宿主細胞から単離し、これを使用して、目的の宿主植物細胞を形質転換することができる。

【0169】

本発明のプロモーター配列には、本発明の選択された植物宿主細胞で作動可能なプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。本発明のDNA構築物は、好ましくは、目的のヌクレオチド配列の5'末端に作動可能に連結された植物機能性プロモーターを有する。好ましいプロモーターは、CVMV、Sein、Gelvinプロモーター、CaMV35S、トマトE8、パタチン、ユビキチン、マンノピンシンターゼ(mas)、イネアクチン1、ダイズ種子タンパク質グリセリン(Gly1)、ダイズ植物貯蔵タンパク質(vsp)、および顆粒結合デンプンシンターゼ(gbss)から選択される。本発明の構築物はまた、他で(Carringtonら、1990)記載されているタバコエッチウイルス(TEV)エンハンサーなどの翻訳エンハンサー領域を含み得る。任意選択的に、本発明の構築物は、目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたSまたはL配列(Masonら、1988)などの少なくとも1つの植物貯蔵タンパク質(VSP)シグナルペプチドコード配列を含み得る。

10

【0170】

好ましくは、避妊タンパク質および任意選択的に粘膜標的タンパク質をコードするDNA構築物配列は、これらは全て1つのプロモーター配列の調節下にあり、得られた融合タンパク質の発現は、それぞれ3つのエレメントを含む。これにより、避妊タンパク質および粘膜標的タンパク質が化学量論的比率で合成され、避妊タンパク質および粘膜標的タンパク質が類似のレベルで発現することが確保される。あるいは、粘膜標的タンパク質の発現は、双方向様式または避妊タンパク質をコードする配列の3'構築物に挿入されるが、粘膜標的タンパク質をコードする配列の5'に挿入されない第2のプロモーターから駆動することができる。

20

【0171】

上記のDNA構築物の保有に加えて、本発明で有用なベクターは、選択マーカー遺伝子をさらに含み得る。本発明で有用なマーカー遺伝子には、選択マーカーをコードする遺伝子（例えば、細菌テトラサイクリン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子）を含み得る。テトラサイクリン耐性遺伝子の組み込みにより、本発明のプラスミド調製手順で選択因子としてテトラサイクリンを使用することが可能である。テトラサイクリン耐性遺伝子使用の1つの利点は、テトラサイクリンが大腸菌によって分解されず、培養時により多数のテトラサイクリン添加なくてよいことである。さらに、テトラサイクリンは薬物が使用される状況で抗生物質として処方される頻度が低く、それにより薬物が使用される状況下におけるプラスミド耐性遺伝子を通した読み取りが抗生物質の使用に妨害される可能性が低いので、アンピシリンをコードする遺伝子よりもテトラサイクリン耐性遺伝子が好ましい。

30

【0172】

本発明で有用なさらなるマーカー遺伝子には、殺菌薬（特に、カナマイシン、G418、ブレオマイシン、ハイグロマイシン、またはクロラムフェニコールなどの抗生物質）への耐性が含まれる。本発明で有用なさらなるマーカー遺伝子には、有機リン殺虫剤およびbialaphosphateなどの除草剤への耐性が含まれる。本発明で有用なさらなるマーカー遺伝子には、グルコリニダーゼ(GUS)または緑色蛍光タンパク質(GFP)などの可視マーカータンパク質をコードするものも含まれる。使用した特異的のマーカーは、移入した核酸を欠く細胞と比較して形質転換細胞を選択可能なマーカーである。

40

【0173】

ベクターはまた、この系を使用した後期形質転換のためにアグロバクテリウム・ツメファシエンス中でベクターを保持することを所望する場合などにアグロバクテリウム・ツメファシエンス複製起点を含み得る。この事象では、目的のタンパク質（すなわち、避妊タンパク質）をコードするヌクレオチド配列は、宿主植物細胞に導入するための左側および右

50

側の T - D N A 境界領域に隣接している。

【 0 1 7 4 】

大腸菌などの細菌の菌株を、本発明の発現ベクターでトランスフェクトして当分野で周知の方法 (A u s u b e l、前出) で即時発現カセットを成長 / 増殖することができる。精製発現カセットを、アグロバクテリウム・ツメファシエンスに付加し、電気パルスまたは熱ショックに供してカセット中にベクターを移入することができ、このベクターはシャトルベクターとして完全な存在することができる。アグロバクテリウム・ツメファシエンス中のヘルパー T i プラスミドは、シャトルベクターから植物細胞に T - D N A を直接導入するために必要な v i r 遺伝子を提供することができる。あるいは、ベクターを、腫瘍誘導 (T i) プラスミドで相同組換えして、T i プラスミドの T - D N A の即時カセットを交換することができる。好ましい実施形態では、本発明は、植物細胞に移入された D N A 構築物が染色体に安定に組み込まれた、植物細胞の安定な形質転換方法を提供する。

10

【 0 1 7 5 】

トランスジェニック植物

本発明は、本発明で有用な 1 つまたは複数の避妊タンパク質を発現する植物細胞を含むトランスジェニック植物および植物材料 (例えば、葉、果実、根) を提供する。好ましい実施形態では、目的の植物細胞を 1 つまたは複数の上記の D N A 構築物で形質転換し、形質転換植物細胞内での構築物の発現により、植物細胞により避妊タンパク質が産生される。

【 0 1 7 6 】

植物細胞への核酸の移入方法

植物への遺伝子導入方法には、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (T i プラスミド系) の使用が含まれるが、これに限定されない。アグロバクテリウム・ツメファシエンスの腫瘍誘導 (T i) プラスミドは、植物宿主ゲノムに組み込む導入 D N A (T - D N A) と呼ばれるプラスミド D N A のセグメントを含む。第 1 に、大腸菌中で複製されるプラスミドベクターを構築する。このプラスミドは、目的のタンパク質をコードする D N A を含み、この D N A は、植物細胞に導入され、植物ゲノムに組み込まれる D N A セグメントの限度を定義する T - D N A 境界配列に隣接する。通常、選択マーカー (カナマイシンなどの抗生物質への耐性をコードする遺伝子など) をコードする遺伝子もまた、左境界 (L B) と右境界 (R B) 配列との間に挿入される。形質転換植物細胞中でのこの遺伝子の発現により、組み込まれた T - D N A 領域を有する植物または植物細胞を同定するためのポジティブ選択法が得られる。第 2 に、プラスミドをアグロバクテリウムに導入する。アグロバクテリウムによるプラスミド D N A の直接取り込みによってこれを行うことができる。その後の植物への T - D N A の導入のために、使用するアグロバクテリウム株は、植物細胞への T - D N A の導入に不可欠な一組の誘導性の毒性 (v i r) 遺伝子セットを含まなければならない。

20

30

【 0 1 7 7 】

上記のアグロバクテリウム・ツメファシエンス遺伝子導入系は、クラウンゴール (植物組織の感染部位に腫瘍または擦り傷を形成する広範な双子葉植物および裸子植物の病気) の病原因子である (D e C l e e n e , M . ら、B o t . R e v .、4 2、3 8 9、1 9 7 6)。アグロバクテリウム系は、種々の植物組織の日常的な形質転換が可能ないように開発された (例えば、S c h e l l , J . ら、B i o / T e c h n o l o g y、1、1 7 5、1 9 8 3 ; C h i l t o n , M - D .、S c i e n t i f i c A m e r i c a n、2 4 8、5 0、1 9 8 3 を参照のこと)。この様式で形質転換された代表的な組織には、タバコ (B a r t o n , K ら、C e l l、3 2、1 0 3 3、1 9 8 3) ; トマト (F i l l a t t i , J . ら、B i o / T e c h n o l o g y、5、7 2 6、1 9 8 7) ; ヒマワリ (E v e r e t t , N . ら、B i o / T e c h n o l o g y、5、1 2 0 1、1 9 8 7) ; ワタ (U m b e c k , P . ら、B i o / T e c h n o l o g y、5、2 6 3、1 9 8 7) ; ナタネ (P u a , E . ら、B i o / T e c h n o l o g y、5、8 1 5、1 9 8 7) ; ジャガイモ (F a c c i o t t i D . ら、B i o / T e c h n o l o g y、3、2 4 1、1 9 8 5) ; ポプラ (P y t h o u d , F . ら、B i o / T e c h n o l o g y、5、

40

50

1323、1987) ; およびダイズ (Hinchee, M. ら、Bio/Technology、6、915、1988) が含まれる。他の植物を、日常的な方法の延長またはこれらの方法の修正形態によって形質転換することができる。

【0178】

アグロバクテリウム株およびプラスミド構築物ストラテジーの複数の選択肢を使用して、植物の遺伝子形質転換を至適化することができる。例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのみが使用されるアグロバクテリウム株ではない。アグロバクテリウム・リゾゲネスなどの他のアグロバクテリウム株は、いくつかの適用においてより適切であり得る。双子葉植物種の根毛形成を誘発するアグロバクテリウム・リゾゲネスは、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのTiプラスミドと類似の様式で機能するRi (根に含まれる) プラスミドと呼ばれる巨大な染色体外エレメントを保有する。アグロバクテリウム・リゾゲネスを使用した形質転換をアグロバクテリウム・ツメファシエンスと同様に開発し、これを首尾よく使用して、例えば、アルファルファが形質転換されている (Sukhapinda, K. ら、Plant Mol. Biol.、8、209、1987)。

10

【0179】

植物組織の接種方法は、植物種およびアグロバクテリウム送達系によって変化する。都合のよいアプローチはジャガイモ形質転換用の葉ディスク手順であるが、完全な植物の分化および再生のための良好な供給源を提供する組織移植片を使用してアグロバクテリウム媒介形質転換を行うことができる。一定の条件下ではナース組織の添加が望ましいであろう。アグロバクテリウム・ツメファシエンスでの再生プロトプラストのインビトロ形質転換などの他の手順により、同様に形質転換植物を得ることができる。

20

【0180】

アグロバクテリウム中間体を使用しないで植物および植物組織を形質転換するためのいくつかのいわゆる「直接的」遺伝子導入手順 (例えば、プロトプラストからの植物再生) が開発されている (Evans, D. A. ら、「植物細胞培養ハンドブック」、1、124、1983)。プロトプラストから植物種を再生することができる場合、直接的遺伝子導入を使用することができ、形質転換はアグロバクテリウム・ツメファシエンスの使用に依存しない。プロトプラストの直接的形質転換では、外因性遺伝物質のプロトプラストへの取り込みを、化学物質または電場の使用によって増強することができる。その後、外因性材料を、核ゲノムに組み込むことができる。

30

【0181】

双子葉植物 *Nicotiana tabacum* (タバコ) で初期の研究が行われ、外来DNAが組み込まれて子孫植物に伝達されることが示された (Paszkowski, J. ら、EMBO J.、3、2717、1984; Potrykus, I. ら、Mol. Gen. Genet.、199、169、1985)。単子葉植物プロトプラストがこの手順によって形質転換されている (例えば、一粒小麦 (Lorz H. ら、Mol. Gen. Genet.、199、178、1985); *Lolium multiflorum* (イタリアンライグラス) (Potrykus, I. ら、Mol. Gen. Genet.、199、183、1983); メイズ (Rhodes, C. ら、Bio/Technology、5、56、1988); およびブラックメキシカンスイートコーン (Fromm, M. ら、Nature、319、719、1986))。プロトプラストから再生した他の植物には、イネ (Abdulah, R. ら、Bio/Technology、4、1987、1987); ナタネ (Kansha ら、Plant Cell Reports、5、101、1986); ジャガイモ (Tavazza, R. ら、Plant Cell Reports、5、243、1986); ナス (Sihachaki, D. ら、Plant, Cell, Tissue, Organ Culture、11、179、1987); およびキュウリ (Jia, S-R. ら、J. Plant Physiol.、124、393、1986) が含まれる。他の種類のプロトプラストの直接的形質転換方法が明らかである。

40

【0182】

50

エレクトロポレーションと呼ばれるプロセスでの適切なDNAの存在下での電気パルスを使用したプロトプラストの処理によって、植物プロトプラストへのDNAの移入を行うことができる。この方法では、プロトプラストを単離し、マンニトール溶液に懸濁する。超らせん状または環状プラスミドDNAを添加する。溶液を混合し、室温で10～100μ秒未満の約400V/cmのパルスに供する。膜の可逆的な物理的破壊によりDNAがプロトプラストに取り込まれる。

【0183】

リポソーム融合もまた、植物細胞の形質転換方法であると示されている。この方法では、所望の遺伝子を保有するリポソームと共にプロトプラストが運ばれる。膜が融合するにつれて、外来遺伝子はプロトプラストに導入される(Dehayes, A.ら、EMBO J., 4, 2731, 1985)。

10

【0184】

N. tabacum(双子葉植物)およびLolium multiflorum(単子葉植物)においてポリエチレングリコール(PEG)媒介形質転換が行われている。これは、 Mg^{2+} 、PEG、およびおそらく Ca^{2+} との間の相乗的相互作用に基づいた直接的遺伝子導入の化学的手順である(Negrutiu, R.ら、Plant Mol. Biol., 8, 363, 1987)。あるいは、外因性DNAを、微量注入によって細胞またはプロトプラストに移入することができる。プラスミドDNA溶液を、細く引いたガラスニードルを使用して細胞に直接注入する。

【0185】

別の開発された直接的遺伝子導入手順は、DNAを保有するマイクロプロジェクタイトルの細胞の打ち込みを含む(Klein, T. M.ら、Nature, 327, 70, 1987)。「遺伝子銃」手順では、外因性DNAをコートしたタングステン粒子または金粒子を、標的細胞に向かって加速させる。タマネギで少なくとも一過性発現が得られた。この手順を使用して、懸濁培養でのブラックメキシカンスイートコーンおよびメイズ未熟胚ならびにダイズプロトプラストにもDNAが移入されている(Klein, T. M.ら、Bio/Technology, 6, 559, 1988)。マイクロインジェクタイトルボンバードメントによって、メイズ、タバコ、オオムギ、カラスムギ、コムギ、イネ、ニンジン、バナナ、およびダイズの安定に形質転換された培養物が得られている。安定に形質転換された植物を再生し、この手順で回収することもできる(McCabe, D. E.ら、Bio/Technology, 6, 923, 1988)。

20

30

【0186】

形質転換された種子を産生するために、シロイヌナズナの花を、以下の手順で形質転換する。アグロバクテリウムを、成長した花に真空で侵入させ、得られた種子をマーカー耐性および外来遺伝子発現についてスクリーニングする。おそらく、雄蕊/花粉、子房/卵、またはすでに受精している場合はさらに成長した接合子を形質転換する。この方法(Clough & Bent, 1998, Plant J., 16, 735に記載されている)を使用して、At2S-2種子プロモーターの転写調節下でrep遺伝子を含む構築物でシロイヌナズナを形質転換する。

【0187】

形質転換後、形質転換細胞または植物組織を、従来の技術によって選択またはスクリーニングする。上記のキメラDNA配列を含む植物組織の形質転換細胞を、上記で引用されたものを含む公知の手順を使用して再生する。これらの技術によって最も容易に再生することができ、それにより本発明で好ましい植物種には、メイズ、ヒマワリ、ナタネ、クローバー、タバコ、ワタ、アルファルファ、イネ、ジャガイモ、ナスビ、キュウリ、およびダイズが含まれるが、これらに限定されない。再生した植物を、下記の標準的な方法によって形質転換についてスクリーニングする。再生植物の子孫をスクリーニングし、改良された植物および種子系列を開発するために組み込んだDNA配列の継続した存在についてスクリーニングおよび選択する。DNA配列を、種々の技術(古典的交配、プロトプラスト融合、核導入、および染色体導入が含まれる)によって他の遺伝子系列に移動させること

40

50

ができる。

【0188】

本発明で有用な植物、細胞、および種子

本発明の実施で 사용할 ことができる植物には、双子葉植物および単子葉植物が含まれる。これらには、タバコ、ニンジン、ホウレンソウ、トウガラシ、ジャガイモ、トマト、リンゴ、コムギ、ライムギ、ダイズ、イネ、メイズ、トウモロコシ、ベリー類（ストロベリーおよびラズベリーなど）、アルファルファ、およびバナナが含まれるが、これらに限定されない。ヒトの食品または動物飼料の成分として使用する哺乳動物食用植物は双子葉植物であるので、典型的には双子葉植物を使用するが、特に動物飼料に有用な一定の穀類の産生において単子葉植物の形質転換を適用することができる。これは、トマト、ダイズ、およびニンジンのジュースまたはミルクなどのヒトが容易に投与するためのジュース中に避妊タンパク質を産生するためにヒト免疫避妊で特に有利である。これらの植物ワクチン由来の細胞および種子もまた、本発明で有用である。

10

【0189】

上記のベクターで形質転換したトランスジェニック植物は、本発明の別の態様である。特に好ましいベクター用植物宿主には、バナナ、トマト、ジャガイモ、ニンジン、アルファルファ、ウマゴヤシ、メイズ、およびタバコが含まれる。

【0190】

ジャガイモ変種 FL1607（「Frito Lay 1607」）および Desiree、およびトマト変種 Tanksley TA234TM2R は、本明細書中に記載の方法を使用してバイナリベクターで形質転換された特に好ましい変種である。これらの形質転換変種のうち、Desireeのみが市販されている変種であり、他の変種は、Frito-Lay (Rhinelander, WI) および Steve Tanksley (Dept. of Plant Breeding, Cornell Univ.) から入手することができる。トマトは遺伝子形質転換が容易であり、発現の調節に果実特異的な成熟依存性プロモーターを利用することができるので、外来タンパク質発現のモデル系としてトマトが好ましい (Giovannoni ら、1989)。E8プロモーターを使用して、成熟トマト果実中でのポリガラクトナーゼ (Giovannoni ら、1989) および野生型トマト果実中でのモネリン (Penarrubia ら、1992) の高レベル産生を媒介されている。

20

30

【0191】

植物細胞懸濁培養物は、広く一般に公知であり、当業者が利用可能である。完全な植物系よりも形質転換、成長、およびタンパク質産生を迅速に行うことができるので、外来タンパク質発現用のモデル系として植物細胞培養が好ましい。植物細胞懸濁培養物を液体中で成長させるか、カルス産生のために固体培地に移すことができる。本発明で記載されている目的に使用することができる細胞懸濁培養物の一般例には、ニンジン、タバコ（例えば、NT-1またはBY-1細胞株）、およびメイズが含まれるが、これらに限定されない。

【0192】

形質転換植物材料の検出

本発明は、避妊タンパク質をコードする核酸配列および避妊タンパク質自体を検出する方法（サザンプロットおよびノーザンプロット分析、PCRベースの検出方法、および本発明の目的のタンパク質の免疫学的検出方法が含まれるが、これらに限定されない）を提供する。本発明にしたがってこれらの技術を使用して、避妊タンパク質および任意選択的に粘膜標的タンパク質をコードする核酸配列の存在を確認し、避妊タンパク質および粘膜標的タンパク質自体を確認することができる。

40

【0193】

目的のヌクレオチド配列の検出

1. サザンプロット分析

サザンプロット分析を使用して、PCR増幅産物または非PCRベースのアッセイを介し

50

て全ゲノムDNA試験サンプルから目的のヌクレオチド配列を検出することができる。サザンブロット分析方法は、当分野で周知である(Ausubelら、前出; Sambrookら、1989、「分子クローニング: 実験マニュアル」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY)。この技術は、電気泳動ゲルから膜支持体へのDNAフラグメントの移行およびそれによるDNAフラグメントの固定を含む。得られた膜により、ゲルの結合パターンが半永久的に再現される。

【0194】

以下の方法に従って、サザンブロット分析を行う。本発明の方法によって核酸ベクターで形質転換した植物から得たゲノムDNA(5~20 μ g)を、適切な制限酵素で消化し、0.6~1.0%のアガロースゲル上でTAE緩衝液中で分離する。DNAを、当分野で周知の方法(Ausubelら、前出; Sambrookら、前出)によって市販のナイロンまたはニトロセルロースメンブレン(例えば、Hybond-Nメンブレン、Amersham、Arlington Heights、IL)に移す。移行およびUV架橋後、メンブレンを65のハイブリッド形成溶液(例えば、5 \times SSC、5 \times Denhardt溶液、1%SDSでのストリンジェントな条件下)中で標識プローブとハイブリッド形成させる。あるいは、68または塩濃度を減少させた(例えば、0.1 \times SSC)ハイブリッド緩衝液中で高ストリンジェンシーハイブリッド形成を行うことができる。ハイブリッド形成条件は、当分野で公知のパラメーターにしたがって必要に応じて変化させることができる。ハイブリッド形成後、メンブレンを室温の2 \times SSC/0.1%SDSおよび65の0.2 \times SSC/0.1%SDSで洗浄し、フィルムに露光する。洗浄緩衝液のストリンジェンシーもまた、バックグラウンドシグナルの量によって変化し得る(Ausubelら、前出)。

【0195】

核酸プローブ-標的核酸ハイブリッドの検出は、核酸プローブをDNA標的とハイブリッド形成させるステップを含み、前記プローブは上記のDNA構築物の核酸配列の一部と相補的である。共有結合がハイブリッド形成の特異性を妨害しないように、このプローブを放射性標識するか、酵素に共有結合させることができる。植物DNAとプローブとの間に得られたハイブリッドを検出することができる。プローブの標識方法には、ランダムオリゴヌクレオチドプライミング合成、ニック翻訳、キナーゼ反応、またはポリメラーゼ連鎖反応(Ausubelら、前出を参照のこと)が含まれる。あるいは、非同位体法によってハイブリッドを検出することができる。非同位体標識プローブを、ビオチンもしくはジゴキシゲニン、蛍光基、化学発光基(例えば、ジオキセタン、特に誘発ジオキセタン)、酵素、または抗体の添加によって産生することができる。典型的には、蛍光法または酵素法によって非同位体プローブを検出する。遊離プローブからの複合体の分離およびオートラジオグラフィーまたはシンチレーション計数による複合体レベルの測定によって放射性標識プローブ-標的核酸複合体の検出を行うことができる。プローブが酵素に共有結合している場合、酵素-プローブ-標的核酸複合体を、遊離酵素結合物から単離し、酵素検出のために基質を添加する。感度が $10^3 \sim 10^6$ 増加した発色または発光の変化として酵素活性を観察する。調製物の例およびハイブリッド形成プローブとしての核酸プローブ-酵素結合物(酵素はアルカリホルファターゼである)の使用は、(Jablonskiら、1986、Nuc. Acids Res.、14、6115)に記載されている。

【0196】

2ステップ標識増幅法は、当分野で公知である。これらのアッセイは、小リガンド(ジゴキシゲニンまたはビオチンなど)が目的の遺伝子(すなわち、避妊タンパク質またはその一部をコードする遺伝子)に特異的に結合することができる核酸プローブに結合する原理に基づく。

【0197】

2ステップ標識増幅方法によれば、核酸プローブに結合した小リガンドが、抗体-酵素結合物によって特異的に認識される。例えば、ジゴキシゲニンを、核酸プローブに結合させ

、アルカリホスファターゼが化学発光基質と反応する抗体 - アルカリホスファターゼ結合物によって検出する。核酸プローブ - 小リガンド結合物の調製方法については、(Martinsonら、1990、Bio Techniques、9、762)を参照のこと。あるいは、小リガンドを、第1のリガンドと特異的に複合体形成することができる第2のリガンド - 酵素結合物によって認識する。この小リガンド相互作用様式の周知の例は、ピオチン - アビジン相互作用である。核酸プローブの標識方法およびピオチン - アビジンベースのアッセイでのその使用は、Rigbyら、1977、J. Mol. Biol.、113、237およびNguyenら、1992、Bio Techniques、13、116に記載されている。

【0198】

基本的なハイブリッド検出プロトコールの変形形態は当分野で公知であり、検出すべきハイブリッドの外来物質からの分離を促進し、そして/または標識部分からのシグナルを使用する修正形態が含まれる。多数のこれらの修正形態は、例えば、Matthews & Kricka、1988、Anal. Biochem.、169:1; Landegrenら、1988、Science、242:229; Mittlin、1989、Clinical Chem.、35、1819; 米国特許第4,868,105号、およびEPO公開番号225,807号に概説されている。

【0199】

2. ノーザンプロット分析

ノーザンプロット分析は、当分野で周知である。この技術は、RNA調製物中の特定の配列を検出するための電気泳動ゲルからメンブレン支持体へのRNAの移行を含む。

以下の方法にしたがってノーザンプロット分析を行う。上記のDNA構築物で形質転換した植物組織から得たRNAサンプル(MOPS緩衝液、ホルムアルデヒド、およびホルムアミドの添加によって調製)を、1xMOPS緩衝液を含むアガロース/ホルムアルデヒドゲルで分離した。RNAの完全性を決定するための臭化エチジウムでの染色および紫外線光下での視覚化後、RNAを、0.05M NaOH/1.5M NaClでの処理およびその後の0.5M Tris-HCl(pH7.4)/1.5M NaClとのインキュベーションによってハイブリッド形成させる。RNAを、当分野で周知の方法(Ausubelら、前出; Sambrookら、前出)によって市販のナイロンまたはニトロセルロースメンブレン(例えば、Hybond-Nメンブレン、Amersham, Arlington Heights, IL)に移す。移行およびUV架橋後、メンブレンを42のハイブリッド形成溶液(例えば、50%ホルムアミド/2.5%Denhardt溶液/100~200mgの変性サケ精子DNA/0.1%SDS/5xSSPE)中で標識プローブとハイブリッド形成させる。ハイブリッド形成条件は、Ausubelら、前出およびSambrookら、前出に記載のように、必要に応じて変化させることができる。ハイブリッド形成後、メンブレンを室温の2xSSC/0.1%SDS、42の1xSSC/0.1%SDS、および65の0.2xSSC/0.1%SDSで洗浄し、フィルムに露光する。洗浄緩衝液のストリンジェンジーもまた、バックグラウンドシグナルの量によって変化し得る(Ausubelら、前出)。

【0200】

3. PCR

本発明の目的の核酸配列(すなわち、避妊タンパク質をコードする核酸配列)を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってゲノムDNAまたは他の天然供給源から増幅する。PCR法は、当業者に周知である。

【0201】

PCRは、目的の標的配列を増幅させるために熱安定性DNA依存性DNAポリメラーゼによって触媒される複数のDNA複製サイクルの使用によって特定のDNA配列を迅速に増幅する方法を提供する。PCRには、増幅すべき核酸、増幅すべき配列に隣接した2つの一本鎖オリゴヌクレオチドプライマー、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、緩衝液、および塩が必要である。

10

20

30

40

50

【0202】

PCR法は、当分野で周知である。PCRは、Mullis and Faloona、1987、Methods Enzymol.、155、335（本明細書中で参考として組み込まれる）に記載のように行う。

【0203】

テンプレートDNA（少なくとも1fg；より有用には、1～1000ng）および少なくとも25pmolのオリゴヌクレオチドプライマーを使用してPCRを行う。典型的な反応混合物には、以下が含まれる。2μlのDNA、25pmolのオリゴヌクレオチドプライマー、2.5μlの10×PCR緩衝液1（Perkin-Elmer、Foster City、CA）、0.4μlの1.25μM dNTP、0.15μl（または2.5単位）のTaq DNAポリメラーゼ（Perkin-Elmer、Foster City、CA）、および全体積を25μlにする量の脱イオン水。プログラム可能なサーマルサイクラーを使用してPCRを行う。

10

【0204】

PCRサイクルの各ステップの長さおよび温度ならびにサイクル数を、実際のストリンジエンシー要件にしたがって調整する。アニーリングの温度およびタイミングを、プライマーがアニーリングするのに有効な温度および耐え得るミスマッチの程度の両方によって決定する。プライマーアニーリングのストリンジエンシーを至適化する能力は、十分に当業者の知識の範囲内である。30と72との間のアニーリング温度を使用する。テンプレート分子の最初の変性は、通常、92と99との間で4分間で起こり、その後の20～40サイクルは、変性（94～99で15秒間～1分間）、アニーリング（上記で考察して決定した温度、1～2分間）、および伸長（72での1分間）からなる。最終伸長ステップを、一般に、72で4分間行い、その後4で任意の時間（0～24時間）保持することができる。

20

【0205】

電気泳動を使用しないでPCR産物を定量的に検出するためのいくつかの技術は、本発明で有用であり得る。これらの技術（Taqman（商標）（Perkin-Elmer、Foster City、CA）などの市販のキットが存在する）のうちの1つを、転写物特異的アンチセンスプローブを使用して行う。このプローブは、PCR産物（例えば、目的の遺伝子由来の核酸フラグメント）に特異的であり、消光剤およびオリゴヌクレオチドの5'末端と複合体形成した蛍光レポータープローブを使用して調製する。異なる蛍光マーカーを、異なるレポーターに結合させて、1つの反応で2つの産物を測定することができる。Taq DNAポリメラーゼが活性化された場合、その5'-3'核酸分解活性によってテンプレートに結合したプローブの蛍光レポーターを切断する。消光剤の存在しない場合には、レポーターは、蛍光を発する。レポーターの色の変化は、各特異的産物の量に比例し、この変化を蛍光光度計によって測定し、それにより、各色の量を測定することができる。PCR産物を定量することができる。96ウェルプレートでPCR反応を行って、複数のサンプルを同時に処理および測定することができる。Taqman（商標）システムは、ゲル電気泳動を必要とせず、検量線を使用した場合に定量することができるというさらなる利点を有する。

30

40

【0206】

目的のタンパク質配列の検出

1. 抗体の調製

本発明の避妊タンパク質に特異的な抗体は、タンパク質の精製および検出に有用である。抗体により、このような抗体の結合（可変）領域を使用した構築および他の抗体修飾が含まれる。したがって、本発明で有用な抗体は、完全な抗体、抗体フラグメント、多機能性抗体凝集物、または一般に抗体由来の1つまたは複数の特異的結合部位を含む物質を含み得る。抗体フラグメントは、Fv、Fab、もしくはF(ab')₂フラグメントなどのフラグメントまたは一本鎖Fvフラグメントなどのその誘導体であり得る。抗体または抗体フラグメントは、非組換えであるか、組換えであるか、ヒト化することができる。抗体

50

は、免疫グロブリンイソ型（例えば、I g GおよびI g Mなど）であり得る。さらに、適切な場合、免疫グロブリンまたはそのフラグメントの凝集体、ポリマー、誘導體、および結合物を使用することができる。

【0207】

抗体産生に有用な本発明の目的の遺伝子のタンパク質産物（またはそのフラグメントもしくはオリゴペプチド）生物活性を必要としないにもかかわらず、抗原性を示さなければならない。特異的抗体の誘導に使用するペプチドは、少なくとも5個のアミノ酸、好ましくは少なくとも10個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有し得る。好ましくは、ペプチドは、天然のタンパク質領域と同一なはずであり、天然に存在する小分子の全アミノ酸配列を含み得る。本発明の避妊タンパク質の種特異的エピトープに対応するアミノ酸の短いストレッチを、L T - Bなどの別のタンパク質（すなわち、粘膜標的タンパク質）由来のアミノ酸と融合することができ、キメラ分子に対して抗体が産生される。当分野で周知の手順を、本発明の目的のタンパク質に対する抗体の産生のために使用することができる。

10

【0208】

抗体産生のために、ヤギ、ウサギ、ラット、マウスなどを含む種々の宿主を、本発明の目的の遺伝子のタンパク質産物（または免疫原性を保持するその一部、フラグメント、またはオリゴヌクレオチド）での注射によって免疫化することができる。宿主の種に依存して、種々のアジュバントを使用して、免疫学的応答を増大させることができる。このようなアジュバントには、F r e u n d アジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性剤、P l u r o n i c ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンベットヘモシアニン、およびジニトロフェノールが含まれるが、これらに限定されない。B C G（カルメットゲラン菌）およびコリネバクテリウム - パルヴムは、潜在的に有用なヒトアジュバントである。

20

【0209】

a . ポリクローナル抗体

抗原タンパク質を、その免疫原性を増大させるために従来キャリアに結合させ、ペプチド - キャリア結合物に対する抗血清を惹起する。ペプチドのキャリアタンパク質へのカップリングおよび免疫化を、記載のように行うことができる（D y m e c k i ら、1992、J . B i o l . C h e m .、267、4815）。E L I S A（以下）またはドットブロッキングまたはスポットブロッキングによって血清の力価を測定することができる（B o e r s m a a n d V a n L e e u w e n、1994、J . N e u r o s c i . M e t h o d s、51、317）。同時に、抗血清を、記載のように調製した組織切片で使用することができる。有用な血清は、例えば、G r e e n ら、1982、C e l l、28、477の手順後のE L I S Aによって適切なペプチドと協力を反応する。

30

【0210】

b . モノクローナル抗体

モノクローナル抗体の調製技術は周知であり、モノクローナル抗体を、A r n h e i t e r ら、1981、N a t u r e、294、278に記載のように、そのレベルが測定されているか不活化されているか親和性精製されており、好ましくはキャリアに結合した候補抗原を使用して調製することができる。

40

【0211】

モノクローナル抗体を、典型的には、ハイブリドーマ組織培養物またはハイブリドーマ組織が移入された動物から得た腹水から得る。

【0212】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ（またはポリクローナル血清）を、標的タンパク質に結合する抗体についてスクリーニングすることができる。

【0213】

2 . 抗体検出方法

特に好ましい免疫学試験は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の使用に依存し、これらには、酵素結合免疫アッセイ（E L I S A）、免疫ブロッキング、免疫組織

50

化学、および免疫沈降 (Humason, G. L., 1979, Animal Tissue Techniques, 第4版, W. H. Freeman & Co., San Francisco, CA; Voller, 19878, Diagnostic Horizons, 2:1, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Vollerら, 1978, J. Clin. Pathol., 31, 507; 米国特許再発行第31, 006号; 英国特許第2, 019, 408号; Butler, 1981, Methods Enzymol., 73, 482; Maggion, E. 編, 1980, 「酵素免疫アッセイ」, CRC Press, Boca Raton, FLを参照のこと) または放射免疫アッセイ (RIA) (Weintraub, B., 「放射免疫アッセイの原理」, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 1986年3月, 1~5, 46~49および68~78頁) が含まれる。本発明の目的のタンパク質の有無についての植物の分析のために、免疫組織化学技術を使用することができる。標的タンパク質が容易な検出を促進するように抗体分子を標識しなければならないかもしれないことが当業者に明らかである。抗体分子の標識技術は、当業者に周知である (Harlow and Lane, 1989, 「抗体」, Cold Spring Harbor Laboratory を参照のこと)。

【0214】

トランスジェニック植物材料の投薬量および投与

本発明は、トランスジェニック植物材料の投与により避妊タンパク質に対する粘膜免疫応答が誘導される、避妊タンパク質を発現するトランスジェニック植物材料の動物への投与による動物の避妊の誘導法を提供する。1つの特定の理論に拘束されないが、本発明は、トランスジェニック植物材料の動物への投与に依存し、その結果、トランスジェニック植物細胞によって発現された避妊タンパク質は、投与された動物の1つまたは複数の粘膜表面に接触する。避妊タンパク質 (抗原) がGALTおよびBALTに被さったM細胞によって取り込まれる場合、全身粘膜免疫により、体内の全分泌組織によって産生された避妊タンパク質に対する分泌型IgAが得られる (Cebraら、前出; Bienenstockら、前出; Weinz-Carringtonら、前出; McCaughanら、前出)。したがって、経口投与は、全身粘膜免疫応答の刺激、さらに、口腔および胃腸管における分泌免疫応答の局所的刺激のために好ましい経路である。

【0215】

好ましい実施形態では、本発明の方法によって産生された避妊タンパク質を、避妊タンパク質を産生するトランスジェニック植物または植物細胞培養物から作製した食材の経口消費によって投与する。1つの実施形態では、本発明のトランスジェニック植物の食用部分を、食品成分として投与する一方で、避妊タンパク質がこのプロセスで投与される。

【0216】

1つの実施形態では、トランスジェニック植物材料を、未処理形態で動物に投与するが、植物材料を、カット、粗みじん切り、みじん切り、ダイスカット、ピューレ化、または動物による摂取を容易にするためのトランスジェニック植物材料のより小さな断片への減少 (家畜による摂取のためのトランスジェニック牧草のサイレージへの減少など) によって処理することができる。未処理形態で投与することができるトランスジェニック植物材料には、果実、葉、茎、根、塊茎、および種子が含まれるが、これらに限定されない。トランスジェニック植物材料が牧草または穀物の形態であるさらなる実施形態では、避妊タンパク質を植物が成長する環境において植物材料を経口で消費するような動物への投与によって動物に植物を投与することができる (例えば、トランスジェニック牧草はウシによって食べられる牧場で成長するので、避妊タンパク質がウシに投与される)。

【0217】

別の実施形態では、トランスジェニック植物材料を、動物への投与前にさらに処理することができる (すなわち、粗みじん切りまたはカット以外)。トランスジェニック植物材料

を、本発明のトランスジェニック植物材料が、経口、経鼻、または吸入投与のために精製する、当業者に公知の技術によって処理することができる。植物材料を、薬学的に許容可能で抗原と適合する賦形剤での乳化によって処理することができる。適切な賦形剤には、アジュバント、緩衝液、糖、抗酸化剤、安定剤、または抗原粉末（例えば、アスコルビン酸ナトリウム、Quillaja抽出物、水、生理食塩水、デキストロース、グルコース、スクロース、グリセロール、またはエタノールなどおよびその組み合わせ）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、所望ならば、ワクチンは、一定量の潤滑剤または乳化剤などの補助物質、pH調整剤、またはワクチンの有効性を増強させるアジュバントを含み得る。さらに、動物による摂取を容易にするために、植物材料を、非トランスジェニック植物または非植物材料と混合することができる。トランスジェニックトウモロコシを他の野菜と混合するか、トランスジェニックダイズ植物をダイズバーガー、ダイズシェイク、または豆乳を作製するためにスパイスまたは他の香味料などの他の成分と混合することができる。さらなる例として、トランスジェニックタバコ培養物をろ過紙、および混合、噴霧、またはトップコートなど（これらに限定されない）の手段によって標準的な飼料材料に添加することができる。さらに、トランスジェニック植物材料を乾燥させ、粉末形態での単独またはジュースまたは水などの許容可能な液体との懸濁液として投与することができる。

10

【0218】

さらなる実施形態では、植物材料および/または細胞が薬学的許容可能なクリーム、軟膏、軟膏、または座剤に組み込まれるように植物材料を処理することができる。したがって、薬学的手段を含むトランスジェニック植物材料を、薬学的に運搬された植物材料の粘膜表面（経口、経鼻、直腸、または膣が含まれるが、これらに限定されない）への接触によって動物に投与することができる。本発明のトランスジェニック植物材料に接触することができるさらなる粘膜表面には、気管支の内被、鼓室の粘膜層、結腸の粘膜内被、精管の内層、食道の内被、小腸の粘膜、咽頭の粘膜、舌の粘膜、下垂体膜、口腔の粘膜、咽頭の粘膜、気管の粘膜内層、耳管の裏打ち、卵管の粘膜層、卵管の内層、尿道の内層、子宮内膜、膣の粘膜、胃の粘膜、膀胱の内被、および精囊の粘膜が含まれる。

20

【0219】

投薬量

本発明のトランスジェニック植物材料を、上記の多数の異なる形態（例えば、未処理、粉末など）で動物に投与することができる。好ましい実施形態では、本発明で有用なトランスジェニック植物材料は、1gの乾燥植物材料あたり少なくとも8 μ gの避妊タンパク質または避妊タンパク質/粘膜標的タンパク質融合物、1gの乾燥植物材料あたり好ましくは少なくとも10 μ g、および最も好ましくは少なくとも20 μ gの避妊タンパク質を発現する。

30

【0220】

1つの実施形態では、制御された環境下（実験室、犬小屋または個人の家など）で収容された動物および野外に収容されているが飼料の摂取は規則的な動物（例えば、家畜）に1週間毎にトランスジェニック植物材料を少なくとも12週間与える（すなわち、0、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77日目）。各採食において、処理する動物のサイズおよび平均摂食量に依存して動物に4gと100、000gとの間のトランスジェニック植物材料を与えた（例えば、平均的なウシは、1日あたり約90ポンドの飼料を消費する）。

40

【0221】

別の実施形態では、一次避妊ワクチン接種を達成するために上記の家畜動物集団に毎日（例えば、0、1、2、3、4、5、6日目）トランスジェニック植物材料を与え、その後十分な避妊免疫状態を維持するために規則的な追加スケジュール（例えば、毎月）でトランスジェニック植物材料を与える。

【0222】

別の実施形態では、トランスジェニック植物材料の送達を使用して、避妊調製物の不変送

50

達を増加させる。例えば、避妊調製物（植物、細菌酵母、または哺乳動物細胞などの系によって産生）を発育期の比較動物に獣医が送達させ、規則的なスケジュール（例えば、毎月）で本明細書中に記載のトランスジェニック植物材料由来の処方避妊飼料を追加することができる。

【0223】

ヒトへの適用のための別の実施形態では、トランスジェニック植物材料を、カプセルまたは錠剤に処方し、自己投与計画に組み込み、それにより避妊および非避妊錠剤またはカプセルを別の日に投与するか投与しないように包装することができる。

【0224】

別の実施形態では、天然の環境に置かれた餌の形態で野生動物にトランスジェニック植物材料を投与することができる。最良の餌の送達方法および投与あたりの集団効果のモデリングは、野生集団抑制分野の当業者に利用可能であり、各標的種のための最良の特異的餌療法を決定する。あるいは、本発明の避妊タンパク質を発現するトランスジェニック植物を、避妊タンパク質を投与される動物が生息する領域に野生で成長させることができる。本明細書中に記載の技術を使用して植物を試験して、植物によって発現される避妊タンパク質量を測定することができる。好ましい実施形態では、野生で成長したトランスジェニック植物は、1gの乾燥植物材料あたり少なくとも8μgの避妊タンパク質または避妊タンパク質/粘膜標的タンパク質融合物、1gの乾燥植物材料あたり好ましくは少なくとも10μg、および最も好ましくは少なくとも20μgの避妊タンパク質を発現する。これらの条件下で、野生動物にトランスジェニック植物材料が自由に与えられる。

【0225】

アジュバント

抗原応答を増大させるために、免疫学的抗原と共にアジュバントを添加することができる。これが当分野で周知である（Coligan LGら編、「現代の免疫学プロトコール」、New York、John Wiley & Sons、1995）。数十年間にわたり、フロイント完全アジュバントが免疫学的アジュバントの主力であった。通常有効であるが、アジュバントは、望ましくない副作用を誘導し得るので、その使用が改良され、代替物が開発されている。

【0226】

他のアジュバントには、以下が含まれるが、これらに限定されない。解毒エンドトキシン（MPL）およびマイコバクテリア細胞壁成分（TDWmCWS）の2%スクアレン溶液を含む水中油滴型乳濁液であるRibiaアジュバント系（RAS）（Ribi Immunochem Research, Inc.、Hamilton、Montana）；TiterMax（安定で代謝可能な油中水滴型アジュバント）（CytRx Corporation、Atlanta Norcross、Georgia）；Syntexアジュバント処方物（SAF）³（Tween80およびpluronicポリオキシレン/ポリオキシプロピレンブロックコポリマーL121によって安定化された水中油滴型乳濁液）（Chiron Corporation、Emeryville、California）；フロイント不完全アジュバント（FIA）（フロイント完全アジュバントの低炎症性代替物）（Novavax Inc.、Columbia、Maryland）；ALUM-水酸化アルミニウム（特にワクチンなどの市販品において広範に使用されているアジュバント）（Accurate Chemical & Scientific Co.、Westbury、New YorkからAlhydrogelとして市販されている）；SuperCarrier（Syntex Research、Palo Alto、CA）；Elvax40W（DuPont Chemical Co.、Wilmington、DE）；Montanide（オレイン酸マニド化合物）（ISA Seppic Fairfield、NJ）；ニトロセルロース吸収タンパク質（Nilsson BO、Larsson A.「免疫化用の不活性キャリア」、Res. Immunol.、143、553~557、1992）；Gerbuアジュバント（C-C Biotech、Poway、California）；免疫刺激複合体（ISCOMS）

(Coligan LGら編、「現代の免疫学プロトコール」、New York、John Wiley & Sons、1995)。

【0227】

非経口ワクチン接種のためにサポニンアジュバントが長年にわたり使用されている(製品には、「QuilA」または「QS-21」が含まれる)。サポニンは、二次代謝産物として産生されるグリコシド化合物である。サポニンは、高等植物および棘皮動物門のいくつかの海洋無脊椎動物に広範に分布する(ApSimonら、Stud. Org. Chem.、17、273~286、1984)。その抗菌活性のために、植物サポニンは微生物(特に、真菌)に対する有効な化学的防御である(Priceら、CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.、26、27~135、1987)。サポニンは、多数の海洋無脊椎動物の毒性を担う(ApSimonら、Stud. Org. Chem.、17、273~286、1984)。サポニンの化学構造により、広範な薬理活性および生物活性(いくつかの強力かつ有効な免疫学的活性を含む)が得られる。さらに、化合物のこのファミリーのメンバーは、発砲性(同定された特徴)、界面活性(溶血活性を担う)、コレステロール結合活性、真菌毒活性、軟体動物駆除活性、避妊活性、成長遅延活性、去痰活性、抗炎症活性、鎮痛活性、抗ウイルス活性、心筋活性、酵素阻害活性、および抗腫瘍活性を有する(Hostettmann, K.ら、Methods Plant Biochem.、7、435~471、1991; Lacaille-Dubois, M. A. & Wagner, H.、Phytomedicine、2、363~386、1996; Price, K. R.ら、CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.、26、27~135、1987)。

【0228】

さらに、サポニン溶液を界面活性剤として使用して、粘膜を横切るポリペプチド送達が増大されている。例えば、Pillion, D. J.ら、Invest. Ophthalm. Vis. Sci.、32、3021~27、1991は、Gypsophylla由来の非精製サポニンを含む1%溶液としての目薬でのインスリンの投与によりラットの血中D-グルコースレベルが迅速かつ再生可能に減少することを開示している。サポニンを欠くインスリン目薬は無効であった。日本国要約番号JP62126135(1987)は、ステロイドまたはトリテルペン構造を有するサポニンを使用した成長ホルモン放出因子の鼻腔投与を開示している。Chiou, G. C. Y.ら、J. Pharm. Sci.、78、815~818、1989; およびサポニン(Sigma Chemical Companyから入手)を含む目薬の成分としてのその投与によるインスリンの全身送達を開示するChiou, G. C. Y.ら、J. Ocul. Pharm. 5: 81~91、1989もまた参照のこと。サポニンのこの界面活性はまた、生体膜の透過性を促進し、それにより免疫応答を増大させることができる。

【0229】

Quillaja saponaria Molina treeの樹皮由来のサポニンアジュバント(Quillajasaponin)は、化学的および免疫学的に十分に特徴付けられた製品である(Dalsgaard, K. Arch. Gesarnte Virusforsch.、44、243、1974; Dalsgaard, K.、Acta Vet. Scand.、19(増補69版): 1、1978; Higuchi, R.ら、Phytochemistry、26、229、1987; 前出、26、257、1987; 前出、27、1168、1988; Kensil, C.ら、J. Immunol.、146、431、1991; Kensilら、米国特許第5,057,540号、1991; Kensilら、Vaccines、92、35、1992; Bornford, R.ら、Vaccine、10、572、1992; およびKensil, C.ら、米国特許第5,273,965号、1993)。

【0230】

サポニンはまた、ダイズなどの他の植物中に存在する(Andrzejewska E.、1984、Rocz Panstw Zakl Hig.、35、135~8)。

【0231】

Quillaja サポニン は、わずかに異なる約 20 種の密接に構造が関連したトリテルペノイドグリコシドの混合物として見出され (Higushi, R. ら、Phytochemistry、26、229、1987; 前出、26、2357、1987; 前出、27、1169、1988; Kensil ら、米国特許第 5,057,540 号、1991; Kensil ら、Vaccines、92、35、1992)、このことが分離を困難にしている。Quillaja Saponaria 抽出物は、市販されている (例えば、Garuda International, Inc.、Lemon Cove、CA 93244)。米国特許第 5,273,965 号および同第 5,650,398 号は、粗サポニン抽出物を開示しており、米国特許 5,057,540 号は、実質的に純粋なサポニン抽出物を開示している。粗および純粋なサポニンの抽出プロセスは、クロマトグラフィによる化合物の精製を含む。

10

【0232】

本発明の有用なサポニンアジュバントには、粗および純粋なサポニン抽出物が含まれる (Garuda International, Inc.、Lemon Cove、CA 93244)。有用なサポニンアジュバントには、サポニンを含む植物の一部 (例えば、葉、根、果実、または他の部分) または処理植物も含まれる。「処理した」は、動物による摂取を容易にするためのカット、粗みじん切り、みじん切り、ダイスカット、またはサポニン含有植物をより小さな断片への減少をいう。

【0233】

好ましい実施形態では、サポニンアジュバントを、トランスジェニック植物材料と共に経口投与する。

20

【0234】

免疫化の検出

本発明は、粘膜免疫応答が惹起された避妊タンパク質の投与による動物の避妊の誘導方法を提供する。好ましい実施形態では、本発明の避妊タンパク質を含むトランスジェニック植物材料の投与後、避妊タンパク質に対する免疫応答が惹起されているかどうかを決定するために動物を試験する。植物材料の投与後に一度に避妊タンパク質に対する免疫応答について動物を試験することができる。

【0235】

以下は、ZP 抗原の評価を記載しているが、記載の技術を、本明細書中に記載の避妊タンパク質に関する動物の免疫状態に使用することができる。1つの実施形態では、当業者は、ZP 抗原に関する動物の免疫状態の決定によって動物が免疫化されているかどうかを決定することができる。例えば、血液、血清、尿、唾液、涙などのサンプル中の ZP 結合抗体の力価のアッセイによってこの評価を行うことができる。より好ましくは、ZP 免疫原またはその等価物に対する抗体を検出することができる酵素結合免疫吸着アッセイ (「ELISA」) を、この目的に使用することができる (Drell ら、Biol. Reprod.、30、445、1984; ELISA および他の固相免疫アッセイ (Kemeny, D. M. ら編)、John Wiley & Sons、N. Y.、1988) (本明細書中で参考として組み込まれる)。

30

【0236】

免疫アッセイの周知の原理から理解されるように、免疫測定アッセイ (「2 部位」または「サンドイッチ」アッセイとしても公知) などの別の形態 (「正方向」、「同時」、および「逆方向」アッセイを含む) を使用することができる (Fackrell, J. Clin. Immunology、8、213~219、1985; Yolken, R. H.、Rev. Infect. Dis.、4、35、1982; Collins, W. P.、「代替免疫アッセイ」、John Wiley & Sons、N. Y.、1985; Ngo, T. T. ら、「酵素媒介免疫アッセイ」、Plenum Press、N. Y.、1985)。

40

【0237】

50

例えば、「正方向」アッセイでは、Z P 抗原を、固体支持体（マイクロタイタープレート、試験管、計深棒など）結合させ、2 固相 Z P 抗体複合体が形成される条件下で、抗 Z P 抗体の存在について評価したサンプルと最初に接触させる。インキュベーションおよび洗浄後、一定量の標識 Z P 抗原（「レポーター分子」として機能する）と接触させて支持体を置く。標識 Z P 抗原を非標識抗原を介した固定 Z P と複合体形成させるための第 2 のインキュベーション後、固体支持体を第 2 の時間洗浄して、未反応標識 Z P 抗原を除去する。この正方向サンドイッチアッセイ型は、抗 Z P 抗体が存在するか残存標識 Z P 抗原の量と既知量の抗 Z P 抗体を含む標準から得られた量との比較によって定量することができるかどうかを決定するための単純な「イエス/ノー」アッセイであり得る。「2 部位」または「サンドイッチ」アッセイは、Wide、「放射免疫アッセイ法」（K i r k h a m 編）、E . & S . L i v i n g s t o n e、E d i n b u r g h、1 9 9 ~ 2 0 6 頁、1 9 7 0（本明細書中で参考として組み込まれる）に記載されている。

10

【0238】

好ましい実施形態では、正方向 E L I S A を使用して、粘膜免疫応答を測定することができる。上記のように、粘膜免疫グロブリンについて評価したサンプルとのインキュベーション後、動物から得られたサンプル中の I g A の存在のレポーターとして機能する標識抗 I g A 抗体と接触して支持体が存在する修飾を使用して、アッセイを行う。

【0239】

「同時」アッセイでは、結合 Z P および標識 Z P の両方を同時に試験サンプルに添加する 1 つのインキュベーションステップを使用する。インキュベーションの完了後、固体支持体を洗浄して、流動物サンプルの残渣および非複合体形成標識抗体を除去する。従来の「正方向」サンドイッチアッセイと同様に、固体支持体に会合した標識抗体の存在を決定した。

20

【0240】

「逆方向」アッセイでは、標識 Z P 溶液をサンプルとインキュベートし、非標識 Z P が先に結合された固体支持体に接触させて反応物を置く。第 2 のインキュベーション後、従来の様式で固相を洗浄して固相から試験サンプルの残渣および未反応標識 Z P 溶液を除去する。「同時」および「正方向」アッセイと同様に、抗体力価の決定を行う。

【0241】

最も好ましい実施形態では、本発明の E L I S A は、モノクローナル抗体を使用する。最も好ましくは、このような抗体を、Z P 抗原での異種動物（マウス、ラット、ウサギなど）の免疫化、およびその後の動物の脾臓白血球の採取、および上記の様式でのこれらと適切な骨髄腫細胞との融合によって上記のように作製する。

30

【0242】

特に好ましい固体支持体に関して免疫アッセイが記載されているにもかかわらず、種々の別の固体支持体を使用することができる。適切な固体支持体は、例えば、ガラス、紙、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、またはマグネタイトなどから構成され得る。支持体の性質は、本発明の目的のためにある程度の範囲で可溶性であるか不溶性であり得る。支持材料は、Z P 分子が抗体に結合することができる限り、事実上可能な構造形を有し得る。したがって、支持体の形は、球状（ビーズとして）または円筒形（試験管の内表面またはロッドの外表面として）であり得る。あるいは、表面は、シート、試験ストリップなどの平面であり得る。当業者は、モノクローナル抗体の結合に適切な哺乳動物他のキャリアに留意するか日常的な実験によってこれを確認することができる。

40

【0243】

さらなる実施形態では、本発明のトランスジェニック植物材料が投与された動物の免疫状態を、免疫組織化学技術によって評価することができる。簡単に述べれば、上記の投与経路によるトランスジェニック植物材料の投与後、雌動物を屠殺し、卵巣を取り出すことができる。卵巣からの卵の放出後にファロピウス管で受精が起こるので、本発明の避妊タン

50

パク質に対する抗体の存在が卵巣の卵で検出されることが好ましい。動物から除去後、卵巣を冷凍切断する。切片を、当分野で公知の固定剤（ホルムアルデヒド、アセトン、パラホルムアミド、およびグルタルアルデヒドが含まれるが、これらに限定されない）中に固定する。その後切片を洗浄し、避妊タンパク質に反応する動物によって惹起された抗体に結合する抗体とインキュベートする。切片を、レポーター分子（例えば、蛍光色素）を含む二次抗体とさらにインキュベートし、顕微鏡下で試験する。投与したトランスジェニック植物によって発現された避妊タンパク質に指向する抗体の同定は、避妊タンパク質に対して動物によって惹起された免疫応答の指標である。例えば、本発明のトランスジェニック植物材料をマウスに投与した場合、植物によって発現された避妊タンパク質に対する粘膜免疫応答を、マウス卵巣の組織切片の獲得およびマウス免疫グロブリンの鎖に指向する抗体での組織の処理によって測定することができる。抗マウス鎖抗体の局在を、蛍光色素などのレポーターに結合した二次抗体での組織の処理によって視覚化することができる。次いで、組織を、標識抗体を視覚的に局在するために顕微鏡下試験し、NIH Image (National Institute of Health, Bethesda, MD) などの当分野で公知の形態計測コンピュータソフトウェアを使用して抗体標識画像を定量した。次いで、定量データを、本発明の避妊タンパク質で処理していないマウスから得た類似の抗体標識データと統計的に比較する。動物間の統計的に有意な相違は、避妊タンパク質でのマウスの免疫化の指標であり、統計的検定のP値は、少なくとも0.1未満、0.05未満、0.01未満、0.005未満、0.001、0.0005であり、好ましくは0.0001である。

10

20

【0244】

避妊効果の決定

最も好ましい実施形態では、投与した本発明の避妊タンパク質の避妊効果を、本発明の方法によってトランスジェニック植物材料を投与された雌動物における繁殖周期あたりの出生数の評価によって決定する。例えば、例えば、マウスへのトランスジェニック植物材料の投与から5～6週間後、各雌マウスを、雄マウスのケージに入れる。次いで、10日～20日後に雄マウスを取り出す。次いで、雌マウスの出生数を毎日観察する。投与した避妊タンパク質の避妊効果を、投与後の産仔数の減少によって決定する。例えば、平均出生数が3匹以上の動物種（例えば、マウス）では、産仔数の減少が10%～100%、30%～90%、または60%～80%である場合に、避妊タンパク質が有効とみなすことができる。平均出生数が1匹または2匹の動物種（例えば、オジロジカ）では、産仔数の減少が少なくとも50%、好ましくは100%である場合に、避妊タンパク質が有効とみなすことができる。

30

【0245】

あるいは、本発明の避妊タンパク質の有効性を、上記のように血液、血清、粘膜、分泌物、排泄物などにおける避妊タンパク質に対する抗体レベルの測定によって決定することができる。避妊タンパク質の有効性を、上記の免疫組織化学技術による卵に結合した避妊タンパク質に対する抗体の視覚化によって評価することもできる。しかし、本発明の避妊タンパク質の有効性を正確に決定するために、避妊タンパク質に対する抗体の測定または視覚化を、観察された産仔数の減少と組み合わせて評価しなければならない。例えば、繁殖力が減少しない場合、避妊タンパク質を、動物の血清中のタンパク質に対する抗体の検出と無官営に有効でないこととみなすことができる。

40

【実施例1】

【0246】

実施例1. 植物至適化合成LT-B遺伝子への植物至適化マウスZP3エピトープの融合合成LTB配列を含むTH210 (Masonら、1998、Vaccine、16、1336)由来のEcoRVおよびKpnIフラグメントを、pBluescript (Stratagene、La Jolla、CA、USA)の対応部位に挿入して、pBlueLTBを作製した。pBlueLTB内のLTBコード領域の3'末端に6つのアミノ酸リンカー（翻訳）を融合させるために、固有のBbsI部位の使用によってプラスミド

50

pLTB-Lを作製した。変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動によって精製した2つの市販の合成オリゴマー5' AAC TCT GAT CCA CAT GTT CCT (配列番号1)および5' AGT TAG GAA CAT GTG GAT CAG (配列番号2)を使用してリンカーを構築した。オリゴマーを、異なる反応においてT4キナーゼでリン酸化し、等モルで混合し、90で5分間の加熱によってアニーリングし、その後1時間にわたり23まで段階的に冷却した。BbsIおよびKpnIでの連続消化および子牛腸ホスファターゼ(CIP)での脱リン酸化によってマウスZP3エピトープの挿入のためにプラスミドpLTB-Lを調製した。

【0247】

マウスZP3(336~342)エピトープのコード配列を、植物遺伝子と比較したそのコドン使用頻度について分析した(Wadaら、1990、Nucleic Acid Research、18、2367)。オリゴのアセンブリの際にBbsIおよびKpnI適合フラグメントを作製する5'および3'末端にさらなるヌクレオチドを含む天然のエピトープのアミノ酸配列を保持した植物至適化エピトープをデザインした。オリゴヌクレオチドMzepA 5' AAC TTC CAA ATT CAT GGA CCA AGA AAC TAA GTC TTC GGT AC (配列番号3)およびMzepB 5' CGA AGA CTT AGT TTC TTG GTC CAT GAA TTT GGA (配列番号4)を合成し、変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動によって精製した。pLTB-Lの構築において、先に記載したようにエピトープを構築した。エピトープを氷上におき、その後pLTB-LのBbsI、KpnIフラグメントへのライゲーションによってpLTBL7を作製した。プラスミドpLTB-LおよびpLTB7を、ジデオキシ鎖終結法によって配列決定した。pLTB7のNcoIおよびKpnIフラグメントが得られ、NcoIおよびKpnIで消化したpIBT210(Haqら、1995、Science、268、714)に挿入してpAW7を作製した。HindIIIおよびEcoRIでの消化後に発現カセットをpAW7から精製し、HindIIIおよびEcoRIで消化したpGPTV.kan(Beckerら、Plant Molecular Biology、20、1195)とライゲートしてpAWBin7を得た。

【実施例2】

【0248】

実施例2．トマト形質転換

大腸菌DH5の培養物から調製したpAWBin7を、アグロバクテリウム・ツメファシエンスEHA105にエレクトロポレーションした。種子を70%エタノールで2分間の浸漬によって滅菌し、その後滅菌水でリンスし、10%ドメストスと1%Tween-20の混合物で22時間洗浄すること以外は、Frary and Earle(Frary and Earle、1996、Plant Cell Reports、16、235)のようにトマト子葉(変種Tankley TA234TM2R)のアグロバクテリウム媒介形質転換を行った。種子を滅菌蒸留水で3回リンスし、その後半分の強度のMurashige and Skoog培地(半分の強度のMS塩(Murashige and Skoog、1962、Physiologia Plantarum 15、473)、50mg/lミオイノシトール、2mg/lチアミンHCl、0.5mg/lピリドキシンHCl、0.5mg/lニコチン酸、10g/lスクロース、および8g/l difco 寒天(pH5.8))にプレートした。300mg/lのカナマイシンを含む培地上に胚を再生させた。各株を、ガングリオシド依存性ELISAによって葉および果実でのLTB発現についてスクリーニングした。最良の果実を発現した株を自己受粉させ、得られた種子を、300mg/lのカナマイシンを補足したMS培地上で発芽させた。生存している苗木を土壌および温室に移し、自己受粉させた。各T1植物由来の果実を、凍結乾燥し、粉末にし、プールし、乾燥条件下で保存した。

【実施例3】

【0249】

実施例 3 . タンパク質抽出および E L I S A

温室で成長させた植物由来の葉サンプルおよび新鮮な果実または乾燥果実サンプルを、Bio 101 Fast prep 装置にて 2 (新鮮なサンプル) または 50 (乾燥果実) ml / l (それぞれ) の氷冷抽出緩衝液 (50 mM リン酸ナトリウム (pH 6.6)、100 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% Triton X-100、10 µg/ml ロイペプチン、1 mM PMSF) 中で均一化した。不溶性物質を、Eppendorf 5415C にて、4 で 5 分間の 14000 rpm での微量遠心分離によってペレット化した。分析の間上清を氷上に保持し、-80 で保存した。植物サンプルの総タンパク質濃度を、標準としてウシ血清アルブミン (BSA) を使用したクーマシー色素結合アッセイ (Bio Rad) を使用して決定した。記載のように (Haqら、前出) 各抽出物を 100 倍希釈した 2 つのサンプルに対してガングリオシド依存性 E L I S A を行った (図 1 a、b、c)。

10

【実施例 4】

【0250】

実施例 4 . 融合タンパク質の精製および検出

1 g の乾燥重量あたり 8 µg を超える L T B を発現する T 1 植物由来の乾燥果実サンプルをプールした。材料を 20 ml / g の氷冷抽出緩衝液で均一化すること以外は以前に記載のように乾燥サンプル由来の抽出物を作製した。得られた上清を、プラットフォームロッカーで PBS 平衡化セファデックスと共に 4 で一晩インキュベートした。セファデックス溶液を静置し、1 ml のサンプルを回収し、4 で保存した。セファデックス溶液の体積を、焼結ガラス漏斗を使用して減少させ、60 ml の氷冷 PBS でフラッシュした。5 ml PBS を使用してセファデックススラリーを作製し、真空デシケーターによって脱気し、Bio Rad X カラムに注いだ。カラムを 50 ml の PBS で洗浄し、1 ml のサンプルを第 1 および第 5 のミリリットル通過から回収した。融合タンパク質を、0.2 M D - (+) - ガラクトースの PBS 溶液を使用して溶出し、4 で保存した。その後、サンプルを SDS - PAGE およびクーマシーブルー染色を使用して分析した。SDS - PAGE ゲル上に融合タンパク質に対応するバンドが検出された。融合タンパク質の存在を、実施例 3 に記載の E L I S A によって確認した。

20

【実施例 5】

【0251】

実施例 5 . ゲノム核酸の単離

液体窒素およびくぎを使用した 1.5 ml 微量遠心分離チューブ中での 200 ~ 250 mg の材料の粉碎によって T 1 植物の若葉組織からゲノム核酸を単離した。粉末を 500 µl の抽出緩衝液 (420 g/l 尿素、312.5 mM NaCl、50 mM Tris . HCl (pH 8.0)、20 mM EDTA、1% サルコシン) に再懸濁し、500 µl のフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) と共にサンプル回転機で 30 分間インキュベートした。得られたスラリーを、14000 rpm にて 4 で 15 分間遠心分離した。上部の水相を回収し、同体積の 4 M LiCl の添加によって RNA を沈殿させ、-20 で少なくとも 8 時間インキュベートした。サンプルを、15000 rpm にて 4 で 15 分間遠心分離し、上清を除去してチューブと分けた。RNA ペレットを、50 µl の Rn アーゼ滅菌水に再懸濁した。10 体積% の 7.5 M 酢酸アンモニウム、1 体積% の氷冷イソプロパノールの添加によってゲノム DNA を確保した上清から沈殿させ、-20 で少なくとも 8 時間インキュベートした。DNA を、70% 氷冷エタノールで洗浄し、5 分間風乾し、50 µl の滅菌水 + Rn アーゼ (50 µg/ml) 中で再懸濁した。

40

【実施例 6】

【0252】

実施例 6 . サザン分析

融合 DNA の染色体組み込みを確認するためにサザンプロット分析を行った。

【0253】

50

15 μ g の DNA を含むサンプルを、1 μ g の DNA あたり 3.4 単位の HindIII にて 37 で一晩消化した。消化サンプルを、1% TAE アガロースゲルで一晩泳動した。ゲルを浄化し (0.25 M HCl)、アルカリ移行についての製造者の説明書にしたがって、プローブメンブレン (Bio Rad) に移す。UV 架橋によって DNA を固定した。

【0254】

pAW7 テンプレート上でプライマー組 TEV (5' - GCA TTC TAC TTC TAT TGC AGC) (配列番号 5) および VSP (5' - GTG CAT ATC AGC ATA C) (配列番号 6) を使用して、PCR 標識プローブを作製した。DIG 標識 dCTP を、製造者の説明 (PCR DIG プローブ合成キット、Boehringer Mannheim) にしたがって 588 bp アンプリコンに組み込んだ。Hybaid PCR Express サーマサイクラーを使用して、増幅を行った。テンプレートを、最初に 94 で 4 分間融解し、その後 94 で 15 秒間、55 で 30 秒間、および 72 で 90 秒間を 30 サイクル行った。72 で 5 分間最終伸長ステップを行い、その後 4 で浸漬させた。

10

【0255】

ハイブリッド形成ボトルおよびメンブレンあたり 10 ml の DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim) を、ハイブリッド形成オープンで 45 に予備加温した。メンブレンを、少なくとも 90 分間予備ハイブリッド形成させ、5 μ l/ml DIG Easy Hyb のプローブ濃度で一晩ハイブリッド形成させた。ハイブリッド形成後、製造者の説明にしたがって洗浄および検出を行った (Boehringer Mannheim - DIG 洗浄およびブロック緩衝液セットおよび DIG 発光検出キット)。標識メンブレンを、フィルムに露光後視覚化した。融合 DNA の植物宿主染色体への融合の組み込みを確認した。

20

【実施例 7】

【0256】

実施例 7. ノーザン分析

ノーザンプロット分析を使用して、mRNA レベルで融合タンパク質の発現を確認した。

【0257】

「分子クロニング」(Sambrook ら、前出) に記載のようにノーザン分析を行った。簡単に述べれば、ゲノム RNA サンプルを、ホルムアルデヒド/ホルムアミドで変性させ、1% アガロースを含む MOPS - 酢酸 - EDTA ゲルで 2 時間泳動した。次いで、RNA を、上方毛管現象によって プローブメンブレン (Bio Rad) に移し、UV 架橋で固定した。ハイブリッド形成ステップを 42 で行う以外は、サザン分析と同様に膜ハイブリッド形成および検出を行った。融合タンパク質 mRNA の存在を確認した。

30

【実施例 8】

【0258】

実施例 8. マウスへの採餌およびサンプルの採取

トランスジェニック植物の避妊効果の有効性を、実験用マウスを使用してインビボで試験した。

40

【0259】

マウスを、雄/雌ペアで収容する一方で、1 匹の雄に対して 3 匹の雌をケージに入れた。実験を通して、雌あたりの出産数に留意した。

【0260】

1 g の乾燥質量あたり 8 μ g を超える LTB を発現するトマト植物の凍結乾燥した粉末果実をプールおよび混合した。各採餌のために、トマト粉末をリンゴサイダーと 1:2 (w/v) で混合した。採餌を、2 週間間隔で 12 週間行った (0、3、14、17、28、31、42、45、56、59、70、73、84、87 日目)。動物を 3 つの群に分け、4~6 匹に 4 g の野生型トマト+リンゴサイダーを与え、4~5 匹に 4 g のトランスジェニックトマト+リンゴサイダーを与え、4~5 匹に 4 g のトランスジェニックトマト+

50

リングサイダー + Quillaja 抽出粉末 (Garuda) を与えた。開始から 31 日目に、雌マウスを、正午に各ケージに移して水および睡眠のみを与える絶食プロトコールに供した。午後 4 時に試験食を与え、一晩放置した。翌朝午前 8 時に雌マウスを通常のケージに戻した。

【0261】

0 日目および 70 日目に、尾静脈由来の血清サンプルを各雌から採取し、さらなる抗体分析のために -80 で保存した。最終血清サンプルを、96 日目に心穿刺によって採取し、上記のように保存した。糞便サンプルを、70 および 87 日目に採取し、-80 で凍結した。凍結ペレットサンプルを、凍結乾燥し、0.8 ml リン酸緩衝化生理食塩水 (pH 7.2) (PBS) に再懸濁し、14000 rpm で 5 分間遠心分離し、アッセイまで上清を -20 で保存した。

10

【実施例 9】

【0262】

実施例 9 . 抗 L T B および抗 Z P 3 エピトープの E L I S A および実験マウスの受精能
サンプルを、記載のように、血清中の抗 L T B および抗 Z P 3 エピトープ I g G 糞便ペレット中の抗 L T B および抗 Z P 3 エピトープ I g A についてアッセイした (Dickenson and Clements, 1995, Infect. Immun., 63, 1617)。結果を、図 2 a および図 2 b に示す。サンプルを、0.05% Tween-20 を含む PBS (PBST) で連続希釈した。抗 L T B 抗体の検出のために、マイクロタイタープレートを、混合ガングリオシド (III 型) (Sigma, St. Louis, MO, USA) でコートし、0.25% BSA でブロックし、精製組換え L T B と 1 時間インキュベートした。抗 Z P 3 エピトープの検出のために、マイクロタイタープレートを、BSA に結合させた組換えエピトープでコートし、0.25% BSA でブロックした。血清抗 L T B または抗 Z P 3 エピトープを、マウスまたはハタネズミ I g G に対するウサギ抗血清およびアルカリホスファターゼ (Sigma) に結合したシカ抗ウサギ抗血清を使用して検出した。糞便抗 L T B および抗 Z P 3 エピトープ抗体のレベルを、マウスまたはハタネズミ免疫グロブリンに対するヤギ抗血清およびアルカリホスファターゼに結合したウサギ抗ヤギ抗血清を使用して決定した。

20

【0263】

試験材料の経口送達効果を、コントロールおよび実験群由来の同腹子の数およびサイズの比較によって試験した (図 3)。各群に 6 匹のマウスを使用した。マウスの実験群に、トランスジェニックマトペーストを与えた。非標的種 (Vole) に対する試験材料の効果もまた試験した (図 4)。

30

【実施例 10】

【0264】

実施例 10 . 避妊タバコ懸濁培養物の産生

マウス Z P 3 エピトープ、ポッサム (フクロネズミ) Z P 3 エピトープ、および一般的な GnRH エピトープのコード領域を、L T B (下記の構築物、図 5 a、b、c) に融合した。マウスおよびポッサムエピトープを、L T B のカルボキシル末端から離れて翻訳されるようにそれぞれ L T B に融合した。GnRH エピトープを使用して、3 つの融合を行った。GnRH エピトープを、アミノ末端、カーボイ末端からなはれて、または L T B 五量体の外側に存在すると予想される位置での L T B 単量体内で翻訳されるように、L T B に融合した。これらの融合タンパク質のコード領域を、p I B T 2 1 0 . 1 の植物発現カセットに置き、アグロバクテリウム媒介形質転換のためにバイナリベクター p G P T V に挿入した。N T 1 細胞 (タバコ細胞懸濁液) を、マウス Z P 3 - L T B 融合物、ポッサム Z P 3 - L T B 融合物、GnRH カルボキシル融合物、および GnRH 内部融合物で形質転換した。

40

【0265】

マウスおよび GnRH 融合形質転換体の L T B 特異的および GnRH 特異的 E L I S A 分析を行った (図 6)。カルボキシル末端融合について検出を確認し、L T B レベルは、内

50

部融合物において低かった。本発明者らは、内部融合は五量体の形成を妨害し、それにより検出されると結論付けた。発現が低いにもかかわらず、GnRHエピトープを、植物細胞によって発現させることができる。

【実施例 11】

【0266】

実施例 11 . トランスジェニックニンジンの産生

全形質転換に、ニンジン品種 Nanco (Daucus carota L. cv. Nanco) を使用する。Nanco は、Gilbertら、1996 (以下の引例) において試験された 3 つの品種のうちの一つであり、形質転換頻度および再生速度が優れていた。種子を、種子供給業者 (Hermel Hempstead, England) から入手し、Boyce Thompson Institute for Plant Research (BTI) に持ち込んだ。全ての種子は、20 分間の漂白、その後の発芽前の 70% エタノールで 20 分間により表面を滅菌した。発芽、形質転換、または再生段階でのさらなる細菌または真菌感染で汚染した材料を、破棄した。無菌発芽から 7 ~ 15 日後にニンジンの胚軸を切り出した。外植片を液体成長培地に移し、アグロバクテリウム EHA 105 株 (下記のように適切な発現ベクターを含む) とゆっくり震盪しながら室温の暗所で 36 ~ 48 時間同時培養した。次いで、外植片を、さらなる植物オーキシン 2, 4-D (胚形成カルス産生を刺激する)、抗生物質チメンチン (残存するアグロバクテリウムの痕跡を全て回復させる) 固体成長培地に移し、室温の暗所で保存した。

10

【0267】

5 週間後、外植片が有意にカルスに成長し、非形質転換細胞に対して選択圧を誘導するためのカナマイシンを含む新たに調製した固体成長培地に移した。さらに 5 週間後、健康なカルスを、2, 4-D の非存在下で新鮮な固体培地に移し、胚再生を誘導するための明所に置いた。さらに、いくつかのカルスを、新鮮な培地 (2, 4-D を含む) に移し、後期の再生のためにさらなるカルス産生を刺激するために暗所に移した。カナマイシン選択培地で適切に成長しなかったか (非トランスジェニックと考えられる)、細菌または真菌の汚染サインを示した全組織を破棄した。

20

【0268】

十分に明るくした再生 / 選択培地上で約 10 ~ 14 週間後、初期の根および芽を有するニンジン胚を、制御された温室成長条件に移すことができる。植付けから 8 ~ 10 週間後、トランスジェニック根材料の採取を行った。

30

【実施例 12】

【0269】

実施例 12 . トランスジェニックニンジン懸濁培養物の産生

カナマイシン培地 (上記) から選択した 2 ~ 5 g の健康なニンジンカルスを、50 ml の液体培養培地に入れた。標準的な液体培地は、400 ml の水、400 μ L Murashige & Skoog ビタミン、1.7 g Murashige & Skoog 塩、12 g グルコースを含み、加圧滅菌によって滅菌し、その後微生物汚染を制御するために最終濃度の 2, 4-D (2.2 mg/L) および抗生物質チメンチン (300 mg/L) を添加した。次いで、混合物を周囲温度のオービタルシェーカーに置き、100 ~ 120 rpm で震盪した。カルスは、段階的により小さな各細胞または細胞クランプに分割された。7 ~ 10 日毎に、5 ml の懸濁培養物を 45 ml の新鮮な液体成長培地に添加し、健康な細胞成長を維持した。

40

【実施例 13】

【0270】

実施例 13 . 粉末ニンジン細胞の産生

7 ~ 10 日の成長後、液体懸濁培養を、ろ紙でろ過し、最低 24 時間 - 80 で凍結させた。回収して長期間凍結した材料を、凍結乾燥チューブに入れ、凍結乾燥装置に最低 48 時間接続する。得られた材料を秤量し、手で砕き、約 350 g のアリコートでの密封プラスチックバッグ中にて - 20 で保存した。粉末材料は、高度に無水であり、触れるとヒ

50

トの皮膚に突き刺さる。粉末材料は、新鮮な収穫重量の10%未満に減少していた。粉末材料のサンプルを、使用される構築物に特異的なELISAおよびPCRによってアッセイした。測定可能な抗原含有量は、1gの乾燥重量あたり50~100 μ gの範囲内であることが見出され、これは検出可能な抗原濃度の約10~15倍であった。

【実施例14】

【0271】

実施例14. 特異的構築物

pTH110

この構築物は、大腸菌易熱性エンテロトキシン由来のBサブユニット(LT-B)の発現をコードする。この構築物は、マウスへの経口送達(Masonら、前出)およびヒトの臨床試験(Tacketら、1998、Nature、Med.、4、607)のためにすでに発現されている。この構築物を、ジャガイモ中で発現させ、MAF輸入許可番号1999007035の対象物であり、その後、Lincoln、NZのLandcare研究施設でポッサムに経口到達された。LT-Bを発現するニンジンを用いて、下記の避妊材料の免疫学的試験および受精能試験のためのネガティブコントロール材料として使用される。

【0272】

LT-B分子は、天然の形態(および植物細胞中で)で五量体を形成し、生殖器官、気道、および消化管の粘膜表面を裏打ちする上皮細胞に結合親和性を提供する。この親和性により、避妊エプトープなどより小さなタンパク質の送達戦略が得られた。以下の哺乳動物構築物は、LT-Bと免疫避妊ペプチドとの間の遺伝子融合をコードする。ELISAによる葉および根材料の分析は、得られた分子は、候補ペプチドを同時に示す五量体であることを示した。

【0273】

pGPTV-MuZP3

pTH110と対照的に、この構築物は、VSPターミネーターの前にLT-B遺伝子のカルボキシル末端に挿入されたさらなる配列を有する。さらなる配列には、リンカーペプチド(Asn-Ser-Asp-Pro-His-Val-Pro)(配列番号7)および最小B細胞エプトープ、マウス透明帯糖タンパク質3(MuZP3)由来のアミノ酸残基335~342(Asn-Phe-Gln-Ile-His-Gly-Pro-Arg)(配列番号8)が含まれる。

【0274】

pGPTV-GNRH1

pGPTV-MuZP3と対照的に、この構築物は、MuZP3エプトープの代わりにブタゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)のデカペプチドをコードする配列を有する。リンカーが保存されている。このデカペプチド配列(Gln-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly)(配列番号9)は、ほとんどの哺乳動物で一般的である。

【0275】

pGPTV-GNRH3

pTH110と対照的に、この構築物は、LT-B遺伝子のアミノ末端に(リンカーを介して)融合したGnRHデカペプチドを有する。シグナルペプチドは、LT-B内に含まれ、翻訳後プロセッシングの際に切断されて、成熟単量体タンパク質を遊離する。この切断は、チロシンとグリシン(残基20および21)との間で起こる。GnRHEプトープは、グリシン残基の後に直接挿入されている。短いリンカー(Tyr-Ala-His-Gly)(配列番号10)を使用して、GnRHEプトープをLT-Bのアミノ末端に結合し、成熟タンパク質のグリシン-アラニン開始配列を維持する。

【0276】

pGPTV-pAW6

pGPTV-GnRHと対照的に、この構築物は、GnRHデカペプチドの代わりに、オ

ーストラリアフクロギツネ透明帯糖タンパク質3 (P o s s Z P 3) 由来の推定B細胞エ
ピトープをコードする配列を有する。エピトープは、27個のアミノ酸(天然の配列由来
の334~361)からなり、リンカーが保存されている。

【0277】

p G P T V - p A W 4

p T H 1 1 0 と対照的に、L T - B 遺伝子がポッサム Z P 3 をコードする全長遺伝子に置
換されている。

【0278】

p G P T V - p A W 4 - A 2

p G P T V - p A W 4 と対照的に、この構築物は、推定切断ペプチドが除去された P o s
s Z P 3 の末端切断バージョンを含む。短いリンカー (G l y - P r o - G l y - P r o)
(配列番号11) および大腸菌易熱性エンテロトキシンサブユニットA (L T - A) 由
来のA2領域をコードするフクロギツネ Z P 3 遺伝子のカルボキシル末端にさらなる配列
が挿入されている。毒素原性大腸菌によるコロニー形成により、L T - A および L T - B
が分泌される。その天然の状態(および植物細胞中)では、これらは互いに結合して安定
なホロトキシンを形成する。L T - B が上皮の裏打ちに分子を標的する一方で、これはA
D P リボシル化およびその後下痢を引き起こす有毒なAサブユニットである。L T - A サ
ブユニットは、2つの領域A1およびA2からなる。A2と呼ばれる領域は、A1領域の
下方からL T - B によって形成される五量体まで伸長したヘリックスを形成し、2つの
サブユニットの間に結合を形成する。A1タンパク質は、五量体の上に固定される。p G
P T V - p A W 4 - A 2 の場合、植物細胞が p T H 1 1 0 (または上記の誘導体) で同時
形質転換された場合、A2ヘリックスは、P o s s Z P 3 たんぱく質とL T - B 五量体と
の間にアンカーを提供する。

【実施例15】

【0279】

実施例15. ニンジンサンプルを使用したマウス避妊実験

実施例14の構築物の1つを含むトランスジェニックニンジンを用いて、実施例11に記載のよ
うに産生し、実施例12および13のように処理した。マウスを、雄/雌ペアとして収容
する一方で、1匹の雌に対して3匹の雌のマウスをケージに入れた。実験を通して、雌あ
たりの出産数に留意した。

【0280】

1gの乾燥質量あたり50 μ gを超えるL T B を発現する粉末ニンジンを用いてプールおよび混
合した。各採餌のために、ニンジン粉末をリンゴサイダーと1:2 (w / v) で混合した
。採餌を、2週間間隔で12週間行った(0、3、14、17、28、31、42、45
、56、59、70、73、84、87)。動物を3つの群に分け、4~6匹に4gの野
生型ニンジン+リンゴサイダーを与え、4~5匹に4gのトランスジェニックニンジン+
リンゴサイダーを与え、4~5匹に4gのトランスジェニックニンジン+リンゴサイダー
+10mgの Q u i l l a j a 抽出粉末 (G a r u d a) を与えた。

【0281】

開始から31日目に、雌マウスを、正午に各ケージに移して水および睡眠のみを与える絶
食プロトコルに供した。午後4時に試験食を与え、一晩放置した。翌朝午前8時に雌マ
ウスを通常のケージに戻した。

【0282】

0日目および70日目に、尾静脈由来の血清サンプルを各雌から採取し、さらなる抗体分
析のために-80 $^{\circ}$ Cで保存した。最終血清サンプルを、96日目に心穿刺によって採取し
、上記のように保存した。糞便サンプルを、70および87日目に採取し、-80 $^{\circ}$ Cで凍
結した。凍結ペレットサンプルを、凍結乾燥し、0.8mlリン酸緩衝化生理食塩水(p
H7.2)(P B S) に再懸濁し、14000rpmで5分間遠心分離し、アッセイまで
上清を-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

【実施例16】

10

20

30

40

50

【0283】

実施例16. 新鮮な植物材料を使用したマウスの採餌

新鮮な植物も使用して、実験マウスに与えた。トマトおよびニンジン植物の葉または新鮮なトマトおよびニンジンを使用した。

【0284】

1 gの乾燥質量あたり50 μ gを超えるLTBを発現する乾燥粉末に対応する新鮮な葉またはトマトおよびニンジンをプールおよび混合した。いくつかの場合、新鮮な材料を小片に粗みじん切りにした。採餌を、2週間間隔で12週間行った(0、3、14、17、28、31、42、45、56、59、70、73、84、87)。動物を3つの群に分け、4~6匹に4gの野生型トマトまたはニンジンを与え、4~5匹に4gのトランスジェニックトマトまたはニンジンを与え、4~5匹に4gのトランスジェニックトマトまたはニンジン+10mgのQuillaja抽出粉末(Garuda)を与えた。

10

【0285】

開始から31日目に、雌マウスを、正午に各ケージに移して水および睡眠のみを与える絶食プロトコルに供した。午後4時に試験食を与え、一晩放置した。翌朝午前8時に雌マウスを通常のケージに戻した。

【0286】

0日目および70日目に、尾静脈由来の血清サンプルを各雌から採取し、さらなる抗体分析のために-80で保存した。最終血清サンプルを、96日目に心穿刺によって採取し、上記のように保存した。糞便サンプルを、70および87日目に採取し、-80で凍結した。凍結ペレットサンプルを、凍結乾燥し、0.8mlリン酸緩衝化生理食塩水(pH7.2)(PBS)に再懸濁し、14000rpmで5分間遠心分離し、アッセイまで上清を-20で保存した。

20

【実施例17】

【0287】

実施例17. 粉末ホモジネートにおける抗原濃度のばらつきの減少

植物由来ワクチンの適用は、一貫した用量を提供する能力および適用すべき最小および最大用量を補助するための臨床データの達成に依存する。ワクチン材料が許容範囲内で一貫した抗原濃度を提供する場合、バッチ製造およびQCの正確さのみを評価することができる。3つの最近のヒト臨床試験(Tacketら、1998、Tacketら、2000、Thanavalaら、私信)では、ヒトボランティアに、目的の抗原タンパク質を発現する未処理で角切りのトランスジェニックジャガイモ材料を与えた。各臨床試験における実験用量は、消費した材料の無作為化したサンプルのアッセイの結果によって示されるように、300%もばらつきが認められた。本明細書中に記載の方法によって脱水粉末に減少した類似のジャガイモ材料により、無作為化サンプルを通してばらつきが1/10まで減少した等価なインビトロ免疫原性反応(適切なアッセイ検出による)が得られた。この結果は、同一の抗原(HBsAg)ならび表1に示したいくつかの他のモデル植物種および抗原を発現する処理したトランスジェニックトマト材料でも同一であった。

30

【0288】

実施例では、2つのいずれかの方法によって均一化を行った。第1の方法を凍結乾燥前に適用し、この方法は、新たに採取した植物材料の粗パルプ化および混合ならびにその後の混合材料の凍結および凍結乾燥を含む。第1のスライス、混合、または粉碎プロセスにより、未処理植物組織(果実、塊茎、葉、種子など)をパルプ混合物に減少させた。この混合物は、完全な植物細胞と粉碎された細胞破片の両方を含むと見なされる。このプロセスの利点は、より大きな器官(果実または塊茎など)の処理しやすい混合物への減少であり、それにより組織間の相同なタンパク質のばらつきが材料の均一なバッチに組み合わされる。全植物細胞の完全性を完全に破壊することなく均一なバッチを得る能力により、その後の処理段階で相同タンパク質の安定な保存環境が得られる。第2の均一化方法には、処理前の植物材料の処理を最低限にすることが必要であった。上記のように、スライス、四つ切り、または完全な材料の凍結乾燥を行った。次いで、得られた材料を、手で破壊して

40

50

微粉末にし、1バッチのコンテナに入れ、震盪または乾燥混合などの機械的手段によって完全に混合した。

【0289】

任意のピューレ化ステップの除去により、全ステップに必要な労働密度が減少した。前乾燥処理（ピューレ化、皮むき、四つ切り、またはスライス）の効果、ジャガイモの全乾燥時間に対するその効果について評価した。図7に示すように、完全な凍結乾燥状態への減少は、ジャガイモ材料の皮をむかないかいくつかの手段（四つ切り、ダイスカット、スライス、またはピューレ化）でカットしない場合に限り、制限される。

【実施例18】

【0290】

実施例18．ジャガイモ塊茎サンプルを、非ピューレ化プロトコールを使用してトランスジェニックタンパク質の損失を最小にしながらか脱水によって乾燥重量対湿重量を基準として1.1倍まで濃縮することができる

以前の採餌試験は、所望の抗原の十分な用量を送達させるために比較的大量の材料を使用していた。例えば、上記で参照された3つのヒト臨床試験は、ボランティアが各セッションで100g～150gの範囲の未処理ジャガイモを消費することが必要であり、ボランティアによっては単回用量を30分以上かけて消費していた。100gまたはそれ以上の未処理材料の経口投与は、おそらくワクチンを投与される者が十分に許容できず、より大きな規模のワクチンには耐えられないであろう。本明細書中に記載のプロセスの主な利点は、達成されたタンパク質濃度である。表2で示すように、材料の質量を、94%（ジャ

10

20

【0291】

記載のデータは、いくつかの抗原の例を提供し、いくつかの植物種および組織にわたる。90%を超える水分の除去により、湿重量に対する乾燥重量の基準として植物サンプルを1.1倍まで濃縮される。しかし、材料の質量が1/1.1に減少するにもかかわらず、抗原濃度は一般に評価した植物種に依存して4～8倍増加し、処理の結果としての抗原の顕著な損失（または少なくとも抗原検出の減少）を示す。使用した例は、一般に、未処理材料のピューレ、さらなる任意の賦形剤（抗酸化剤、安定剤、アジュバントなど）、その後の凍結、凍結乾燥、および得られた材料の微粉末への減少を含んでいた。表2にまとめたように、等価な特徴の材料を得ることができる一方で、いくつかの植物種において抗原損失を最小限にすることができる上記の非ピューレプロトコールを示した。

30

【0292】

この手順の実践的結果は、有意により低い投与体積で、それにともなって抗原濃度が増大した処方および経口投与ができることである。さらに、この方法は、細胞構造および目的のトランスジェニックタンパク質を著しく破壊することなく湿式混合による均一化に影響を受けやすい葉または茎などの広範な植物組織由来のワクチンまたは治療薬の安定化のための都合のよい機構を提供する。

40

【実施例19】

【0293】

実施例19．ホモジネート処方物の周囲安定性および抗原回収率および安定性に対する賦形剤の効果

植物由来の医薬品の抽出に依存する以前の研究では、粗植物抽出物中の標的タンパク質の安定性を評価した。アルファルファから産生されたモデル抗体の抽出により、水抽出物で2時間まで、乾燥アルファルファで12週間までの安定性を示した（Khouidira、1999）。特に経口ワクチンストラテジーとして植物由来の治療薬の価値を最大に高めるために、いくつかの腐敗しにくい食品形態の安定性を、少なくとも6ヶ月、好ましくは2

50

～ 3 年に延長する必要がある。

【 0 2 9 4 】

目的のモデル抗原を発現するいくつかの処方物を、12ヶ月までの規則的な期間で所望のタンパク質の周囲安定性について評価した。図9に示すように、大部分の材料は周囲保存下で抗原が著しく分解しなかった。これは、有効な非熱分解は、乾燥同時植物材料であるか、植物細胞内に封入されたままであり、部分的に破壊された細胞破片である抗原に保護状態を提供する有効な手段であることを示す。植物酵素または構造タンパク質の存在が、抗原が非トランスジェニックホモジネートに急増する処方物のこの保護の付与に十分であるかどうかを決定するためにさらなる試験を完了すべきである。

【 0 2 9 5 】

免疫原性の評価ならびに植物材料処理、抗原回収率、および抗原安定性に対するその効果を調査するためにいくつかの賦形剤をこれらのモデル処方物に添加した。以前の報告 (Leopold, 1988) では、単純なガラス状の糖は天然のタンパク質変性に対する保護によって植物酵素を安定化することができる結論付けられた。食品グレードの供給源をピューレ化時にトランスジェニックトマトホモジネートに添加して、植物材料中にカプセル化された抗原の安定性に対する効果を評価した。糖に加えて、実験アジュバントを臨床評価のために液相 (ピューレ後) のジャガイモまたはトマトに添加し、アスコルビン酸 (Aldrich) をいくつかのサンプルに添加して、抗酸化剤のピューレ化ジャガイモ中での抗原の損失を最小にする能力を評価した。抗原回収率および安定性に対するこれらの賦形剤の効果は一貫していないが、いずれの場合も重大ではない。供給源の添加において適切な脱水産物に到達するために必要な乾燥時間が著しく増加する。ピューレ化ジャガイモの視覚可能な酸化 (褐変) を有効に遮断するためには、1:150未満 (質量) の濃度でのアスコルビン酸の添加が必要であるが、この濃度は試験サンプル内の記録可能な抗原レベルに対して一貫した効果がなかった。

【 0 2 9 6 】

一般に、全ての凍結乾燥材料は、周囲温度で少なくとも6ヶ月間、いくつかの場合では12ヶ月まで周囲温度での抗原の安定性が示された。凍結乾燥がこれらの例での主な脱水方法である一方で、粗くパルスした材料を、保存前に風乾または噴霧乾燥によって安定化することもできる。理想的には、どのような乾燥方法によっても、最終材料を全水分含有量の少なくとも90重量%の除去に十分に脱水し、密封バッグまたはコンテナで保存する。一旦密封すると、均一な粉末を、測定可能なレベルの標的タンパク質レベルのいかなる顕著な減少もせず、に相当な期間室温で保存することができる。

【 実施例 20 】

【 0 2 9 7 】

実施例 20 . 乾燥免疫避妊トランスジェニックトマトを与えられた動物はコントロール動物と比較して産仔数が減少した

この研究内で、サポニンアジュバントと同時投与された経口送達される植物由来のLTBマウスZP3エピトープ融合タンパク質は、種特異性を示し、マウスの受精能が45.3%減少した。

【 0 2 9 8 】

本研究で使用されたトランスジェニックトマト果実は、Millarらに記載のマウスZP3遺伝子由来のエピトープに融合したLTBを発現した。以下の3つの試験食を使用した。野生型トマト (コントロール)、トランスジェニックトマト (トランスジェニック)、およびQuillaja抽出物を含むトランスジェニックトマト (トランスジェニック + アジュバント)。凍結乾燥した粉末トマト果実を、1:2 (重量) で低温殺菌リンゴサイダー (Cornell Orchards) と混合した。トマト果実中のLTB濃度を、融合タンパク質濃度に関する概算として得た。1gの乾燥質量あたり8gを超えるLTBを発現するトマト果実を、2つのトランスジェニック群の試験食で使用した。トランスジェニック果実のプール後、計算した平均LTBまたは融合タンパク質は、37.8 g⁻¹であった。トランスジェニック + quill群のために、4gの飼料あたり10mg

10

20

30

40

50

の Quillaja 抽出粉末 (Garuda) も添加した。採餌時に、雌に 4 g の試験飼料をペトリ皿で与えた。トランスジェニック果実からなる治療では、これは、飼料あたりの LTB 融合タンパク質の全部で 100.8 g となった。

【0299】

マウスおよびハタネズミの両方に 2 週間毎に 12 週間試験食を与えた (0、3、14、17、28、31、42、45、56、59、70、73、84、および 87 日目)。

【0300】

マウスのために、試験食を与える最初の 5 日間 (0 日目 ~ 28 日目) に、雌をホームケージから取り出し、試験食を含む個別のケージに入れ、4 ~ 6 時間放置し、その後ホームケージに戻した。開始から 31 日目に、雌マウスを、正午に各ケージに移して水および睡眠のみを与える絶食プロトコールに供した。午後 4 時に試験食を与え、一晩放置した。翌朝午前 8 時に雌マウスを通常のケージに戻した。両採餌計画を使用して、消費された試験食の最終重量を記録した。

10

【0301】

ハタネズミについては、雌に試験飼料を与える直前に、ホームケージから雄および任意の子を取り出し、試験食の消費を防止するために一時的に保持ケージに移した。分離によって生じたいかなるストレスも軽減させるために最大 1 時間雌を戻した。雌がこの時間内に全トマト混合物を消費しない場合、残存部分を除去し、同一の採餌手順にしたがって 4 時間後に再度勧めた。使用された最終の重量を記録した。

【0302】

マウスおよびハタネズミの両方の実験を通して雌が出産した同腹子および子の数を記録した。

20

【0303】

マウスでは、出生数に関して食餌処理間で有意差は認められなかった ($p = 0.05$)。しかし、コントロール食を与えたメスの産仔数 (平均 5.3 匹 / 同腹子) と比較してトランスジェニック + アジュバント食を与えたメスの産仔数 (平均 2.9 匹 / 同腹子) は 45.3% 減少した。これは、信頼区間を使用して有意な減少と証明される ($p = 0.1$)。ハタネズミでは、出生数に関して食餌処理間で有意差は認められなかった ($p = 0.05$)。95% の信頼区間を使用しても同腹子に関する食餌処理の間に有意差は認められなかった ($p = 0.05$ および $p = 0.1$)。

30

【実施例 21】

【0304】

実施例 21 . 抗原含有量の処理効果

質量および抗原含有量に対する凍結乾燥の効果を決定するために、5 つの T₂ 植物由来の 2 つの果実を秤量し、処理前後に LTB 含有量についてアッセイした。凍結乾燥前後サンプル質量の比較により、サンプルをその元の質量の 6% に減少させる (データ示さず) プロセスが明らかとなった。新鮮な材料および処理した材料の LTB 含有量の ELISA 分析により、類似の 16 倍濃縮を示す抗原が示され、これにより、使用した処理方法 (図 10) によって抗原があまり喪失していないことが示唆される。

【実施例 22】

40

【0305】

実施例 22 . 植物由来のワクチンを使用した経口免疫化により、子孫が受動的に免疫化される

動物

試験食を与える場合以外は水および標準的な実験用飼料を準備したケージにマウスを維持した。各処理群には、5 ~ 6 匹の成体雌マウスを含んでいた。雌を、ケージあたり 1 匹雄に対して雌 3 匹または 1 匹の雄に対して雌 2 匹のいずれかの比でパートナーと組ませた。離乳時に子を取り出し、ケージで 1 つの性を維持した。

【0306】

試験食

50

L T Bを発現するトランスジェニックトマト株を、承認された温室施設内で成長させた。採取したトマトを、粉末形態に処理し、均一なワクチンバッチとして組み合わせた。このバッチを、使用前に4 で保存した。トランスジェニックトマト粉末とリンゴサイダーとの1 : 2 (重量)の比での混合によってワクチンを処方した。4 gのトランスジェニック粉末に対して10 mgの*Quillaja*抽出物を含む基本ワクチン処方物の増加によって、アジュバント化処方物を達成した。

【0307】

ワクチン接種療法

採餌を、2週間間隔で12週間行った(0、3、14、17、28、31、42、45、56、59、70、73、84、87)。開始から31日目に、雌マウスを、試験食を与える前に4時間、各ケージに移して水および睡眠のみを与える絶食プロトコールに供した。ジャガイモ食を雌とともに一晩放置し、翌朝午前8時に取り出し、その時点で雌を通常のケージに戻した。上記のように、非トランスジェニック処方物(n = 4)、トランスジェニック処方物(n = 5)、またはアジュバント処方物(n = 5)のいずれかを動物に投与した。

10

【0308】

血清サンプリング

0日目および70日目に、尾静脈由来の血清サンプルを各雌から採取し、分析のために-80 で保存した。最終血清サンプルを、96日目に心穿刺によって採取し、上記のように保存した。試験から42日後、各実験群で誕生した子(群あたり2匹またはそれ以上の母から群あたり最少で13匹)を、その後の受動抗L T B力価の決定のために良好な健康状態を維持した。最少年齢21日間で、これらの子から心穿刺によって血清を採取した。

20

【0309】

抗L T B抗体のためのE L I S A

記載のように血清抗L T B I g Gについてサンプルをアッセイした(8)。簡単に述べれば、サンプルを、0.05% Tween - 20を含むP B Sで連続希釈した。マイクロタイタープレートで、混合ガングリオシド(III型)(Sigma、St. Louis、MO、USA)でコートし、0.25% B S Aでブロックし、精製組換えL T Bと1時間インキュベートした。希釈血清をウェルに添加し、洗浄前に1時間インキュベートし、マウスI g Gに対するウサギ抗血清およびアルカリホスファターゼ(Sigma)に結合した抗ウサギ抗血清を使用して検出した。母および対応する同腹子の終点希釈の比較によって母と子との間の力価の関係を調査した。子の誕生日が最も近い(70日または96日)ものの血清サンプルの終点希釈として母の希釈を得た。21日齢で交配した子のみを、この分析に用いた。このデータセットは、7匹の母、9つの同腹子、および41匹の子からなる。

30

【0310】

処理および同腹子

L T B力価決定のためにサンプリングされた子のうち、4つの同腹子由来の18匹の子がコントロール群由来の3匹の異なる母親から生まれ、4つの同腹子由来の17匹の子がトランスジェニックトマト群由来の4匹の異なる母親から生まれ、3つの同腹子由来の13匹の子がトランスジェニックトマト+アジュバント群由来の2匹の異なる母親から生まれた。

40

【0311】

抗L T B抗体のE L I S A

トランスジェニックトマト食群またはトランスジェニックトマト+アジュバント食群内の親マウスは、接種あたり平均75.6 μgのL T Bを含むトマトの14個の経口接種物を投与された。サンプリングした子の出産前に母親が投与された接種物数はさまざまであるが、少なくとも8回採餌された。トランスジェニックトマト食を投与された全母親は、試験70日目までのコントロール群よりも有意に高い抗L T B血清I g G力価を産生した(図11、 = 0.05)。2つのトランスジェニック材料の試験食(*Quillaja*抽出物)は、

50

出粉末を含むか含まないトランスジェニックトマト粉末)の間で力価の有意差は認められなかった。コントロール群の母親から生まれた18匹の子のうち、25を超える終点希釈を有する子はいなかった(図12)。トランスジェニックトマト群の母親から誕生した17匹の子の平均終点希釈は558.8である一方で、トランスジェニックトマト+アジュバント群の母親から誕生した13匹の子の平均終点希釈は448.1であった。トランスジェニックトマトとトランスジェニックトマト+アジュバントの母親由来の子の平均終点希釈の間で有意差は認められなかったが($p = 0.05$)、両トランスジェニック食由来の子の平均終点希釈は、コントロール群よりも有意に高かった($p = 0.05$)。母親とその対応する同腹子との間に正の直線関係が認められた(r^2 値は0.9289)(図13)。

10

【実施例23】

【0312】

実施例23.安定性研究

多数の異なるトランスジェニック植物材料を、本明細書中に記載の手段によって処理した。材料には、AIV-HA(HAONT)または改変大腸菌エンテロトキシン(SLT102)のいずれかを発現するトランスジェニックNT-1細胞培養物、AIV-HA、NVCP、HBsAg、もしくは大腸菌エンテロトキシンBサブユニット(LT-B)のいずれかを発現するトランスジェニックジャガイモ、およびNVCPもしくはHBsAgのいずれかを発現するトランスジェニックトマトが含まれていた。処理した材料を、種々の温度で6ヶ月保存した。この間一定間隔で無作為化サンプルを抗原含有量について評価した(目的の抗原についての適切なアッセイによる)。図14~17は、サンプリング期間中にこれらの材料中で保持された検出可能な抗原レベルを記載する。

20

【0313】

他の実施形態

他の実施形態が当業者に自明である。前述の詳細な説明は明確にするためのみに提供し、例示のみを意図すると理解すべきである。本発明の精神および範囲は上記実施例に制限されず、以下の特許請求の範囲に含まれる。全ての特許、特許出願、および本明細書中で引用された公表された引例は、参考文献および表を含むその全体が本明細書中で参考として組み込まれる。

【0314】

参考文献

【表3A】

30

Arakawa T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC, Langridge WH: "A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes"; *Nat Biotechnol* 16: 934-8 (1998).

Arikawa, J., K. Yoshimatsu, and K. H.: "Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in Japan."; *Jpn. J. Infect. Dis.*, 54, no. 3: 95-102 (2001).

Bagdasarian MM, Nagai M, Frey J, Bagdasarian M: "Immunogenicity of *Actinobacillus ApxIA* toxin eptiopes fused to the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit". *Vaccine* 17: 441-447. (1999).

Bandivdekar, A.H., V.J. Vernekar, S.B. Moodbidri et al.: "Characterization of 80 kDa human sperm antigen responsible for immunoinfertility." *Am. J. Reprod. Immunol*"; 45, no. 1: 28-34 (2001).

Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R: "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology*"; 20: 1195-1197 (1992).

Berger, J., and S.L. Cain: "Reproductive synchrony in brucellosis-exposed bison in the southern Greater Yellowstone Ecosystem and in noninfected populations."; *Conservation Biology*, 13, no. 2: 357-366 (1999).

Bosshardt, S.C., et al.: "Brugia pahangi: circulating antibodies to adult worm antigens in uninfected progeny of homologously infected female jirds"; *Exp Parasitol*, 72(4): p. 440-449 (1991).

Cardenas L, Ciements JD: "Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector"; *Infect Immun* 61: 4629-36 (1993).

Chavali, S.R. and J.B. Campbell: "Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune responses in mice"; *Immunobiology*, 174(3): p. 347-359 (1987).

Cousins, D.V.: "Mycobacterium bovis infection and control in domestic livestock." *Rev. Sci. Tech.* "; 20, no. 1: 71-85 (2001).

Cox, J.C., and A.R. Coulter: "Adjuvants--a classification and review of their modes of action." *Vaccine*"; 15, no. 3: 248-256 (1997).

Dalsgaard, K., et al.: "Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease". *Nat Biotechnol*, 15(3): p. 248-52 (1997).

Dickinson, B.L. and J.D. Clements: "Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity"; *Infect Immun*, 63(5): p. 1617-23 (1995).

Dunbar, B.S., and S.V. Prasad: "Contraceptive vaccine comprising a glycosylated 55KD zona pellucida protein immunogen and method of use of the same in contraception." United States, 1997.

- Edelman, R. "An update on vaccine adjuvants in clinical trial"; AIDS Res. Hum. Retroviruses; 8, no. 8: 1409-1411 (1992).
- Fitchen J, Beachy RN, Hein MB: "Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response"; Vaccine 13: 1051-7 (1995).
- Frary A, Earle ED: "An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato"; Plant Cell Reports 16: 235-240 (1996).
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ.: "Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants"; Science 268:714-716 (1995). 10
- Hiatt AC, Cafferkey R, Bowdish K.: "Production of antibodies in transgenic plants"; Nature 342: 76-78 (1989).
- Hoshi, S., A. Uchino, N. Saito et al.: "Comparison of adjuvants with respect to serum IgG antibody response in orally immunized chickens"; Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 22, no. 1: 63-69 (1999).
- Ingardia, C.J., et al., "Correlation of maternal and fetal hepatitis B antibody titers following maternal vaccination in pregnancy"; Am. J. Perinatology, 16(3): p. 129-132 (1999).
- Kennelly, J.J., and K.A. Converse: "Surgical sterilization: an underutilized research procedure for wildlife damage control"; In Proceeding of symposium: Contraception in wildlife management. Washington, D.C.: USDA/APHIS. 20
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo J-M, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemieux R, Vezina L-P: "Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnology and Bioengineering*"; 64(2): 135-143 (1999).
- Koo, M., et al.: "Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope"; Proc Natl Acad Sci U S A, 96(14): p. 7774-9 (1999).
- Kuby, J. "Immunology"; Third ed., ed. Allen, D. New York: W. W. Freeman and Company, 1997. 30
- Leopold C.: "A sweet way to keep proteins safe"; Science. 281: 179 (1998)
- Ma J.K.-C, Hein M.B. "Plant antibodies for immunotherapy"; Plant Physiol. 109: 341-346 (1995).
- Marciani, D.J., J.B. Press, R.C. Reynolds et al.: "Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity"; Vaccine, 18, no. 27: 3141-3151 (2000).
- Martinez, M.L., and J.D. Harris: "Effectiveness of zona pellucida protein ZPB as an immunocontraceptive antigen"; J. Reprod. Fertil., 120, no. 1: 19-32 (2000). 40
- Mason H, Lam D, Arntzen CJ: "Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11745-11749 (1992).
- Mason HS, Ball J, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ: "Expression and immunogenicity of Norwalk virus capsid protein from transgenic tobacco and potato"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5335-5340 (1996).

- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ: "*Edible vaccine protects mice against Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene*"; Vaccine 16: 1336-43 (1998).
- Millar, S.E., S.M. Chamow, A.W. Baur et al.: "*Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice*"; Science 246: 935-938 (1989).
- Miller, L.A., B.E. Johns, and G.J. Killian: "*Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine*"; Am. J. Reprod. Immunol. 44, no. 5: 266-274 (2000).
- Miller, L.A., B.E. Johns, D.J. Elias et al.: "*Comparative efficacy of two immunocontraceptive vaccines*"; Vaccine 15, no. 17-18: 1858-1862 (1997). 10
- Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Stepkowski K, Hooper DC, Koprowski H, Yusibov V: "*Immunization against rabies with a plant-derived antigen*"; Proc Natl Acad Sci U S A 95: 2481-5 (1998).
- Murashige T, Skoog F: "*A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*"; Physiologia Plantarum 15: 473-497 (1962).
- O'Dowd AM, Botting CH, Precious B, Shawcross R, Randall RE: "*Novel modifications to the C-terminus of LTB that facilitate site-directed chemical coupling of antigens and the development of LTB as a carrier for mucosal vaccines*"; Vaccine 17: 1442-1453 (1999). 20
- O'Hern, P.A., Z.G. Liang, C.S. Bamba et al.: "*Colinear synthesis of an antigen-specific B-cell epitope with a 'promiscuous' tetanus toxin T-cell epitope: a synthetic peptide immunocontraceptive*"; Vaccine 15, no. 16: 1761-1766 (1997).
- Pal, R., and O. Singh: "*Absence of corpus luteum rescue by chorionic gonadotropin in women immunized with a contraceptive vaccine*"; Fertil. Steril., 76 no. 2: 332-336 (2001).
- Pillai D, Dixit A, Alok D, Garg LC: "*Translational fusion of heat labile enterotoxin chain B and beta- subunit of human chorionic gonadotropin: periplasmic expression in Escherichia coli and its immunogenicity*"; FEBS Lett 387: 23-6 (1996). 30
- Richmond, M., and C.H. Conaway: "*Management breeding and reproductive performance of the vole, Microtus ochrogaster, in a laboratory colony*"; Laboratory Animal Care 19: 80-87 (1969).
- Richter L, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS: "*Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization*"; Nature Biotechnol. 18:1167-1171(2000).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: "*Molecular Cloning - A Laboratory Manual*"; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York (1989).
- Schodel F, Will H, Johansson S, Sanchez J, Holmgren J: "*Synthesis in Vibrio cholerae and secretion of hepatitis B virus antigens fused to Escherichia coli heat-labile enterotoxin subunit B*"; Gene 99: 255-9 (1991). 40
- Sewani CR, Bagdasarian MM, Ireland JJ, Bagdasarian M: "*Display of an inhibin epitope in a surface-exposed loop of the E. coli heat-labile enterotoxin B subunit*"; Vaccine 16: 1611-9 (1998).

Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BAM, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, Hol WGJ: "*Refined structure of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin*"; J. Mol. Biol. 230: 890-918 (1993).

Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, van Zanten BA, Berghuis AM, Hol WG: "*Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography*"; Nature 355: 561-4 (1992).

Skinner, S.M., G.J. Killian, L.A. Miller et al.: "*Characterization of antigenicity and immunogenicity patterns of native and recombinant zona pellucida proteins in the white-tailed deer (Oidocoileus virginianus)*"; Journal of Reproduction and Fertility 101: 295-303 (1994). 10

Soltysik, S., J.Y. Wu, J. Recchia et al.: "*Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function*"; Vaccine 13, no. 15: 1403-1410 (1995).

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ: "*Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in transgenic potato*" Nature Medicine 4:607-609 (1998).

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ: "*Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes*"; J. Infect. Dis. 182: 302-305 (2000). 20

Takahashi, H., T. Takeshita, B. Morein et al.: "*Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs*"; Nature 344, no. 6269: 873-875 (1990).

Takikawa, M., M. Kamada, M. Maegawa et al.: "*Evaluation of two sperm antigens, rSMP-B and YWK-II, as targets for immunocontraception*" Zygote 9, no. 2: 145-151 (2001).

Tung, K.S.K., J. Ang, and Y. Lou.: "*ZP3 peptide vaccine that induces antibody and reversible infertility without autoimmune oophoritis*"; American Journal of Reproductive Immunology 35: 181-183 (1996). 30

VandeVoort, C.A., E.D. Schwoebel, and B.S. Dunbar: "*Immunization of monkeys with recombinant complimentary deoxyribonucleic acid expressed zona pellucida proteins*"; Fertil. Steril. 64, no. 4: 838-847 (1995).

Wada K, Aota S, Tsuchiya R, Ishibashi F, Gojobori T, Ikemura T: "*Codon usage tabulated from the GeneBank genetic sequence data*"; Nucleic Acid Research 18: 2367-2411 (1990).

Walmsley AM, Arntzen CJ: "*Plants for delivery of edible vaccines. Current Opinion in Biotechnology 11*"; 126-129 (2000).

Wigdorovitz A, Perez Filgueira DM, Robertson N, Carrillo C, Sadir AM, Morris TJ, Borca MV: "*Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1*"; Virology 264: 85-91 (1999). 40

Wigdorovitz, A., C. Carrillo, M.J. Dus Santos et al.: "*Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1*"; Virology 255, no. 2: 347-53 (1999).

Wu, J.Y., B.H. Gardner, C.I. Murphy et al.: "Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine"; J. Immunol. 148, no. 5: 1519-1525 (1992).

Yu, J. and W.H. Langridge: "A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. Nat Biotechnol"; 19(6): p. 548-552 (2001).

【図面の簡単な説明】

【0315】

【図1a】Elisaで決定した、 T_0 植物由来の葉および果実サンプルのLTB含有量を示す図である。

【図1b】Elisaで決定した、 T_1 植物由来の葉および果実サンプルのLTB含有量を示す図である。

【図1c】Elisaで決定したLTB含有量に関する葉および果実順位の比較を示す図である。

【図2a】試験したマウスの抗LTB抗体希釈の平均終点を示す図である。バーは、 OD_{450} の読み取りが同一処理内の6匹の動物で0.1に等しくなった場合の平均血清希釈を示す。処理には、非トランスジェニックトマトペーストを与えたマウス（コントロール）、トランスジェニックトマトペーストを与えたマウス（試験区）、および10mgのQuillaja抽出粉末（Garuda）と混合したトランスジェニックトマトペーストを与えたマウスが含まれる。エラーバーは、標準誤差を示す。

【図2b】マウスZP3エピトープと融合させたLT-Bからなる融合タンパク質を発現する未処理トマト材料の経口投与後の抗LTB力価の増加（シリーズ1）と繁殖力（シリーズ2）との間の関係を示す図である。第3のデータセットは、トマト材料に混合したさらなるアジュバントを投与した実験群を示す。

【図3】マウスの受精能に対する試験材料の経口送達の効果を示す図である。各バーは、コントロールが非トランスジェニックトマトペーストを与えた動物由来の結果を示し、試験区がトランスジェニックトマトペーストを与えた動物由来の結果を示し、試験区+adjが10mgのアジュバント粉末（Garuda）と混合したトランスジェニックトマトペーストを与えた動物由来の結果を示す、特定の処理における6匹の動物の平均を示す。エラーバーは、標準誤差を示す。

【図4】ハタネズミの受精能に対する試験材料の経口送達の効果を示す図である。各バーは、コントロールが非トランスジェニックトマトペーストを与えた動物由来の結果を示し、試験区がトランスジェニックトマトペーストを与えた動物由来の結果を示し、試験区+adjが10mgのQuillaja抽出粉末（Garuda）と混合したトランスジェニックトマトペーストを与えた動物由来の結果を示す、特定の処理における6匹の動物の平均を示す。エラーバーは、標準誤差を示す。

【図5a】LTB融合構築物を示す図である。

【図5b】さらなるLTB融合構築物を示す図である。

【図5c】N末端融合カセットを示す図である。

【図6】トランスジェニックタバコ（NT-1）細胞懸濁培養で発現した3つの免疫避妊融合物の平均および「エリートライン」の発現データを示す図である。エピトープ検出は、最初の捕捉がLT-Bに特異的であり、第2の反応が融合避妊エピトープ（マウスZP3エピトープまたは使用した構築物によるGnRHデカペプチド）に特異的であるサンドイッチELISAに基づいた。LTB-GnRH2のデータにより、融合タンパク質の構造は天然のオリゴマー形成を妨害し、それにより完全に形成された五量体の検出（サンドイッチELISAによる融合エピトープの検出能力）を著しく減少させることが示唆される。

【図7】異なる切開方法による乾燥時間の効果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 8】種々の材料における長期間の水分再吸収を示す図である。

【図 9】抗原安定性を示す図である。

【図 10】T2 果実材料内の LTB 含有量に対する処理効果を示す図である。黒べたのバーはプールした果実の平均 LTB 濃度を示し、エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

【図 11】成体血清サンプルの抗 LTB 終点希釈を示す図である。コントロールバーは野生型トマト粉末を与えたマウスの平均終点血清希釈を示し、トランスジェニックバーはトランスジェニックトマト粉末を与えたマウスの平均終点血清希釈を示し、トランスジェニック+アジュバントは Quilaja 抽出粉末を含むトランスジェニックトマト粉末を与えたマウスの平均終点血清希釈を示す。終点希釈を、OD 450 nm 読み取りが 0.1 の血清の第 1 の希釈とした。コントロール：n = 3、トランスジェニック：n = 4、およびトランスジェニック + Adj：n = 2。エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

10

【図 12】子血清サンプルの抗 LTB 終点希釈を示す図である。コントロールバーは野生型トマト粉末を与えられたマウスの子の平均終点血清希釈を示し、トランスジェニックバーはトランスジェニックトマト粉末を与えられたマウスの子の平均終点血清希釈を示し、トランスジェニック+アジュバントバーは Quilaja 抽出粉末を含むトランスジェニックトマト粉末を与えられたマウスの子の平均終点血清希釈を示す。終点希釈を、OD 450 nm 読み取りが 0.1 の血清の第 1 の希釈とした。コントロール：n = 18、トランスジェニック：n = 17、およびトランスジェニック + Adj：n = 13。* 使用した最小希釈 (1/25) での 0.1 未満の OD の血清サンプルを含む。エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

20

【図 13】母と子孫の力価との間の関係を示す図である。母の終点希釈は、対応する同腹子の誕生の最も近くで採取した血清サンプルの終点であり、子の終点希釈は同腹子の平均終点を示す。終点希釈を、OD 450 nm 読み取りが 0.1 の血清の第 1 の希釈とした。母：n = 7、同腹子：n = 9、および子：n = 41。

【図 14 a】凍結乾燥 LT-B ジャガイモチャートの安定性研究を示す図である。

【図 14 b】凍結乾燥 LT-B ジャガイモグラフの安定性研究を示す図である。

【図 15】凍結乾燥 HAO NT 細胞の安定性研究を示す図である。

【図 16】凍結乾燥 HA110-A11 ジャガイモの安定性研究を示す図である。

【図 17】凍結乾燥 SLT102 細胞の安定性研究を示す図である。

【 図 1 a 】

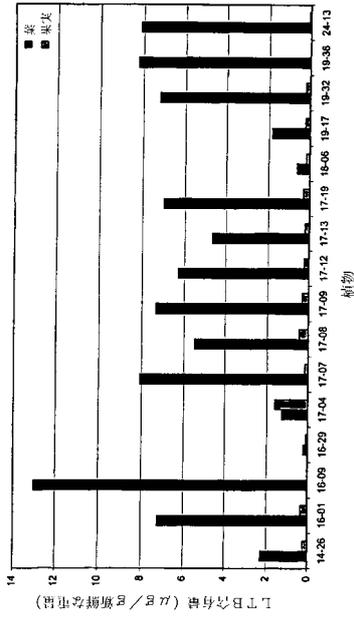


Figure 1a

【 図 1 b 】

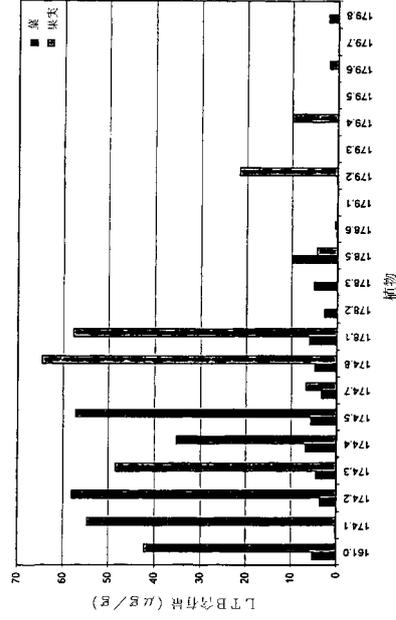


Figure 1b

【 図 1 c 】

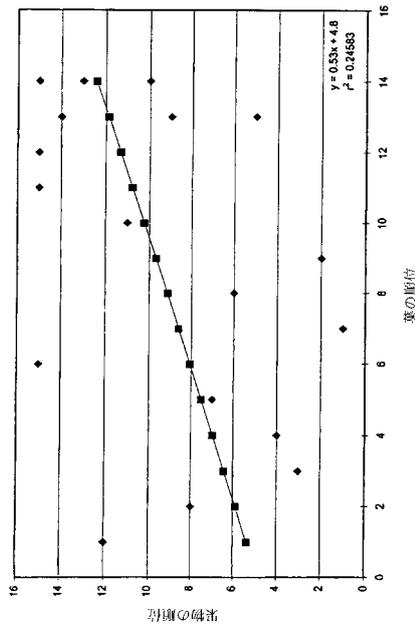


Figure 1c

【 図 2 a 】

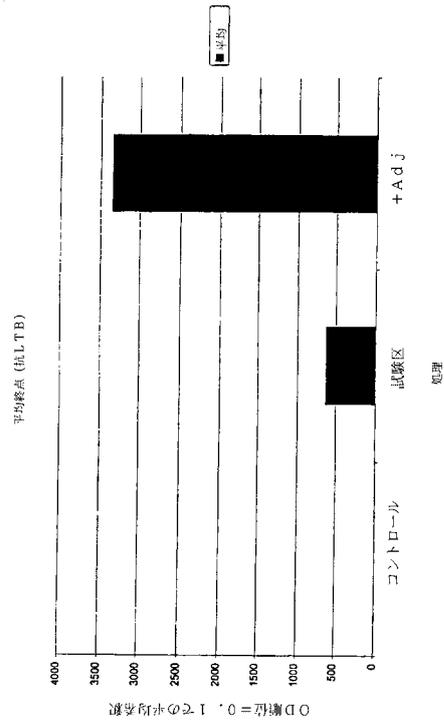


Figure 2a

【 図 2 b 】

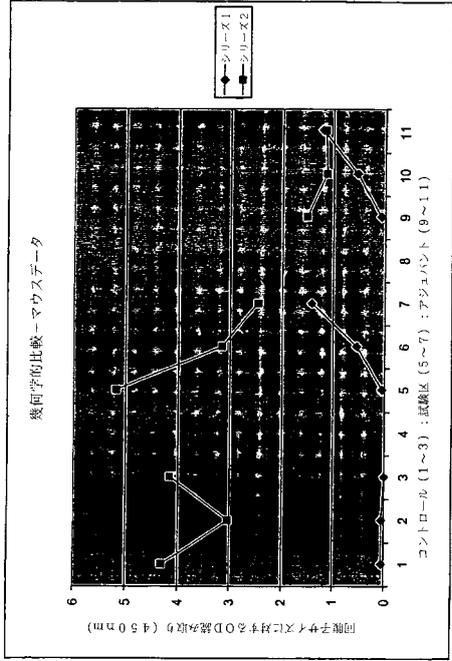


Figure 2 b

【 図 3 】

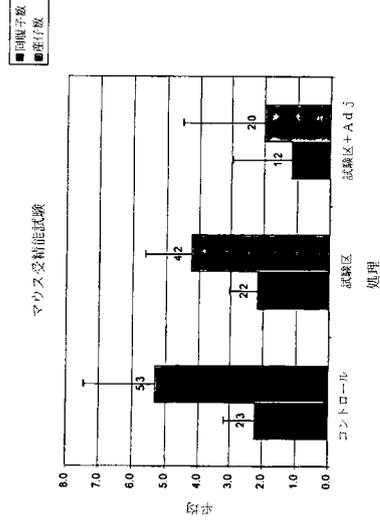


Figure 3.

【 図 4 】

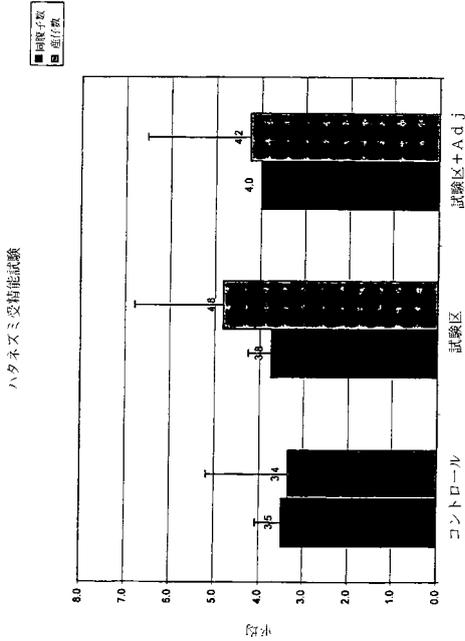
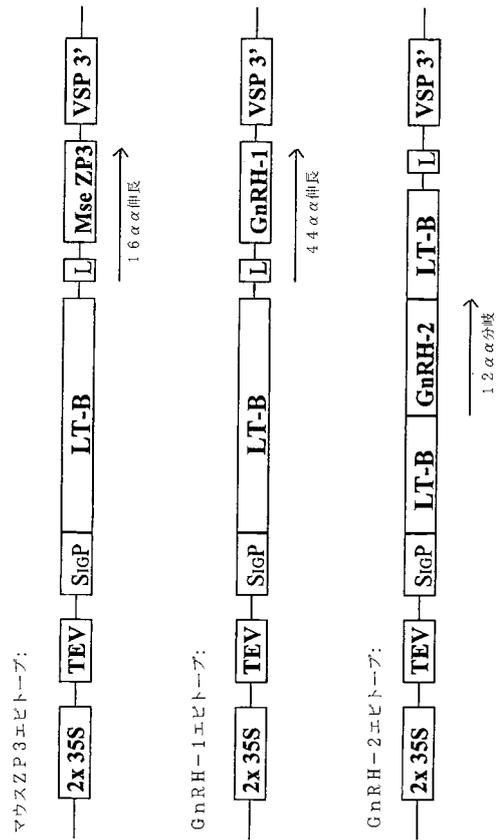


Figure 4

【 図 5 a 】

Figure 5 a 避妊L.T.B融合標薬物



【 図 8 】

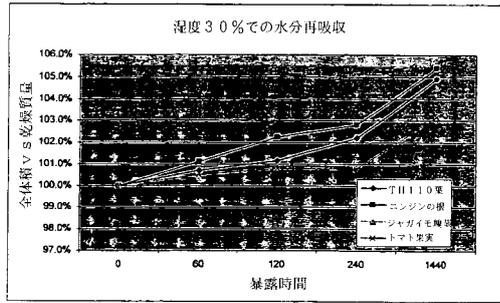


FIGURE 8

【 図 9 】

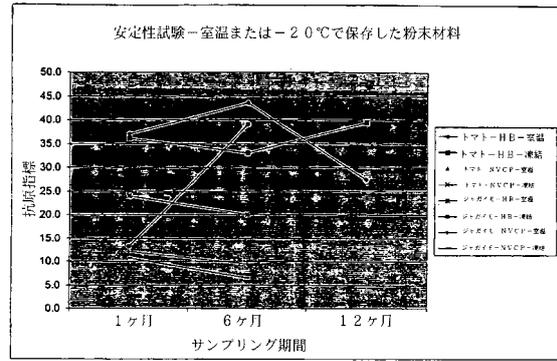


FIGURE 9

【 図 10 】

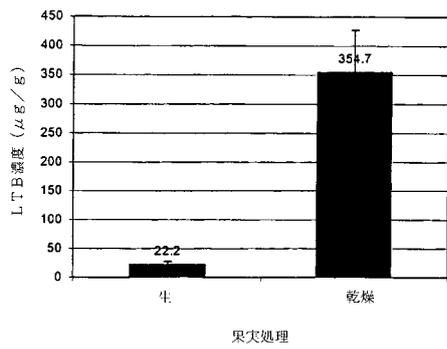


FIGURE 10

【 図 11 】

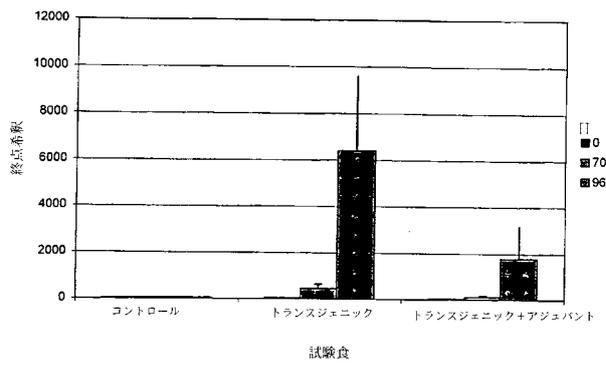


FIGURE 11

【 図 1 2 】

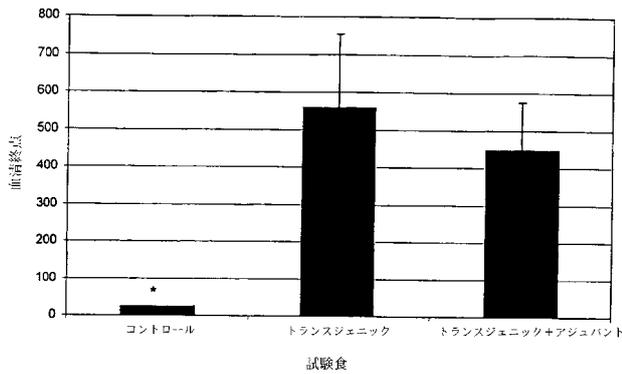


FIGURE 12

【 図 1 3 】

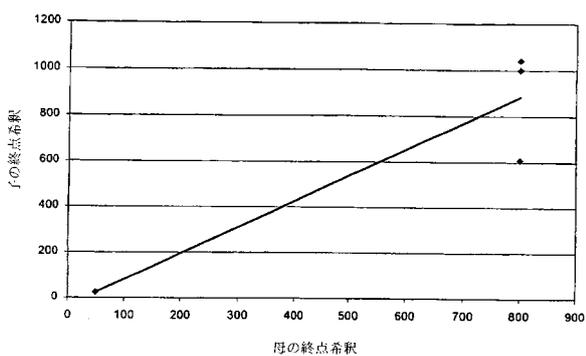


FIGURE 13

【 図 1 4 b 】

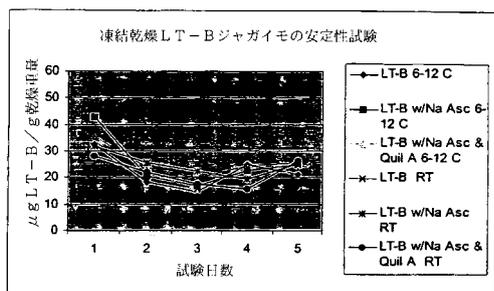


FIGURE 14b

【 図 1 4 a 】

凍結乾燥LT-B ジャガイモ	安定性試験		凍結乾燥LT-B ジャガイモ	安定性試験	
	保存	LT-B ELISA		保存	LT-B ELISA
2001年10月12日	(6-12°C)	32.6	2001年10月12日	(6-12°C)	42.8
2001年10月12日	(R.T.)	35.5	2001年10月12日	(R.T.)	31.9
2001年11月28日	(6-12°C)	18.2	2001年11月28日	(6-12°C)	20.6
2001年11月28日	(R.T.)	23.7	2001年11月28日	(R.T.)	25.5
2002年1月12日	(6-12°C)	14.7	2002年1月12日	(6-12°C)	16.9
2002年1月12日	(R.T.)	19.8	2002年1月12日	(R.T.)	22.5
2002年2月13日	(6-12°C)	25.0	2002年2月13日	(6-12°C)	22.7
2002年2月13日	(R.T.)	24.4	2002年2月13日	(R.T.)	19.3
2002年3月14日	(6-12°C)	21.4	2002年3月14日	(6-12°C)	24.8
2002年3月14日	(R.T.)	25.7	2002年3月14日	(R.T.)	25.3

Figure 14a

【 図 1 5 】

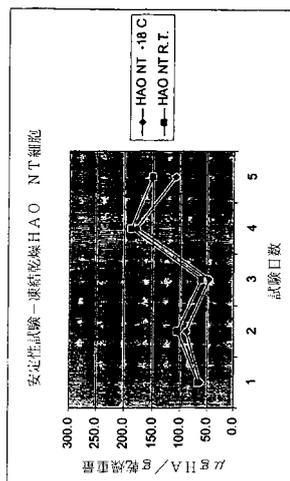


FIGURE 15

HA保存試験

凍結乾燥T-1細胞 (H.A.O)	ELISAの結果
27-Sep-01 (-18°C)	62.35
27-Sep-01 (R.T.)	66.5
25-Oct-01 (-18°C)	88.65
25-Oct-01 (R.T.)	105.33
27-Nov-01 (-18°C)	45.9
27-Nov-01 (R.T.)	60.0
11-Jan-01 (-18°C)	179.3
11-Jan-01 (R.T.)	187.5
8-Mar-02 (-18°C)	* 108.1
8-Mar-02 (R.T.)	* 149.6

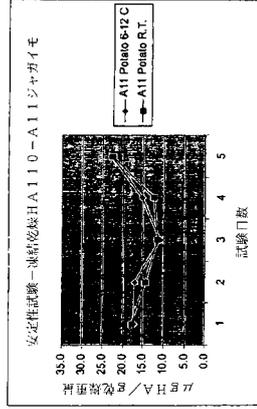
*ELISAにおける凍結乾燥体としてSEPRL由来のニトロトリウム (P/W/68) の新しいロットを説明して開示した。

【 図 16 】

HA保存実験
凍結乾燥機A110-A111ジャガイモ

日付	保存条件	ELISAの結果
27-Sep-01	(6-12°C)	17.22
27-Sep-01	(R.T.)	17.74
28-Oct-01	(6-12°C)	16.89
28-Oct-01	(R.T.)	14.41
27-Nov-01	(6-12°C)	11.0
27-Nov-01	(R.T.)	11.5
11-Jan-01	(6-12°C)	15.2
11-Jan-01	(R.T.)	12.4
8-Mar-02	(6-12°C)	* 22.8
8-Mar-02	(R.T.)	* 22.6

*ELISAは対象は乾燥試料としてELISA
由来のエピトプド抗体A11 (T/W/68) の直
接のロットを確認して開始した



【 図 17 】

安定性試験

凍結乾燥機NT-1細胞 (SLT102)

日付	保存条件	ELISA結果 の値	ELISAの結果 A11
12-Oct-01	(-18°C)	41.4	183.4
12-Oct-01	(R.T.)	41.4	183.4
28-Nov-01	(-18°C)	32	186.8
28-Nov-01	(R.T.)	36.2	201.1
12-Jan-02	(-18°C)	* 18.7	166.1
12-Jan-02	(R.T.)	* 20.6	162.2
13-Feb-02	(-18°C)	11	143.1
13-Feb-02	(R.T.)	12.9	176.3
14-Mar-02	(-18°C)	20.6	186.9
14-Mar-02	(R.T.)	19.9	166.8

AよりB乾燥試料あたりのみよりTまたはRとして
測定された結果。

*>初期のサンプルは乾燥と保存ではなかった。しかし、
評価可能なほど強弱に弱体化して来た。

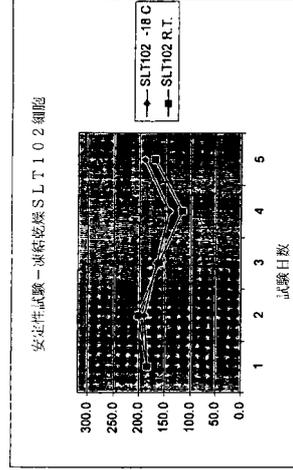


Figure 17

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083072 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K**
- (21) International Application Number: PCT/US02/11693
- (22) International Filing Date: 12 April 2002 (12.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 50/283,884 13 April 2001 (13.04.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH** [US/US]; Tower Road, Ithaca, NY 14853-1801 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **KIRK, Dwayne** [AU/US]; 3427 N. Sericin Street, Mesa, AZ 85215 (US). **MASON, Hugh** [US/US]; 1311 Hanshaw Road, Ithaca, NY 14850 (US). **WALMSLEY, Amanda** [AU/US]; 3427 N. Sericin Street, Mesa, AZ 85215 (US). **ARNTZEN, Charles** [US/US]; 7686 E. Wilderness Trail, Superstition Mountain, AZ 85216-1806 (US).
- (74) Agent: **WILLIAMS, Kathleen, M.**; Palmer & Dodge LLP, 111 Huntington Avenue, Boston, MA 02199-7613 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/083072 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR STABLE TRANSGENIC PLANT PHARMACEUTICALS AND THEIR USE AS CONTRACEPTIVES

(57) Abstract: The present invention provides for processing methods that preserve pharmaceutical proteins expressed in plants. Herein raw plant tissue is reduced to a stable homogenate without significant loss of protein or pharmaceutical potency. The homogenate can be used directly for pharmaceutical purposes without the need to further extract, purify, or precipitate the pharmaceutical protein. The present invention further provides a method of effective immunocontraception for animal and human application. Methods are disclosed for producing transgenic plant or plant cells which express contraceptive proteins, and which can be delivered whole, in part, or after processing, to an animal to cause a contraceptive effect in the target species.

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR STABLE TRANSGENIC PLANT
PHARMACEUTICALS AND THEIR USE AS CONTRACEPTIVES**

BACKGROUND OF THE INVENTION

This invention relates to processing techniques for the production of pharmaceutically active proteins such as vaccines, antibodies or other therapeutic compounds derived from transgenic plants, as well as to their administration to humans and animals for immunocontraception, vaccination against pathogenic diseases, or therapeutic treatment against infection of other immunoreactive compounds. The development of plant based vaccines has significantly advanced the available approaches to vaccination of humans and animals. The use of transgenic plants for the development of vaccines, antibodies, and other human and veterinary therapeutics has not only increased the efficiency of therapeutic protein production, but it has also substantially reduced primary production costs.

With regards to production of plant based vaccines, there has been significant advancements in expression of proteins in transgenic plants. For example, various expression forms, aggregates or fusions have been used to increase production of vaccine subunits, antibodies, and therapeutic or contraceptive proteins, as described in U.S. patents 5,679,880, 5,484,719, 5,686,079 and U.S. patent application 2002/0006411. However, the current state of transgenic plant vaccine technology still requires that the pharmaceutical protein be purified away from the transgenic plant material, or that standardized raw crude plant tissues be consumed. Unfortunately, these options for producing administratable plant-derived pharmaceuticals have inherent drawbacks.

The preferred plant-derived pharmaceutical is standardized plant tissue that can be administered orally. More specifically, it is preferred that the plant material can be stored, shipped and administered at ambient temperatures. However, unpurified transgenic plant based vaccines have the inherent problems of i) variable protein expression levels found from plant to plant and ii) perishability, hence protein degradation. Freshly harvested produce such as fruit, tubers, roots, foliage or any other plant tissue is limited due to their relatively short shelf life, in comparison to conventional pharmaceutical requirements. In addition, the variable level of transgenic protein accumulation found between different plants, clones or plant tissues poses significant difficulty in achieving dose consistency, which is mandatory for pharmaceutical application.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Conventional pharmaceutical technology provides methods for the extraction, purification and concentration of pharmaceutical proteins, however this is expensive, introduces the need for refrigeration of the purified product, and does not allow for protective encapsulation of the transgenic protein by the plant cell itself. Thus, there is a need in the art for production methods of stable transgenic plant based pharmaceuticals that both bypass the drawback of variable protein expression found from plant to plant and that do not require further purification from the original plant material. The processing methods described herein provide for a manner of producing a room temperature stable homogenous formulation that can be used across a broad variety of applications. In addition, the ambient-stable homogenate can inherently be pooled and quality control tested on a batch per batch basis. Further, the described methods of transgenic plant processing allow for the convenient addition of adjuvants, buffers, antioxidants, stabilizers, or antigenic powders throughout the processing enabling a wide range of pharmaceutical formulations to be produced, efficiently and cost effectively. The stable dry homogenates can be used not only for vaccination and treatment of pathogenic diseases, but also may be used for prevention of fertilization.

Fertilization is a complex interaction between key regulatory molecules on the surface of the sperm and egg. The vital role that these molecules play in the reproductive process make them likely targets for control of fertility in many species.

All mammalian eggs are surrounded by a zona pellucida, a relatively simple coat composed of three glycoproteins (ZP1, ZP2, and ZP3) that provide the egg's sperm receptor. The zona pellucida of some non-mammalian species also includes a fourth glycoprotein, ZP4. The glycoprotein components of the zona pellucida serve specific functions during fertilization and early development, which are well defined in the mouse. ZP1 is a structural protein that crosslinks filaments of ZP2 and ZP3. During fertilization sperm initially bind to ZP3, which induces the sperm acrosome reaction. After induction of the acrosome, ZP2 acts as a secondary sperm receptor which is necessary for penetration of the sperm through the zona pellucida. Following fertilization the proteolytic cleavage of ZP2 and modification of ZP3 are thought to be involved in the prevention of polyspermy.

The important role of the zona pellucida during fertilization, its unique expression in growing oocytes and strong immunogenicity has made it an attractive target for the development of immunocontraceptive vaccines (reviewed by Epifano and Dean *Reprod Fertil Dev*. 1994;6:319). Immunization with whole zonae or components of the zona pellucida, has been shown to inhibit fertilization in several species including primates, rabbits, rodents and dogs

WO 02/083072

PCT/US02/11693

(reviewed by Prasad et al., (1996) *J Reprod Fertil Suppl.* 50:143). While the compositions described in these references may inhibit fertilization, they must be administered parenterally by darting, or injection, and are thus impractical for economical, wide spread use. The compositions described in these references, in contrast to the present invention, could not be effectively administered orally as a raw bait, or food, or as processed material for digestive consumption.

Fitchen et al. ((1995) *Vaccine* 13:1051) attempted to produce contraceptive proteins in plants for purified delivery to target or model animal species by injection. In this example, a murine ZP3 epitope was engineered within the sequence of tobacco mosaic virus (TMV) coat protein and expressed in tobacco during TMV infection. The virus particles (displaying the ZP epitope on the outer surface of the virus) were crudely purified from the plant material for parenteral administration. However, the viral particles were not effective in reducing litter size in the mouse model. Fitchen et al. does not relate to a method of inducing contraception in an animal, or to orally administering a transgenic plant to the animal, wherein the oral administration reduces average litter size by at least 50%.

There is a need in the art for a plant composition which may be conveniently administered orally to an animal as a raw bait, or food for digestive consumption, and which significantly reduces litter size in animals to which it is administered. There is a need in the art to avoid the use of plant viruses for expression. Therefore, there is a need in the art to express contraceptive proteins directly by the plant cells themselves, thus providing a mucosal immune response upon consumption of the plant material by an animal.

As the estimated human population continues to expand beyond the 6 billion marks, the population distribution of other wildlife species will continue to be heavily influenced by the environmental activities of industrialised man. During the twentieth century, man's use of land and water resources has had an increasingly profound affect on the population dynamics of animal species. The World Wildlife Fund now predicts that as much as one third of the world's species may be extinct within the next twenty years. In addition to reducing specific fauna and flora populations to extinction or endangerment, overabundance of particular species has also been induced by the modern human race. As a specific example, the survival of herbivorous animals has been leveraged throughout the ages by natural forces such as geographical containment, natural predators, climatic conditions, and availability of food. Amongst the influences too many to list, the industrialised world has cleared forests for agriculture and construction, reduced the population and natural range of predatory animals, introduced species

WO 02/083072

PCT/US02/11693

across geographical barriers, provided unnatural shelters against climatic extremes, and spawned a social culture where proposed animal rights and human interest often conflict. There are now many examples where overabundant herbivorous populations are in direct conflict with human co-existence and agricultural production. Due to an assortment of reasons, population control for many of these species has become unachievable, and alternative methods are sought.

Therefore, there exists the need for the development of humane techniques of population management to mitigate the damage that results from the unchecked proliferation of animal species, whether the damage is economic, environmental, or to animal welfare. Furthermore, there exists a need to do this with formulations that can be produced efficiently and cost effectively.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods for the production of transgenic plant biopharmaceuticals. The methods described herein allow for the production of dry transgenic plant material that is stable at room temperature, homogeneous, and pharmaceutically potent. In general, either intact or partitioned transgenic plants are dried or freeze dried through food processing techniques known in the art. The dry homogenate, which contains the biopharmaceutical product, can then be used therapeutically without the need to further extract, purify, or precipitate the pharmaceutical protein. The stable dry homogenates can be used for vaccination, treatment of pathogenic diseases, and as a contraceptive. The present invention further provides a safe and effective vaccine for the control of fertility and fecundity. Thus, the invention satisfies the need in the art for efficient methods of producing stable plant-based pharmaceuticals and the need for convenient and cost effective methods of population control for domestic animals, feedlot species, zoological captive specimens, game reserve populations and humans.

Herein methods for the production and use of plant based pharmaceuticals are disclosed.

The present invention provides a method for producing a stable dry homogenate of a transgenic plant expressing a heterologous protein comprising: i) obtaining either intact or partitioned transgenic plant material, ii) dehydrating said transgenic plant material and, iii) mixing said transgenic plant material into a homogenate either before or after said dehydrating step, thereby producing a stable dry homogenate of a transgenic plant expressing a heterologous pharmaceutical protein.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

In one embodiment, the dehydration is accomplished by freeze drying, air drying, or spray drying said material.

In another embodiment, the method further comprises the step of partitioning the dehydrated material before said mixing step.

In a still further embodiment, the method additionally comprises the addition of an excipient.

The invention further provides for the stable dry homogenate that is produced by the methods described above.

In one embodiment the stable dry homogenate contains an antigen or an antibody.

The invention provides for a stable dry homogenate comprising a dehydrated transgenic plant material containing a transgenic protein.

The invention further provides for a pharmaceutical composition comprising a stable dry homogenate that comprises a dehydrated transgenic plant material containing a transgenic protein, optionally mixed with a pharmaceutically acceptable carrier.

The invention still further provides for a method for preventing a pathogenic disease in an animal comprising administering the pharmaceutical composition comprising a stable dry homogenate that comprises a dehydrated transgenic plant material containing a transgenic protein, optionally mixed with a pharmaceutically acceptable carrier.

The invention also provides a method for delivering a transgenic protein to an animal comprising administering to an animal the pharmaceutical composition comprising a stable dry homogenate that comprises a dehydrated transgenic plant material containing a transgenic protein, optionally mixed with a pharmaceutically acceptable carrier.

In one embodiment, the transgenic protein present in the stable dry homogenate is a vaccine.

The invention further provides for methods of contraception using transgenic plant based pharmaceuticals.

The present invention utilizes plant chromosomal expression of the contraceptive protein in the absence of a viral intermediate.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

The invention provides a method of contraception comprising:

administering transgenic plant material comprising a nucleic acid molecule which encodes a contraceptive polypeptide to an animal; and

wherein said administering reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.

The invention also provides a method of contraception comprising:

administering transgenic plant material comprising a nucleic acid molecule which encode a contraceptive polypeptide to an animal in an amount effective to induce contraception; and

wherein said administering induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein.

The invention further provides a method of contraception comprising:

administering transgenic plant material comprising a nucleic acid molecule which encodes a contraceptive polypeptide to an animal, wherein said nucleic acid is integrated into a plant chromosome; and

wherein said method of contraception reduces the average number of offspring per breeding cycle produced by said animal to which said transgenic plant material has been administered by at least 50%.

The invention further provides a method of contraception comprising:

administering transgenic plant material comprising a nucleic acid molecule which encodes a contraceptive polypeptide to an animal in an amount effective to induce contraception, wherein said nucleic acid is integrated into a plant chromosome; and

wherein said method of contraception reduces the average number of offspring per breeding cycle produced by said animal to which said transgenic plant material has been administered by at least 50%.

In a preferred embodiment, said transgenic plant material is selected from the group consisting of: leaf, root, shoot, stem, fruit, tuber, flower, and seed.

In a more preferred embodiment, said transgenic plant material is edible.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

In another preferred embodiment, said contraceptive polypeptide encoded by said nucleic acid is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LHRH, LH, LDH and anti-sperm antigens.

In a more preferred embodiment, said zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.

In a more preferred embodiment, said zona pellucida glycoprotein is ZP3.

In a preferred embodiment, said contraceptive protein is species-specific.

In another preferred embodiment, said nucleic acid encoding a contraceptive protein further comprising a sequence encoding a mucosal targeting protein.

On a more preferred embodiment, said mucosal targeting protein is the *E. coli* enterotoxin subunit B.

In another preferred embodiment, said transgenic plant material is administered as a whole plant.

In another preferred embodiment, said transgenic plant material is administered by mucosal delivery.

In yet another preferred embodiment, said mucosal administration is oral, nasal, or ocular delivery.

The invention provides a method of inducing a mucosal immune response comprising:

administering to an animal transgenic plant material comprising a nucleic acid sequence which encodes a contraceptive polypeptide, wherein said administering induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein, and wherein said administering reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.

In a preferred embodiment, said transgenic plant material is selected from the group consisting of: leaf, root, shoot, stem, fruit, tuber, flower, and seed.

In another preferred embodiment, said transgenic plant material is in the form of an edible plant.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

In yet another embodiment, said contraceptive polypeptide encoded by said nucleic acid is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LHRH, LH, LDH and anti-sperm antigen.

In a preferred embodiment, said zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.

In a more preferred embodiment, said zona pellucida glycoprotein is ZP3.

In another embodiment, said contraceptive protein is species-specific.

In another preferred embodiment, said nucleic acid encoding a contraceptive polypeptide further encodes a mucosal targeting protein.

In a more preferred embodiment, said mucosal targeting protein is the *E. coli* enterotoxin subunit B.

The invention provides a transgenic plant comprising transgenic plant material which express a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide, wherein administering said transgenic plant material to an animal induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein, and wherein said administering reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.

The invention also provides a transgenic plant comprising transgenic plant material which express a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide, wherein said nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide is not expressed on a viral particle, and wherein administration of said transgenic plant material to an animal induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein.

The invention further provides a transgenic plant comprising transgenic plant material which express a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide, and wherein said administration reduces the average number of offspring per breeding cycle produced by said animal to which said transgenic plant material is administered by at least 50%.

The invention further provides an edible transgenic plant comprising transgenic plant material which express a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide, wherein administration of said transgenic plant material to an animal induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein, and wherein said nucleic acid is integrated into a plant chromosome.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

In one embodiment, said contraceptive polypeptide is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LHRH, LH, LDH, and anti-sperm antigens.

In a preferred embodiment, said zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.

In a more preferred embodiment, said zona pellucida glycoprotein or fragment thereof is species-specific.

In another more preferred embodiment, said zona pellucida glycoprotein is ZP3 or a fragment thereof.

In one embodiment, said nucleic acid sequence further encodes a mucosal targeting protein.

In a preferred embodiment, said mucosal targeting protein is the *E. coli* enterotoxin subunit B.

In another preferred embodiment, said plant is monocotyledonous.

In yet another preferred embodiment, said plant is dicotyledonous.

In still another preferred embodiment, said plant is selected from the group consisting of tomato plants, rice plants, wheat plants, corn plants, carrot plants, potato plants, apple plants, soybean plants, alfalfa plants, medicago plants, vegetable plants, and fruit plants.

The present invention provides a plant cell comprising a nucleic acid vector, wherein the nucleic acid vector encodes a contraceptive polypeptide, wherein the nucleic acid vector is incorporated into and expressed from the chromosome of the plant cell, and wherein administration of the plant cell to an animal reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by the animal by at least 50%.

In one embodiment, the contraceptive polypeptide encoded by the nucleic acid vector is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LH, LDH, and anti-sperm antigens.

In a further embodiment, the zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.

In a still further embodiment, the contraceptive polypeptide is species-specific.

In a preferred embodiment, the zona pellucida glycoprotein is ZP3.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

In one embodiment, the nucleic acid vector further encodes a mucosal targeting protein.

In a preferred embodiment, the mucosal targeting protein is the E. coli enterotoxin subunit B.

In one embodiment, the plant cell is obtained from a monocotyledonous plant.

In one embodiment, the plant cell is obtained from a dicotyledonous plant.

In a preferred embodiment, the plant cell is selected from the group consisting of tomato plant cells, rice plant cells, wheat plant cells, corn plant cells, carrot plant cells, potato plant cells, apple plant cells, soybean plant cells, vegetable plant cells, and fruit plant cells.

The present invention further provides a plasmid vector for transforming a plant cell comprising: a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide, a plant-functional promoter operably linked to the nucleic acid sequence encoding the contraceptive polypeptide which is capable of directing the synthesis of the contraceptive polypeptide in the plant cell, and wherein administering the plant cell comprising the plasmid vector to an animal induces a mucosal immune response in the animal, and wherein the administering reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by the animal by at least 50%.

In one embodiment, the contraceptive polypeptide encoded by the nucleic acid sequence is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LHRH, LH, LDH, and anti-sperm antigens.

In a preferred embodiment, the zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.

In a further embodiment, the plant cell is obtained from an edible plant.

In one embodiment, the plasmid vector further comprises a nucleic acid sequence encoding a mucosal targeting protein.

In a preferred embodiment, the mucosal targeting protein is the E. coli enterotoxin subunit B.

The invention further provides a food composition comprising at least a portion of the transgenic plant described above, capable of being ingested by an animal, wherein ingestion of the transgenic plant induces a mucosal immune response in the animal, and wherein the ingestion reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by the animal by at least 50%.

The invention further provides a pharmaceutical composition comprising at least a portion of the transgenic plant described above in conjunction with a pharmaceutically

WO 02/083072 PCT/US02/11693
acceptable carrier, wherein administration of the pharmaceutical composition to an animal reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by the animal by at least 50%.

The present invention further provides a composition comprising a saponin adjuvant in admixture with processed transgenic plant material for oral administration to an animal, wherein administration of the composition reduces the number of offspring produced by the animal per breeding cycle by at least 50%.

As used herein, "contraceptive" refers to an agent which is used for contraception. "Contraception" is defined as reducing the number of offspring produced by an animal in a single breeding cycle, or preventing the fertilization of an oocyte by a spermatozoon in a sexual reproduction. The "prevention" of fertilization may be confirmed by a reduction in the number of offspring produced by a female animal to which the "contraceptive" is administered as described below. As used herein, "contraceptive" refers to the described reduction or prevention of fertilization, or prevention of zygote implantation, for a minimum of one breeding cycle.

As used herein, "sexual reproduction" refers to the exclusive form of reproduction for mammals. It involves the fertilization of one type of sex cell by another type (gamete: ovum for female and sperm for male), producing a new cell (called a zygote), which develops into a new organism. Ova (plura for Ovum) or sperms are produced in the reproduction organs of the female or the male. In a single sexual reproduction process, after a sperm fertilizes the ovum, the female carrying the fertilized ovum is usually not capable of producing more mature ova until the offspring is reproduced (born).

As used herein, one "breeding cycle" refers to a single process of sexual reproduction which comprises the fertilization of a mature ovum and the reproduction of offspring before a subsequent reproduction can occur. One "breeding cycle", according to the invention, also refers to a potential single reproduction process blocked by contraception which otherwise might occur.

As used herein, "contraceptive protein" refers to polypeptide, or fragment of a polypeptide, which reduces the number of offspring produced by an animal per breeding cycle. For animal species which produce an average litter of 3 offspring or more, a "contraceptive protein" is a polypeptide which reduces litter size by at least 60%, 70%, 80%, 90% and even up to 100%. For animal species which produce an average litter of 1 or 2 offspring, a "contraceptive protein" refers to a protein or polypeptide which reduces litter size by at least 50% (that is, from 2 offspring to 1), and up to 100% (that is, from 1 or 2 offspring to no offspring). Alternatively a "contraceptive protein" can refer to a polypeptide which prevents the

WO 02/083072

PCT/US02/11693

fertilization of an oocyte by a spermatozoon, or which prevents the implantation of a fertilized egg in the uterus of an animal, and thus reduces average litter size as described above. Alternatively, a "contraceptive protein" refers to a polypeptide which is capable of stimulating a mucosal immune response in an animal, wherein the immune response raises antibodies to the "contraceptive protein". The antibodies may bind to sites on sex hormones, the oocyte or the spermatoocyte and prevent sexual maturity, fertilization of the oocyte and/or implantation of a fertilized oocyte in the uterus of the animal, thus reducing litter size. Examples of "contraceptive proteins" useful in the present invention include, but are not limited to zona pellucida glycoproteins, gonadotrophin releasing hormone (GnRH), leutinizing hormone releasing hormone (LHRH), leutinizing hormone (LH), lactate dehydrogenase (LDH), and anti-sperm antigens. "Anti-sperm antigens" include, but are not limited to SP5, SP56, fertilin, PH30, LDH-C4, and P10.

As used herein, "an amount effective to induce contraception", as it refers to an amount of transgenic plant material which induces contraception. Preferably, transgenic plant material in "an amount effective to induce contraception" is an amount of plant material which reduces litter size by 10%, 30%, 60%, 80%, and up to 100%. For animal species which produce an average litter of 1 or 2 offspring per breeding cycle, transgenic plant material in "an amount effective to induce contraception" is an amount of plant material which reduces litter size by at least 50%, and up to 100%. As used herein, "an amount effective to induce contraception" refers to an amount of transgenic plant material which induces contraception is at least about 5 µg of contraceptive protein per gram of dry transgenic plant material by weight, preferably at least 10 µg, 20 µg, 40 µg, 60 µg, 80 µg, 100 µg, 120 µg, 140 µg, 150 µg or more, of contraceptive protein per gram of dry transgenic plant weight.

As used herein, "transgenic plant" refers to a plant, the cells of which stably express a "heterologous" foreign gene, wherein the foreign gene is integrated into the plant cell chromosome and does not carry with it a viral vector sequence unique to a virus, where the foreign gene is passed onto the next plant generation and is capable of being expressed from the host plant cell chromosome. A "transgenic plant" comprises a "plurality of transgenic plant cells". A "transgenic plant" refers to the whole plant, or a part thereof including, but not limited to roots, stems, leaves, stalks, seeds, fruit, tubers, flowers, pollen, and the like. Examples of heterologous foreign genes include, but are not limited to, Norwalk virus capsid protein (NVCP), Avian Influenza hemagglutination antigen (AIV-HA), Newcastle Disease Virus hemagglutinin (NDV-HN), zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3), and Hepatitis B surface Antigen (HBsAg).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

As used herein, a "heterologous protein" refers to a protein expressed from a "heterologous gene". A "heterologous gene" is a gene or gene fragment that encodes a protein obtained from one or more sources other than the genome of the species of plant within which it is ultimately expressed. The source can be natural, *e.g.*, the gene can be obtained from another source of living matter, such as bacteria, virus, yeast, fungi and the like, or a different species of plant. The source can also be synthetic, *e.g.*, the gene or gene fragment can be prepared *in vitro* by chemical synthesis. "Heterologous" can also be used in situations where the source of the gene fragment is elsewhere in the genome of the plant in which it is ultimately expressed. The "heterologous protein" may be an antigen, or other therapeutic proteins, such as, but not limited to endostatin or angiostatin. The "heterologous protein" may also be an antibody or antibody complex, for example "plantibodies". "Plantibodies" are antibodies that are made in plants.

As used herein, "transgenic plant material" refers to a transgenic plant, either processed or not processed as defined herein. The "transgenic plant material", according to the invention, may be a whole transgenic plant, or a portion of a transgenic plant including, but not limited to a "transgenic leaf", "transgenic root", "transgenic shoot", "transgenic stem", "transgenic fruit", "transgenic tuber", "transgenic flower" and "transgenic seed". "Transgenic plant material" also refers to one or a plurality of "transgenic plant cells". A "transgenic plant cell" refers to a plant cell which stably expresses a foreign gene, wherein the foreign gene is integrated into the plant cell chromosome and does not carry with it a viral vector sequence unique to a virus, where the foreign gene is passed onto the next cell generation and is capable of being expressed from the host plant cell chromosome. In addition, "transgenic plant material" refers to a "transgenic cell suspension" comprising one or a plurality of "transgenic plant cells" obtained by well-known cell culture techniques (Street, H.E. 1973, Plant tissue and cell culture: botanical monographs. Vol II, University of California, Berkeley)

As used herein "intact" transgenic plant material refers to the whole plant or plant parts that have not been further processed to reduce their size for example, by slicing, dicing, cutting, or pureeing. In general, the plant material is "intact" or "whole" as harvested but may be simply part of the transgenic plant. For example an intact, "transgenic leaf", "transgenic root", "transgenic shoot", "transgenic stem", "transgenic fruit", "transgenic tuber", "transgenic flower" or "transgenic seed".

As used herein, "partitioned" transgenic plant material refers to a "whole" plant or "intact" plant parts that have been reduced in size by means known in the art. Means for "partitioning" include, but are not limited to, cubing, quartering, mincing slicing, dicing, pureeing, or pulping, milling, crushing, pressing, or cracking. The transgenic plant material,

WO 02/083072

PCT/US02/11693

either cut or uncut, cooked or uncooked, may be pulped by any process known to those of skill in the art including juicing, blending, or pureeing in a kitchen blender at room temperature for up to 20 minutes. The pulped plant material may be mixed with suitable excipients that are pharmaceutically acceptable and compatible with the transgenic protein. The transgenic plant material may be "partitioned" into a fine powder.

As used herein, "homogenation" refers to reduction of larger plant organs, to a uniform mixture whereby variance in the amounts of homologous protein from tissue to tissue is combined into a uniform batch of material. Thus the term "homogeneous" or "homogenate" also refers plant material which has been partitioned or reduced such that the plant tissues, which may contain different amounts of plant proteins and/or transgenic protein from tissue to tissue, is combined into a batch of material containing a uniform amount of such protein.

As used herein, an "edible plant" refers to a plant which may be consumed by an animal, has nutritional value and is not toxic. An "edible plant" may be a "food" which is a plant or a material obtained from a plant which is ingested by humans or other animals. The term "food" is intended to include plant material which may be fed to humans and other animals or a processed plant material which is fed to humans and other animals. Materials obtained from a plant are intended to include a component of a plant which is eventually ingested by a human or other animal. Examples of "edible plant" include, but are not limited to, tomato plants, rice plants, wheat plants, corn plants, carrot plants, potato plants, apple plants, soybean plants, alfalfa plants, medicago plants, vegetable plants, and fruit plants.

In some cases an "edible plant" is "capable of being ingested for its nutritional value", which refers to a plant or portion thereof that provides a source of metabolizable energy, supplementary or necessary vitamins or co-factors, roughage or otherwise beneficial effect upon ingestion by an animal. Thus, where the animal to be treated by the methods of the present invention is an herbivore capable of bacterial-aided digestion of cellulose, such a food might be represented by a transgenic grass plant. Other edible plants include vegetables and fruits. Similarly, although transgenic lettuce plants, for example, do not substantially contribute energy sources, building block molecules such as proteins, carbohydrates or fats, nor other necessary or supplemental vitamins or cofactors, a lettuce plant transgenic for the nucleic acid molecules described herein used as food for an animal would fall under the definition of a food as used herein if the ingestion of the lettuce contributed roughage to the benefit of the animal, even if the animal could not digest the cellulosic content of lettuce. An "edible plant" therefore excludes tobacco.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

As used herein "processed" transgenic plant material can refer to plant material that is "cut", wherein "cut" refers to "chopping", "mincing", "dicing", or otherwise reducing the plant material to smaller pieces with a minimum size of about 1 mm². Transgenic plant material, either "cut" or uncut may be further processed by "cooking" the plant material using any technique known in the art including, but not limited to boiling, baking, and sautéing, wherein the temperature of the plant material is raised to at least 140⁰ C, 160⁰ C, 180⁰ C, and up to 200⁰ C for at least about 5 minutes, and up to about 30 minutes. "Cooked" transgenic plant material, useful in the present invention is administered without purification of the contraceptive protein, as the "cooked" plant material may comprise disrupted plant cells. Transgenic plant material, either "cut" or uncut, "cooked" or uncooked may be further processed by "combining" the plant material with non-transgenic plant or non-plant material by, for example, mixing, wherein the transgenic plant material comprises at least 50% by weight of the combination of transgenic plant material and non-transgenic or non-plant material. For example, transgenic corn may be "processed" by "combining" the corn kernels with other vegetables, or transgenic soy plants may be "processed" by "combining" the plant material with other ingredients such as spices, and/or other flavorings to produce, for example soy burgers, soy shakes, or soy milk.

Alternatively, transgenic plant material, useful in the present invention may be "processed" by "liquefying" the transgenic plant material, either cut or uncut, cooked or uncooked, by any process known to those of skill in the art including juicing, blending, or pureeing in a kitchen blender at room temperature for up to 20 minutes. The "liquefied" plant material may then be administered directly to an animal, or may be further processed by mixing the "liquefied" plant material with suitable excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the contraceptive protein. The "liquefied" plant material may be further "processed" by mixing the liquid plant material with a pharmaceutically acceptable cream, ointment, or salve. It is possible that during the "liquefaction" of transgenic plant material, transgenic plant cells may become disrupted, thereby liberating their contents into the "liquefied" mixture. A "liquefied" mixture of this nature is useful in the present invention provided that the contraceptive proteins expressed by the transgenic plant cells is not purified from the "liquefied" plant material.

Alternatively, transgenic plant material, either cut or uncut, cooked or uncooked, useful in the present invention, may be "processed" by "lyophilizing" or "dehydrating" the plant material to remove water. "Dehydration" may be performed by air drying or spray drying or by "lyophilization", wherein the "lyophilization" refers to the preparation of a plant composition in dry form by rapid freezing and dehydration in the frozen state (sometimes referred to as

WO 02/083072

PCT/US02/11693

sublimation). This process may take place under vacuum at a pressure sufficient to maintain frozen product with the ambient temperature of the containing vessel at about room temperature, preferably less than about 500 mTorr, more preferably less than about 200 mTorr, even more preferably less than about 1 mTorr, for between about 1 hour to 72 hours. Plant material may be "dehydrated" by placing the plant material in an oven with a temperature between about 60° C and 200° C for between about 1 hour to 72 hours. Plant material is deemed to be sufficiently "lyophilized" or "dehydrated" when the weight of the plant material ceases to change over time. For example, the weight of plant material placed in an oven at temperatures described above will decrease over time as water evaporates. When the weight ceases to change, all of the water has evaporated, and the plant material can be said to be "dehydrated". Preferably, by whatever drying method is used, the final material is dehydrated sufficiently to remove at least 90% of all the water content by weight. The "lyophilized" or "dehydrated" plant material may be further "processed" by emulsifying the "lyophilized" or "dehydrated" plant material with excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the contraceptive polypeptide. Suitable excipients include, for example, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol, or the like and combinations thereof, wherein the "lyophilized" or "dehydrated" plant material comprises at least 40% and preferably at least 50% by weight of the excipient mixture. In addition, if desired, the "lyophilized" or "dehydrated" plant material may contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, or adjuvants which enhance the effectiveness of the plant material. As used herein, "lyophilized" or "dehydrated" plant material may be further processed by admixing the plant material with a pharmaceutically acceptable creams, ointments, salves, or suppositories, wherein the plant material comprises at least 40% and preferably at least 50% by weight of the admixture. Alternatively, "dehydrated" plant material may be further processed by reconstituting the plant material with a liquid, such as, but not limited to, fruit juice, vegetable juice, milk, water, or other vaccine formulations to form multivalent or multicomponent vaccines.

As used herein "excipients" refer to extraneous material added at any stage of processing. For example, excipients may be added when partitioning the transgenic plant material, or added during dehydration, or added upon mixing pre- or post dehydration. Suitable excipients include, but are not limited to, adjuvants, buffers, sugars, antioxidants, stabilizers, or antigenic powders.

As used herein, "polypeptide" refers to a series of amino acid residues linked through peptide bonds between the α -carboxyl carbon of one amino acid residue and the α -nitrogen of the next. A "polypeptide" as used herein can refer to a whole protein, a fragment of a protein, or an immunogenic epitope of a protein.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

As used herein, "zona pellucida glycoprotein" refers to a group of three sulfated glycoproteins which comprise the mammalian zona pellucida. The zona pellucida further comprises a layer consisting of microvilli of the oocyte, and cellular processes of follicular cells. One "zona pellucida glycoprotein" in particular, ZP3, functions as the primary binding site for mammalian sperm. The zona pellucida, and, in particular the zona pellucida glycoprotein ZP3 may be identified using ZP3 specific antibodies and standard immunohistochemical techniques well described in the art (East et al., 1985, *Dev. Biol.* 109: 268). The nomenclature used in the art to describe ZP glycoproteins is variable. Example of ZP glycoproteins include, but are not limited to, ZP proteins isolated from pig: PZI, PZIII, 90K, 65K, 55K, 25K, ZP1, ZP2, ZP3 (PPZA), ZP4, 87K (ZP1/ZP2), 58K; ZP proteins isolated from rabbit: RZI, RZII, RZIII, ZP1, ZP2, ZP3, RZII; ZP proteins isolated from mouse: ZP1, ZP2, ZP3; ZP proteins isolated from cat: CZI and CZII; ZP proteins isolated from dog: DZI, DZII, and DZIII; ZP proteins isolated from squirrel monkey: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4; ZP proteins isolated from human: ZP1, ZP2, and ZP3. In addition to the ZP peptides described above, the nucleotide sequence encoding ZP glycoproteins of a number of species (e.g., mouse, human, hamster, rabbit) have been elucidated and are thus, useful in the present invention as they encode contraceptive proteins. The present invention uses the designation of ZP1, 2, or 3 for the three ZP glycoproteins. However, others in the art have grouped the ZP glycoproteins into ZPA, B, and C wherein ZPA includes those peptides described as ZP1, and ZP2, ZPB includes those peptides described as ZP3 α and rc55, and ZPC includes those peptides described as ZP3 β and ZP3 (see, for example U.S. Pat. No. 5,989,550).

As used herein, "immunocontraception" refers to temporary, reversible contraception, and also to permanent non-reversible contraception, or sterilization, resulting from an immune response to a contraceptive protein. As used herein, "immunocontraception" is deemed to be "effective" if the average number of offspring per breeding cycle produced by an animal subjected to "immunocontraception" by at least 60%, 70%, 80%, 90% and even up to 100% for animal species which produce an average litter size of three or more offspring. For animal species which produce an average litter of less than 3 offspring, "effective" immunocontraception would result in a reduction in litter size by at least 50%, and up to 100%.

As used herein, "immune response" refers to a response made by the immune system of an organism to a substance, which includes but is not limited to foreign or self proteins. There are three general types of "immune response" including, but not limited to mucosal, humoral and cellular "immune responses." A "mucosal immune response" results from the production of secretory IgA (sIgA) antibodies in secretions that bathe all mucosal surfaces of the respiratory

WO 02/083072

PCT/US02/11693

tract, gastrointestinal tract and the genitourinary tract and in secretions from all secretory glands (McGhee, J. R. et al., 1983, *Annals NY Acad. Sci.* 409). These sIgA antibodies act to prevent colonization of pathogens on a mucosal surface (Williams, R. C. et al., *Science* 177, 697 (1972); McNabb, P. C. et al., *Ann. Rev. Microbiol.* 35, 477 (1981)) and thus act as a first line of defense to prevent colonization or invasion through a mucosal surface. The production of sIgA can be stimulated either by local immunization of the secretory gland or tissue or by presentation of an antigen to either the gut-associated lymphoid tissue (GALT or Peyer's patches) or the bronchial-associated lymphoid tissue (BALT; Cebra, J. J. et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41, 210 (1976); Bienenstock, J. M., *Adv. Exp. Med. Biol.* 107, 53 (1978); Weisz-Carrington, P. et al., *J. Immunol* 123, 1705 (1979); McCaughan, G. et al., *Internal Rev. Physiol* 28, 131 (1983)). Membranous microfold cells, otherwise known as M cells, cover the surface of the GALT and BALT and may be associated with other secretory mucosal surfaces. M cells act to sample antigens from the luminal space adjacent to the mucosal surface and transfer such antigens to antigen-presenting cells (dendritic cells and macrophages), which in turn present the antigen to a T lymphocyte (in the case of T-dependent antigens), which process the antigen for presentation to a committed B cell. B cells are then stimulated to proliferate, migrate and ultimately be transformed into an antibody-secreting plasma cell producing IgA against the presented antigen. When the antigen is taken up by M cells overlying the GALT and BALT, a generalized mucosal immunity results with sIgA against the antigen being produced by all secretory tissues in the body (Cebra et al., supra; Bienenstock et al., supra; Weisz-Carrington et al., supra; McCaughan et al., supra). Oral immunization is therefore an important route to stimulate a generalized mucosal immune response and, in addition, leads to local stimulation of a secretory immune response in the oral cavity and in the gastrointestinal tract.

An "immune response" may be measured using a technique known to those of skill in the art. For example, serum, blood or other secretions may be obtained from an organism for which an "immune response" is suspected to be present, and assayed for the presence of a of the above mentioned immunoglobulins using an enzyme-linked immuno-adsorbant assay (ELISA; U.S. Pat. No. 5,951,988; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* 3rd Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1995). According to the present invention, a contraceptive protein of the present invention can be said to stimulate an "immune response" if the quantitative measure of immunoglobulins in an animal treated with a contraceptive protein detected by ELISA is statistically different from the measure of immunoglobulins detected in an animal not treated with a contraceptive protein, wherein said immunoglobulins are specific for the contraceptive protein. A statistical test known in the art may be used to determine the difference in measured

WO 02/083072

PCT/US02/11693

immunoglobulin levels including, but not limited to ANOVA, Student's T-test, and the like, wherein the P value is at least <0.1, <0.05, <0.01, <0.005, <0.001, and even <0.0001.

An "immune response" may be measured using other techniques such as immunohistochemistry using labeled antibodies which are specific for portions of the immunoglobulins raised during the "immune response". Tissue (e.g., ovarian tissue) from an animal to which a contraceptive protein has been administered according to the invention may be obtained and processed for immunohistochemistry using techniques well known in the art (Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* 3rd Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1995). Microscopic data obtained by immunohistochemistry may be quantitated by scanning the immunohistochemically stained tissue sample and quantitating the level of staining using a computer software program known to those of skill in the art including, but not limited to NIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD). According to the present invention, a contraceptive protein of the present invention can be said to stimulate an "immune response" if the quantitative measure of immunohistochemical staining in an animal treated with a contraceptive protein is statistically different from the measure of immunohistochemical staining detected in an animal not treated with a contraceptive protein, wherein said histochemical staining requires binding specific for that contraceptive protein. A statistical test known in the art may be used to determine the difference in measured immunohistochemical staining levels including, but not limited to ANOVA, Student's T-test, and the like, wherein the P value is at least <0.1, <0.05, <0.01, <0.005, <0.001, and even <0.0001.

A "mucosal immune response" may be "detected" using a of the above referenced techniques. For example, an ELISA assay may be employed using anti-IgA antibodies to detect and measure the mucosal-specific immunoglobulins (Dickinson, B.L. & Clements, J.D. Dissociation of Escherichia coli heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect Immun* 63, 1617-1623 (1995)).

As used herein, an "adjuvant" is a compound which when administered in conjunction with an antigen enhances the immune response to the antigen [(Coligan LG et al. eds. *Current Protocols in Immunology*, New York: John Wiley & Sons, 1995)]. An adjuvant can be effective by retarding the destruction of an antigen and allow the persistence of low but effective levels of antigen in the tissues or by nonspecifically activating the immune system by provoking an inflammatory response or other immune reaction which provides a heightened immune sensitivity.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

As used herein, "species-specific" refers to a nucleic acid or amino acid sequence which is unique to the species from which it is derived. For example a "species-specific" nucleic acid sequence encoding a zona pellucida glycoprotein refers to a nucleic acid sequence that shares no greater than at least between 95-70% sequence identity with a nucleic acid sequence encoding a corresponding zona pellucida glycoprotein from a different species, no greater than between 80-50% sequence identity, and no greater than between 60-40% sequence identity. The "species-specificity" of a particular nucleic acid or amino acid sequence may be determined using a technique known to those of skill in the art including BLAST analysis.

As used herein, a "mucosal targeting protein" refers to a polypeptide which, when conjugated to, or expressed as a fusion protein with a second peptide, increases the potential for the combination of peptides to elicit a mucosal immune response. A "mucosal targeting protein" may be a polypeptide which is not endogenous to the organism to which it is introduced. Evidence (Black et al., *Infect. Immunol.* 55:1116 (1987)) indicates that "mucosal targeting proteins" when administered orally with an antigen (e.g., ZP glycoprotein) serves as an adjuvant to enhance the protective immune response. It therefore follows, that a "mucosal targeting protein" is a protein having ganglioside binding affinity for the mucosal epithelium when administered at least 10 µg doses, 1 µg doses, 500 ng doses, and even 1 ng doses, thus causing translocation of the protein across the mucosal epithelial membrane, such that "mucosal targeting proteins" may be important in eliciting a secretory immune response. It can be anticipated then that the product of a gene fusion of a contraceptive protein and a "mucosal targeting protein" will be more readily transported into cells of the mucosa and lead to enhanced local secretory immune responses. Examples of "mucosal targeting proteins" include, but are not limited to *E. coli* enterotoxin subunit B and A, Cholera toxin, shigatoxin B (StxB), staphylococcus enterotoxin B (SEB), Norwalk virus capsid protein (NVCP), and hepatitis B surface antigen. The ability of a polypeptide to target the immunogenicity of a second peptide to the mucosa may be examined by measuring the "mucosal immune response" (i.e., measuring the level of sIgA), for example, by ELISA or immunohistochemistry, which is stimulated by the administration of the combination of peptides and determining whether it is significantly increased compared to that observed when the second peptide is administered without the "mucosal targeting protein" using the statistical techniques described above for measuring an immune response.

As used herein, "animal" refers to an organism classified within the phylogenetic kingdom Animalia. As used herein, an "animal" also refers to a mammal. Animals, useful in the present invention, include, but are not limited to mammals, marsupials, mice, dogs, cats, cows, humans,

WO 02/083072

PCT/US02/11693

deer, horses, sheep, livestock, poultry, chickens, turkeys, ostrich, fish, fin fish, shell fish, and the like.

As used herein, "monocotyledonous" refers to a type of plant whose embryos have one cotyledon or seed leaf. Examples of "monocots" include, but are not limited to lilies; grasses; corn; grains, including oats, wheat and barley; orchids; irises; onions and palms.

As used herein, "dicotyledonous" refers to a type of plant whose embryos have two seed halves or cotyledons. Examples of "dicots" include, but are not limited to tobacco; tomato; the legumes including alfalfa; oaks; maples; roses; mints; squashes; daisies; walnuts; cacti; violets and buttercups.

As used herein, "nucleic acid vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded nucleic acid loop into which additional nucleic acid segments can be ligated. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant nucleic acid techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" can be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector.

As used herein, "promoter" refers to a sequence of DNA, usually upstream (5') of the coding region of a structural gene, which controls the expression of the coding region by providing recognition and binding sites for RNA polymerase and other factors which may be required for initiation of transcription. The selection of the promoter will depend upon the nucleic acid sequence of interest. A "plant-functional promoter" refers to a "promoter" which is capable of supporting the initiation of transcription in plant cells. "Plant-functional promoters" useful in the present invention include, but are not limited to the 35S promoter of the cauliflower mosaic virus (CaMV); promoters of seed storage protein genes such as Zma10Kz or Zmag12, light inducible genes such as ribulose biphosphate carboxylase small subunit (*rbcS*), stress induced genes such as alcohol dehydrogenase (*Adh1*), or "housekeeping genes" that express in all cells (such as *Zmact*, a maize actin gene); the tomato E8 promoter; ubiquitin; mannopine synthetase (*mas*); rice *actin 1*; soybean seed protein glycinin (*Gyl1*); soybean vegetative storage

WO 02/083072

PCT/US02/11693

protein (*vsp*); and granule-bound starch synthase (*gbss*). Other "plant-functional promoters" include promoters for genes which are known to give high expression in edible plant parts, such as the patatin gene promoter from potato.

As used herein, "operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A control sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences. A promoter sequence is "operably-linked" to a gene when it is in sufficient proximity to the transcription start site of a gene to regulate transcription of the gene.

As used herein, "administered" refers to the delivery of the transgenic plant material, cells, compositions, and pharmaceutical formulations of the present invention to an animal in such a manner so to guarantee that the "delivered" material contacts a mucosal surface of the animal to which it was administered. Routes of "delivery" useful in the present invention include, but are not limited to oral delivery, nasal delivery, rectal or vaginal delivery (e.g., by suppository, or topical administration), or a route of delivery wherein the delivered material directly contacts a mucosal surface (i.e., "mucosal delivery"). As used herein, "pharmaceutically acceptable" means a non-toxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient(s). The characteristics of the carrier will depend on the route of administration.

As used herein, a "mucosal surface", "mucosal membrane", or "mucosa" refers to the well known medical definition of these structures, which is the surface or lining of a structure comprising an epithelium, lamina propria, and, in the digestive tract, a layer of smooth muscle. Examples of "mucosal surfaces" include, but are not limited to the inner coat of the bronchi, the mucous layer of the tympanic cavity, the inner mucous coat of the colon, the inner layer of the ductus deferens, the inner coat of the esophagus, the mucous coat of the small intestine, the mucous coat of the larynx, the mucous membrane of the tongue, the pituitary membrane, the mucous membrane of the oral cavity, the mucous membrane of the pharynx, the inner mucous layer of the trachea, the lining of the auditory tube, the mucous layer of the uterine tube, the inner layer of the ureter, the inner layer of the urethra, the endometrium, the mucous membrane of the vagina, the mucous layer of the stomach, the inner coat of the urinary bladder, and the mucous membrane of the seminal vesicle.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

As used herein, "species" refers to a biological division between a genus of organisms and the individual organisms therein, in which all organisms within the species share close resemblance in the essential features of their general morphology, body plan, development, etc.

As used herein, "stable" refers to plant material that remains preserved at room temperature. Herein, "stable transgenic plant material" refers to plant material wherein the "heterologous" protein or "transgenic protein" remains potent without significant loss of immuno-reactivity, wherein immuno-reactivity is measured by an assay such as, Elisa, quantitative western blot, or agglutination. A "heterologous" protein is stable when at least 40% of the immuno-reactivity observed at the time of production, according to the inventive process, remains present for at least 5 months, and for longer periods, up to 10 months, or 12 months, or 18 months, or even longer.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 a LTB content of leaf and fruit samples from T_0 plants as determined by Elisa.

Figure 1 b LTB content of leaf and fruit samples from T_1 plants as determined by Elisa.

Figure 1 c Comparison of leaf and fruit rankings with respect to LTB content as determined by Elisa.

Figure 2 a The average end point for dilutions of anti-LTB antibodies in tested mice. The bars represent the average of the serum dilution when OD_{450} reading is equal to 0.1 of the six animals within the same treatment. Treatments include mice that were fed non-transgenic tomato paste (control), mice that were fed transgenic tomato paste (Test) and mice that were fed transgenic tomato paste mixed with 10 mg of Quillaja extract powder (Garuda). Error bars represent the standard error.

Figure 2 b This figure shows the relationship between increasing anti-LTB titers (Series 1), and decreasing fecundity (series 2), after oral administration of raw tomato material expressing a fusion protein consisting of LT-B fused to murine ZP3 epitope. The third set of data, represents the experimental group who received an additional adjuvant mixed into the tomato material.

Figure 3 The effect of oral delivery of tested materials on the fertility of mice. Each bar represents the average of the six animals in a particular treatment where the control represents

WO 02/083072

PCT/US02/11693

results from animals fed non-transgenic tomato paste, test represents results from animals fed transgenic tomato paste and test + adj represents results from animals fed transgenic tomato paste mixed with 10 mg adjuvant powder (Garuda). Error bars represent the standard error.

Figure 4 The effect of oral delivery of tested materials on the fertility of voles. Each bar represents the average of the six animals in a particular treatment where the control represents results from animals fed non-transgenic tomato paste, test represents results from animals fed transgenic tomato paste and test + adj represents results from animals fed transgenic tomato paste mixed with 10 mg of Quillaja extract powder (Garuda). Error bars represent the standard error.

Figure 5 a LTB fusion constructs.

Figure 5 b Additional LTB fusion constructs.

Figure 5 c N-terminal fusion cassette.

Figure 6 This figure illustrates average and "elite line" expression data for three immunocontraceptive fusions expressed in transgenic tobacco (NT-1) cell suspension cultures. Epitope detection was based upon a sandwich ELISA, where primary capture was specific for LT-B, and secondary reaction was specific for the fused contraceptive epitope (either Mouse ZP3 epitope, or GnRH decapeptide according to the construct used). The data for LTB-GnRH2 suggests that the structure of the fusion protein interfered with the natural oligomerization, hence detection of fully formed pentamers was significantly reduced, as was the ability to detect the fused epitope by sandwich ELISA.

Table 1. Improved homogeneity of processed materials. Antigen content of processed or unprocessed transgenic plant material present in "batches" of plants pooled together, or in unmixed samples from specific plant lines.

Figure 7 Graph showing effect of drying time by different incision methods

Table 2 Recovery of antigen in different tissues and concentration of antigen obtained by different methods. Processing of potato biopharmaceuticals by puree and freeze-drying allows concentration of detectable antigen by an average of 4.2 fold. When the same materials are processed by cubing or quartering followed by freeze-drying, the concentration of detectable antigen is increased to an average of 15.2 fold. Other materials such as transgenic tomato show a similar destructive effect on the antigen when pureeing is used as a method for material homogenization prior to freezing. When transgenic carrot materials are processed by freeze

WO 02/083072

PCT/US02/11693

drying (no puree or slicing), the concentration of antigen comparable to raw material is directly proportional to the reduction in mass, further indicating conservation of the detectable antigen by this process.

Figure 8 Graph showing reabsorbance of moisture over time in assorted materials.

Figure 9 Graph showing antigen stability.

Figure 10 Effect of processing on LTB content within T2 fruit material. Solid bars represent the average LTB concentration of pooled fruit and the error bars represent the standard error of the mean.

Figure 11 Anti-LTB end point dilutions of adult serum samples. Where the Control bar represents the average end point serum dilution of mice fed the wild type tomato powder, the Transgenic bar represents the average end point serum dilution of mice fed the transgenic tomato powder and the Transgenic + Adjuvant bar represents the average end point serum dilution of mice fed the transgenic tomato powder with Quillaja extract powder. The end point dilution was determined to be the first dilution of serum that received an OD 450nm reading of 0.1. Control n = 3, Transgenic n = 4 and Transgenic + Adj n = 2. Error bars represent the standard error of the mean.

Figure 12 Anti-LTB end point dilutions of pup serum samples. Where the Control bar represents the average end point serum dilution of pups from mice fed the wild type tomato powder, the Transgenic bar represents the average end point serum dilution of pups from mice fed the transgenic tomato powder and the Transgenic + Adjuvant bar represents the average end point serum dilution of pups from mice fed the transgenic tomato powder with Quillaja extract powder. The end point dilution was determined to be the first dilution of serum that received an OD 450nm reading of 0.1. Control n = 18, Transgenic n = 17 and Transgenic + Adjuvant n = 13. *Contains serum samples that received an OD of less than 0.1 with the minimum dilution used (1 in 25). Error bars represent the standard error of the mean.

Figure 13 Relationship between dam and offspring titers. The dam end point dilution is the end point of the serum sample taken closest to the birth of the corresponding litter and the pup end point dilution represents the average end point of a litter. The end point dilution was determined to be the first dilution of serum that received an OD 450 nm reading of 0.1. Dam n = 7, litter n = 9 and pup n = 41.

Figure 14a Stability study of Lyophilized LT-B Potato chart.

- WO 02/083072 PCT/US02/11693
- Figure 14b Stability study of Lyophilized LT-B Potato graph.
- Figure 15 Stability study of Lyophilized HAO NT cells.
- Figure 16 Stability study of Lyophilized HA11O-A11 Potato.
- Figure 17 Stability study of Lyophilized SLT 102 cells.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention provides methods for the production of transgenic plant biopharmaceuticals. The methods described herein allow for the production of dry transgenic plant material that is stable at room temperature, homogeneous, and pharmaceutically potent. In general, an intact or partitioned transgenic plant that produces a biopharmaceutical is dried or freeze/dried through food processing techniques known in the art. The dry homogenate product can then be used therapeutically without the need to further extract, purify, or precipitate the pharmaceutical protein.

The resultant transgenic plant materials comprise formulated powders that can be easily handled, and that are stable at ambient temperatures when stored up to 12 months. Furthermore, batch processing described herein significantly increase the consistency in detectable antigen between plants or plant tissues, and concentrate the antigen for improved potency.

Transgenic plant species

Plants that can be used for the present invention include both dicotyledon and monocotyledon types. These include, but are not limited to, carrot, spinach, pepper, potato, tomato, apple, wheat, rye, soybean, rice, maize, corn, berries such as strawberries, raspberries, alfalfa and banana. Since edible plants used by humans for food or as components of animal feed are dicotyledonous plants, dicotyledons are typically employed, although monocotyledon plants are useful for animal feed. Cells and seeds derived from these plant vaccines are also useful according to the invention.

The transgenic plant can be produced by any means known in the art. In one embodiment, a range of transgenic plant species including tomato, potato and carrot are grown under biosafety level 1 greenhouse containment conditions without any pesticide or herbicide applications, and allowed to grow to maturity.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

The transgenic plants useful in this invention express heterologous proteins. Examples of suitable heterologous proteins include, but are not limited to, Norwalk virus capsid protein (NVCP), Avian Influenza hemagglutination antigen (AIV-HA), Newcastle Disease Virus hemagglutinin (NDV-HN), zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3), and Hepatitis B surface Antigen (HBsAg), antibodies made in plants (e.g. "plantibodies"), and other therapeutic proteins (e.g. endostatin and angiostatin).

Harvesting

The transgenic plant material can be harvested by hand or machine, or by any means known in the art. The harvesting method may vary per plant species. In one embodiment, transgenic potato or carrot, may be harvested as an entire batch, and stored at 4°C until processing. In another embodiment, transgenic tomato fruit deemed to be mid-ripe or ripe is harvested biweekly over a period of 6 weeks and processed on the day of harvest. In a further embodiment, the leaf or stem materials are removed from tomato fruit, potato tubers, or carrot root by hand prior to washing tomato fruit, potato tubers, or carrot root in a 0.1% chlorine solution (1% Clorox) to remove soil and bioburden. For purposes of record keeping, each batch is counted and weighed, and accompanied by Harvest and Processing Record sheets.

Homogenation

Homogenation of transgenic plant material can be performed either pre- or post-drying. In one embodiment, homogenation is performed prior to drying and involves the crude pulping and mixing of freshly harvested plant materials, followed by freezing and subsequent freeze-drying of the blended materials. The first process of slicing, blending or grinding, reduces raw plant tissues (fruit, tubers, leaf, seed, etc) to a pulp mixture. This mixture is assumed to contain both intact plant cells and ground cell debris. The advantage of this process is the reduction of larger plant organs, such as fruit or tubers, to a manageable mixture whereby variance in homologous protein content between tissues is combined into a more uniform batch of material. The ability to provide a uniformed batch without fully disrupting all plant cell integrity provides the stable environment for homologous protein storage during the subsequent processing stages. In another embodiment, homogenization requires minimal processing to the plant materials prior to processing. Homogenation is performed after Freeze-drying of sliced, quartered or intact materials. The resultant materials are crushed to a fine powder, combined into a single batch container, and mixed thoroughly by mechanical means such as shaking or dry blending to obtain a homogenous mixture.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Partitioning

For partitioning, whole plant or intact plant parts may be reduced in size by means known in the art. Means for partitioning include, but are not limited to, cubing, quartering, mincing slicing, dicing, pureeing, pulping, milling, crushing, pressing, or cracking.

If pureeing is preferred, freshly harvested fruit, tubers or roots are pureed using a Stephan Industrial Vertical Mixer/Slicer for approximately 1 minute. It is preferred that a maximum volume of approximately 20 lbs of material be pureed at a single time. When pureeing potato, a quantity of water (up to 500 ml) may be added to assist in the pureeing process. It is preferred that the temperature of the pureed materials does not exceed 2 °C. In one embodiment, the homogenate is poured off into clearly labeled freezer trays and stored at -40°C. To avoid loss of any genetically modified pulp or seed, the Mixer/Slicer may be wiped down with paper towel.

Materials may also be quartered, peeled, or sliced by any means known in the art.

Dehydration

In one embodiment, the quartered, peeled, or sliced transgenic plant material is transferred to freezer trays and placed within an industrial lyophilizer and freeze-dried for 2-6 days, at a temperature of 30 °C with a maximum shelf temperature of 25 °C. Resultant materials may then be combined into labeled containers and returned with completed Harvest and Processing Record sheets. In another embodiment, the transgenic plant material is sliced in a 1-gallon stainless steel Waring blender and samples are transferred to 500 ml or 1 liter flasks and freeze dried using a laboratory freeze dryer. In this case, materials were dried for 1-6 days at a temperature of 30°C.

Determination of Antigen Concentration

The analysis of plant materials to determine the concentration of antigens of interest can be achieved using enzyme linked immunosorbant assays (ELISA) or agglutination assays appropriate to the antigen contained in the plant tissues. The assay method chosen for a specific antigen should be applied consistently when evaluating both raw and processed materials.

Stability and Excipient Use

To evaluate the stability of processed materials at ambient temperatures, samples of 10-50 grams of material were removed immediately following freeze drying, and placed in airtight bags and in secondary containers before storage on a laboratory shelf. Ambient temperature was

WO 02/083072 PCT/US02/11693
maintained at 23°C +/- 2°C. The remainder of the processed materials were stored at either 4°C or at -20°C. Samples were periodically taken from materials stored under each condition and antigen content compared by appropriate assay to determine the relative stability of materials stored at ambient temperature.

Contraception

The present invention is also based on the discovery that transgenic plants are generated which express proteins capable of inducing contraception, and that administration of the transgenic plant material to an animal is sufficient to induce a mucosal immune response to the contraceptive protein such that effective contraception is achieved. The present invention provides a method for immunocontraception comprising administering to an animal a transgenic plant which expresses a contraceptive protein, wherein the administration of the transgenic plant induces a mucosal immune response in the animal to which it is administered. The present invention further provides a method for making a transgenic plant which expresses a contraceptive protein useful in the present invention for administration to an animal, and further provides a transgenic plant which, upon administration to an animal is capable of inducing contraception in that animal.

Contraceptive Proteins

The present invention provides transgenic plant material, the cells of which, express a protein or polypeptide which is capable of inducing contraception in an animal to which the plant material is administered. Contraceptive proteins, useful in the present invention, include, but are not limited to zona pellucida glycoproteins, gonadotrophin releasing hormone (GnRH), leutinizing hormone releasing hormone (LHRH), Leutinizing hormone (LH), Lactate Dehydrogenase (LDH), and anti-sperm antigens.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Zona Pellucida Glycoproteins

The zona pellucida is a tough, refractile, extracellular glycoprotein matrix enveloping the oocyte. Its characteristic striated appearance results from the numerous fine canals with which it is pierced. Cytoplasmic processes from the follicular cells extend through the ZP and occasionally invaginate the plasma membrane of the oocyte. The cytoplasmic processes of the follicular cells also transport nutritive material to the surface of the oocyte. In addition, microvilli of the oocyte extend into the ZP and increase the absorptive capacity at the surface of the oocyte. [See, generally, W. J. Hamilton, ed., Hamilton, Boyd and Mossman's Human Embryology, pp. 27-32 and 54-64 (1972); J. B. Warshaw, ed., The Biological Basis Of Reproduction And Developmental Medicine (1973).] Zone pellucida (ZP) glycoproteins, useful as contraceptive proteins in the present invention, include all forms of the glycoprotein matrix which are capable of eliciting antibodies to ZP, including ZP glycoproteins 1, 2, 3 and 4. These encompass ZP epitopes which appear late in an oocyte's development, during the antral and preovulatory phases, as well as epitopes which are expressed after ovulation.

In a preferred embodiment, the contraceptive protein of the present invention is the ZP3 glycoprotein, or an epitope thereof. An "epitope" of a contraceptive protein of the present invention is at least 6, 8, 10, 12, 14, 20, and up to 30 amino acids in length. As used herein, an "epitope" of a contraceptive protein useful in the present invention is a portion of the contraceptive protein that can stimulate a mucosal immune response. The ability of an epitope of a contraceptive protein to stimulate a mucosal immune response may be determined by measuring the amount of secretory IgA present in an animal to which the contraceptive epitope has been administered using a technique known to those of skill in the art. For example, a measurement of the amount of secretory IgA present in an animal to which a contraceptive epitope has been administered can be measured by ELISA using anti-IgA antibodies and compared to sIgA levels in an animal to which the epitope has not been administered. A statistically significant difference between the sIgA levels in the two animals, measured using a statistical test known in the art, is indicative of the stimulation of a mucosal immune response by the epitope. The P value for statistical tests useful in the present invention is at least <0.1, <0.05, <0.01, <0.005, 0.001, 0.0005, and preferably <0.0001.

Despite the common morphological properties of the ZP of different species, the ZPs of different animal species have immunologically distinct regions or "epitopes" (Timmons et al., In: Perspectives in Immunoreproduction: Conception and Contraception (Mathur et al., eds.)

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Hemisphere Publ., pp. 242-260 (1988)). A number of ZP proteins have been isolated from distinct animal species, and are useful as contraceptive proteins in the present invention.

Zona pellucida proteins isolated from pig include: PZI, a 40-110 kD protein isolated by Dunbar et al., Biol. Reprod. 24:1111 (1981); PZII, a 70-110 kD protein, PZIII, a 95-118 kD protein, and PZIV, an 18-25 kD protein, all isolated by Dunbar et al. (Biol. Reprod. 32:619 (1985)); 90K, a 89-119 kD protein, 65K, a 61-83 kD protein, 55K, a 47-66 kD protein, and 25K, an 18-26 kD protein, all isolated by Hedrick, J. L. and Wardrip, N. J. (Biochem. 157: 63 (1986)); ZP1, an 82-118 kD protein, ZP2, a 58-96 kD protein, ZP3 (PPZA), a 40-74 kD protein, and ZP4, a 21 kD protein, all isolated by Subramanian et al. (Biol. Reprod. 24:933 (1981)); 87K (ZP1/ZP2), a 77-97 kD protein, 58K, a 40-70 kD protein both isolated by Yurewicz et al. (Biol. Reprod. 29: 511 (1983)); deglycosylated PZI, a 35 kD protein; PZII, a 55 kD protein; and PZIII, an 80 kD protein all isolated by Skinner and Dunbar as described in Immunological Approaches to Contraception and the Promotion of Fertility, G. P. Talwar (ed.) New York: Plenum pp. 251-268 (1986); and deglycosylated ZP3 having a molecular weight of 45 kD isolated by Sacco et al. (J. Reprod. Fertil. 76:575 (1986)).

Isolated rabbit zona pellucida proteins include: RZI, RZII, and RZIII, having molecular weights of 68-125 kD, 80-100.5 kD, and 100-132 kD respectively, all isolated by Dunbar et al. (Biol. Reprod. 24:1111 (1986)); ZP1, ZP2, and ZP3 having molecular weights of 100-118 kD, 83-110 kD, and 80-92 kD respectively, all isolated by Sacco et al. (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167:318 (1981)); deglycosylated RZI, and RZII having molecular weights of 65 kD, and 80 kD respectively, both isolated by Skinner and Dunbar and described in Immunological Approaches to Contraception and Promotion of Fertility, G. P. Talwar (ed.) New York: Plenum, pp. 251-268 (1986); and deglycosylated RZIII, a 90 kD protein isolated by Timmons and Dunbar (Biol. Reprod. 36: 1275 (1987)).

A number of mouse zona pellucida proteins have been isolated including: ZP1, ZP2, and ZP3 having molecular weights of 200 kD, 120 kD, and 83 kD respectively, all isolated by Bleil and Wassarman (Dev. Biol. 76:185 (1980)); and ZP1 and ZP2 having molecular weights of 166-122 kD and 90-92 kD respectively, isolated by Sacco et al. (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167: 318 (1981)). The differences in the molecular weights of mouse ZP1 and ZP2 as reported by Bleil et al. and Sacco et al. may be due to the fact that Bleil used 2D-PAGE under non-reducing conditions while Sacco used 2D-PAGE under reducing conditions.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

The cat zona pellucida proteins CZI and CZII were isolated by Maresh and Dunbar J. (Exp. Zool. 244:299 (1987)) and have molecular weights of 50-110 kD and 90-110 kD respectively.

Maresh and Dunbar (J. Exp. Zool. 244:299 (1987)), have also isolated the dog zona pellucida proteins DZI, DZII, and DZIII which have molecular weights of 50-110 kD, 70-95 kD, and 90-100 kD respectively.

Sacco et al. (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167:318 (1981)) described squirrel monkey ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4 having molecular weights of 63-78 kD, 63-70 kD, 47-51 kD, and 43-47 kD respectively. In the same publication Sacco et al. described human ZP1, ZP2, and ZP3 having molecular weights of 80-120 kD, 73 kD, and 59-65 kD respectively.

In addition to the ZP peptides described above, the nucleotide sequence encoding ZP glycoproteins of a number of species have been elucidated and are thus, useful in the present invention as they encode contraceptive proteins. For example, Ringuette et al. (Dev. Biol., (1988) 127:287-295) and Liang et al. (Mol. Cell. Biol., (1990) 10:1507-1515), reported cloning of mouse DNA encoding zona pellucida proteins ZP3 and ZP2, respectively. The clones were obtained by screening mouse cDNA libraries with anti-ZP3 and anti-ZP2 antibodies. No sequence homology was found between mouse ZP3 and ZP2.

Ringuette et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1986) 83:4341-4345), reported isolation of a partial cDNA clone for mouse ZP3, which clone hybridized with total genomic DNA of mouse, rat, dog, cow, and human, but not with pig or rabbit genomic DNA unless the hybridization was performed at very low stringency. The full length ZP3 cDNA characterized by Ringuette (Dev. Biol. (1988) 127:287-295) represents a germ-line specific mRNA having relatively short 5' and 3' untranslated regions and an open reading frame of about 1317 nucleotides with an additional 200-300 nucleotide poly-A tail. Ringuette also found that rat, rabbit, dog, and cow ovary transcribes mRNA which hybridized to the mouse ZP3 cDNA and that the ZP3 transcripts had similar molecular weights. Liang et al. (Mol. Cell. Biol., (1990) 10:1507-1515), showed that the nucleic acid and deduced amino acid sequence of ZP2 is distinctly different from that of ZP3 although it had the same short motif of 5' and 3' untranslated regions. The ZP2 mRNA is reported to have single open reading frame of 2,139 nucleotides which codes for a polypeptide of 80,217 Daltons representing 713 amino acids.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Chamberlin and Dean, (*Dev. Biol.* (1989) 131:207-214) and Kinloch, R. A. et al. (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1988) 85:6409-6413) have reported the cloning of the mouse ZP3 gene. The mouse ZP3 gene is reported to have 8 exons and 7 introns in a transcription unit of 8.6 kbp.

Kinloch et al. (*Dev. Biol.* (1990) 142:414-421), reported cloning of hamster genomic ZP3 DNA from a hamster genomic DNA library screened with mouse ZP3 DNA as a probe. The hamster ZP3 gene has a transcription unit of 7900 nucleotides and was found to contain 7 introns and 8 exons. The hamster ZP3 protein is approximately 81% homologous to mouse ZP3 protein. The hamster transcript contained 1266 nucleotides, six less than mouse ZP3 mRNA.

Chamberlain and Dean (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:6014-6018), reported the cloning of human ZP3 from a human genomic DNA library using mouse ZP3 cDNA as a probe. The human ZP3 gene is composed of 8 exons in a transcription unit of 18.3 kbp. The exons are almost identical in size to the eight exons of mouse ZP3 and the nucleotide sequence of the coding region is 74% homologous. The human ZP3 transcript is very similar to mouse ZP3 mRNA. Both have short 5' and 3' untranslated regions, and both have a single open reading frame of 1272 nucleotides that encodes a 424-amino acid protein.

U.S. Pat. No. 4,996,297, to Dunbar, reported the isolation of three rabbit zona pellucida clones encoding rabbit ZP1 and ZP2 proteins, using anti-ZP1 and anti-ZP2 antibodies as screening probes. The sequences designated as P2 and P3 in FIG. 4 of the Dunbar patent represent rabbit ZP cDNAs of 812 and 1705 nucleotides respectively.

Schwobel et al. (*J. Biol. Chem.* (1991) 266:7214-7219), isolated and characterized a full length cDNA (designated rc 55) encoding the 55-kD rabbit zona pellucida protein using cross-species affinity purified antisera. The protein encoded by this cDNA has some similarity to the mouse ZP2 protein described by Liang. However, comparisons of rc 55 with the mouse ZP3 protein revealed no homology.

Other ZP glycoprotein nucleotide sequences, useful in the present invention include, but are not limited to, Human lutenizing hormone-releasing hormone (LHRH, Genbank accession No. X01059), Human ZP3A glycoprotein (GenBank Accession No. XM004616), human ZPB glycoprotein (GenBank Accession No. XM001779), Bovine ZPA and B glycoproteins (GenBank Accession Nos. AB042653; AB042652), Chicken ZP1 and 3 glycoprotein (GenBank Accession Nos. AJ289697; AB031033), mouse ZP1, 2, and 3 glycoproteins (GenBank Accession Nos. NM011776; NM011775; NM009580), vole ZP3 glycoprotein (GenBank Accession No. AF304487), dunnart ZPA (GenBank Accession No. AF263025), brushtail possum ZPA and B

WO 02/083072

PCT/US02/11693

(GenBank Accession Nos. AF263014; AF263013), brushtail possum ZP2 and 3 (GenBank Accession Nos. AF079525; AF079524) swine ZP1, 2, and 3 glycoprotein (GenBank Accession Nos. S74651; E07737; D45064), rat ZP1, 2, and 3 glycoprotein (GenBank Accession Nos. D78482; AB000929; AB000928), marmoset ZP1 and 2 glycoprotein (GenBank Accession Nos. Y10822; Y10767), feline ZP2 and 3 (GenBank Accession Nos. E07930; E06506), dog ZP2 and 3 (GenBank Accession Nos. D45064; D45070), and wallaby ZP3 glycoprotein (Australian Patent No. AU78554/98).

The term "zona pellucida glycoprotein", as used herein, includes a complete ZP protein, an enzymatically digested or chemically denatured form of ZP, or a combinations thereof. In addition, zona pellucida glycoprotein includes isolated ZP antigenic determinants which are not inherently immunogenic but which can be utilized as an immunogen when they are chemically linked to immunogenic carrier molecules (e.g., LT-B) as described herein below. A ZP extract includes a whole extract or one or more of the three individual glycoprotein fractions which comprise ZP,

Other Contraceptive Proteins

In addition to the ZP glycoproteins described above, or fragments thereof, other proteins are useful as contraceptive proteins in the present invention. For example, in one embodiment a contraceptive protein may be selected from the group including, but by no means limited to gonadotrophin releasing hormone (GnRH), leutinizing hormone (LH), lactate dehydrogenase (LDH) and anti-sperm antigens. In addition to these contraceptive proteins, the nucleotide sequences which encode contraceptive proteins useful in the present invention, are also useful in the generation of transgenic plants which express the encoded contraceptive proteins. For example, nucleotide sequences encoding GnRH, useful in the present invention include, but are not limited to human GnRH1 (GenBank Accession No. XM005041), rat GnRH1 (GenBank Accession No. M31670), brushtail possum GnRH (GenBank Accession No. AF193516), and shrew GnRH (GenBank Accession No. AF107315). Nucleotide sequences encoding LH, useful in the present invention include, but are not limited to rat LH (GenBank Accession No. D00576), pig LH (GenBank Accession No. D00579), rhinoceros LH (GenBank Accession No. AF024521), tapir LH (GenBank Accession No. AF047606), horse LH (GenBank Accession Nos. Y16326; Y16265), bovine LH (GenBank Accession No. M11506), and canine LH (GenBank Accession No. Y00518).

In one embodiment, contraceptive proteins of the present invention include anti-sperm antigens. Immunization of male and female animals with extracts of whole sperm has been

WO 02/083072

PCT/US02/11693

shown previously to cause infertility (Tung et al., (1979). *J. Reprod. Immunol.* 20:931). Accordingly, contraceptive proteins of the present invention may comprise a sperm-associated protein or nucleic acid sequence encoding such proteins including, but not limited to PH30 (U.S. Pat. No. 5,935,578), PH34 (U.S. Pat. No. 5,723,305), SP17 (U.S. Pat. No. 5,814,456), SP22 (U.S. Pat. No. 6,197,940), SP56 (mouse SP56: GenBank Accession No. U17108), LDHC₄ (human LDHC₄: GenBank Accession No. J02938; U.S. Pat. No. 5,891,992; Goldberg "LDH-X as a sperm-specific antigen", in T. Wegmann and T.J. Gill (eds.), Reproductive Immunology, Oxford University Press, 1981), fertilin (mouse fertilin: GenBank Accession No. AF167406; human fertilin: GenBank Accession No. AJ133005; tree shrew fertilin: GenBank Accession No. Y15965; baboon fertilin: GenBank Accession No. Y15520; gorilla fertilin: GenBank Accession No. Y15492; tamarin fertilin: GenBank Accession No. Y15512; bovine fertilin: GenBank Accession No. AF086808; and rat fertilin: GenBank Accession No. Y08616),

Mucosal Targeting Proteins

In one embodiment of the present invention, a transgenic plant is administered to an animal, wherein the plant expresses a portion, or epitope of one or more of the contraceptive proteins described above. It is well recognized in the art that mucosal targeting of immunogenic substances is highly dependent upon particle size or natural binding affinity of a sufficient degree to ensure M-cell recognition. In addition, it has been found that the mucosal immune system may be stimulated by feeding low doses of certain classes of proteins. In particular, this may be achieved with proteins which share the property of being able to bind specifically to various glycolipids and glycoproteins located on the surface of the cells on the mucosal membrane. Accordingly, the present invention provides a fusion protein comprising an auxiliary immunogenic proteins which is fused to a complex immuno-contraceptive protein, or if desired to a smaller soluble contraceptive antigen thereof, such as a ZP3 epitope, or GnRH, to enhance the immunogenicity of the contraceptive epitope.

Auxiliary proteins, useful according to the invention for stimulating a mucosal immune response include antigenic proteins such as shigatoxin B (StxB) (Genbank Accession No. AJ132761), staphylococcus enterotoxin B (SEB)(GenBank Accession No. M11118), *E. coli* labile toxin B (LT-B)(GenBank Accession No. AB011677), *E. coli* labile toxin A subunit (LT-A) (GenBank Accession No. AB011677), Norwalk virus capsid protein (NVCP)(GenBank Accession No. AF093797), and hepatitis B surface antigen (HBsAg)(GenBank Accession No. AF090842). It is preferred that such antigenic proteins associate as antigenic particles and/or complexes when such association is necessary to impart immunogenicity thereto. Construction

WO 02/083072

PCT/US02/11693

of fusion proteins comprising contraceptive proteins useful in the present invention and proteins which enhance mucosal immunogenicity will be described below.

Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg)

The feasibility of expressing HBsAg as virus-like particles (VLPs) in plants has been demonstrated (Mason *et al.*, 1992). The VLPs are similar to the recombinant yeast-derived vaccine, which is licensed for parenteral immunization. The formation of HBsAg particles requires insertion of the peptide in the endoplasmic reticulum (ER) membrane with four transmembrane domains, followed by budding of particles into the ER lumen. The plant-derived HBsAg retains both B- and T-cell epitopes when studied in a mouse model (Thanavala *et al.*, 1995). The finding that plant cells can produce an immunogenic HBsAg VLP indicates that plants are a feasible expression system for animal, viral, or bacterial proteins that assemble into complex structures. Accordingly, the necessary genetic elements for generating immunogenic HBsAg particles have been identified. These elements, e.g., regulatory and coding regions, can be incorporated into a vector encoding a contraceptive protein as described herein to afford a means of amplifying expression of this antigen in plants.

Norwalk Capsid Protein (NVCP)

The expression and VLP assembly in plants of NVCP, and its oral immunogenicity in mice have been reported (Mason *et al.*, 1996). The NVCP accumulated to 0.3% of the total protein, and assembled into VLPs with about 60% efficiency in tobacco leaf and potato tuber cells. When viewed by negative staining electron microscopy, the empty capsids were virtually indistinguishable from those produced in an insect cell system. Further, the material was orally immunogenic in mice when given by gavage in 4 doses as low as 10 µg each, or when given by direct feeding of potato tuber slices in 4 doses as low as 50 µg each. Both serum IgG and gut mucosal IgA were stimulated by the plant vaccine. Thus, the means for generating immunogenic amounts of VLPs of NVCP antigens have been identified. These can be used with the present invention to generate yet higher levels of immunogen in plants according to the gene amplification methods described herein.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

E. coli heat-labile enterotoxin (LT)

LT is a potent mucosal immunogen and adjuvant that stimulates immune responses against co-administered antigens (Clements *et al.*, 1988). The B-subunit of LT (LT-B) expressed in plants assembles into active oligomers that possess ganglioside G_{M1} binding capacity (Haq *et al.*, 1995). It is found that addition of a microsomal retention sequence (SEKDEL) at the carboxyl-terminus of LT-B increases its accumulation in plant tissue, while still allowing G_{M1} binding and immunogenicity. In oral tests with plant-derived LT-B given to mice, either tobacco leaf extracts administered by gavage or potato tubers fed without preparation (other than slicing) stimulated serum and gut mucosal antibodies against LT-B (Haq *et al.*, 1995). The serum anti-LT-B from these animals showed inhibition of LT activity, indicating its potential value as a protective vaccine.

Vectors for Contraceptive Protein Expression

Central to the use of the present invention is the creation and/or use of a nucleic acid construct comprising a nucleic acid sequence encoding a contraceptive protein and optionally a nucleic acid sequence encoding a mucosal targeting protein, wherein the construct can be introduced into a plant cell of interest to produce a transgenic plant that expresses the contraceptive protein. In preferred embodiments, the nucleic acid construct is a plant expression vector, a plasmid that can be prepared and grown in plant cells. The nucleic acid sequences of the construct can contain DNA, RNA, a synthetic nucleic acid, or a combination thereof, as known in the art. In embodiments where the nucleic acid construct comprises both a contraceptive protein and a mucosal targeting protein, the sequences encoding each of the components may be interspersed with other sequences (e.g., regulatory sequences) as needed.

Nucleic acid constructs, useful in the present invention may be generated using a plasmid backbone known to those of skill in the art which may be used to mediate expression of the contraceptive proteins in plant cells according to the invention. Appropriate vectors which can be utilized as starting materials are known in the art. Suitable vectors for transforming plant tissue have been described by deFramond *et al.* (*Biotechnology* 1983, 263), An *et al.* (*EMBO* 1985, 277), and Rothstein *et al.* (*Gene* 1987, 53), and include, but are not limited to pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), pIBT210 (Haq *et al.*, (1995) *Science* 268:714), pGEM (Promega, Madison, WI) pGPTV.kan (Becker *et al.*, (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197.), Agrobacterium-Ti plasmid (White *et al.*, Plant Biotechnology Kung and Arnitzen eds. Butterworth Pub., Boston, MA, 1989) In addition to these vectors, many others have been produced in the art which are suitable for use in the present invention.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Vector constructs, useful in the present invention, preferably contain DNA sequences encoding contraceptive proteins. A DNA sequence encoding a contraceptive protein is obtained by conventional means and inserted into a vector suitable for the transformation of plants. For example, the DNA sequence can be isolated from a gene bank of genomic clones. Alternatively, the DNA sequence can be prepared by reverse transcription. The vectors are then introduced into plant cells by a variety of known techniques, described below, which give rise to transformed cells, tissues, and plants.

The DNA sequence can be chemically synthesized in the amino acid sequence of the contraceptive protein, or portion thereof is known. Several prior art methods can be utilized to determine the amino acid sequence of a contraceptive protein (see, for example Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology 3rd Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1995).

The DNA sequence encoding a contraceptive protein or part thereof is inserted into an appropriate vector in such a manner that the contraceptive protein is correctly expressed. In other words, the DNA sequence is positioned in the proper orientation and reading frame so that the correct amino acid sequence is produced upon expression of the DNA sequence in plant tissue. In accordance with conventional techniques, a chimeric DNA sequence is generally constructed which contains a promoter operably in plant tissue and the DNA sequence encoding a contraceptive protein. The DNA sequence may further contain 3' non-coding sequence operable in plant tissue. In one embodiment, the chimeric DNA sequence may further contain a coding sequence for a polypeptide which can enhance the mucosal targeting of the contraceptive protein, such as LT-B, such that a fusion protein is produced upon expression. The chimeric DNA sequence can be prepared *in situ* within a suitable vector by inserting the DNA sequence coding for a contraceptive protein or portion thereof in to a restriction site of a known plant transformation vector. Alternatively, the chimeric gene may be first constructed and then inserted into a vector to produce a plant transformation vector. Vectors, useful in the invention, are generally inserted into a prokaryotic host cell, such as *E. coli*, wherein the number of vectors is amplified by replication. Vectors may subsequently be isolated from the prokaryotic host cell, using a technique known in the art (see, for example Ausubel et al., *supra*), and subsequently used to transform a host plant cell of interest.

Promoter sequences of the present invention include, but are not limited to a promoter that is operably in a selected plant host cell according to the invention. The DNA construct according to the invention preferably has a plant-functional promoter operably linked to the 5' end of a nucleotide sequence of interest. A preferred promoter is selected from among CVMV,

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Gamma Sein, Gelvin promoter, CaMV 35S, tomato E8, patatin, ubiquitin, mannopine synthase (*mas*), rice *actin 1*, soybean seed protein glycinin (Gyl), soybean vegetative storage protein (*vsp*), and granule-bound starch synthase (*gbss*). A construct of the present invention can also include a translational enhancer region, such as tobacco etch virus (TEV) enhancer, which has been described elsewhere (Carrington, *et al.* (1990)). Optionally, a construct of the invention can comprise at least one vegetative storage protein (VSP) signal peptide encoding sequence, such as an α S or α L sequence (Mason *et al.* 1988), operably linked to the 5' end of a nucleotide sequence encoding a protein of interest.

Preferably, the sequences of the DNA construct encoding the contraceptive protein and, optionally, the mucosal targeting protein are all under the control of a single promoter sequence, resulting in the expression of a fusion protein containing each of the three elements. This assures that the contraceptive protein and the mucosal targeting protein will be synthesized in stoichiometric proportion, and results in similar levels of expression of the contraceptive protein and the mucosal targeting protein. Alternatively, the expression of the mucosal targeting protein can be driven from a second promoter inserted in a bidirectional manner, or into the construct 3' of the sequence encoding the contraceptive protein, but 5' of the sequence encoding the mucosal targeting protein.

Vectors, useful in the present invention, in addition to carrying the DNA constructs described above, may additionally comprise a selectable marker gene. Marker genes useful according to the invention may include a gene encoding a selectable marker, e.g., an antibiotic resistance gene such as the bacterial tetracycline resistance gene. Incorporation of the tetracycline resistance gene permits the use of tetracycline as a selective agent in the plasmid preparation procedure according to the invention. One advantage to the use of a tetracycline resistance gene is that tetracycline is not degraded in *E. coli*, and therefore more tetracycline does not have to be added during fermentation. In addition, the tetracycline resistance gene is preferred over a gene encoding ampicillin resistance because tetracycline is prescribed less often as an antibiotic in a clinical setting, and therefore read through from the plasmid resistance gene will be less likely to interfere with the use of an antibiotic in a clinical setting.

Additional marker genes useful according to the invention include resistance to biocide, particularly an antibiotic, such as kanamycin, G418, bleomycin, hygromycin, chloramphenicol or the like. Additional marker genes useful according to the invention include resistance to herbicides such as organophosphates and bialaphosphates. Additional marker genes useful according to the invention also include those encoding for visual marker proteins such as beta

WO 02/083072

PCT/US02/11693

glucorinidase (GUS), green fluorescent protein (GFP), or the like. The particular marker employed will be one which allows for selection of transformed cells as compared to cells lacking the nucleic acid which has been introduced.

A vector can also have an *A. tumefaciens* origin of replication, such as when it is desired to maintain the vector in *A. tumefaciens* for later transformation with this system. In this event, the nucleotide sequence encoding a protein of interest (i.e., a contraceptive protein) is flanked by the left and right T-DNA border regions to effect its transfer to a host plant cell.

A strain of bacteria, such as *E. coli*, can be transfected with an expression vector of the present invention in order to grow/amplify an instant expression cassette according to methods well known in the art (Ausubel, supra). The purified expression cassette can be added to *A. tumefaciens* and subjected to electric pulse or heat shock treatment to introduce the vector therein, where it can reside intact as a shuttle vector. A helper Ti plasmid in the *A. tumefaciens* can provide the *vir* genes necessary to transfer the T-DNA directly from the shuttle vector to the plant cell. Alternatively, the vector can undergo homologous recombination with a tumor-inducing (Ti) plasmid and exchange the instant cassette for the T-DNA of the Ti plasmid. In preferred embodiments, the invention provides for methods of stably transforming plant cells wherein a DNA construct that is introduced into a plant cell is stably integrated into a chromosome.

Transgenic Plants

The present invention provides transgenic plants and plant material (e.g., leaves, fruit, roots, etc.) comprising plant cells which express one or more contraceptive proteins useful in the present invention. In a preferred embodiment, a plant cell of interest is transformed with one or more of the DNA constructs described above, wherein expression of the construct within the transformed plant cell results in the production of a contraceptive protein by the plant cell.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Methods of Introducing Nucleic Acid into Plant Cells

Methods of gene transfer into plants include, but are not limited to use of the *A. tumefaciens* --Ti plasmid system. The tumor-inducing (Ti) plasmids of *A. tumefaciens* contain a segment of plasmid DNA called transfer DNA (T-DNA), which integrates into the plant host genome. First, a plasmid vector is constructed that replicates in *E. coli*. This plasmid contains the DNA encoding the protein of interest (i.e., a contraceptive protein) and this DNA is flanked by T-DNA border sequences, which define the limits to the segment of DNA which is transferred into the plant cell and integrated into the plant genome. Usually a gene encoding a selectable marker (such as a gene encoding resistance to an antibiotic such as kanamycin) is also inserted between the left border (LB) and right border (RB) sequences. The expression of this gene in transformed plant cells gives a positive selection method to identify those plants or plant cells having an integrated T-DNA region. Second, the plasmid is transferred to *Agrobacterium*. This can be accomplished via a direct uptake of plasmid DNA by the *Agrobacterium*. For subsequent transfer of the T-DNA to plants, the *Agrobacterium* strain utilized must contain a set of inducible virulence (*vir*) genes, which are essential for T-DNA transfer to plant cells.

The *A. tumefaciens* gene transfer system mentioned above is the etiologic agent of crown gall, a disease of a wide range of dicotyledons and gymnosperms [DeCleene, M. et. al., *Bot. Rev.* 42, 389 (1976)], that results in the formation of tumors or galls in plant tissue at the site the infection. The *Agrobacterium* system has been developed to permit routine transformation of a variety of plant tissue [see, e.g., Schell, J. et al., *Bio/Technology* 1, 175 (1983); Chilton, M-D, *Scientific American* 248, 50 (1983)]. Representative tissues transformed in this manner include tobacco [Barton, K. et al., *Cell* 32, 1033 (1983)]; tomato [Fillatti, J. et al., *Bio/Technology* 5, 726 (1987)]; sunflower [Everett, N. et al., *Bio/Technology* 5, 1201 (1987)]; cotton [Umbeck, P. et al., *Bio/Technology* 5, 263 (1987)]; rapeseed [Pua, E. et al., *Bio/Technology* 5, 815 (1987)]; potato [Facciotti D. et al., *Bio/Technology* 3, 241 (1985)]; poplar [Pythoud, F. et al., *Bio/Technology* 5, 1323 (1987)]; and soybean [Hinchee, M. et al., *Bio/Technology* 6, 915 (1988)]. Other plants can be transformed by routine extensions or modifications of these methods.

Multiple choices of *Agrobacterium* strains and plasmid construction strategies can be used to optimize genetic transformation of plants. For instance, *A. tumefaciens* may not be the only *Agrobacterium* strain used. Other *Agrobacterium* strains such as *A. rhizogenes* may be more suitable in some applications. *A. rhizogenes*, which incites root hair formation in many dicotyledonous plant species, carries a large extra-chromosomal element called an Ri (root-including) plasmid, which functions in a manner analogous to the Ti plasmid of *A. tumefaciens*.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Transformation using *A. rhizogenes* has developed analogously to that of *A. tumefaciens* and has been successfully utilized to transform, for example, alfalfa, [Sukhapinda, K. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 8, 209 (1987)].

Methods of inoculation of the plant tissue vary depending upon the plant species and the *Agrobacterium* delivery system. A convenient approach is the leaf disc procedure for transforming potato, however *Agrobacterium*-mediated transformation can be performed with a tissue explant that provides a good source for initiation of whole plant differentiation and regeneration. The addition of nurse tissue may be desirable under certain conditions. Other procedures such as *in vitro* transformation of regenerating protoplasts with *A. tumefaciens* may be followed to obtain transformed plant cells as well.

Several so-called "direct" gene transfer procedures have been developed to transform plants and plant tissues without the use of an *Agrobacterium* intermediate, for example plant regeneration from protoplasts [Evans, D. A. *et al.*, *Handbook of Plant Cell Culture* 1, 124 (1983)]. When a plant species can be regenerated from protoplasts, direct gene transfer procedures can be utilized and transformation is not dependent on the use of *A. tumefaciens*. In the direct transformation of protoplasts the uptake of exogenous genetic material into a protoplast may be enhanced by use of a chemical agent or electric field. The exogenous material may then be integrated into the nuclear genome.

Early work has been conducted in the dicot *Nicotiana tabacum* (tobacco) where it was shown that the foreign DNA was incorporated and transmitted to progeny plants [Paszkowski, J. *et al.*, *EMBO J*, 3: 2717 (1984); Potrykus, I. *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 199: 169 (1985)]. Monocot protoplasts have also been transformed by this procedure: for example, *Triticum monococcum* [Lorz H. *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 199: 178 (1985)]; *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass), Potrykus, I. *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 199, 183 (1985); maize [Rhodes, C., *et al.*, *Bio/Technology* 5, 56 (1988)]; and Black Mexican sweet corn [Fromm, M. *et al.*, *Nature* 319, 719 (1986)]. Other plants that have been regenerated from protoplasts include rice [Abdulah, R. *et al.*, *Bio/Technology* 4, 1987 (1987)]; rapeseed [Kansha, *et al.*, *Plant Cell Reports* 5, 101 (1986)]; potato [Tavazza, R. *et al.*, *Plant Cell Reports* 5, 243 (1986)]; eggplant, Sihachaki, D. *et al.*, *Plant Cell, Tissue, Organ Culture* 11, 179 (1987); and cucumber [Jia, S-R., *et al.*, *J. Plant Physiol.* 124, 393 (1986)]. Methods for directly transforming protoplasts of other varieties are evident.

Introduction of DNA into protoplasts of a plant can be effected by treatment of the protoplasts with an electric pulse in the presence of the appropriate DNA in a process called electroporation. In this method, the protoplasts are isolated and suspended in a mannitol

WO 02/083072

PCT/US02/11693

solution. Supercoiled or circular plasmid DNA is added. The solution is mixed and subjected to a pulse of about 400 V/cm at room temperature for less than 10 to 100 microseconds. A reversible physical breakdown of the membrane occurs to permit DNA uptake into the protoplasts.

Liposome fusion has also been shown to be a method for transformation of plant cells. In this method, protoplasts are brought together with liposomes carrying the desired gene. As membranes merge, the foreign gene is transferred to the protoplasts [Dehayes, A. *et al.*, *EMBO J.* 4, 2731 (1985)].

Polyethylene glycol (PEG) mediated transformation has been carried out in *N. tabacum* (a dicot) and *Lolium multiflorum* (a monocot). It is a chemical procedure of direct gene transfer based on synergistic interaction between Mg^{2+} , PEG, and possibly Ca^{2+} [Negrutiu, R. *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 8, 363 (1987)]. Alternatively, exogenous DNA can be introduced into cells or protoplasts by microinjection. A solution of plasmid DNA is injected directly into the cell with a finely pulled glass needle.

Another developed procedure for direct gene transfer involves bombardment of cells by microprojectiles carrying DNA [Klein, T. M. *et al.*, *Nature* 327, 70 (1987)]. In this "biolistic" procedure, tungsten or gold particles coated with the exogenous DNA are accelerated toward the target cells. At least transient expression has been achieved in onion. This procedure has been utilized to introduce DNA into Black Mexican sweet corn cells in suspension culture and maize immature embryos and also into soybean protoplasts [Klein, T. M. *et al.*, *Bio/Technology* 6, 559 (1988)]. Stably transformed cultures of maize, tobacco, barley, oats, wheat, rice, carrot, banana and soybean have been obtained by microprojectile bombardment. Stably transformed plants can also be regenerated and recovered by this procedure [McCabe, D. E. *et al.*, *Bio/Technology* 6, 923 (1988)].

To produce transformed seeds, flowers of Arabidopsis are transformed according to the following method. The Agrobacterium is vacuum-infiltrated into developing flowers, and the resulting seed are then screened for marker resistance and foreign gene expression. Presumably, stamens/pollen, ovary/egg, or even the developing zygote if fertilization has already occurred, are transformed. This method (described in Clough & Bent, 1998, *Plant J.*, 16:735) is used to transform Arabidopsis with a construct comprising a rep gene under the transcriptional regulation of the At2S-2 seed promoter.

Following transformation, the transformed cell or plant tissue is selected or screened by conventional techniques. The transformed cell of plant tissue containing the chimeric DNA

WO 02/083072

PCT/US02/11693

sequence discussed above is then regenerated using known procedures, including those described in the referenced discussed above. The species of plant which can most easily be regenerated by these techniques, and are thus, preferred in the present invention include, but are not limited to maize, sunflower, rapeseed, clover, tobacco, cotton, alfalfa, rice, potato, eggplant, cucumber and soybean. The regenerated plants are screened for transformation by standard methods described below. Progeny of the regenerated plants are screened and selected for the continued presence of the integrated DNA sequence in order to develop improved plant and seed lines. The DNA sequence can be moved into other genetic lines by a variety of techniques, including classical breeding, protoplast fusion, nuclear transfer and chromosome transfer.

Plants, Cells and Seeds Useful According to the Invention

Plants that can be used for practice of the present invention include a dicotyledon and monocotyledon. These include, but are not limited to, tobacco, carrot, spinach, pepper, potato, tomato, apple, wheat, rye, soybean, rice, maize, corn, berries such as strawberries, raspberries, alfalfa and banana. Since many edible plants used by humans for food or as components of animal feed are dicotyledonous plants, dicotyledons are typically employed, although monocotyledon transformation is also applicable especially in the production of certain grains useful for animal feed. It is particularly advantageous in human immunocontraception to produce a contraceptive protein in a juice for ease of administration to humans such as juice of tomato, soybean, and carrot, or milk. Cells and seeds derived from these plant vaccines are also useful according to the invention.

A transgenic plant transformed with a vector described hereinabove is another aspect of the present invention. Particularly preferred plant hosts for the vector include banana, tomato, potato, carrot, alfalfa, medicago, maize, and tobacco.

Potato varieties FL 1607 ("Frito Lay 1607") and Desiree, and tomato variety Tanksley TA234TM2R are particularly preferred varieties, which have been transformed with binary vectors using the methods described herein. Of these transformed varieties, Desiree is the only commercial variety; the other varieties can be obtained from Frito-Lay (Rhineland, WI) and Steve Tanksley (Dept. of Plant Breeding, Cornell Univ.). Tomato is preferred as a model system for expression of foreign proteins because of its ease of genetic transformation, and because fruit-specific, ripening dependent promoters are available for regulated expression (Giovannoni *et al.*, 1989). The E8 promoter has been used to mediate high level production of polygalacturonase protein in mutant tomato fruit (Giovannoni *et al.*, 1989) and monellin in wild-type tomato fruit (Penarrubia *et al.*, 1992).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Plant cell suspension cultures are widely known and available to those in the art. Plant cell culture is preferred as a model system for expression of foreign proteins because they allow transformation, growth and protein production more rapidly than whole plant systems. Plant cell suspension cultures can be grown in liquid, or can be transferred to solid media for callus production. Common examples of cell suspension cultures which could be used for the purposes described in the invention include but are not limited to carrot, tobacco (eg. NT-1 or BY-1 cell lines), maize.

Detection of Transformed Plant Material

The invention provides for methods of detecting nucleic acid sequences encoding contraceptive proteins and the contraceptive proteins themselves including but not limited to Southern and northern blot analysis, PCR-based methods of detection, as well as immunological methods of detecting a protein of interest according to the invention. These techniques may be used according to the invention, to confirm the presence of nucleic acid sequences encoding contraceptive proteins, and optionally mucosal targeting proteins, and to confirm the expression of the contraceptive and mucosal targeting proteins themselves.

Detection of a Nucleotide Sequence of Interest

1. Southern Blot Analysis

Southern blot analysis can be used to detect a nucleotide sequence of interest from a PCR amplified product or from a total genomic DNA test sample via a non-PCR based assay. The method of Southern blot analysis is well known in the art (Ausubel et al., supra, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). This technique involves the transfer of DNA fragments from an electrophoresis gel to a membrane support resulting in the immobilization of the DNA fragments. The resulting membrane carries a semi-permanent reproduction of the banding pattern of the gel.

Southern blot analysis is performed according to the following method. Genomic DNA (5-20 μ g) obtained from a plant transformed with a nucleic acid vector according to the methods of the present invention is digested with the appropriate restriction enzyme and separated on a 0.6-1.0% agarose gel in TAE buffer. The DNA is transferred to a commercially available nylon or nitrocellulose membrane (e.g. Hybond-N membrane, Amersham, Arlington Heights, IL) by methods well known in the art (Ausubel et al., supra, Sambrook et al., supra). Following transfer

WO 02/083072

PCT/US02/11693

and UV cross linking, the membrane is hybridized with a labeled probe in hybridization solution (e.g. under stringent conditions in 5X SSC, 5X Denhardt solution, 1% SDS) at 65°C.

Alternatively, high stringency hybridization can be performed at 68°C or in a hybridization buffer containing a decreased concentration of salt, for example 0.1X SSC. The hybridization conditions can be varied as necessary according to the parameters known in the art. Following hybridization, the membrane is washed at room temperature in 2X SSC/0.1% SDS and at 65°C in 0.2X SSC/0.1% SDS, and exposed to film. The stringency of the wash buffers can also be varied depending on the amount of the background signal (Ausubel et al., supra).

Detection of a nucleic acid probe-target nucleic acid hybrid will include the step of hybridizing a nucleic acid probe to the DNA target, wherein the probe is complementary to a portion of the nucleic acid sequence of the DNA construct described above. This probe may be radioactively labeled or covalently linked to an enzyme such that the covalent linkage does not interfere with the specificity of the hybridization. A resulting hybrid between plant DNA and the probe can be detected. Methods for labeling a probe include random oligonucleotide primed synthesis, nick translation, kinase reactions, or polymerase chain reaction (see Ausubel et al., supra). Alternatively, a hybrid can be detected via non-isotopic methods. Non-isotopically labeled probes can be produced by the addition of biotin or digoxigenin, fluorescent groups, chemiluminescent groups (e.g. dioxetanes, particularly triggered dioxetanes), enzymes or antibodies. Typically, non-isotopic probes are detected by fluorescence or enzymatic methods. Detection of a radiolabeled probe-target nucleic acid complex can be accomplished by separating the complex from free probe and measuring the level of complex by autoradiography or scintillation counting. If the probe is covalently linked to an enzyme, the enzyme-probe-conjugate-target nucleic acid complex will be isolated away from the free probe enzyme conjugate and a substrate will be added for enzyme detection. Enzymatic activity will be observed as a change in color development or luminescent output resulting in a 10^3 - 10^6 increase in sensitivity. An example of the preparation and use of nucleic acid probe-enzyme conjugates as hybridization probes (wherein the enzyme is alkaline phosphatase) is described in (Jablonski et al., 1986, Nuc. Acids Res., 14:6115)

Two-step label amplification methodologies are known in the art. These assays are based on the principle that a small ligand (such as digoxigenin, biotin, or the like) is attached to a nucleic acid probe capable of specifically binding to a gene of interest (i.e., a gene encoding a contraceptive protein or portion thereof).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

According to the method of two-step label amplification, the small ligand attached to the nucleic acid probe will be specifically recognized by an antibody-enzyme conjugate. For example, digoxigenin will be attached to the nucleic acid probe and hybridization will be detected by an antibody-alkaline phosphatase conjugate wherein the alkaline phosphatase reacts with a chemiluminescent substrate. For methods of preparing nucleic acid probe-small ligand conjugates, see (Martin et al., 1990, BioTechniques, 9:762). Alternatively, the small ligand will be recognized by a second ligand-enzyme conjugate that is capable of specifically complexing to the first ligand. A well known example of this manner of small ligand interaction is the biotin-avidin interaction. Methods for labeling nucleic acid probes and their use in biotin-avidin based assays are described in Rigby et al., 1977, J. Mol. Biol., 113:237 and Nguyen et al., 1992, BioTechniques, 13:116).

Variations of the basic hybrid detection protocol are known in the art, and include modifications that facilitate separation of the hybrids to be detected from extraneous materials and/or that employ the signal from the labeled moiety. A number of these modifications are reviewed in, e.g., Matthews & Kricka, 1988, Anal. Biochem., 169:1; Landegren et al., 1988, Science, 242:229; Mittlin, 1989, Clinical Chem. 35:1819; U.S. Pat. No. 4,868,105, and in EPO Publication No. 225,807.

2. Northern Blot Analysis

The method of Northern blotting is well known in the art. This technique involves the transfer of RNA from an electrophoresis gel to a membrane support to allow the detection of specific sequences in RNA preparations.

Northern blot analysis is performed according to the following method. An RNA sample obtained from plant tissue transformed with the DNA constructs described above (prepared by the addition of MOPS buffer, formaldehyde and formamide) is separated on an agarose/formaldehyde gel in 1X MOPS buffer. Following staining with ethidium bromide and visualization under ultra violet light to determine the integrity of the RNA, the RNA is hydrolyzed by treatment with 0.05M NaOH/1.5M NaCl followed by incubation with 0.5M Tris-Cl (pH 7.4)/1.5M NaCl. The RNA is transferred to a commercially available nylon or nitrocellulose membrane (e.g. Hybond-N membrane, Amersham, Arlington Heights, IL) by methods well known in the art (Ausubel et al., supra, Sambrook et al., supra). Following transfer and UV cross linking, the membrane is hybridized with a labeled probe in hybridization solution (e.g. in 50% formamide/2.5% Denhardt's/100-200mg denatured salmon sperm DNA/0.1% SDS/5X SSPE) at 42°C. The hybridization conditions can be varied as necessary as described in

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Ausubel et al., supra and Sambrook et al., supra. Following hybridization, the membrane is washed at room temperature in 2X SSC/0.1% SDS, at 42°C in 1X SSC/0.1% SDS, at 65°C in 0.2X SSC/0.1% SDS, and exposed to film. The stringency of the wash buffers can also be varied depending on the amount of background signal (Ausubel et al., supra).

3. PCR

Nucleic acid sequences of interest (i.e., those encoding a contraceptive protein) of the invention are amplified from genomic DNA or other natural sources by the polymerase chain reaction (PCR). PCR methods are well-known to those skilled in the art.

PCR provides a method for rapidly amplifying a particular DNA sequence by using multiple cycles of DNA replication catalyzed by a thermostable, DNA-dependent DNA polymerase to amplify the target sequence of interest. PCR requires the presence of a nucleic acid to be amplified, two single stranded oligonucleotide primers flanking the sequence to be amplified, a DNA polymerase, deoxyribonucleoside triphosphates, a buffer and salts.

The method of PCR is well known in the art. PCR, is performed as described in Mullis and Faloona, 1987, Methods Enzymol., 155: 335, herein incorporated by reference.

PCR is performed using template DNA (at least 1fg; more usefully, 1-1000 ng) and at least 25 pmol of oligonucleotide primers. A typical reaction mixture includes: 2µl of DNA, 25 pmol of oligonucleotide primer, 2.5 µl of 10X PCR buffer 1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0.4 µl of 1.25 µM dNTP, 0.15 µl (or 2.5 units) of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer, Foster City, CA) and deionized water to a total volume of 25 µl. PCR is performed using a programmable thermal cycler.

The length and temperature of each step of a PCR cycle, as well as the number of cycles, are adjusted according to the stringency requirements in effect. Annealing temperature and timing are determined both by the efficiency with which a primer is expected to anneal to a template and the degree of mismatch that is to be tolerated. The ability to optimize the stringency of primer annealing conditions is well within the knowledge of one of moderate skill in the art. An annealing temperature of between 30°C and 72°C is used. Initial denaturation of the template molecules normally occurs at between 92°C and 99°C for 4 minutes, followed by 20-40 cycles consisting of denaturation (94-99°C for 15 seconds to 1 minute), annealing (temperature determined as discussed above; 1-2 minutes), and extension (72°C for 1 minute).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

The final extension step is generally carried out for 4 minutes at 72°C, and may be followed by an indefinite (0-24 hour) step at 4°C.

Several techniques for detecting PCR products quantitatively without electrophoresis may be useful according to the invention. One of these techniques, for which there are commercially available kits such as Taqman™ (Perkin Elmer, Foster City, CA), is performed with a transcript-specific antisense probe. This probe is specific for the PCR product (e.g. a nucleic acid fragment derived from a gene of interest) and is prepared with a quencher and fluorescent reporter probe complexed to the 5' end of the oligonucleotide. Different fluorescent markers can be attached to different reporters, allowing for measurement of two products in one reaction. When Taq DNA polymerase is activated, it cleaves off the fluorescent reporters of the probe bound to the template by virtue of its 5'-to-3' nucleolytic activity. In the absence of the quenchers, the reporters now fluoresce. The color change in the reporters is proportional to the amount of each specific product and is measured by a fluorometer; therefore, the amount of each color can be measured and the PCR product can be quantified. The PCR reactions can be performed in 96 well plates so that multiple samples can be processed and measured simultaneously. The Taqman™ system has the additional advantage of not requiring gel electrophoresis and allows for quantification when used with a standard curve.

Detection of a Protein Sequence of Interest

1. Preparation of Antibodies

Antibodies specific for the contraceptive proteins of the present invention are useful for protein purification and detection. By antibody, we include constructions using the binding (variable) region of such an antibody, and other antibody modifications. Thus, an antibody useful in the invention may comprise a whole antibody, an antibody fragment, a polyfunctional antibody aggregate, or in general a substance comprising one or more specific binding sites from an antibody. The antibody fragment may be a fragment such as an Fv, Fab or F(ab')₂ fragment or a derivative thereof, such as a single chain Fv fragment. The antibody or antibody fragment may be non-recombinant, recombinant or humanized. The antibody may be of an immunoglobulin isotype, e.g., IgG, IgM, and so forth. In addition, an aggregate, polymer, derivative and conjugate of an immunoglobulin or a fragment thereof can be used where appropriate.

Although a protein product (or fragment or oligopeptide thereof) of a gene of interest of the invention that is useful for the production of antibodies does not require biological activity, it

WO 02/083072

PCT/US02/11693

must be antigenic. Peptides used to induce specific antibodies may have an amino acid sequence consisting of at least five amino acids and preferably at least 10 amino acids. Preferably, they should be identical to a region of the natural protein and may contain the entire amino acid sequence of a small, naturally occurring molecule. Short stretches of amino acids corresponding to species specific epitopes of the contraceptive proteins of the invention may be fused with amino acids from another protein (i.e., a mucosal targeting protein) such as LT-B, and antibody will be produced against the chimeric molecule. Procedures well known in the art can be used for the production of antibodies to the proteins of interest of the invention.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice etc... may be immunized by injection with the protein products (or a portion, fragment, or oligonucleotide thereof which retains immunogenic properties) of the genes of interest of the invention. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase the immunological response. Such adjuvants include but are not limited to Freund's, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. BCG (bacilli Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum* are potentially useful human adjuvants.

a. Polyclonal antibodies.

The antigen protein may be conjugated to a conventional carrier in order to increase its immunogenicity, and an antiserum to the peptide-carrier conjugate will be raised. Coupling of a peptide to a carrier protein and immunizations may be performed as described (Dymecki et al., 1992, J. Biol. Chem., 267: 4815). The serum can be titered against protein antigen by ELISA (below) or alternatively by dot or spot blotting (Boersma and Van Leeuwen, 1994, J. Neurosci. Methods, 51: 317). At the same time, the antiserum may be used in tissue sections prepared as described. A useful serum will react strongly with the appropriate peptides by ELISA, for example, following the procedures of Green et al., 1982, Cell, 28: 477.

b. Monoclonal antibodies.

Techniques for preparing monoclonal antibodies are well known, and monoclonal antibodies may be prepared using a candidate antigen whose level is to be measured or which is to be either inactivated or affinity-purified, preferably bound to a carrier, as described by Arnheiter et al., 1981, Nature, 294:278.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Monoclonal antibodies are typically obtained from hybridoma tissue cultures or from ascites fluid obtained from animals into which the hybridoma tissue was introduced.

Monoclonal antibody-producing hybridomas (or polyclonal sera) can be screened for antibody binding to the target protein.

2. Antibody Detection Methods

Particularly preferred immunological tests rely on the use of either monoclonal or polyclonal antibodies and include enzyme-linked immunoassays (ELISA), immunoblotting, immunohistochemistry and immunoprecipitation (see Humason, G.L., 1979, *Animal Tissue Techniques*, 4th ed. W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA; Voller, 1978, *Diagnostic Horizons*, 2:1, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller et al., 1978, *J. Clin. Pathol.*, 31: 507; U.S. Reissue Pat. No. 31,006; UK Patent 2,019,408; Butler, 1981, *Methods Enzymol.*, 73: 482; Maggio, E. (ed.), 1980, *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL) or radioimmunoassays (RIA) (Weintraub, B., *Principles of radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March 1986, pp. 1-5, 46-49 and 68-78). For analyzing plants for the presence or absence of a protein of interest according to the present invention, immunohistochemistry techniques may be used. It will be apparent to one skilled in the art that the antibody molecule may have to be labeled to facilitate easy detection of a target protein. Techniques for labeling antibody molecules are well known to those skilled in the art (see Harlow and Lane, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory).

Dosage and Administration of Transgenic Plant Material

The present invention provides a method of inducing contraception in an animal by administering to an animal a transgenic plant material which expresses a contraceptive protein, wherein the administration of the transgenic plant material induces a mucosal immune response to the contraceptive protein. Without being bound to a one particular theory, the present invention relies on administration of transgenic plant material to an animal, such that, the contraceptive proteins expressed by the transgenic plant cells contact one or more mucosal surfaces of the animal to which it is administered. When the contraceptive protein (antigen) is taken up by M cells overlying the GALT and BALT, a generalized mucosal immunity results with secretory IgA against the contraceptive protein being produced by all secretory tissues in the body (Cebra et al., supra; Bienenstock et al., supra; Weinz-Carrington et al., supra; McCaughan et al., supra). Oral administration, therefore, is a preferred route to stimulate a

WO 02/083072

PCT/US02/11693

generalized mucosal immune response and, in addition, lead to local stimulation of a secretory immune response in the oral cavity and in the gastrointestinal tract.

In a preferred embodiment, the contraceptive protein produced by the methods of the present invention is administered by the oral consumption of the foodstuff which has been produced from the transgenic plant or plant cell culture producing the contraceptive protein. In one embodiment, the edible portion of a transgenic plant of the present invention is administered as a dietary component while the contraceptive protein is administered in the process.

In one embodiment, the transgenic plant material is administered to an animal in raw form, although the plant material may be processed by cutting, chopping, mincing, dicing, pureeing, or otherwise reducing the transgenic plant material to smaller pieces so to facilitate ingestion by an animal, such as by the reduction of transgenic grasses to silage for ingestion by livestock. Transgenic plant material which may be administered in raw form include, but is not limited to fruit, leaves, stems, roots, tubers, and seeds. In a further embodiment, wherein the transgenic plant material is in the form of grasses or grains, the plant may be administered to an animal by permitting an animal to which the contraceptive protein is to be administered to orally consume the plant material in the environment in which it is growing (e.g., transgenic grass is grown in a field in which cows are permitted to graze, thus administering the contraceptive protein to the cow).

In an alternative embodiment, the transgenic plant material may undergo additional processing (i.e., other than chopping or cutting) prior to administration to an animal. Transgenic plant material may be processed by a technique known to those of skill in the art by which the transgenic plant material of the present invention is refined for oral, nasal, or inhaled application. The plant material may be processed by emulsification with excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the antigen. Suitable excipients include, but are not limited to, adjuvants, buffers, sugars, antioxidants, stabilizers, or antigenic powders; for example, sodium ascorbate, Quillaja extract, water, saline, dextrose, glucose, sucrose, glycerol, ethanol, or the like and combinations thereof. In addition, if desired, the vaccine may contain amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, or adjuvants which enhance the effectiveness of the vaccines. Further, the plant material may be mixed with non-transgenic plant or non-plant material to facilitate ingestion by an animal. For example, transgenic corn may be mixed with other vegetables, or transgenic soy plants may be mixed with other ingredients such as spices, or other flavorings to produce, for example soy burgers, soy shakes, or soy milk. For further example, transgenic tobacco cultures may be

WO 02/083072

PCT/US02/11693

filtered and added to regular feed materials by means such as but not limited to mixing, spraying, or top-coating. In addition, the transgenic plant material may be dried and administered in powdered form either alone, or as a suspension in an acceptable liquid such as juice, or water.

In a further embodiment, the plant material may be processed so as to incorporate the plant material and/or cells in pharmaceutically acceptable creams, ointments, salves, or suppositories. Accordingly, transgenic plant material carried with a pharmaceutical means may be administered to an animal by contacting the pharmaceutically carried plant material to a mucosal surface including, but not limited to oral, nasal, rectal or vaginal. Additional mucosal surfaces which may be contacted with transgenic plant material of the present invention include the inner coat of the bronchi, the mucous layer of the tympanic cavity, the inner mucous coat of the colon, the inner layer of the ductus deferens, the inner coat of the esophagus, the mucous coat of the small intestine, the mucous coat of the larynx, the mucous membrane of the tongue, the pituitary membrane, the mucous membrane of the oral cavity, the mucous membrane of the pharynx, the inner mucous layer of the trachea, the lining of the auditory tube, the mucous layer of the uterine tube, the inner layer of the ureter, the inner layer of the urethra, the endometrium, the mucous membrane of the vagina, the mucous layer of the stomach, the inner coat of the urinary bladder, and the mucous membrane of the seminal vesicle.

Dosage

Transgenic plant material of the present invention may be administered to an animal in a number of different forms as described above (e.g., raw, powdered, etc.). In preferred embodiments, transgenic plant material useful in the present invention will express at least 8 μg of contraceptive protein, or a contraceptive protein/mucosal targeting protein fusion per gram of dry plant material, preferably at least 10 μg , and most preferably at least 20 μg of contraceptive protein per gram of dry plant material.

In one embodiment, animals housed in a controlled environment, such as a laboratory, kennel, or private home, and animals housed outdoors, but whose food intake is regulated (e.g., livestock) are fed transgenic plant material at weekly intervals for at least 12 weeks (i.e., days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77,). At each feeding, animals receive between 4 and 100,000 grams of transgenic plant material depending on the size and average food intake of the animal to be treated (e.g., the average cow consumes approximately 90 pounds of food per day).

In an alternate embodiment, captive animal populations as described above are fed transgenic plant material on a daily basis (eg. days 0,1,2,3,4,5,6) to achieve primary

WO 02/083072

PCT/US02/11693

contraceptive vaccination, and then fed transgenic plant material on a regular boosting schedule (eg. monthly) to maintain a sufficient contraceptive immune state.

In an alternate embodiment, delivery of transgenic plant material is used to augment parenteral delivery of contraceptive preparations. For example, a contraceptive preparation (produced through systems such as plants, bacterial yeast, or mammalian cells) may be delivered by veterinarian to a companion animal at the onset of puberty, and boosted on a regular schedule (eg. monthly) with a prescribed contraceptive feed derived from transgenic plant materials described herein.

In an alternate embodiment for human application, transgenic plant materials may be formulated into capsules or tablets and incorporated into a self-administered regime, whereby contraceptive and non-contraceptive tablets or capsules are packaged such that dosing and non-dosing occurs on alternate days.

In an alternate embodiment, animals in the wild may be administered transgenic plant material in the form of food baits which are placed in the animals natural environment. Best methods for delivery of baits, and modelling of population effects per application, are available to those skilled in the art of wild population control, and will determine the best specific baiting regime for each target species. Alternatively, transgenic plants which express the contraceptive proteins of the present invention may be allowed to grow wild in areas which are inhabited by animals to which the contraceptive protein is to be administered. Plants may be examined using the techniques described herein, to measure the amount of contraceptive protein expressed by the plant. In preferred embodiments, transgenic plant growing in the wild will express at least 8 μg of contraceptive protein, or a contraceptive protein/mucosal targeting protein fusion per gram of dry plant material, preferably at least 10 μg , and most preferably at least 20 μg of contraceptive protein per gram of dry plant material. Under these conditions, wild animals would be permitted to feed *ad libitum* on the transgenic plant material.

Adjuvant

It is well known in the art that adjuvants can be added with an immunological antigen to increase the antigenic response (Coligan LG et al. eds. Current Protocols in Immunology, New York: John Wiley & Sons, 1995). Freund's Complete Adjuvant has been the mainstay of immunological adjuvants for decades. While usually effective, the adjuvant may induce undesirable side effects which has lead to refinement of its use and to development of alternatives.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Other alternative adjuvants include, but are not limited to, Ribi Adjuvant System (RAS) which is a oil-in-water emulsion containing detoxified endotoxin (MPL) and mycobacterial cell wall components (TDW, CWS) in 2% squalene (Ribi Immunochem Research, Inc. Hamilton, Montana); TiterMax, a stable, metabolizable water-in-oil adjuvant (CytRx Corporation, Atlanta Norcross, Georgia); Syntex Adjuvant Formulation (SAF)³, a performed oil-in-water emulsion stabilized by Tween 80 and pluronic polyoxyethylene/polyoxypropylene block copolymer L121 (Chiron Corporation, Emeryville, California); Freund's Incomplete Adjuvant (FIA), a less inflammatory alternative of Freund's complete adjuvant (Novavax Inc., Columbia, Maryland); ALUM - aluminum hydroxide, a widely used adjuvant, especially in commercial products such as vaccines (commercially available as Alhydrogel, Accurate Chemical & Scientific Co, Westbury, New York); SuperCarrier (Syntex Research, Palo Alto, CA); Elvax 40W (DuPont Chemical Co. Wilmington, DE); Montanide, a manide-oleate compound (ISA Seppic Fairfield, NJ); Nitrocellulose-absorbed protein (Nilsson BO, Larsson A. Inert carriers for immunization. Res. Immunol. 143:553-557, 1992); Gerbu adjuvant, (C-C Biotech, Poway, California); Immune-stimulating complexes (ISCOMS) (Coligan LG et al. eds. Current Protocols in Immunology, New York: John Wiley & Sons, 1995).

Saponin adjuvants have been used for many years for parenteral vaccination (products include "Quil A" or "QS-21"). Saponins are glycosidic compounds that are produced as secondary metabolites. They are widely distributed among higher plants and in some marine invertebrates of the phylum Echinodermata (ApSimon et al., Stud. Org. Chem. 17:273-286 (1984)). Because of their antimicrobial activity, plant saponins are effective chemical defenses against microorganisms, particularly fungi (Price et al., CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 26:27-135 (1987)). Saponins are responsible for the toxic properties of many marine invertebrates (ApSimon et al., Stud. Org. Chem. 17:273-286 (1984)). The chemical structure of saponins imparts a wide range of pharmacological and biological activities, including some potent and efficacious immunological activity. In addition, members of this family of compounds have foaming properties (an identifying characteristic), surfactant properties (which are responsible for their hemolytic activity), cholesterol-binding, fungitoxic, molluscicidal, contraceptive, growth-retarding, expectorant, antiinflammatory, analgesic, antiviral, cardiovascular, enzyme-inhibitory, and antitumor activities [Hostettmann, K., et al., Methods Plant Biochem. 7:435-471(1991); Lacaille-Dubois, M. A. & Wagner, H., Phytomedicine 2:363-386 (1996); Price, K. R., et al., CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 26:27-135 (1987)].

In addition, solutions of saponin have been employed as detergents to increase the delivery of polypeptides across mucosal membranes. For example, Pillion, D. J. et al., Invest.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Ophthalm. Vis. Sci. 32:3021-27 (1991) disclose that administration of insulin in eyedrops containing unpurified saponin from *Gypsophylla* as a 1% solution causes a rapid and reproducible reduction in the blood levels of D-glucose in rats. Insulin eyedrops lacking saponin were ineffective. Japanese Abstract No. JP 62126135 (1987) discloses the nasal administration of growth hormone releasing factor employing a saponin having a steroidal or triterpene structure. See also, Chiou, G. C. Y. et al., *J. Pharm. Sci.* 78:815-818 (1989); and Chiou G. C. Y. et al., *J. Ocul. Pharm.* 5:81-91 (1989) who disclose the systemic delivery of insulin by its administration as a component of eyedrops containing saponin (obtained from Sigma Chemical Company). This detergent property of Saponin may also facilitate the permeability of biomembrane, therefore increase the immune response.

Saponin adjuvants from the bark of the *Quillaja saponaria* Molina tree (Quillajasaponins) are chemically and immunologically well-characterized products (Dalsgaard, K. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 44:243 (1974); Dalsgaard, K., *Acta Vet. Scand.* 19 (Suppl. 69):1 (1978); Higuchi, R. et al., *Phytochemistry* 26:229 (1987); *ibid.* 26:2357 (1987); *ibid.* 27:1168 (1988); Kensil, C. et al., *J. Immunol.* 146:431 (1991); Kensil et al., U.S. Pat. No. 5,057,540 (1991); Kensil et al., *Vaccines* 92:35 (1992); Bomford, R. et al., *Vaccine* 10:572 (1992); and Kensil, C. et al., U.S. Pat. No. 5,273,965 (1993)).

Saponin also exists in other plant such as soy bean (Andrzejewska E., 1984, *Rocz Panstw Zakl Hig.* 35:135-8).

Quillaja saponins are found as a mixture of about twenty structurally closely related triterpenoid glycosides with minimal differences between them (Higuchi, R. et al., *Phytochemistry* 26:229 (1987); *ibid.*, 26:2357 (1987); *ibid.*, 27:1169 (1988); Kensil et al., U.S. Pat. No. 5,057,540 (1991); Kensil et al., *Vaccines* 92:35 (1992)), making their separation difficult. Quillaja Saponaria extracts are commercially available (e.g., Garuda International, Inc. Lemon Cove, CA 93244). U.S. Patent Nos 5,273,965 and 5,650,398 disclose crude Saponin extracts and U.S. Patent No. 5,057,540 discloses a substantially pure Saponin extract. The extraction processes for both crude and pure Saponin include purifying the compound through chromatography.

A useful saponin adjuvant, according to the invention, includes crude and pure saponin extract (Garuda International, Inc. Lemon Cove, CA 93244). Useful saponin adjuvant also includes part of (e.g., leaf, root, fruit, or other parts) or processed plant containing saponin. By "processed", it refers to the cutting, chopping, mincing, dicing, or an otherwise reduction to smaller pieces of the saponin-containing plant, so to facilitate ingestion by an animal.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

In a preferred embodiment, saponin adjuvant is orally administered with the transgenic plant material.

Detecting Immunization

The present invention provides a means of inducing contraception in an animal by administering a contraceptive protein to which a mucosal immune response is raised. In a preferred embodiment, following administration of transgenic plant material bearing contraceptive proteins of the present invention, animals are examined to determine whether an immune response to the contraceptive protein has been raised. Animals may be examined for an immune response to the contraceptive protein at a time following administration of the plant material.

The following describes the assessment of ZP antigens, however, the techniques described may be used to an animal's immune status with respect to a of the contraceptive proteins described herein. In one embodiment, one of skill in the art can determine whether an animal has been immunized is by determining the animal's immune status with respect to ZP antigens. This evaluation can be done by assaying the titer of ZP-binding antibodies in a sample of, for example, blood, serum, urine, saliva, teardrop, etc. Most preferably, an enzyme-linked immunosorbent assay ("ELISA") that is capable of detecting antibodies to the ZP immunogen or its equivalent may be used for this purpose (Drell, et al., *Biol. Reprod.* 30:445 (1984); *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays* (Kemeny, D. M. et al., Eds.), John Wiley & Sons, N.Y. (1988), Incorporated by reference herein).

As will be understood from the well-known principles of immunoassays, alternative formats, such as immunometric assays (also known as a "two-site" or "sandwich" assays), including both "forward," "simultaneous" and "reverse" assays may be employed (Fackrell, J. *Clin. Immunoassay* 8:213-219 (1985); Yolken, R. H., *Rev. Infect. Dis.* 4:35 (1982); Collins, W. P., In: *Alternative Immunoassays*. John Wiley & Sons, N.Y. (1985); Ngo, T. T. et al., In: *Enzyme Mediated Immunoassay*, Plenum Press, N.Y. (1985)).

For example, in a "forward" assay, ZP antigens are bound to a solid support (such as a microtiter plate, test tube, dipstick, etc.), and then first contacted with the sample being evaluated for the presence of anti-ZP antibody under conditions that permit the formation of a binary solid phase ZP-antibody complex. After incubation and washing, the support is placed in contact with a quantity of labeled ZP antigen (which functions as a "reporter molecule"). After a second incubation period to permit the labeled ZP antigen to complex with the immobilized ZP through

WO 02/083072

PCT/US02/11693

the unlabeled antibody, the solid support is washed a second time to remove the unreacted labeled ZP antigen. This type of forward sandwich assay may be a simple "yes/no" assay to determine whether anti-ZP antibodies are present or may be made quantitative by comparing the amount of retained labeled ZP antigen with that obtained for a standard containing known quantities of anti-ZP antibody. "Two-site" or "sandwich" assays are described by Wide, In: Radioimmune Assay Method, (Kirkham et al., Ed.), E. & S. Livingstone, Edinburgh, pp. 199-206 (1970), herein incorporated by reference).

In a preferred embodiment, the forward ELISA assay may be used to measure a mucosal immune response. The assay is conducted as described above, with the modification that following incubation with the sample being evaluated for mucosal immunoglobulins, the support is placed in contact with labeled anti-IgA antibodies, which function as reporters of the presence of IgA in the sample obtained from the animal.

In a "simultaneous" assay, a single incubations step is employed in which the bound ZP and the labeled ZP are both added to the sample being tested at the same time. After the incubation is completed, the solid support is washed to remove the residue of fluid sample and uncomplexed labeled antibody. The presence of labeled antibody associated with the solid support is then determined as it would be in a conventional "forward" sandwich assay.

In a "reverse" assay, a solution of labeled ZP is incubated with the sample, and the reaction is then placed in contact with a solid support to which unlabeled ZP has been previously bound. After a second incubation, the solid phase is washed in a conventional fashion to free it from the residue of the sample being tested and the solution of unreacted labeled ZP. The determination of antibody titer is determined as in the "simultaneous" and "forward" assays.

In its most preferred embodiment, the ELISA of the present invention employs a monoclonal antibody. Most preferably, such antibodies are generated, as described above, by immunizing a heterologous animal (such as a mouse, rat, rabbit, etc.) with a ZP antigen, and then harvesting the splenic leukocytes of the animal, and fusing them with a suitable myeloma cell, in the manner described above.

Although the immunoassay has been described with respect to a particular preferred solid support, a variety of alternative solid supports may be employed. Suitable solid supports may be composed, for example, of materials such as glass, paper, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses, or magnetite. The nature of the support can be either soluble to some extent or

WO 02/083072

PCT/US02/11693

insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually a possible structural configuration so long as the ZP molecules are capable of binding to antibody. Thus, the support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as sheet, test strip, etc. Those skilled in the art will note many other suitable carriers for binding monoclonal antibody, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

In a further embodiment, the immune status of an animal to which transgenic plant material of the present invention has been administered may be evaluated by immunohistochemical techniques. Briefly, following administration of transgenic plant material by any of the routes of administration described above, female animals may be sacrificed and the ovaries removed. As fertilization occurs in the fallopian tube following release of the ovum from the ovary, it is preferred that the presence of antibodies against contraceptive proteins of the invention be detected on ovarian ova. Following removal from the animal, the ovaries are frozen and cryosectioned. Sections are fixed in a fixative known in the art including, but not limited to formaldehyde, acetone, paraformaldehyde, and glutaraldehyde. Sections are subsequently washed and incubated with antibodies which bind to the antibodies raised by the animal in response to the contraceptive protein. The sections are further incubated with a secondary antibody comprising a reporter molecule (e.g., a fluorescent dye), and examined under a microscope. Identification of antibodies directed against the contraceptive protein expressed by the administered transgenic plant is indicative of an immune response having been raised by the animal against the contraceptive protein. For example, if transgenic plant material of the present invention is administered to a mouse, a mucosal immune response to the contraceptive protein expressed by the plant may be measured by obtaining tissue sections of the mouse ovary, and treating the tissue with antibodies directed against the kappa chain of the mouse immunoglobulin. The anti-murine kappa chain antibody localization may be visualized by treating the tissue with a secondary antibody conjugated to a reporter, such as a fluorescent dye. The tissue may then be examined under a microscope to visually localize the labeled antibodies, and the image of the antibody labeling quantitated using a morphometric computer software known to those of skill in the art, such as NIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The quantitative data is then compared statistically to similar antibody labeling data obtained from a mouse that has not been treated with a contraceptive protein of the invention. A statistically significant difference between the animals is indicative of immunization of the mouse with the contraceptive protein, wherein the P value for the statistical test is at least <0.1 , <0.05 , <0.01 , <0.005 , 0.001 , 0.0005 , and preferably <0.0001 .

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Determining Contraceptive Effect

In the most preferred embodiment, the contraceptive effect of the administered contraceptive proteins of the present invention is determined by evaluating the number of offspring produced per breeding cycle by a female animal to which was administered transgenic plant material according to the methods of the present invention. For example, following 5 to 6 weeks of administration of transgenic plant material to, for example, a mouse, individual female mice are placed in cages with a male mouse. Male mice are then removed after between 10 and 20 days. Female mice are then observed daily for birth of pups. The contraceptive effect of the administered contraceptive protein is determined by the reduction in litter size following administration. For example, for animal species which produce average litters of 3 offspring or more (e.g., mice), the contraceptive protein can be considered effective if there is a reduction in litter size by 10% to 100%, 30% to 90%, or 60% to 80%. For animal species which produce average litters of 1 or 2 offspring (e.g., white tailed deer) a contraceptive protein is considered effective if there is a reduction in litter size by at least 50%, preferably 100%.

Alternatively, the effectiveness of the contraceptive proteins of the present invention may be determined by measuring the levels of antibodies against the contraceptive protein in the blood, serum, mucosal secretions, excrement, etc., as described above. The effectiveness of the contraceptive proteins may also be evaluated by visualizing antibodies against the contraceptive protein bound to the ovum by immunohistochemical techniques as described above. However, to accurately determine the effectiveness of a contraceptive protein according to the invention, the measurement or visualization of antibodies against the contraceptive protein must be evaluated in conjunction with an observed reduction in litter size. For example, a contraceptive protein may be considered not effective regardless of the detection of antibodies against the protein in an animal's serum if there is no reduction in fecundity.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

EXAMPLES

Example 1. Fusion of a plant-optimized mouse ZP3 epitope to a plant-optimized synthetic LT-B gene

An EcoRV and KpnI fragment from TH210 (Mason et al., (1998) *Vaccine* 16: 1336) containing a synthetic LTB sequence was inserted into the corresponding sites of pBluescript (Stratagene, La Jola, CA, USA) to make pBlueLTB. The plasmid pLTB-L was created by using a unique BbsI site to fuse the coding region of a 6 amino acid linker (translational) to the 3' end of the LTB coding region within pBlueLTB. The linker was constructed using two commercially synthesized oligomers 5' AAC TCT GAT CCA CAT GTT CCT (SEQ ID NO: 1) and 5' AGT TAG GAA CAT GTG GAT CAG (SEQ ID NO: 2) that had been purified by electrophoresis on a denaturing polyacrylamide gel. The oligomers were phosphorylated with T4 kinase in separate reactions, mixed in equimolar amounts and annealed by heating to 90°C for 5 minutes before being gradually cooled to 23°C over an hour. The plasmid pLTB-L was prepared for insertion of the mouse ZP3 epitope by serial digestion with BbsI and KpnI and dephosphorylation with calf intestinal phosphatase (CIP).

The coding sequence of the mouse ZP3 (336-342) epitope was analyzed for its codon usage compared with plant genes (Wada et al., 1990 *Nucleic Acid Research* 18: 2367). A plant-optimized epitope was designed maintaining the amino acid sequence of the native epitope with additional nucleotides at the 5' and 3' ends that, upon assembly of the oligos, make a BbsI and KpnI compatible fragment. The oligonucleotides MZepA 5' AAC TTC CAA ATT CAT GGA CCA AGA AAC TAA GTC TTC GGT AC (SEQ ID NO: 3) and MzepB 5' CGA AGA CTT AGT TTC TTG GTC CAT GAA TTT GGA (SEQ ID NO: 4) were synthesized and purified by electrophoresis on a denaturing polyacrylamide gel. The epitope was assembled as previously described in the construction of pLTB-L. The epitope was placed on ice before ligation into a BbsI, KpnI fragment pLTB-L making pLTB7. The plasmids pLTB-L and pLTB7 were sequenced by the dideoxy chain termination method. The authors obtained an NcoI and KpnI fragment of pLTB7 and inserted it into pIBT210 (Haq et al., 1995 *Science* 268: 714) digested with NcoI and KpnI to make pAW7. The expression cassette was purified from pAW7 after digestion with HindIII and EcoRI and ligated with pGPTV.kan (Becker et al., *Plant Molecular Biology* 20: 1195) digested with HindIII and EcoRI to give pAWBin7.

Example 2. Tomato Transformation

WO 02/083072

PCT/US02/11693

pAWBin7 prepared from cultures of *E. coli* DH5 α was electroporated into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (variety Tanksley TA234TM2R) was performed as per Frary and Earle (Frary and Earle, 1996 *Plant Cell Reports* 16: 235) except seeds were sterilized by soaking in 70% ethanol for two minutes before rinsing in sterile water and washing in a mixture of 10% domestos and 1% Tween-20 for two hours. The seeds were rinsed three times in sterile distilled water before plating on half strength Murashige and Skoog medium (half strength MS salts (Murashige and Skoog, 1962 *Physiologia Plantarum* 15: 473), 50 mg/l myo-inositol, 2 mg/l thiamine HCl, 0.5 mg/l pyridoxine HCl, 0.5 mg/l nicotinic acid, 10 g/l sucrose and 8 g/l difco bacto agar, pH 5.8). Plantlets were regenerated on medium containing kanamycin at 300 mg/l. Individual lines were screened by ganglioside-dependent ELISA for LTB expression in leaves and fruit. The lines with best fruit expression were self-pollinated and the resulting seeds germinated on MS medium supplemented with 300 mg/l kanamycin. Surviving seedlings were transferred to soil and the glasshouse and self-pollinated. Fruit from each T1 plant were freeze-dried, powdered, pooled, and stored in a dry environment.

Example 3. Protein Extraction and ELISA

Leaf samples and fresh fruit from greenhouse grown plants or dried fruit samples were homogenized in 2 (fresh samples) or 50 (dried fruit) ml/l (respectively) of ice cold extraction buffer (50 mM sodium phosphate, pH 6.6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF) in a Bio 101 Fast prep machine. Insoluble materials were pelleted by centrifugation at 14 000 rpm in an Eppendorf 5415C microcentrifuge at 4°C for 5 minutes. The supernatant was kept on ice during analysis and stored at -80°C. Total protein concentration of the plant samples was determined using Coomassie dye binding assay (Bio Rad), using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Ganglioside-dependent ELISA was performed on two samples of 1 in 100 dilutions of each extract as described (Haq et al., *supra*) (Figure 1 a, b,c).

Example 4. Fusion protein purification and detection

Dried fruit samples from T1 plants expressing over 8 μ g LTB per gram dry weight were pooled. An extract from the dried samples was made as previously described except the material was homogenized in 20 ml/g ice cold extraction buffer. The resulting supernatant was incubated with PBS equilibrated sephadex on a platform rocker at 4°C overnight. The sephadex solution was allowed to settle and a 1 ml sample collected and stored at 4°C. The volume of the sephadex solution was reduced using a sintered glass funnel and flushed with 60 ml ice cold PBS. A

WO 02/083072

PCT/US02/11693

sephadex slurry was made with 5 ml PBS and the air removed via a vacuum dessicator before being poured into a Bio Rad X column. The column was washed with 50 ml PBS with 1 ml samples collected from the first and fifth milliliter run through. The fusion protein was eluted using 0.2 M D-(-)-galactose in PBS and stored at 4°C. Samples were later analyzed using SDS-PAGE and comassie blue staining. A band corresponding to the fusion protein was detected on SDS-PAGE gel. The presence of the fusion protein was also confirmed by ELISA as described in Example 3.

Example 5. Isolation of Genomic Nucleic Acid

Genomic nucleic acid was isolated from young leaf tissue of T1 plants by grinding 200-250 mg of material in a 1.5 ml microcentrifuge tube using liquid nitrogen and a nail. The powder was resuspended in 500 µl of extraction buffer (420 g/l urea, 312.5 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1% sarcosine) and incubated for 30 minutes with 500 µl of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) on a sample rotator. The resulting slurry was centrifuged for 15 minutes at 14 000 rpm, 4°C. The upper aqueous phase was collected and RNA precipitated through addition of equal volume of 4 M LiCl and incubation at -20°C for at least 8 hours. Samples were centrifuged at 15000 rpm for 15 minutes at 4°C and the supernatant removed to separate tubes. The RNA pellet was resuspended in 50 µl RNase free sterile water. Genomic DNA was precipitated from the saved supernatant through addition of 10% volume 7.5 M ammonium acetate, 1 volume ice-cold isopropanol and incubation at -20°C for at least 8 hours. The DNA was washed with 70% ice cold ethanol, allowed to air dry for 5 minutes and resuspended in 50 µl sterile water + RNase (50 µg/ml).

Example 6. Southern Analysis

Southern blot analysis was performed to confirm the chromosomal integration of the fusion DNA.

Samples containing 15 µg DNA, were digested with 3.4 units of HindIII per µg DNA in an overnight reaction at 37°C. Digested samples were run overnight in a 1% TAE agarose gel. The gel was depurinated (0.25 M HCl) and transferred to zeta probe membrane (Bio Rad) following the manufacturer's recommendations for alkaline transfer. The DNA was fixed by UV cross-linkage.

A PCR labeled probe was made using the primer set, TEV (5'-GCA TTC TAC TTC TAT TGC AGC) (SEQ ID NO: 5) and VSP (5'-GTG CAT ATC AGC ATA C) (SEQ ID NO: 6) on a pAW7 template. DIG labeled dCTP was incorporated into the 588 bp amplicon as per

WO 02/083072

PCT/US02/11693

manufacturer's instructions (PCR DIG Probe Synthesis kit, Boehringer Mannheim). The amplifications were performed over 32 cycles using a Hybaid PCR Express Thermo-Cycler. The template was initially melted at 94°C for 4 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 15 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 90 seconds. A final extension step was performed at 72°C for 5 minutes before soaking at 4°C.

Hybridization bottles and 10 ml DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim) per membrane were pre-warmed to 45°C in a hybridization oven. Membranes were pre-hybridized for at least 90 minutes and hybridized overnight with a probe concentration of 5 µl/ml DIG Easy Hyb. Post hybridization washes and detection were performed as per manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim – DIG wash and block buffer set and DIG Luminescent Detection Kit). Labeled membranes were visualized after exposure to film. The integration of fusion DNA into plant host chromosome was confirmed.

Example 7. Northern Analysis

Northern blot analysis was used to confirm the expression of the fusion protein at mRNA level.

Northern analysis was performed as described in Molecular Cloning [Sambrook et al. *supra*]. Briefly, genomic RNA samples were denatured with formaldehyde / formamide and run for two hours in a 1% agarose, MOPS-acetate-EDTA gel. RNA was then transferred to zeta probe membrane (Bio Rad) by upward capillary action and fixed by UV cross-linkage. Membrane hybridization and detection were performed as with Southern analysis except hybridization steps were performed at 42°C. The presence of fusion protein mRNA was confirmed.

Example 8. Mouse feeding and sample collection

The efficacy of contraception effect of transgenic plant was tested in vivo using laboratory mice.

Mice were housed as male / female pairs while mice were caged three females to one male. The number of pups per female was noted throughout the experiment.

Freeze-dried, powdered fruit from tomato plants expressing over 8 µg LTB per gram of dry mass were pooled and mixed. For each feeding, the tomato powder was mixed 1:2 (weight per volume) with apple cider. Feedings were performed at fortnightly intervals for 12 weeks

WO 02/083072

PCT/US02/11693

(days 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84, 87). Animals were divided into 3 groups, 4 – 6 received 4 g of wild-type tomato plus apple cider; 4 – 5 received 4 g of transgenic tomato plus apple cider; 4 – 5 received 4 g of transgenic tomato plus apple cider plus 10 mg of Quillaja extract powder (Garuda). Starting at day 31, female mice were subjected to a fasting protocol in which at noon, they were removed to individual cages with water and bedding only. The test diet was given at 4pm and left overnight. At 8 am the following morning, females were returned to their regular cage.

On days 0 and 70, serum samples from tail bleeds were collected from each female and stored at -80°C for future antibody analysis. Final serum samples were collected on day 96 through cardiac puncture and stored as previously described. Fecal samples were collected on days 70 and 87 and frozen overnight at -80°C . The frozen pellet samples were lyophilized, resuspended in 0.8 ml phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS), centrifuged at 14 000 rpm for 5 minutes, and the supernatant stored at -20°C until assayed.

Example 9. ELISAs for anti-LTB and anti-ZP3 epitope antibodies and fertility of experimental mice

Samples were assayed for anti-LTB and anti-ZP3 epitope IgG in serum and anti-LTB and anti-ZP3 epitope IgA in faecal pellets as described (Dickenson and Clements, 1995 *Infect. Immun.* 63: 1617). The results are shown in Figure 2 a and 2 b. Samples were serially diluted in PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST). For detection of anti-LTB antibodies, microtitre plates were coated with mixed gangliosides (Type III), Sigma, St Louis, MO, USA, blocked with 0.25% BSA and incubated with purified recombinant LTb for one hour. For detection of anti-ZP3 epitope, microtitre plates were coated with recombinant epitope conjugated to BSA and blocked with 0.25% BSA. Serum anti-LTB or anti-ZP3 epitope was detected using rabbit antiserum against mouse or vole IgG and deer anti-rabbit antiserum conjugated with alkaline phosphatase (Sigma). Levels of fecal anti-LTB and anti-ZP3 epitope antibodies were determined with goat antiserum against mouse or vole immunoglobulins and rabbit anti-goat antiserum conjugated to alkaline phosphatase.

The effect of oral delivery of tested material were examined by comparing the number and size of litters from control and experimental group (Figure 3). Six mice were used for each group. The experimental groups of mice were fed with transgenic tomato paste. The effect of the test material on a non-target species (Voles) was also examined (Figure 4).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Example 10. Production of Contraceptive Tobacco Suspension Cultures

The coding regions for a mouse ZP3 epitope, a possum ZP3 epitope and a general GnRH epitope were fused to LTB (constructs described below, Figure 5 a, b, c). The mouse and possum epitopes were individually fused to LTB so that they would be translated off the carboxyl terminus of LTB. Three fusions were made with the GnRH epitope. The GnRH epitope was fused to LTB so that it would be translated off the amino terminus, the carboxyl terminus or within the LTB monomer in a position predicted to sit on the exterior of an LTB pentamer. The coding region of these fusion proteins were then placed into the plant expression cassette of pIBT210.1 and inserted into the binary vector pGPTV.kan for *Agrobacterium*-mediated transformation. NT1 cells (tobacco cell suspension) were transformed with the mouse ZP3-LTB fusion, possum ZP3-LTB fusion, the GnRH carboxyl fusion and the GnRH internal fusion.

LTB specific and GnRH specific ELISA analysis of the mouse and GnRH fusion transformants was performed (Figure 6). Detection was confirmed for the carboxyl terminus fusion and LTB levels were low for the internal fusion. We concluded that the internal fusion was interfering with pentamer formation and hence detection. Although expression was low, the GnRH epitope could be expressed by plant cells.

Example 11. Production of Transgenic Carrot

All transformations are using the carrot cultivar Nanco (*Daucus carota* L. cv. Nanco). Nanco was one of 3 cultivars examined by Gilbert et al in 1996 (references below), and was identified as superior for frequency of transformation and speed of regeneration. The seed was obtained from a commercial seed supplier in Hemel Hempstead, England, and imported to the Boyce Thompson Institute for Plant Research (BTI). All seed were surface sterilised with bleach for 20 minutes, followed by 70% Ethanol for 20 minutes, prior to germination. A materials contaminated with additional bacterial or fungal infection during the germination, transformation or regeneration stages were destroyed. Carrot hypocotyls were excised 7-15 days following aseptic germination. Explants were transferred to liquid growth media, and co-cultivated with *Agrobacterium* strain EHA105 (containing the appropriate expression vectors, as described below) for 36-48 hours at room temperature, in darkness and under slow shaking conditions. Explants were then transferred to solid growth media, which contained additional plant auxin 2,4-D (to stimulate embryogenic callus production), the antibiotic Timentin (to cure all remaining traces of *Agrobacterium*), and stored in darkness at room temperature.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

After five (5) weeks, the explants had developed significant callus and were transferred to freshly prepared solid growth media containing Kanamycin to induce selective pressure against non-transformed cells. All tissues remained at room temperature and stored in darkness. After an additional 5 weeks, healthy callus was transferred to fresh solid media in the absence of 2,4-D and placed in well-lit conditions to induce plantlet regeneration. In addition, some callus was transferred to fresh media (containing 2,4-D) and returned to darkness to stimulate further callus production for regeneration at a later stage. All tissues which did not grow appropriately on Kanamycin selection (assumed non-transgenic), or showed signs of bacterial or fungal contamination were destroyed.

After approximately 10-14 weeks on regenerative/selective media, with ample lighting, carrot plantlets with initial roots and shoots could be transferred to controlled greenhouse growth conditions. Harvest of transgenic root materials was conducted 8-10 weeks after planting.

Example 12. Production of Transgenic Carrot Suspension Cultures

2-5grams of healthy carrot callus selected from Kanamycin media (described above) was placed into 50 mls of liquid growth media. The standard liquid media contained 400ml water, 400uL Murashige & Skoog Vitamins, 1.7g Murashige & Skoog Salts, 12g sucrose, and was sterilized by autoclaving prior to adding final concentrations of 2,4-D (2.2mg/L) and the antibiotic Timentin to control microbial contamination (300mg/L). The mixture was then placed on an orbital shaker at ambient temperature, to shake at 100-120 rpm. The callus gradually broke apart into smaller individual cells or cell clumps. Every 7-10 days, 5ml of suspension culture was added to 45mls of fresh liquid growth media, to maintain healthy growth of cells.

Example 13. Production of Powdered Carrot Cells

After 7-10 days growth, liquid suspension cultures were filtered onto filter paper, and frozen at -80°C for a minimum of 24 hours. Materials collected and frozen over a period of several weeks, were placed into lyophilization tubes, and attached to freeze drying apparatus for a minimum of 48 hours. Resultant material was weighed, crushed by hand, and stored at -20 °C in air-tight plastic bags in aliquots of approximately 350g. The powdered material was highly anhydrous, such that it would stick to human skin upon contact. The powdered material had been reduced to less than 10% of fresh harvest weight. Samples of the powdered material were assayed by ELISA and PCR specific for the construct in use. Measurable antigen content was found to be within the range of 50-100ug per gram dry weight, an approximate 10-15 fold increase in the detectable antigen concentration.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Example 14. Specific Constructs:

pTH110 This construct encodes for the expression of the B subunit from the *E. coli* heat labile enterotoxin (LT-B). This construct has previously been expressed in potatoes for oral delivery to mice (Mason et.al., *supra*) and for human clinical trial in humans (Tacket et.al. 1998 *Nature Med.* 4: 607). This construct was expressed in potatoes, which were the subject of MAF Import Permit number 1999007035, and the subsequent oral delivery to possums at Landcare Research facilities in Lincoln, NZ. Carrots expressing LT-B will be used as negative control materials for immunological and fertility trials of contraceptive materials specified below.

The LT-B molecule forms a pentamer in native form (and in plant cells), providing a binding affinity for epithelial cells which line the mucosal surfaces of reproductive, respiratory and digestive tracts. This affinity has provided a strategy for targeting delivery of smaller proteins such as contraceptive epitopes. Many of the following constructs encode genetic fusions between LT-B and immunocontraceptive peptides. Analysis of leaf and root materials by ELISA has shown that the resultant molecule is a pentamer, with co-display of the candidate peptides.

pGPTV - MuZP3 In contrast to pTH110, this construct has an additional sequence inserted at the carboxyl terminus of the LT-B gene, prior to the VSP terminator. The additional sequence includes a linker peptide (Asn-Ser-Asp-Pro-His-Val-Pro) (SEQ ID NO: 7) and the minimal B-cell epitope, amino acid residues 335-342 (Asn-Phe-Gln-Ile-His-Gly-Pro-Arg) (SEQ ID NO:8), from the murine zona pellucida glycoprotein 3 (MuZP3).

pGPTV - GNRH1 In contrast to pGPTV-MuZP3, this construct has sequence encoding the decapeptide for porcine gonadotrophin releasing hormone (GnRH), in place of the MuZP3 epitope. The linker is conserved. The sequence for this decapeptide (Gln-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly) (SEQ ID NO: 9) is common to most mammals.

pGPTV - GNRH3 In contrast to pTH110, this construct has the GnRH decapeptide fused (via a linker) to the amino-terminus of the LT-B gene. A signal peptide is contained within the LT-B gene, and is cleaved during post-translational processing to leave the mature monomeric protein. This cleavage occurs between Tyrosine and Glycine (residues 20 & 21). The GnRH epitope has been inserted immediately following the Glycine residue. A short linker (Tyr-Ala-His-Gly) (SEQ ID NO: 10) is used to link the GnRH epitope to the amino-terminus of LT-B, maintaining the Glycine-Alanine starting sequence of the mature protein.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

pGPTV - pAW6 In contrast to pGPTV-GnRH1, this construct has sequence encoding a predicted B-cell epitope from Australian Brushtail Possum zona pellucida glycoprotein 3 (PossZP3), in place of the GnRH decapeptide. The epitope consists of 27 amino acids (334-361 from native sequence) and the linker is conserved.

pGPTV - pAW4 In contrast to pTH110, the LT-B gene has been replaced by the full-length gene encoding for Brushtail Possum ZP3.

pGPTV - pAW4-A2 In contrast to pGPTV-pAW4, this construct contains a truncated version of the PossZP3, where a putative cleavage peptide has been removed. Additional sequence has been inserted at the carboxyl terminus of the Brushtail Possum ZP3 gene, which encodes for a short linker (Gly-Pro-Gly-Pro) (SEQ ID NO: 11) and the A2 region from the *E. coli* heat labile enterotoxin subunit A (LT-A). Colonisation by enterotoxigenic *E. coli* results in the secretion of LT-A and LT-B. In their native state (and also in plant cells), they bind to each other to form a stable holotoxin. Whilst LT-B targets the molecule to epithelial linings, it is the toxic A subunit which causes ADP-ribosylation and subsequently diarrhoea. The LT-A subunit consists of two regions, A1 and A2. The region designated as A2 forms an alpha helix which extends from the A1 region downwards into the pentamer formed by LT-B, and forms the bond between the two subunits. The A1 protein is then anchored above the pentamer. In the case of pGPTV-pAW4-A2, when the plant cells are co-transformed with pTH110 (or the derivatives listed above) the A2 helix provides the anchor between the PossZP3 protein and an LT-B pentamer.

Example 15. Mouse contraception experiment with carrot samples

Transgenic carrots comprising one of the constructs in Example 14 were produced as described in Example 11 and processed as in Example 12 and 13. Mice were housed as male / female pairs while mice were caged three females to one male. The number of pups per female was noted throughout the experiment.

Powdered carrot expressing over 50 µg LTB per gram of dry mass were pooled and mixed. For each feeding, the carrot powder was mixed 1:2 (weight per volume) with apple cider. Feedings were performed at fortnightly intervals for 12 weeks (days 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84, 87). Animals were divided into 3 groups, 4 – 6 received 4 g of wild-type carrot plus apple cider; 4 – 5 received 4 g of transgenic carrot plus apple cider; 4 – 5 received 4 g of transgenic tomato plus apple cider plus 10 mg of Quillaja extract powder (Garuda).

Starting at day 31, female mice were subjected to a fasting protocol in which at noon, they were removed to individual cages with water and bedding only. The test diet was given at

WO 02/083072

PCT/US02/11693

4pm and left overnight. At 8 am the following morning, females were returned to their regular cage.

On days 0 and 70, serum samples from tail bleeds were collected from each female and stored at -80°C for future antibody analysis. Final serum samples were collected on day 96 through cardiac puncture and stored as previously described. Fecal samples were collected on days 70 and 87 and frozen overnight at -80°C . The frozen pellet samples were lyophilized, resuspended in 0.8 ml phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS), centrifuged at 14 000 rpm for 5 minutes, and the supernatant stored at -20°C until assayed.

Example 16. Feeding mice with fresh plant materials

Fresh plants were also used to feed the experimental mice. Both tomato and carrot plant leaves or fresh tomato and carrot were used.

Fresh leaves or tomato and carrot corresponding to their dry powder form expressing over 50 μg LTB per gram of dry mass were pooled and mixed. In some cases, the fresh materials were chopped into small pieces. Feedings were performed at fortnightly intervals for 12 weeks (days 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84, 87). Animals were divided into 3 groups, 4 – 6 received 4 g of wild-type tomato or carrot; 4 – 5 received 4 g of transgenic tomato or carrot; 4 – 5 received 4 g of transgenic tomato plus apple cider plus 10 mg of Quillaja extract powder (Garuda).

Starting at day 31, female mice were subjected to a fasting protocol in which at noon, they were removed to individual cages with water and bedding only. The test diet was given at 4pm and left overnight. At 8 am the following morning, females were returned to their regular cage.

On days 0 and 70, serum samples from tail bleeds were collected from each female and stored at -80°C for future antibody analysis. Final serum samples were collected on day 96 through cardiac puncture and stored as previously described. Fecal samples were collected on days 70 and 87 and frozen overnight at -80°C . The frozen pellet samples were lyophilized, resuspended in 0.8 ml phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS), centrifuged at 14 000 rpm for 5 minutes, and the supernatant stored at -20°C until assayed.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Example 17. Reduction of antigen concentration variance in powder homogenates

The application of plant-derived vaccines is dependent on the ability to provide a consistent dose, and achievement of clinical data to support the minimal and maximal doses to be applied. Batch manufacturing and QC assurance can only be validated if the vaccine material provides consistent antigen concentration within an acceptable range. In three recent human clinical trials (Tacket et.al 1998, Tacket et.al 2000, Thanavala et.al., personal communication), human volunteers were fed raw, cubed, transgenic potato materials, expressing antigenic proteins of interest. The experimental doses in each of those trials were shown to vary by as much as 300%, as shown by assay results on randomized samples of consumed materials. Similar potato materials reduced to dehydrated powder by the method described herein resulted in equivalent in-vitro immunogenic reactivity (by appropriate assay detection) with up to a 10-fold reduction in variance across randomized samples. This result was duplicated in processed transgenic tomato material expressing the same antigen (HBsAg), and several other model plant species and antigens, as shown in Table 1.

In the examples, homogenization was achieved by either of two methods. The first method was applied prior to freeze drying and involves the crude pulping and mixing of freshly harvested plant materials, followed by freezing and subsequent freeze-drying of the blended materials. The first process of slicing, blending or grinding, reduced raw plant tissues (fruit, tubers, leaf, seed, etc) to a pulp mixture. This mixture was assumed to contain both intact plant cells and ground cell debris. The advantage of this process is the reduction of larger plant organs, such as fruit or tubers, to a manageable mixture whereby variance in homologous protein content between tissues is combined into a more uniform batch of material. The ability to provide a uniformed batch without fully disrupting all plant cell integrity provides the stable environment for homologous protein storage during the subsequent processing stages. The second method of homogenization required minimal processing to the plant materials prior to processing. Freeze-drying of sliced, quartered or intact materials was conducted as described above. The resultant materials were then hand-crushed to a fine powder, combined into a single batch container, and mixed thoroughly by mechanical means such as shaking or dry blending.

The removal of any pureeing step decreased labor intensity required for the overall process. The effect of pre-drying treatment (pureed, peeled, quartered, or sliced) was evaluated for its effect on overall drying time for potato. As displayed in **Figure 7**, reduction to full freeze dried state was limited only if potato materials were not peeled or cut in some manner (quartered, diced, sliced or pureed).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Example 18. Potato tuber samples can be concentrated by up to 11 fold as a measure of dry weight versus wet weight by dehydration with minimized loss of transgenic protein using a non-pureeing protocol.

Previous feeding trials have utilized relatively large amounts of material to deliver sufficient doses of the desired antigen. For example, the three human clinical trials referenced above required volunteers to consume a range of 100g to 150g of raw potato at each session, taking some volunteers more than 30mins to consume a single dose. Oral administration of 100g or more of raw material is unlikely to be well accepted by vaccine administrators, or tolerated by vaccines on a broader scale. A major advantage of the process described herein, is the concentration of protein, which is achieved. As shown in Table 2, the material mass was reduced by as much as 94% (11% final weight for potato, 6% final weight for tomato). In comparison to the clinical trials reference above, such reduction in mass would theoretically provide an equivalent dose by consuming just 6 grams of powder, assuming no significant loss of antigen by processing. Additionally the physical qualities of this powdered material are convenient to allow formulation for oral intake by more popular methods, such as consuming several tablespoons of a paste or drink concoction.

The data described thus far provides examples for several antigens and across several plant species and tissues. Removal of more than 90% of the moisture, concentrated the plant samples by up to 11-fold as a measure of dry weight versus wet weight. However, despite the 11-fold reduction in material mass the antigen concentration was generally a 4-8-fold increase depending on the plant species evaluated, indicating significant loss of antigen (or at least a reduction in detection of antigen) as a result of the process. The examples used generally involved the puree of raw materials, addition of any excipients (antioxidants, stabilizers, adjuvants etc), followed by freezing, then freeze-drying, and reduction of the resultant material to a fine powder. As summarized in Table 2 the non-puree protocol described above was shown capable of achieving a material of equivalent characteristics whilst minimizing the loss of antigen in several plant species.

The practical outcome of this procedure is that formulation and oral dosing can be achieved with a significantly lower dose volume, with parallel increase in antigen concentration. Additionally, this method provides a convenient mechanism for stabilizing vaccines or therapeutics from a wider range of plant tissues such as leaf or stem materials which would not otherwise be amenable to homogenization by wet blending without significant disruption to cellular structure and the transgenic proteins of interest.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Example 19. Ambient stability of homogenate formulations and the effect of excipients on antigen recovery and stability.

Previous studies dependant on extraction of plant-derived pharmaceuticals have evaluated the stability of the target proteins in crude plant extracts. Extraction of a model antibody produced in Alfalfa showed stability up to 2 hours in water extracts and up to 12 weeks in dried alfalfa (Khoudi et.al., 1999). For plant-derived therapeutics to gain most value, particularly as oral vaccine strategies, stability of the antigen in some non-perishable food form would need to extend to at least 6 months, and preferably 2-3 years.

Several formulations expressing model antigens of interest were evaluated for ambient stability of the desired protein at regular periods up to 12 months. As shown in Figure 9, the majority of materials suffered no significant degradation of antigen at ambient storage, or at lower temperatures. This indicates that efficient non-heat dehydration is an effective means of providing a protective state for antigens which are dried alongside plant material or remain encapsulated within plant cells and partly disrupted cell debris. Further examination should be completed, to determine whether the presence of plant enzymes or structural proteins, are sufficient to impart this protection in formulations where antigens are spiked into a non-transgenic homogenate.

Several excipients were added to these model formulations, for both immunogenic evaluation and to investigate their effect on plant material processing, antigen recovery, and antigen stability. Previous reports (Leopold, 1998) concluded that simple vitrified sugars were capable of stabilizing plant enzymes by protecting against natural protein denaturation. Food grade sucrose was added to transgenic tomato homogenate at the time of pureeing to evaluate its effect on the stability of an antigen encapsulated in plant material. In addition to sugars, experimental adjuvants were added to potato or tomato materials in liquid phase (post-puree) for clinical evaluation, and Ascorbic Acid (Aldrich) was added to some samples to evaluate the potential for antioxidants to minimize antigen loss in pureed potato. The effects of these excipients on antigen recovery and stability were inconsistent, although not severe in any single case. The addition of sucrose did significantly increase the drying time required to reach an adequately dehydrated product. The addition of Ascorbic Acid was required at concentrations not less than 1:150 (by mass) to effectively block visible oxidation (browning) of pureed potato, however this concentration had no consistent effect on recoverable antigen levels within the samples tested.

In general, all freeze dried materials displayed stability of the antigen at ambient temperatures for at least 6 months and in some cases up to 12 months. Whilst freeze-drying was the principal method of dehydration in these examples, crudely pulped materials could

WO 02/083072

PCT/US02/11693

alternatively be stabilized by air-drying, or spray drying prior to storage. Ideally, by whatever drying method, the final material is dehydrated sufficiently to remove at least 90% of all water content by weight, and stored in airtight bags or containers. Once sealed, the homologous powder can be stored at room temperature for significant periods without any significant decrease in measurable levels of the target protein.

Example 20. Animals fed dried immunocontraceptive transgenic tomato showed reduction in litter size compared to control animals.

Within this study an orally delivered, plant-derived, LTB-mouse ZP3 epitope fusion protein co-administered with a saponin adjuvant displayed species-specificity and reduced mice fertility by 45.3%

The transgenic tomato fruit used in this study expressed LTB fused to an epitope from the mouse ZP3 gene as described by Millar et al. Three test diets were used: wild-type tomato (control), transgenic tomato (transgenic), and transgenic tomato with Quillaja extract (transgenic + adjuvant). Freeze-dried, powdered, tomato fruit was mixed 1:2 (by weight) with pasteurized apple cider (Cornell Orchards). The concentration of LTB within tomato fruit was taken as an approximation as to the concentration of fusion protein. Tomato fruit expressing over 8 g LTB per gram of dry mass were used in the test diet for the two transgenic groups. After pooling the transgenic fruit the calculated average LTB or fusion protein was 37.8 g.g-1. We also added 10 mg of Quillaja extract powder (Garuda) per 4 g of feed for the trans+quill group. At each feeding, the female was offered 4 g of the test-feed in a petri dish. In treatments consisting of transgenic fruit, this amounted to a total of 100.8 g of the LTB fusion protein per feeding.

Both mice and voles were provided with the test-diet at fortnightly intervals for 12 weeks, on days 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84, and 87.

For Mice, on the first five test diet feedings days (days 0 to 28) the females were taken from their home cages, placed into individual cages containing the test diet and left for four to six hours before being returned to their home cages. Starting at day 31, female mice were subjected to a fasting protocol in which at noon, they were removed to individual cages with water and bedding only. The test feed was given at 4pm and left overnight. At 8 am the following morning, females were returned to their home cage. With both feeding regimen, the final weight of test diet consumed was recorded.

For voles, immediately prior to offering a female the test-feed, the male and any pups were removed from the home cage and transferred to a temporary holding cage to prevent them consuming the test-diet. They were returned after a maximum of one hour to reduce any stress caused by the separation. If the female had not consumed all the tomato mix within this time, the

WO 02/083072

PCT/US02/11693

remaining portion was removed and offered again four hours later, following the same feeding procedure. The final weight consumed was recorded.

The number of litters and pups produced per female was recorded throughout the experiment for both mice and voles.

With the mice, no significant difference was found between the diet treatments with respect to number of litters produced ($\alpha = 0.05$). However there was a 45.3% reduction in litter size from the females fed the control diet (average of 5.3 pups per litter) to the litter size of females fed the transgenic + adjuvant diet (average of 2.9 pups per litter). This proved a significant reduction using a confidence interval of 90% ($\alpha = 0.1$).

With the voles, no significant difference was found between the diet treatments with respect to number of litters produced ($\alpha = 0.05$). There was also no significant difference between diet treatments with respect to litter size using a confidence interval of 95% ($\alpha = 0.05$ and $\alpha = 0.1$).

Example 21. Effect of processing on antigen content

To determine the effect of freeze-drying on mass and antigen content, two fruit from five T₂ plants were weighed and assayed for LTB content before and after processing. Comparison of sample mass before and after freeze-drying revealed the process to decrease the sample to 6% of its original mass (data not shown). ELISA analysis of LTB content of fresh and processed materials displayed the antigen to show a similar 16-fold concentration, suggesting no appreciable loss of antigen by the processing method employed (Figure 10).

Example 22. Oral immunization of mice with plant derived vaccine passively immunize offspring.

Animals

Mice were maintained in cages provisioned with water and standard laboratory food except when fed the test diet. Each treatment contained 5-6 adult females. Mice were partnered in a ratio of either three females to one male or two females to one male per cage. Pups were removed when weaned and kept in single sex cages.

Test Diet

Transgenic tomato lines expressing LTB were grown within approved greenhouse facilities. Harvested tomato fruit was processed into a powdered form and combined as a uniform vaccine batch. This batch was stored at 4°C prior to use. Vaccine formulation was

WO 02/083072

PCT/US02/11693

achieved by mixing transgenic tomato powder with apple cider in a ration of 1:2 (by weight). An adjuvanted formulation was achieved by augmenting the basic vaccine formulation with 10mg of Quillaia extract for every 4g of transgenic powder.

Vaccination Regime

Feedings were performed at fortnightly intervals for 12 weeks (days 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84, 87). Starting at day 31, the females were subjected to a fasting protocol in which they were removed to individual cages with water and bedding only for four hours before adding the test diet. The tomato diet was left overnight with the females and removed at 8 am the following morning at which time females were returned to their regular cage. As described above, the animals received either non-transgenic formulation (n=4), transgenic formulation (n=5) or adjuvanted formulation (n=5).

Serum Sampling

On days 0 and 70, serum samples were collected from each adult female by tail bleed, and stored at -80°C until analysis. Final serum samples were collected on day 96 through cardiac puncture and stored as previously described. After day 42 of the trial, pups born to each experimental group (n= minimum of 13 per group, from 2 or more mothers per group) were maintained in good health for later determination of passive anti-LTB titers. At a minimum age of 21 days serum was collected from these pups by cardiac puncture.

ELISAs for anti-LTB antibodies

Samples were assayed for serum anti-LTB IgG as described [8]. Briefly, samples were serially diluted in PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST). Microtiter plates were coated with mixed gangliosides (Type III), Sigma, St Louis, MO, USA, blocked with 0.25% BSA and incubated with purified recombinant LTB for one hour. The diluted serum was added to the wells and incubated for one hour before washing and detection using rabbit antiserum against mouse IgG and goat anti-rabbit antiserum conjugated with alkaline phosphatase (Sigma). We investigated the relationship between dam and pup titers by comparing the end point dilutions of dams and corresponding litters. The dams' dilution was taken as the end point dilution of the serum sample that was taken closest to the birth date of the pups (either at 70 or 96 days). Only pups that were bled at 21 days of age were used for this analysis. The data set consisted of 7 dams, 9 litters and 41 pups.

Treatment and Litters

Of the pups sampled for LTB titer determination, 18 pups from 4 litters were born to 3 different mothers from the control group; 17 pups from 5 litters were born to 4 different mothers from the transgenic tomato group and 13 pups from 3 litters were born to 2 different mothers from the transgenic tomato plus adjuvant group.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

ELISAs for anti-LTB antibodies

Parent mice within the transgenic tomato or transgenic tomato plus adjuvant diet groups received 14 oral inoculations of tomato averaging 75.6 µg of LTB per inoculation. The number of inoculations the mother had received before birthing the sampled pups varied, however at least 8 feedings of the diet had occurred. All of the mothers receiving transgenic tomato diet generated anti-LTB serum IgG titers significantly higher than the control group by day 70 of the trial (Figure 11, $\alpha = 0.05$). There was no significant difference in titers between the two transgenic material test diets, (transgenic tomato powder with and without the addition of Quillaja extract powder). Of the 18 pups born to mothers in the control group, none possessed an end point dilution larger than 25 (Figure 12). The average end point dilution of the 17 pups born to mothers in the transgenic tomato group was 558.8 whilst the average end point for the 13 pups born to the mothers in the transgenic tomato plus adjuvant groups was 448.1. Whilst no significant difference was found between the average end point dilutions of the pups from transgenic tomato and transgenic tomato plus adjuvant mothers ($\alpha = 0.05$), the average dilution end points of pups from both transgenic diets were significantly higher than the control groups' ($\alpha = 0.05$). A positive, linear relationship was found between dams and their corresponding litters with an r^2 value of 0.9289 (Figure 13).

Example 23. Stability Studies

A number of different transgenic plant materials were processed by means described herein. Materials included transgenic NT-1 cell culture expressing either AIV-HA (HAO NT) or a modified E.coli enterotoxin (SLT102), transgenic potato expressing either AIV-HA, NVCP, HBsAg or E.coli enterotoxin B subunit (LT-B), and transgenic tomato expressing either NVCP or HBsAg. Processed materials were stored under a variety of temperatures for periods beyond 6 months. At regular intervals during that period, randomized samples were evaluated for antigen content (by appropriate assay for the antigen of interest). Figures 14 to 17 describe the detectable antigen levels retained in those materials during the sampling period.

OTHER EMBODIMENTS

Other embodiments will be evident to those of skill in the art. It should be understood that the foregoing detailed description is provided for clarity only and is merely exemplary. The spirit and scope of the present invention are not limited to the above examples, but are encompassed by the following claims. All patents, patent applications, and published references

WO 02/083072

PCT/US02/11693

cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety, including references and tables.

References

- Arakawa T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC, Langridge WH: "A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes"; *Nat Biotechnol* 16: 934-8 (1998).
- Arikawa, J., K. Yoshimatsu, and K. H.: "Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in Japan."; *Jpn. J. Infect. Dis.*, 54, no. 3: 95-102 (2001).
- Bagdasarian MM, Nagai M, Frey J, Bagdasarian M: "Immunogenicity of *Actinobacillus ApxIA* toxin epitopes fused to the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit". *Vaccine* 17: 441-447. (1999).
- Bandivdekar, A.H., V.J. Vernekar, S.B. Moodbidri et al.: "Characterization of 80 kDa human sperm antigen responsible for immunoinfertility." *Am. J. Reprod. Immunol*"; 45, no. 1: 28-34 (2001).
- Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R: "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border." *Plant Molecular Biology*"; 20: 1195-1197 (1992).
- Berger, J., and S.L. Cain: "Reproductive synchrony in brucellosis-exposed bison in the southern Greater Yellowstone Ecosystem and in noninfected populations."; *Conservation Biology*, 13, no. 2: 357-366 (1999).
- Bosshardt, S.C., et al.: "*Brugia pahangi*: circulating antibodies to adult worm antigens in uninfected progeny of homologously infected female jirds"; *Exp Parasitol*, 72(4): p. 440-449 (1991).
- Cardenas L, Clements JD: "Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector"; *Infect Immun* 61: 4629-36 (1993).
- Chavali, S.R. and J.B. Campbell: "Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune responses in mice"; *Immunobiology*, 174(3): p. 347-359 (1987).
- Cousins, D.V.: "*Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock." *Rev. Sci. Tech.*"; 20, no. 1: 71-85 (2001).
- Cox, J.C., and A.R. Coulter: "Adjuvants--a classification and review of their modes of action." *Vaccine*"; 15, no. 3: 248-256 (1997).
- Dalsgaard, K., et al.: "Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease". *Nat Biotechnol*, 15(3): p. 248-52 (1997).
- Dickinson, B.L. and J.D. Clements: "Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity"; *Infect Immun*, 63(5): p. 1617-23 (1995).
- Dunbar, B.S., and S.V. Prasad: "Contraceptive vaccine comprising a glycosylated 55KD zona pellucida protein immunogen and method of use of the same in contraception." United States, 1997.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

- Edelman, R. "An update on vaccine adjuvants in clinical trial"; AIDS Res. Hum. Retroviruses; 8, no. 8: 1409-1411 (1992).
- Fitchen J, Beachy RN, Hein MB: "Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response"; Vaccine 13: 1051-7 (1995).
- Frary A, Earle ED: "An examination of factors affecting the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation of tomato"; Plant Cell Reports 16: 235-240 (1996).
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ: "Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants"; Science 268:714-716 (1995).
- Hiatt AC, Cafferkey R, Bowdish K.: "Production of antibodies in transgenic plants"; Nature 342: 76-78 (1989).
- Hoshi, S., A. Uchino, N. Saito et al.: "Comparison of adjuvants with respect to serum IgG antibody response in orally immunized chickens"; Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 22, no. 1: 63-69 (1999).
- Ingardia, C.J., et al., "Correlation of maternal and fetal hepatitis B antibody titers following maternal vaccination in pregnancy"; Am. J. Perinatology, 16(3): p. 129-132 (1999).
- Kennelly, J.J., and K.A. Converse: "Surgical sterilization: an underutilized research procedure for wildlife damage control"; In Proceeding of symposium: Contraception in wildlife management. Washington, D.C.: USDA/APHIS.
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo J-M, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemieux R, Vezina L-P: "Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. Biotechnology and Bioengineering"; 64(2): 135-143 (1999).
- Koo, M., et al.: "Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope"; Proc Natl Acad Sci U S A, 96(14): p. 7774-9 (1999).
- Kuby, J. "Immunology"; Third ed., ed. Allen, D. New York: W. W. Freeman and Company, 1997.
- Leopold C.: "A sweet way to keep proteins safe"; Science. 281: 179 (1998)
- Ma J.K.-C., Hein M.B. "Plant antibodies for immunotherapy"; Plant Physiol. 109: 341-346 (1995).
- Marciani, D.J., J.B. Press, R.C. Reynolds et al.: "Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity"; Vaccine, 18, no. 27: 3141-3151 (2000).
- Martinez, M.L., and J.D. Harris: "Effectiveness of zona pellucida protein ZPB as an immunocontraceptive antigen"; J. Reprod. Fertil., 120, no. 1: 19-32 (2000).
- Mason H, Lam D, Arntzen CJ: "Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11745-11749 (1992).
- Mason HS, Ball J, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ: "Expression and immunogenicity of Norwalk virus capsid protein from transgenic tobacco and potato"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5335-5340 (1996).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ: "Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene"; *Vaccine* 16: 1336-43 (1998).
- Millar, S.E., S.M. Chamow, A.W. Baur et al.: "Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice"; *Science* 246: 935-938 (1989).
- Miller, L.A., B.E. Johns, and G.J. Killian: "Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine"; *Am. J. Reprod. Immunol.* 44, no. 5: 266-274 (2000).
- Miller, L.A., B.E. Johns, D.J. Elias et al.: "Comparative efficacy of two immunocontraceptive vaccines"; *Vaccine* 15, no. 17-18: 1858-1862 (1997).
- Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, Koprowski H, Yusibov V: "Immunization against rabies with a plant-derived antigen"; *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2481-5 (1998).
- Murashige T, Skoog F: "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures"; *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 (1962).
- O'Dowd AM, Botting CH, Precious B, Shawcross R, Randall RE: "Novel modifications to the C-terminus of LTB that facilitate site-directed chemical coupling of antigens and the development of LTB as a carrier for mucosal vaccines"; *Vaccine* 17: 1442-1453 (1999).
- O'Hern, P.A., Z.G. Liang, C.S. Bamba et al.: "Colinear synthesis of an antigen-specific B-cell epitope with a 'promiscuous' tetanus toxin T-cell epitope: a synthetic peptide immunocontraceptive"; *Vaccine* 15, no. 16: 1761-1766 (1997).
- Pal, R., and O. Singh: "Absence of corpus luteum rescue by chorionic gonadotropin in women immunized with a contraceptive vaccine"; *Fertil. Steril.*, 76 no. 2: 332-336 (2001).
- Pillai D, Dixit A, Alok D, Garg LC: "Translational fusion of heat labile enterotoxin chain B and beta-subunit of human chorionic gonadotropin: periplasmic expression in *Escherichia coli* and its immunogenicity"; *FEBS Lett* 387: 23-6 (1996).
- Richmond, M., and C.H. Conaway: "Management breeding and reproductive performance of the vole, *Microtus ochrogaster*, in a laboratory colony"; *Laboratory Animal Care* 19: 80-87 (1969).
- Richter L, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS: "Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization"; *Nature Biotechnol.* 18:1167-1171(2000).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: "Molecular Cloning - A Laboratory Manual"; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York (1989).
- Schodel F, Will H, Johansson S, Sanchez J, Holmgren J: "Synthesis in *Vibrio cholerae* and secretion of hepatitis B virus antigens fused to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin subunit B"; *Gene* 99: 255-9 (1991).
- Sewani CR, Bagdasarian MM, Ireland JJ, Bagdasarian M: "Display of an inhibin epitope in a surface-exposed loop of the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit"; *Vaccine* 16: 1611-9 (1998).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BAM, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, Hol WGJ: "Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin"; *J. Mol. Biol.* 230: 890-918 (1993).

Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, van Zanten BA, Berghuis AM, Hol WG: "Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography"; *Nature* 355: 561-4 (1992).

Skinner, S.M., G.J. Killian, L.A. Miller et al.: "Characterization of antigenicity and immunogenicity patterns of native and recombinant zona pellucida proteins in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)"; *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 295-303 (1994).

Soltysik, S., J.Y. Wu, J. Recchia et al.: "Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function"; *Vaccine* 13, no. 15: 1403-1410 (1995).

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ: "Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in transgenic potato"; *Nature Medicine* 4:607-609 (1998).

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ: "Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes"; *J. Infect. Dis.* 182: 302-305 (2000).

Takahashi, H., T. Takeshita, B. Morein et al.: "Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs"; *Nature* 344, no. 6269: 873-875 (1990).

Takikawa, M., M. Kamada, M. Maegawa et al.: "Evaluation of two sperm antigens, rSMP-B and YWK-II, as targets for immunocontraception"; *Zygote* 9, no. 2: 145-151 (2001).

Tung, K.S.K., J. Ang, and Y. Lou.: "ZP3 peptide vaccine that induces antibody and reversible infertility without autoimmune oophoritis"; *American Journal of Reproductive Immunology* 35: 181-183 (1996).

VandeVoort, C.A., E.D. Schwoebel, and B.S. Dunbar: "Immunization of monkeys with recombinant complementary deoxyribonucleic acid expressed zona pellucida proteins"; *Fertil. Steril.* 64, no. 4: 838-847 (1995).

Wada K, Aota S, Tsuchiya R, Ishibashi F, Gojobori T, Ikemura T: "Codon usage tabulated from the GeneBank genetic sequence data"; *Nucleic Acid Research* 18: 2367-2411 (1990).

Walmsley AM, Arntzen CJ: "Plants for delivery of edible vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 11"; 126-129 (2000).

Wigdorovitz A, Perez Filgueira DM, Robertson N, Carrillo C, Sadir AM, Morris TJ, Borca MV: "Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1"; *Virology* 264: 85-91 (1999).

Wigdorovitz, A., C. Carrillo, M.J. Dus Santos et al.: "Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1"; *Virology* 255, no. 2: 347-53 (1999).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Wu, J.Y., B.H. Gardner, C.I. Murphy et al.: "*Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine*"; J. Immunol. 148, no. 5: 1519-1525 (1992).

Yu, J. and W.H. Langridge: "*A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases*. *Nat Biotechnol*"; 19(6): p. 548-552 (2001).

WO 02/083072

PCT/US02/11693

CLAIMS

1. A method for producing a stable dry homogenate of a transgenic plant expressing a heterologous protein comprising:
 - a. obtaining either intact or partitioned transgenic plant material
 - b. dehydrating said transgenic plant material
 - c. mixing said transgenic plant material into a homogenate either before or after said dehydrating step.thereby producing a stable dry homogenate of a transgenic plant expressing a heterologous protein.
2. The method of claim 1 wherein dehydration is accomplished by freeze drying, air drying, or spray drying said material.
3. The method of claim 1 further comprising the step of partitioning the dehydrated material before said mixing step.
4. The method of claim 1 further comprising the addition of an excipient.
5. The stable dry homogenate of claim 1.
6. The stable dry homogenate of claim 5 wherein the heterologous protein is selected from the group consisting of: an antigen, or an antibody.
7. A stable dry homogenate comprising a dehydrated transgenic plant material containing a transgenic protein.
8. A pharmaceutical composition comprising the stable dry homogenate of claim 7 mixed with a pharmaceutically acceptable carrier.
9. A method for preventing a pathogenic disease in an animal comprising administering the pharmaceutical composition of claim 8.
10. A method for delivering a transgenic protein to an animal comprising administering to an animal the pharmaceutical composition of claim 8.
11. The method of claim 10 wherein the transgenic protein is a vaccine.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

12. A method of contraception comprising:

administering transgenic plant material comprising a nucleic acid molecule which encodes a contraceptive polypeptide to an animal; and

wherein said administering reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.

13. A method of contraception comprising:

administering transgenic plant material comprising a nucleic acid molecule which encode a contraceptive polypeptide to an animal in an amount effective to induce contraception; and

wherein said administering induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein.

14. A method of contraception comprising:

administering transgenic plant material comprising a nucleic acid molecule which encodes a contraceptive polypeptide to an animal, wherein said nucleic acid is integrated into a plant chromosome; and

wherein said method of contraception reduces the average number of offspring per breeding cycle produced by said animal to which said transgenic plant material has been administered by at least 50%.

15. A method of contraception comprising:

administering edible transgenic plant material comprising a nucleic acid molecule which encodes a contraceptive polypeptide to an animal in an amount effective to induce contraception, wherein said nucleic acid is integrated into a plant chromosome; and

wherein said administering induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein.

16. The method of claim 1, 2, 3 or 4, wherein said transgenic plant material is selected from the group consisting of: leaf, root, shoot, stem, fruit, tuber, flower, and seed.

17. The method of claim 1, 2, 3 or 4, wherein said transgenic plant material is edible.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

18. The method of claim 1, 2, 3 or 4, wherein said contraceptive polypeptide encoded by said nucleic acid is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LHRH, LH, LDH and anti-sperm antigens.
19. The method of claim 7 wherein said zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.
20. The method of claim 7, wherein said zona pellucida glycoprotein is ZP3.
21. The method of claim 1, 2, 3 or 4, wherein said contraceptive protein is species-specific.
22. The method of claim 1, 2, 3 or 4, wherein said nucleic acid encoding a contraceptive protein further comprising a sequence encoding a mucosal targeting protein.
23. The method of claim 11, wherein said mucosal targeting protein is the *E. coli* enterotoxin subunit B.
24. The method of claim 1, 2, 3, or 4, wherein said transgenic plant material is administered as a whole plant.
25. The method of claim 1, 2, 3, or 4, wherein said transgenic plant material is administered by mucosal delivery.
26. The method of claim 14, wherein said mucosal administration is oral, nasal, or ocular delivery.
27. A method of inducing a mucosal immune response comprising:
administering to an animal transgenic plant material comprising a nucleic acid sequence which encodes a contraceptive polypeptide, wherein said administering induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein, and wherein said administering reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.
28. The method of claim 16, wherein said transgenic plant material is selected from the group consisting of: leaf, root, shoot, stem, fruit, tuber, flower, and seed.
29. The method of claim 16, wherein said transgenic plant material is in the form of an edible plant.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

30. The method of claim 1516 wherein said contraceptive polypeptide encoded by said nucleic acid is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LHRH, LH, LDH and anti-sperm antigen.
31. The method of claim 19 wherein said zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.
32. The method of claim 19, wherein said zona pellucida glycoprotein is ZP3.
33. The method of claim 19, wherein said contraceptive protein is species-specific.
34. The method of claim 16, wherein said nucleic acid encoding a contraceptive polypeptide further encodes a mucosal targeting protein.
35. The method of claim 23, wherein said mucosal targeting protein is the *E. coli* enterotoxin subunit B.
36. A transgenic plant comprising transgenic plant material which expresses a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide, wherein administering said transgenic plant material to an animal induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein, and wherein said administering reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.
37. A transgenic plant comprising transgenic plant material which express a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide, wherein said nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide is not expressed on a viral particle, and wherein administration of said transgenic plant material to an animal induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein.
38. A transgenic plant comprising transgenic plant material which express a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide, and wherein said administration reduces the average number of offspring per breeding cycle produced by said animal to which said transgenic plant material is administered by at least 50%.
39. An edible transgenic plant comprising transgenic plant material which express a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide, wherein administration of said transgenic plant material to an animal induces a mucosal immune response in said animal to said contraceptive protein, and wherein said nucleic acid is integrated into a plant chromosome.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

40. The transgenic plant of claim 25, 26, 27, or 28, wherein said contraceptive polypeptide is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LHRH, LH, LDH, and anti-sperm antigens.
41. The transgenic plant of claim 29, wherein said zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.
42. The transgenic plant of claim 29, wherein said zona pellucida glycoprotein or fragment thereof is species-specific.
43. The transgenic plant of claim 29, wherein said zona pellucida glycoprotein is ZP3 or a fragment thereof.
44. The transgenic plant of claim 25, 26, 27, or 28, wherein said nucleic acid sequence further encodes a mucosal targeting protein.
45. The transgenic plant of claim 33, wherein said mucosal targeting protein is the *E. coli* enterotoxin subunit B.
46. The transgenic plant of claim 25, 26, 27, or 28, wherein said plant is monocotyledonous.
47. The transgenic plant of claim 25, 26, 27, or 28, wherein said plant is dicotyledonous.
48. The transgenic plant of claim 25, 26, 27, or 28, wherein said plant is selected from the group consisting of tomato plants, rice plants, wheat plants, corn plants, carrot plants, potato plants, apple plants, soybean plants, alfalfa plants, medicago plants, vegetable plants, and fruit plants.
49. A plant cell comprising a nucleic acid vector, wherein said nucleic acid vector encodes a contraceptive polypeptide, wherein said nucleic acid vector is incorporated into and expressed from the chromosome of said plant cell, and wherein administration of said plant cell to an animal reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.
50. The plant cell of claim 38, wherein said contraceptive polypeptide encoded by said nucleic acid vector is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LH, LDH, and anti-sperm antigens.
51. The plant cell of claim 39, wherein said zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

52. The plant cell of claim 38, wherein said contraceptive polypeptide is species-specific.
53. The plant cell of claim 40, wherein said zona pellucida glycoprotein is ZP3.
54. The plant cell of claim 38, wherein said nucleic acid vector further encodes a mucosal targeting protein.
55. The plant cell of claim 43, wherein said mucosal targeting protein is the E. coli enterotoxin subunit B.
56. The plant cell of claim 38, wherein said plant cell is obtained from a monocotyledonous plant.
57. The plant cell of claim 38, wherein said plant cell is obtained from a dicotyledonous plant.
58. The plant cell of claim 38, wherein said plant cell is selected from the group consisting of tomato plant cells, rice plant cells, wheat plant cells, corn plant cells, carrot plant cells, potato plant cells, apple plant cells, soybean plant cells, vegetable plant cells, and fruit plant cells.
59. A plasmid vector for transforming a plant cell comprising:
a nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide;
a plant-functional promoter operably linked to said nucleic acid sequence encoding a contraceptive polypeptide capable of directing the synthesis of said contraceptive polypeptide in said plant cell; and
wherein administering said plant cell comprising said plasmid vector to an animal induces a mucosal immune response in said animal, and wherein said administering reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.
60. The plasmid vector of claim 48, wherein said contraceptive polypeptide encoded by said nucleic acid sequence is selected from the group consisting of a zona pellucida glycoprotein, GnRH, LHRH, LH, LDH, and anti-sperm antigens.
61. The plasmid vector of claim 49, wherein said zona pellucida glycoprotein is selected from the group consisting of ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4.
62. The plasmid vector of claim 48, wherein said plant cell is obtained from an edible plant.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

63. The plasmid vector of claim 48, further comprising a nucleic acid sequence encoding a mucosal targeting protein.
64. The plasmid vector of claim 52, wherein said mucosal targeting protein is the E. coli enterotoxin subunit B.
65. A food composition comprising at least a portion of the transgenic plant of claim 25, 26, 27, or 28, capable of being ingested by an animal, wherein said ingestion induces a mucosal immune response in said animal, and wherein said ingestion reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.
66. The food of claim 54, wherein said at least a portion of the transgenic plant of claim 25, 26, 27, or 28 is selected from the group consisting of fruit, leaf, root, shoot, stem, tuber, and seed of said transgenic plant.
67. A pharmaceutical composition comprising
- at least a portion of the transgenic plant of claim 25, 26, 27, or 28;
- a pharmaceutically acceptable carrier; and
- wherein administration of said pharmaceutical composition to an animal reduces the average number of offspring produced per breeding cycle by said animal by at least 50%.
68. The pharmaceutical composition of claim 56, wherein said at least a portion of the transgenic plant of claim 25, 26, 27, or 28 is selected from the group consisting of fruit, leaf, root, stem, tuber, and seed of said plant.
69. A composition comprising a saponin adjuvant in admixture with processed transgenic plant material for oral administration to an animal, wherein said administration reduces the number of offspring produced by said animal per breeding cycle by at least 50%.

WO 02/083072

PCT/US02/11693

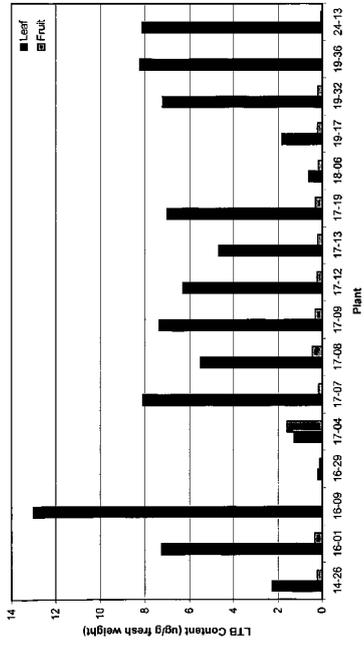


Figure 1a

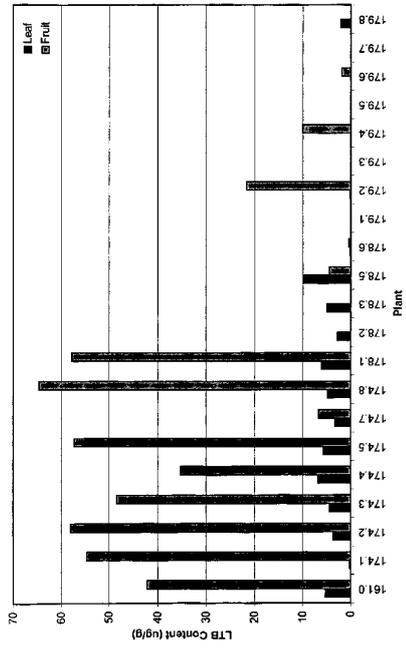


Figure 1b

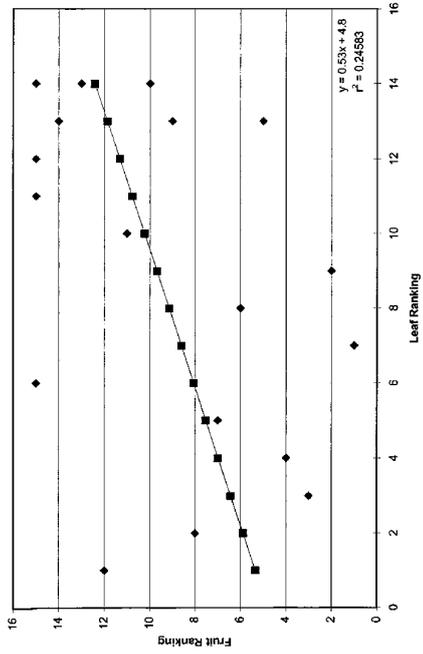


Figure 1 c

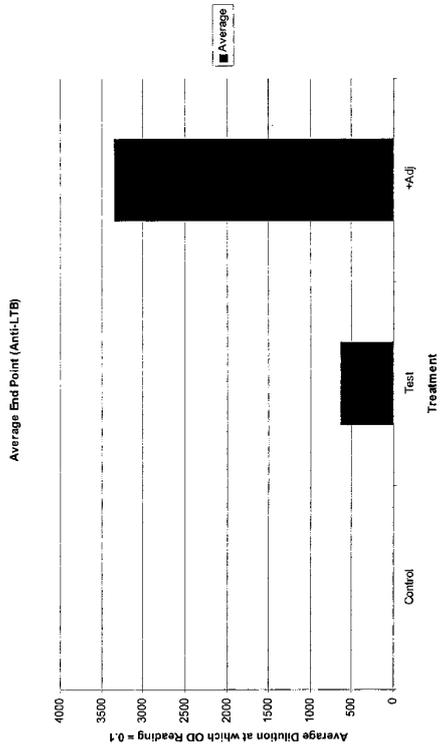


Figure 2a

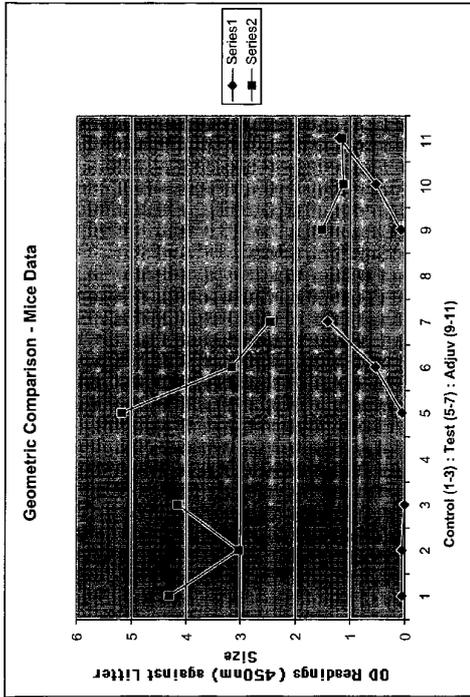


Figure 2 b

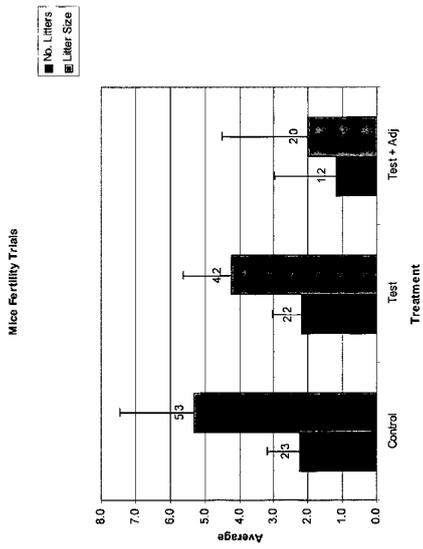


Figure 3.

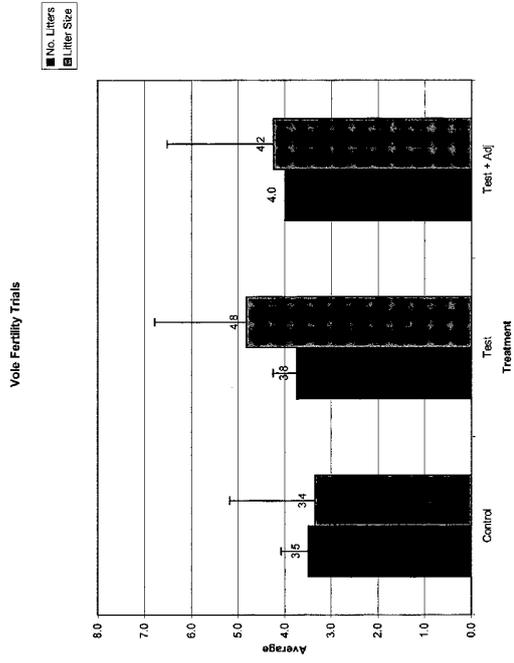


Figure 4

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Figure 5 a Contraceptive - LTB Fusion Constructs

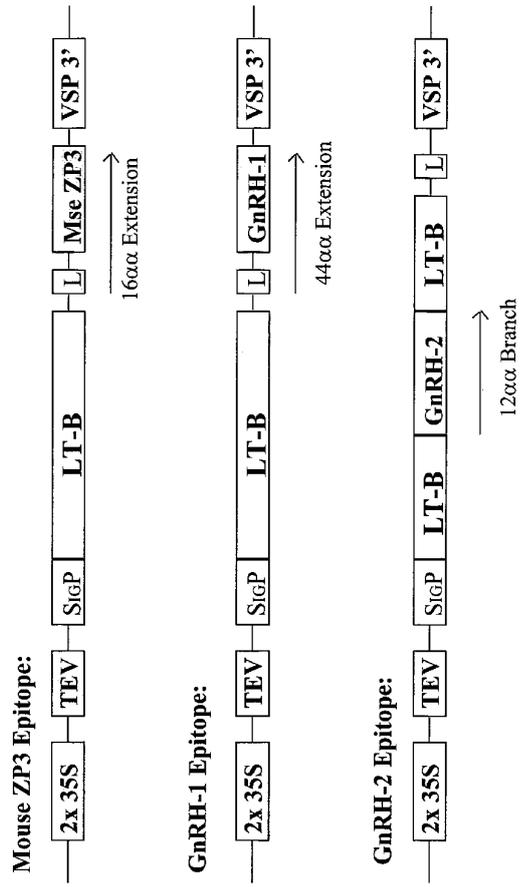
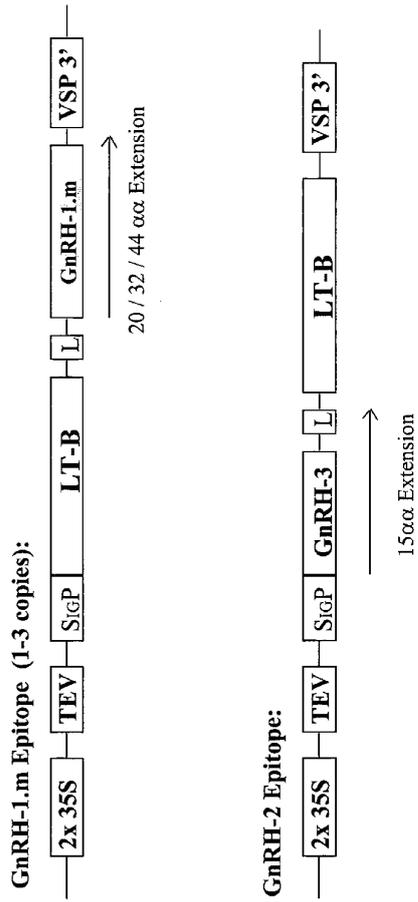


Figure 5 b Contraceptive - LTB Fusion Constructs



WO 02/083072

PCT/US02/11693

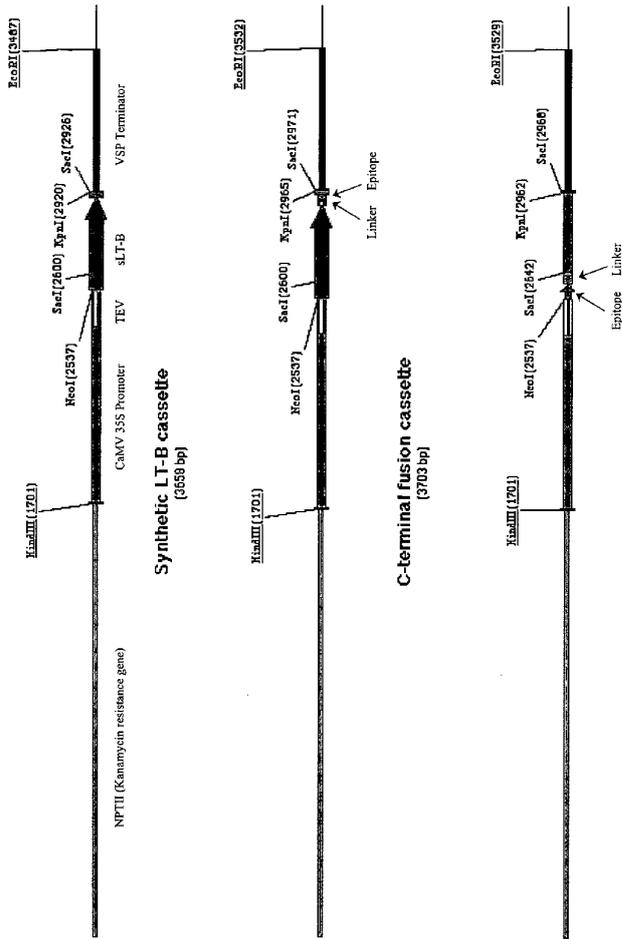


Figure 5 c N-terminal fusion cassette (3700 bp)

WO 02/083072

PCT/US02/11693

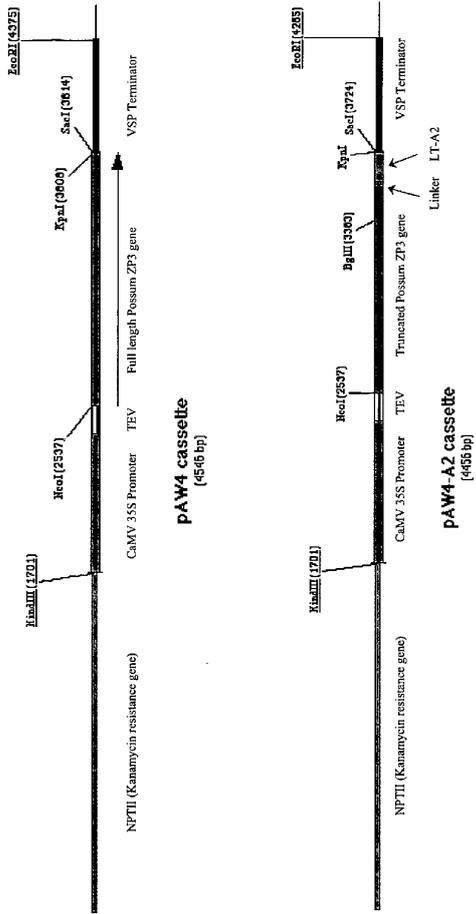


Figure 5 c N-terminal fusion cassette (3700 bp) continued

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Fusion Construct	Total Soluble Protein Conc.	Average Level of LT-B Detected	Highest Level of LT-B Detected	Highest Level of Epitope Detected
LTB-Mouse ZP3	16.5ug/g FW	0.74ug/g FW	2.90ug/g FW	50ng/g FW
LTB-GnRH1	17.3ug/g FW	0.61ug/g FW	1.21ug/g FW	270ng/g FW
LTB- GnRH2	14.5ug/g FW	0.22ug/g FW	0.29ug/g FW	0ng/g FW

Figure 6

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Processed Plant Type	Antigen of Interest	Post Processing Treatment Group	Sample 1 Antigen Content	Sample 2 Antigen Content	Sample 3 Antigen Content	Average Antigen Content	Greatest Variance
Tomato fruit	HBsAg combined	Frozen Room Temp	89.9 76.1	92.4 90.8	n/a 81	91.1 82.6	3% 19%
Tomato fruit	HBsAg combined	Frozen	19.8	23.1	n/a	21.5	17%
		Room Temp	15.5	15.5	19.4	16.8	25%
		RT (+antioxidant)	13.2	11.4	12.8	12.5	16%
		Frozen (+antioxidant)	26.8	28.2	n/a	27.5	5%
Tomato fruit	NVCP combined	Frozen	1.34	1.49	n/a	1.4	11%
		Room Temp	1.42	1.68	n/a	1.6	18%
		RT (+adjuvant)	1.22	1.13	n/a	1.2	8%
		Frozen (+adjuvant)	0.95	0.93	n/a	0.9	2%
Potato tuber	NVCP combined	None	16.4	17.1	15.2	16.2	13%
		+antioxidant	14.3	15.7	17.1	15.7	20%
		+antioxidant +adjuvant	16.8	13.9	14.9	15.2	21%
Potato tuber	NVCP combined	Room Temp	7.2	5.9	6.3	6.5	22%
		RT (+antioxidant)	4.6	5.1	3.9	4.5	31%
		Frozen (+antioxidant)	11.9	11.1	9.8	10.9	21%
		RT (+adjuvant)	5.1	5.1	3.8	4.7	34%
		Frozen (+adjuvant)	12.1	9.9	10.5	10.8	22%
Potato Tubers	NDV-HN- line 4	None	5.44	6.63	7.06	6.4	30%
		UNPROCESSED	0.47	2.4	0.95	1.3	153%
Potato Tubers	NDV-HN- line 6	None	27.87	39.43	22.62	30.0	74%
		UNPROCESSED	1.16	2.26	5.07	2.8	337%
Potato Tubers	AIV-HA- line 109	None	5.6	6.1	7	6.2	25%
		UNPROCESSED	1.18	1.81	1.91	1.6	62%
Potato Tubers	AIV-HA- line 73	None	5.6	6	6.7	6.1	20%
		UNPROCESSED	3.64	2.26	2.01	2.6	81%

TABLE 1

WO 02/083072

PCT/US02/11693

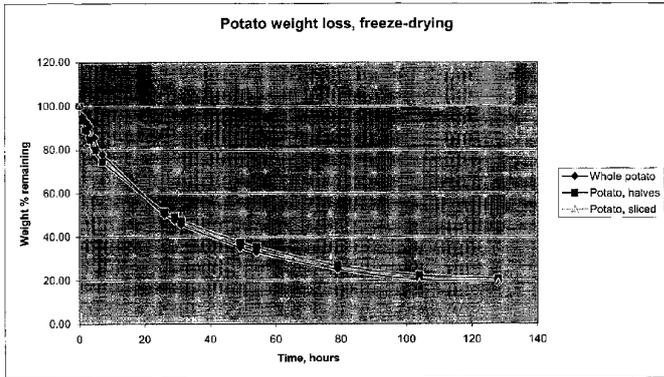


FIGURE 7

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Plant Source (- Antigen)	Pre-processing Method	Reduction in Mass	Antigen Recovery	Total Concentration Effect
Potato - NYCP	Puree, freeze-dry	88%	43%	3.6 fold
Potato - ALV/HA	Puree, freeze-dry	89%	52%	4.7 fold
Potato - NDV/HN	Puree, freeze-dry	83%	52%	3.1 fold
Potato - HBsAg	Puree, freeze-dry	90%	57%	5.7 fold
Potato - LTB	Puree, freeze-dry	89%	44%	4.0 fold
Tomato - NYCP	Puree, freeze-dry	94%	43%	7.2 fold
Tomato - HBsAg	Puree, freeze-dry	95%	59%	11.8 fold
Tomato - LTB	Puree, freeze-dry	94%	48%	8.0 fold
Potato - ALV/HA	Cube, freeze-dry	84%	95%	15.2 fold
Potato - NDV/HN	Cube, freeze-dry	84%	95%	15.2 fold
Carrot/Root - LTB	None, freeze-dry	88%	~ 100%	8.3 fold
Carrot/Root - ZP2	None, freeze-dry	92%	~ 100%	12.5 fold
Carrot/Root - LTB	None, freeze-dry	90%	~ 100%	10.0 fold
Carrot/Root - ZP2	None, freeze-dry	90%	~ 100%	10.0 fold

TABLE 2

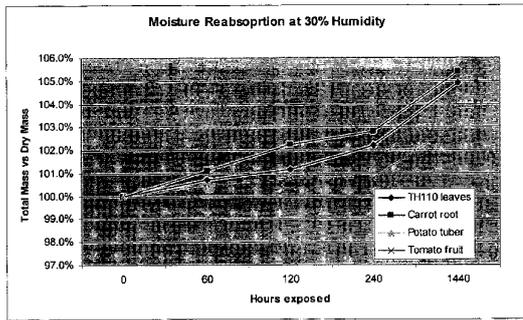


FIGURE 8

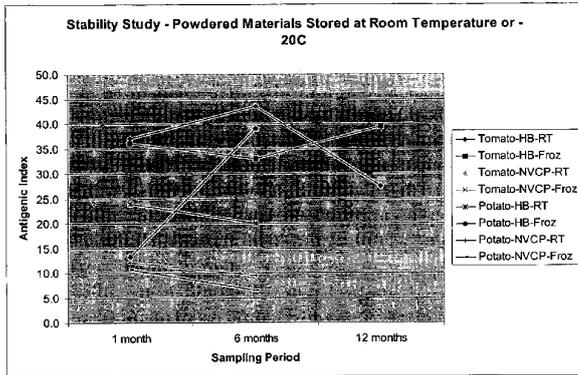


FIGURE 9

WO 02/083072

PCT/US02/11693

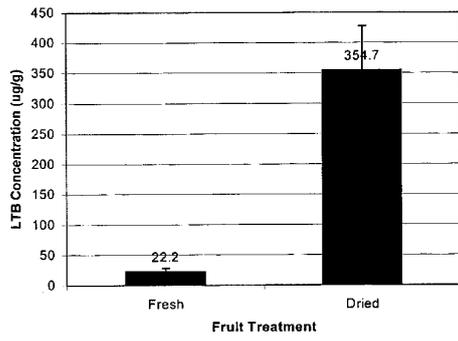


FIGURE 10

WO 02/083072

PCT/US02/11693

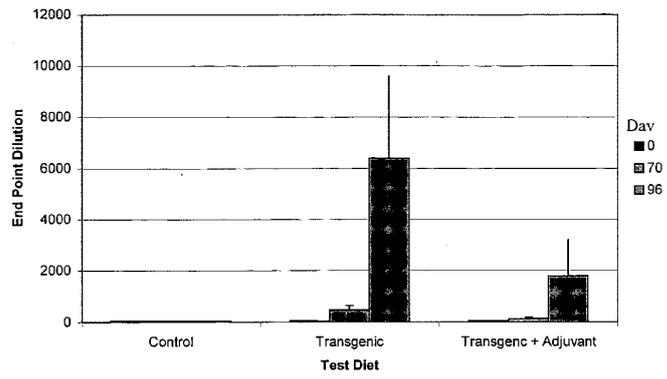


FIGURE 11

WO 02/083072

PCT/US02/11693

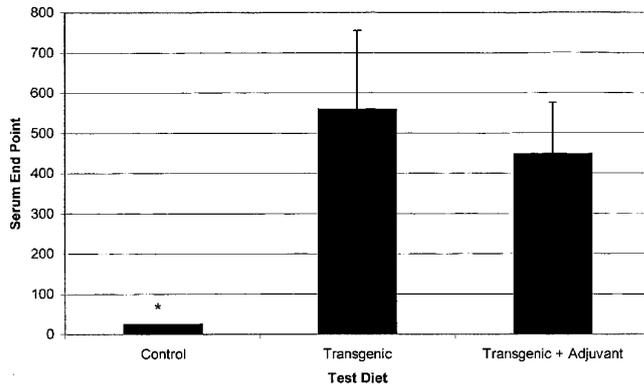


FIGURE 12

WO 02/083072

PCT/US02/11693

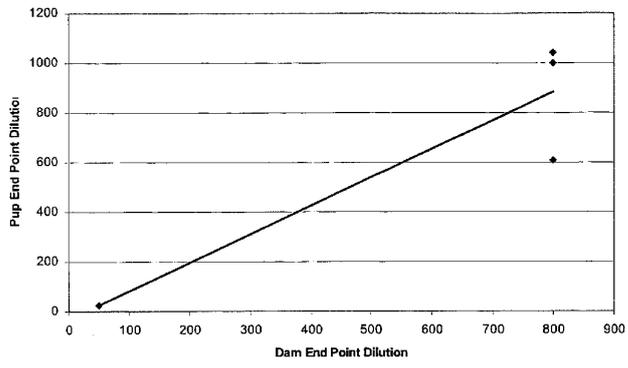


FIGURE 13

WO 02/083072

PCT/US02/11693

Lyoph LT-B TH110 Potatoes		Lyoph LT-B TH110 Potatoes with Sodium Ascorbate		Lyoph LT-B TH110 Potatoes with Sodium Ascorbate & Quil A	
Stability Study		Stability Study		Stability Study	
Storage	LT-B ELISA	Storage	LT-B ELISA	Storage	LT-B ELISA
12-Oct-01 (6-12°C)	32.6	12-Oct-01 (6-12°C)	42.8	12-Oct-01 (6-12°C)	26.0
12-Oct-01 (R.T.)	35.5	12-Oct-01 (R.T.)	31.9	12-Oct-01 (R.T.)	28.1
28-Nov-01 (6-12°C)	18.2	28-Nov-01 (6-12°C)	20.6	28-Nov-01 (6-12°C)	23.4
28-Nov-01 (R.T.)	23.7	28-Nov-01 (R.T.)	25.5	28-Nov-01 (R.T.)	21.8
12-Jan-02 (6-12°C)	14.7	12-Jan-02 (6-12°C)	16.9	12-Jan-02 (6-12°C)	14.4
12-Jan-02 (R.T.)	19.8	12-Jan-02 (R.T.)	22.5	12-Jan-02 (R.T.)	17.7
13-Feb-02 (6-12°C)	25.0	13-Feb-02 (6-12°C)	22.7	13-Feb-02 (6-12°C)	17.2
13-Feb-02 (R.T.)	24.4	13-Feb-02 (R.T.)	19.3	13-Feb-02 (R.T.)	15.8
14-Mar-02 (6-12°C)	21.4	14-Mar-02 (6-12°C)	24.8	14-Mar-02 (6-12°C)	23.4
14-Mar-02 (R.T.)	25.7	14-Mar-02 (R.T.)	25.3	14-Mar-02 (R.T.)	26.3

Figure 14a

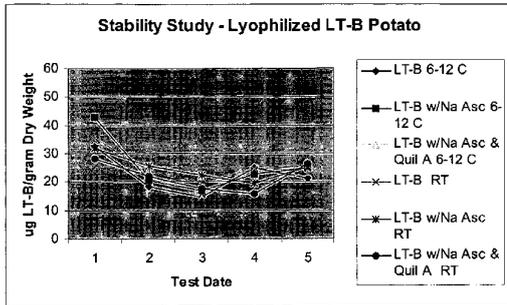


FIGURE 14b

WO 02/083072

PCT/US02/11693

HA Storage Experiment

Lyoph NT-1 Cells (HAO)		Storage	ELISA
Date	Conditions	Results	
27-Sep-01	(-18°C)	62.35	
27-Sep-01	(R.T.)	66.5	
25-Oct-01	(-18°C)	88.65	
25-Oct-01	(R.T.)	105.33	
27-Nov-01	(-18°C)	45.9	
27-Nov-01	(R.T.)	60.0	
11-Jan-01	(-18°C)	179.3	
11-Jan-01	(R.T.)	187.5	
8-Mar-02	(-18°C)	* 108.1	
8-Mar-02	(R.T.)	* 149.8	

*Began using a new lot of Chicken anti-AIV (T/W/68) from SEPRL as the detector antibody in the ELISA

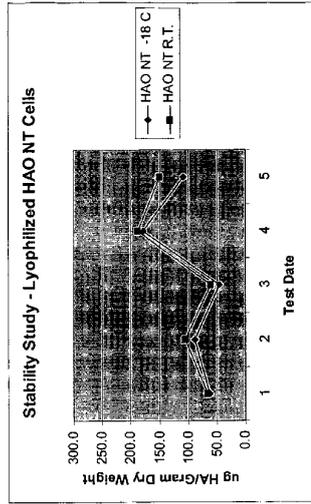


FIGURE 15

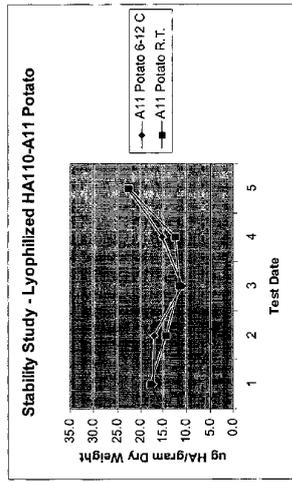
WO 02/083072

PCT/US02/11693

HA Storage Experiment
Lyoph HA 110-A11 Potatoes
FIGURE 16

Date	Storage Conditions	ELISA Results
27-Sep-01	(6-12°C)	17.22
27-Sep-01	(R.T.)	17.74
25-Oct-01	(6-12°C)	16.89
25-Oct-01	(R.T.)	14.41
27-Nov-01	(6-12°C)	11.0
27-Nov-01	(R.T.)	11.5
11-Jan-01	(R.T.)	15.2
11-Jan-01	(R.T.)	12.4
8-Mar-02	(6-12°C)	* 22.8
8-Mar-02	(R.T.)	* 22.6

*Began using a new lot of Chicken anti-A1V (T/W/68) from SEPRL as the detector antibody in the ELISA



WO 02/083072

PCT/US02/11693

Stability Study

Lyoph NT-1 Cells (SLT102)			
Date	Storage Conditions	LT ELISA Results ^A	LT-B-ELISA Results ^A
12-Oct-01	(-18°C)	41.4	183.4
12-Oct-01	(R.T.)	41.4	183.4
28-Nov-01	(-18°C)	32	188.8
28-Nov-01	(R.T.)	36.2	201.1
12-Jan-02	(-18°C)	* 18.7	166.1
12-Jan-02	(R.T.)	* 20.6	162.2
13-Feb-02	(-18°C)	11	143.1
13-Feb-02	(R.T.)	12.9	116.3
14-Mar-02	(-18°C)	20.6	188.9
14-Mar-02	(R.T.)	19.9	168.8

A=> Results reported as ug LT or LT-B per gram dry weight

*=> Unknown samples were not parallel to the reference. But Slope ration was close to being acceptable.

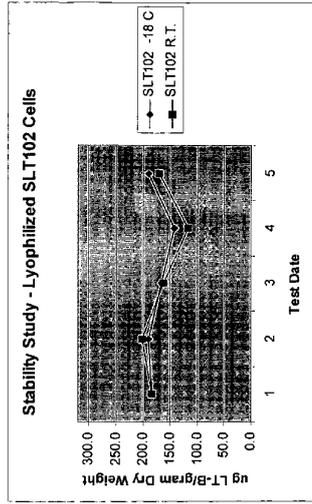


Figure 17

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083072 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/00, 15/36, 15/82, A01H 5/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/11693
- (22) International Filing Date: 12 April 2002 (12.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/283,884 13 April 2001 (13.04.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH [US/US]; Tower Road, Ithaca, NY 14853-1801 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): KIRK, Dwayne [AU/US]; 3427 N. Sericin Street, Mesa, AZ 85215 (US). MASON, Hugh [US/US]; 13111 Hamshaw Road, Ithaca, NY 14850 (US). WALMSLEY, Amanda [AU/US]; 3427 N. Sericin Street, Mesa, AZ 85215 (US). ARNTZEN, Charles [US/US]; 7686 E. Wilderness Trail, Superstition Mountain, AZ 85216-1806 (US).
- (74) Agent: WILLIAMS, Kathleen, M.; Palmer & Dodge LLP, 111 Huntington Avenue, Boston, MA 02199-7613 (US).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR). OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 17 April 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/083072 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR STABLE TRANSGENIC PLANT PHARMACEUTICALS AND THEIR USE AS CONTRACEPTIVES

(57) Abstract: The present invention provides for processing methods that preserve pharmaceutical proteins expressed in plants. Herein raw plant tissue is reduced to a stable homogenate without significant loss of protein or pharmaceutical potency. The homogenate can be used directly for pharmaceutical purposes without the need to further extract, purify, or precipitate the pharmaceutical protein. The present invention further provides a method of effective immunocontraception for animal and human application. Methods are disclosed for producing transgenic plant or plant cells which express contraceptive proteins, and which can be delivered whole, in part, or after processing, to an animal to cause a contraceptive effect in the target species.

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/11693
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(Cl.) : H01N 15/00, 15/36, 15/82, A01H 5/00 US CL. : 514/841, 842, 435/172.3, 321.0, 69.3, 172.3, 424/88; 800/295 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/841, 842, 435/172.3, 321.0, 69.3, 172.3, 424/88; 800/295 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) West, STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,484,719 A (LAM et al) 16 January 1996 (16.01.96). Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	US 5,686,079 A (CURTISS, III et al) 11 November 1997 (11.11.97). Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	US 5,679,880 A (CURTISS, III et al) 21 October 1997 (21.10.97). Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	WO 86/06076 A1 (BIOTECHNOLOGY AUSTRALIA PT. LTD.) 23 October 1986 (23.10.86). Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	WO 99/65940 A1 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER) 23 December 1999 (23 December 1999). Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	DOMANSKY, N. Transgenic plants as edible vaccines-reality and future prospects. Biopolimery I Kletka. 1999, Vol. 15, No. 1, pages 5-9. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	OCRA, F. et al. Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. Clinical Microbiology Reviews. April 2001, Vol. 14, No. 2, pages 430-445. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69/69
Y	MASON, H. et al. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Proc. Nat Acad. Sci. USA. May 1996, Vol. 93, No. 11, pages 5335-5340. Entire document.	1-35, 41-43, 45, 49-64, 69
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to emphasize the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 August 2002 (25.08.2002)		Date of mailing of the international search report 23 OCT 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Georgia Helmer Telephone No. 703-305-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/11693

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MASON et al. Edible vaccine protects mice against <i>Escherichia coli</i> heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. <i>Vaccine</i> . 1998, Vol. 16, No. 13, pages 1335-1343. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	STOGER, et al. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. <i>March 2000 Vol. 42, No. 4</i> , pages 583-590. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	LARRICK et al. Production of antibodies in transgenic plants. 1998, <i>Research in Immunology</i> . 1998, Vol. 149, No. 6, pages 603-608. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	MASON et al. Transgenic plants as vaccine production systems. <i>Trends in Biotechnology</i> . September 1995, Vol. 13, No. 9, pages 388-392. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	MESTECKY et al. Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. <i>Behr. Inst. Mitt.</i> 1997, Vol 98, pages 33-43. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	TACKET et al. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. <i>Nature Medicine</i> May 1998, Vol. 4, No. 5, pages 607-609. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	SMITH et al. Plant-derived immun contraceptive vaccines. <i>Reproduction, Fertility and Development</i> . 1997, Vol. 9, No. 1, 83-89. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	RUEDL et al. Features of oral immunization. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> . 1995, Vol. 108, No. 4, pages 334-339. Entire Document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	YU et al. Assembly of cholera toxin-antigen fusion proteins in transgenic potato. <i>Transgenics</i> . 2001, Vol. 3, No 2-4, pages 153-162. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	ARAKAWA et al. Suppression of autoimmune diabetes by a plant-derived cholera toxin B subunit-human glutamate decarboxylase fusion protein. <i>Transgenics</i> . 1999, Vol. 3, No. 1, pages 51-60. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69
Y	WONGSAMUTH et al. 'Production of monoclonal antibody by tobacco hairy roots'. <i>Book of Abstracts, 211th ACS Nation Meeting, New Orleans, LA, March 24-28, 1996, BIOT-166</i> , Publisher, American Chemical Society, Washington, Abstract No. 166. Entire document.	1-39, 41-43, 45, 49-64, 69

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/11693
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 40, 44, 46-48 AND 65-68 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input checked="" type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/11693

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-11, 16, 17, 28 and 29, drawn to a method for producing a dry homogenate, the dry homogenate, and a method for preventing pathogenic disease comprising administering the dry homogenate..

Group II, claim(s) 12-15, 18-27 and 23-35, drawn to a method of contraception..

Group III, claim(s) 36-39, 41-43, 45, 49-58, drawn to a transgenic plant expressing a contraceptive polypeptide.

Group IV claim(s) 59-64, drawn to a plasmid vector.

Group V, claim(s) 69, drawn to an oral administration composition comprising a saponin adjuvant.

and it considers that the International Applicant does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: expression of a heterologous protein in a transgenic plant was well known in the art (page 1 of description). Further, the method of Group I targets a different population and utilizes structurally different materials from the method of Group II. The dry homogenate, transgenic plant, vector, food, pharmaceutical composition with saponin adjuvant imply structurally distinct materials. Accordingly, Groups I-V lack unity.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 35/78	N 4 C 0 8 8
A 6 1 P 15/18	A 6 1 K 35/78	R
C 1 2 N 5/10	A 6 1 K 35/78	U
//(C 1 2 N 5/10	A 6 1 K 35/78	X
C 1 2 R 1:91)	A 6 1 K 39/00	Z
	A 6 1 K 39/39	
	A 6 1 P 15/18	
	A 6 1 P 15/18	1 7 1
	C 1 2 N 5/00	C
	C 1 2 N 5/00	C
	C 1 2 R 1:91	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 カーク, ドウェイン
 アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 2 1 5 , メサ, ノース・セリシン・ストリート 3 4 2 7

(72)発明者 メイソン, ヒュー
 アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 4 8 5 0 , イサカ, ハンショール・ロード 1 3 1 1

(72)発明者 ウォームズリー, アマンダ
 アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 2 1 5 , メサ, ノース・セリシン・ストリート 3 4 2 7

(72)発明者 アーンツェン, チャールズ
 アメリカ合衆国アリゾナ州 8 5 2 1 6 - 1 8 0 6 , スーパースティション・マウンテン, イースト
 ・ウィルダネス・トレイル 7 6 8 6

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA17 CB02 CB03
 4B018 MD20 MD48 MD69 ME14 MF07
 4B024 AA01 AA08 BA63 CA04 CA07 DA01 DA05 EA04 GA14 GA17
 4B065 AA01X AA11X AA88X AA90Y AB01 BA03 CA24 CA43 CA53
 4C085 AA03 AA38 CC40 DD21 FF18
 4C088 AB40 AB48 AB51 AB59 AB61 AB73 AB74 AB78 AC04 AC05
 AC13 ZA86 ZC61