



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 321**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 15/36** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02725654 .4**  
96 Fecha de presentación : **12.04.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1389997**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Procedimiento y composiciones para productos farmacéuticos de plantas transgénicas estables y su utilización como anticonceptivos.**

30 Prioridad: **13.04.2001 US 283884 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.04.2011**

73 Titular/es: **BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR  
PLANT RESEARCH  
Tower Road  
Ithaca, New York 14853-1801, US**

72 Inventor/es: **Kirk, Dwayne;  
Mason, Hugh;  
Walmsley, Amanda y  
Arntzen, Charles**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 357 321 T3

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

**DESCRIPCIÓN****ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

5 La presente invención se refiere a técnicas de tratamiento para la producción de proteínas farmacéuticamente activas, tales como vacunas, anticuerpos u otros compuestos terapéuticos derivados de plantas transgénicas, así como a su administración a seres humanos y animales para la inmunoanticoncepción, la vacunación contra enfermedades patológicas, o el tratamiento terapéutico contra la infección por otros compuestos inmunorreactivos. El desarrollo de vacunas a base de plantas ha desarrollado significativamente los enfoques disponibles de vacunación de seres humanos y animales. La utilización de plantas transgénicas para el desarrollo de vacunas, anticuerpos y otros compuestos terapéuticos humanos y veterinarios no sólo ha incrementado la eficiencia de la producción de proteínas terapéuticas, sino que ha reducido asimismo sustancialmente los costes primarios de producción.

10 Con respecto a la producción de vacunas a base de plantas, se han realizado avances significativos en la expresión de proteínas en plantas transgénicas. Por ejemplo, se han utilizado diversas formas, agregados o fusiones de expresión para incrementar la producción de subunidades de vacuna, anticuerpos y proteínas terapéuticas o anticonceptivas, tal como se describe en las patentes US nº 5.679.880, nº 5.484.719, nº 5.686.079 y en la solicitud de patente US 2002/0006411. Sin embargo, el estado actual de la tecnología de vacunas de plantas transgénicas todavía requiere que la proteína farmacéutica se purifique respecto del material vegetal transgénico, o que sean consumidos los tejidos vegetales no tratados crudos estandarizados. Desafortunadamente, estas opciones para la producción de productos farmacéuticos administrables derivados de plantas presentan desventajas inherentes.

15 El producto farmacéutico derivado de planta preferido es el tejido vegetal estandarizado que pueda administrarse por vía oral. Más específicamente, resulta preferido que el material vegetal pueda almacenarse, transportarse y administrarse a temperatura ambiente. Sin embargo, las vacunas a base de plantas transgénicas no purificadas presentan los problemas inherentes siguientes: i) los niveles variables de expresión de proteínas observados de una planta a otra, e ii) el carácter perecedero, por lo tanto la degradación de las proteínas. Los productos recién recolectados, tales como frutos, tubérculos, raíces, hojas o cualquier otro tejido vegetal, se encuentran limitados debido a su vida de almacenamiento relativamente corta en comparación con los requisitos farmacéuticos convencionales. Además, el nivel variable de acumulación de las proteínas transgénicas observado entre diferentes plantas, clones o tejidos vegetales plantea una dificultad significativa para conseguir una consistencia de las dosis, la cual resulta necesaria para la aplicación farmacéutica.

20 La tecnología farmacéutica convencional proporciona procedimientos para la extracción, purificación y concentración de las proteínas farmacéuticas; sin embargo, esto resulta caro, supone la necesidad de refrigeración del producto purificado, y no permite el encapsulado protector de la proteína transgénica por la propia célula vegetal. De esta manera, existe una necesidad en la técnica de procedimientos de producción de productos farmacéuticos a base de plantas transgénicas estables que eviten la desventaja de la expresión variable de las proteínas observada de una planta a otra, y que tampoco requieran una purificación adicional respecto del material vegetal original. Los procedimientos de tratamientos descritos en la presente memoria proporcionan un modo de producir a temperatura ambiente una formulación homogénea estable que puede utilizarse en una amplia gama de aplicaciones. Además, el homogeneizado estable a temperatura ambiente presenta las propiedades inherentes de que puede agruparse y realizarse un control de calidad del mismo por lotes. Además, los procedimientos descritos de tratamiento de plantas transgénicas permiten la adición conveniente de adyuvantes, tampones, antioxidantes, estabilizadores o polvos antigénicos durante todo el tratamiento, permitiendo producir una amplia diversidad de formulaciones farmacéuticas de manera eficiente y rentable. Los homogeneizados secos estables pueden utilizarse no sólo para la vacunación y el tratamiento de enfermedades patológicas, sino que también pueden utilizarse para bloquear la fertilización.

25 La fertilización es una interacción compleja entre moléculas reguladoras clave sobre la superficie de espermatozoide y óvulo. El papel vital que estas moléculas desempeñan en el proceso reproductor las convierte en dianas para el control de la fertilidad en especies de mamífero.

30 Todos los óvulos de mamífero se encuentran circundados por una zona pelúcida, una cubierta relativamente simple compuesta de tres glucoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3) que proporcionan el receptor de espermatozoide al óvulo. La zona pelúcida de algunas especies no de mamífero también incluye una cuarta glucoproteína, ZP4. Los componentes glucoproteicos de la zona pelúcida presentan funciones específicas durante la fertilización y el desarrollo temprano que han sido bien definidas en el ratón. ZP1 es una proteína estructural que entrecruza filamentos de ZP2 y ZP3. Durante la fertilización, el espermatozoide se une inicialmente a ZP3, que induce la reacción acrosómica del espermatozoide. Tras la inducción acrosómica, ZP2 actúa como receptor secundario del espermatozoide, resultando necesario para la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida. Tras la fertilización, se cree que el corte proteolítico de ZP2 y la modificación de ZP3 se encuentran implicados en la evitación de la polispermia.

35 El importante papel de la zona pelúcida durante la fertilización, su expresión única en los oocitos en crecimiento y su fuerte inmunogenicidad la han convertido en una diana atractiva para el desarrollo de vacunas inmunoanticonceptivas (revisión en Epifano y Dean, *Reprod. Fertil. Dev.* 6:319, 1994). Se ha demostrado que la inmunización con zonas enteras o con componentes de la zona pelúcida inhibe la fertilización en varias especies, entre ellas primates, conejos, roedores y perros (revisión de Prasad *et al.*, *J. Reprod. Fertil. suppl.* 50:143, (1996). Aunque las composiciones indicadas en dichas referencias pueden inhibir la fertilización, deben administrarse parenteralmente

mediante dardos o inyección, y de esta manera no resultan prácticos para un uso generalizado y económico. Las composiciones indicadas en dichas referencias, en contraste con la presente invención, no pudieron administrarse eficazmente por vía oral en forma de cebo crudo, alimento o material tratado para el consumo digestivo.

5 Fitchen *et al.* (Vaccine 13:1051, 1995) intentaron producir proteínas anticonceptivas en plantas para la administración purificada en especies animales diana o de modelo mediante inyección. En este ejemplo, se manipuló un epítipo de ZP3 murino dentro de la secuencia de la proteína de cubierta del virus del mosaico del tabaco (TMV) y se expresó en la planta del tabaco durante la infección por el TMV. Las partículas víricas (que expresaban el epítipo de ZP sobre la superficie exterior del virus) se purificaron crudamente a partir del material vegetal para la administración parenteral. Sin embargo, las partículas víricas no resultaron efectivas para reducir el tamaño de la camada en el modelo de ratón. Fitchen *et al.* no se refieren a un procedimiento para inducir la anticoncepción en un animal, o a la administración oral de un planta transgénica en el animal, en la que la administración oral reduce el tamaño de camada medio en por lo menos 50%.

15 Existe una necesidad en la técnica de una composición vegetal que pueda administrarse convenientemente por vía oral en un animal en forma de un cebo crudo, o como alimento para el consumo digestivo, y que reduzca significativamente el tamaño de camada de los animales en los que se administre. Existe una necesidad de la técnica de evitar el uso de virus vegetales para la expresión. Por lo tanto, existe una necesidad de la técnica para expresar proteínas anticonceptivas directamente por parte de las células vegetales mismas, proporcionando de esta manera una respuesta inmunológica de la mucosa tras el consumo del material vegetal por parte de un animal.

20 Mientras la población humana estimada continúe expandiéndose más allá del número de los 6 mil millones, la distribución poblacional de otras especies salvajes continuará muy influida por las actividades ambientales del hombre industrializado. Durante el siglo veinte, el uso humano del territorio y de los recursos hídricos ha presentado un efecto crecientemente profundo sobre la dinámica poblacional de las especies animales. La organización World Wildlife Fund predice en la actualidad que hasta un tercio de las especies del mundo podría extinguirse en los próximos veinte años. Además de reducir las poblaciones específicas de fauna y flora hasta la extinción o el peligro de extinción, la sobreadundancia de especies particulares también ha sido inducida por el hombre moderno. A título de ejemplo específico, la supervivencia de los animales herbívoros ha establecido un equilibrio a través del tiempo gracias a fuerzas naturales tales como las barreras geográficas, los depredadores naturales, las condiciones climáticas y la disponibilidad de alimento. Entre las muchas influencias se incluyen que el mundo industrializado ha talado bosques para la agricultura y la construcción, ha reducido la población y el territorio natural de los animales depredadores, ha introducido especies a través de barreras geográficas, ha proporcionado refugios no naturales frente a extremos climáticos y ha generado una cultura social en la que los derechos animales y los intereses humanos con frecuencia entran en conflicto. En la actualidad existen muchos ejemplos en los que las poblaciones excesivamente abundantes de herbívoros se encuentran en conflicto directo con la coexistencia humana y la producción agrícola. Debido a una diversidad de motivos, el control poblacional de muchas de estas especies resulta inalcanzable y se están buscando procedimientos alternativos.

35 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar técnicas respetuosas de control poblacional para mitigar el daño que resulta de la proliferación incontrolada de las especies animales, sean los daños de tipo económico, ambiental o al bienestar animal. Además, existe una necesidad de su realización con formulaciones que puedan producirse eficientemente y con eficiencia de costes.

#### 40 **SUMARIO DE LA INVENCION**

45 La presente invención proporciona procedimientos para la producción de productos biofarmacéuticos de plantas transgénicas. Los procedimientos descritos en la presente memoria permiten la producción de material vegetal transgénico seco que es estable a temperatura ambiente, homogéneo y farmacéuticamente potente. En general, se secan o se secan mediante congelación plantas transgénicas intactas o divididas mediante técnicas de tratamiento alimentario conocidas de la técnica. El homogeneizado seco, que contiene el producto biofarmacéutico, puede utilizarse a continuación terapéuticamente sin necesidad de extracción, purificación o precipitación adicional de la proteína farmacéutica. Los homogeneizados secos estables pueden utilizarse para la vacunación, tratamiento de enfermedades patogénicas y como anticonceptivo. La presente invención proporciona además una vacuna segura y eficaz para el control de la fertilidad y la fecundidad. De esta manera, la invención satisface la necesidad de la técnica de procedimientos eficientes de producción de productos farmacéuticos estables a base de plantas y la necesidad de procedimientos convenientes y rentables de control población para animales domésticos, especies de engorde, especímenes zoológicos en cautividad, poblaciones de reserva de caza y seres humanos.

55 En la presente memoria se dan a conocer procedimientos para la producción y utilización de productos farmacéuticos a base de plantas.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir un homogeneizado seco estable de una planta transgénica que expresa una proteína heteróloga, que comprende: i) obtener material vegetal transgénico intacto o dividido, ii) deshidratar dicho material vegetal transgénico, e iii) mezclar dicho material vegetal transgénico en un homogeneizado antes o después de dicha etapa de deshidratación, produciendo de esta manera un homogeneizado seco estable de una planta transgénica que expresa una proteína farmacéutica heteróloga.

En una forma de realización, la deshidratación se lleva a cabo mediante secado por congelación, secado al aire o secado por pulverización de dicho material.

En otra forma de realización, el procedimiento comprende además la etapa que consiste en dividir el material deshidratado antes de dicha etapa de mezcla.

5 En todavía otra forma de realización, el procedimiento comprende además la adición de un excipiente.

La invención proporciona además un homogeneizado seco estable producido mediante los procedimientos descritos anteriormente.

En una forma de realización, el homogeneizado seco estable contiene un antígeno o un anticuerpo.

10 La invención proporciona un homogeneizado seco estable que comprende un material vegetal transgénico deshidratado que contiene una proteína transgénica.

Se da a conocer además una composición farmacéutica que comprende un homogeneizado seco estable que comprende un material vegetal transgénico deshidratado que contiene una proteína transgénica, opcionalmente mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable.

15 Se da a conocer todavía adicionalmente un procedimiento para prevenir una enfermedad patogénica en un animal, que comprende administrar la composición farmacéutica que comprende un homogeneizado seco estable que comprende un material vegetal transgénico deshidratado que contiene una proteína transgénica, opcionalmente mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable.

20 También se da a conocer un procedimiento para administrar una proteína transgénica en un animal, que comprende administrar en un animal la composición farmacéutica que comprende un homogeneizado seco estable que comprende un material vegetal transgénico deshidratado que contiene una proteína transgénica, opcionalmente mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización, la proteína transgénica presente en el homogeneizado seco estable es una vacuna.

25 La invención proporciona además procedimientos de anticoncepción que utilizan productos farmacéuticos a base de plantas transgénicas.

La presente invención utiliza la expresión cromosómica vegetal de la proteína anticonceptiva en ausencia de un producto intermedio vírico.

La invención proporciona un procedimiento de anticoncepción que comprende:

30 administrar material vegetal transgénico que comprende una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido anticonceptivo en un animal, y

en el que dicha administración reduce el número medio de descendientes producidos en cada ciclo reproductivo por dicho animal en por lo menos 50%.

La invención proporciona además un procedimiento de anticoncepción que comprende:

35 administrar material vegetal transgénico que comprende una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido anticonceptivo en un animal en una cantidad efectiva para inducir la anticoncepción, y

en el que dicha administración induce una respuesta inmunológica de la mucosa en dicho animal frente a dicha proteína anticonceptiva.

La invención proporciona además un procedimiento de anticoncepción que comprende:

40 administrar material vegetal transgénico que comprende una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido anticonceptivo en un animal, en el que dicho ácido nucleico se integra en un cromosoma de la planta, y

en el que dicho procedimiento de anticoncepción reduce el número medio de descendientes en cada ciclo reproductivo producido por dicho animal al que se ha administrado dicho material vegetal transgénico en por lo menos 50%.

La invención proporciona además un procedimiento de anticoncepción que comprende:

45 administrar material vegetal transgénico que comprende una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido anticonceptivo en un animal en una cantidad eficaz para inducir la anticoncepción, en el que dicho ácido nucleico se integra en un cromosoma de la planta, y

en el que dicho procedimiento de anticoncepción reduce el número medio de descendientes en cada ciclo

reproductivo producido por dicho animal al que se ha administrado dicho material vegetal transgénico en por lo menos 50%.

En una forma de realización preferida, dicho material vegetal transgénico se selecciona de entre el grupo constituido por hoja, raíz, brote, tallo, fruto, tubérculo, flor y semilla.

5 En una forma de realización más preferida, dicho material vegetal transgénico es comestible.

En otra forma de realización preferida, dicho polipéptido anticonceptivo codificado por dicho ácido nucleico se selecciona de entre el grupo constituido por una glucoproteína de zona pelúcida, GnRH, LHRH, LH, LDH y antígenos antiespermáticos.

10 En una forma de realización más preferida, dicha glucoproteína de zona pelúcida se selecciona de entre el grupo constituido por ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4.

En una forma de realización más preferida, dicha glucoproteína de zona pelúcida es ZP3.

En una forma de realización preferida, dicha proteína anticonceptiva es específica de una especie.

En otra forma de realización preferida, dicho ácido nucleico codificante de una proteína anticonceptiva comprende además una secuencia codificante de una proteína de direccionamiento mucoso.

15 En una forma de realización más preferida, dicha proteína de direccionamiento mucoso es la subunidad B de la enterotoxina de *E. coli*.

En otra forma de realización preferida, dicho material vegetal transgénico se administra en forma de una planta completa.

En otra forma de realización preferida, dicho material vegetal transgénico se administra por vía mucosal.

20 En todavía otra forma de realización preferida, dicha administración mucosal es por vía oral, nasal u ocular.

La invención proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica de la mucosa que comprende:

25 administrar en un animal, material vegetal transgénico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido anticonceptivo, en el que dicha administración induce una respuesta inmunológica de la mucosa en dicho animal frente a dicha proteína anticonceptiva, y en el que dicha administración reduce el número medio de descendientes producidos en cada ciclo reproductivo por dicho animal en por lo menos 50%.

En una forma de realización preferida, dicho material vegetal transgénico se selecciona de entre el grupo constituido por: hoja, raíz, brote, tallo, fruto, tubérculo, flor y semilla.

30 En otra forma de realización preferida, dicho material vegetal transgénico se encuentra en forma de una planta comestible.

En todavía otra forma de realización, dicho polipéptido anticonceptivo codificado por dicho ácido nucleico se selecciona de entre el grupo constituido por una glucoproteína de zona pelúcida, GnRH, LHRH, LH, LDH y anti-antígeno espermático.

35 En una forma de realización preferida, dicha glucoproteína de zona pelúcida se selecciona de entre el grupo constituido por ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4.

En una forma de realización más preferida, dicha glucoproteína de zona pelúcida es ZP3.

En otra forma de realización, dicha proteína anticonceptiva es específica de una especie.

En otra forma de realización preferida, dicho ácido nucleico codificante de un polipéptido anticonceptivo codifica adicionalmente una proteína de direccionamiento mucoso.

40 En una forma de realización más preferida, dicha proteína de direccionamiento mucoso es la subunidad B de la enterotoxina de *E. coli*.

45 La invención proporciona una planta transgénica que comprende material vegetal transgénico que expresa una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido anticonceptivo, en la que la administración de dicho material vegetal transgénico en un animal induce una respuesta inmunológica de la mucosa en dicho animal frente a dicha proteína anticonceptiva, y en la que dicha administración reduce el número medio de descendientes producido en cada ciclo reproductivo por dicho animal en por lo menos 50%.

La invención también proporciona una planta transgénica que comprende material vegetal transgénico que expresa una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido anticonceptivo, en la que dicha secuencia de

ácidos nucleicos codificante de un polipéptido anticonceptivo no se expresa sobre una partícula vírica, y en la que la administración de dicho material vegetal transgénico en un animal induce una respuesta inmunológica de la mucosa en dicho animal frente a dicha proteína anticonceptiva.

5 La invención proporciona además una planta transgénica que comprende material vegetal transgénico que expresa una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido anticonceptivo, y en la que dicha administración reduce el número medio de descendientes en cada ciclo reproductivo producido por dicho animal al que se administra dicho material vegetal transgénico en por lo menos 50%.

10 La invención proporciona además una planta transgénica comestible que comprende material vegetal transgénico que expresa una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido anticonceptivo, en la que la administración de dicho material vegetal transgénico en un animal induce una respuesta inmunológica de la mucosa en dicho animal frente a dicha proteína anticonceptiva, y en la que dicho ácido nucleico se encuentra integrado en un cromosoma de la planta.

En una forma de realización, dicho polipéptido anticonceptivo se selecciona de entre el grupo constituido por una glucoproteína de zona pelúcida, GnRH, LHRH, LH, LDH y antígenos antiespermáticos.

15 En una forma de realización preferida, dicha glucoproteína de zona pelúcida se selecciona de entre el grupo constituido por ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4.

En una forma de realización más preferida, dicha glucoproteína de zona pelúcida o fragmento de la misma es específica de una especie.

20 En otra forma de realización más preferida, dicha glucoproteína de zona pelúcida es ZP3 o un fragmento de la misma.

En una forma de realización, dicha secuencia de ácidos nucleicos codifica adicionalmente una proteína de direccionamiento mucoso.

En una forma de realización preferida, dicha proteína de direccionamiento mucoso es la subunidad B de la enterotoxina de *E. coli*.

25 En otra forma de realización preferida, dicha planta es monocotiledónea.

En todavía otra forma de realización preferida, dicha planta es dicotiledónea.

En todavía otra forma de realización preferida, dicha planta se selecciona de entre el grupo constituido por plantas tomateras, plantas del arroz, plantas del trigo, plantas del maíz, plantas de la zanahoria, plantas patateras, manzanos, plantas de la soja, plantas de la alfalfa, plantas *Medicago*, plantas hortalizas, y plantas frutales.

30 La presente invención proporciona una célula vegetal que comprende un vector ácido nucleico, en el que el vector ácido nucleico codifica un polipéptido anticonceptivo, en el que el vector ácido nucleico se incorpora y se expresa a partir del cromosoma de la célula vegetal, y en el que la administración de la célula vegetal en un animal reduce el número medio de descendientes producido en cada ciclo reproductivo por parte del animal en por lo menos 50%.

35 En una forma de realización, el polipéptido anticonceptivo codificado por el vector ácido nucleico se selecciona de entre el grupo constituido por una glucoproteína de zona pelúcida, GnRH, LH, LDH y antígenos antiespermáticos.

En otra forma de realización, la glucoproteína de zona pelúcida se selecciona de entre el grupo constituido por ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4.

En todavía otra forma de realización, el polipéptido anticonceptivo es específico de una especie.

40 En una forma de realización preferida, la glucoproteína de zona pelúcida es ZP3.

En una forma de realización, el vector ácido nucleico codifica además una proteína de direccionamiento mucoso.

En una forma de realización preferida, la proteína de direccionamiento mucoso es la subunidad B de la enterotoxina de *E. coli*.

45 En una forma de realización, la célula vegetal se obtiene a partir de una planta monocotiledónea.

En una forma de realización, la célula vegetal se obtiene a partir de una planta dicotiledónea.

En una forma de realización preferida, la célula vegetal se selecciona de entre el grupo constituido por células de planta tomatera, células de planta arrozera, células de planta del trigo, células de planta del maíz, células de planta de la zanahoria, células de planta patatera, células de manzano, células de planta de la soja, células de planta hortaliza

y células de planta frutal.

5 La presente invención proporciona además un vector plásmido para transformar una célula vegetal, que comprende: una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido anticonceptivo, un promotor funcional en una planta ligado funcionalmente a la secuencia de ácidos nucleicos codificante del polipéptido anticonceptivo que puede dirigir la síntesis del polipéptido anticonceptivo en la célula vegetal, y en la que la administración del a célula vegetal que comprende el vector plásmido en un animal induce una respuesta inmunológica de la mucosa en el animal, en la que la administración reduce el número medio de descendientes producido en cada ciclo reproductivo por parte del animal en por lo menos 50%.

10 En una forma de realización, el polipéptido anticonceptivo codificado por la secuencia de ácidos nucleicos se selecciona de entre el grupo constituido por una glucoproteína de zona pelúcida, GnRH, LHRH, LH, LDH y antígenos antiespermáticos.

En una forma de realización, la glucoproteína de zona pelúcida se selecciona de entre el grupo constituido por ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4.

En otra forma de realización, la célula vegetal se obtiene de una planta comestible.

15 En una forma de realización, el vector plásmido comprende además una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína de direccionamiento mucoso.

En una forma de realización preferida, la proteína de direccionamiento mucoso es la subunidad B de la enterotoxina de *E. coli*.

20 La invención proporciona además una composición alimentaria que comprende por lo menos una parte de la planta transgénica indicada anteriormente, que puede ser ingerida por un animal, en el que la ingestión de la planta transgénica induce una respuesta inmunológica de la mucosa en el animal, y en el que la ingestión reduce el número medio de descendientes producido en cada ciclo reproductivo por parte del animal en por lo menos 50%.

25 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende por lo menos una parte de la planta transgénica indicada anteriormente conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable, en el que la administración de la composición farmacéutica en un animal reduce el número medio de descendientes producido en cada ciclo reproductivo por parte del animal en por lo menos 50%.

30 La presente invención proporciona además una composición que comprende un adyuvante saponina mezclado con material vegetal transgénico tratado para la administración oral en un animal, en la que la administración de la composición reduce el número de descendientes producido por el animal en cada ciclo reproductivo en por lo menos 50%.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticonceptivo" se refiere a un agente que se utiliza para la anticoncepción. El término "anticoncepción" se define como la reducción del número de descendientes producido por un animal en un único ciclo reproductivo, o el bloqueo de la fertilización de un oocito por parte de un espermatozoo en una reproducción sexual. El "bloqueo" de la fertilización puede confirmarse a partir de una reducción del número de descendientes producido por un animal hembra al que se ha administrado el "anticonceptivo" tal como se indica a continuación. Tal como se utiliza en la presente memoria, "anticonceptivo" se refiere a la reducción o bloqueo de la fertilización indicado, o el bloqueo de la implantación del cigoto, durante por lo menos un ciclo reproductivo.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "reproducción sexual" se refiere a la forma de reproducción exclusivamente de los mamíferos. Implica la fertilización de un tipo de célula sexual por otro tipo (gameto: óvulo para la hembra y espermatozoide para el macho), la producción de una nueva célula (denominada cigoto), que se desarrolla en un nuevo organismo. Los óvulos o espermatozoides se producen en los órganos de la reproducción de la hembra o del macho. En un único proceso de reproducción sexual, tras la fertilización del óvulo por parte del espermatozoide, la hembra portadora del óvulo fertilizado habitualmente no puede producir más óvulos maduros hasta la reproducción (nacimiento) de los descendientes.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "ciclo reproductivo" se refiere a un único proceso de reproducción sexual que comprende la fertilización de un óvulo maduro y la reproducción de descendientes antes de que pueda producirse la reproducción posterior. Un "ciclo reproductivo", según la invención, también se refiere a un único proceso potencial de reproducción bloqueado mediante anticoncepción que de otra manera podría producirse.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "proteína anticonceptiva" se refiere a un polipéptido, o fragmento de un polipéptido, que reduce el número de descendientes producido por un animal en cada ciclo reproductivo. Para especies animales que producen una camada media de 3 descendientes o más, una "proteína anticonceptiva" es un polipéptido que reduce el tamaño de camada en por lo menos 60%, 70%, 80%, 90% e incluso hasta en 100%. Para las especies animales que producen una camada media de 1 ó 2 descendientes, una "proteína anticonceptiva" se refiere a una proteína o polipéptido que reduce el tamaño de camada en por lo menos 50% (es decir, de 2 descendientes a 1), y hasta en 100% (es decir, de 1 ó 2 descendientes a ninguno). Alternativamente, una

5 "proteína anticonceptiva" puede referirse a un polipéptido que evita la fertilización de un oocito por parte de un espermatozoo, o que impide la implantación de un huevo fertilizado en el útero de un animal, y que de esta manera reduce el tamaño de camada medio, tal como se ha indicado anteriormente. Alternativamente, una "proteína anticonceptiva" se refiere a un polipéptido que puede estimular una respuesta inmunológica de la mucosa en un animal, en la que la respuesta inmunológica induce anticuerpos contra la "proteína anticonceptiva". Los anticuerpos pueden unirse a sitios sobre hormonas sexuales, el oocito o el espermatozoo, e impedir la madurez sexual, la fertilización del oocito y/o la implantación de un oocito fertilizado en el útero del animal, reduciendo de esta manera el tamaño de camada. Los ejemplos de "proteínas anticonceptivas" útiles en la presente invención comprenden de manera no limitativa glucoproteínas de zona pelúcida, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), hormona luteinizante (LH), lactato deshidrogenasa (LDH), y antígenos antiespermáticos. Entre los "antígenos antiespermáticos" se incluyen, aunque sin limitación, SP5, SP56, fertilina, PH30, LDH-C4 y P10.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, "una cantidad efectiva para inducir la anticoncepción", se refiere a una cantidad de material vegetal transgénico que induce la anticoncepción. Preferentemente, el material vegetal transgénico en "una cantidad efectiva para inducir la anticoncepción" es una cantidad de material vegetal que reduce el tamaño de camada en 10%, 30%, 60%, 80% y hasta en 100%. Para especies animales que producen una camada media de 1 ó 2 descendientes en cada ciclo reproductivo, el material vegetal transgénico en "una cantidad efectiva para inducir la anticoncepción" es una cantidad de material vegetal que reduce el tamaño de camada en por lo menos 50% y hasta en 100%. Tal como se utiliza en la presente memoria, "una cantidad efectiva para inducir la anticoncepción" se refiere a una cantidad de material vegetal transgénico que induce la anticoncepción es por lo menos aproximadamente 5 µg de proteína anticonceptiva por gramo de material vegetal transgénico seco en peso, preferentemente por lo menos 10 µg, 20 µg, 40 µg, 60 µg, 80 µg, 100 µg, 120 µg, 140 µg, 150 µg o más, de proteína anticonceptiva por gramo de peso de planta transgénica seca.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, "planta transgénica" se refiere a una planta, cuyas células expresan establemente un gen foráneo "heterólogo", en el que el gen foráneo se integra en el cromosoma de la célula vegetal y no porta consigo una secuencia de vector vírico propia del virus, en el que el gen foráneo se transmite a la siguiente generación de plantas y es capaz de expresarse a partir del cromosoma de la célula vegetal huésped. Una "planta transgénica" comprende una "pluralidad de células de planta transgénica". Una "planta transgénica" se refiere a la planta completa, o a una parte de la misma, que comprenden de manera no limitativa, raíces, tallos, hojas, pedúnculos, semillas, frutos, tubérculos, flores, polen y similares. Los ejemplos de genes foráneos heterólogos comprenden de manera no limitativa proteína de cápside del virus Norwalk (NVCP), antígeno de hemaglutinación del virus Influenza aviar (AIV-HA), neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-HN), glucoproteína 3 de zona pelúcida (ZP3), y antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg).

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, una "proteína heteróloga" se refiere a una proteína expresada a partir de un "gen heterólogo". Un "gen heterólogo" es un gen o fragmento génico que codifica una proteína obtenida a partir de una o más fuentes que no son el genoma de la especie vegetal en la que se expresa finalmente. La fuente puede ser natural, por ejemplo el gen puede obtenerse a partir de otra fuente de materia viva, tal como bacterias, virus, levaduras, hongos y similares, o de una especie de planta diferente. La fuente también puede ser sintética, por ejemplo el gen o fragmento génico pueden prepararse *in vitro* mediante síntesis química. El término "heterólogo" también puede utilizarse en situaciones en las que la fuente del fragmento génico se encuentra en otro sitio en el genoma de la planta en la que se expresa finalmente. La "proteína heteróloga" puede ser un antígeno, u otras proteínas terapéuticas, tales como, aunque sin limitación, endostatina o angiostatina. La "proteína heteróloga" también puede ser un anticuerpo o complejo de anticuerpos, por ejemplo "planticuerpos". Los "planticuerpos" son anticuerpos que se construyen en plantas.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, "material vegetal transgénico" se refiere a una planta transgénica, tratada o no tratada tal como se define en la presente memoria. El "material vegetal transgénico", según la invención, puede ser una planta transgénica completa, o una parte de una planta transgénica, que comprende de manera no limitativa, una "hoja transgénica", "raíz transgénica", "brote transgénico", "tallo transgénico", "fruto transgénico", "tubérculo transgénico", "flor transgénica" y "semilla transgénica". La expresión "material vegetal transgénico" también se refiere a una o a una pluralidad de "células vegetales transgénicas". Una "célula vegetal transgénica" se refiere a una célula vegetal que expresa establemente un gen foráneo, en la que el gen foráneo se integra en el cromosoma de la célula vegetal y no porta consigo una secuencia de vector vírico propia del virus, en la que el gen foráneo se transmite a la siguiente generación de células y es capaz de expresarse a partir del cromosoma de la célula vegetal del huésped. Además, la expresión "material vegetal transgénico" se refiere a una "suspensión de células transgénicas" que comprende una o una pluralidad de "células vegetales transgénicas" obtenidas mediante técnicas de cultivo celular bien conocidas (Street H.E., Plant tissue and cell culture: botanical monographs, vol. II, University of California, Berkeley, 1973).

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, material vegetal transgénico "intacto" se refiere a la planta completa o a partes de planta que no han sido tratadas adicionalmente para reducir su tamaño, por ejemplo mediante corte en rodajas, troceado, cortado, o triturado en puré. En general, el material vegetal se encuentra "intacto" o "completo" tal como se recolecta, pero puede ser simplemente parte de la planta transgénica. Por ejemplo, una "hoja transgénica", "raíz transgénica", "brote transgénico", "tallo transgénico", "fruto transgénico", "tubérculo transgénico",



"flor transgénica" o "semilla transgénica" intacta.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el material vegetal transgénico "dividido" se refiere a una planta "completa" o partes de la planta "intactas" que se han reducido de tamaño por medios conocidos de la técnica. Los medios de "división" comprenden de manera no limitativa, troceado en cubos, cuarteado, picado, corte en rodajas, troceado, triturado en puré o en pulpa, molido, machacado, prensado o partido. El material vegetal transgénico, cortado o no cortado, cocido o no cocido, puede triturarse en pulpa mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, incluyendo el exprimido, mezclado o triturado en puré en una trituradora doméstica a temperatura ambiente durante 20 minutos como máximo. El material vegetal triturado en pulpa puede mezclarse con excipientes adecuados que resulten farmacéuticamente aceptables y compatibles con la proteína transgénica. El material vegetal transgénico puede "dividirse" en unos polvos finos.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, "homogeneizado" se refiere a una reducción de órganos vegetales mayores, hasta una mezcla uniforme en la que la variación de las cantidades de proteína homóloga de tejido a tejido se combina en un lote uniforme de material. De esta manera, los términos "homogéneo" o "homogeneizado" también se refieren a material vegetal que ha sido dividido o reducido de manera que los tejidos vegetales, que pueden contener cantidades diferentes de proteínas de la planta y/o de proteína transgénica en diferentes tejidos, se agrupa en un lote de material que contiene una cantidad uniforme de dichas proteínas.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, una "planta comestible" se refiere a una planta que puede ser consumida por un animal, que presenta valor nutricional y que no es tóxica. Una "planta comestible" puede ser un "alimento" que es una planta o un material obtenido de una planta que es ingerida por seres humanos u otros animales. El término "alimento" pretende incluir material vegetal que puede utilizarse para alimentar a seres humanos y otros animales o a un material vegetal tratado que se utiliza para alimentar a seres humanos y a otros animales. Los materiales obtenidos de una planta pretenden incluir un componente de una planta que es finalmente ingerida por un ser humano u otro animal. Los ejemplos de "planta comestible" comprenden de manera no limitativa, plantas tomateras, plantas arroceras, plantas del trigo, plantas del maíz, plantas de la zanahoria, plantas patateras, plantas del manzano, plantas de la soja, plantas de la alfalfa, plantas *Medicago*, plantas hortalizas y plantas frutales.

20 En algunos casos, una "planta comestible" es "ingerible debido a su valor nutricional", que se refiere a una planta o parte de la misma que proporciona una fuente de energía metabolizable, vitaminas o cofactores suplementarios o necesarios, fibra u otro efecto beneficioso tras la ingestión por parte de un animal. De esta manera, en el caso de que el animal que debe tratarse mediante los procedimientos de la presente invención sea un herbívoro capaz de digestión ayudada por bacterias de la celulosa, dicho alimento puede encontrarse representado por una planta herbácea transgénica. Entre otras plantas comestibles se incluyen hortalizas y frutas. De manera similar, aunque las plantas de lechuga transgénicas, por ejemplo, no contribuyen sustancialmente como fuente energética, como moléculas de bloque constructivo tales como proteínas, carbohidratos o grasas, ni otras vitaminas o cofactores necesarios o suplementarios, una planta de lechuga transgénica para las moléculas de ácidos nucleicos indicadas en la presente invención utilizada como alimento para un animal se encontraría comprendida dentro de la definición de un alimento tal como se utiliza en la presente memoria en el caso de que la ingestión de la lechuga contribuyese fibra beneficiosa para el animal, incluso en el caso de que el animal no pudiese digerir el contenido celulósico de la lechuga. Por lo tanto, una "planta comestible" excluye el tabaco.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el material vegetal transgénico "tratado" puede referirse a material vegetal que se "corta", en donde "corta" se refiere a "troceado", "picado", "troceado en cubos", o de otro modo reducir el material vegetal a trozos más pequeños con un tamaño mínimo de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>. El material vegetal transgénico, "cortado" o no cortado, puede tratarse adicionalmente mediante "cocción" del material vegetal utilizando cualquier técnica conocida en la materia, incluyendo, aunque sin limitación, hervido, horneado y ligeramente frito, en el que la temperatura del material vegetal se eleva hasta por lo menos 140°C, 160°C, 180°C, y hasta 200°C, durante por lo menos aproximadamente 5 minutos, y durante aproximadamente 30 minutos como máximo. El material vegetal transgénico "cocido" que resulta útil en la presente invención se administra sin purificación de la proteína anticonceptiva, debido a que el material vegetal "cocido" puede comprender células vegetales rotas. El material vegetal transgénico, "cortado" o no cortado, "cocido" o no cocido, puede tratarse adicionalmente mediante "agrupación" del material vegetal con material vegetal o no vegetal transgénico mediante, por ejemplo, mezcla, en la que el material vegetal transgénico comprende por lo menos 50% en peso de la agrupación de material vegetal transgénico y material no transgénico o no vegetal. Por ejemplo, el maíz transgénico puede "tratarse" mediante "agrupación" de las mazorcas del maíz con otras hortalizas, o pueden "tratarse" plantas de soja transgénica mediante "agrupación" del material vegetal con otros ingredientes, tales como especias y/o otros saborizantes, con el fin de producir, por ejemplo, hamburguesas de soja, batidos de soja o leche de soja.

30 Alternativamente, el material vegetal transgénico que resulta útil en la presente invención puede "tratarse" mediante "licuefacción" del material vegetal transgénico, cortado o no cortado, cocido o no cocido, mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, incluyendo exprimido, mezclado o triturado en puré en una trituradora doméstica a temperatura ambiente durante 20 minutos como máximo. El material vegetal "licuado" puede administrarse a continuación directamente a un animal, o puede tratarse adicionalmente mediante mezcla del material vegetal "licuado" con los excipientes adecuados que resulten farmacéuticamente aceptables y compatibles con la proteína anticonceptiva. El material vegetal "licuado" puede "tratarse" adicionalmente mediante mezcla del material vegetal líquido con una crema, pomada o ungüento farmacéuticamente aceptable. Resulta posible que durante la

"licuación" del material vegetal transgénico, las células vegetales transgénicas resulten rotas, liberando de esta manera su contenido en la mezcla "licuada". Una mezcla "licuada" de esta naturaleza resulta útil en la presente invención con la condición de que las proteínas anticonceptivas expresadas por las células vegetales transgénicas no se purifiquen a partir del material vegetal "licuado".

5 Alternativamente, el material vegetal transgénico, cortado o no cortado, cocido o no cocido, que resulta útil en la presente invención, puede "tratarse" mediante "lío-filización" o "deshidratado" del material vegetal para eliminar el agua. La "deshidratación" puede realizarse mediante secado al aire o secado mediante pulverización o mediante "lío-filización", en la que la "lío-filización" se refiere a la preparación de una composición vegetal en forma seca mediante congelación rápida y deshidratación en el estado congelado (en ocasiones denominada sublimación). Este procedimiento puede realizarse bajo vacío a una presión suficiente para mantener producto congelado con la temperatura ambiental del recipiente contenedor a aproximadamente la temperatura ambiente, preferentemente inferior a aproximadamente 500 mTorr, más preferentemente inferior a aproximadamente 200 mTorr, todavía más preferentemente inferior a aproximadamente 1 mTorr, durante aproximadamente 1 a 72 horas. El material vegetal puede "deshidratarse" mediante la introducción del material vegetal en un horno a una temperatura de entre aproximadamente 60°C y 200°C durante aproximadamente 1 a 72 horas. El material vegetal se considera suficientemente "lío-filizado" o "deshidratado" cuando el peso del material vegetal deja de cambiar con el tiempo. Por ejemplo, el peso de material vegetal introducido en un horno a las temperaturas indicadas anteriormente se reducirá con el tiempo a medida que se evapora el agua. Al cesar el cambio de peso, se ha evaporado toda el agua, y el material vegetal puede considerarse "deshidratado". Preferentemente, sea cual sea el procedimiento de secado utilizado, el material fino se deshidrata suficientemente para eliminar por lo menos 90% de la totalidad del contenido de agua en peso. El material vegetal "lío-filizado" o "deshidratado" puede "tratarse" adicionalmente mediante emulsión del material vegetal "lío-filizado" o "deshidratado" con excipientes que resulten farmacéuticamente aceptables y compatibles con el polipéptido anticonceptivo. Los excipientes adecuados comprenden, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y combinaciones de los mismos, en los que el material vegetal "lío-filizado" o "deshidratado" comprende por lo menos 40%, y preferentemente por lo menos 50% en peso de la mezcla de excipiente. Además, si se desea, el material vegetal "lío-filizado" o "deshidratado" puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, o adyuvantes que incrementen la efectividad del material vegetal. Tal como se utiliza en la presente memoria, el material vegetal "lío-filizado" o "deshidratado" puede tratarse adicionalmente mediante la mezcla del material vegetal con cremas, pomadas, ungüentos o supositorios farmacéuticamente aceptables, en los que el material vegetal comprende por lo menos 40%, y preferentemente por lo menos 50% en peso de la mezcla. Alternativamente, el material vegetal "deshidratado" puede tratarse adicionalmente mediante reconstitución del material vegetal con un líquido, tal como, aunque sin limitación, zumo de fruta, zumo de hortaliza, leche, agua, u otras formulaciones de vacuna, con el fin de formar vacunas multivalentes o multicomponente.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, "excipientes" se refiere a material extraño añadido en cualquier etapa del tratamiento. Por ejemplo, pueden añadirse excipiente al dividir el material vegetal transgénico, o añadirse durante la deshidratación, o añadirse durante la mezcla antes o después de la deshidratación. Los excipientes adecuados comprenden de manera no limitativa, adyuvantes, tampones, azúcares, antioxidantes, estabilizantes o polvos antigénicos.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, "polipéptido" se refiere a una serie de residuos aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos entre el carbono  $\alpha$ -carbonilo de un residuo aminoácido y el nitrógeno  $\alpha$  del siguiente. Un "polipéptido" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una proteína completa, a un fragmento de proteína, o a un epítipo inmunogénico de una proteína.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, "glucoproteína de zona pelúcida" se refiere a un grupo de tres glucoproteínas sulfatadas comprendidas en la zona pelúcida de mamífero. La zona pelúcida comprende además una capa que consiste de microvilli del oocito, y procesos celulares de las células foliculares. Una "glucoproteína de zona pelúcida", en particular ZP3, funciona como el sitio de unión principal para el esperma de mamífero. La zona pelúcida y, en particular, la glucoproteína de zona pelúcida ZP3, puede identificarse utilizando anticuerpos específicos para ZP3 y técnicas inmunohistoquímicas estándares bien descritas en la materia (East *et al.*, Dev. Biol. 109:268, 1985). La nomenclatura utilizada en la técnica para describir las glucoproteínas ZP es variable. Entre los ejemplos de glucoproteínas ZP se incluyen, aunque sin limitación, proteínas ZP aisladas a partir del cerdo: PZI, PZIII, 90K, 65K, 55K, 25K, ZP1, ZP2, ZP3 (PPZA), ZP4, 87K (ZP1/ZP2), 58K; proteínas ZP aisladas a partir del conejo: RZI, RZII, RZIII, ZP1, ZP2, ZP3, RZII; proteínas ZP aisladas a partir del ratón: ZP1, ZP2, ZP3; proteínas ZP aisladas a partir del gato: CZI y CZII; proteína ZP aisladas a partir del perro: DZI, DZII y DZIII; proteína ZP aisladas a partir del mono ardilla: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4; proteínas ZP aisladas a partir del ser humano: ZP1, ZP2 y ZP3. Además de los péptidos ZP indicados anteriormente, la secuencia de nucleótidos codificante de las glucoproteínas ZP de varias especies (por ejemplo el ratón, el ser humano, el hámster y el conejo) han sido elucidadas y, de esta manera, resultan útiles en la presente invención debido a que codifican proteínas anticonceptivas. La presente invención utiliza la denominación ZP1, 2 ó 3 para las tres glucoproteínas ZP. Sin embargo, otros en la técnica han agrupado las glucoproteínas ZP en ZPA, B y C, en donde ZPA incluye los péptidos denominados ZP1 y ZP2; ZPB incluye los péptidos denominados ZP3 $\alpha$  y rc55, y ZPC incluye los péptidos denominados ZP3 $\beta$  y ZP3 (ver, por ejemplo, la patente US n° 5.989.550).

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, "inmunoanticoncepción" se refiere a la anticoncepción reversible

temporal y también a la anticoncepción no reversible permanente, o esterilización, resultante de una respuesta inmunológica contra una proteína anticonceptiva. Tal como se utiliza en la presente memoria, la "inmunoanticoncepción" se considera "efectiva" si el número medio de descendientes en cada ciclo reproductivo producido por un animal sometido a "inmunoanticoncepción" se reduce en por lo menos 60%, 70%, 80%, 90% e incluso hasta 100% para especies animales que producen un número de camada medio de tres o más descendientes. Para las especies animales que producen una camada media inferior a 3 descendientes, la inmunoanticoncepción "efectiva" resultaría en una reducción del tamaño de camada de por lo menos 50%, y de hasta 100%.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "respuesta inmunológica" se refiere a una respuesta producida por el sistema inmunológico de un organismo frente a una sustancia, que incluye, aunque sin limitación, frente a proteínas foráneas o propias. Existen tres tipos generales de "respuesta inmunológica", incluyendo, aunque sin limitación, "respuestas inmunológicas" mucosal, humoral y celular. Una "respuesta inmunológica de la mucosa" resulta de la producción de anticuerpos IgA secretorios (slgA) en secreciones que bañan todas las superficies mucosales del tracto respiratorio, tracto gastrointestinal y tracto genitourinario, y en secreciones procedentes de todas las glándulas secretorias (McGhee J.R. *et al.*, *Annals NY Acad. Sci.* 409, 1983). Estos anticuerpos slgA actúan evitando la colonización de patógenos de una superficie de la mucosa (Williams R.C. *et al.*, *Science* 177:697, 1972; McNabb P.C. *et al.*, *Ann. Rev. Microbiol.* 35:477, 1981), actuando de esta manera como primera línea de defensa impidiendo la colonización o invasión a través de una superficie de la mucosa. La producción de slgA puede estimularse mediante inmunización local de la glándula o tejido secretorio, o mediante presentación de un antígeno al tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT o placas de Peyer) o a tejido linfoide asociado a los bronquios (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). Las células de los micropliegues membranosos, también conocidas como células M, cubren la superficie del GALT y del BALT y pueden encontrarse asociadas a otras superficies mucosas secretorias. Las células M actúan captando muestras de antígenos del espacio luminal contiguo a la superficie mucosa y transfiriendo dichos antígenos a las células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos), que, a su vez, presentan el antígeno a un linfocito T (en el caso de los antígenos T-dependientes), que procesan el antígeno para la presentación a una célula B dedicada. Seguidamente resulta la estimulación de las células B, que proliferan, migran y finalmente se transforman en una célula plasmática secretora de anticuerpos que produce IgA contra el antígeno presentado. Al ser incorporado el antígeno por las células M sobre el GALT y BALT, resulta una inmunidad mucosa generalizada, con la producción de slgA contra el antígeno en todos los tejidos secretorios del cuerpo (Cebra *et al.*, *supra*; Bienenstock *et al.*, *supra*; Weisz-Carrington *et al.*, *supra*; McCaughan *et al.*, *supra*). Por lo tanto, la inmunización oral es una vía importante para estimular una respuesta inmunológica de la mucosa generalizada y, además, conduce a la estimulación local de una respuesta inmunológica secretoria en la cavidad oral y en el tracto gastrointestinal.

Una "respuesta inmunológica" puede medirse utilizando una técnica conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, puede obtenerse suero, sangre u otras secreciones de un organismo para el que se sospeche la presencia de una "respuesta inmunológica", y someterse a ensayo para la presencia de cualquiera de las inmunoglobulinas anteriormente mencionadas, utilizando un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA; patente US nº 5.951.988; Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª edición, John Wiley & Sons, Inc., 1995). Según la presente invención, una proteína anticonceptiva de la presente invención puede considerarse que estimula una "respuesta inmunológica" en el caso de que la medida cuantitativa de las inmunoglobulinas en un animal tratado con una proteína anticonceptiva detectada mediante ELISA sea estadísticamente diferente de la medida de las inmunoglobulinas detectadas en un animal no tratado con una proteína anticonceptiva, en donde dichas inmunoglobulinas son específicas de la proteína anticonceptiva. Puede utilizarse una prueba estadística conocida de la técnica para determinar la diferencia entre los niveles de inmunoglobulina medidos, incluyendo, aunque sin limitación, ANOVA, la prueba t de Student, y similares, en los que el valor P sea por lo menos <0,1, <0,05, <0,01, <0,005, <0,001 e incluso <0,0001.

Una "respuesta inmunológica" puede ser medida utilizando otras técnicas tales como inmunohistoquímica utilizando anticuerpos marcados que son específicos para las partes de las inmunoglobulinas producidas durante la "respuesta inmunológica". Puede obtenerse tejido (por ejemplo, tejido ovárico) de un animal al que se ha administrado una proteína anticonceptiva según la invención y ser tratado por la inmunohistoquímica que utiliza técnicas conocidas por el experto en la materia (Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* 3ª Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1995). Los datos microscópicos obtenidos mediante inmunohistoquímica pueden ser cuantificados mediante exploración de la muestra de tejido teñida inmunohistoquímicamente y cuantificando el nivel de tinción utilizando un programa de software informático conocido por los expertos en la materia que comprende de manera no limitativa NIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Según la presente invención, puede decirse que una proteína anticonceptiva de la presente invención estimula una "respuesta inmunológica" si la medición cuantitativa de la tinción inmunohistoquímica en un animal tratado con una proteína anticonceptiva es diferente estadísticamente de la medición de la tinción inmunohistoquímica detectada en un animal no tratado con una proteína anticonceptiva, en la que dicha tinción histoquímica requiere la unión específica para la proteína anticonceptiva. Una prueba estadística conocida en la técnica puede ser utilizada para determinar la diferencia en los niveles de tinción inmunohistoquímica medidos que comprende de manera no limitativa ANOVA, prueba T de Student, y similares, en la que el valor de P es de por lo menos <0,1, <0,05, <0,01, <0,005, <0,001, e incluso <0,0001.

Una "respuesta inmunológica de la mucosa" puede "detectarse" utilizando cualquiera de las técnicas

anteriormente indicadas. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo ELISA utilizando anticuerpos anti-IgA para detectar y medir las inmunoglobulinas específicamente de las mucosas (Dickinson B.L. y Clements J.D., Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity, *Infect. Immun.* 63:1617-1623, 1995).

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "adyuvante" es un compuesto que, al administrarse conjuntamente con un antígeno, potencia la respuesta inmunológica frente al antígeno [(Coligan L.G. *et al.*, eds, *Current Protocols in Immunology*, New York: John Wiley & Sons, 1995)]. Un adyuvante puede resultar efectivo mediante el retraso de la destrucción de un antígeno, al permitir la persistencia de niveles bajos aunque efectivos de antígeno en los tejidos, o mediante la activación no específica del sistema inmunológico, al provocar una respuesta inflamatoria u otra reacción inmunológica que proporciona una sensibilidad inmunológica incrementada.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, "específico de una especie" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos que es única de la especie a partir de la que se obtiene. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos "específica de una especie" codificante de una glucoproteína de zona pelúcida se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comparte una identidad de secuencia no superior a por lo menos entre 95% y 70% respecto a una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una glucoproteína de zona pelúcida correspondiente de una especie diferente, una identidad de secuencia no superior a entre 80% y 50%, y una identidad de secuencia no superior a entre 60% y 40%. La "especificidad de especie" de una secuencia particular de ácidos nucleicos o de aminoácidos puede determinarse utilizando una técnica conocida por el experto en la materia, incluyendo el análisis BLAST.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, una "proteína de direccionamiento mucoso" se refiere a un polipéptido que, al conjugarse o expresarse como proteína de fusión con un segundo péptido, incrementa el potencial de combinación de los péptidos para inducir una respuesta inmunológica de la mucosa. Una "proteína de direccionamiento mucoso" puede ser un polipéptido que no es endógeno del organismo en el que se introduce. Los datos disponibles (Black *et al.*, *Infect. Immunol.* 5:1116, 1987) indican que las "proteínas de direccionamiento mucoso", al administrarse oralmente conjuntamente un antígeno (por ejemplo una glucoproteína ZP), actúan como adyuvante, incrementando la respuesta inmunológica protectora. Por lo tanto, se infiere que una "proteína de direccionamiento mucoso" es una proteína que presenta una afinidad de unión a gangliósido para el epitelio mucosal al administrarse dosis de por lo menos 10 µg, dosis de 1 µg, dosis de 500 ng e incluso dosis de 1 ng, provocando de esta manera la traslocación de la proteína a través de la membrana epitelial mucosal, de manera que las "proteínas de direccionamiento mucoso" pueden resultar importantes en la inducción de una respuesta inmunológica secretoria. Por lo tanto, puede preverse que el producto de una fusión génica de una proteína anticonceptiva y una "proteína de direccionamiento mucoso" resultará más fácilmente transportada al interior de las células de la mucosa y conducirá a respuestas inmunológicas secretorias locales incrementadas. Entre los ejemplos de "proteínas de direccionamiento mucoso" comprenden de manera no limitativa las subunidades B y A de la enterotoxina de *E. coli*, la toxina del cólera, la shigatoxina B (StxB), la enterotoxina B estafilocócica (SEB), la proteína de cápside del virus Norwalk (NVCP), y el antígeno de superficie de la hepatitis B. La capacidad de un polipéptido de dirigir la inmunogenicidad de un segundo péptido a la mucosa puede examinarse mediante la medición de la "respuesta inmunológica de la mucosa" (es decir, midiendo el nivel de sIgA), por ejemplo mediante ELISA o inmunohistoquímica, que resulta estimulada por la administración de una combinación de péptidos, y determinando si resulta significativamente incrementada en comparación con la observada al administrarse el segundo péptido sin la "proteína de direccionamiento mucoso" utilizando las técnicas estadísticas indicadas anteriormente para medir una respuesta inmunológica.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, "animal" se refiere a un organismo clasificado dentro del reino filogenético Animalia. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "animal" también se refiere a un mamífero. Los animales que resultan útiles en la presente invención comprenden de manera no limitativa, mamíferos, marsupiales, ratones, perros, gatos, vacas, seres humanos, ciervos, caballos, ovejas, ganado, aves de corral, pollos, pavos, avestruces, peces, peces de aleta, moluscos con concha, y similares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "monocotiledónea" se refiere a un tipo de planta cuyos embriones presenta un cotiledón u hoja seminal. Entre los ejemplos de las "monocots" se incluyen, aunque sin limitación, lirios; plantas herbáceas; maíz; cereales, incluyendo avena, trigo y cebada; orquídeas; iris; cebollas y palmeras.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, "dicotiledónea" se refiere a un tipo de planta cuyos embriones presentan dos mitades de semilla o cotiledones. Entre los ejemplos de las "dicots" se incluyen, aunque sin limitación, tabaco; tomate; legumbres, incluyendo alfalfa; *Quercus*; arces; rosas; mentas; cucurbitáceas; margaritas; nueces; cactus; violetas y ranúnculos.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, "vector ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido unida. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ácidos nucleicos circular de doble cadena en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ácidos nucleicos. Determinados vectores pueden presentar replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo vectores bacterianos que presentan un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo vectores no episómicos de mamífero) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de esta manera se replican conjuntamente con el genoma del huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que se encuentran

60

funcionalmente ligados. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión que resultan útiles en las técnicas de ácidos nucleicos recombinantes con frecuencia se encuentran en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse intercambiamente, debido a que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "promotor" se refiere a una secuencia de ADN, habitualmente cadena arriba (5') de la región codificante de un gen estructural, que controla la expresión de la región codificante mediante la provisión de sitios de reconocimiento y de unión para la ARN polimerasa y de otros factores que pueden resultar necesarios para el inicio de la transcripción. La selección del promotor dependerá de la secuencia de ácidos nucleicos de interés. Un "promotor funcional en una planta" se refiere a un "promotor" que puede dar soporte al inicio de la transcripción en células vegetales. Entre los "promotores funcionales en plantas" que resultan útiles en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV); promotores de genes de proteínas de reserva de semilla, tales como Zma10Kz o Zmag12, genes inducibles por la luz, tales como la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa (rbcS), genes inducidos por estrés, tales como de la alcohol deshidrogenasa (Adh1), o los "genes de mantenimiento", que se expresan en todas las células (tales como *Zmact*, el gen de actina del maíz), el promotor E8 del tomate; la ubiquitina; la manopina sintetasa (*mas*); la actina 1 del arroz; la proteína glicina de la semilla de la soja (*Gyl*); la proteína de reserva vegetativa de la soja (*vsp*), y la almidón sintasa unida al gránulo (*gbss*). Entre otros "promotores funcionales en plantas" se incluyen promotores de genes que es conocido que proporcionan un nivel elevado de expresión en partes comestible de plantas, tales como el promotor del gen de la patatina de la patata.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, "funcionalmente ligado" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes indicados se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia de control "funcionalmente ligada" a una secuencia codificante se liga de manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Una secuencia promotora se encuentra "funcionalmente ligada" a un gen en el caso de que se encuentre suficientemente próxima al sitio de inicio de transcripción de un gen para regular la transcripción del mismo.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "administrado" se refiere a la administración del material vegetal transgénico, células, composiciones y formulaciones farmacéuticas de la presente invención en un animal de manera que se garantice que el material "administrado" entre en contacto con una superficie mucosal del animal en el que se ha administrado. Entre las vías de "administración" que resultan útiles en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, la administración oral, la administración nasal, la administración rectal o vaginal (por ejemplo mediante supositorio o administración tópica), o una vía de administración en la que el material administrado entra en contacto directo con una superficie mucosal (es decir, "administración mucosal"). Tal como se utiliza en la presente memoria, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las características del portador dependerán de la vía de administración.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, una "superficie mucosal", "membrana mucosa", o "mucosa", se refieren a la definición médica bien conocida de estas estructuras, que es la superficie o revestimiento de una estructura que comprende un epitelio, lámina propia y, en el tracto digestivo, una capa de músculo liso. Entre los ejemplos de "superficies mucosales" se incluyen, aunque sin limitación, la capa interna de los bronquios, la capa mucosa de la cavidad timpánica, la capa mucosa interna del colon, la capa interna del conducto deferente, la capa interna del esófago, la capa mucosa del intestino delgado, la capa mucosa de la laringe, la membrana mucosa de la lengua, la membrana pituitaria, la membrana mucosa de la cavidad oral, la membrana mucosa de la faringe, la capa mucosa interna de la tráquea, el revestimiento del conducto auditivo, la capa mucosa del conducto uterino, la capa interna del uréter, la capa interna de la uretra, el endometrio, la membrana mucosa de la vagina, la capa mucosa del estómago, la capa interna de la vejiga urinaria, y la membrana mucosa de la vesícula seminal.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, "especie" se refiere a una división biológica entre un género de organismos y los organismos individuos en el mismo, en el que todos los organismos dentro de la especie comparten una similitud más estrecha en las características esenciales de su morfología general, plan corporal, desarrollo, etc.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, "estable" se refiere a material vegetal que se mantiene conservado a temperatura ambiente. En la presente memoria, "material vegetal transgénico estable" se refiere a material vegetal en el que la proteína "heteróloga" o "proteína transgénica" sigue siendo potente sin pérdida significativa de inmunorreactividad, en el que la inmunorreactividad se mide mediante un ensayo tal como ELISA, transferencia Western cuantitativa, o aglutinación. Una proteína "heteróloga" es estable en el caso de que por lo menos 40% de la inmunorreactividad observada en el momento de la producción, según el procedimiento inventivo, sigue encontrándose presente durante por lo menos 5 meses, y durante periodos más prolongados, de hasta 10 meses, o de 45 12 meses, o de 18 meses o incluso más prolongados.

### **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Figura 1a. Contenido de LTB de muestras de hoja y de fruto procedentes de plantas T<sub>0</sub> determinado mediante ELISA.

Figura 1b. Contenido de LTB de muestras de hojas y de frutos procedentes de plantas T<sub>1</sub> determinado mediante ELISA.

Figura 1c. Comparación entre los niveles de clasificación con respecto al contenido de LTB determinado mediante ELISA.

5  
10  
Figura 2a. Punto final medio de diluciones de anticuerpos anti-LTB en ratones sometidos a ensayo. Las columnas representan la medida de las diluciones de suero en las que la lectura de DO<sub>450</sub> es igual a 0,1 de los seis animales en el mismo tratamiento. Entre los tratamientos se incluyen ratones alimentados con pasta de tomate no transgénico (control), ratones alimentados con pasta de tomate transgénico (Ensayo) y ratones alimentados con pasta de tomate transgénico mezclada con 10 mg de polvos de extracto de *Quillaja* (Garuda). Las barras de error representan el error estándar.

Figura 2b. La figura muestra la relación entre los títulos crecientes de anti-LTB (serie 1) y la fecundidad decreciente (serie 2), tras la administración oral de material crudo de tomate que expresa una proteína de fusión consistente de LT-B fusionado con el epítipo murino ZP3. El tercer conjunto de datos representa el grupo experimental que recibió un adyuvante adicional mezclado en el material de tomate.

15  
20  
Figura 3. Efecto de la administración oral de los materiales sometidos a ensayo sobre la fertilidad de los ratones. Cada columna representa la media de los seis animales en un tratamiento particular, en donde el control representa los resultados de animales alimentados con pasta de tomate no transgénico, Ensayo representa los resultados de animales alimentados con pasta de tomate transgénico, y Ensayo + ady. representa los resultados de animales alimentados con pasta de tomate transgénico mezclada con 10 mg de polvos de adyuvante (Garuda). Las barras de error representan el error estándar.

25  
Figura 4. Efecto de la administración oral de los materiales sometidos a ensayo sobre la fertilidad de ratas de agua. Cada columna representa la media de los seis animales en un tratamiento particular, en donde el control representa los resultados de animales alimentados con pasta de tomate no transgénico, Ensayo representa los resultados de animales alimentados con pasta de tomate transgénico, y Ensayo + ady. representa los resultados de animales alimentados con pasta de tomate transgénico mezclada con 10 mg de polvos de extracto de *Quillaja* (Garuda). Las barras de error representan el error estándar.

Figura 5a. Constructos de fusión de LTB.

Figura 5b. Constructos de fusión de LTB adicionales.

Figura 5c. Casete de fusión N-terminal.

30  
35  
Figura 6. La figura representa los datos de expresión de medias y "línea de élite" de tres fusiones inmunoanticonceptivas expresadas en cultivos de suspensiones celulares de tabaco transgénico (NT-1). La detección de epítopos se basó en una ELISA sándwich, en la que la captura primaria era específica para LT-B, y la reacción secundaria era específica para el epítipo anticonceptivo fusionado (epítipo de ZP3 de ratón, o decapeptido GnRH según el constructo utilizado). Los datos de LTB-GnRH2 sugieren que la estructura de la proteína de fusión interfería con la oligomerización natural, por lo tanto la detección de pentámeros completamente formados resultó significativamente reducida, al igual que la capacidad de detectar el epítipo fusionado mediante ELISA sándwich.

Tabla 1. Homogeneidad mejorada de los materiales tratados. Contenido de antígeno de material vegetal transgénico tratado o no tratado presente en "lotes" de plantas agrupados, o en muestras no mezclas de líneas específicas de plantas.

40  
Figura 7. Gráfico que representa el efecto del tiempo de secado mediante diferentes procedimientos de incisión.

45  
50  
Tabla 2. Recuperación de antígeno en diferentes tejidos y concentración de antígeno obtenida mediante diferentes procedimientos. El tratamiento de compuestos biofarmacéuticos de la patata mediante trituración en puré y secado por congelación permitió la concentración de antígeno detectable de media en 4,2 veces. En el caso de que se procesasen los mismos materiales mediante troceado en cubos o trozos seguido del secado mediante congelación, la concentración de antígeno detectable se incrementó de media en 15,2 veces. Otros materiales, tales como tomate transgénico, mostraron un efecto destructivo similar sobre el antígeno al utilizar la trituración en puré como un procedimiento para la homogeneización del material previamente a la congelación. En el caso de que se procesasen materiales de zanahoria transgénica mediante secado por congelación (sin trituración en puré ni corte en rodajas), la concentración de antígeno comparable a material crudo era directamente proporcional a la reducción de la masa, indicando adicionalmente que este procedimiento había conservado el antígeno detectable.

Figura 8. Gráfico que representa la reabsorción de la humedad durante el tiempo en una diversidad de materiales.

Figura 9. Gráfico que representa la estabilidad de los antígenos.

Figura 10. Efecto del tratamiento sobre el contenido de LTB dentro de material de frutos T<sub>2</sub>. Las columnas negras representan la concentración media de LTB de todos los frutos agrupados, y las barras de error representan el error estándar de la media.

Figura 11 Diluciones de punto final de anti-LTB de muestras de suero de adulto. En los casos en los que la columna Control representa la media de la dilución del suero de punto final de ratones alimentados con tomate en polvo de tipo salvaje, la columna Transgénico representa la media de dilución del suero de punto final alimentados con tomate transgénico en polvo, y la columna de Transgénico + Adyuvante representa la media de dilución de punto final de suero de ratones alimentados con tomate transgénico en polvo con polvos de extracto de *Quillaja*. Se determinó que la dilución de punto final fuese la primera dilución de suero que obtuviese una lectura de DO<sub>450</sub> de 0,1. Control n=3, Transgénico n=4 y Transgénico + Ady. n=2. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Figura 12 Diluciones de punto final anti-LTB de muestras de suero de crías. En los casos en los que la columna Control representa la media de la dilución del suero de punto final procedente de crías de ratón alimentadas con tomate en polvo de tipo salvaje, la columna Transgénico representa la media de dilución del suero de punto final de crías de ratón alimentadas con tomate transgénico en polvo y la columna Transgénico + Adyuvante representa la media de la dilución del suero de punto final procedente de ratones alimentados con tomate transgénico en polvo con polvos de extracto de *Quillaja*. Se determinó que la dilución de punto final fuese la primera dilución del suero que recibiese una lectura de DO<sub>450</sub> nm de 0,1. Control n=18, Transgénico n=17 y Transgénico + Adyuvante n=13. \*Contiene muestras de suero que recibieron una DO inferior a 0,1 con la dilución mínima utilizada (1 de 25). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Figura 13. Relación entre los títulos de las madres y de los descendientes. La dilución de punto final madre es el punto final de la muestra de suero obtenida más próxima al nacimiento de la camada correspondiente, y la dilución de punto final de los neonatos representa la media del punto de dilución de una camada. Se determinó que la dilución de punto final fuese la primera dilución del suero que recibiese una lectura de DO<sub>450</sub> nm de 0,1. Madre n=7, camada n=9 y neonatos n=41.

Figura 14a. Tabla del estudio de estabilidad de LT-B liofilizada de la patata.

Figura 14b. Gráfico del estudio de estabilidad de LT-B liofilizada de la patata.

Figura 15. Estudio de estabilidad de células NT HAO liofilizadas.

Figura 16. Estudio de estabilidad de HA110-A11 liofilizadas de patata.

Figura 17. Estudio de estabilidad de células SLT 102 liofilizadas.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona procedimientos para la producción de compuestos biofarmacéuticos de planta transgénica. Los procedimientos descritos en la presente memoria permiten la producción de material vegetal transgénico seco que es estable a temperatura ambiente, homogéneo y farmacéuticamente potente. En general, una planta transgénica intacta o dividida que produce un compuesto biofarmacéutico se seca o se seca mediante congelación mediante técnicas de tratamiento alimentario conocidas en la técnica. El producto homogeneizado seco puede a continuación utilizarse terapéuticamente sin necesidad de extracción, purificación o precipitación adicional de la proteína farmacéutica.

Los materiales vegetales transgénicos resultantes comprenden polvos formulados que pueden manipularse fácilmente y que son estables a temperaturas ambiente al almacenarse durante 12 meses como máximo. Además, el tratamiento de lotes descrito en la presente memoria incrementa significativamente la consistente del antígeno detectable entre plantas o tejidos de las plantas, y concentra el antígeno para una potencia mejorada.

#### Especies de planta transgénica

Entre las plantas que pueden utilizarse para la presente invención se incluyen tipos tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. Estos comprenden de manera no limitativa, zanahoria, espinaca, pimiento, patata, tomate, manzana, trigo, centeno, soja, arroz, maíz, frutos tales como fresas y frambuesas, alfalfa y plátano. Debido a que las plantas comestibles utilizadas por el ser humano como alimento o como componentes de pienso animal son plantas dicotiledóneas, se utilizan típicamente dicotiledóneas, aunque las plantas monocotiledóneas resultan útiles para el pienso animal. Las células y semillas derivadas de estas vacunas de plantas también resultan útiles según la invención.

La planta transgénica puede producirse mediante cualquier medio conocido de la técnica. En una forma de realización, se cultiva una diversidad de especies de planta transgénica, incluyendo tomate, patata y zanahoria, bajo condiciones de contención en invernadero de bioseguridad de nivel 1, sin aplicaciones de pesticidas o herbicidas, y se deja que crezcan hasta la madurez.

Las plantas transgénicas que resultan útiles en la presente invención expresan proteínas heterólogas. Los ejemplos de proteínas heterólogas adecuadas comprenden de manera no limitativa proteína de cápside del virus

Norwalk (NVCP), antígeno de hemaglutinación del virus influenza aviar (AIV-HA), huraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV-HN), glucoproteína 3 de zona pelúcida (ZP3), y antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos preparados en plantas (por ejemplo "planticuerpos") y otras proteínas terapéuticas (por ejemplo endostatina y agiostatina).

## 5 Recolección

El material vegetal transgénico puede recolectarse a mano o a máquina, o por medios conocidos de la técnica. El procedimiento de recolección puede variar según la especie de planta. En una forma de realización, la patata o zanahoria transgénica, puede recolectarse en forma de un lote completo, y almacenarse a 4°C hasta el tratamiento. En otra forma de realización, el fruto del tomate transgénico considerado de madurez intermedia o maduro se recolecta cada dos semanas durante un periodo de 6 semanas y se procesa el día de la recolección. En otra forma de realización, los materiales de hoja o tallo se eliminan del futo del tomate, tubérculos de la patata o raíz de la zanahoria a mano antes del lavado del fruto del tomate, los tubérculos de la patata o la raíz de la zanahoria en una solución de cloro al 0,1% (Clorox al 1%) para eliminar tierra y carga biológica. Con el fin de mantener un registro, se contó y peso cada lote, y se adjuntaron hojas de registro de recolección y tratamiento.

## 15 Homogeneización

La homogeneización del material vegetal transgénico puede llevarse a cabo antes o después del secado. En una forma de realización, la homogeneización se lleva a cabo antes del secado e implica la trituración en pulpa del material crudo y la mezcla de materiales vegetales recién recolectados, seguido de la congelación y del posterior secado mediante congelación de los materiales mezclador. El primer procedimiento de corte en rodajas, mezcla o molienda, reduce los tejidos vegetales no tratados (frutos, tubérculos, hojas, semillas, etc.) a una mezcla en forma de pulpa. Esta mezcla se supone que contiene células vegetales tanto intactas como residuos celulares molidos. La ventaja de este procedimiento es la reducción de los órganos vegetales de mayor tamaño, tales como frutos o tubérculos, hasta una mezcla manipulable en la que la variación del contenido de proteína homóloga entre tejidos se agrupa en un lote de material más uniforme. La capacidad de proporcionar un lote uniforme sin romper totalmente la integridad de las células vegetales proporciona un ambiente estable para el almacenamiento de proteínas homólogas durante las etapas de tratamiento posteriores. En otra forma de realización, la homogeneización requiere un tratamiento mínimo de los materiales vegetales antes del tratamiento. La homogeneización se lleva a cabo tras secar por congelación los materiales cortados en rodajas, en trozos o intactos. Los materiales resultantes se trituraron hasta formar unos polvos finos, se agruparon en un recipiente de un único lote, y se mezclaron uniformemente por medios mecánicos, tales como la agitación o la mezcla en seco para obtener una mezcla homogénea.

## 25 División

Para la división, puede reducirse el tamaño de las plantas completas o de partes de planta intactas por medios conocidos de la técnica. Entre los medios de división se incluyen, aunque sin limitación, troceado en cubos, cuarteado, picado, corte en rodajas, troceado, triturado en puré, o en pulpa, molido, machacado, prensado o partido.

35 En el caso de que resulte preferida la trituración en puré, los frutos, tubérculos o raíces recién recolectados utilizando un mezclador/cortador vertical industrial Stephan durante aproximadamente 1 minuto. Resulta preferido que se triture en puré un volumen máximo de aproximadamente 20 libras de material en cualquier momento dado. Durante la trituración en puré de la patata, puede añadirse una cantidad de agua (hasta 500 ml) para ayudar en el procedimiento de trituración en puré. Resulta preferido que la temperatura de los materiales triturados en puré no exceda 2°C. En una forma de realización, el homogeneizado se vierte en bandejas de congelador claramente etiquetadas y se almacena a -40°C. Para evitar las pérdidas de pulpa o semillas genéticamente modificadas, puede enjuagarse el mezclador/cortador utilizando una servilleta de papel.

Los materiales también pueden trocearse, pelarse o cortarse en rodajas por cualquier medio conocido de la técnica.

## 45 Deshidratación

50 En una forma de realización, el material vegetal transgénico troceado, pelado o corte en rodajas se transfirió a bandejas para congelador y se introdujo en un liofilizador industrial y se secó por congelación durante 2 a 6 días, a una temperatura de 30°C con una temperatura de almacenamiento máxima de 25°C. A continuación, los materiales resultantes se agruparon en recipientes marcados y se devolvieron con hojas de registro completas de recolección y tratamiento. En otra forma de realización, el material vegetal transgénico se cortó en rodajas en un mezclador Waring de acero inoxidable de 1 galón y las muestras se transfirieron a matraces de 500 ml o de 1 litro y se secaron mediante congelación utilizando un secador por congelación de laboratorio. En este caso, los materiales se secaron durante 1 a 6 días a una temperatura de 30°C.

## Determinación de la concentración de antígeno

55 El análisis de los materiales vegetales para determinar la concentración de los antígenos de interés puede conseguirse utilizando ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) o ensayos de aglutinación adecuados al antígeno contenido en los tejidos vegetales. El procedimiento de ensayo seleccionado para un antígeno específico



debe aplicarse consistentemente al evaluar materiales tanto crudos como tratados.

#### Estabilidad y uso de excipientes

5 Para evaluar la estabilidad de los materiales tratados a temperaturas ambiente, se extrajeron muestras de 10 a 50 gramos de material inmediatamente tras el secado por congelación, y se introdujeron en bolsas herméticas y en recipientes secundarios antes de su almacenamiento en un estante de laboratorio. Se mantuvo la temperatura ambiente a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . El resto de los materiales tratados se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  o a  $20^{\circ}\text{C}$ . Se extrajeron periódicamente las muestras de los materiales almacenados bajo cada condición y se comparó el contenido de antígeno mediante un ensayo apropiado para determinar la estabilidad relativa de los materiales almacenados a temperatura ambiente.

#### Anticoncepción

10 La presente invención también se basa en los descubrimientos de que se generan plantas transgénicas que expresan proteínas capaces de inducir la anticoncepción, y de que la administración del material vegetal transgénico en un animal resulta suficiente para inducir una respuesta inmunológica de la mucosa frente a la proteína anticonceptiva de manera que se consigue una anticoncepción efectiva. La presente invención proporciona un procedimiento para la  
15 inmuoanticoncepción que comprende administrar en un animal una planta transgénica que expresa una proteína anticonceptiva, en la que la administración de la planta transgénica induce una respuesta inmunológica de la mucosa en el animal en el que se administra. La presente invención proporciona además un procedimiento para preparar una planta transgénica que expresa una proteína anticonceptiva que resulta útil en la presente invención para la administración en un animal, y proporciona además una planta transgénica que, tras la administración en un animal, puede inducir la anticoncepción en dicho animal.

#### 20 Proteínas anticonceptivas

La presente invención proporciona material vegetal transgénico, las células del cual, expresa una proteína o polipéptido que puede inducir la anticoncepción en un animal en el que se administra el material vegetal. Entre las proteínas anticonceptivas, que resultan útiles en la presente invención, se incluyen, aunque sin limitación,  
25 glucoproteínas de zona pelúcida, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), hormona luteinizante (LH), lactato deshidrogenasa (LDH) y antígenos antiespermáticos.

#### *Glucoproteínas de zona pelúcida*

La zona pelúcida es una matriz extracelular de glucoproteínas refráctil y robusta que circunda el oocito. Su apariencia estriada característica resulta de numerosos canales finos que lo recubren. Los procesos citoplasmáticos de las células foliculares se extienden a través de la ZP y ocasionalmente invaginan la membrana plasmática del oocito.  
30 Los procesos citoplasmáticos de las células foliculares también transportan materiales nutricionales hasta la superficie del oocito. Además, los microvilli del oocito se extienden hacia el interior de la ZP y incrementan la capacidad absorbente en la superficie del oocito (ver, de manera general, W.J. Hamilton, editor, Hamilton, Boyd and Mossman's Human Embryology, páginas 27 a 32 y 54 a 64, 1972; J.B. Warshaw, editor, The Biological Basis Of Reproduction And Developmental Medicine, 1973). Entre las glucoproteínas de zona pelúcida (ZP), útiles como proteínas anticonceptivas  
35 en la presente invención, se incluyen todas las formas de la matriz de glucoproteínas capaces de inducir anticuerpos contra las ZP, incluyendo las glucoproteínas ZP 1, 2, 3 y 4. Éstas comprenden epítomos de ZP que aparecen tardíamente en el desarrollo de un oocito, durante las etapas antral y preovulatoria, así como epítomos que se expresan después de la ovulación.

40 En una forma de realización preferida, la proteína anticonceptiva de la presente invención es la glucoproteína ZP3, o un epítomo de la misma. Un "epítomo" de una proteína anticonceptiva de la presente invención presenta una longitud mínima de 6, 8, 10, 12, 14, 20 y hasta 30 aminoácidos. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "epítomo" de una proteína anticonceptiva útil en la presente invención es una parte de la proteína anticonceptiva que puede estimular una respuesta inmunológica de la mucosa. La capacidad de un epítomo de una proteína anticonceptiva de estimular una respuesta inmunológica de la mucosa puede determinarse mediante la medición de la cantidad de IgA secretoria presente en un animal en el que se ha administrado el epítomo anticonceptivo utilizando una técnica conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, una medición de la cantidad de IgA secretoria presente en un animal en el que se ha administrado un epítomo anticonceptivo puede medirse mediante ELISA utilizando anticuerpos anti-IgA y compararse con los niveles de sIgA en un animal en el que no se ha administrado el epítomo. Una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de sIgA en los dos animales, medida utilizando una prueba estadística conocida de la técnica, es indicativa de la estimulación de la respuesta inmunológica de la mucosa por parte del epítomo. El valor de P para las pruebas estadísticas útil en la presente invención es de por lo menos  $<0,1$ ,  $<0,05$ ,  $<0,01$ ,  $<0,005$ ,  $0,001$ ,  $0,0005$  y preferentemente  $<0,0001$ .

55 A pesar de las propiedades morfológicas comunes de las ZP de diferentes especies, las ZP de diferentes especies animales presentan regiones inmunológicamente diferentes o "epítomos" (Timmons *et al.*, en: Perspectives in Immunoreproduction: Conception and Contraception (Mathur *et al.*, editores), Hemisphere Publ., páginas 242 a 260, 1988). Se han aislado varias proteínas ZP de diferentes especies animales y resultan útiles como proteínas anticonceptivas en la presente invención.

Entre las proteínas de zona pelúcida aisladas a partir del cerdo se incluyen: PZI, una proteína de 40 a 110 kD aislada por Dunbar *et al.*, Biol. Reprod. 24:1111, 1981; PZII, una proteína de 70 a 110 kD; PZIII, una proteína de 95 a 118 kD, y PZIV, una proteína de 18 a 25 kD, todas aisladas por Dunbar *et al.* (Biol. Reprod. 32:619, 1985); 90K, una proteína de 89 a 119 kD; 65K, una proteína de 61 a 83 kD; 55K, una proteína de 47 a 66 kD, y 25K, una proteína de 18 a 26 kD, todas aisladas por Hedrick J.L. y Wardrip N.J. (Biochem. 157:63, 1986); ZP1, una proteína de 82 a 118 kD; ZP2, una proteína de 58 a 96 kD; ZP3 (PPZA), una proteína de 40 a 74 kD, y ZP4, una proteína de 21 kD, todos aislados por Subramanian *et al.* (Biol. Reprod. 24:933, 1981); 87K (ZP1/ZP2), una proteína de 77 a 79 kD; 58K, una proteína de 40 a 70 kD, ambas aisladas por Yurewicz *et al.* (Biol. Reprod. 29:511, 1983); PZI desglucosilado, una proteína de 35 kD; PZII, una proteína de 55 kD, y PZIII, una proteína de 80 kD, todos aislados por Skinner y Dunbar, tal como se describe en Immunological Approaches to Contraception and the Promotion of Fertility, G.P. Talwar (editor), New York: Plenum, páginas 251 a 268, 1986; y ZP3 desglucosilado que presenta un peso molecular de 45 kDa, aislado por Sacco *et al.* (J. Reprod. Fertil 76:575, 1986).

Entre las proteínas de zona pelúcida de conejo aisladas se incluyen: RZI, RZII y RZIII, que presentan pesos moleculares de 68 a 125 kDa, de 80 a 100,5 kD, y de 100 a 132 kD, respectivamente, todos aislados por Dunbar *et al.* (Biol. Reprod. 24:1111, 1986); ZP1, ZP2 y ZP3 que presentan pesos moleculares de 100 a 118 kD, 83 a 110 kD y 80 a 92 kD, respectivamente, todos aislados por Sacco *et al.* (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167:318, 1981); RZI desglucosilado, y RZII, que presentan pesos moleculares de 65 kD y 80 kD, respectivamente, ambos aislados por Skinner y Dunbar y descritos en Immunological Approaches to Contraception and Promotion of Fertility. G.P. Talwar (editor). New York: Plenum, páginas 251 a 268, 1986; y RZIII desglucosilado, una proteína de 90 kD aislada por Timmons y Dunbar (Biol. Reprod. 36:1275, 1987).

Se han aislado varias proteínas de zona pelúcida del ratón, incluyendo: ZP1, ZP2 y ZP3, que presentaban pesos moleculares de 200 kD, 120 kD y 83 kD, respectivamente, todas aisladas por Bleil y Wassarman (Dev. Biol. 76:185, 1980); y ZP1 y ZP2 que presentaban pesos moleculares de 166 a 122 kD y de 90 a 92 kDa, respectivamente, aisladas por Sacco *et al.* (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167:318, 1981). Las diferencias entre los pesos moleculares de ZP1 y ZP2 de ratón informadas por Bleil *et al.* y por Sacco *et al.* podrían deberse al hecho de que Bleil utilizó 2D-PAGE bajo condiciones no reductoras, mientras que Sacco utilizó 2D-PAGE bajo condiciones reductoras.

Las proteínas de zona pelúcida del gato CZ1 y CZII fueron aisladas por Maresh y Dunbar J. (Exp. Zool. 244:299, 1987) y presentaban pesos moleculares de 50 a 110 kD y 90 a 110 kD, respectivamente.

Maresh y Dunbar (J. Exp. Zool. 244:299, 1987) también aislaron las proteínas de zona pelúcida del perro DZI, DZII y DZIII, que presentaban los pesos moleculares 50 a 100 kD, 70 a 95 kD y 90 a 100 kD, respectivamente.

Sacco *et al.* (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167:318, 1981) describieron ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de mono ardilla que presentaban los pesos moleculares 63 a 78 kD, 63 a 70 kD, 47 a 51 kD y 43 a 47 kD, respectivamente. En la misma publicación, Sacco *et al.* describieron ZP1, ZP2 y ZP3 humanas que presentaban pesos moleculares de 80 a 120 kD, 73 kD y 59 a 65 kD, respectivamente.

Además de los péptidos ZP indicados anteriormente, la secuencia de nucleótidos codificante de las glucoproteínas ZP de varias especies ha sido elucidada y de esta manera resultan útiles en la presente invención debido a que codifican proteínas anticonceptivas. Por ejemplo, Ringuette *et al.* (Dev. Biol. 127:287-295, 1988) y Liang *et al.* (Mol. Cell. Biol. 10:1507-1515, 1990) informaron de la clonación de ADN de ratón codificante de las proteínas de zona pelúcida ZP3 y ZP2, respectivamente. Los clones se obtuvieron mediante cribado de bibliotecas de ADNc de ratón con anticuerpos anti-ZP3 y anti-ZP2. No se encontró homología de secuencias entre ZP3 y ZP2 de ratón.

Ringuette *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4341-4345, 1986) informaron del aislamiento de un clon parcial de ADNc para la ZP3 de ratón, que se hibridaba con ADN genómico total de ratón, rata, perro, cabra y ser humano, pero no con ADN genómico de cerdo o de conejo, a menos que la hibridación se llevara a cabo a astringencia muy baja. El ADNc de ZP3 de longitud completa caracterizado por Ringuette (Dev. Biol. 127:287-295, 1988) representa un ARNm específico de línea germinal que presenta regiones 5' y 3' no traducidas relativamente cortas y un marco de lectura abierto de aproximadamente 1.317 nucleótidos con una cola poli-A adicional de 200 a 300 nucleótidos. Ringuette también encontró que el ovario de rata, conejo, perro y vaca transcribe ARNm que se hibridaba con el ADNc de la ZP3 de ratón y que los transcritos de ZP3 presentaban pesos moleculares similares. Liang *et al.* (Mol. Cell. Biol. 10:1507-1515, 1990) demostraron que la secuencia de ácidos nucleicos y deducida de aminoácidos de ZP2 era claramente diferente de la de ZP3, aunque presentaba el mismo motivo corto de las regiones 5' y 3' no traducidas. Se informó de que el ARNm de ZP2 presentaba un único marco de lectura abierto de 2.139 nucleótidos que codificaba para un polipéptido de 80.217 daltons, representando 713 aminoácidos.

Chamberlin y Dean (Dev. Biol. 131:207-214, 1989) y Kinloch R.A. *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:6409-6413, 1988) han informado de la clonación del gen ZP3 de ratón. El gen ZP3 de ratón se informa que presenta 8 exones y 7 intrones en una unidad de transcripción de 8,6 kpb.

Kinloch *et al.* (Dev. Biol. 142:414-421, 1990) han informado de la clonación de ADN de ZP3 genómico de hámster procedente de una biblioteca de ADN genómico de hámster cribado con ADN de ZP3 de ratón como sonda. El gen ZP3 de hámster presenta una unidad de transcripción de 7.900 nucleótidos y se encontró que contenía 7 intrones y 8 exones. La proteína ZP3 de hámster era aproximadamente 81% homóloga a la proteína ZP3 de ratón. El transcrito de

hámster contenía 1.266 nucleótidos, seis menos que el ARNm de ZP3 de ratón.

Chamberlain y Dean (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6014-6018, 1990) informaron de que la clonación de ZP3 humana a partir de una biblioteca de ADN genómico humano utilizando ADNc de ZP3 de ratón como sonda. El gen ZP3 humano está compuesto de 8 exones en una unidad de transcripción de 18,3 kpb. Los exones son prácticamente del mismo tamaño que los ocho exones de la ZP3 de ratón y la secuencia de nucleótidos de la región codificante es 74% homóloga. El transcrito de la ZP3 humana es muy similar al ARNm de la ZP3 de ratón. Ambas presentan regiones 5' y 3' no traducidas cortas, y ambas presentan un único marco de lectura abierto de 1.272 nucleótidos que codifica una proteína de 424 aminoácidos.

La patente US nº 4.996.297, de Dunbar, informa del aislamiento de tres clones de zona pelúcida de conejo codificantes de las proteínas ZP1 y ZP2 de conejo utilizando los anticuerpos anti-ZP1 y anti-ZP2 como sondas de cribado. Las secuencias denominadas P2 y P3 en la fig. 4 de la patente de Dunbar representan los ADNc de la ZP de conejo de 812 y 1.705 nucleótidos, respectivamente.

Schwoebel *et al.* (J. Biol. Chem. 266:7214-7219, 1991) aislaron y caracterizaron un ADNc de longitud completa (denominado rc55) codificante de la proteína de zona pelúcida del conejo de 55 kD utilizando antisueros purificados por afinidad entre especies. La proteína codificada por este ADNc presenta cierta similitud a la proteína ZP2 de ratón descrita por Liang. Sin embargo, las comparaciones entre rc55 con la proteína ZP3 de ratón no revelaron homología.

Entre otras secuencias de nucleótidos de glucoproteína ZP que resultan útiles en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, hormona liberadora de hormona luteinizante humana (LHRH, nº de acceso de GenBank X01059), glucoproteína ZP3A humana (nº de acceso de GenBank XM004616), glucoproteína ZPB humana (nº de acceso de GenBank XM001779), glucoproteínas ZPA y B bovinas (nº de acceso de GenBank AB042653, AB042652), glucoproteínas ZP1 y 3 de pollo (nº de acceso de GenBank AJ289697, AB031033), glucoproteínas ZP1, 2 y 3 de ratón (nº de acceso de GenBank NM011776, NM011775, NM009580), glucoproteína ZP3 de rata de agua (nº de acceso de GenBank AF304487), ZPA de ratón marsupial (nº de acceso de GenBank AF263025), ZPA y B de possum de cola de cepillo (nº de acceso de GenBank AF263014, AF263013), ZP2 y 3 de possum de cola de cepillo (nº de acceso de GenBank AF079525, AF079524), glucoproteínas ZP1, 2 y 3 de cerdo (nº de acceso de GenBank S74651, E07737, D45064), glucoproteínas ZP1, 2 y 3 de rata (nº de acceso de GenBank D78482, AB000929, AB000928), glucoproteínas ZP1 y 2 de mono tití (nº de acceso de GenBank Y10822, Y10767), ZP2 y 3 felinas (nº de acceso de GenBank E07930, E06506), ZP2 y 3 de perro (nº de acceso de GenBank D45064, D45070) y glucoproteína ZP3 de ualabí (patente australiana nº AU78554/98).

La expresión "glucoproteína de zona pelúcida", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye una proteína ZP completa, una forma enzimáticamente digerida o químicamente desnaturalizada de ZP, o una combinación de las mismas. Además, la glucoproteína de zona pelúcida incluye determinantes antigénicos de ZP aislados que no son inherentemente inmunogénicos pero que pueden ser utilizados como inmunógeno en el caso de que se unan químicamente a moléculas portadoras inmunogénicas (por ejemplo LT-B), tal como se describe posteriormente en la presente memoria. Un extracto de ZP incluye un extracto completo o una o más de las tres fracciones de glucoproteína individuales que comprenden ZP.

#### Otras proteínas anticonceptivas

Además de las glucoproteínas ZP anteriormente indicadas, o fragmentos de las mismas, otras proteínas resultan útiles como proteínas anticonceptivas en la presente invención. Por ejemplo, en una forma de realización, puede seleccionarse una proteína anticonceptiva de entre el grupo que incluye, aunque en modo alguno de manera limitativa, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la hormona luteinizante (LH), la lactato deshidrogenasa (LDH) y los antígenos antiespermáticos. Además de estas proteínas anticonceptivas, las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas anticonceptivas útiles en la presente invención también resultan útiles en la generación de plantas transgénicas que expresan las proteínas anticonceptivas codificadas. Por ejemplo, entre las secuencias de nucleótidos codificantes de GnRH, que resultan útiles en la presente invención, se incluyen, aunque sin limitación, la GnRH1 humana (nº de acceso de GenBank XM005041), la GnRH1 de rata (nº de acceso de GenBank M31670), la GnRH de possum de cola de cepillo (nº de acceso de GenBank AF193516) y la GnRH de musaraña (nº de acceso de GenBank AF107315). Entre las secuencias de nucleótidos codificantes de LH, que resultan útiles en la presente invención, se incluyen, aunque sin limitación, la LH de rata (nº de acceso de GenBank D00576), la LH de cerdo (nº de acceso de GenBank D00579), la LH de rinoceronte (nº de acceso de GenBank AF024521), la LH de tapir (nº de acceso de GenBank AF047606), la LH de caballo (nº de acceso de GenBank Y16326; Y16265), la LH bovina (nº de acceso de GenBank M11506) y la LH canina (nº de acceso de GenBank Y00518).

En una forma de realización, entre las proteínas anticonceptivas de la presente invención se incluyen los antígenos antiespermáticos. La inmunización de animales macho y hembra con extractos de esperma completo se ha demostrado anteriormente que provoca infertilidad (Tung *et al.*, J. Reprod. Immunol. 20:931, 1979). De acuerdo con lo expuesto anteriormente, las proteínas anticonceptivas de la presente invención pueden comprender una proteína asociada a esperma o una secuencia de ácidos nucleicos codificante de dichas proteínas, incluyendo, aunque sin limitación, PH30 (patente US nº 5.935.578), PH34 (patente US nº 5.723.305), SP17 (patente US nº 5.814.456), SP22 (patente US nº 6.197.940), SP56 (SP56 de ratón: nº de acceso de GenBank U17108), LDHC<sub>4</sub> (LDHC<sub>4</sub> humana; nº de acceso de GenBank J02938; patente US nº 5.891.992; Goldberg, "LDH-X as a sperm-specific antigen", en: T.

Wegmann y T.J. Gill (editores), Reproductive Immunology, Oxford University Press, 1981), fertilina (fertilina de ratón: nº de acceso de GenBank AF167406; fertilina humana: nº de acceso de GenBank AJ133005; fertilina de musaraña arborícola: nº de acceso de GenBank Y15965; fertilina de babuino: nº de acceso de GenBank Y15520; fertilina de gorila: nº de acceso de GenBank Y15492; fertilina de tamarindo: nº de acceso de GenBank Y15512; fertilina bovina: nº de acceso de GenBank AF086808; y fertilina de rata: nº de acceso de GenBank Y08616).

#### Proteínas de direccionamiento mucoso

En una forma de realización de la presente invención, se administra una planta transgénica a un animal, en la que la planta expresa una parte, o epítipo, de una o más de las proteínas anticonceptivas indicadas anteriormente. Ha sido bien reconocido por la técnica que el direccionamiento mucosal de sustancias inmunogénicas es altamente dependiente del tamaño de las partículas o de una afinidad natural de unión de un grado suficiente para garantizar el reconocimiento de las células M. Además, se ha descubierto que el sistema inmunológico mucosal puede ser estimulado mediante la alimentación de dosis bajas de determinadas clases de proteínas. En particular, lo expuesto anteriormente puede conseguirse con proteínas que comparten la propiedad de ser capaces de unirse específicamente a diversos glucolípidos y glucoproteínas situados sobre la superficie de las células de la membrana mucosal. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende una proteína inmunogénica auxiliar que se fusiona con una proteína inmuno-anticonceptiva compleja, o si se desea, con un antígeno anticonceptivo soluble más pequeño de la misma, tal como un epítipo de ZP3, o de GnRH, para incrementar la inmunogenicidad del epítipo anticonceptivo.

Entre las proteínas auxiliares que resultan útiles según la invención para estimular una respuesta inmunológica de la mucosa se incluyen proteínas antigénicas, tales como la shigatoxina B (StxB) (nº de acceso de GenBank AJ132761), la enterotoxina B estafilocócica (SEB) (nº de acceso de GenBank M11118), la toxina B lábil de *E. coli* (LT-B) (nº de acceso de GenBank AB011677), la subunidad A de la toxina lábil de *E. coli* (LT-A) (nº de acceso de GenBank AB011677), la proteína de cápside del virus Norwalk (NVCP) (nº de acceso de GenBank AF093797), y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) (nº de acceso de GenBank AF090842). Resulta preferido que dichas proteínas antigénicas se asocian como partículas antigénicas y/o complejos en el caso de que dicha asociación resulte necesaria para proporcionar inmunogenicidad a la misma. La construcción de proteínas de fusión que comprenden proteínas anticonceptivas que resultan útiles en la presente invención y de proteínas que incrementan la inmunogenicidad mucosal se describe a continuación.

#### *Antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg)*

La viabilidad de la expresión de HBsAg en forma de partículas de tipo vírico (VLP) en plantas ha sido demostrada (Mason *et al.*, 1992). Las VLP son similares a la vacuna recombinante derivada de levadura, que ha sido autorizada para la inmunización parenteral. La formación de partículas de HBsAg requiere la inserción del péptido en la membrana del retículo endoplasmático (RE) con cuatro dominios transmembranales, seguido de la gemación de partículas hacia el interior del lumen del RE. El HBsAg derivado de una planta conserva epítopos tanto de células B como de células T según estudios en un modelo de ratón (Thanavala *et al.*, 1995). El resultado de que las células vegetales pueden producir VLP de HBsAg inmunogénico indica que las plantas son un sistema de expresión viable para las proteínas animales, víricas o bacterianas que se ensamblan formando estructuras complejas. De acuerdo con lo anterior, se han identificado los elementos genéticos necesarios para generar partículas inmunogénicas de HBsAg. Estos elementos, por ejemplo regiones reguladoras y codificantes, pueden incorporarse en un vector codificante de una proteína anticonceptiva tal como se describe en la presente memoria, proporcionando un medio para amplificar la expresión de este antígeno en las plantas.

#### *Proteína de cápside de Norwalk (NVCP)*

Se ha informado de la expresión y ensamblaje de VLP en plantas de la NVCP, y de su inmunogenicidad oral en ratones (Mason *et al.*, 1996). La NVCP se acumulaba hasta el 0,3% de las proteínas totales, y se ensamblaba en VLP con una eficiencia de aproximadamente 60% en células de hoja de tabaco y de tubérculo de patata. Al observarlas mediante microscopía electrónica con tinción negativa, las cápsides vacías eran virtualmente indistinguibles de las producidas en un sistema de células de insecto. Además, el material era oralmente inmunogénico en ratones al administrarse mediante sonda gástrica en 4 dosis de tan sólo 10 µg cada una, o al administrarse mediante alimentación directa de rodajas de tubérculo de la patata en 4 dosis de tan sólo 50 µg cada una. Tanto la IgG sérica como la IgA mucosal del tracto digestivo resultaron estimuladas por la vacuna procedente de planta. De esta manera, se ha identificado un medio para generar cantidades inmunogénicas de VLP de antígenos NVCP. Estos pueden utilizarse con la presente invención para generar niveles todavía más altos de inmunógeno en plantas según los procedimientos de amplificación génica descritos en la presente memoria.

#### *Enterotoxina lábil al calor de E. coli (LT)*

La LT es un potente inmunógeno y adyuvante mucosal que estimula respuesta inmunológicas contra antígenos administrados simultáneamente (Clements *et al.*, 1988). La subunidad B de la LT (LT-B) expresada en plantas se ensambla en oligómeros activos que presentan capacidad de unión al gangliósido G<sub>M1</sub> (Haq *et al.*, 1995). Se ha descubierto que la adición de una secuencia de retención microsómica (SEKDEL) en el extremo carboxilo-terminal de LT-B incrementa su acumulación en el tejido vegetal, permitiendo simultáneamente la unión e inmunogenicidad de

5 G<sub>M1</sub>. En ensayos orales con LT-B derivada de plantas administrada a ratones, tanto los extractos de hoja del tabaco administrados mediante sonda gástrica, como tubérculos de la patata alimentados sin preparación (aparte del corte en rodajas) estimularon los anticuerpos mucosales séricos y del tracto digestivo contra LT-B (Haq *et al.*, 1995). El anticuerpo anti-LT-B sérico procedente de estos animales mostró inhibición de la actividad de LT, indicando su valor potencial como vacuna protectora.

#### Vectores para la expresión de proteínas anticonceptivas

10 Resulta crucial para la utilización de la presente invención la creación y/o uso de un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína anticonceptiva y opcionalmente una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína de direccionamiento mucoso, en la que el constructo puede introducirse en una célula vegetal de interés para producir una planta transgénica que expresa la proteína anticonceptiva. En formas de realización preferidas, el constructo de ácidos nucleicos es un vector de expresión vegetal, un plásmido que puede prepararse y cultivarse en células vegetales. Las secuencias de ácidos nucleicos del constructo pueden contener ADN, ARN, un ácido nucleico sintético, o una combinación de los mismos, tal como es conocido de la técnica. En las formas de realización en las que el constructo de ácidos nucleicos comprende tanto una proteína anticonceptiva como una proteína de direccionamiento mucoso, las secuencias codificantes de cada uno de los componentes pueden intercalarse con otras secuencias (por ejemplo secuencias reguladoras), según resulte necesario.

20 Los constructos de ácidos nucleicos, que resultan útiles en la presente invención, pueden generarse utilizando un esqueleto plásmido conocido por el experto en la materia, que puede utilizarse para mediar en la expresión de las proteínas anticonceptivas en células vegetales según la invención. Los vectores apropiados que pueden utilizarse como materiales de partida son conocidos de la técnica. Los vectores que resultan adecuados para transformar tejidos vegetales han sido descritos por deFramond *et al.* (Biotechnology 263, 1983), An *et al.* (EMBO 277, 1985) y Rothstein *et al.* (Gene 53, 1987), y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), pIBT210 (Haq *et al.*, Science 268:714, 1995), pGEM (Promega, Madison, WI), pGPTV.kan (Becker *et al.*, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197, 1992), el plásmido Ti de *Agrobacterium* (White *et al.*, Plant Biotechnology, Jung y Arntzen (eds), Butterworth Pub., Boston, MA, 1989). Además de estos vectores, se han producido muchos otros en la técnica que resultan adecuados para la utilización en la presente invención.

30 Los constructos de vector, que resultan útiles en la presente invención, preferentemente contienen secuencias de ADN codificantes de proteínas anticonceptivas. Se obtiene una secuencia de ADN codificante de una proteína anticonceptiva por medios convencionales y se inserta en un vector adecuado para la transformación de plantas. Por ejemplo, la secuencia de ADN puede aislarse a partir de un banco genómico de clones genómicos. Alternativamente, la secuencia de ADN puede prepararse mediante transcripción inversa. A continuación, se introducen los vectores en células vegetales mediante una diversidad de técnicas conocidas, descritas posteriormente, que dan lugar a células, tejidos y plantas transformadas.

35 Puede conocerse la secuencia del ADN mediante síntesis química a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína anticonceptiva, o de parte de la misma. Pueden utilizarse varios procedimientos de la técnica anterior para determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína anticonceptiva (ver, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 3<sup>a</sup> edición, John Wiley & Sons, Inc., 1995).

40 La secuencia de ADN codificante de una proteína anticonceptiva o parte de la misma se inserta en un vector apropiado de manera que la proteína anticonceptiva se exprese correctamente. En otras palabras, se sitúa la secuencia de ADN en la orientación y marco de lectura correctos, de manera que se produzca la secuencia de aminoácidos correcta tras la expresión de la secuencia de ADN en el tejido vegetal. Según técnicas convencionales, generalmente se construye una secuencia de ADN quimérico que contiene un promotor operable en tejido vegetal y la secuencia de ADN codificante de una proteína anticonceptiva. La secuencia de ADN puede contener además una secuencia 3' no codificante operable en tejido vegetal. En una forma de realización, la secuencia de ADN quimérico puede contener además una secuencia codificante de un polipéptido que puede incrementar el direccionamiento mucosal de la proteína anticonceptiva, tal como LT-B, de manera que se produzca una proteína de fusión al expresarse. La secuencia de ADN quimérico puede prepararse *in situ* dentro de un vector adecuado mediante la inserción de la secuencia de ADN codificante de una proteína anticonceptiva o parte de la misma en un sitio de restricción de un vector de transformación de plantas conocido. Alternativamente, el gen quimérico puede construirse en primer lugar y después insertarse en un vector para producir un vector de transformación de plantas. Los vectores, que resultan útiles en la invención, generalmente se insertan en una célula huésped procariótica, tal como *E. coli*, en la que se amplifican mediante replicación varios vectores. Los vectores posteriormente pueden aislarse de la célula huésped procariótica utilizando una técnica conocida de la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *supra*) y posteriormente utilizarse para transformar una célula vegetal huésped de interés.

60 Entre las secuencias de promotor de la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, un promotor que es operable en una célula huésped vegetal seleccionada según la invención. El constructo de ADN según la invención preferentemente presenta un promotor funcional en plantas funcionalmente ligado al extremo 5' de una secuencia de nucleótidos de interés. Se selecciona un promotor preferente de entre CVMV, Gamma Sein, promotor Gelvin, CaMV 35S, E8 del tomate, patatina, ubiquitina, manopina sintasa (mas), actina 1 del arroz, proteína glicinina de la semilla de soja (*Gyl*), proteína de reserva vegetativa de la soja (*vsp*), y almidón sintasa unida al gránulo (*gbss*). Un constructo de

la presente invención también puede incluir una región intensificadora de la traducción, tal como un intensificador del virus del jaspeado del tabaco (TEV), que ha sido descrito por otros investigadores (Carrington *et al.*, 1990). Opcionalmente, un constructo de la invención puede comprender por lo menos una secuencia codificante de péptido de señal de la proteína de reserva vegetativa (VSP), tal como una secuencia  $\alpha$ S o  $\alpha$ L (Mason *et al.*, 1988) funcionalmente ligada al extremo 5' de una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína de interés.

Preferentemente, las secuencias del constructo de ADN codificante de la proteína codificante y, opcionalmente, la proteína de direccionamiento mucoso, se encuentran, todas, bajo el control de una única secuencia de promotor, resultando en la expresión de una proteína de fusión que contiene cada uno de los tres elementos. Lo expuesto anteriormente garantiza que la proteína anticonceptiva y la proteína de direccionamiento mucoso se sinteticen en proporción estequiométrica, y resulta en niveles similares de expresión de la proteína anticonceptiva y de la proteína de direccionamiento mucoso. Alternativamente, la expresión de la proteína de direccionamiento mucoso puede controlarse a partir de un segundo promotor insertado de un modo bidireccional, o en el constructo en posición 3' respecto a la secuencia codificante de la proteína anticonceptiva, aunque en posición 5' respecto a la secuencia codificante de la proteína de direccionamiento mucoso.

Los vectores, que resultan útiles en la presente invención, además de transportar los constructos de ADN indicados anteriormente, adicionalmente pueden comprender un gen de marcador seleccionable. Entre los genes marcadores que resultan útiles según la invención pueden incluirse un gen codificante de un marcador seleccionable, por ejemplo un gen de resistencia a antibiótico, tal como el gen bacteriano de resistencia a la tetraciclina. La incorporación del gen de resistencia a la tetraciclina permite la utilización de la tetraciclina como un agente selectivo en el procedimiento de preparación del plásmido según la invención. Una ventaja de la utilización de un gen de resistencia a la tetraciclina es que la tetraciclina no resulta degradada en *E. coli*, y por lo tanto no resulta necesario añadir más tetraciclina durante la fermentación. Además, el gen de resistencia a la tetraciclina resulta preferido respecto a un gen codificante de resistencia a la ampicilina debido a que la tetraciclina se prescribe con menos frecuencia como antibiótico en un contexto clínico, y por lo tanto la lectura a través del gen de resistencia del plásmido será menos probable que interfiera con la utilización de un antibiótico en un contexto clínico.

Entre los genes marcadores adicionales que resultan útiles según la invención se incluyen la resistencia a biocida, particularmente a un antibiótico, tal como canamicina, G418, bleomicina, higromicina, cloranfenicol o similar. Entre los genes marcadores adicionales que resultan útiles según la invención se incluyen la resistencia a herbicidas, tales como organofosfatos y bialfosfatos. Entre los genes marcadores adicionales que resultan útiles según la invención también se incluyen los codificantes de proteínas marcadores visuales, tales como la beta glucuronidasa (GUS), la proteína fluorescente verde (GFP) o similares. El marcador particular utilizado será uno que permita la selección de células transformadas respecto a células que no presentan el ácido nucleico que ha sido introducido.

Un vector también puede presentar un origen de replicación de *A. tumefaciens*, tal como en el caso de que se desee mantener el vector en *A. tumefaciens* para la transformación posterior con este sistema. En este caso, la secuencia de nucleótidos codificante de una proteína de interés (es decir, una proteína anticonceptiva) se encuentra flanqueada por las regiones limítrofes izquierda y derecha de T-ADN para llevar a cabo la transferencia a una célula vegetal huésped.

Puede transfectarse una cepa de bacteria, tal como *E. coli*, con un vector de expresión de la presente invención con el fin de cultivar/amplificar un casete de expresión instantáneo según procedimientos bien conocidos de la técnica (Ausubel, *supra*). El casete de expresión purificado puede añadirse a *A. tumefaciens* y someterse a tratamiento de pulso eléctrico o choque térmico para introducir el vector en el mismo, en donde puede residir intacto a modo de vector lanzadera. Un plásmido Ti ayudante en *A. tumefaciens* puede proporcionar los genes *vir* necesarios para transferir el T-ADN directamente desde el vector lanzadera hasta la célula vegetal. Alternativamente, el vector puede llevar a cabo una recombinación homóloga con un plásmido inductor de tumor (Ti) e intercambiar el casete instantáneo por el T-ADN del plásmido Ti. En las formas de realización preferidas, la invención proporciona los procedimientos para transformar establemente células vegetales, en los que un constructo de ADN que se introduce en una célula vegetal se integra establemente en un cromosoma.

#### Plantas transgénicas

La presente invención proporciona plantas transgénicas y material vegetal (por ejemplo hojas, frutos, raíces, etc.) que comprende células vegetales que expresan una o más proteínas anticonceptivas que resultan útiles en la presente invención. En una forma de realización preferida, se transforma una célula vegetal de interés con uno o más de los constructos de ADN indicados anteriormente, en los que la expresión del constructo dentro de la célula vegetal transformada resulta en la producción de una proteína anticonceptiva por parte de la célula vegetal.

#### *Procedimientos de introducción de ácidos nucleicos en células vegetales*

Los procedimientos de transferencia génica a plantas comprenden de manera no limitativa, la utilización del sistema de plásmido Ti de *A. tumefaciens*. Los plásmidos inductores de tumor (Ti) de *A. tumefaciens* contienen un segmento de ADN de plásmido denominado ADN de transferencia (T-ADN), que se integra en el genoma del huésped planta. En primer lugar, se construye un vector plásmido que se replica en *E. coli*. Este plásmido contiene el ADN codificante de la proteína de interés (es decir, una proteína anticonceptiva) y este ADN se encuentra flanqueado por

secuencias limítrofes del ADN-T, que definen los límites del segmento de ADN que se transfiere a la célula vegetal y que se integra en el genoma vegetal. Habitualmente, también se inserta un gen codificante de un marcador seleccionable (tal como un gen codificante de resistencia a un antibiótico, tal como la canamicina) entre las secuencias limítrofes izquierda (LB) y derecha (RB). La expresión de este gen en las células vegetales transformadas proporciona un procedimiento de selección positiva para identificar aquellas plantas o células vegetales que presentan una región de T-ADN integrada. En segundo lugar, el plásmido se transfiere a *Agrobacterium*. Esto puede llevarse a cabo mediante una incorporación directa de ADN de plásmido por parte de *Agrobacterium*. Para la transferencia posterior del T-ADN a plantas, la cepa de *Agrobacterium* utilizada debe contener un conjunto de genes de virulencia (*vir*) inducibles, que resultan esenciales para la transferencia del T-ADN a las células vegetales.

El sistema de transferencia génica de *A. tumefaciens* mencionado anteriormente es el agente etiológico de la agalla de corona, una enfermedad en un amplio abanico de dicotiledóneas y gimnospermas (DeCleene M. *et al.*, Bot. Rev. 42:389, 1976), que resulta en la formación de tumores o agallas en tejido vegetal en el sitio de la infección. Se ha desarrollado el sistema *Agrobacterium* para permitir la transformación rutinaria de una diversidad de tejidos vegetales (ver, por ejemplo, Schell J. *et al.*, Bio/Technology 1:175, 1983; Chilton M-D, Scientific American 248:50, 1983). Entre los tejidos representativos transformados de esta manera se incluyen el tabaco (Barton K. *et al.*, Cell 32:1033, 1983), el tomate (Fillatti J. *et al.*, Bio/Technology 5:726, 1987), el girasol (Everett N. *et al.*, Bio/Technology 5:1201, 1987), el algodón (Umbeck P. *et al.*, Bio/Technology 5:263, 1987), la colza (Pua E. *et al.*, Bio/Technology 5:815, 1987), la patata (Facciotti D. *et al.*, Bio/Technology 3:241, 1985), el chopo (Pythoud F. *et al.*, Bio/Technology 5:1323, 1987) y la soja (Hinchee M. *et al.*, Bio/Technology 6:915, 1988). Pueden transformarse otras plantas mediante extensiones o modificaciones rutinarias de dichos procedimientos.

Pueden utilizarse múltiples elecciones de cepas de *Agrobacterium* y estrategias de construcción de plásmidos para optimizar la transformación genética de las plantas. Por ejemplo, *A. tumefaciens* puede no ser la única cepa de *Agrobacterium* utilizada. Otras cepas de *Agrobacterium*, tales como *A. rhizogenes*, pueden resultar más adecuadas en algunas aplicaciones. *A. rhizogenes*, que induce la formación de pelos radicales en muchas especies de plantas dicotiledóneas, porta un elemento extracromosómico de gran tamaño denominado plásmido Ri (inductor de raíces), que funciona de un modo análogo al plásmido Ti de *A. tumefaciens*. La transformación utilizando *A. rhizogenes* se ha desarrollado análogamente a la de *A. tumefaciens* y se ha utilizado con éxito para transformar, por ejemplo, alfalfa (Sukhapinda K. *et al.*, Plant Mol. Biol. 8:209, 1987).

Los procedimientos de inoculación del tejido vegetal varían dependiendo de la especie vegetal y del sistema de administración de *Agrobacterium*. Un enfoque conveniente es el procedimiento del disco foliar para transformar la patata; sin embargo, la transformación mediada por *Agrobacterium* puede llevarse a cabo con un explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación y regeneración de la planta completa. La adición de tejido nodriza puede resultar deseable bajo determinadas condiciones. Pueden seguirse otros procedimientos, tales como la transformación *in vitro* de protoplastos en regeneración con *A. tumefaciens*, para obtener también células vegetales transformadas.

Se han desarrollado varios procedimientos de transferencia génica denominada "directa" para transformar plantas y tejidos vegetales sin utilizar un producto intermedio *Agrobacterium*, por ejemplo la regeneración de plantas a partir de protoplastos (Evans D.A. *et al.*, Handbook of Plant Cell Culture 1:124, 1983). En el caso de que pueda regenerarse una especie vegetal a partir de protoplastos, pueden utilizarse procedimientos de transferencia génica directa y la transformación no es dependiente de la utilización de *A. tumefaciens*. En la transformación directa de protoplastos, la incorporación de material genético exógeno en un protoplastos puede potenciarse mediante la utilización de un agente químico o de un campo eléctrico. A continuación, el material exógeno puede integrarse en el genoma nuclear.

Se han llevado a cabo trabajos preliminares en la dicotiledónea *Nicotiana tabacum* (tabaco), en la que se ha demostrado que se incorporaba y transmitía a las plantas descendientes el ADN foráneo (Paszkowski J. *et al.*, EMBO J. 3:2717, 1984; Potrykus I. *et al.*, Mol. Gen. Genet. 199:169, 1985). También se han transformado protoplastos de monocotiledónea mediante este procedimiento: por ejemplo, *Triticum monococum* (Lorz H. *et al.*, Mol. Gen. Genet. 199:178, 1985), *Lolium multiflorum* (centeno italiano) (Potrykus I. *et al.*, Mol. Gen. Genet. 199:183, 1985), maíz (Rhodes C. *et al.*, Bio/Technology 5:56, 1988) y maíz dulce mejicano negro (Fromm M. *et al.*, Nature 319:719, 1986). Entre otras plantas que han sido regeneradas a partir de protoplastos se incluyen el arroz (Abdulah R. *et al.*, Bio/Technology 4:1987, 1987), la colza (Kansha *et al.*, Plant Cell Reports 5:101, 1986), la patata (Tavazza R. *et al.*, Plant Cell Reports 5:243, 1986), la berenjena (Sihachaki D. *et al.*, Plant Cell, Tissue, Organ Culture 11:179, 1987), y el pepino (Jia, S-R. *et al.*, J. Plant Physiol. 124:393, 1986). Los procedimientos para transformar directamente protoplastos de otras variedades resultan evidentes.

La introducción de ADN en protoplastos de una planta puede llevarse a cabo mediante tratamiento de los protoplastos con un pulso eléctrico en presencia del ADN apropiado en un procedimiento denominado electroporación. En este procedimiento, se aíslan los protoplastos y se suspenden en una solución de manitol. Se añade ADN de plásmido circular o superenrollado. La solución se mezcla y se somete a un pulso de aproximadamente 400 V/cm a temperatura ambiente durante menos de 10 a 100 microsegundos. Se produce una rotura física reversible de la membrana, permitiendo la incorporación del ADN en los protoplastos.

También se ha demostrado que la fusión de liposomas es un procedimiento para la transformación de células vegetales. En este procedimiento, se reúnen los protoplastos y los liposomas que portan el gen deseado. A medida que se fusionan las membranas, se transfiere el gen foráneo a los protoplastos (Dehayes A. *et al.*, EMBO J. 4:2731, 1985).

5 Se ha llevado a cabo la transformación mediada por polietilenglicol (PEG) en *N. tabacum* (una dicotiledónea) y *Lolium multiflorum* (una monocotiledónea). Es un procedimiento químico de transferencia génica directa basada en la interacción sinérgica entre  $Mg^{2+}$ , PEG y posiblemente  $Ca^{2+}$  (Negrutiu R. *et al.*, Plant Mol. Biol. 8:363, 1987). Alternativamente, puede introducirse ADN exógeno en células o protoplastos mediante microinyección. Se inyecta una solución de ADN de plásmido directamente en la célula con una aguja de vidrio finamente estirado.

10 Otro procedimiento desarrollado para la transferencia génica directa implica el bombardeo de células con microproyectiles que portan ADN (Klein T.M. *et al.*, Nature 327:70, 1987). En este procedimiento "biolístico", se aceleran partículas de tungsteno u oro recubiertas con el ADN exógeno hacia las células diana. SE ha conseguido una expresión por lo menos transitoria en la cebolla. Este procedimiento se ha utilizado para introducir ADN en células de maíz dulce mejicano negro en cultivo en suspensión y en embriones inmaduros de maíz y también en protoplastos de soja (Klein T.M. *et al.*, Bio/Technology 6:559, 1988). Se han obtenido mediante bombardeo con microproyectiles, cultivos establemente transformados de maíz, tabaco, cebada, avena, trigo, arroz, zanahoria, plátano y soja. También pueden regenerarse plantas establemente transformadas y recuperadas mediante este procedimiento (McCabe D.E. *et al.*, Bio/Technology 6:923, 1988).

20 Para producir semillas transformadas, se transforman flores de *Arabidopsis* según el procedimiento siguiente. Se infiltra *Agrobacterium* bajo vacío en flores en desarrollo, y seguidamente las semillas resultantes se criban para resistencia a marcadores y la expresión de genes foráneos. Presumiblemente, se transforman estambres/polen, ovarios/huevos, o incluso el cigoto en desarrollo en el caso de que ya se haya producido la fertilización. Este procedimiento (descrito en Clough y Bent, Plant J. 16:735, 1998) se utiliza para transformar *Arabidopsis* con un constructo que comprende un gen *rep* bajo la regulación transcripcional del promotor de semillas de At2S-2.

25 Tras la transformación, la célula o tejido vegetal transformado se selecciona o se criba mediante técnicas convencionales. La célula o tejido vegetal transformado que contiene la secuencia de ADN quimérico comentada anteriormente seguidamente se regenera utilizando procedimientos conocidos, incluyendo aquellos descritos en las referencias comentadas anteriormente. Entre las especies de planta que pueden regenerarse más fácilmente mediante estas técnicas y que, de esta manera, resultan preferidas en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, maíz, girasol, colza, trébol, tabaco, algodón, alfalfa, arroz, patata, berenjena, pepino y soja. Las plantas regeneradas se criban para la transformación mediante estándares descritos posteriormente. Se criba la progenie de las plantas regeneradas y se selecciona para la presencia continua de la secuencia de ADN integrada con el fin de desarrollar líneas mejoradas de plantas y de semillas. La secuencia de ADN puede moverse a otras líneas genéticas mediante una diversidad de técnicas, incluyendo el cruce clásico, la fusión de protoplastos, la transferencia nuclear y la transferencia cromosómica.

35 *Plantas, células y semillas que resultan útiles según la invención*

40 Entre las plantas que pueden utilizarse para la práctica de la presente invención se incluyen una dicotiledónea y una monocotiledónea. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, tabaco, zanahoria, espinacas, pimiento, patata, tomate, manzana, trigo, centeno, soja, arroz, maíz, maíz, frutos tales como fresas, frambuesas, alfalfa y plátano. Debido a que muchas plantas comestibles utilizadas por el ser humano como alimento o como componentes de pienso animal son plantas dicotiledóneas, típicamente se utilizan dicotiledóneas, aunque la transformación de monocotiledóneas también resulta aplicable, especialmente en la producción de determinados cereales que resultan útiles para el pienso animal. Resulta particularmente ventajoso en la inmuno-anticoncepción humana producir una proteína anticonceptiva en un zumo para la fácil administración en seres humanos, tal como zumo de tomate, de soja y de zanahoria, o leche. Las células y semillas derivadas a partir de dichas vacunas vegetales también resultan útiles según la invención.

Una planta transgénica transformada con un vector indicado anteriormente en la presente memoria es otro aspecto de la presente invención. Entre las plantas huésped particularmente preferentes para el vector se incluyen el plátano, el tomate, la patata, la zanahoria, la alfalfa, *Medicago*, el maíz y el tabaco.

50 Las variedades particularmente preferidas son las variedades FL 1607 ("Frito Lay 1607") y Desiree de la patata, y la variedad Tanksley TA234TM2R del tomate, que han sido transformadas con vectores binarios utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria. De estas variedades transformadas, Desiree es la única variedad comercial; las otras variedades pueden obtenerse de Frito-Lay (Rhineland, WI) y Steve Tanksley (Dept. of Plant Breeding, Cornell Univ.). El tomate resulta preferido como sistema modelo para la expresión de proteínas foráneas debido a su fácil transformación genética, y debido a que los promotores específicos de fruta dependientes de la maduración se encuentran disponibles para la expresión regulada (Giovannoni *et al.*, 1989). El promotor E8 ha sido utilizado para mediar en la producción de nivel elevado de la proteína poligalacturonasa en fruto del tomate mutante (Giovannoni *et al.*, 1989) y de monelina en fruto del tomate de tipo salvaje (Penarrubia *et al.*, 1992).

Los cultivos en suspensión de células vegetales son ampliamente conocidos y se encuentran ampliamente disponibles para el experto en la materia. El cultivo celular vegetal resulta preferido como sistema modelo para la



expresión de proteínas foráneas debido a que permiten la transformación, crecimiento y producción de proteínas más rápidamente que los sistemas de plantas completas. Los cultivos en suspensión de células vegetales pueden cultivarse en líquido, o pueden transformarse a medios sólidos para la producción de callos. Entre los ejemplos comunes de cultivos de suspensión celular que podrían utilizarse para los fines descritos en la invención se incluyen, aunque sin limitación, la zanahoria, el tabaco (por ejemplo las líneas celulares NT-1 o BY-1) y el maíz.

#### Detección de material vegetal transformado

La invención proporciona procedimientos de detección de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de proteínas anticonceptivas y las proteínas anticonceptivas mismas, incluyendo, aunque sin limitación, el análisis de transferencia southern y northern, los procedimientos de detección basados en la PCR, así como procedimientos inmunológicos de detección de una proteína de interés según la invención. Estas técnicas pueden utilizarse según la invención para confirmar la presencia de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de proteínas anticonceptivas, y opcionalmente proteínas de direccionamiento mucoso, y para confirmar la expresión de las proteínas anticonceptivas y de direccionamiento mucosal mismas.

#### *Detección de una secuencia de nucleótidos de interés*

##### 1. Análisis de transferencia southern

Puede utilizarse el análisis de transferencia southern para detectar una secuencia de nucleótidos de interés de un producto de amplificación mediante PCR o de una muestra de ensayo de ADN genómico total mediante un ensayo no basado en la PCR. El procedimiento de análisis de transferencia southern es bien conocido en la técnica (Ausubel *et al.*, *supra*; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Esta técnica implica la transferencia de fragmentos de ADN de un gel de electroforesis a un soporte de membrana que resulta en la inmovilización de los fragmentos de ADN. La membrana resultante es portadora de una reproducción semipermanente del patrón de bandas del gel.

El análisis de transferencia southern se lleva a cabo siguiendo el procedimiento siguiente. El ADN genómico obtenido (5 a 20 µg) de una planta transformada con un vector de ácidos nucleicos según los procedimientos de la presente invención se digiere con el enzima de restricción apropiado y se separa en un gel de agarosa al 0,6-1,0% en tampón TAE. Se transfirió el ADN a una membrana de nilón o de nitrocelulosa comercializada (por ejemplo una membrana Hybond-N, Amersham, Arlington Heights, IL) mediante procedimientos bien conocidos de la técnica (Ausubel *et al.*, *supra*; Sambrook *et al.*, *supra*). Tras la transferencia y el entrecruzamiento con U.V., la membrana se hibridó con una sonda marcada en solución de hibridación (por ejemplo bajo condiciones astringentes en 5X SSC, 5X solución de Denhardt, SDS al 1%) a 65°C. Alternativamente, puede llevarse a cabo una hibridación de elevada astringencia a 68°C o en un tampón de hibridación que contenga una concentración salina reducida, por ejemplo 0,1X SSC. Las condiciones de hibridación pueden modificarse según resulte necesario según los parámetros conocidos de la técnica. Tras la hibridación, se lavó la membrana a temperatura ambiente en 2X SSC/SDS al 0,1% y a 65°C en 0,2X SSC/SDS al 0,1%, y se expuso a película. La astringencia de los taponces de lavado también puede modificarse, dependiendo de la magnitud de la señal de fondo (Ausubel *et al.*, *supra*).

La detección de un híbrido de sonda de ácidos nucleicos-ácidos nucleicos diana incluye la etapa de hibridar una sonda de ácidos nucleicos con el ADN diana, en donde la sonda es complementaria a una parte de la secuencia de ácidos nucleicos del constructo de ADN indicado anteriormente. Esta sonda puede marcarse radioactivamente o unirse covalentemente a un enzima, de manera que el enlace covalente no interfiera con la especificidad de la hibridación. Puede detectarse un híbrido resultante entre el ADN vegetal y la sonda. Entre los procedimientos para marcar una sonda se incluyen la síntesis cebada por oligonucleótidos aleatorios, la traducción de muescas, las reacciones de quinasa, o la reacción en cadena de la polimerasa (ver Ausubel *et al.*, *supra*). Alternativamente, puede detectarse un híbrido mediante procedimientos no isotópicos. Pueden producirse sondas marcadas no isotópicamente mediante la adición de biotina o digoxigenina, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo dioxetanos, particularmente dioxetanos inducidos), enzimas o anticuerpos. Típicamente, se detectan las sondas no isotópicas mediante fluorescencia o procedimientos enzimáticos. La detección de un complejo de sonda de ácidos nucleicos-ácidos nucleicos diana marcado radioactivamente puede llevarse a cabo mediante la separación del complejo de la sonda libre y midiendo el nivel de complejo mediante autorradiografía o recuento de centelleo. En el caso de que la sonda se encuentre unida covalentemente a un enzima, el complejo de conjugado enzima-sonda-ácido nucleico diana se aísla del conjugado sonda-enzima libre y se añade un sustrato para la detección enzimática. Se observa la actividad enzimática como un cambio en el desarrollo de color o de salida luminiscente que resulta en un incremento de  $10^3$  a  $10^6$  de la sensibilidad. Un ejemplo de la preparación y utilización de conjugados de sonda de ácidos nucleicos-enzima como sondas de hibridación (en las que el enzima es la fosfatasa alcalina) se describe en Jablonski *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 14:6115, 1986).

Las metodologías de amplificación de marcajes en dos etapas son conocidas de la técnica. Estos ensayos se basan en el principio de que un ligando de pequeño tamaño (tal como digoxigenina, biotina o similar) se une a una sonda de ácidos nucleicos capaz de unirse específicamente a un gen de interés (es decir, un gen codificante de una proteína anticonceptiva o parte de la misma).

Según el procedimiento de amplificación de marcaje en dos etapas, el ligando de tamaño reducido unido a la

sonda de ácidos nucleicos resultará específicamente reconocido por un conjugado de anticuerpo-enzima. Por ejemplo, se une digoxigenina a la sonda de ácidos nucleicos y se detecta la hibridación mediante un conjugado de anticuerpo-fosfatasa alcalina en el que la fosfatasa alcalina reacciona con un sustrato quimioluminiscente. Para procedimientos de preparación de conjugados de sonda de ácidos nucleicos-ligando pequeño, ver Martin *et al.*, *BioTechniques* 9:762, 1990. Alternativamente, el ligando pequeño resultará reconocido por un segundo conjugado de ligando-enzima que puede acomplejarse específicamente con el primer ligando. Un ejemplo bien conocido de este modo de interacción de ligando pequeño es la interacción entre biotina y avidina. Los procedimientos para marcar sondas de ácidos nucleicos y su utilización en ensayos de tipo biotina-avidina se describen en Rigby *et al.*, *J. Mol. Biol.* 113:237, 1977, y Nguyen *et al.*, *BioTechniques* 13:116, 1992.

Las variaciones del protocolo básico de detección de híbridos son conocidas de la técnica, e incluyen modificaciones que facilitan la separación de los híbridos que deben detectarse de los materiales extraños y/o que utilizan la señal del grupo marcado. Se revisan algunas de estas modificaciones en, por ejemplo, Matthews y Kricka, *Anal. Biochem.* 169:1, 1988; Landegren *et al.*, *Science* 242:229, 1988; Mittlin, *Clinical Chem.* 35:1819, 1989; patente US nº 4.868.105 y en la publicación EPO nº 225.807.

## 2. Análisis de transferencia northern

El procedimiento de transferencia northern es bien conocido en la técnica. Esta técnica implica la transferencia de ARN de un gel de electroforesis a una membrana de soporte para permitir la detección de secuencias específicas en preparaciones de ARN.

Se llevó a cabo un análisis de transferencia northern siguiendo el procedimiento siguiente. Una muestra de ARN obtenida de tejido vegetal transformado con los constructos de ADN indicados anteriormente (preparados mediante la adición de tampón MOPS, formaldehído y formamida) se separó en un gel de agarosa/formaldehído en tampón 1X MOPS. Tras la tinción con bromuro de etidio y la visualización bajo luz ultravioleta para determinar la integridad del ARN, se hidrolizó el ARN mediante tratamiento con NaOH 0,05 M/NaCl 1,5 M, seguido de la incubación con Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4)/NaCl 1,5 M. Se transfirió el ARN a un nilón o membrana de nitrocelulosa comercializado (por ejemplo membrana Hybond-N, Amersham, Arlington Heights, IL) mediante procedimientos bien conocidos de la técnica (Ausubel *et al.*, *supra*; Sambrook *et al.*, *supra*). Tras la transferencia y entrecruzamiento con U.V., la membrana se hibridó con una sonda marcada en solución de hibridación (por ejemplo en formamida al 50%/solución de Denhardt al 2,5%/100 a 200 mg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado/SDS al 0,1%/5X SSPE) a 42°C. Las condiciones de hibridación pueden modificarse según resulte necesario, tal como se describe en Ausubel *et al.*, *supra*, y en Sambrook *et al.*, *supra*. Tras la hibridación, la membrana se lavó a temperatura ambiente en 2X SSC/SDS al 0,1% a 42°C en 1X SSC/SDS al 0,1% a 65°C en 0,2X SSC/SDS al 0,1% y se expuso a película. También puede modificarse la astringencia de los tampones de lavado, dependiendo de la magnitud de la señal de fondo (Ausubel *et al.*, *supra*).

## 3. PCR

Las secuencias de ácidos nucleicos de interés (es decir, las codificantes de una proteína anticonceptiva) de la invención se amplificaron a partir de ADN genómico o de otras fuentes naturales, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los procedimientos de PCR son bien conocidos por el experto en la materia.

La PCR proporciona un procedimiento para amplificar rápidamente una secuencia particular de ADN mediante la utilización de múltiples ciclos de replicación de ADN catalizados por una ADN polimerasa ADN-dependiente termoestable para amplificar la secuencia diana de interés. La PCR requiere la presencia de un ácido nucleico que debe amplificarse, dos cebadores oligonucleótidos de una cadena flanqueantes de la secuencia que debe amplificarse, una ADN polimerasa, desoxirribonucleósidos trifosfato, un tampón y sales.

El procedimiento de la PCR es bien conocido en la técnica. La PCR se llevó a cabo tal como se describe en Mullis y Faloona, *Methods Enzymol.* 155:335, 1987.

La PCR se llevó a cabo utilizando ADN molde (por lo menos 1 fg, más útilmente 1 a 1.000 ng) y por lo menos 25 pmoles de cebadores oligonucleótidos. Una mezcla de reacción típica incluye: 2 µl de ADN, 25 pmoles de cebador oligonucleótido, 2,5 µl de 10X tampón para PCR 1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0,4 µl de dNTP 1,25 µM, 0,15 µl (o 2,5 unidades) de ADN polimerasa Taq (Perkin Elmer, Foster City, CA) y agua desionizada hasta un volumen total de 25 µl. La PCR se llevó a cabo utilizando un ciclador térmico programable.

La duración y temperatura de cada etapa de un ciclo de PCR, así como el número de ciclos, se ajustaron según los requisitos de astringencia. La temperatura de hibridación y la temporización se determinaron a partir de tanto la eficiencia con la que se espera que un cebador se hibride con un molde, y el grado de apareamiento incorrecto que debe tolerarse. La capacidad de optimizar la astringencia de las condiciones de hibridación e cebadores se encuentra perfectamente comprendida dentro de los conocimientos del experto ordinario en la materia. Se utiliza una temperatura de apareamiento de entre 30°C y 72°C. La desnaturalización inicial de las moléculas de molde normalmente se produce entre 92°C y 99°C durante 4 minutos, seguido de 20 a 40 ciclos consistentes de desnaturalización (94°C a 99°C durante 15 segundos a 1 minuto), apareamiento (temperatura determinada tal como se ha comentado anteriormente; 1 a 2 minutos) y extensión (72°C durante 1 minuto). La etapa final de extensión se llevó a cabo de manera general durante 4 minutos a 72°C, a la que puede seguir una etapa de duración indefinida (0 a 24 horas) a 4°C.

Varias técnicas para detectar productos de PCR cuantitativamente sin electroforesis pueden resultar útiles según la invención. Una de estas técnicas, para la que existen kits comercializados, tales como Taqman™ (Perkin Elmer, Foster City, CA), se lleva a cabo con una sonda antisentido específica de transcrito. Esta sonda es específica para el producto de PCR (por ejemplo un fragmento de ácidos nucleicos derivado de un gen de interés) y se prepara con un compuesto extintor y una sonda informadora fluorescente acomplejada con el extremo 5' del oligonucleótido. Pueden unirse diferentes marcadores fluorescentes a diferentes informadores, permitiendo la medición de dos productos en una reacción. En el caso de que se active la ADN polimerasa Taq, escinde los informadores fluorescentes de la sonda unida al molde en virtud de su actividad nucleolítica 5' a 3'. En ausencia de los extintores, los informadores emiten fluorescencia. El cambio de color de los informadores es proporcional a la cantidad de cada producto específico y se mide con un fluorímetro; por lo tanto, la cantidad de cada color puede medirse y el producto de PCR puede cuantificarse. Las reacciones de PCR pueden llevarse a cabo en placas de 96 pocillos de manera que pueden tratarse y medirse simultáneamente múltiples muestras. El sistema Taqman™ presenta la ventaja adicional de no requerir electroforesis en gel y de permitir la cuantificación en el caso de que se utilice con una curva de estándares.

#### Detección de una secuencia de proteína de interés

##### 1. Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos específicos para las proteínas anticonceptivas de la presente invención resultan útiles para la purificación y detección de proteínas. El término "anticuerpo" comprende construcciones que utilizan la región de unión (variable) de dicho anticuerpo y otras modificaciones del mismo. De esta manera, un anticuerpo que resulta útil en la invención puede comprender un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un agregado polifuncional de anticuerpos, o en general una sustancia que comprende uno o más sitios de unión específicos de un anticuerpo. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento, tal como un fragmento Fv, Fab o F(ab')<sub>2</sub> o un derivado de los mismos, tal como un fragmento Fv de una cadena. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser no recombinante, recombinante o humanizado. El anticuerpo puede ser de un isotipo de inmunoglobulina, por ejemplo IgG, IgM, y similares. Además, puede utilizarse, en caso apropiado, un agregado, polímero, derivado y conjugado de una inmunoglobulina o de un fragmento de la misma.

Aunque un producto proteína (o fragmento u oligopéptido del mismo) de un gen de interés de la invención que resulta útil para la producción de anticuerpo no requiere actividad biológica, debe ser antigénico. Los péptidos utilizados para inducir anticuerpos específicos pueden presentar una secuencia de aminoácidos que consiste de por lo menos cinco aminoácidos y preferentemente de por lo menos 10 aminoácidos. Preferentemente, deberían ser idénticos a una región de la proteína natural y pueden contener la secuencia de aminoácidos entera de una molécula natural de tamaño reducido. Pueden fusionarse tramos cortos de aminoácidos correspondientes a epítomos específicos de especie de las proteínas anticonceptivas de la invención, con aminoácidos de otra proteína (es decir, una proteína de direccionamiento mucoso) tal como LT-B, y producirse anticuerpos contra la molécula quimérica. Pueden utilizarse procedimientos bien conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos contra las proteínas de interés de la invención.

Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos huéspedes, incluyendo cabras, conejos, ratas, ratones, etc., mediante inyección con los productos proteicos (o una parte, fragmento u oligonucleótido de los mismos que conserva propiedades inmunogénicas) de los genes de interés de la invención. Dependiendo de la especie de huésped, pueden utilizarse diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes comprenden de manera no limitativa, solución de Freund, geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, y sustancias activas en superficie, tales como lisolecitina, poliols plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa americana y dinitrofenol. BCG (bacilos Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son adyuvantes potencialmente útiles en el ser humano.

##### a. Anticuerpos policlonales

La proteína antígeno puede conjugarse con un portador convencional con el fin de incrementar su inmunogenicidad, e inducirse un antisero contra el conjugado de péptido-portador. El acoplamiento de un péptido a una proteína portadora y las inmunizaciones pueden llevarse a cabo tal como se ha descrito (Dymecki *et al.*, J. Biol. Chem. 267:4815, 1992). El suero puede titularse contra la proteína antígeno mediante ELISA (posteriormente) o, alternativamente, mediante transferencia por puntos o manchas (Boersma y Van Leeuwen, J. Neurosci. Methods 51:317, 1994). Simultáneamente, puede utilizarse el antisero en secciones de tejido preparadas tal como se ha descrito. Un suero útil reaccionará fuertemente con los péptidos apropiados mediante ELISA, por ejemplo siguiendo los procedimientos de Green *et al.*, Cell 28:477, 1982.

##### b. Anticuerpos monoclonales

Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales son bien conocidas, y pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando un antígeno candidato cuyo nivel debe medirse o que se encuentra inactivado o ha sido purificado por afinidad, preferentemente unido a un portador, tal como describen Arnheiter *et al.*, Nature 294:278, 1981.

Los anticuerpos monoclonales típicamente se obtienen a partir de cultivos de tejido de hibridoma o de líquido ascites obtenido de animales en los que se ha introducido tejido de hibridoma.

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (o sueros policlonales) pueden cribarse para la unión de anticuerpos a la proteína diana.

## 2. Procedimientos de detección de anticuerpos

5 Los ensayos inmunológicos particularmente preferidos se basan en la utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales e incluyen inmunoensayos ligados a enzima (ELISA), inmunotransferencia, inmunohistoquímica e inmunoprecipitación (ver Humason G.L., *Animal Tissue Techniques*, 4ª edición, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1979; Voller, *Diagnostic Horizons*, 2:1, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD, 1978; Voller *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 31:507, 1978; patente US republicada nº 31.006; patente UK nº 2.019.408; Butler, *Methods Enzymol.* 73:482, 1981; Maggio E. (editor), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1980) o radioinmunoensayos (RIA) (Weintraub B., *Principles of radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986, páginas 1 a 5, 46 a 49 y 68 a 78). Para analizar plantas para la presencia o ausencia de una proteína de interés según la presente invención, pueden utilizarse técnicas inmunohistoquímicas. Resultará evidente para el experto en la materia que la molécula de anticuerpo podría tener que marcarse para proporcionar una fácil detección de una proteína diana. Las técnicas para marcar moléculas de anticuerpo son bien conocidas por el experto en la materia (ver Harlow y Lane, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

### Dosificación y administración de material vegetal transgénico

20 La presente invención proporciona un procedimiento para inducir la anticoncepción en un animal mediante la administración en un animal de un material vegetal transgénico que expresa una proteína anticonceptiva, en la que la administración del material vegetal transgénico induce una respuesta inmunológica de la mucosa contra la proteína anticonceptiva. Sin restringirse a una teoría en particular, la presente invención se basa en la administración de material vegetal transgénico en un animal, de manera que las proteínas anticonceptivas expresadas por las células vegetales transgénicas entran en contacto con una o más superficies mucosales del animal en el que se administran. Al incorporarse la proteína anticonceptiva (antígeno) en las células M que recubren el GALT y el BALT, resulta una inmunidad mucosal generalizada, produciéndose IgA secretorias contra la proteína anticonceptiva en todos los tejidos secretorios del cuerpo (Cebra *et al.*, *supra*; Bienenstock *et al.*, *supra*; Weinz-Carrington *et al.*, *supra*; McCaughan *et al.*, *supra*). Por lo tanto, la administración oral es una vía preferida para estimular una respuesta inmunológica de la mucosa generalizada y, además, para conducir a la estimulación local de una respuesta inmunológica secretoria en la cavidad oral y en el tracto gastrointestinal.

30 En una forma de realización preferida, la proteína anticonceptiva producida mediante los procedimientos de la presente invención se administra mediante el consumo oral del alimento que ha sido producido a partir de la planta transgénica o cultivo de células vegetales, produciendo la proteína anticonceptiva. En una forma de realización, la parte comestible de una planta transgénica de la presente invención se administra en forma de componente de la dieta, mientras que la proteína anticonceptiva se administra simultáneamente.

35 En una forma de realización, el material vegetal transgénico se administra en un animal en forma cruda, aunque el material vegetal puede tratarse mediante corte, corte en trozos, picado, corte en dados, trituración en puré, o de otro modo, reduciendo el material vegetal transgénico a trozos más pequeños para facilitar de esta manera la ingestión por un animal, tal como mediante la reducción de hierbas transgénicas a forraje ensilado para la ingestión por parte del ganado. Entre los materiales vegetales transgénicos que pueden administrarse en forma cruda se incluyen, aunque sin limitación, frutos, hojas, tallos, raíces, tubérculos y semillas. En una forma de realización adicional, en la que el material vegetal transgénico se encuentra en forma de hierbas o granos, la planta puede administrarse en un animal permitiendo que un animal en el que debe administrarse la proteína anticonceptiva que consuma oralmente el material vegetal en el ambiente en el que crece (por ejemplo se cultiva hierba transgénica en un campo en el que se deja que pasten vacas, administrando de esta manera la proteína anticonceptiva en la vaca).

45 En otra forma de realización, el material vegetal transgénico puede someterse a tratamiento adicional (es decir, aparte de troceado o corte) previamente a la administración en un animal. El material vegetal transgénico puede tratarse mediante una técnica conocida por el experto en la materia, por la que el material vegetal transgénico de la presente invención se refina para la aplicación oral, nasal o por inhalación. El material vegetal puede tratarse mediante emulsificación con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el antígeno. Entre los excipientes adecuados se incluyen, aunque sin limitación, adyuvantes, tampones, azúcares, antioxidantes, estabilizantes o polvos antigénicos, por ejemplo ascorbato sódico, extracto de *Quillaja*, agua, solución salina, dextrosa, glucosa, sacarosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener ciertas cantidades de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH, o adyuvantes que incrementan la efectividad de las vacunas. Además, el material vegetal puede mezclarse con material vegetal o no vegetal no transgénico para facilitar la ingestión por parte de un animal. Por ejemplo, puede mezclarse maíz transgénico con otros vegetales, o pueden mezclarse plantas de soja transgénica con otros ingredientes, tales como especias, u otros saborizantes, para producir, por ejemplo, hamburguesas de soja, batidos de soja, o leche de soja. A título de ejemplo adicional, pueden filtrarse cultivos de tabaco transgénico y añadirse a materiales de pienso comunes mediante, aunque sin limitarse a ellos, mezcla, pulverización o recubrimiento final. Además, el material vegetal transgénico puede secarse y administrarse en forma de polvos solo o en forma de una suspensión en un líquido aceptable, tal como zumo o agua.

En una forma de realización adicional, el material vegetal puede tratarse de manera que incorpore el material vegetal y/o las células en cremas, pomadas, ungüentos o supositorios farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con lo anterior, el material vegetal transgénico transportado por un medio farmacéutico puede administrarse en un animal mediante la puesta en contacto del material vegetal farmacéuticamente transportado hasta una superficie mucosal, incluyendo, aunque sin limitación, una superficie oral, nasal, rectal o vaginal. Entre las superficies mucosales adicionales que pueden ponerse en contacto con material vegetal transgénico de la presente invención se incluyen la capa interna de los bronquios, la capa mucosa de la cavidad timpánica, la capa mucosa interna del colon, la capa interna del conducto deferente, la capa interna del esófago, la capa mucosa del intestino delgado, la capa mucosa de la laringe, la membrana mucosa de la lengua, la membrana pituitaria, la membrana mucosa de la cavidad oral, la membrana mucosa de la faringe, la capa mucosa interna de la tráquea, el revestimiento del conducto auditivo, la capa mucosa del tubo uterino, la capa interna del uréter, la capa interna de la uretra, el endometrio, la membrana mucosa de la vagina, la capa mucosa del estómago, la capa interna de la vejiga urinaria, y la membrana mucosa de la vesícula seminal.

#### *Dosificación*

El material vegetal transgénico de la presente invención puede administrarse en un animal de varias formas diferentes, tal como se ha indicado anteriormente (por ejemplo en crudo, en polvo, etc.). En las formas de realización preferidas, el material vegetal transgénico que resulta útil en la presente invención expresará por lo menos 8 µg de proteína anticonceptiva, o una fusión de proteína anticonceptiva/proteína de direccionamiento mucoso por gramo de material vegetal seco, preferentemente por lo menos 10 µg, y más preferentemente por lo menos 20 µg de proteína anticonceptiva por gramo de material vegetal seco.

En una forma de realización, los animales alojados en un ambiente controlado, tal como un laboratorio, perrera, u hogar privado, y los animales alojados en el exterior, pero cuya ingestión de alimento se encontraba regulada (por ejemplo el ganado), se alimentaron con material vegetal transgénico a intervalos semanales durante por lo menos 12 semanas (es decir, los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77). Durante cada alimentación, los animales recibieron entre 4 y 100.000 gramos de material vegetal transgénico, dependiendo del tamaño e ingesta alimentaria media del animal que debía tratarse (por ejemplo una vaca de promedio consume aproximadamente 90 libras de alimento al día).

En una forma de realización alternativa, las poblaciones animales en cautividad tal como se ha indicado anteriormente se alimentan con material vegetal transgénico diariamente (por ejemplo los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6) para conseguir una vacunación anticonceptiva, y después se alimentan con material vegetal transgénico en un programa de refuerzo periódico (por ejemplo mensual) para mantener un estado inmunológico anticonceptivo suficiente.

En una forma de realización alternativa, la administración de material vegetal transgénico se utiliza para incrementar la administración parenteral de preparaciones anticonceptivas. Por ejemplo, un veterinario puede administrar una preparación anticonceptiva (producida mediante sistemas tales como células vegetales, bacterianas, de levadura o de mamífero) a un animal de compañía al inicio de la pubertad, y reforzarlo en un programa periódico (por ejemplo mensual) con un pienso anticonceptivo de prescripción derivado de los materiales vegetales transgénicos indicados en la presente memoria.

En una forma de realización alternativa para la aplicación en el ser humano, pueden formularse materiales vegetales transgénicos en cápsulas o comprimidos e incorporarse en un régimen de autoadministración, de manera que las tabletas o cápsulas anticonceptivas y no anticonceptivas se empaqueten de manera que la dosificación y la no dosificación se produzcan en días alternativos.

En una forma de realización alternativa, puede administrarse material vegetal transgénico en animales en el medio salvaje en forma de cebos de alimento que se sitúan en el ambiente natural de los animales. Los mejores procedimientos para la administración de cebos y el modelado de los efectos poblacionales de cada aplicación se encuentran disponibles para el experto en la materia del control de poblaciones salvajes, y determinará el mejor régimen específico de colocación de cebos para cada especie diana. Alternativamente, puede permitirse que las plantas transgénicas que expresan las proteínas anticonceptivas de la presente invención crezcan de forma salvaje en áreas pobladas por animales en los que debe administrarse la proteína anticonceptiva. Las plantas pueden examinarse utilizando las técnicas descritas en la presente memoria, para medir la cantidad de proteína anticonceptiva expresada por la planta. En las formas de realización preferidas, la planta transgénica que crece en el medio salvaje expresará por lo menos 8 µg de proteína anticonceptiva, o una fusión de proteína anticonceptiva/proteína de direccionamiento mucoso por gramo de material vegetal seco, preferentemente por lo menos 10 µg, y más preferentemente por lo menos 20 µg de proteína anticonceptiva por gramo de material vegetal seco. Bajo estas condiciones, se permitiría que los animales salvajes se alimentaran *ad libitum* del material vegetal transgénico.

#### Adyuvante

Es bien conocido en la técnica que pueden añadirse adyuvantes a un antígeno inmunológico con el fin de incrementar la respuesta antigénica (Coligan L.G. *et al.*, editores, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, 1995). El adyuvante completo de Freund ha sido el adyuvante inmunológico principal durante décadas. Aunque habitualmente resulta efectivo, el adyuvante puede inducir efectos secundarios no deseables, lo que ha

conducido al refinado de su utilización y al desarrollo de alternativas.

Entre otros adyuvantes alternativos se incluyen, aunque sin limitación, el sistema adyuvante Ribi (RAS), que es una emulsión de aceite en agua que contiene endotoxina destoxicada (MPL) y componentes de pared celular micobacteriana (TDW, CWS) en escualeno al 2% (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, Montana); TiterMax, un adyuvante de agua en aceite metabolizable estable (CytRx Corporation, Atlanta Norcross, Georgia); formulación adyuvante Syntex (SAF)<sup>3</sup>, una emulsión de aceite en agua preformada estabilizada por Tween 80 y copolímero en bloque plurónico de polioxietileno/polioxipropileno L121 (Chiron Corporation, Emeryville, California); adyuvante incompleto de Freund (FIA), una alternativa menos inflamatoria del adyuvante completo de Freund (Novavax Inc., Columbia, Maryland); hidróxido de aluminio - ALUM, un adyuvante ampliamente utilizado, especialmente en productos comerciales tales como vacunas (comercializadas como Alhydrogel, Accurate Chemical & Scientific Co., Westbury, New York); SuperCarrier (Syntex Research, Palo Alto, CA); Elvax 40W (DuPont Chemical Co., Wilmington, DE); Montanide, un compuesto de oleato de manida (ISA Seppic Fairfield, NJ); proteína adsorbida a nitrocelulosa (Nilsson BO, Larsson A. Inert carriers for immunization, Res. Immunol. 143:553-557, 1992); adyuvante Gerbu (C-C Biotech, Poway, California); complejos estimulantes inmunológicos (ISCOMS) (Coligan L.G. *et al.*, editores, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, 1995).

Los adyuvantes de saponina han sido utilizados durante muchos años para la vacunación parenteral (entre los productos se incluyen "Quil A" o "QS-21"). Las saponinas son compuestos glucosídicos que se producen como metabolitos secundarios. Se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas superiores y en algunos invertebrados marinos del filum *Echinodermata* (ApSimon *et al.*, Stud. Org. Chem. 17:273-286, 1984). Debido a su actividad antimicrobiana, las saponinas vegetales son defensas químicas efectivas contra microorganismos, particularmente hongos (Price *et al.*, CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 26:27-135, 1987). Las saponinas son responsables de las propiedades tóxicas de muchos invertebrados marinos (ApSimon *et al.*, Stud. Org. Chem. 17:273-286, 1984). La estructura química de las saponinas proporciona un amplio abanico de actividades farmacológicas y biológicas, incluyendo una actividad inmunológica potente y eficaz. Además, los miembros de esta familia de compuestos presentan propiedades de espumante (una característica identificativa), propiedades de surfactante (que son responsables de su actividad hemolítica), de unión al colesterol, fungitóxica, molusquicida, anticonceptiva, retardadora del crecimiento, expectorante, antiinflamatoria, analgésica, antivírica, cardiovascular, inhibidora enzimática y antitumoral (Hostettmann K. *et al.*, Methods Plant Biochem. 7:435-471, 1991; Lacaille-Dubois M.A. y Wagner H., Phytomedicine 2:363-386, 1996; Price K.R. *et al.*, CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 26:27-135, 1987).

Además, las soluciones de saponina pueden utilizarse como detergentes para incrementar la administración de polipéptidos a través de membranas mucosales. Por ejemplo, Pillion D.J. *et al.*, Invest. Ophthal. Vis. Sci. 32:3021-27, 1991, dan a conocer que la administración de insulina en gotas oculares que contienen saponina no purificada de *Gypsophilla* en forma de una solución al 1% provoca una reducción rápida y reproducible de los niveles sanguíneos de D-glucosa en ratas. Las gotas oculares de insulina que no presentaban saponina resultaron inefectivas. El resumen japonés nº JP 62126135, 1987, da a conocer la administración nasal de factor liberador de hormona de crecimiento utilizando una saponina que presenta una estructura esteroidea o triterpeno (ver también Chiou G.C.Y. *et al.*, J. Pharm. Sci. 78:815-818, 1989; y Chiou G.C.Y. *et al.*, J. Ocul. Pharm. 5:81-91, 1989, quienes dan a conocer la administración sistémica de insulina mediante su administración como componente de gotas oculares que contienen saponina (obtenida de Sigma Chemical Company). Esta propiedad detergente de la saponina también podría facilitar la permeabilidad de la membrana biológica, incrementando por lo tanto la respuesta inmunológica.

Los adyuvantes saponina procedentes de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina (*Quillajasaponinas*) son productos química e inmunológicamente bien caracterizados (Dalsgaard K., Arch. Gesamte Virusforsch. 44:243, 1974; Dalsgaard K., Acta Vet. Scand. 19(supl. 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.*, patente US nº 5.057.540, 1991; Kensil *et al.*, Vaccines 92:35, 1992; Bomford R. *et al.*, Vaccine 10:572, 1992; y Kensil C. *et al.*, patente US nº 5.273.965, 1993).

La saponina también existe en otras plantas, tales como la soja (Andrzejewska E., Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 35:135-8, 1984).

Las saponinas de *Quillaja* se encuentran en forma de una mezcla de aproximadamente veinte glucósidos triterpenoide de estructura estrechamente relacionada con diferencias mínimas entre ellas (Higuchi R. *et al.*, Phytochemistry 26:229, 1987; *ibid.*, 26:2357, 1987; *ibid.*, 27:1169, 1988; Kensil *et al.*, patente US nº 5.057.540, 1991; Kensil *et al.*, Vaccines 92:35, 1992), dificultando su separación. Los extractos de saponaria de *Quillaja* se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo de Garuda International, Inc., Lemon Cove, CA 93244). Las patentes US nº 5.273.965 y nº 5.650.398 dan a conocer extractos crudos de saponina, y la patente US nº 5.057.540 da a conocer un extracto de saponina sustancialmente puro. Los procedimientos de extracción para saponina tanto cruda como pura incluyen la purificación del compuesto mediante cromatografía.

Un adyuvante de saponina que resulta útil según la invención incluye un extracto de saponina crudo y puro (Garuda International, Inc., Lemon Cove, CA 93244). Entre los adyuvantes de saponina que resultan útiles también se incluyen partes (por ejemplo hojas, raíces, frutos u otras partes) o plantas tratadas que contienen saponina. El término "tratado" se refiere al corte, troceado, picado, troceado en cubos, o reducción de otro modo a trozos más pequeños de la planta que contiene saponina, de manera que se facilite la digestión por parte de un animal.

En una forma de realización preferida, el adyuvante saponina se administra por vía oral conjuntamente con el material vegetal transgénico.

#### Detección de la inmunización

5 La presente invención proporciona un medio para inducir la anticoncepción en un animal mediante la administración de una proteína anticonceptiva contra la que se induce una respuesta inmunológica de la mucosa. En una forma de realización preferida, tras la administración de material vegetal transgénico que incluye las proteínas anticonceptivas de la presente invención, se examinan los animales para determinar si se ha inducido una respuesta inmunológica contra la proteína anticonceptiva. Los animales pueden examinarse para una respuesta inmunológica contra la proteína anticonceptiva en un momento posterior a la administración del material vegetal.

10 A continuación se describe la evaluación de los antígenos ZP; sin embargo, las técnicas descritas pueden utilizarse para un estado inmunológico del animal respecto a las proteínas anticonceptivas indicadas en la presente memoria. En una forma de realización, el experto en la materia puede determinar si un animal ha sido inmunizado mediante la determinación del estado inmunológico del animal con respecto a los antígenos ZP. Esta evaluación puede realizarse mediante el ensayo del título de anticuerpos ligantes de ZP en una muestra de, por ejemplo, sangre, suero, orina, saliva, lágrimas, etc. Más preferentemente, puede utilizarse para este fin un ensayo de inmunosorción ligada a enzima ("ELISA"), que puede detectar anticuerpos contra el inmunógeno ZP o equivalente (Drell *et al.*, Biol. Reprod. 30:445, 1984; ELISA and Other Solid Phase Immunoassays (Kemeny D.M. *et al.*, editores), John Wiley & Sons, N.Y., 1988).

20 Tal como se apreciará a partir de principios bien conocidos de los inmunoensayos, pueden utilizarse formatos alternativos, tales como ensayos inmunométricos (también conocidos como ensayos "de dos sitios" o "en sándwich"), incluyendo ensayos tanto "directos", "simultáneos" como "inversos" (Fackrell J., Clin. Immunoassay 8:213-219, 1985; Yoken R.H., Rev. Infect. Dis. 4:35, 1982; Collins W.P., en: Alternative Immunoassays, John Wiley & Sons, N.Y., 1985; Ngo T.T. *et al.*, en: Enzyme Mediated Immunoassay, Plenum Press, N.Y., 1985).

25 Por ejemplo, en un ensayo "directo", se unen antígenos ZP a un soporte sólido (tal como una placa de microtitulación, probeta, varilla, etc.) y después, en primer lugar, se ponen en contacto con la muestra, que se evalúa para la presencia de anticuerpo anti-ZP bajo condiciones que permiten la formación de un complejo binario en fase sólida ZP-anticuerpo. Tras la incubación y el lavado, el soporte se pone en contacto con una cantidad de antígeno ZP marcado (que actúa de "molécula informadora"). Tras un segundo periodo de incubación para permitir que el antígeno ZP marcado se acompleje con el ZP inmovilizado a través del anticuerpo no marcado, se lava el soporte sólido una segunda vez para eliminar el antígeno ZP marcado que no ha reaccionado. Este tipo de ensayo en sándwich directo puede ser un ensayo simple "sí/no" para determinar la presencia de anticuerpos anti-ZP, o puede convertirse en cuantitativo mediante la comparación de la cantidad de antígeno ZP marcado que se ha retenido con la obtenida con un estándar que contiene cantidades conocidas de anticuerpo anti-ZP. Los ensayos "de dos sitios" o "en sándwich" se describen en Wide, en: Radioimmune Assay Method, Kirkham *et al.*, editor, E. & S. Livingstone, Edinburgh, páginas 199 a 206, 1970.

40 En una forma de realización preferida, el ensayo ELISA directo puede utilizarse para medir una respuesta inmunológica de la mucosa. El ensayo se lleva a cabo tal como se ha indicado anteriormente, con las modificaciones de que, tras la incubación con la muestra que se evalúa para inmunoglobulinas de la mucosa, el soporte se pone en contacto con anticuerpo anti-IgA marcados, que actúan de informadores de la presencia de IgA en la muestra obtenida del animal.

En un ensayo "simultáneo", se utiliza una única etapa de incubación en la que la ZP unida y la ZP marcada se añaden a la muestra a ensayo simultáneamente. Tras completarse la incubación, se lava el soporte sólido para eliminar el residuo de muestra líquida y de anticuerpo marcado no acomplejado. La presencia de anticuerpo marcado asociado al soporte sólido se determina a continuación tal como se haría en un ensayo en sándwich "directo" convencional.

45 En un ensayo "inverso", se incuba una solución de ZP marcado con la muestra, y seguidamente la reacción se pone en contacto con un soporte sólido al que se ha unido previamente ZP no marcado. Tras una segunda incubación, se lava la fase sólida de un modo convencional para liberarlo del residuo de la muestra a ensayo y la solución de ZP marcado que no ha reaccionado. La determinación del título de anticuerpos se realiza tal como en los ensayos "simultáneo" y "directo".

50 En la forma de realización más preferida, la ELISA de la presente invención utiliza un anticuerpo monoclonal. Más preferentemente, dichos anticuerpos anticuerpos se generan, tal como se ha indicado anteriormente, mediante inmunización de un animal heterólogo (tal como un ratón, rata, conejo, etc.) con un antígeno ZP, y después recolectando los leucocitos esplénicos del animal, y fusionándolos con una célula de mieloma adecuada, de la manera indicada anteriormente.

55 Aunque el inmunoensayo se ha descrito con respecto a un soporte sólido preferido particular, puede utilizarse una diversidad de soportes sólidos alternativos. Los soportes sólidos adecuados pueden estar compuestos de, por ejemplo, materiales tales como vidrio, papel, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácilamidas, agarosas o magnetita. La naturaleza del soporte puede ser soluble en cierto

5 grado o insoluble para los fines de la presente invención. El material de soporte puede presentar virtualmente una posible configuración estructural con la condición de que las moléculas de ZP pueden unirse al anticuerpo. De esta manera, la configuración del soporte puede ser esférica, tal como en una perla, o cilíndrica, tal como en la superficie interna de una probeta, o en la superficie externa de una barra. Alternativamente, la superficie puede ser plana, tal como una hoja, tira de ensayo, etc. El experto en la materia reconocerá muchos otros portadores adecuados para la unión de anticuerpos monoclonales, o será capaz de determinar los mismos mediante la utilización de experimentación rutinaria.

10 En una forma de realización adicional, el estado inmunológico de un animal al que se ha administrado material vegetal transgénico de la presente invención puede evaluarse mediante técnicas inmunohistoquímicas. Brevemente, tras la administración de material vegetal transgénico por una de las vías de administración indicadas anteriormente, los animales hembra pueden sacrificarse y extirparse los ovarios. Debido a que la fertilización se produce en los conductos de Falopio tras la liberación del óvulo del ovario, resulta preferido que la presencia de anticuerpos contra proteínas anticonceptivas de la invención se detecte en los óvulos dentro del ovario. Tras la extirpación del animal, los ovarios se congelan y se obtienen criosecciones. Las secciones se fijan en un fijador conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, formaldehído, acetona, paraformaldehído y glutaraldehído. Posteriormente, las secciones se lavan y se incuban con anticuerpos que se unen a los anticuerpos inducidos por el animal en respuesta a la proteína anticonceptiva. Las secciones se incuban adicionalmente con un anticuerpo secundario que comprende una molécula informadora (por ejemplo un pigmento fluorescente) y se examinan bajo un microscopio. La identificación de anticuerpos dirigidos contra la proteína anticonceptiva expresada por la planta transgénica administrada es indicativa de que en el animal se ha inducido una respuesta inmunológica contra la proteína anticonceptiva. Por ejemplo, en el caso de que el material vegetal transgénico de la presente invención se administre a un ratón, puede medirse una respuesta inmunológica de la mucosa contra la proteína anticonceptiva expresada por la planta, mediante la obtención de secciones de tejido del ovario del ratón, y el tratamiento del tejido con anticuerpos dirigidos contra la cadena kappa de la inmunoglobulina de ratón. La localización del anticuerpo anticadena kappa murina puede visualizarse mediante tratamiento del tejido con un anticuerpo secundario conjugado con un informador, tal como un pigmento fluorescente. A continuación, el tejido puede examinarse bajo un microscopio para localizar visualmente los anticuerpos marcados, y la imagen del marcaje de anticuerpos puede cuantificarse utilizando software informático morfométrico conocido por el experto en la materia, tal como NIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Seguidamente, los datos cuantitativos se comparan estadísticamente con datos de marcaje de anticuerpos similares obtenidos de un ratón que no ha sido tratado con una proteína anticonceptiva de la invención. Una diferencia estadísticamente significativa entre los animales es indicativa de que el ratón ha sido inmunizado con la proteína anticonceptiva, en donde el valor P de la prueba estadística es por lo menos <0,1, <0,05, <0,01, <0,005, 0,001, 0,0005 y preferentemente <0,0001.

#### Determinación del efecto anticonceptivo

35 En la forma de realización más preferida, el efecto anticonceptivo de las proteínas anticonceptivas de la presente invención administradas se determinó mediante la evaluación del número de descendientes producido en cada ciclo reproductivo por un animal hembra en el que se había administrado material vegetal transgénico según los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, tras 5 a 6 semanas de administración de material vegetal transgénico a, por ejemplo, un ratón, se enjaularon ratones hembra individuales con un ratón macho. A continuación, se extrajeron los ratones macho tras 10 a 20 días. Se observaron a continuación los ratones hembra diariamente para el nacimiento de crías. El efecto anticonceptivo de la proteína anticonceptiva administrada se determinó a partir de la reducción del tamaño de camada tras la administración. Por ejemplo, para especies animales que producen camadas medias de 3 descendientes o más (por ejemplo ratones), la proteína anticonceptiva puede considerarse efectiva en el caso de que se produzca una reducción del tamaño de camada de 10% a 100%, 30% a 90%, ó 60% a 80%. Para especies animales que producen camadas medias de 1 ó 2 descendientes (por ejemplo el ciervo de cola blanca), se considera que una proteína anticonceptiva resulta efectiva en el caso de que se produzca una reducción del tamaño de camada de por lo menos 50%, preferentemente de 100%.

50 Alternativamente, la efectividad de las proteínas anticonceptivas de la presente invención puede determinarse mediante la medición de los niveles de anticuerpos contra la proteína anticonceptiva en la sangre, suero, secreciones mucosales, excremento, etc., tal como se ha indicado anteriormente. La efectividad de las proteínas anticonceptivas también puede evaluarse mediante la visualización de anticuerpos contra la proteína anticonceptiva unida al óvulo, mediante técnicas inmunohistoquímicas tal como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, para determinar exactamente la efectividad de una proteína anticonceptiva según la invención, debe evaluarse la medición o visualización de anticuerpos contra la proteína anticonceptiva conjuntamente con la observación de una reducción del tamaño de camada. Por ejemplo, una proteína anticonceptiva puede considerarse no efectiva con independencia de la detección de anticuerpos contra la proteína en el suero de un animal en el caso de que no se produzca ninguna reducción de la fecundidad.

#### **EJEMPLO 1. Fusión de un epítipo de ZP3 de ratón optimizado en plantas contra un gen LT-B sintético optimizado en plantas**

60 Se insertó un fragmento EcoRV y KpnI procedente de TH210 (Mason *et al.*, Vaccine 16:1336, 1998) que contenía una secuencia de LTB sintética, en los sitios correspondientes de pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA), para construir pBlueLTB. Se creó el plásmido pLTB-L mediante la utilización de un sitio BbsI único para fusionar la



región codificante de un conector (traduccional) de 6 aminoácidos con el extremo 3' de la región codificante de LTB dentro de pBlueLTB. Se construyó el conector utilizando dos oligómeros sintetizados comercialmente: 5' AAC TCT GAT CCA CAT GTT CCT (SEC ID nº 1) y 5' AGT TAG GAA CAT GTG GAT CAG (SEC ID nº 2) que habían sido purificados mediante electroforesis en un gel de poli(acrilamida) desnaturante. Los oligómeros se fosforilaron con quinasa de T4 en reacciones separadas, se mezclaron en cantidades equimolares y se aparearon mediante calentamiento a 90°C durante 5 minutos antes de enfriar gradualmente hasta 23°C durante una hora. El plásmido pLTB-L se preparó para la inserción del epítipo de ZP3 de ratón mediante digestión en serie con BbsI y KpnI y desfosforilación con fosfatasa intestinal bovina (CIP).

La secuencia codificante del epítipo de ZP3 de ratón (336-342) se analizó para el uso de los codones en comparación con los genes vegetales (Wada *et al.*, Nucleic Acid Research 18:2367, 1990). Se diseñó un epítipo optimizado en plantas que mantenía la secuencia de aminoácidos del epítipo nativo con nucleótidos adicionales en los extremos 5' y 3' que, tras el ensamblaje de los ligos, proporcionan un fragmento compatible con BbsI y KpnI. Los oligonucleótidos MZepA 5' AAC TTC CAA ATT CAT GGA CCA AGA AAC TAA GTC TTC GGT AC (SEC ID nº 3) y MzepB 5' CGA AGA CTT AGT TTC TTG GTC CAT GAA TTT GGA (SEC ID nº 4) se sintetizaron y se purificaron mediante electroforesis en un gel de poli(acrilamida) desnaturante. El epítipo se ensambló tal como se ha descrito anteriormente para la construcción de pLTB-L. El epítipo se dejó sobre hielo antes de la ligación en un fragmento BbsI, KpnI de pLTB-L, construyendo pLTBL7. Se secuenciaron los plásmidos pLTB-L y pLTBL7 mediante el procedimiento de terminación de cadena dideoxi. Los autores obtuvieron un fragmento NcoI y KpnI de pLTBL7 y lo insertaron en pIBT210 (Haq *et al.*, Science 268:714, 1995) digerido con NcoI y KpnI, obteniendo pAW7. Se purificó el casete de expresión a partir de pAW7 tras la digestión con HindIII y EcoRI y se ligó con pGPTV.kan (Becker *et al.*, Plant Molecular Biology 20:1195) digerido con HindIII y EcoRI, proporcionando pAWBin7.

#### **EJEMPLO 2. Transformación del tomate**

Se electroporó pAWBin7 preparado a partir de cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  en *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. La transformación mediada por *Agrobacterium* de cotiledones del tomate (variedad Tanksley TA234TM2R) se llevó a cabo según Frary y Earle (Frary y Earle, Plant Cell Reports 16:235, 1996) excepto en que las semillas se esterilizaron mediante inmersión en etanol al 70% durante dos minutos antes de enjuagar en agua estéril y lavar en una mezcla de domestos al 10% y Tween-20 al 1% durante dos horas. Las semillas se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril antes de sembrar en placa en medio de fuerza intermedia de Murashige y Skoog (sales MS de fuera intermedia (Murashige y Skoog, Physiologia Plantarum 15:473, 1962), mioinositol 50 mg/l, HCl de tiamina 2 mg/l, HCl de piridoxina 0,5 mg/l, ácido nicotínico 0,5 mg/l, sacarosa 10 g/l y agar Bacto 8 g/l, pH 5,8). Las plántulas se regeneraron en medio que contenía canamicina 300 mg/l. Las líneas individuales se cribaron mediante ELISA dependiente de gangliósidos para la expresión de LTB en hojas y frutos. Las líneas con mejor expresión en frutos se autopolinizaron y las semillas resultantes se germinaron en medio MS suplementado con canamicina 300 mg/l. Las plantas de semillero supervivientes se transfirieron a tierra en invernadero y se autopolinizaron. Los frutos de cada planta T1 se secaron por congelación, se pulverizaron, se agruparon y se almacenaron en un ambiente seco.

#### **EJEMPLO 3. Extracción de proteínas y ELISA**

Se homogeneizaron las muestras de hojas y de frutos frescos procedentes de plantas cultivadas en invernadero o de muestras de frutos secos en 2 (muestras frescas) o 50 (frutos secos) ml/l (respectivamente) de tampón de extracción helado (fosfato sódico 50 mM, pH 6,6, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0,1%, leupeptina 10  $\mu$ g/ml, PMSF 1 mM) en una máquina Bio 101 Fast prep. Los materiales insolubles se pelletizaron mediante centrifugación a 14.000 rpm en una microcentrifuga Eppendorf 5415C a 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se mantuvo sobre hielo durante el análisis y se almacenó a -80°C. Se determinó la concentración total de proteínas de las muestras de plantas utilizando el ensayo de unión con pigmento de Coomassie (BioRad), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se llevó a cabo una ELSIA dependiente de gangliósidos de dos muestras de 1 en 100 diluciones de cada extracto tal como se ha descrito (Haq *et al.*, *supra*) (figura 1a, b, c).

#### **EJEMPLO 4. Purificación y detección de proteínas de fusión**

Se agruparon muestras de frutos secos procedentes de plantas T1 que expresaban más de 8  $\mu$ g de LTB por gramo de peso seco. Se preparó un extracto a partir de las muestras secas tal como se ha indicado anteriormente, con la excepción de que el material se homogeneizó en 20 ml/g de tampón de extracción helado. El sobrenadante resultante se incubó con Sephadex equilibrado con PBS en un agitador de plataforma oscilante a 4°C durante la noche. La solución de Sephadex se dejó reposar y se recogió una muestra de 1 ml y se almacenó a 4°C. Se redujo el volumen de la solución de Sephadex utilizando un embudo de vidrio sinterizado y se enjuagó con 60 ml de PBS helado. Se preparó una suspensión en Sephadex con 5 ml de PBS y se eliminó el aire con un desecador de vacío antes de verterla en una columna Bio Rad X. La columna se lavó con 50 ml de PBS, recogiendo muestras de 1 ml entre el primer y el quinto mililitros de eluido. La proteína de fusión se eluyó utilizando D-(+)-galactosa 0,2 M en PBS y se almacenó a 4°C. Las muestras se analizaron posteriormente utilizando SDS-PAGE y tinción de azul de Coomassie. Se detectó una banda correspondiente a la proteína de fusión en el gel SDS-PAGE. La presencia de la proteína de fusión también se confirmó mediante ELISA tal como se ha indicado en el Ejemplo 3.

**EJEMPLO 5. Aislamiento de ácidos nucleicos genómicos**

Se aislaron los ácidos nucleicos genómicos a partir de tejido foliar joven de plantas T1 mediante molido de 200 a 250 mg de material en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml utilizando nitrógeno líquido y una uña. Los polvos se resuspendieron en 500 µl de tampón de extracción (420 g/l de urea, NaCl 312,5 mM, Tris.HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, sarcocina al 1%) y se incubaron durante 30 minutos con 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) en una centrífuga para muestras. La suspensión resultante se centrifugó durante 15 minutos a 14.000 rpm, 4°C. La fase acuosa superior se recogió y el ARN se precipitó mediante la adición de un volumen igual de LiCl 4 M y la incubación a -20°C durante por lo menos 8 horas. Las muestras se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se extrajo el sobrenadante y se añadió a tubos separados. Se resuspendió el sedimento de ARN en 50 µl de agua estéril sin ARNasa. Se precipitó el ADN genómico del sobrenadante recuperado, mediante adición de 10% de volumen de acetato amónico 7,5 M, 1 volumen de isopropanol helado e incubación a -20°C durante por lo menos 8 horas. Se lavó el ADN con etanol helado al 70%, se dejó secar al aire durante 5 minutos y se resuspendió en 50 µl de agua estéril + ARNasa (50 µl/ml).

**EJEMPLO 6. Transferencia southern**

Se llevó a cabo un análisis de transferencia southern para confirmar la integración cromosómica del ADN de fusión.

Las muestras que contenían 15 µg de ADN se digirieron con 3,4 unidades de HindIII por µg de ADN en una reacción durante la noche a 37°C. Las muestras digeridas se corrieron durante la noche en un gel de agarosa en tae al 1%. Se despurinó el gel (HCl 0,25 M) y se transfirió a una membrana de sonda Zeta (BioRad) siguiendo las recomendaciones del fabricante para la transferencia alcalina. Se fijó el ADN mediante entrecruzamiento con U.V.

Se preparó una sonda marcada para PCR utilizando el conjunto de cebadores, TEV (5'-GCA TTC TAC TTC TAT TGC AGC) (SEC ID nº 5) y VSP (5'-GTG CAT ATC AGC ATA C) (SEC ID nº 6) en un molde pAW7. Se incorporó dCTP marcado con DIG en el amplicón de 588 pb siguiendo las instrucciones del fabricante (kit de síntesis de sonda PCR DIG, Boehringer Mannheim). Las amplificaciones se llevaron a cabo durante 32 ciclos utilizando un termociclador Hybaid PCR Express. El molde se fundió inicialmente a 94°C durante 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos. Se llevó a cabo una etapa de extensión final a 72°C durante 5 minutos antes del remojo a 4°C.

Se precalentaron a 45°C en un horno para hibridación, botellas para hibridación y 10 ml de DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim) en cada membrana. Las membranas se prehibridaron durante por lo menos 90 minutos y se hibridaron durante la noche con una concentración de sonda de 5 µg/ml de DIG Easy Hyb. Los lavados y detección posteriores a la hibridación se llevar a cabo según instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim - lavado con DIG y conjunto de tampones de bloqueo y kit de detección luminiscente de DIG). Las membranas marcadas se visualizaron tras la exposición a película. Se confirmó la integración del ADN de fusión en el cromosoma de la planta huésped.

**EJEMPLO 7. Transferencia northern**

Se utilizó el análisis de transferencia northern para confirmar la expresión de la proteína de fusión al nivel del ARNm.

Se llevó a cabo un análisis northern tal como se describe en Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, *supra*). Brevemente, se desnaturalizaron muestras de ARN genómico con formaldehído/formamida y se corrieron durante dos horas en un gel de agarosa al 1% con MOPS-acetato-EDTA. A continuación, se transfirió ARN a una membrana de sonda Zeta (BioRad) mediante acción capilar vertical y se fijaron mediante entrecruzamiento con U.V. La hibridación con la membrana y la detección se llevaron a cabo tal como con el análisis southern, excepto en que las etapas de hibridación se llevaron a cabo a 42°C. Se confirmó la presencia de ARNm de proteína de fusión.

**EJEMPLO 8. Alimentación de los ratones y recolección de muestras**

Se sometió a ensayo *in vivo* la eficacia del efecto de anticoncepción de las plantas transgénicas utilizando ratones de laboratorio.

Los ratones se alojaron como parejas macho/hembra, aunque los ratones se enjaularon tres hembras por cada macho. Se registró el número de crías de cada hembra durante el experimento.

La fruta secada por congelación en polvo procedente de plantas tomateras que expresaban más de 8 µg de LTB por gramo de masa seca se agrupó y se mezcló. Para cada alimentación, se mezcló el tomate en polvo 1:2 (peso por volumen) con sidra de manzana. La alimentación se llevó a cabo a intervalos quincenales durante 12 semanas (días 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84, 87). Los animales se dividieron en 3 grupos, 4-6 recibieron 4 gramos de tomate de tipo salvaje más sidra de manzana; 4-5 recibieron 4 g de tomate transgénico más sidra de manzana; 4-5 recibieron 4 g de tomate transgénico más sidra de manzana más 10 mg de extracto de *Quillaja* en polvo (Garuda). Desde el día 31, los ratones hembra se sometieron a un protocolo de ayuno en el que, al mediodía, se apartaron en jaulas individuales con únicamente agua y cama. La dieta de ensayo se proporcionó a las 4 de la tarde y se dejó durante la noche. A las 8 de la mañana siguiente, se devolvieron las hembras a su jaula habitual.

Los días 0 y 70 se recogieron muestras de suero de sangrados de la cola de cada hembra y se almacenaron a -80°C para el análisis posterior de anticuerpos. Las muestras finales de suero se recogieron el día 96 mediante punción cardíaca y se almacenaron tal como se ha indicado anteriormente. Se recogieron muestras fecales los días 70 y 87 y se congelaron durante la noche a -80°C. Las muestras de sedimento congelado se liofilizaron, se resuspendieron en 0,8 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 (PBS), se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta el ensayo.

#### **EJEMPLO 9. ELISA para anticuerpos antiepítipo LTB y anti-ZP3 y fertilidad de los ratones experimentales**

Se sometieron a ensayo muestras para IgG antiepítipo LTB y anti-ZP3 en suero e IgA antiepítipo LTB y anti-ZP3 en sedimentos fecales tal como se ha descrito (Dickenson y Clements, Infect. Immun. 63:1617, 1995). Se muestran los resultados en las figuras 2a y 2b. Las muestras de diluyeron en serie en PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (PBST). Para la detección de los anticuerpos anti-LTB, se recubrieron placas de microtitulación con gangliósidos mixtos (tipo III), Sigma, St. Louis, MO, USA, bloqueados con BSA al 0,25% y se incubaron con LTB recombinante purificado durante una hora. Para la detección de antiepítipo ZP3, se recubrieron placas de microtitulación con epítipo recombinante conjugado con BSA y se bloquearon con BSA al 0,25%. Se detectó el suero antiepítipo LTB o anti-ZP3 utilizando antisuero de conejo contra IgG de ratón o de rata de agua y antisuero anticonejo de ciervo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Se determinaron los niveles de anticuerpos fecales antiepítipo LTB y anti-ZP3 con antisuero de cabra con inmunoglobulinas de ratón o de rata de agua y antisuero anticabra de conejo conjugado con fosfatasa alcalina.

Se examinó el efecto de la administración oral del material sometido a ensayo mediante la comparación entre el número y tamaño de las camadas del grupo de control y del grupo experimental (figura 3). Se utilizaron seis ratones para cada grupo. Los grupos experimentales de ratones se alimentaron con pasta de tomate transgénico. También se examinó el efecto del material de ensayo sobre una especie no diana (ratas de agua) (figura 4).

#### **EJEMPLO 10. Producción de cultivos en suspensión de tabaco anticonceptivos**

Se fusionaron regiones codificantes de un epítipo ZP3 de ratón, un epítipo ZP3 de possum y un epítipo GnRH general a LTB (constructos indicados posteriormente, figuras 5a, b, c). Los epítipos de ratón y de possum se fusionaron individualmente con LTB de manera que se tradujesen a partir del extremo carboxilo-terminal de LTB. Se prepararon tres fusiones con el epítipo GnRH. Se fusionó el epítipo GnRH con LTB de manera que se tradujese a partir del extremo amino-terminal, el extremo carboxi-terminal o dentro del monómero LTB en una posición que se predecía que se localizaba en el exterior de un pentámero de LTB. La región codificante de estas proteínas de fusión seguidamente se introdujo en el casete de expresión vegetal de pIBT210.1 y se insertó en el vector binario pGPTV.kan para la transformación mediada por *Agrobacterium*. Se transformaron células NT1 (suspensión celular de tabaco) con la fusión ZP3-LTB de ratón, la fusión ZP3-LTB de possum, la fusión GnRH-carboxilo y la fusión interna de GnRH.

Se llevó a cabo un análisis ELISA específico de LTB y específico de GnRH de los transformantes de ratón y de fusión de GnRH (figura 6). La detección se confirmó para la fusión del extremo carboxilo-terminal y los niveles de LTB eran bajos para la fusión interna. Se determinó que la fusión interna interfería con la formación de pentámero y por lo tanto, con la detección. Aunque el nivel de expresión era reducido, las células vegetales pudieron expresar el epítipo GnRH.

#### **EJEMPLO 11. Producción de zanahoria transgénica**

Todas las transformaciones se realizaron utilizando el cultivar Nanco de zanahoria (*Daucus carota* L. cv. Nanco). El cultivar Nanco fue uno de los 3 examinados por Gilbert *et al.* en 1996 (referencias posteriormente), y se identificó como superior por su frecuencia de transformación y velocidad de regeneración. Las semillas se obtuvieron de un suministrador comercial de semillas en Hernel Hempstead, Inglaterra, y se importaron al Boyce Thompson Institute for Plant Research (BTI). Todas las semillas se esterilizaron superficialmente con hipoclorito sódico durante 20 minutos, seguido de etanol al 70% durante 20 minutos, previamente a la germinación. Los materiales contaminados con bacterias adicionales o infección fúngica durante las etapas de germinación, transformación o regeneración fueron destruidos. Se extrajeron los hipocótilos de la zanahoria 7 a 15 días después de la germinación aséptica. Los explantes se transfirieron a medio de crecimiento líquido y se cocultivaron con *Agrobacterium* cepa EHA105 (que contiene los vectores de expresión apropiados, tal como se describe a continuación) durante 36 a 48 horas a temperatura ambiente, en la oscuridad y bajo condiciones de agitación lenta. A continuación, se transfirieron los explantes a medio decrecimiento sólido, que contenía auxina 2,4-D vegetal adicional (para estimular la producción de callo embrionario), el antibiótico timentina (para curar todas las trazas remanentes de *Agrobacterium*) y se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente.

Tras cinco (5) semanas, los explantes habían desarrollado un callo significativo y se transfirieron a un medio de crecimiento sólido recién preparado que contenía canamicina para inducir una presión selectiva contra células no transformadas. Todos los tejidos permanecieron a temperatura ambiente y se almacenaron en la oscuridad. Tras 5 semanas adicionales, los callos sanos se transfirieron a medios sólidos frescos en ausencia de 2,4-D y se sometieron a condiciones de buena iluminación para inducir la regeneración de las plántulas. Además, algunos callos se transfirieron a medio fresco (que contenía 2,4-D) y se devolvieron a la oscuridad para estimular la producción adicional de callo para la regeneración en una etapa posterior. Todos los tejidos que no crecieron apropiadamente bajo selección de

canamicina (supuestamente no transgénicos) o que mostraron indicios de contaminación bacteriana o fúngica fueron destruidos.

Tras aproximadamente 10 a 14 semanas en medio renerador/selectivo, con iluminación abundante, las plántulas de zanahoria con raíces y brotes iniciales pudieron transferirse a condiciones de crecimiento controladas en invernadero. La recolección de los materiales radiculares transgénicos se llevó a cabo 8 a 10 semanas después del plantado.

#### **EJEMPLO 12. Producción de cultivos en suspensión de zanahoria transgénica**

Se introdujeron 2 a 5 gramos de callo de zanahoria sano procedente de medio con canamicina (indicado anteriormente) en 50 ml de medio de crecimiento líquido. El medio líquido estándar contenía 400 ml de agua, 400 µl de vitaminas Murashige & Skoog, 1,7 g de sales Murashige & Skoog, 12 g de sacarosa y se esterilizó mediante autoclave antes de añadir concentraciones finales de 2,4-D (2,2 mg/l) y el antibiótico timentina para controlar la contaminación microbiana (300 mg/l). A continuación, se introdujo la mezcla en un agitador orbital a temperatura ambiente, agitando a 100-120 rpm. Se rompió gradualmente el callo en células individuales o agrupaciones celulares más pequeñas. Cada 7 a 10 días, se añadieron 5 ml de cultivo en suspensión a 45 ml de medio de crecimiento líquido fresco para mantener el crecimiento saludable de las células.

#### **EJEMPLO 13. Producción de células de zanahoria en polvo**

Tras 7 a 10 días de crecimiento, los cultivos en suspensión líquida se filtraron sobre papel de filtro y se congelaron a -80°C durante por lo menos 24 horas. Los materiales recogidos y congelados durante un periodo de varias semanas se introdujeron en tubos de liofilización y se acoplaron a un aparato de secado por congelación durante como mínimo 48 horas. El material resultante se pesó, se trituroó manualmente, y se almacenó a -20°C en bolsas de plástico herméticas al aire en alícuotas de aproximadamente 350 g. El material en polvo era altamente anhidro, de manera que se pegaría a la piel humana al entrar en contacto con ella. El material en polvo se había reducido a menos de 10% del peso fresco de recolección. Las muestras del material en polvo se sometieron a ensayo mediante ELISA y PCR específica para el constructo utilizado. Se descubrió que el contenido de antígeno medible se encontraba comprendido en el intervalo de entre 50 y 100 µg por gramo de peso seco, un incremento de aproximadamente 10 a 15 veces de la concentración detectable de antígeno.

#### **EJEMPLO 14. Constructos específicos**

**pTH110** Este constructo codifica la expresión de la subunidad B de la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LT-B). Este constructo ha sido expresado anteriormente en patatas para la administración oral en ratones (Mason *et al.*, *supra*) y para ensayo clínico en seres humanos (Tacket *et al.*, *Nature Med.* 4:607, 1998). Se expresó este constructo en patatas, objeto del número de permiso de importación de MAF 1999007035, y la posterior administración oral en possums en instalaciones de Landcare Research en Licoln, NZ. Se utilizaron zanahorias que expresaban LT-B como materiales de control negativo para los ensayos inmunológicos y de fertilidad de los materiales anticonceptivos indicados posteriormente.

La molécula de LT-B forma un pentámero en forma nativa (y en células vegetales), proporcionando una afinidad de unión para las células epiteliales que revisten las superficies mucosales de los tractos reproductivo, respiratorio y digestivo. Esta afinidad ha proporcionado una estrategia para la administración dirigida de proteínas más pequeñas, tales como epítotos anticonceptivos. Muchos de los constructos siguientes codifican fusiones genéticas entre LT-B y los péptidos inmunoanticonceptivos. El análisis de materiales de hojas y raíces mediante ELISA ha demostrado que la molécula resultante es un pentámero, con coexpresión de los péptidos candidatos.

**pGPTV - MuZP3** En contraste con pTH110, este constructo presenta una secuencia adicional insertada en el extremo carboxilo-terminal del gen LT-B, antes del terminador de VSP. La secuencia adicional incluye un péptido conector (Asn-Ser-Asp-Pro-His-Val-Pro) (SEC ID nº 7) y el epítoto mínimo de células B, residuos aminoácidos 335 a 342 (Asn-Phe-Gln-Ile-His-Gly-Pro-Arg) (SEC ID nº 8), de la glucoproteína 3 de zona pelúcida murina (MuZP3).

**pGPTV - GNRH1** En contraste con pGPTV-MuZP3, este constructo presenta una secuencia codificante del decapeptido de la hormona liberadora de gonadotropina porcina (GnRH), en lugar del epítoto de MuZP3. El conector se encuentra conservado. La secuencia de este decapeptido (Gln-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly) (SEC ID nº 9) es común a la mayoría de mamíferos.

**pGPTV - GNRH3** En contraste con pTH110, este constructo presenta el decapeptido GnRH fusionado (mediante un conector) al extremo amino-terminal del gen LT-B. Dentro del gen LT-B se encuentra un péptido de señal, que resulta cortado durante el tratamiento postraducciona, dejando la proteína monomérica madura. Este corte se produce entre tirosina y glicina (residuos 20 y 21). El epítoto GnRH ha sido insertado inmediatamente después del residuo de glicina. Se utiliza un conector corto (Tyr-Ala-His-Gly) (SEC ID nº 10) para unir el epítoto GnRH al extremo amino-terminal de LT-B, manteniendo la secuencia de inicio glicina-alanina de la proteína madura.

**pGPTV - pAW6** En contraste con pGPTV-GnRH1, este constructo presenta una secuencia codificante de un epítoto de células B predicho de la glucoproteína 3 de zona pelúcida del possum cola de cepillo australiano (PossZP3)

en lugar del deca péptido GnRH. El epítipo está constituido por 27 aminoácidos (334 a 361 de la secuencia nativa) y el conector se encuentra conservado.

**pGPTV - pAW4** En contraste con pTH110, el gen LT-B ha sido sustituido por el gen de longitud completa codificante de ZP3 de possum cola de cepillo.

5 **pGPTV - pAW4-A2** En contraste con pGPTV-pAW4, este constructo contiene una versión truncada de PossZP3, en el que se ha eliminado un péptido putativo de corte. Se ha insertado una secuencia adicional en el extremo carboxilo-terminal del gen ZP3 del possum cola de cepillo, que codifica un conector corto (Gly-Pro-Gly-Pro) (SEC ID nº 11) y la región A2 de la subunidad A de la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LT-A). La colonización por *E. coli* enterotoxigénicas resulta en la secreción de LT-A y LT-B. En su estado nativo (y también en células vegetales), se unen entre sí formando una holotoxina estable. Mientras que LT-B dirige la molécula a los revestimientos epiteliales, es la subunidad A tóxica la que provoca la ribosilación del ADP y posteriormente, diarrea. La subunidad LT-A consiste de dos regiones, A1 y A2. La región denominada A2 forma una hélice alfa que se extiende entre la región A1, cadena abajo hasta el interior del pentámero formado por LT-B, y forma el enlace entre las dos subunidades. La proteína A1 seguidamente se ancla en la parte superior del pentámero. En el caso de pGPTV-pAW4-A2, al cotransformarse las células vegetales con pTH110 (o los derivados indicados anteriormente), la hélice A2 proporciona el anclaje entre la proteína PossZP3 y un pentámero LT-B.

#### **EJEMPLO 15. Experimento de anticoncepción en el ratón con muestras de zanahoria**

20 Se produjeron zanahorias transgénicas que comprendían uno de los constructos en el Ejemplo 14 tal como se describe en el Ejemplo 11 y se trataron tal como en los Ejemplos 12 y 13. Los ratones se alojaron como parejas macho/hembra, mientras que en el caso de los ratones, se enjaularon tres hembras por cada macho. Se registró el número de crías de cada hembra durante el experimento.

25 Se agrupó y se mezcló zanahoria en polvo que expresaba más de 50 µg de LTB por gramo de masa seca. Para cada alimentación, la zanahoria en polvo se mezcló 1:2 (peso por volumen) con sidra de manzana. Las alimentaciones se llevaron a cabo a intervalos de quince días durante 12 semanas (días 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84, 87). Los animales se dividieron en 3 grupos, 4 a 6 recibieron 4 g de zanahoria de tipo salvaje más sidra de manzana; 4 a 5 recibieron 4 g de zanahoria transgénica más sidra de manzana; 4 a 5 recibieron 4 g de tomate transgénico más sidra de manzana más 10 mg de extracto de *Quillaja* en polvo (Garuda).

30 A partir del día 31, se sometieron ratones hembra a un protocolo de ayuno en el que, al mediodía, fueron introducidos en jaulas individuales con únicamente agua y cama. La dieta de ensayo se proporcionó a las 4 de la tarde y se dejó durante la noche. A las 8 de la mañana siguiente, se reintrodujeron las hembras en su jaula habitual.

35 Los días 0 y 70, se recogieron muestras de suero de sangrados de la cola de cada hembra y se almacenaron a -80°C para el análisis futuro de los anticuerpos. Se recogieron muestras finales de suero el día 96 mediante punción cardiaca y se almacenaron tal como se ha indicado anteriormente. Se recogieron muestras fecales los días 70 y 87 y se congelaron durante la noche a -80°C. Las muestras de sedimento congeladas se liofilizaron, se resuspendieron en 0,8 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 (PBS), se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta el ensayo.

#### **EJEMPLO 16. Alimentación de ratones con materiales vegetales frescos**

También se utilizaron plantas frescas para alimentaron los ratones experimentales. Se utilizaron hojas de las plantas de tanto zanahoria como tomate, o tomate y zanahoria frescos.

40 Las hojas frescas o el tomate y la zanahoria correspondientes a su forma en polvos secos que expresaban más de 50 µg de LTB por gramo de masa seca se agruparon y se mezclaron. En algunos casos, los materiales frescos se cortaron en trozos pequeños. Las alimentaciones se llevaron a cabo a intervalos quincenales durante 12 semanas (días 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84, 87). Los animales se dividieron en 3 grupos, 4 a 6 recibieron 4 g de tomate o zanahoria de tipo salvaje; 4 a 5 recibieron 4 g de tomate o zanahoria transgénica; 4 a 5 recibieron 4 g de tomate transgénico más sidra de manzana más 10 mg de extracto de *Quillaja* en polvo (Garuda).

A partir del día 31, se sometieron ratones hembra a un protocolo de ayuno en el que, al mediodía, se introdujeron en jaulas individuales con agua y cama únicamente. Se proporcionó la dieta de ensayo a las 4 de la tarde y se dejó durante la noche. A las 8 de la mañana siguiente, las hembras fueron reintroducidas en su jaula habitual.

50 Los días 0 y 70, se recogieron muestras de suero de sangrados de la cola de cada hembra y se almacenaron a -80°C para el análisis futuro de los anticuerpos. Se recogieron muestras finales de suero el día 96 mediante punción cardiaca y se almacenaron tal como se ha indicado anteriormente. Se recogieron muestras fecales los días 70 y 87 y se congelaron durante la noche a -80°C. Las muestras de sedimento congeladas se liofilizaron, se resuspendieron en 0,8 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 (PBS), se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta el ensayo.

55 **EJEMPLO 17. Reducción de la varianza de las concentraciones de antígeno en homogeneizados de polvos**

La aplicación de vacunas derivadas de plantas depende de la capacidad de proporcionar una dosis consistente, y conseguir datos clínicos que permitan conocer las dosis mínima y máxima que deben aplicarse. La fabricación por lotes y la garantía de QC únicamente pueden validarse en el caso de que el material de vacuna proporcione una concentración consistente de antígenos dentro de un intervalo aceptable. En tres ensayos clínicos humanos recientes (Tacket *et al.*, 1998; Tacket *et al.*, 2000; Thanavala *et al.*, comunicación personal), se alimentaron voluntarios humanos con materiales de patata transgénica crudos troceados en forma de dados, que expresaban proteínas antigénicas de interés. SE demostró que las dosis experimentales en cada uno de dichos ensayos variaban hasta en 300%, tal como demuestran los resultados de ensayos de muestras aleatorizadas de materiales consumidos. En el caso de materiales de patata similares reducidos a polvos deshidratados mediante el procedimiento descrito en la presente memoria se obtuvo una reactividad inmunogénica *in vitro* equivalente (mediante detección con el ensayo apropiado) con una reducción de hasta 10 veces de la varianza en muestras aleatorizadas. Este resultado se duplicó en material de tomate transgénico tratado que expresaba el mismo antígeno (HBsAg) y algunas otras especies vegetales y antígenos, tal como se muestra en la Tabla 1.

En los ejemplos, la homogeneización se consiguió mediante dos procedimientos. El primer procedimiento se aplicó antes del secado por congelación e implicaba la trituración en pulpa cruda y la mezcla de materiales vegetales recién recolectados, seguido de la recolección y posterior secado por congelación de los materiales mezclados. El primer procedimiento de corte en rodajas, trituración en pulpa o molido, redujo los tejidos vegetales crudos (frutos, tubérculos, hojas, semillas, etc.) a una mezcla en forma de pulpa. Esta mezcla se supuso que contenía tanto células vegetales intactas como residuos celulares molidos. La ventaja de este procedimiento es la reducción de órganos vegetales de mayor tamaño, tales como frutos o tubérculos, a una mezcla controlable en la que la varianza del contenido de proteínas homólogas en diferentes tejidos se agrupa en un lote más uniforme de material. La capacidad de proporcionar un lote uniforme sin romper por completo toda la integridad de la célula vegetal proporciona un ambiente estable para el almacenamiento de proteínas homólogas durante las etapas de tratamiento posteriores. El segundo procedimiento de homogeneización requirió un tratamiento mínimo de los materiales vegetales antes del tratamiento. El secado por congelación de los materiales en rodajas, trozos o intactos se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente. Los materiales resultantes se trituraron a continuación manualmente hasta formar polvos finos, se agruparon en un recipiente de un único lote y se mezclaron uniformemente por medios mecánicos, tales como la agitación o la mezcla en seco.

La eliminación de cualquier etapa de trituración en puré redujo la intensidad del trabajo necesario para el procedimiento total. El efecto del tratamiento de presecado (en puré, pelados, en trozos o en rodajas) se evaluó para su efecto sobre el tiempo de secado total en el caso de la patata. Tal como se muestra en la figura 7, la reducción a un estado completamente seco por congelación se encontraba limitada únicamente en el caso de que los materiales de la patata no hubieran sido pelados o cortados de algún modo (cortados en trozos, dados, rodajas o triturados en puré).

**EJEMPLO 18. Las muestras de tubérculos de la patata pueden concentrarse hasta 11 veces como medida del peso seco frente al peso fresco mediante deshidratación con pérdida minimizada de proteína transgénica utilizando un protocolo no de trituración en puré**

Los ensayos de alimentación anteriores han utilizado cantidades relativamente grandes de material para administrar dosis suficientes del antígeno deseado. Por ejemplo, los tres ensayos clínicos humanos a los que se ha hecho referencia anteriormente requirieron que los voluntarios consumiesen un intervalo de 100 g a 150 g de patata cruda en cada sesión, tardando algunos voluntarios más de 30 minutos en consumir una única dosis. La administración oral de 100 g o más de material crudo es improbable que resulte bien aceptado por los administradores de vacuna, o tolerado por vacunas a una escala más amplia. Una ventaja importante del procedimiento descrito en la presente memoria es la concentración de proteínas que se alcanza. Tal como se muestra en la Tabla 2, la masa de material se redujo hasta en 94% (11% de peso final para la patata, 6% de peso final para el tomate). En comparación con los ensayos clínicos a los que se ha hecho referencia anteriormente, dicha reducción de la masa proporcionaría teóricamente una dosis equivalente mediante el consumo de únicamente 6 gramos de polvos, suponiendo que no se producen pérdidas significativas de antígeno durante el tratamiento. Además, las calidades físicas de este material en polvo resultan convenientes para la formulación para la ingestión oral mediante procedimientos más populares, tales como el consumo de varias cucharadas de una pasta o preparación potable.

Los datos indicados hasta el momento proporcionan ejemplos de varios antígenos y de varias especies y tejidos vegetales. La eliminación de más de 90% de la humedad, concentró las muestras vegetales hasta en 11 veces, como medida de peso seco frente a peso fresco. Sin embargo, a pesar de la reducción de 11 veces de la masa de material, la concentración de antígeno generalmente se incrementó en 4 a 8 veces, dependiendo de la especie vegetal evaluadas, indicando que se había producido una pérdida significativa de antígeno (o por lo menos una reducción de la detección de antígeno) como resultado del procedimiento. Los ejemplos utilizados generalmente implicado la trituración en puré de los materiales crudos, la adición de cualquier excipiente (antioxidantes, estabilizadores, adyuvantes, etc.), seguido de la congelación, seguido de secado por congelación, y reducción del material resultante para formar polvos finos. Tal como se resume en la Tabla 2, el protocolo no de trituración en puré descrito anteriormente demostró poder conseguir un material de características equivalentes, minimizando simultáneamente la pérdida de antígeno en varias especies vegetales.

El resultado práctico de dicho procedimiento fue que la formulación y dosificación oral pudo conseguirse sin un

5

volumen de dosis significativamente menor, con un incremento paralelo de la concentración del antígeno. Además, este procedimiento proporcionó un mecanismo conveniente para estabilizar las vacunas o compuestos terapéuticos procedentes de un abanico más amplio de tejidos vegetales, tales como materiales de hojas o tallos, que de otra manera no podrían homogeneizarse mediante mezcla en húmedo sin una rotura significativa de la estructura celular y de las proteínas transgénicas de interés.

**EJEMPLO 19. Estabilidad ambiental de las formulaciones de homogeneizado y efecto de los excipientes sobre la recuperación y estabilidad de los antígenos**

10

Los estudios anteriores referentes a la extracción de productos farmacéuticos derivados de plantas han evaluado la estabilidad de las proteínas diana en extractos vegetales crudos. La extracción de un anticuerpo modelo producido en alfalfa mostró una estabilidad durante hasta 2 horas en extractos en agua y de hasta 12 semanas en alfalfa seca (Khouidi *et al.*, 1999). Con el fin de que los compuestos terapéuticos derivados de plantas obtengan el máximo valor, particularmente como estrategias de vacunación oral, la estabilidad del antígeno en alguna forma de alimento no perecedero debería extenderse hasta por lo menos 6 meses, y preferentemente a 2 a 3 años.

15

20

Se evaluaron varias formulaciones que expresaban antígenos modelo de interés para la estabilidad a temperatura ambiente de la proteína deseada en periodos regulares hasta los 12 meses. Tal como se muestra en la figura 9, la mayoría de los materiales no sufrieron ninguna degradación significativa del antígeno durante el almacenamiento a temperatura ambiente, o a temperaturas inferiores. Esto indica que la deshidratación eficiente no con calor es un medio efectivo para proporcionar un estado protector de los antígenos que se secan conjuntamente con material vegetal o que permanecen encapsulados dentro de célula vegetales y residuos celulares parcialmente fragmentados. Debe realizarse un examen adicional para determinar si la presencia de enzimas vegetales o proteínas estructurales resulta suficiente para proporcionar dicha protección en formulaciones en las que se añaden los antígenos a un homogeneizado no transgénico.

25

30

35

Se añadieron varios excipientes a dichas formulaciones modelo tanto para una evaluación inmunogénico como para investigar su efecto sobre el tratamiento del material vegetal, la recuperación de antígenos y la estabilidad de los mismos. Los informes anteriores (Leopold, 1998) han concluido que azúcares vitrificados simples podían estabilizar los enzimas vegetales mediante la protección frente a la desnaturalización natural de las proteínas. Se añadió sacarosa de grado alimentario a un homogeneizado de tomate transgénico en el momento de la trituración en puré para evaluar su efecto sobre la estabilidad de un antígeno encapsulado en material vegetal. Además de azúcares, se añadieron adyuvantes experimentales a materiales de patata o de tomate en fase líquida (post-puré) para la evaluación clínica, y se añadió ácido ascórbico (Aldrich) a algunas muestras para evaluar el potencial de los antioxidantes de minimizar la pérdida de antígenos en el tomate triturado en puré. Los efectos de estos excipientes sobre la recuperación y estabilidad de los antígenos fueron inconsistentes, aunque no severos en ningún caso individual. La adición de sacarosa incrementó significativamente el tiempo de secado necesario para conseguir un producto adecuadamente deshidratado. La adición de ácido ascórbico resultó necesaria a concentraciones no inferiores a 1:150 (en masa) para bloquear efectivamente la oxidación visible (pardeamiento) de la patata en puré, sin embargo, esta concentración no presentó ningún efecto consistente sobre los niveles de antígeno recuperables dentro de las muestras sometidas a ensayo.

40

45

En general, todos los materiales secados por congelación mostraron estabilidad del antígeno a temperaturas ambiente durante por lo menos 6 meses y, en algunos casos, hasta durante 12 meses. Aunque el secado por congelación fue el procedimiento principal de deshidratación en estos ejemplos, los materiales triturados crudamente en pulpa podrían estabilizarse alternativamente mediante secado al aire o secado mediante pulverización previamente al almacenamiento. Idealmente, mediante cualquier procedimiento de secado, el material final se deshidrata suficientemente para eliminar por lo menos 90% de la totalidad del contenido de agua en peso, y se almacena en bolsas o recipientes herméticos al aire. Tras el sellado, los polvos homólogos pueden almacenarse a temperatura ambiente durante periodos significativos sin ninguna reducción significativa de los niveles medibles de la proteína diana.

**EJEMPLO 20. Los animales alimentados con tomate transgénico inmunoanticonceptivo seco mostraron una reducción del tamaño de camada en comparación con los animales de control**

50

En el presente estudio, una proteína de fusión de LTB-epítipo de ZP3 de ratón derivada de una planta y administrada por vía oral conjuntamente con un adyuvante saponina mostró especificidad de especie y reducción de la fertilidad del ratón de 45,3%.

55

60

El fruto del tomate transgénico utilizado en el presente estudio expresaba LTB fusionado con un epítipo procedente del gen ZP3 del ratón descrito por Millar *et al.* se utilizaron tres dietas de ensayo: tomate de tipo salvaje (control), tomate transgénico (transgénico) y tomate transgénico con extracto de *Quillaja* (transgénico + adyuvante). Se mezclaron frutos del tomate en polvo secado mediante congelación 1:2 (en peso) con sidra de manzana pasteurizada (Cornell Orchards). Se consideró que la concentración de LTB en el fruto del tomate era una aproximación de la concentración de la proteína de fusión. El fruto de tomate que expresaba más de 8 g de LTB por gramo de masa seca se utilizó en la dieta de ensayo para los dos grupos transgénicos. Tras agrupar los frutos transgénicos, la LTB o proteína de fusión media calculada era de 37,8 g.g-l. Los presentes inventores también añadieron 10 mg de extracto de *Quillaja* en polvo (Garuda) por cada 4 g de pienso para el grupo trans+Quill. En cada alimentación, se ofrecieron 4 g del

pienso de ensayo en una placa de Petri a la hembra. En los tratamientos que consistían de frutos transgénicos, lo anterior constituía un total de 100,8 gramos de proteína de fusión de LTB en cada alimentación.

Tanto ratones como ratas de agua recibieron la dieta de ensayo a intervalos quincenales durante 12 semanas, los días 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84 y 87.

5 Para los ratones, los primeros cinco días de alimentación con dieta de ensayo (días 0 a 28), las hembras fueron extraídas de sus jaulas, se introdujeron en jaulas individuales que contenían la dieta de ensayo y se dejaron durante cuatro a seis horas antes de devolverlas a sus jaulas de origen. A partir del día 31, los ratones hembra se sometieron a un protocolo de ayuno en el que, al mediodía, se extrajeron a jaulas individuales con agua y cama únicamente. Se proporcionó la alimentación de ensayo a las 4 de la tarde y se dejó durante la noche. A las 8 de la mañana siguiente, se devolvieron las hembras a su jaula original. En ambos regímenes de alimentación, se registró el peso final consumido de dieta de ensayo.

15 Para las ratas de agua, inmediatamente antes de ofrecer la alimentación de ensayo a la hembra, se extrajo el macho y cualquier cría de la jaula original y se transfirieron a una jaula temporal para evitar que consumiesen la dieta de ensayo. Se devolvieron tras un máximo de una hora, para reducir el estrés causado por la separación. En el caso de que la hembra no hubiese consumido toda la mezcla de tomate en este tiempo, se extrajo la parte restante y se ofreció nuevamente cuatro horas después, siguiendo el mismo procedimiento de alimentación. Se registró el peso final consumido.

Se registró el número de camadas y de crías producidos por cada hembra durante el experimento tanto para los ratones como para las ratas de agua.

20 En el caso de los ratones, no se descubrió ninguna diferencia significativa entre los tratamientos de dieta con respecto al número de camadas producido ( $\alpha=0,05$ ). Sin embargo, se produjo una reducción de 45,3% del tamaño de camada, de las hembras alimentadas con la dieta de control (promedio de 5,3 crías por camada) al tamaño de camada de las hembras alimentadas con la dieta de transgénico + adyuvante (media de 2,9 crías por camada). Esto demostró una reducción significativa utilizando un intervalo de confianza de 90% ( $\alpha=0,1$ ).

25 Con las ratas de agua, no se encontró ninguna diferencia significativa entre los tratamientos de dieta con respecto al número de camadas producido ( $\alpha=0,05$ ). Tampoco se observó ninguna diferencia significativa entre los tratamientos de dieta con respecto al tamaño de camada utilizando un intervalo de confianza de 95% ( $\alpha=0,05$  y  $\alpha=0,1$ ).

#### **EJEMPLO 21. Efecto del tratamiento sobre el contenido de antígeno**

30 Para determinar el efecto del secado por congelación sobre la masa y contenido de antígenos, se pesaron dos frutos con cinco plantas T2 y se sometieron a ensayo para el contenido de LTB antes y después del tratamiento. La comparación entre la masa de muestra antes y después del secado por congelación reveló cuál era el procedimiento para reducir la muestra hasta 6% de su masa original (datos no representados). El análisis ELISA del contenido de LTB de materiales frescos y tratados mostró una concentración similar de 16 veces del antígeno, sugiriendo que no se había producido ninguna pérdida apreciable de antígeno por el procedimiento de tratamiento utilizado (figura 10).

#### **EJEMPLO 22. La inmunización oral de ratones con vacuna derivada de plantas inmuniza pasivamente la descendencia**

##### Animales

40 Se mantuvieron ratones en jaulas aprovisionadas con agua y alimentos de laboratorio estándares excepto en el caso de que se alimentasen con la dieta de ensayo. Cada tratamiento contenía 5 a 6 hembras adultas. Se aparejaron los ratones en una proporción de tres hembras por un macho, o de dos hembras por un macho en cada jaula. Se extrajeron las crías al destetarlas y se mantuvieron en jaulas unisexuales.

##### Dieta de ensayo

45 Se cultivaron líneas de tomate transgénico que expresaban LTB dentro de instalaciones de invernadero autorizadas. Los frutos de tomate recolectados se trataron en forma de polvos y se agruparon para formar un lote uniforme de vacuna. Este lote se almacenó a 4°C previamente a la utilización. La formulación de vacuna se obtuvo mediante la mezcla de tomate transgénico en polvo con sidra de manzana en una proporción de 1:2 (en peso). Se preparó una formulación con adyuvante enriqueciendo la formulación básica de vacuna con 10 mg de extracto de *Quillaja* por cada 4 gramos de polvos transgénicos.

##### Régimen de vacunación

50 Se llevaron a cabo alimentaciones a intervalos quincenales durante 12 semanas (días 0, 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56, 59, 70, 73, 84, 87). A partir del día 31, las hembras se sometieron a un protocolo de ayuno en el que se introdujeron en jaulas individuales con agua y cama únicamente durante cuatro horas antes de añadir la dieta de ensayo. Se dejó la dieta de tomate durante la noche y se retiró a las 8 de la mañana siguiente, momento en el que las hembras se devolvieron a su jaula habitual. Tal como se ha indicado anteriormente, los animales recibieron una



formulación no transgénica (n=4), una formulación transgénica (n=5) o una formulación con adyuvante (n=5).

#### Muestreo de suero

5 Los días 0 y 70, se recogieron muestras de suero de cada hembra adulta mediante sangrado de la cola y se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Las muestras de suero finales se recogieron el día 96 mediante punción cardiaca y se almacenaron tal como se ha indicado anteriormente. Tras el día 42 del ensayo, las crías nacidas en cada grupo experimental (n=mínimo de 13 por grupo, procedentes de 2 ó más madres en cada grupo) se mantuvieron en estado saludable para la determinación posterior de los títulos pasivos anti-LTB. A una edad de por lo menos 21 días se recogió suero de dichas crías mediante punción cardiaca.

#### ELISA para anticuerpos anti-LTB

10 Se sometieron a ensayo muestras para IgG anti-LTB en suero tal como ha sido descrito [8]. Brevemente, se diluyeron en serie muestras en PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (PBST). Se recubrieron placas de microtitulación con gangliósidos mixtos (de tipo III), Sigma, St. Louis, MO, USA, se bloquearon con BSA al 0,25% y se incubaron con LTB recombinante purificado durante una hora. El suero diluido se añadió a los pocillos y se incubó durante una hora antes del lavado y detección utilizando antisuero de conejo contra IgG de ratón y antisuero anticonejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Los presentes inventores investigaron la relación entre los títulos de las madres y de las crías mediante la comparación de las diluciones de punto final de las madres y de las camadas correspondientes. Se consideró que la dilución de las madres era la dilución de punto final de la muestra de suero obtenida más próxima a la fecha de nacimiento de las crías (a los 70 o a los 96 días). Para este análisis únicamente se utilizaron las crías sangradas a los 21 días de edad. El conjunto de datos estaba constituido por 7 madres, 9 camadas y 41 crías.

#### Tratamiento y camadas

25 De las crías muestreadas para la determinación del título de LTB, 18 crías de 4 camadas procedían de 3 madres diferentes del grupo de control, 17 crías de 5 camadas procedían de 4 madres diferentes del grupo de tomate transgénico, y 13 crías de 3 camadas procedían de 2 madres diferentes del grupo de tomate transgénico más adyuvante.

#### ELISA de anticuerpo anti-LTB

30 Los ratones parentales en los grupos de dieta de tomate transgénico o de tomate transgénico más adyuvante recibieron 14 inoculaciones orales de tomate, de promedio 75,6 µg de LTB en cada inoculación. Aunque el número de inoculaciones recibidas por la madre antes del nacimiento de las crías muestreadas era variable, por lo menos habían recibido 8 alimentaciones de la dieta. Todas las madres que habían recibido la dieta de tomate transgénico generaron títulos de IgG sérico anti-LTB significativamente superiores a los del grupo de control el día 70 del ensayo (figura 11,  $\alpha=0,05$ ). No se observó una diferencia significativa de los títulos en las dos dietas de ensayo de material transgénico (tomate transgénico en polvo con y sin la adición de extracto de *Quillaja* en polvo). De los 18 crías nacidas de madres del grupo de control, ninguno presentaba una dilución de punto final superior a 25 (figura 12). La dilución de punto final media de los 17 crías nacidas de madres en el grupo de tomate transgénico era de 558,8, mientras que el punto final medio para los 13 crías nacidas de madres en el grupo de tomate transgénico más adyuvante era de 448,1. Aunque no se encontró ninguna diferencia significativa entre las diluciones de punto final medias de las crías de madres con tomate transgénico y de madres con tomate transgénico más adyuvante ( $\alpha=0,05$ ), los puntos de dilución final medios de las crías de ambas dietas transgénicas fueron significativamente superiores a los de los grupos de control ( $\alpha=0,05$ ). Se encontró una relación lineal positiva entre las madres y sus camadas correspondientes, con un valor de  $r^2$  de 0,9289 (figura 13).

#### **EJEMPLO 23. Estudios de estabilidad.**

45 Se trataron varios materiales vegetales transgénicos diferentes por los medios indicados en la presente memoria. Entre los materiales se incluían el cultivo celular transgénico NT-1 que expresaba AIV-HA (HAO NT) o una enterotoxina modificada de *E. coli* (SLT102), patata transgénica que expresaba AIV-HA, NVCP, HBsAg o subunidad B de la enterotoxina de *E. coli* (LT-B) y tomate transgénico que expresaba NVCP o HBsAg. Los materiales tratados se almacenaron bajo una diversidad de temperaturas durante periodos de más 6 meses. A intervalos regulares durante este periodo se evaluaron muestras aleatorizadas para el contenido de antígenos (mediante un ensayo apropiado para el antígeno de interés). Las figuras 14 a 17 describen los niveles de antígeno detectables retenidos en dichos materiales durante el periodo de muestreo.

#### **REFERENCIAS**

- 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).
- 55 Arikawa, J., K. Yoshimatsu, y K. H.: "Epidemiology and epizootiology of hantavirus infection in Japan."; Jpn. J. Infect.

- Dis., 54, n° 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).
- 5 Bandivdekar, A.H., V.J. Vemekar, S.B. Moodbidri *et al.*: "Characterization of 80 kDa human sperm antigen responsible for immunoinfertility". *Am. J Reprod. Immunol*"; 45, n° 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).
- 10 Berger, J., y S.L. Cain: "Reproductive synchrony in brucellosis-exposed bison in the southern Greater Yellowstone Ecosystem and in noninfected populations."; *Conservation Biology*, 13, n° 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).
- 15 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).
- 20 Chavali, S.R. y 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, n° 1: 71-85 (2001).
- 25 Cox, J.C., y A.R. Coulter: "Adjuvants--a classification and review of their modes of action." *Vaccine*"; 15, n° 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).
- 30 Dickinson, B.L. y J.D. Clements: "Dissociation of Escherichia coli heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity"; *Infect Immun*, 63(5): p. 1617-23 (1995).
- 35 Dunbar, B.S., y 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, n° 8: 1409-1411 (1992).
- 40 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).
- 5 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, n° 1: 63-69 (1999).
- 10 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., y 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.
- 15 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).
- 20 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)
- 25 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, n° 27: 3141-3151 (2000).
- 30 Martinez, M.L., y J.D. Harris: "Effectiveness of zona pellucida protein ZPB as an immunocontraceptive antigen"; *J. Reprod. Fertil.*, 120, n° 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).
- 35 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).
- 40 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, y G.J. Killian: "Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine"; Am. J. Reprod. Immunol. 44, nº 5: 266-274 (2000).

5

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, 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).

15

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., y 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).

25

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., y 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).

35

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 surfaceexposed 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).
- 5 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, n° 15: 1403-1410 (1995).
- 15 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, n° 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, n° 2: 145-151 (2001).
- 25 Tung, K.S.K., J. Ang, y 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, y B.S. Dunbar: "Immunization of monkeys with recombinant complimentary deoxyribonucleic acid expressed zona pellucida proteins"; Fertil. Steril. 64, n° 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).
- 35 Walmsley AM, Arntzen CJ: "Plants for delivery of edible vaccines. Current Opinion in Biotechnology 11"; 126-129 (2000).
- 40 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, n° 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).

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

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un homogeneizado seco estable de una planta transgénica que expresa una proteína anticonceptiva heteróloga, que comprende:
- 5 a) obtener material vegetal transgénico intacto o dividido que expresa una proteína anticonceptiva heteróloga fusionada con una proteína de direccionamiento mucoso,
- b) deshidratar dicho material vegetal transgénico;
- c) mezclar dicho material vegetal transgénico en un homogeneizado antes o después de dicha etapa de deshidratación; y
- 10 d) añadir un adyuvante a dicho homogeneizado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la deshidratación se lleva a cabo mediante secado por congelación, secado al aire o secado mediante pulverización de dicho material.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa que consiste en dividir el material deshidratado antes de dicha etapa de mezcla.
- 15 4. Homogeneizado seco estable de una planta transgénica que expresa una proteína anticonceptiva heteróloga fusionada con una proteína de direccionamiento mucoso y que comprende un adyuvante que se puede obtener mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Homogeneizado seco estable que comprende: (i) un material vegetal transgénico deshidratado que contiene una proteína anticonceptiva transgénica fusionada con una proteína de direccionamiento mucoso, e (ii) un adyuvante.
- 20 6. Composición farmacéutica que comprende el homogeneizado seco estable según la reivindicación 4 ó 5 mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable.
7. Procedimiento de anticoncepción, que comprende:
- 25 administrar a un animal no humano: (i) un homogeneizado seco estable de un material vegetal transgénico que comprende una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido anticonceptivo fusionado con una proteína de direccionamiento mucoso, e (ii) un adyuvante, y en el que dicha administración reduce el número medio de descendientes producidos por ciclo reproductivo por dicho animal en por lo menos 50%.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha administración induce una respuesta inmunológica de la mucosa en dicho animal no humano a dicha proteína anticonceptiva.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que dicho ácido nucleico se integra en un cromosoma vegetal.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 9, en el que dicho material vegetal transgénico se selecciona de entre el grupo constituido por hojas, raíces, brotes, tallos, frutos, tubérculos, flores y semillas.
- 35 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 9 ó 10, en el que el material vegetal transgénico es comestible.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho material vegetal transgénico se selecciona de entre el grupo constituido por hojas, raíces, brotes, tallos, frutos, tubérculos, flores y semillas.
- 40 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 9 a 12, en el que dicho polipéptido anticonceptivo codificado por dicho ácido nucleico se selecciona de entre el grupo constituido por glucoproteína de zona pelúcida, GnRH, LHRH, LH, LDH y antígenos antiespermáticos.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicha glucoproteína de zona pelúcida se selecciona de entre el grupo constituido por ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4.
- 45 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicha glucoproteína de zona pelúcida es la ZP3.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 9 a 15, en el que dicha proteína anticonceptiva es específica de una especie.

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, en el que dicha proteína de direccionamiento mucoso es la subunidad B de la enterotoxina de *E. coli*.
18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicho material vegetal transgénico se administra como una planta completa.
- 5 19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicho material vegetal transgénico se administra por vía mucosa.
20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicha administración mucosa es por vía oral, nasal u ocular.
- 10 21. Procedimiento para inducir una respuesta inmunológica de la mucosa, que comprende: administrar a un animal no humano: (i) un homogeneizado seco estable de un material vegetal transgénico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido anticonceptivo fusionado con una proteína de direccionamiento mucoso, e (ii) un adyuvante, en el que dicha administración induce una respuesta inmunológica de la mucosa en dicho animal no humano a dicha proteína anticonceptiva, y en el que dicha administración reduce el número medio de descendientes producidos por ciclo reproductivo por parte de dicho animal no humano en por lo menos 50%.
- 15 22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicho material vegetal transgénico se selecciona de entre el grupo constituido por: hojas, raíces, brotes, tallos, frutos, tubérculos, flores y semillas.
23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicho material vegetal transgénico presenta la forma de una planta comestible.
- 20 24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que dicho polipéptido anticonceptivo codificado por dicho ácido nucleico se selecciona de entre el grupo constituido por una glucoproteína de zona pelúcida, GnRH, LHRH, LH, LDH y antígeno antiespermático.
- 25 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que dicha glucoproteína de zona pelúcida se selecciona de entre el grupo constituido por ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4.
26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que dicha glucoproteína de zona pelúcida es la ZP3.
27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en el que dicha proteína anticonceptiva es específica de una especie.
- 30 28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en el que dicha proteína de direccionamiento mucoso es la subunidad B de la enterotoxina de *E. coli*.
- 35 29. Composición que comprende un adyuvante saponina mezclado con un homogeneizado seco estable tratado de un material vegetal transgénico que expresa una proteína anticonceptiva heteróloga fusionada con una proteína de direccionamiento mucoso para la administración oral a un animal no humano, en la que dicha administración reduce el número de descendientes producidos por dicho animal no humano por ciclo reproductivo por dicho animal no humano en por lo menos 50%.



1 / 26

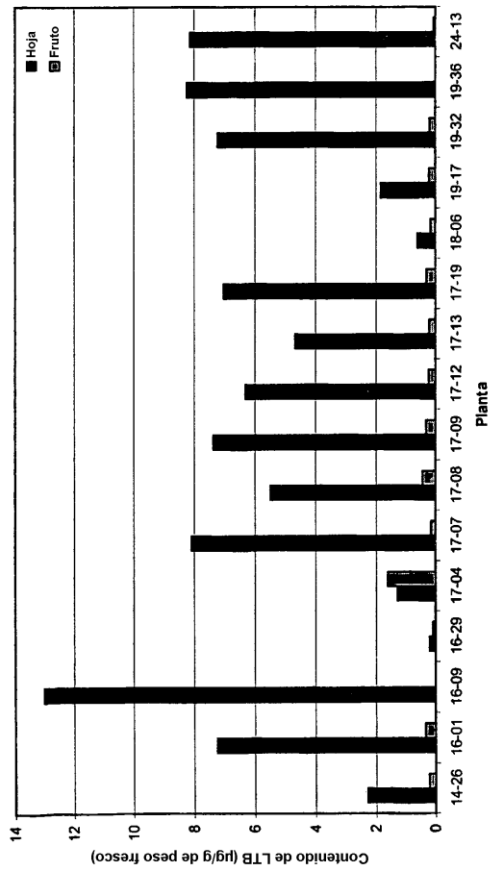


Figura 1a

2 / 26

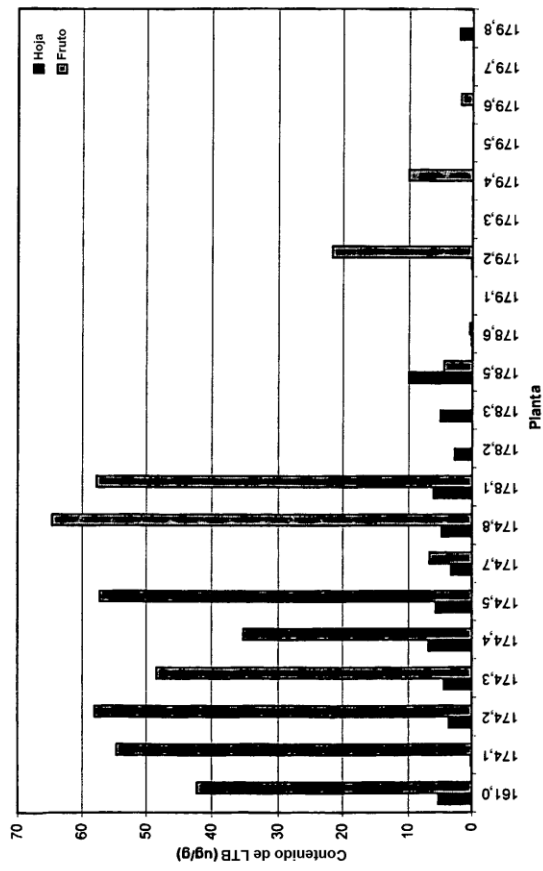


Figura 1b

3 / 26

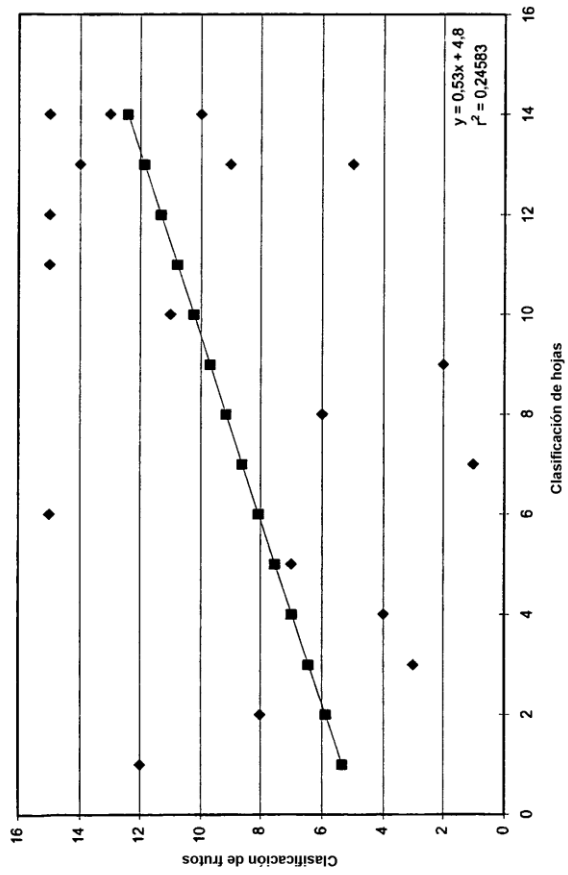


Figura 1 c

4 / 26

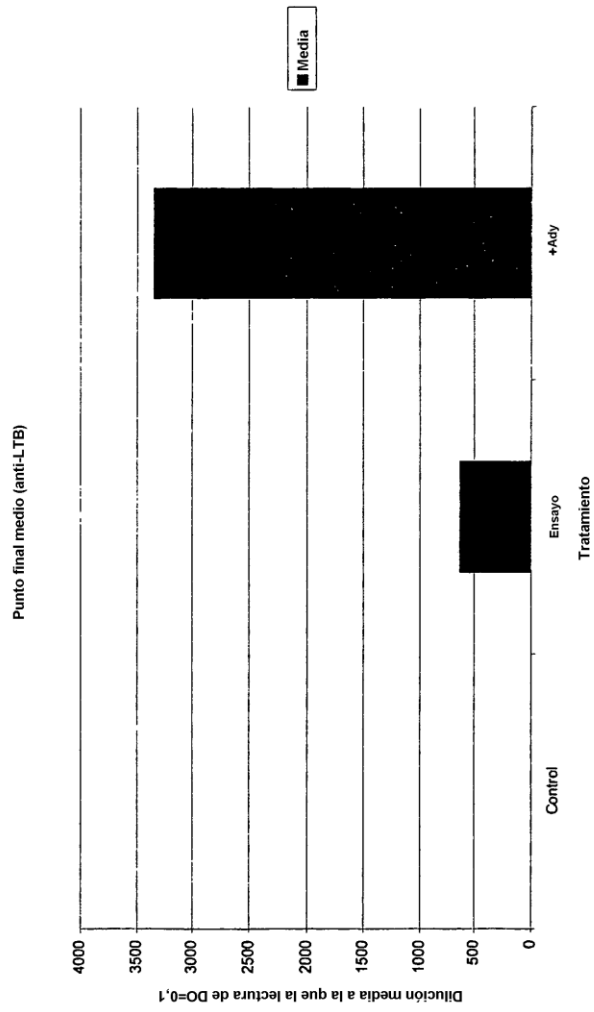


Figura 2a

5 / 26

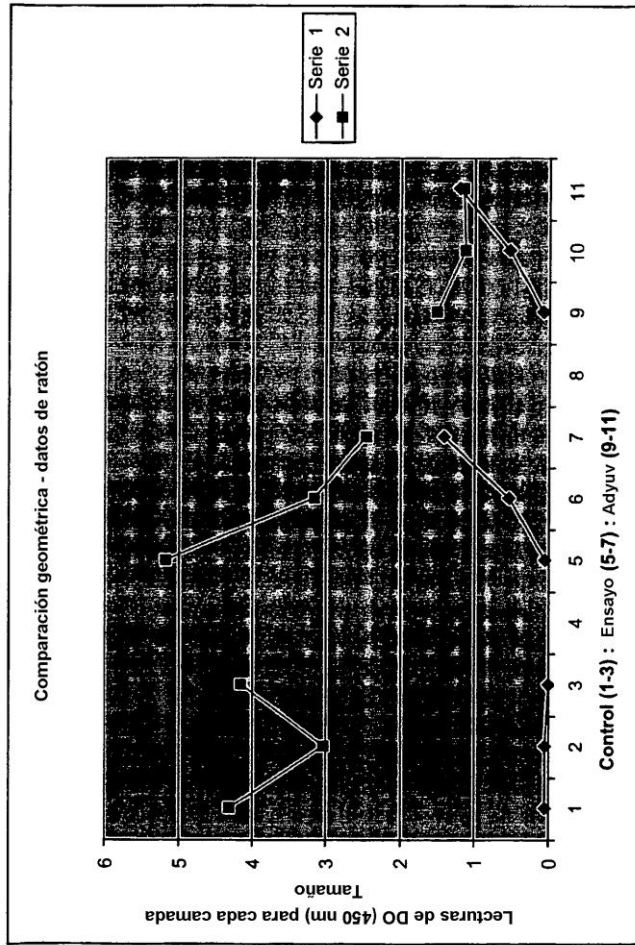


Figura 2 b

6 / 26

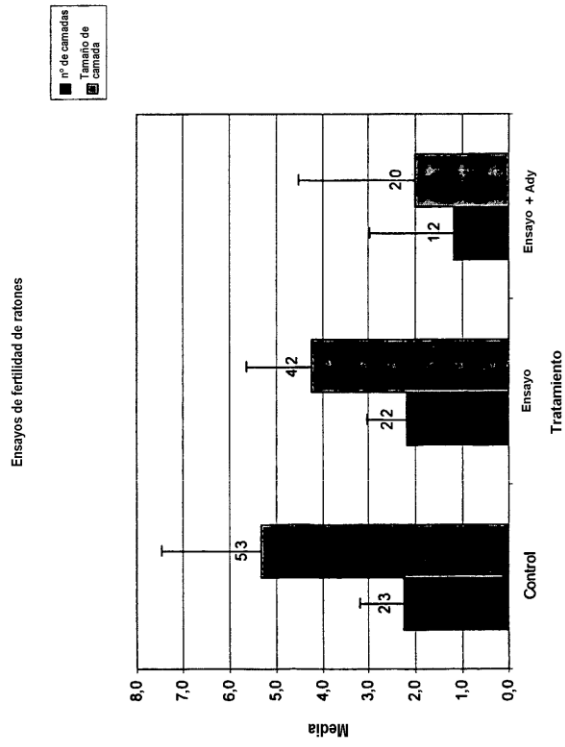


Figura 3.

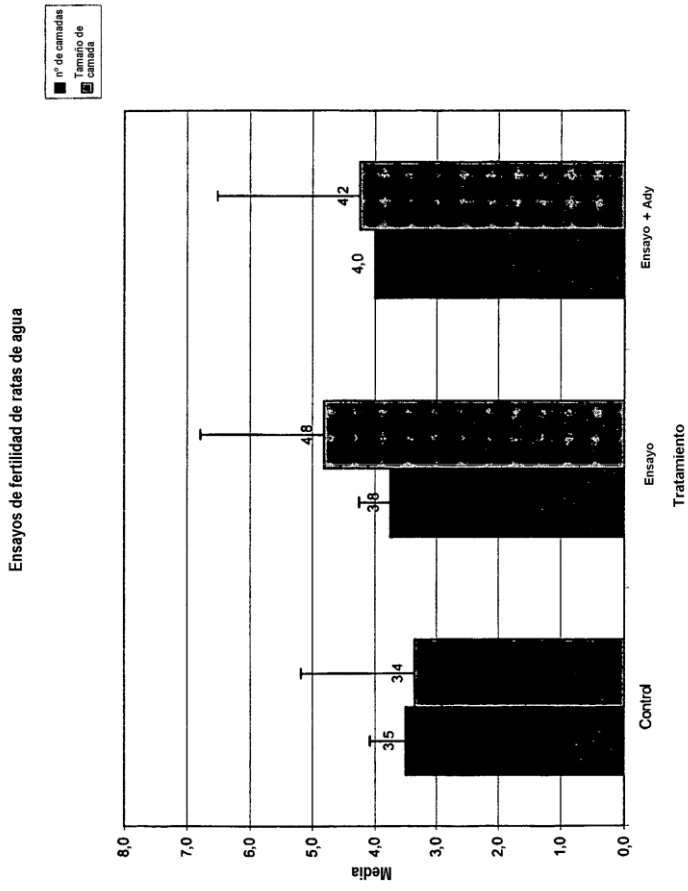


Figura 4

Figura 5 a Constructos anticonceptivos de fusión de LTB

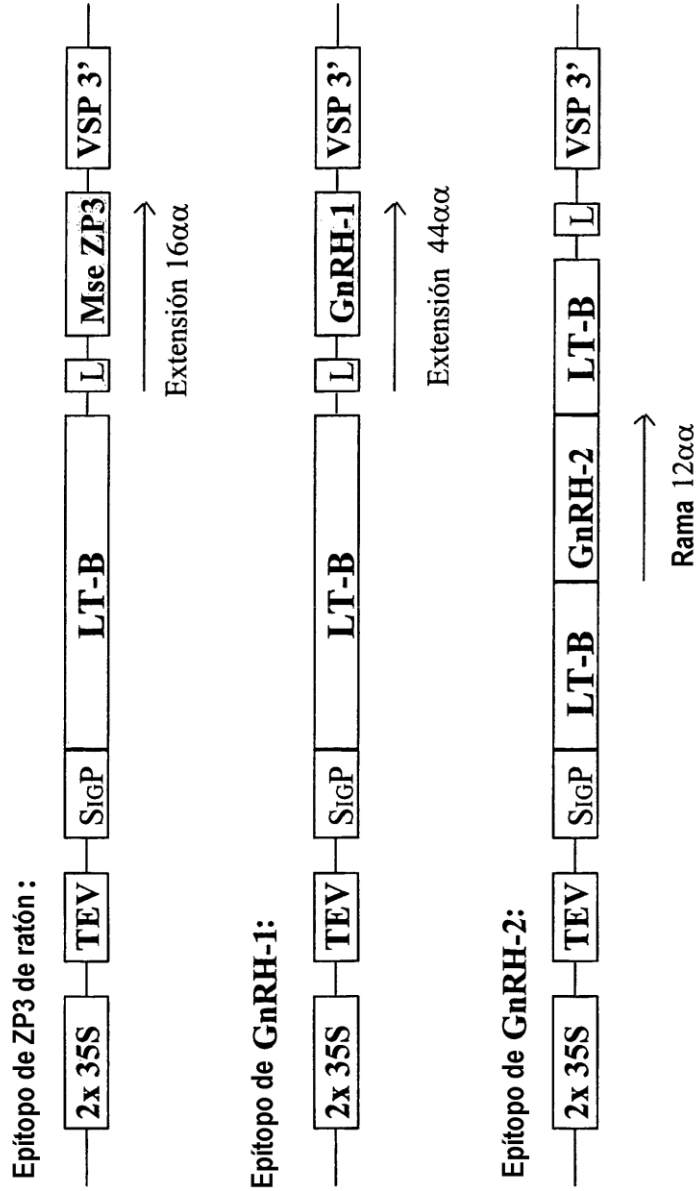
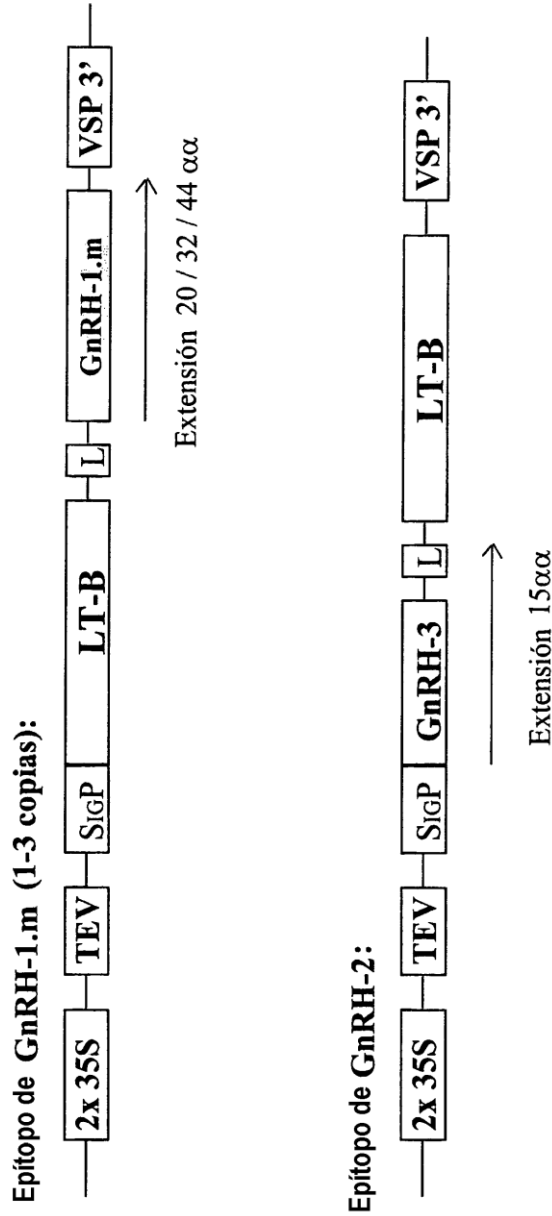




Figura 5 b Constructos anticonceptivos de fusión de LTB:3fs



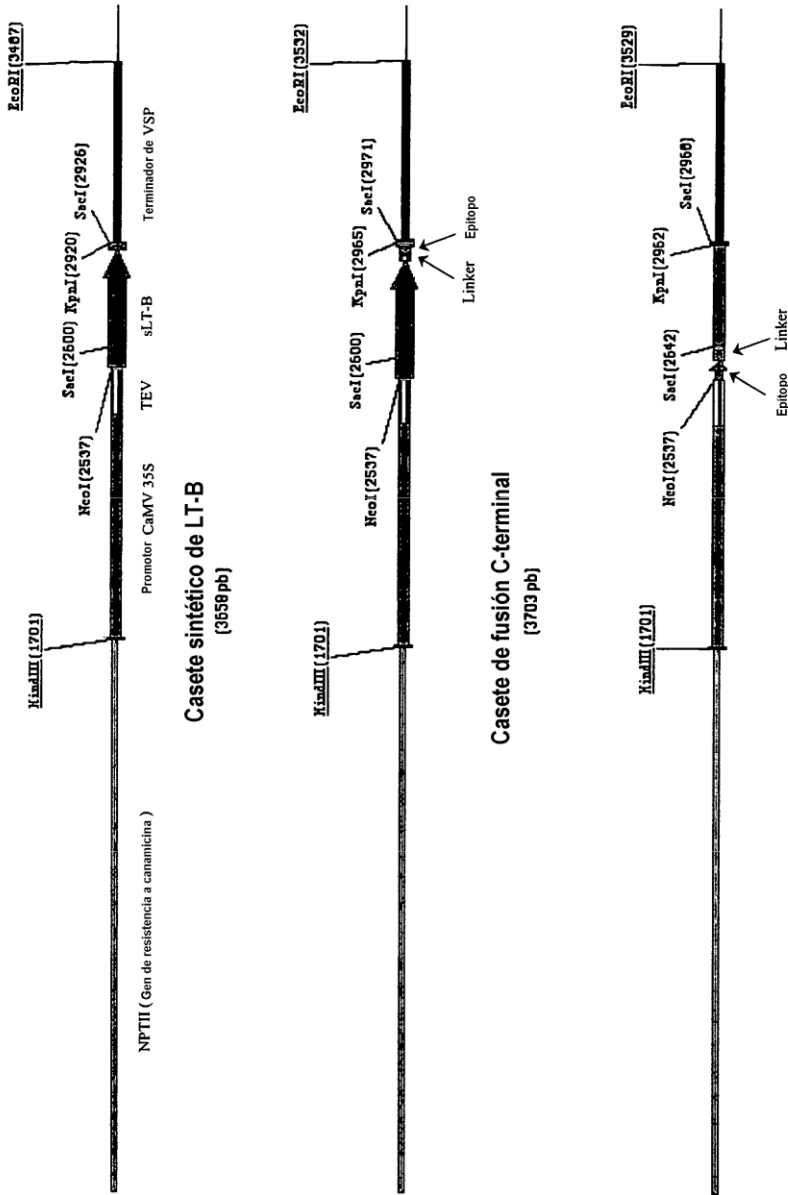


Figura 5 c Casete de fusión N-terminal (3700 pb)

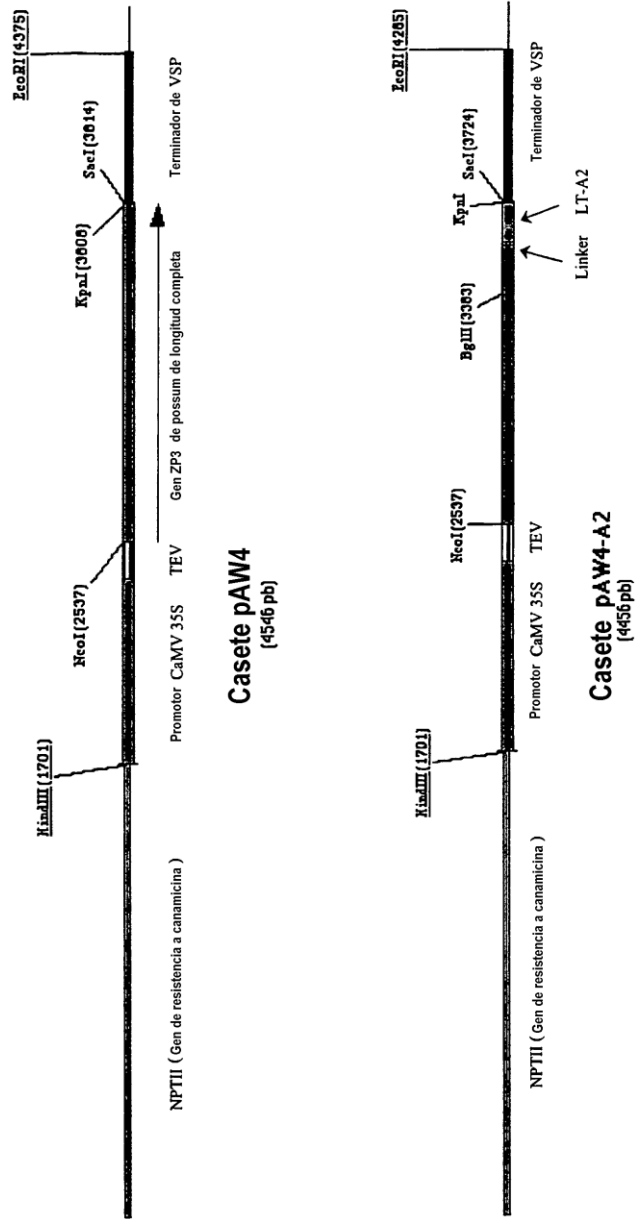


Figura 5 c Casete de fusión N-terminal (3700 pb) continuación

**12 / 26**

Construcoto de fusión	Conc. de proteínas solubles totales	Nivel medio de LT-B detectado	Nivel máximo de LT-B detectado	Nivel máximo de epitopo detectado
<b>LTB-Ratón ZP3</b>	16,5ug/g FW	0,74ug/g FW	2,90ug/g FW	50ng/g FW
<b>LTB-GnRH1</b>	17,3ug/g FW	0,61ug/g FW	1,21ug/g FW	270ng/g FW
<b>LTB- GnRH2</b>	14,5ug/g FW	0,22ug/g FW	0,29ug/g FW	0ng/g FW

**Figura 6**

## 13 / 26

Tipo de planta procesada	Antígeno de interés	Grupo de tratamiento post-procesamiento	Contenido de antígeno de muestra 1	Contenido de antígeno de muestra 2	Contenido de antígeno de muestra 3	Contenido de medio de antígeno	Varianza máxima
Fruto del tomate	HBsAg agrupado	Congelación Temperatura ambiente	89,9 76,1	92,4 90,8	n/a 81	91,1 82,6	3% 19%
Fruto del tomate	HBsAg agrupado	Congelación Temperatura ambiente TA (+antioxidante) Congelación (+antioxidante)	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%
Fruto del tomate	NVCP agrupado	Congelación Temperatura ambiente TA (+adyuvante) Congelación (+adyuvante)	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%
Tubérculo de la patata	NVCP agrupado	Ninguno +antioxidante +antioxidante +adyuvante	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%
Tubérculo de la patata	NVCP agrupado	Temperatura ambiente TA (+antioxidante) Congelación (+antioxidante) TA (+adyuvante) Congelación (+adyuvante)	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%
Tubérculo de la patata	NDV-HN-línea 4	Ninguno NO PROCESADO	5,44 0,47	6,63 2,4	7,06 0,95	6,4 1,3	30% 153%
Tubérculo de la patata	NDV-HN-línea 6	Ninguno NO PROCESADO	27,87 1,16	39,43 2,26	22,62 5,07	30,0 2,8	74% 337%
Tubérculo de la patata	AIV-HA- línea 109	Ninguno NO PROCESADO	5,6 1,18	6,1 1,81	7 1,91	6,2 1,6	25% 62%
Tubérculo de la patata	AIV-HA- línea 73	Ninguno NO PROCESADO	5,6 3,64	6 2,26	6,7 2,01	6,1 2,6	20% 81%

TABLA 1

14 / 26

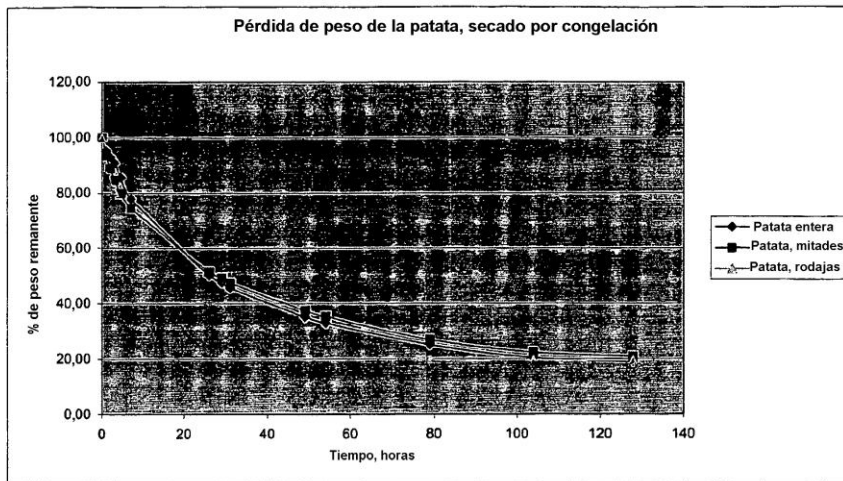


FIGURA 7

## 15 / 26

Planta origen (-Antígeno)	Método de pre- procesamiento	Reducción de masa	Recuperación de antígeno	Efecto total sobre la concentración
Patata - NVCP	Trituración en puré, secado por congelación	88%	43%	3,6 veces
Patata - AIV:HA	Trituración en puré, secado por congelación	89%	52%	4,7 veces
Patata - NDV:HN	Trituración en puré, secado por congelación	83%	52%	3,1 veces
Patata - HBsAg	Trituración en puré, secado por congelación	90%	57%	5,7 veces
Patata - LTB	Trituración en puré, secado por congelación	89%	44%	4,0 veces
Tomate - NVCP	Trituración en puré, secado por congelación	94%	43%	7,2 veces
Tomate - HBsAg	Trituración en puré, secado por congelación	95%	59%	11,8 veces
Tomate - LTB	Trituración en puré, secado por congelación	94%	48%	8,0 veces
Patata - AIV:HA	Cubo, secado por congelación	84%	95%	15,2 veces
Patata - NDV:HN	Cubo, secado por congelación	84%	95%	15,2 veces
Patata - LTB	Ninguno, secado por congelación	88%	~ 100%	8,3 veces
Patata - ZP3	Ninguno, secado por congelación	92%	~ 100%	12,5 veces
Patata - LTB	Ninguno, secado por congelación	90%	~ 100%	10,0 veces
Patata - ZP3	Ninguno, secado por congelación	90%	~ 100%	10,0 veces

TABLA 2

16 / 26

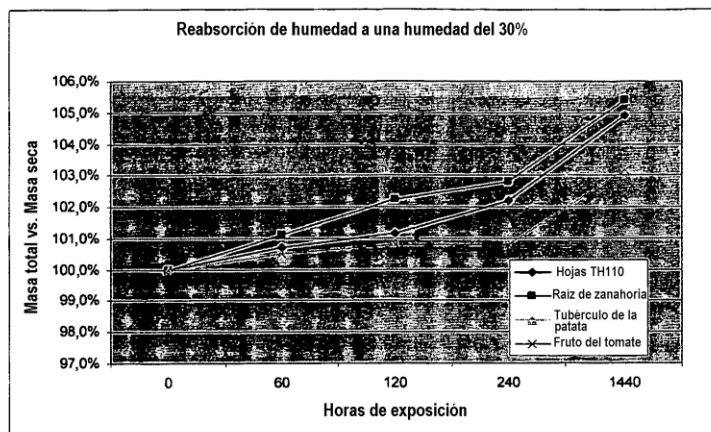


FIGURA 8



17 / 26

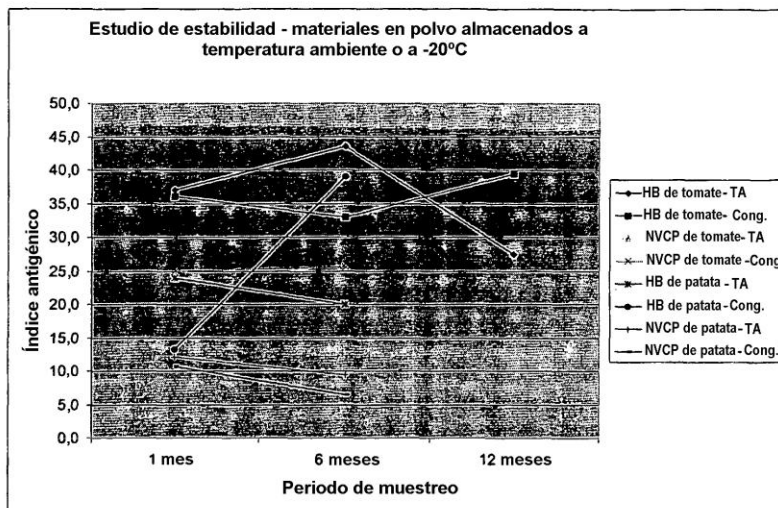


FIGURA 9

18 / 26

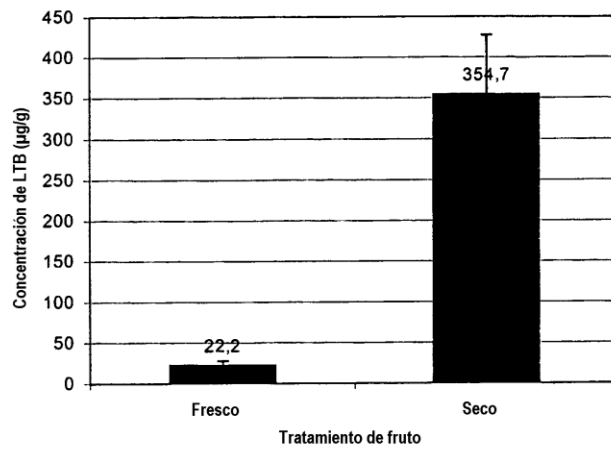


FIGURA 10

19 / 26

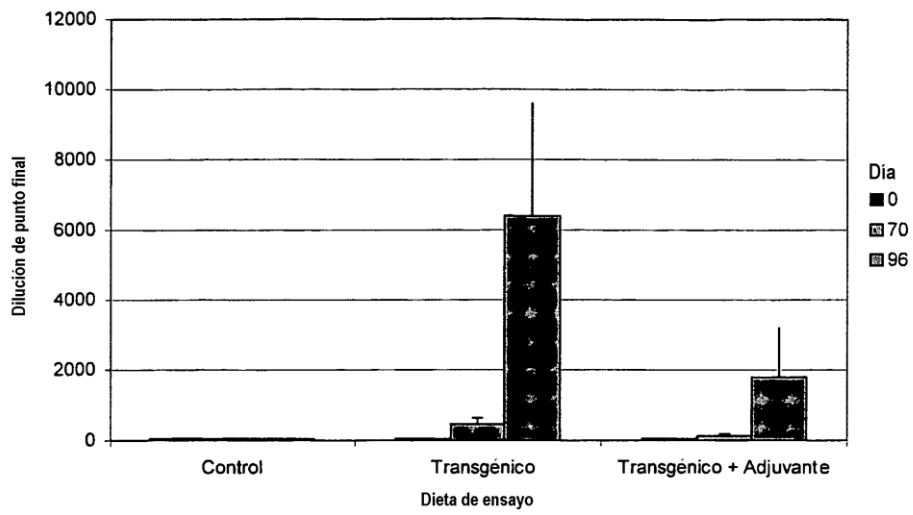


FIGURA 11

20 / 26

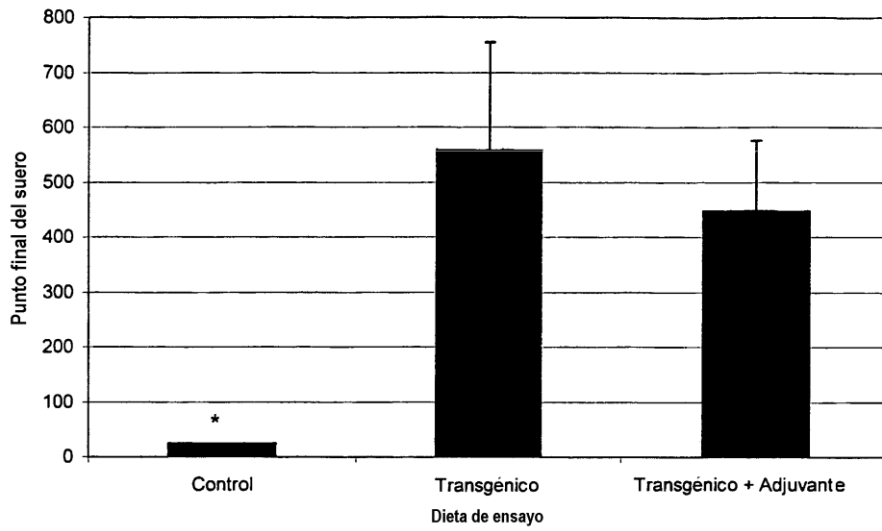


FIGURA 12

21 / 26

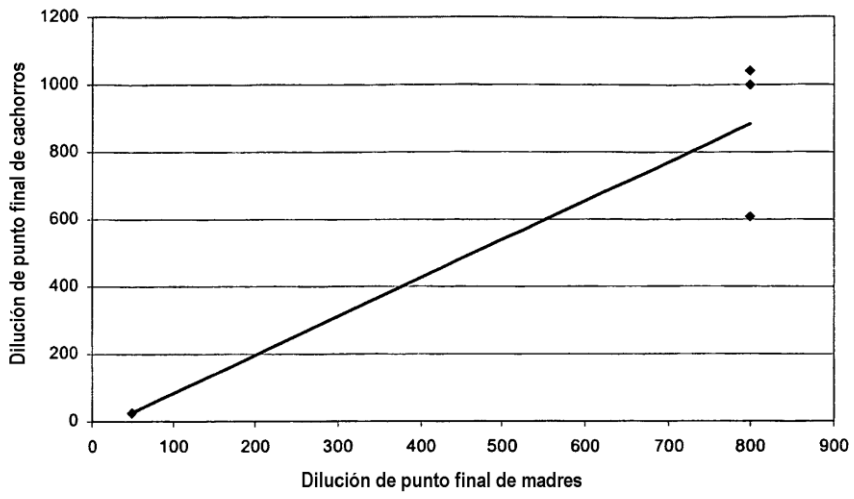


FIGURA 13

Patatas TH110 LT-B iiof.		Patatas TH110 LT-B iiof. con ascorbato sódico		Patatas TH110 LT-B iiof. con ascorbato sódico & Quil A	
Estudio de estabilidad		Estudio de estabilidad		Estudio de estabilidad	
Almacenamiento	ELISA de LT-B	Almacenamiento	ELISA de LT-B	Almacenamiento	ELISA de LT-B
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 (T.A.)	35,5	12-Oct-01 (T.A.)	31,9	12-Oct-01 (T.A.)	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 (T.A.)	23,7	28-Nov-01 (T.A.)	25,5	28-Nov-01 (T.A.)	21,8
12-Ene-02 (6-12°C)	14,7	12-Ene-02 (6-12°C)	16,9	12-Ene-02 (6-12°C)	14,4
12-Ene-02 (T.A.)	19,8	12-Ene-02 (T.A.)	22,5	12-Ene-02 (T.A.)	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 (T.A.)	24,4	13-Feb-02 (T.A.)	19,3	13-Feb-02 (T.A.)	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 (T.A.)	25,7	14-Mar-02 (T.A.)	25,3	14-Mar-02 (T.A.)	26,3

Figura 14a

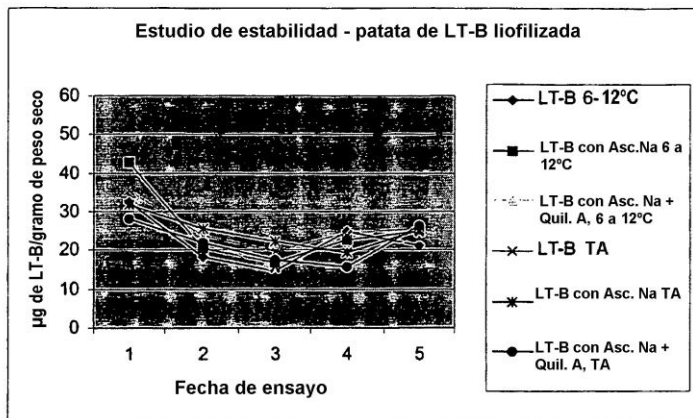


FIGURA 14b

Experimento de almacenamiento HA

Células NT-1 liof. (HAO)

Fecha	Condiciones de almacenamiento	Resultados de ELISA
27-Sep-01	(-18°C)	62,35
27-Sep-01	(T.A.)	66,5
25-Oct-01	(-18°C)	88,65
25-Oct-01	(T.A.)	105,33
27-Nov-01	(-18°C)	45,9
27-Nov-01	(T.A.)	60,0
11-Ene-01	(-18°C)	179,3
11-Ene-01	(T.A.)	187,5
8-Mar-02	(-18°C)	* 108,1
8-Mar-02	(T.A.)	* 149,8

\*Se inició utilizando un lote nuevo de anti-AIV de pollo (TW/68) de SEPRL como el anticuerpo detector en el ELISA

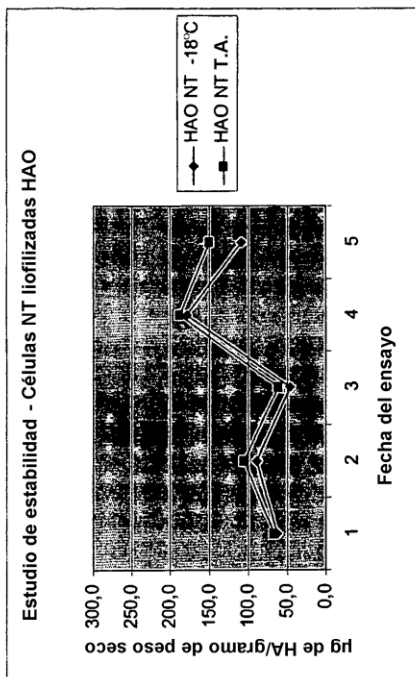


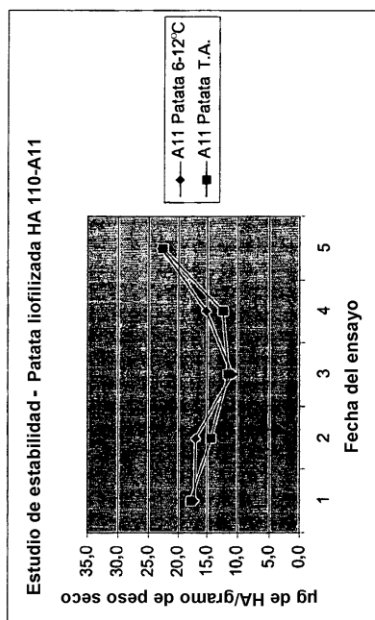
FIGURA 15



Experimento de almacenamiento HA  
 Patata liofilizada HA 110-A11  
**FIGURA 16**

Fecha	Condiciones de almacenamiento	Resultados de ELISA
27-Sep-01	(6-12°C)	17,22
27-Sep-01	(T.A.)	17,74
25-Oct-01	(6-12°C)	16,89
25-Oct-01	(T.A.)	14,41
27-Nov-01	(6-12°C)	11,0
27-Nov-01	(T.A.)	11,5
11-Ene-01	(6-12°C)	15,2
11-Ene-01	(T.A.)	12,4
8-Mar-02	(6-12°C)	* 22,8
8-Mar-02	(T.A.)	* 22,6

\*Se inició utilizando un lote nuevo de anti-AIV de pollo (T/W/68) de SEPRL como el anticuerpo detector en el ELISA



Estudio de estabilidad

Células NT-1 liof. (SLT102)			
Fecha	Condiciones de almacenamiento	Resultados de ELISA <sup>A</sup> LT de ELISA <sup>A</sup> LT-B	Resultados de ELISA <sup>A</sup> LT de ELISA <sup>A</sup> LT-B
12-Oct-01	(-18°C)	41,4	183,4
12-Oct-01	(T.A.)	41,4	183,4
28-Nov-01	(-18°C)	32	188,8
28-Nov-01	(T.A.)	36,2	201,1
12-Ene-02	(-18°C)	* 18,7	166,1
12-Ene-02	(T.A.)	* 20,6	162,2
13-Feb-02	(-18°C)	11	143,1
13-Feb-02	(T.A.)	12,9	116,3
14-Mar-02	(-18°C)	20,6	188,9
14-Mar-02	(T.A.)	19,9	168,8

A=> Resultados proporcionados como µg de LT o de LT-B por gramo de peso seco

\*=> Las muestras desconocidas no eran paralelas a la referencia, aunque la relación de pendiente era prácticamente aceptable

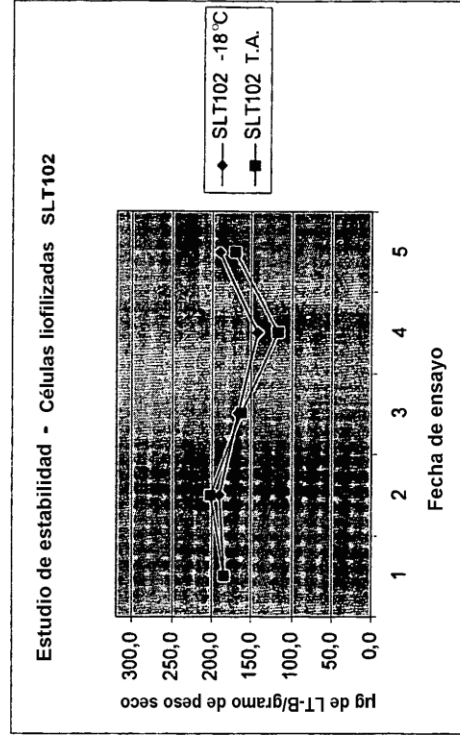


FIGURA 17