(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 964 T2** 2006.03.30

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 793 717 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 964.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/13376**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 940 519.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/012801**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.10.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.05.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.09.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **26.01.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.03.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/00*** (2006.01)
C12N 15/05 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)
C07K 14/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
328716 **24.10.1994** **US**

(73) Patentinhaber:
The Texas A & M University System, College Station, Tex., US; The Administrators of The Tulane University Educational Fund, New Orleans, La., US

(74) Vertreter:
WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und Rechtsanwälte, 81541 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, DE, ES, FR, GB, IT, NL

(72) Erfinder:
ARNTZEN, Charles J., Ithaca, US; MASON, Hugh S., Ithaca, US; HAQ, Tariq A., Houston, US; CLEMENTS, John D., New Orleans, US

(54) Bezeichnung: **ORALE IMMUNISIERUNG DURCH VERWENDUNG VON TRANSGENEN PFLANZEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft allgemein die Herstellung von oralen Impfstoff-Adjuvantien und oralen Impfstoffen in eßbaren transgenen Pflanzen und, genauer gesagt, die Hervorrufung einer Immunantwort in Tieren, welche das transgene Pflanzenmaterial essen. Die vorliegende Erfindung betrifft spezifischer die Herstellung von transgenen Pflanzen unter Verwendung der Gene, codierend die bakteriellen Toxin-Untereinheiten LT-A und LT-B oder CT-A und CT-B, und die Verwendung des exprimierten Proteins zum Induzieren von Immunantworten in Säugern, allein oder mit anderen assoziierten antigenen Mitteln.

[0002] Folglich betrifft diese Erfindung die Einführung von Genen in Pflanzen, codierend Kolonisierungs- oder Virulenz-Antigene oder antigene Bereiche daraus von Pathogenen, welche auf Schleimhautoberflächen von Säugern kolonisieren oder dadurch eindringen. Genauer gesagt, betrifft diese Erfindung die Einführung von Genen, codierend für LT-B oder CT-B enthaltende Proteine, in Pflanzen, so daß die Pflanzen das LT-B oder CT-B enthaltende Protein herstellen können.

[0003] Diese Erfindung repräsentiert ferner eine signifikante und unerwartete Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik dahingehend, daß sie die tatsächliche Immunisierung von Tieren gegen bakterielle Antigene durch Füttern der Tiere mit transgenen Pflanzen ermöglicht, in welchen ausreichende Spiegel des bakteriellen Antigens exprimiert worden sind, damit eine Immunität induziert wird. Ferner zeigt diese Erfindung die zusätzliche und unerwartete Verbesserung eines Adjuvanz-Effektes, verursacht beim Immunisieren von Tieren mit transgenen Pflanzen, welche bakterielle Toxin-Antigene enthalten.

Hintergrund der Erfindung

[0004] Infektionskrankheiten haben das Leben auf der Erde wahrscheinlich seit seiner Entstehung heimgesucht. Derartige Krankheiten betreffen nicht nur den Menschen sondern auch Tiere. In ökonomisch weiterentwickelten Ländern der Welt sind Infektionskrankheiten 1) zeitweilig krankmachend; 2) dauerhaft krankmachend oder verkrüppelnd; oder 3) tödlich. In den weniger entwickelten Ländern besteht die Tendenz, dass Infektionskrankheiten den letztgenannten zwei Kategorien, dauerhaft krankmachend oder verkrüppelnd und tödlich, angehören, aufgrund vieler Faktoren, einschließlich des Fehlens von präventiven Immunisierungen und von heilender Medizin.

[0005] Es ist allgemein anerkannt, daß die Nützlichkeit von Antibiotika zur effektiven Bekämpfung bakterieller Pathogene wegen des vermehrten Auftretens von Antibiotikum-resistenten Pathogenen zunehmend problamtisch wird. Somit ist die Verhinderung infektiöser Krankheiten kostengünstiger als die letztendliche Behandlung der Krankheit, sobald sie aufgetreten ist. Als Ergebnis wird die Aufmerksamkeit in zunehmendem Maße auf die Entwicklung von Impfstoffen fokusiert.

[0006] Impfstoffe werden an Menschen und Tiere verabreicht, um ihre Immunsysteme dazu zu veranlassen, Antikörper gegen Viren, Bakterien und andere Typen von pathogenen Organismen herzustellen. In den ökonomisch fortgeschritteneren Ländern der Welt haben Impfstoffe viele Krankheiten unter Kontrolle gebracht. Insbesondere werden jetzt viele Virenkrankheiten aufgrund der Entwicklung von Impfprogrammen verhindert. Die praktische Eliminierung von Pocken ist ein Beispiel der weltweiten Wirksamkeit eines Impfstoffs. Jedoch sind viele Impfstoffe für solche Krankheiten wie Poliomyelitis, Masern, Mumps, Tollwut, Maul-und-Klauenseuche und Hepatitis B für die weniger entwickelten Länder noch zu kostspielig, um deren große Menschen- und Tier-Populationen zu versorgen. Das Fehlen dieser vorbeugenden Maßnahmen für Tierpopulationen kann die Bedingungen für die Menschen durch Verursachen von Nahrungsmittelverknappungen noch verschlimmern.

[0007] Aufgrund der Einfachheit der Zuführung von Impfstoffen durch die orale Verabreichung besteht derzeit ein großes Interesse an der Entwicklung einer neuen oralen Impfstofftechnnologie. Angemessen zugeführte orale Immunogene können sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität stimulieren und besitzen das Potential, kostengünstige, sichere Impfstoffe zur Verwendung in Entwicklungsländern oder Innenstädten vorzusehen, wo eine parenterale Impfung im großen Maßstab nicht praktikabel oder äußerst schwierig auszuführen ist. Derartige Impfstoffe können auf bakteriellen oder viralen Vektorsystemen basieren, welche schutzgebende Epitope aus verschiedenen Pathogenen (mehrwertige Impfstoffe) exprimieren, oder können auf gereinigten Antigenen basieren, welche einzeln oder in Kombination mit relevanten Antigenen oder anderen Pathogenen zugeführt werden.

A. Mikrobielle Pathogenese und orale Impfung

[0008] Mikrobielle Pathogene können einen Wirt durch einen von mehreren Mechanismen infizieren. Sie können über einen durch Verletzung verursachten Riß im Integument eintreten, sie können durch Vektortransmission eingeführt werden oder sie können mit einer Schleimhautoberfläche wechselwirken. Die Mehrzahl der humanen Pathogene initiiert eine Krankheit durch den letztgenannten Mechanismus, d. h. im Anschluß an eine Wechselwirkung mit Schleimhautoberflächen. Bakterielle und virale Pathogene, welche durch diesen Mechanismus wirken, nehmen als erstes Kontakt mit der Schleimhautoberfläche auf, wo sie anhaften und dann kolonisieren können, oder durch spezialisierte absorptive Zellen (M-Zellen) im Epithel aufgenommen werden, welche über den Peyer-Haufen oder anderen Lymphoidfollikeln liegen. Organismen, welche in die Lymphoidgewebe eintreten, können innerhalb der Lymphoidfollikel leicht abgetötet werden, wodurch eine potentiell schutzgebende immunologische Antwort hervorgerufen wird, da Antigene an Immunzellen innerhalb der Follikel zugeführt werden (z. B. Vibrio cholerae). Alternativ dazu können sich pathogene Organismen, fähig zum Überleben der örtlichen Abwehrmechanismen, aus den Follikeln ausbreiten und anschließend eine lokale oder systemische Erkrankung verursachen (z. B. Salmonella spp., Poliovirus in immunkompromitierten Wirten).

[0009] Sekretorische IgA-Antikörper (sIgA), gerichtet gegen spezifische Virulenz-Determinanten des infizierenden Organismus, spielen eine bedeutende Rolle in der insgesamten Schleimhaut-Immunität. In vielen Fällen ist es möglich, die anfängliche Infektion von Schleimhautoberflächen durch Stimulieren der Herstellung von mucosalen sIgA-Spiegeln zu verhindern, die gegen relevante Virulenzdeterminanten eines infizierenden Organismus gerichtet sind. Sekretorisches IgA kann der anfänglichen Wechselwirkung des Pathogens mit der Schleimhautoberfläche durch Blockieren der Anhaftung und/oder Kolonisation, Neutralisieren der oberflächenwirksamen Toxine oder Verhindern der Invasion der Wirtszellen vorbeugen.

[0010] Parenteral verabreichte, inaktivierte Ganzzell- und Ganzvirus-Präparationen sind wirksam zur Hervorrufung von schutzgebendem Serum-IgG und Hypersensitivitäts-Reaktionen vom verzögerten Typ gegen Organismen, welche eine signifikante Serum-Phase in ihrer Pathogenese aufweisen (z. B. Salmonella typhi, Hepatitis B). Allerdings sind parenterale Impfstoffe nicht wirksam zur Hervorrufung von mucosalen sIgA-Antworten und sind unwirksam gegen Bakterien, welche mit Schleimhautoberflächen wechselwirken und nicht eindringen (z. B. Vibrio cholerae).

[0011] Eine orale Impfung kann für die Induktion von spezifischen sIgA-Antworten effektiv sein, wenn die Antigene an die T- und B-Lymphozyten und akzessorische Zellen präsentiert werden, die innerhalb der Peyer-Haufen, wo eine präferentielle IgA-B-Zell-Entwicklung eingeleitet wird, enthalten sind. Die Peyer-Haufen enthalten T-Helferzellen (TH), welche die B-Zell-Isotyp-Umschaltung direkt von IgM-Zellen zu IgA-B-Zellen vermitteln, danach zu den mesenterischen Lymphknoten wandern und eine Differenzierung durchlaufen, in den Ductus thoracicus und danach den allgemeinen Kreislauf eintreten, und sich anschließend über alle sekretorischen Gewebe des Körpers verteilen, einschließlich der Lamina propria des Darms und des respiratorischen Trakts. IgA wird dann von den reifen Plasmazellen hergestellt, mit membrangebundener sekretorischer Komponente komplexiert und auf die Schleimhautoberfläche transportiert, wo es zur Wechselwirkung mit eindringenden Pathogenen zur Verfügung steht. Die Existenz dieses üblichen mucosalen Immunsystems erklärt teilweise das Potential von lebenden oralen Impfstoffen und der oralen Impfung zum Schutz gegen pathogene Organismen, welche eine Infektion zuerst durch Wechselwirken mit Schleimhautoberflächen einleiten.

[0012] Eine Reihe von Strategien ist für die orale Impfung entwickelt worden, einschließlich der Verwendung von attenuierten Mutanten von Bakterien (z. B. Salmonella spp.) als Träger von heterologen Antigenen, Einkapselung von Antigenen in Mikrosphären, aufgebaut aus Poly-DL-lactid-glycolid (PGL), proteinartigen Polymeren-Proteinoiden, Gelatinekapseln, unterschiedlichen Formulierungen von Liposomen, Adsorption auf Nanopartikeln, Verwendung von lipophilen immunstimulierenden Komplexen und Zusetzen von Bakterienprodukten mit bekannten Adjuvanzeigenschaften.

[0013] Der Entwicklung der meisten derzeitigen Impfstoffe liegt das Vermögen zugrunde, das krankheitsverursachende Agens in großen Mengen zu züchten. Gegenwärtig werden Impfstoffe üblicherweise aus abgetöteten oder lebenden attenuierten Pathogenen hergestellt. Wenn es sich bei dem Pathogen um ein Virus handelt, müssen große Mengen des Virus in einem tierischen Wirt oder kultivierten tierischen Zellen herangezüchtet werden. Wenn ein lebendes attenuiertes Virus verwendet wird, muß von ihm deutlich bewiesen sein, daß ihm Virulenz fehlt, während es die Fähigkeit beibehält, eine Infektion zu begründen und humorale und zelluläre Immunität zu induzieren. Wenn ein getötetes Virus verwendet wird, muß der Impfstoff das Fehlen der Fähigkeit überlebender Antigene, eine Immunisierung zu induzieren, aufzeigen. Zusätzlich dazu können Oberflächenantigene, die hauptsächlichen viralen Partikel, welche Immunität induzieren, isoliert und verabreicht werden, um

Immunität zu induzieren, anstelle der Verwendung lebender attenuierter oder abgetöteter Viren.

[0014] Enterische bakterielle Krankheiten, wie Cholera, Dysenterie, mit Escherichia coli (E. coli) zusammenhängende Diarrhoe-Arten und typhoides Fieber, sind Hauptursachen von Krankhaftigkeit und Sterblichkeit weltweit, insbesondere in Entwicklungsländern, wo die hygienischen Bedingungen häufig weniger als angemessen sind. Mehrere Typen von Impfstoffen gegen diese Enteropathien sind über die Jahre hinweg entwickelt und getestet worden, unter diesen abgetötete Gesamtzellen, Untereinheiten von Toxinen und lebende attenuierte Bakterien, welche parenteral oder oral verabreicht werden. Der Großteil der Krankhaftigkeit und Sterblichkeit aufgrund von bakterieller Diarrhoe-artiger Erkrankung erwächst aus Infektionen mit V. cholerae und den Cholera-verwandten enterotoxischen Enteropathien (nämlich E. coli, welche Cholera-ähnliches Enterotoxin erzeugen).

[0015] E. coli verursacht Diarrhoe-Krankheit durch eine Vielzahl von Mechanismen, einschließlich der Herstellung eines oder mehrerer Enterotoxine. Eines dieser Toxine, bezeichnet als das Hitze-labile Enterotoxin (LT), ist immunologisch und physikochemisch mit dem Cholera-Enterotoxin verwandt. LT ist zur Homogenität gereinigt und umfassend charakterisiert worden. LT-B, ein 56000 Dalton großes pentameres Protein, welches aus 5 identischen Monomer-Untereinheit besteht, wirkt als die Bindungskomponente des Hitze-labilen Enterotoxins. Bei parenteraler Verabreichung induziert LT-B eine Serumantwort gegen sich selbst und gegen Haptene, welche kovalent mit dem Molekül verknüpft sind, sogar in Abwesenheit eines Adjuvanz. Dergleichen ist von LT-B, welches oral verabreicht wurde, sowohl in Tiermodellen als auch in menschlichen Freiwilligen gezeigt worden, eine Serum-IgG- und Schleimhaut-IgA-Antwort gegen sich selbst und gegen geeignet gebundene Haptene zu induzieren.

[0016] Die Struktur von LT ist durch Röntgen-Kristallographie gut charakterisiert worden und besteht aus einem multimeren Protein. Das Holotoxin schließt eine "A"-Untereinheit (LT-A) mit einem Molekulargewicht von 27000 Dalton ein, welche durch die Proteasen im Dünndarm zu LT-A1 und LT-A2 gespalten wird. Das Holotoxin enthält auch fünf "B"-Untereinheiten (LT-B) mit einem Molekulargewicht von jeweils 11600 Dalton, welche nicht-kovalent zu einer sehr stabilen Doughnut-ähnlichen Pentamerstruktur verknüpft sind.

[0017] Die LT-B-Pentamerstruktur bindet an Darmepithelzellen durch spezifische Wechselwirkungen mit dem GM-I-Gangliosid (Galactosyl-N-acetylgalactosaminyl-(sialyl)-galactosylglucosylceramid), welches auf der Zelloberfläche vorhanden ist. Dies erleichtert den Eintritt von toxischem LT-A1 in Zellen, welches die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität enthält. Das LT-Toxin von enterotoxigenem E. coli (ETEC) ist sowohl strukturell als auch funktionell ähnlich zu CT, dem Choleratoxin von Vibrio cholera. Eine Immunisierung gegen das Eine führt beobachteterweise zur Kreuz-Schützung gegen das Andere; J. D. Clemens et al Lancet 335, 270 (1990). Die B-Untereinheit von Cholera ist ein integraler Teil des in Bangladesh getesteten oralen Kandidaten-Impfstoffs; J. D. Clemens et al., Lancet 335, 270 (1990).

[0018] Die Impfstoffherstellung verwendet häufig komplexe Technologien, welche sowohl für Entwicklung als auch Herstellung des Impfstoffs hohe Kosten mit sich bringen. Eine Konzentration und Reinigung des Impfstoffs ist erforderlich, egal ob dieser aus Zellkulturen, ganzen Bakterien, Viren, anderen pathogenen Organismen oder Untereinheiten davon hergestellt wird. Die hohen Kosten der Reinigung eines Impfstoffs gemäß den Regulierungen der Food and Drug Administration (FDA) machen die Herstellung der meisten oralen Impfstoffe unerschwinglich kostspielig, weil diese die zehn- bis fünfzigfach höhere Menge als die reguläre Menge an Impfstoff pro Dosis erfordern, als ein Impfstoff, der parenteral verabreicht wird.

[0019] Gemäß den FDA-Richtlinien muß die Wirksamkeit von Impfstoffen für Menschen in Tieren durch Antikörperentwicklung und durch Resistenz gegen Infektion und Krankheit nach Herausforderung mit dem Pathogen aufgezeigt werden. Wenn die Sicherheit und der Immunogenitäts-Spiegel zufriedenstellend sind, werden danach klinische FDA-Untersuchungen an Menschen durchgeführt. Eine kleine sorgfältig kontrollierte Gruppe von Freiwilligen wird aus der allgemeinen Bevölkerung eingeschrieben, um Versuche am Menschen zu beginnen. Dieser lange und kostspielige Vorgang des Testens dauert Jahre, bevor bestimmt werden kann, ob der Impfstoff an die allgemeine Bevölkerung gegeben werden kann. Wenn die Versuche erfolgreich sind, kann der Impfstoff dann in die Massenproduktion eingehen und an die Öffentlichkeit verkauft werden.

[0020] Selbst nach diesen Vorsichtsmaßnahmen können und werden Probleme aufkommen. Bei abgetöteten Bakterienzellen, Viren oder anderen pathogenen Organismen, besteht stets die Möglichkeit, daß lebende Pathogene überleben und die Impfung zu isolierten Fällen von Erkrankung führen kann. Darüber hinaus können die Impfstoffe manchmal mit Zellmaterial aus dem Kulturmaterial kontaminiert sein, aus welchem sie abgeleitet wurden. Diese Kontaminanten können nachteilige Reaktionen im Impfstoffempfänger und manchmal sogar

den Tod herbeiführen. Die gesetzliche Haftung des Impfstoffherstellers für diejenigen, welche von einer nachteiligen Reaktion gegen Impfstoffe geschädigt werden, macht es für den Herstellung notwendig, eine kostspielige Haftpflichtversicherung zu besitzen und aufrecht zu erhalten, welche weiterhin zu den letztendlichen Kosten des Impfstoffs beiträgt.

[0021] Die meisten Pathogene treten auf oder durch eine Schleimhautoberfläche ein, mit Ausnahme von in Insekten befindlichen Pathogenen oder Pathogenen, welche den Körper durch Wunden betreten. Pathogene, welche durch Schleimhautoberflächen eintreten, schließen, ohne Einschränkung darauf, Actinomyces, Aeromonas, Bacillus, Bacteroides, Bordetella, Brucella, Compylobacter, Capnocylophaga, Clamydia, Clostridium, Corynebacterium, Eikenella, Erysipelothrix, Escherichia, Fusobacterium, Hemophilus, Klebsiella, Legionella, Leptospira, Listeria, Mycobacterium, Mycoplasma, Neisseria, Nocardia, Pasteurella, Proteus, Pseudomonas, Rickettsia, Salmonella, Selenomonas, Shigelia, Staphylococcus, Streptococcus, Treponema, Vibro und Yersinia, pathogene Virenstämme aus den Gruppen Adeiiovirus, Coronavirus, Herpesvirus, Orthomyxovirus, Picornavirus, Pockenvirus, Reovirus, Retrovirus und Rotavirus, pathogene Pilze aus den Gattungen Aspergillus, Blastomyces, Candida, Coccoidiodes, Cryptococcus, Histoplasma und Phycomyces, und pathogene Parasiten in den Gattungen Eimeria, Entamoeba und Trichomonas ein.

[0022] Säugerwirte, welche von einem Pathogen infiziert werden, setzen eine Immunantwort in Gang, im Bestreben, das Pathogen zu überwinden. Das Immunsystem besteht aus drei Zweigen: mucosal, humoral und zellulär. Die mucosale Immunität resultiert aus der Herstellung von sekretorischen (sIgA) Antikörpern in Sekretionen, welche alle Schleimhautoberflächen überziehen, einschließlich des respiratorischen Trakts, Gastrointestinaltrakts und des Urogenitaltrakts, und in Sekretionen aus allen sekretorischen Drüsen. Sekretorische IgA-Antikörper verhindern eine Ansiedlung von Pathogenen auf den Schleimhautoberflächen und sind eine erste Verteidigungslinie gegen die Kolonisierung und Invasion eines Pathogens durch die Schleimhautoberflächen. Die Herstellung von sIgA kann entweder durch örtliche Impfung der sekretorischen Drüse oder Gewebe oder durch Präsentation eines Antigens entweder an das Darm-assoziierte Lymphoidgewebe (GALT oder Peyer-Haufen) oder das Bronchienassoziierte Lymphoidgewebe (BALT) stimuliert werden.

[0023] Membranöse Microfold- bzw. Mikrofalten-Zellen, anderweitig bekannt als M-Zellen, bedecken die Oberfläche des GALT und BALT und können mit anderen sekretorischen Schleimhautoberflächen assoziiert sein. M-Zellen wirken zum Sammeln von Antigenen aus dem Lumen-Raum, welcher an die Schleimhautoberfläche angrenzt, und transferieren derartige Antigene an Antigen-präsentierende Zellen (dendritische Zellen und Makrophagen), welche ihrerseits das Antigen an T-Lymphozyten (im Falle von T-abhängigen Antigenen) präsentieren, welche das Antigen für die Präsentation an dafür prädisponierte (committed) B-Zellen prozessieren. B-Zellen werden dann stimuliert, um zu proliferieren und zu migrieren und werden letztendlich in Antikörper-sezernierende Plasmazellen umgewandelt, welche IgA gegen das präsentierte Antigen herstellen.

[0024] Wenn das Antigen von M-Zellen aufgenommen wird, welche über dem GALT und BALT liegen, resultiert eine generalisierte mucosale Immunität, wobei sIgA gegen das Antigen von allen sekretorischen Geweben im Körper hergestellt wird. Weil die meisten Pathogene durch Schleimhautoberflächen eintreten und solche Oberflächen die erste Verteidigungslinie gegen Infektion ausmachen und die körpereigene Immunantwort erleichtern, repräsentieren Impfstoffe, welche oral verabreicht werden können, eine der wichtigsten Routen zum Stimulieren einer generalisierten Schleimhaut-Immunantwort, welche zu einer lokalen Stimulation einer sekretorischen Immunantwort in der Mundhöhle und im Gastrointestinaltrakt führt.

[0025] Sekretorische IgA-Antikörper inhibieren direkt die Adhäsion von Mikroorganismen an Schleimhautepithelzellen und an die Zähne des Wirtes. Diese Inhibition kann das Ergebnis von Agglutination von Mikroorganismen, Reduktion der Hydrophobizität oder negativen Ladung und Blockierung von mikrobiellen Adhäsionen sein. Diese Anti-Adhäsions-Effekte werden von anderen Faktoren, wie sekretorischen Glycoproteinen, kontinuierlicher Abschuppung von Oberflächenepithel und der Flora-Kompetition, verstärkt.

[0026] Klinische Erfahrungen mit humanem peroralen Poliovirus-Impfstoff und mehreren in der Tiermedizin angewandten peroralen oder intranasalen Virusimpfstoffen zeigen, daß sIgA eine entscheidende Rolle beim schützenden Effekt durch das Schleimhaut-Immunsystem gegen respiratorische und enterische Vireninfektionen spielt. Der Effekt von sIgA scheint eher derjenige des Inhibierens des Eintritts von Viren in Wirtszellen als die Verhinderung der Anlagerung zu sein.

B. Gentechnische Veränderung von Pflanzen

[0027] Auf dem Fachgebiet sind verschiedene Verfahren bekannt, um die genetische Transformation von

Pflanzen und Pflanzengeweben zu bewerkstelligen, so daß Fremd-DNA auf stabile Weise in das genetische Material der Pflanzen eingebracht wird, d. h. eine Weise, welche zulassen wird, daß die Fremd-DNA auf die Nachkommenschaft der Pflanzen übertragen wird. Zwei derartige transformierende Verfahrensweisen sind eine Agrobacterium-vermittelte Transformation und der direkte Gentransfer.

[0028] Agrobacterium-vermittelte Transformation verwendet A. tumefaciens, das ätiologische Agens von Wurzelhalsgallen bzw. "crown galls", einer Krankheit einer ganzen Reihe von Dicotyledonen und Gymnospermen, welche zur Bildung von Tumoren oder Gallen im Pflanzengewebe an der Stelle der Infektion führt. Agrobacterium, welches normalerweise die Pflanzen an Wundstellen infiziert, trägt ein großes extrachromosomales Element, welches Ti-Plasmid (Tumor-induzierend) genannt wird.

[0029] Ti-Plasmide enthalten zwei Regionen, die für die Tumorinduktion erforderlich sind. Eine Region ist die T-DNA (transferierte-DNA), welche die DNA-Sequenz ist, die sich letztendlich stabil in die genomische Pflanzen-DNA transferiert findet. Die andere Region ist die vir(Virulenz)-Region, welche mit dem Transfermechanismus in Zusammenhang gebracht worden ist. Obwohl die vir-Region für eine stabile Transformation absolut erforderlich ist, wird die vir-DNA eigentlich nicht in die infizierte Pflanze überführt. Die Transformation von Pflanzenzellen, vermittelt durch Infektion mit A. tumefaciens, und der anschließende Transfer allein der T-DNA sind gut dokumentiert worden; siehe z. B. Bevan, M. W. et al., Int. Rev. Genet., 16, 357 (1982).

[0030] Nach mehreren Jahren intensiver Forschung in vielen Laboratorien ist das Agrobacterium-System entwickelt worden, um die routinemäßige Transformation einer Vielzahl von Pflanzengeweben zu gestatten. Repräsentative, durch diese Technik transformierte Gewebe schließen, ohne Einschränkung darauf, Tabak, Tomate, Sonnenblume, Baumwolle, Raps, Kartoffel, Pappel und Sojabohne ein.

[0031] A. rhizogenes ist auch als ein Vektor für Pflanzentransformation verwendet worden. Dieses Bakterium, welches die Wurzelhaarbildung in vielen dicotylen Pflanzenspezies hervorruft, trägt ein großes extrachromosomales Element, bezeichnet als Ri-Plasmid (root-inducing bzw. wurzel-induzierend), welches auf eine analoge Weise zum Ti-Plasmid von A. tumefaciens funktioniert. Die Transformation unter Verwendung von A. rhizogenes ist analog zu derjenigen von A. tumefaciens entwickelt worden und ist erfolgreich angewandt worden, um Pflanzen zu transformieren, welche ohne Einschränkung darauf Alfalfa und Pappel einschließen.

[0032] Im Falle von direktem Gentransfer wird das fremde genetische Material ohne die Verwendung des Agrobacterium-Plasmids in Pflanzengewebe transformiert. Die direkte Transformation beinhaltet die Aufnahme von exogenem genetischen Material in Pflanzenzellen oder Protoplasten. Eine derartige Aufnahme kann durch die Verwendung chemischer Mittel oder elektrischer Felder verstärkt werden. Das exogene Material kann dann in das nukleäre Genom integriert werden. Frühe Arbeiten mit direktem Transfer wurden in der Dicotyle Nicotiana tobacum (Tabak) durchgeführt, wo gezeigt wurde, daß die Fremd-DNA eingebaut und an Nachkommen-Pflanzen weitergegeben wurde. Mehrere monocotyle Protoplasten sind ebenfalls durch dieses Vorgehen transformiert worden, einschließlich Mais und Reis.

[0033] Von Liposomenfusion ist ebenfalls gezeigt worden, ein Verfahren zum Transformieren von Pflanzenzellen zu sein. Protoplasten werden mit Liposomen, welche das gewünschte Gen tragen, zusammengebracht. Mit dem Verschmelzen der Membranen wird das Fremdgen in den Protoplasten transformiert.

[0034] Darüber hinaus kann ein direkter Gentransfer durch Polyethylenglycol(PEG)-vermittelte Transformation bewerkstelligt werden. PEG-vermittelte Transformation ist erfolgreich eingesetzt worden, um Dicotyle, wie Tabak, und Monocotyle, wie Lolium multiflorum, zu transformieren. Dieses Verfahren beruht auf Chemikalien zur Vermittlung der DNA-Aufnahme durch Protoplasten und basiert auf synergistischen Wechselwirkungen zwischen Mg^{+2}, PEG und möglicherweise Ca^{+2}; siehe z. B. Negrutiu, R., et al., Plant Mol. Biol., 8, 363 (1987).

[0035] Alternativerweise kann exogene DNA durch Mikroinjektion in Zellen oder Protoplasten eingebracht werden. In dieser Technik wird eine Lösung der Plasmid-DNA oder des DNA-Fragments mit einer fein gezogenen Glasnadel direkt in die Zelle injiziert. Diese Technik ist angewandt worden, um Alfalfa zu transformieren.

[0036] Eine noch kürzlicher entwickelte Vorgehensweise für den direkten Gentransfer beinhaltet den Beschuß von Zellen mit Mikro-Projektilen, welche DNA tragen. In dieser Vorgehensweise, üblicherweise bezeichnet als Partikel-Bombardment, werden Wolfram- oder Goldteilchen, beschichtet mit der exogenen DNA, in Richtung auf die Zielzellen hin beschleunigt. Die Teilchen dringen in die Zellen ein, wobei sie die aufbeschichtete DNA mit sich tragen. Von der Mikropartikel-Beschleunigung ist erfolgreich gezeigt worden, sowohl zu transienter Expression als auch stabiler Expression in Zellen, suspendiert in Kulturen, Protoplasten, unreifen Em-

bryonen von Pflanzen, einschließlich ohne Einschränkung darauf Zwiebel, Mais, Sojabohne und Tabak, zu führen.

[0037] Sobald Pflanzenzellen transformiert worden sind, gibt es eine Vielzahl an Verfahren zum Regenerieren von Pflanzen. Das jeweilige Verfahren zur Regeneration wird von dem Ausgangs-Pflanzengewebe und der besonderen zu regenerierenden Pflanzenart abhängen. In den letzten Jahren ist es möglich geworden, viele Pflanzenspezies aus Callusgewebe zu regenerieren, welches aus Pflanzen-Explantaten abgeleitet ist. Die Pflanzen, welche aus Callus regeneriert werden können, schließen Monocotyle wie, ohne Einschränkung darauf, Mais, Reis, Gerste, Weizen und Roggen, und Dicotyle wie, ohne Einschränkung darauf, Sonnenblume, Sojabohne, Baumwolle, Raps und Tabak, ein.

[0038] Die Regeneration von Pflanzen aus mit A. tumefaciens transformiertem Gewebe ist für mehrere Pflanzenarten demonstriert worden. Diese schließen, ohne Einschränkung darauf, Sonnenblume, Tomate, weißen Klee, Raps, Baumwolle, Tabak, Kartoffel, Mais, Reis und blume, Tomate, weißen Klee, Raps, Baumwolle, Tabak, Kartoffel, Mais, Reis und zahlreiche Gemüse-Nutzpflanzen ein.

[0039] Die Pflanzenregeneration aus Protoplasten ist gelegentlich eine nützliche Technik. Wenn eine Pflanzenspezies aus Protoplasten regeneriert werden kann, dann können direkte Gentransfer-Vorgehensweisen eingesetzt werden, und die Transformation ist nicht von der Verwendung von A. tumefaciens abhängig. Die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten ist für Pflanzen aufgezeigt worden, einschließlich, ohne Einschränkung darauf, Tabak, Kartoffel, Pappel, Mais und Sojabohne.

[0040] Die für die Erzeugung von transgenen Pflanzen entwickelte Technologie hat viele Forscher dazu geführt, die Expression von Genen zu untersuchen, welche aus unähnlichen Pflanzenspezies oder aus Nicht-Pflanzen-Genomen abgeleitet sind. In vielen Fällen ist es wünschenswert gewesen, die Expression von rekombinanten Proteinen zu charakterisieren, welche von Genen codiert werden, die aus Viren oder Bakterien abgeleitet sind. Die Konstruktion von chimären Genen zur Expression von fremden codierenden Sequenzen in Pflanzen beinhaltet die Ligation von nicht-codierenden regulatorischen Elementen, welche in Pflanzen funktionieren, 5' zur DNA-Sequenz, welche das gewünschte Protein codiert, und die Ligation eines Polyadenylierungs-Signals, welches in Pflanzenzellen aktiv ist, 3' zur DNA-Sequenz, welche das gewüschte Protein codiert.

[0041] Die regulatorischen 5'-Sequenzen, welche häufig bei der Erzeugung von chimären Genen für die Pflanzentransformation verwendet werden, können entweder eine nominell konstitutive Expression in allen Zellen der transgenen Pflanze verursachen oder eine regulierte Genexpression, bei der lediglich spezifische Zellen oder Gewebe eine Expression der eingeführten Gene zeigen. Der CaMV-35S-Promotor, welcher aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus abgeleitet ist, welches eine Pflanzenkrankheit verursacht, ist häufig verwendet worden, um die nominiell konstitutive Expression von Fremdgenen in Pflanzen zu steuern. Ein regulatorisches DNA-Element, welches gezeigtermaßen die Wurzelknollen-spezifische Expression des Patatin-Proteins steuert, ist ein Beispiel einer entwicklungsspezifischen Genexpression; dieses Patatin-Promotorelement verursacht bekanntermaßen die Knollen-spezifische Expression wenigstens einiger Fremdgene; siehe z. B. H. C. Wenzler, G. A. Mignery, L. M. Fisher, W. D. Park, Plant Mol. Biol., 12: 41–50 (1989).

[0042] Chimäre Genkonstruktionen können ebenfalls Modifikationen der Aminosäure-codierenden Sequenz des Strukturgens, welches in transgene Pflanzen eingebracht wird, einschließen. Beispielsweise kann es wünschenswert sein, Aminosäuren in dem zu exprimierenden Protein hinzuzufügen oder zu deletieren, um die zelluläre Lokalisierung des Fremdgenprodukts in den Zellen von transgenen Pflanzen zu beeinflussen.

[0043] Es ist gezeigt worden, daß der Einschluß von KDEL- und HDEL-Aminosäuresequenzen am Carboxyterminus von mindestens einem Protein die Erkennung dieses Proteins durch die Maschinerie der Pflanze zur Retention im endoplasmatischen Reticulum verstärkte; S. Munro und H. R. B. Pelham, Cell 48, 988–997 (1987); J. Denecke, R. DeRycke, J. Botterman, EMBO-J. 11, 2345 (1992); E. M. Herman, B. W. Tague, L. M. Hoffman, S. E. Kjemtrip, M. J. Chrispeels, Planta 182, 305 (1991); C. Wandelt et al., The Plant Journal 2, 181 (1992). Allerdings sind derartige Modifikationen bestenfalls problematisch, weil andere Faktoren, wie Proteinkonformation oder Proteinfaltung in den transformierten Zellen, die Verfügbarkeit dieses Carboxyterminus-Signals für die Maschinerie der Pflanze zur Retention im endoplasmatischen Reticulum stören können; S. M. Haugejorden, M. Srinivasan, M. Green, J. Biol. Chem. 266, 6015 (1991).

C. Orale Impfstoff-Methodiken unter Verwendung transgener Pflanzen

[0044] Es gibt vier gut bekannte genentische Expressions-Transformationssysteme, welche zur Herstellung

von transgenen Pflanzen, fähig zur Verabreichung als einer der Wirkstoffe in oralen Impfstoffen gegen ein gewünschtes Antigen, verwendet werden können. Die vorliegende Erfindung zieht Vorteil aus allen vier dieser Expressionssysteme für die Konstruktion von eßbaren Impfstoffen. Es sollte erkannt werden, daß diese Liste nicht gedacht ist, um andere mögliche Vorgehensweisen auszuschließen. Die Liste ist lediglich eingeschlossen, um einen passenden Kontext für den Umfang und die Lehren der vorliegenden Erfindung vorzusehen.

[0045] Zuerst können, in transgenen Pflanzen, Expressionsvektoren, die den CaMV-35S-Promotor und Antigen-codierende Sequenzen einschließen, verwendet werden, um die Pflanzen konstitutiv zu transformieren, wobei die Expression in den Blättern eine rasche Analyse der Genexpression und eine biochemische Charakterisierung von Genprodukten gestattet.

[0046] In solchen Pflanzen, wie, ohne Einschränkung darauf, Brassica napus (Canola), können Expressionsvektoren, welche den 2S-Albumin-Promotor und Antigen-codierende Sequenzen einschließen, verwendet werden, um eine samenspezifische Genexpression hervorzurufen, um die Erzeugung von rekombinantem Protein in Samengewebe zu veranlassen, das routinemäßig als Tierfutter verwendet wird, wodurch die Erstellung attraktiver oraler Immunogenitäts-Analysen vorgesehen wird.

[0047] In Pflanzen, wie, ohne Einschränkung darauf, Solanum tuberosum (Kartoffel), können Expressionsvektoren, welche den Patatin-Promotor oder Sojabohnen-vspB-Promotor und Antigen-codierende Sequenzen einschließen, verwendet werden, um eine knollenspezifische Genexpression zu verursachen, um die knollenspezifische Produktion von rekombinantem Protein in Knollengeweben, welche routinemäßig als Futtermittel verwendet werden, hervorzurufen. Dies ermöglicht die Erstellung von attraktiven oralen Immunogenitäts-Analysen.

[0048] Schließlich können in Pflanzen, wie, ohne Einschränkung darauf, Musa acuminata (Banane), Expressionsvektoren, welche Fruchtreifungs-spezifische Promotoren und Antigen-codierende Sequenzen einschließen, verwendet werden, und Pflanzen zu transformieren, welche das rekombinante Protein in gereiften Früchten produzieren, wobei die Herstellung des rekombinanten Proteins direkt als Kandidatenimpfstoffe für Verzehrstudien in Tieren und Menschen hervorgerufen wird.

[0049] Die Beibehaltung von biologischen Eigenschaften in den in Pflanzen hergestellten rekombinanten Proteinen, spezifisch Ligandenbindung und die Präsentation von antigenen Epitopen, ist von beträchtlicher Bedeutung für die erfolgreiche Herstellung eßbarer Impfstoffe in transgenen Pflanzen. Der schlußendliche Test des Wertes von Proteinen von pharmakologischer Bedeutung ist ihre biologische Aktivität. Impfstoffe sind von besonderem Interesse für Untersuchungen der Proteinexpression, da ihre Effekte in Tiermodellen exakt quantifiziert werden können. Darüber hinaus sind relativ niedrige Mengen erforderlich, da ihre Effekte durch das Immunsystem verstärkt werden.

[0050] Die hohen Kosten der Herstellung und Reinigung von synthetischen Peptiden, hergestellt durch chemische oder Fermentations-basierende Verfahren, können deren Verwendung als orale Impfstoffe in großem Maßstab verhindern. Die Herstellung von immunogenen Proteinen in transgenen Pflanzen und der Adjuvanz-Effekt solcher Proteine in transgenen Pflanzen bietet eine ökonomische Alternative.

[0051] Während orale Impfstoffe eine effektive und kostengünstige Vorgehensweise zur Induzierung von sekretorischen Immunantworten in Tieren einschließlich Menschen sein können, besteht ein Bedarf nach erwiesenen Techniken, welche transgene Pflanzen oder Pflanzengewebe ergeben, die, nach direktem Verzehr, eine gewünschte Immunantwort gegen ein gegebenes Antigen ohne signifikante Nebenwirkungen herbeiführen.

[0052] Versuche zur Herstellung von transgenen Pflanzen, welche bakterielle Antigene von E. coli und von Streptococcus mutans exprimieren, sind vorgenommen worden; Curtiss und Ihnen, WO 90/0248, veröffentlicht am 22. März 1990. Transgene Pflanzen, welche das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) exprimieren, sind ebenfalls erzeugt worden; H. S. Mason, D. M-K. Lam, C. J. Arntzen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 11745–749 (1992).

[0053] Allerdings haben diese Untersuchungen kein oral immunogenes Pflanzenmaterial ergeben noch haben sie demonstriert, daß es tatsächlich möglich ist, Tiere oral mit in transgenen Pflanzen erzeugten Antigenen zu impfen. Tatsächlich bedurfte es der signifikanten und unerwarteten Verbesserungen, welche hierin offenbart werden, um erfolgreich zu demonstrieren, daß es tatsächlich möglich ist, Tiere gegen Antigene wirklich durch Füttern der Tiere mit transgenen Pflanzen zu impfen, in welchen ausreichende Spiegel des Antigens exprimiert worden sind, um eine Immunität zu induzieren. Darüber hinaus waren die signifikanten und unerwarteten Ver-

besserungen der vorliegenden Erfindung ebenfalls nötig, um den Adjuvanz-Effekt bezüglich anderer Immunogene zu demonstrieren, der durch Impfen von Tieren mit transgenen Pflanzen, welche bakterielle Toxin-Antigene enthalten, hervorgerufen wird.

[0054] Die in den nachfolgenden Abschnitten beschriebene, vorliegende Erkenntnis offenbart, wie man die früheren Beschränkungen überwindet durch die signifikanten und unerwarteten Verbesserungen der Herbeiführung der Herstellung erhöhter Spiegel des antigenen Proteins und durch Kompartimentierung eines oral aktiven LT-B-Proteins, welches hoch immunogen ist, in mikrosomalen Vesikeln von transgenen Pflanzen, und durch die erhöhte Expression derartiger transgener bakterieller Antigene in Pflanzen durch i) Änderungen in den Pflanzenpromotoren zur Erhöhung des Expressionsspiegels von transgenen Proteinen in Pflanzen, ii) Änderung der 3'-Botschaften und Polyadenylierungssignale zur Erhöhung der Produktion von transgenen Proteinen in Pflanzen, und iii) Produktion synthetischer Gene, codierend bakterielle Antigene, wobei die Codon-Verwendung geändert worden ist, um die Verwendung durch Pflanzen zu erhöhen, wodurch der Spiegel an in Pflanzen produzierten transgenen Proteinen erhöht wird. Ferner offenbart die vorliegende Erkenntnis, daß die kompartimentierte Fremdprotein-Expression in eßbaren transgenen Pflanzengeweben die Expression und Zuführung von zusätzlichen, gewünschten Antigenen von Nutzen als orale Impfstoffe erlaubt, da das Mikrosomen-eingekapselte LT-B als ein orales Adjuvanz dient.

Zusammenfassung der Erfindung

[0055] Gemäß der Erfindung wird ein transgenes Pflanzenmaterial vorgesehen, welches entweder eine DNA-Sequenz, die mindestens ein immunogenes Mittel codiert, umfasst oder exprimiert,
wobei die DNA-Sequenz ferner eine endoplasmatisches Reticulum(ER)-Retentionssequenz, die mit der das immunogene Mittel codierenden DNA-Sequenz fusioniert ist, umfasst, und
wobei das Material in der Lage ist, eine Immunantwort auf das exprimierte immunogene Mittel in Tieren zu induzieren, die ausreicht, um die Tiere gegen das Mittel zu immunisieren, wenn dem Tier das transgene Pflanzenmaterial durch orale Einnahme verabreicht wird.

[0056] Die Erfindung sieht des weiteren folgendes vor:

– Verwendung von transgenem Pflanzenmaterial der Erfindung bei der Herstellung eines Medikamentes zur Impfung eines Tieres durch orale Verabreichung des Materials.

– Verfahren zur Herstellung von transgenem Pflanzenmaterial der Erfindung, umfassend:

Konstruieren mindestens eines Vektors mit einer DNA-Sequenz, welche mindestens ein immunogenes Mittel codiert, wobei die DNA-Sequenz ferner eine endoplasmatisches Reticulum(ER)-Retentionssequenz, fusioniert mit der das immunogene Mittel codierenden DNA-Sequenz, umfasst;
Transformieren von Pflanzenmaterial zur Erzeugung von transgenem Pflanzenmaterial mit dem Vektor; und
Exprimieren des immunogenen Mittels aus dem Vektor innerhalb des transgenen Pflanzenmaterials, wobei der Grad der Expression des immunogenen Mittels ausreichend ist, um eine Immunantwort in dem Tier zu induzieren, die ausreicht, um das Tier gegen das immunogene Mittel zu immunisieren, wenn das Pflanzenmaterial dem Tier durch orale Einnahme verabreicht wird.

[0057] Um ein klares und konsistentes Verständnis der vorliegenden Erfindung vorzusehen, wird die folgende Liste von Begriffen und ihren Definitionen angegeben.

[0058] Ein Tier ist jegliches Wirbeltier oder jeglicher Wirbellose, einschließlich, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Menschen, Vögel und Fische.

[0059] Ein Antigen ist ein Makromolekül, welches fähig zur Stimulierung der Produktion von Antikörpern nach Einbringung in einen Säuger oder ein anderes Tier, einschließlich Menschen, ist. Wie in dieser Anwendung verwendet, bedeutet Antigen ein Antigen per se, eine antigene Determinante des Antigens oder ein Fusionsprotein, enthaltend das Antigen oder die antigene Determinante, manchmal bezeichnet als ein natives Epitop.

[0060] Eine antigene Determinante ist ein kleiner chemischer Komplex, der sie Spezifität einer Antigen-Antikörper-Reaktion bestimmt. Kolonisations- und/oder Virulenz-Antigene eines Pathogens enthalten eine oder mehrere antigene Determinanten.

[0061] Eine Aminosäuredomäne ist eine Aminosäuresequenz innerhalb eines Proteins, welche mit einer besonderen Funktion oder Sequenzhomologie assoziiert sein kann.

[0062] Ein Kolonisations- oder Virulenzantigen ist ein Antigen auf der Oberfläche eines pathogenen Mikroorganismus, welches mit dem Vermögen des Mikroorganismus, seinen Wirt zu kolonisieren oder in selbigen einzudringen, assoziiert ist. Die Diskussion und die Patentansprüche können sich auf Kolonisations- oder Virulenzantigene oder antigene Determinanten davon beziehen. Ein Pathogen kann Antigene für entweder Kolonisation oder Virulenz oder beides enthalten, und eine oder mehrere DNA-Sequenzen für jedes oder beide können in einen Vektor transferiert und verwendet werden, um eine Pflanze so zu transformieren, daß sie das Antigen oder die Antigene exprimiert.

[0063] Ein immunogenes Mittel ist jedwedes Antigen, welches fähig ist, eine Immunantwort in Tieren zu verursachen, wie nach oraler Einnahme von Pflanzen, welche Vektoren tragen, die das Antigen exprimieren.

[0064] Ein(e) chimäre(s) Sequenz oder Gen ist eine DNA-Sequenz, enthaltend mindestens zwei heterologe Teile, d. h. Teile, welche aus vorher-existierenden DNA-Sequenzen abgeleitet sind oder substantielle Sequenzhomologie zu diesen aufweisen, wobei diese in ihren vorher existierenden Zuständen nicht assoziiert sind. Die vorher existierenden DNA-Sequenzen können von natürlichem oder synthetischem Ursprung sein.

[0065] Eine codierende DNA-Sequenz ist eine DNA-Sequenz, aus welcher die Information zur Herstellung eines Peptidmoleküls, mRNA oder tRNA transkribiert wird. Eine DNA-Sequenz kann ein Gen, eine Kombination von Genen oder Genfragment sein.

[0066] Eine Fremd-DNA ist eine DNA, welche exogen ist oder nicht natürlicherweise in den zu transformierenden Mikroorganismen oder Pflanzen gefunden wird. Solche Fremd-DNA schließt virale, prokaryotische und eukaryotische DNA ein, und kann natürlich vorkommend, chemisch synthetisiert, cDNA, mutiert oder jedwede Kombination solcher DNAs sein. Die Fremd-DNA dieser Erfindung ist abgeleitet aus oder besitzt substantielle Sequenzhomologie zu DNA von pathogenen Mikroorganismen und Viren, oder ist ein synthetisches Gen, welches ein Protein codiert, das von ähnlicher Aminosäuresequenz zu prokaryotischen Genen ist.

[0067] Ein Fusionsprotein ist ein Protein, enthaltend mindestens zwei unterschiedliche Aminosäuresequenzen, verknüpft in einem Polypeptid, wobei die Sequenzen nicht natürlicherweise als ein einzelnes Protein exprimiert wurden. Fusionsproteine sind häufig das Ergebnis von gentechnischen Veränderungen, wobei DNA-Sequenzen aus verschiedenen Genen miteinander verknüpft werden, um ein einzelnes Protein zu codieren, zusammengesetzt aus Aminosäuresequenzen aus den ursprünglich separaten Genen.

[0068] Ein Gen ist eine diskrete chromosomale Region, welche für ein diskretes zelluläres Produkt codiert.

[0069] Ein LT-B enthaltendes Protein ist jedwedes Protein, welches substantiell hinsichtlich der Aminosäuresequenz homolog ist zu oder im wesentlichen funktionell ähnlich ist zu bakteriell abgeleitetem LT-B-Protein oder CT-B-Protein. LT-B enthaltende Proteine schließen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Proteine mit mindestens einer Domäne mit mindestens etwa 90% Aminosäuresequenzhomologie zu bakteriell abgeleiteten LT-B oder CT-B-Proteinen, Proteine, welche im wesentlichen funktionell ähnlich zu bakteriell abgeleiteten LT-B- oder CT-B-Proteinen bei der Bindung an GM-I-Ganglioside sind, und Proteinfusionen, in denen Domänen, welche substantiell ähnlich zu bakteriell abgeleitetem LT-B- oder CT-B sind, an andere Aminosäuresequenzen entweder am N- oder C-Terminus der anderen Aminosäuresequenzen fusioniert sind oder innerhalb der anderen Aminosäuresequenzen fusioniert sind, ein.

[0070] Ein LT-A enthaltendes Protein ist jedwedes Protein, welches hinsichtlich der Aminosäuresequenz im wesentlichen homolog oder im wesentlichen funktionell ähnlich zu dem bakteriell abgeleiteten LT-A-Protein ist. LT-A enthaltende Proteine schließen, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Proteine mit mindestens einer Domäne mit mindestens etwa 90% Aminosäuresequenzhomologie zu bakteriell abgeleitetem LT-A und Proteine, welche im wesentlichen funktionell ähnlich zu bakteriell abgeleitetem LT-A sind, ein.

[0071] Ein Mikroorganismus ist ein Mitglied einer der folgenden Klassen: Bakterien, Pilze, Protzoen oder Viren.

[0072] Ein Pflanzengewebe ist jegliches Gewebe einer Pflanze in seinem nativen Zustand oder in Kultur. Dieser Begriff schließt, ohne Einschränkung, ganze Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzenorgane, Pflanzensamen, Protoplasten, Callus, Zellkulturen und jegliche Gruppe von Pflanzenzellen, organisiert in strukturellen und/oder funktionellen Einheiten, ein. Die Verwendung dieses Begriffs im Zusammenhang mit, oder in Abwesenheit von, jedwedem spezifischen Typ von Pflanzengewebe, wie oben stehend aufgezählt oder anderweitig von dieser Definition abgedeckt, schließt beabsichtigterweise nicht irgendwelche anderen Typen von Pflanzengewebe

aus. Für Transformation gemäß der Verfahren dieser Erfindung geeignete Pflanzen schließen, ohne Einschränkung, Monocotyle, wie Mais, Weizen, Gerste, Sorghum, Roggen, Reis, Banane und Pisang, und Dicotyle, wie Kartoffel, Tomate, Alfalfa, Sojabohne, Bohnen im allgemeinen, Canola, Apfel, Birnen, Obst im allgemeinen und andere Gemüsesorten ein.

[0073] Ein Pflanzentransformationsvektor ist ein Plasmid oder viraler Vektor, der in der Lage zum Transformieren von Pflanzengewebe ist, so daß das Pflanzengewebe DNA enthält und exprimiert, welche in dem Pflanzengewebe nicht vorher existiert.

[0074] Ein Futtermittel oder eßbares Pflanzenmaterial ist jedwedes Pflanzenmaterial, welches direkt von Tieren oder Menschen als eine Nährstoffquelle oder Lebensmittel-Ergänzung eingenommen werden kann.

[0075] Eine im voraus existierende DNA-Sequenz ist eine DNA-Sequenz, welche vor ihrer Verwendung, in toto oder teilweise, in einem Produkt des Verfahrens gemäß dieser Erfindung existiert. Während eine derartige Vor-Existenz typischerweise einen natürlichen Ursprung widerspiegelt, können vorexistierende Sequenzen von synthetischem oder sonstigem Ursprung sein.

[0076] Eine Immunantwort beinhaltet die Produktion von Antikörpern, welche als Immunglobuline bezeichnete Proteine sind. Die Antikörper zirkulieren im Blutstrom und permeieren die anderen Körperflüssigkeiten, wo sie spezifisch an den Typ von Fremdantigen binden, der sie induzierte. Die Bindung durch einen Antikörper inaktiviert Viren und bakterielle Toxine (wie Tetanus- oder Botulinus-Toxin) häufig durch Blockieren ihrer Fähigkeit, an Rezeptoren auf Zielzellen zu binden. Antikörperbindung markiert des weiteren eindringende Mikroorganismen für eine Zerstörung, entweder durch Vereinfachen, daß eine phagozytische Zelle sie verzehrt, oder durch Aktivieren eines Systems von Blutproteinen, kollektiv bezeichnet als Komplement, welches die Eindringlinge tötet. Zellvermittelte Immunantworten, die zweite Klasse von Immunantworten, beinhalten die Produktion von spezialisierten Zellen, welche mit Fremdantigenen auf der Oberfläche von anderen Wirtszellen reagieren. Die reagierende Zelle kann eine Virus-infizierte Wirtszelle töten, welche virale Proteine auf ihrer Oberfläche aufweist, wodurch die infizierte Zelle eliminiert wird, bevor das Virus repliziert hat. In anderen Fällen sezerniert die reagierende Zelle chemische Signale, welche Makrophagen zur Zerstörung eindringender Mikroorganismen aktivieren.

[0077] Eine sekretorische Immunantwort (SIR) ist ein spezifischer Typ von Immunantwort. Sie beinhaltet die Bildung und Produktion von sekretorischen IgA-Antikörpern in Sekretionen, welche die Schleimhautoberflächen von Menschen und anderen Tieren überziehen, und in Sekretionen aus sekretorischen Drüsen. Ein Mittel, welches die Bildung und Herstellung solcher Antikörper verursacht, wird als die sekretorische Immunität stimulierend oder eine SIR hervorrufend betrachtet. Sekretorische Immunität wird manchmal auch als mucosale Immunität bezeichnet.

[0078] Eine substantielle Sequenzhomologie ist eine funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen Sequenzen von Nukleotiden oder Aminosäuren. Funktionelle und/oder strukturelle Unterschiede zwischen Sequenzen mit einer substantiellen Sequenzhomologie sind häufig de minimus bzw. minimal.

[0079] Eine transgene Pflanze ist eine Pflanze, welche DNA enthält und exprimiert, die in der Pflanze vor der Einbringung der DNA in die Pflanze nicht existent war.

[0080] Transgenes Pflanzenmaterial ist jedwedes Pflanzenmaterial, einschließlich, ohne Einschränkung darauf, Zellen, Protoplasten, Geweben, Blättern, Stengeln, Früchten und Knollen, sowohl natürlich als auch verarbeitet, enthaltend und exprimierend DNA, welche in der Pflanze vor der Einführung der DNA in die Pflanze nicht vorher-existent war. Ferner schließt Pflanzenmaterial verarbeitete Derivate davon ein, einschließlich, ohne darauf eingeschränkt zu sein, Lebensmittelprodukte, Lebensmittel, Lebensmittelergänzungen, Extrakte, Konzentrate, Pillen, Pastillen, Kau-Zusammensetzungen, Pulver, Formeln, Sirups, Süßigkeiten, Waffeln, Kapseln und Tabletten.

[0081] Ein eßbares Pflanzenmaterial schließt eine Pflanze und jedwedes aus einer Pflanze erhaltene Material ein, welches für den Verzehr durch Säuger oder andere Tiere, einschließlich Menschen, geeignet ist. Dieser Begriff schließt beabsichtigterweise Rohpflanzenmaterial ein, welches direkt an Tiere verfüttert werden kann, oder jedwedes verarbeitete Pflanzenmaterial, welches an Tiere, einschließlich Menschen, verfüttert wird. Aus einer Pflanze erhaltene Materialien schließen beabsichtigterweise jedwede Komponente einer Pflanze ein, welche letztendlich von einem Menschen oder einem anderen Tier verzehrt wird.

[0082] Eine Sequenz für die Retention im endoplasmatischen Reticulum (ER) ist jegliche DNA-Sequenz, welche für eine Aminosäuresequenz codiert, die bekanntermaßen in der Zurückhaltung eines gegebenen Proteins am oder assoziiert mit dem endoplasmatischen Reticulum führt, wie DNA-Sequenzen, welche für die Aminosäuren KDEL, HDEL, SEKDEL und SEHDEL codieren.

[0083] Eine ER-Signalsequenz ist jedwede DNA-Sequenz, welche für eine Aminosäuresequenz codiert, die bekanntermaßen zur Erkennung eines gegebenen Proteins durch das Signalerkennungsteilchen bzw. "signal recognition particle" auf dem endoplasmatischen Reticulum führt, was zur Lokalisierung des Proteins innerhalb des ER führt. Beispiele für Signalsequenzen in Pflanzenzellen, welche neu synthetisierte Proteine in das endoplasmatische Reticulum lenken, schließen Gerste-Lectin (Dombrowski JE, Schroeder MR, Bednarek SY, Raikhel NV, 1993, Plant Cell 5: 587–596), Gerste-Aleurain (Holwerda BC, Padgett HS, Rogers JC, 1992, Plant Cell 4: 307–318), Süßkartoffel-Sporamin (Matsuoka K, Nakamura K, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 834–838), Patatin (Sonnewald U, Braur M, von Schaewen A, Stitt M, Willmitzer L, 1991, Plant J. 1: 95–106), vegetative Sojabohnenspeicherproteine (Mason HS, Guerrero F, Boyer J, Mullet J, 1988, Plant Mol. Biol. 11: 845–856), und β-Fructosidase (Faye L, Chrispeels MJ, 1989, Plant Physiol. 89: 845–851) ein.

[0084] Ein LT-Holotoxin ist ein Proteinkomplex, hergestellt von enterotoxischen E. coli oder von transgenen Organismen, enthaltend das Gen für LT-A und LT-B, wie das Enterotoxin selbst oder Proteine, welche Austausch-Codons enthalten, um die Pflanzentranskription durch Ersetzen der bakteriell bevorzugten Aminosäure-Codons durch in Pflanzen bevorzugte Aminosäure-Codons zu erleichtern.

[0085] Ein CT-Holotoxin ist ein Proteinkomplex, hergestellt von V. cholerae oder von transgenen Organismen, enthaltend das Gen für CT-A und CT-B, wie das Choleratoxin selbst oder Proteine, welche Austausch-Codons enthalten, um die Pflanzentranskription zu erleichtern durch die Ersetzung von bakteriellen A- und T-reichen bevorzugten Aminosäure-Codons durch in Pflanzen bevorzugte Aminosäure-Codons.

[0086] Ein LT-Fusionsprotein ist ein Protein, worin Abschnitte entweder der LT-A-Untereinheit oder der LT-B-Untereinheit oder beider Untereinheiten des LT-Toxins modifiziert worden sind, um codierende Regionen für Aminosäuresequenzen, abgeleitet aus anderen antigenen Proteinen oder synthetischen Proteinen oder anderen synthetischen Proteinen, einzuschließen, entworfen, um die immunogene Antwort von anderen antigenen Proteinen oder Mitteln nachzuahmen. Ein CT-Fusionsprotein ist analog definiert, außer daß die Fusionen an entweder einer oder beiden der CT-Untereinheiten stattfinden. Bevorzugte Fusionsproteine sind diejenigen Fusionen an die LT-B- oder CT-B-Untereinheit, welche die LT-B- oder CT-B-Untereinheit-Oligomerisierung zu Pentameren nicht stören, und/oder LT-A- oder CT-A-Fusionen, welche denjenigen Abschnitt des LT-A- oder CT-A-Proteins beibehalten, welcher mit der pentameren B-Untereinheit assoziiert, um das intakte Holotoxin in der unmodifizierten Form zu bilden.

[0087] Die vorliegende Erfindung sieht einen eßbaren Impfstoff vor, umfassend eine transgene Pflanze, umfassend oder exprimierend mindestens eine DNA-Sequenz, codierend ein LT-B oder CT-B enthaltendes Protein, wobei der Impfstoff entworfen ist, um Immunantworten in Tieren einschließlich Menschen hervorzurufen. Diese Erfindung sieht des weiteren transgene Pflanzen vor, umfassend oder exprimierend mindestens eine DNA-Sequenz, codierend ein LT-B oder ein CT-B enthaltendes Protein, welches zur Herstellung von Impfstoffen mit verstärkten Immunantworten in Tieren verwendet werden kann. Die transgenen Pflanzen dieser Erfindung sind speziell als Impfstoffe oder Impfstoff-Adjuvantien für die orale Verabreichung und Stimulation von Immunantworten im GALT von Tieren, einschließlich Menschen, entworfen.

[0088] Die vorliegende Erfindung sieht desweiteren eine transgene Pflanze vor, fähig zur Verstärkung der Immunantworten gegen Antigene, wobei die transgene Pflanze eine DNA-Sequenz umfaßt oder exprimiert, codierend ein LT-B oder ein CT-B enthaltendes Protein. Die transgenen Pflanzen können auch genetische Elemente einschließen, codierend für andere gewünschte Antigene, fähig zur Hervorrufung einer sekretorischen Immunantwort in Tieren. Solche anderen Antigene können, bei Präsentation mit transgenen Pflanzen mit Adjuvans-artigen Bakterientoxin-Antigenen, hinsichtlich ihrer Immunogenität durch den Adjuvanzeffekt der von den Pflanzen hergestellten transgenen Bakterientoxin-Antigene weiter gesteigert werden.

[0089] Die vorliegende Erfindung sieht auch Verfahren zur Verabreichung der Impfstoffe dieser Erfindung, Verfahren zur Herstellung der Impfstoffe der vorliegenden Erfindung und Verfahren zur Herstellung der transgenen Pflanzen dieser Erfindung vor. Dies schließt die bedeutenden und unerwarteten Verbesserungen durch die Veranlassung der Herstellung erhöhter Spiegel des antigenen Proteins und durch die Kompartimentierung eines oral aktiven LT-B-Proteins, welches hoch immunogen ist, in mikrosomalen Vesikeln der transgenen Pflanzen und durch die erhöhte Expression derartiger transgener Bakterienantigene in Pflanzen durch i) Än-

derungen in den Pflanzenpromotoren zur Erhöhung des Spiegels der Expression von transgenen Proteinen in Pflanzen, ii) Änderung der 3'-Botschaften und Polyadenylierungssignale zur Erhöhung der Produktion von transgenen Proteinen in Pflanzen, und iii) Herstellung von synthetischen Genen, codierend für Bakterienantigene, wobei die Codon-Verwendung geändert worden ist, um die Verwendung bei Pflanzen zu steigern, wodurch der in Pflanzen hergestellte Spiegel an transgenen Proteinen erhöht wird, ein. Ferner schließt dies die vorliegende und unerwartete Feststellung ein, daß die kompartimentierte Fremdproteinexpression in eßbaren transgenen Pflanzengeweben die Expression und Zuführung zusätzlicher gewünschter Antigene von Nutzen als orale Impfstoffe erlaubt, weil das Mikrosomen-eingekapselte LT-B als ein orales Adjuvans dient.

[0090] Das Verfahren zur Herstellung der transgenen Pflanzen dieser Erfindung schließt das Transformieren einer Zielpflanze mit einem Pflanzentransformationsvektor, enthaltend mindestens eine DNA-Sequenz, welche für ein LT-B oder ein CT-B enthaltendes Protein codiert, ein. Die DNA-Sequenz kann auch DNA-Elemente, codierend für ein oder mehrere Kolonisierungs-Antigene, Virulenz-Antigene oder eine antigene Determinante von Virulenz- oder Kolonisations-Antigenen von pathogenen Mikroorganismen, enthalten.

[0091] Diese Erfindung sieht ferner Pflanzentransformationsvektoren vor, fähig zur stabilen Einbringung von mindestens einem LT-B oder CT-B enthaltenden Proteingen und von Promotorregionen in Zielpflanzen. Die Transformationsvektoren werden hergestellt durch Inserieren einer für ein LT-B oder CT-B enthaltendes Protein codierenden DNA-Sequenz und wahlfrei einer oder mehrerer DNA-Sequenzen, codierend für andere Antigene, wobei das LT-B- oder CT-B-Gen als ein orales Adjuvanz wirkt und entworfen ist, um die Immunantworten gegen das wahlfrei exprimierte Antigen zu erhöhen. Die DNA-Sequenzen können natürlich oder synthetisch sein und können ganze Gene oder Fragmente von Genen, welche für Antigene codieren, umfassen. Darüber hinaus können die DNA-Sequenzen funktionelle Pflanzen-Promotoren und genetische Markierer, entworfen zur Erleichterung der Identifizierung und Selektion der transformierten Pflanzenzellen, sowie Sequenzen für eine gewählte Kompartimentierung in gewünschten Pflanzengeweben oder Zellenbestandteilen enthalten.

[0092] Die vorliegende Erfindung sieht ebenfalls transgene Pflanzen vor, verwendbar als orale Impfstoffe oder orale Impfstoffadjuvantien, wobei die Pflanzen eine DNA-Sequenz umfassen oder exprimieren, codierend ein LT-B oder CT-B enthaltendes Protein, Sequenzen, codierend Proteine, enthaltend Komponenten von LT-A oder CT-A, oder Proteinkomponenten von LT-A oder CT-A, und Sequenzen, codierend zelluläre Signal- und Retentions-Polypeptide oder -Proteine, wobei die LT-B-, CT-B-, LT-A- und/oder CT-A-Proteine Fusionen von anderen antigenen Mitteln einschließen können. Weiterhin kann die DNA-Sequenz codierende Elemente für die koordinative Expression von anderen Nicht-LT- oder Nicht-CT-Antigenen einschließen. Ferner sieht die vorliegende Erfindung auch die Coexpression und/oder gemeinsame Bereitstellung von anderen Antigenen, wie viralen Antigenen, neben dem LT-B-Antigen vor, so daß die zusätzlichen Antigene von dem Adjuvanzeffekt des transgenischen LT-B profitieren können. Darüber hinaus sieht die vorliegende Erfindung die Coexpression sowohl der LT-A- als auch LT-B-Untereinheiten vor, so daß das Holotoxin im Pflanzengewebe zusammengebaut werden kann, um sowohl als ein Immunogen als auch ein Adjuvanz zu wirken.

[0093] Die vorliegende Erfindung sieht ebenfalls eine Lebensmittelzusammensetzung vor, nützlich zur Hervorrufung von Immunantworten, umfassend eine transgene Pflanze oder ein aus der Pflanze abgeleitetes Material. Die Nahrungsmittelzusammensetzung kann die transgene Pflanze selbst, verarbeitete Nahrungsprodukte der Pflanze, Nährstoffe, Vitamine, Färbemittel und/oder Geschmacksmittel einschließen.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0094] Die Fig. 1A, Fig. 1B und Fig. 1C zeigen die Struktur der Vektoren pLTBI40, pLTKI10 bzw. pLTB110;

[0095] Die **Fig.** 2 zeigt ELISA-Spiegel von rekombinanten LT-B- und LT-B-SEKDEL-Proteinen in löslichen Extrakten aus transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen, transformiert mit den Vektoren pLTB110 und pLTK110;

[0096] Die Fig. 3 zeigt radioaktiv markierte Immunpräzipitate von LT-B und LT-B-SEKDEL (in der Figur markiert als LT-B-KDEL) aus Blattextrakten aus transgenem Tabak, transformiert mit den Vektoren pLTB110 und pLTK110;

[0097] Die Fig. 4 zeigt ein Größenausschluß-Chromatogramm der LT-B-SEKDEL-Proteine für transgene Tabakblätter;

[0098] Die **Fig.** 5 zeigt die Immunogenität von transgenen Tabak-Blattextrakten (in der Figur markiert als LT-B-KDEL) bei oraler Fütterung an Balb/c-Mäuse;

[0099] Die Fig. 6 zeigt die Immunantwort in Mäusen, welche mit Kartoffelknollen gefüttert wurden, die LT-B-SEKDEL exprimieren (in der Figur gekennzeichnet mit 110-1, 110-3, 110-4 und 110-7);

[0100] Die Fig. 7 zeigt nicht-codierende regulatorische Elemente von Vektoren, welche verwendet werden können, um Pflanzen zu transformieren und zur Herstellung des LT-B-Proteins in den resultierenden Pflanzen führen;

[0101] Die Fig. 8 zeigt Kartoffel-Mikroknollen von transformierten Kartoffelpflanzen;

[0102] Die Fig. 9 zeigt Kartoffelknollen, erhalten aus selektierten Transformanten, welche die Vektoren pLTB110 und pLTK110 tragen;

[0103] Die Fig. 10 zeigt die Detektion von mRNA, codierend LT-A und LT-B, in Transformanten, welche pLT100 und pLT101 tragen;

[0104] Die Fig. 11 zeigt die die Struktur von pLTB120, LT102, LT103, LT104, LT105 und LTK140;

[0105] Die Fig. 12 zeigt die synthetischen Oligonukleotid-Segmente, A1–A4, verwendet zum Erzeugen des synthetischen LT-B-Gens;

[0106] Die Fig. 13 zeigt das Verfahren zur Erzeugung des A-Satzes von Fragmenten, verwendet zur Erzeugung des synthetischen LT-B-Gens;

[0107] Die Fig. 14 zeigt die synthetischen Oligonukleotidsegmente, B1–B4, verwendet zur Erzeugung des synthetischen LT-B-Gens;

[0108] Die Fig. 15 zeigt das Verfahren zur Erzeugung des B-Satzes von Fragmenten, verwendet zum Erzeugen des synthetischen LT-B-Gens;

[0109] Die Fig. 16 zeigt das Verfahren zur Erzeugung des synthetischen LT-B-Gens, einschließlich der Ligation der Fragmentsätze A und B; und

[0110] Die Fig. 17 zeigt LT-B codierende mRNA in Tabakblättern (LTB120 und LTB112) und Mikroknollen (LT100 und LT101).

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0111] Die Durchführbarkeit der Bereitstellung von Impfstoffen auf dem oralen Weg ist für die Prävention von durch Bakterien verursachte Diarrhoe beschrieben worden; M. Lebens, S. Johansson, J. Osek, M. Lindbald, J. Holingren, Bio/Technology, 11: 1574–578 (1993). Die Stimulation des GALT mit einem Antigen kann zur Entwicklung von schützenden Antikörperantworten im Darm und an anderen Schleimhautstellen führen.

[0112] Im Vergleich zu parenteralen Impfungen ist eine orale Impfung mit nicht-lebenden Antigenen häufig unwirksam zur Stimulierung einer Immunantwort und erfordert üblicherweise große Menge von Antigen (mg gegenüber µg bei parenteral), um eine Immunantwort zu erzeugen. Somit werden derzeitig in Auswertung befindliche orale Untereinheit-Impfstofikandiaten Fermenter im großen Maßstab und stringente Aufreinigungsprotokolle erfordern, um ausreichende Mengen an rekombinanten Protein für eine orale Zuführung zu erhalten. Diese Faktoren werden eine wichtige Erwägung bei den Herstellungskosten darstellen.

[0113] Das B-Untereinheit-Pentamer von Choleratoxin (CT-B) ist fähig zur Bindung an das GM-1-Gangliosid des Darmepithels und zur Verursachung einer Translokation über die Epithelmembran hinweg auf die gleiche Weise wie das hitzelabile Enterotoxin (LT-B) von E. coli. Somit wird es erwartet, daß entweder das CT-B- oder LT-B-Toxin bei oraler Verabreichung mit einem Antigen auch als ein Adjuvans dienen werden, um die schutzgebende Immunantwort durch Wirken als ein "Pilot"- oder "Auslöser"-Protein bei der Herbeiführung einer örtlichen Immunantwort zu verstärken.

[0114] Die vorliegende Erfindung richtet sich auf die Vervollkommnung und Ermöglichung von oralen Impfstoffen unter Verwendung transgener Pflanzen. Im Unterschied zum Stand der Technik präsentiert die vorliegende Erfindung die unerwarteten Verbesserungen, welche sowohl neuartig als auch notwendig sind, um über transgene Pflanzen zu impfen. Im Unterschied zum Stand der Technik haben die Erfinder hierin zum ersten

Mal aufgezeigt, daß transgene Pflanzen, welche orale Kandidaten-Impfstoff-Antigene in ihrem eßbaren Gewebe exprimieren, an Tiere verfüttert werden können, wodurch die Herstellung von Antigenen verursacht wird, welche eine spezifische humorale und mucosale Immunantwort zeigen. Ferner haben die Erfinder sich erstmalig dem Gesichtspunkt der Verwendung von transgenen bakteriellen Antigenen nicht nur als Immunogene an sich sondern auch als Adjuvanzien für zusätzlich Immunogene zugewandt. Die Erfinder nehmen an, daß transgene Pflanzen, welche antigene Proteine exprimieren, ein kostengünstiges Herstellungs- und Zuführungssystem für solche Antigene an Tiere darstellen werden.

[0115] Die vorliegende Erfindung demonstriert und überprüft dieses Konzept in kritischer Weise durch Exprimieren eines für ein bakterielles Antigen codierenden Gens in transgenen Pflanzen. Enterotoxigener Escherichia coli (ETEC) ist ein durchaus anerkanntes ätiologisches Agens von akutem wäßrigem Durchfall, der Menschen jeden Alters betrifft. Die Pathogenität von ETEC erfolgt durch die Kolonisierung des Dünndarms und die Synthese von einem oder mehreren Enterotoxinen, von denen eines das hitzelabile Enterotoxin (LT) ist. Das LT-Hototoxin besteht aus einem Pentamer von bindenden (LT-B) Untereinheiten und einer enzymatisch aktiven (LT-A) Untereinheit.

[0116] Die Erfinder haben erfolgreich gezeigt, daß DNA, codierend LT-B mit einer C-terminalen endoplasmatisches Reticulum (ER)-Retentionssequenz SEKDEL, die Menge von LT-B und LT-B-Pentamer in den transformierten Pflanzenzellen wesentlich erhöht. Ferner haben die Erfinder die unerwartete Verbesserung aufgezeigt, daß die Expression von transgenischen bakteriellen Antigenen in Pflanzen auf ausreichende Spiegel erhöht werden kann, damit diese sowohl als Immunogene und Adjuvantien wirken, durch i) Änderungen in Pflanzenpromotoren zur Erhöhung des Expressionsspiegels von transgenen Proteinen in Pflanzen, ii) Änderung von 3'-Botschaften und Polyadenylierungssignalen zur Erhöhung der Produktion von transgenen Proteinen in Pflanzen und iii) Produktion von synthetischen Genen, codierend bakterielle Antigene, wobei die Codonverwendung geändert worden ist, um die Verwendung durch Pflanzen zu erhöhen, wodurch der Spiegel an transgenen Proteinen, welche in Pflanzen hergestellt werden, erhöht wird. Die Erfinder glauben, daß die erhöhten Spiegel an LT-B-Pentamer in den mikrosomalen Vesikeln von transgenen Zellen an sich ein bevorzugtes Verfahren zur Induzierung einer sekretorischen Immunantwort in Tieren ausmachen, welche mit solchen transgenen Pflanzenzellen gefüttert werden. In analoger Weise können Pflanzen mit DNA transformiert werden, codierend die Choleratoxin-B-Untereinheit (CT-B) als ein chimäres Gen, welches die SEKDEL codierende Sequenz einschließt.

[0117] Die Erfinder haben festgestellt, daß zur Hervorrufung von sekretorischen Immunantworten in Tieren befähigte Impfstoffe aus transgenen Pflanzen hergestellt werden können, umfassend und exprimierend wenigstens eine DNA-Sequenz, codierend ein LT-B enthaltendes Protein, wobei das LT-B-enthaltende Protein in ausreichenden Mengen exprimiert wird, um eine Pentamerbildung in der Zelle zu induzieren. Eine verdaubare Zusammensetzung, abgeleitet aus transgenen Pflanzen, exprimierend ein LT-B-enthaltendes Protein, verursacht bei Einnahme durch Mäuse eine Immunantwort, welche diese veranlaßt, Immunglobulin herzustellen, welches das LT neutralisiert.

[0118] In einer bevorzugten Ausführungsform und einer unerwarteten Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik haben die Erfinder festgestellt, daß das Einschließen eines DNA-Segments, welches für zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus der LT-B-Sequenz codiert, welche eine endoplasmatisches Reticulum (ER)-Retentionssequenz codieren, zu transgenen Pflanzen führt, welche erhöhte Konzentrationen des LT-B enthaltenden Proteins innerhalb der Zelle in Pentamer-Form in Vesikeln zurückhalten, die zum ER recycliert werden. Die bevorzugten ER-Retentions-Sequenzen schließen DNA ein, codierend für KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) (SEQ ID Nr.: 1); HDEL (His-Asp-Glu-Leu) (SEQ ID Nr.: 2), SEKDEL (Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu) (SEQ ID Nr.: 3) und SEHDEL (Ser-Glu-His-Asp-Glu-Leu) (SEQ ID Nr.: 4), wobei SEKDEL und SEHDEL besonders bevorzugt werden. Die Erfinder erwarten vollkommen das gleiche Verhalten in transgenen Pflanzen, welche mit CT-B-Genen transformiert sind, und faktisch mit jeglichen Genen, welche dieselben C-Terminus-Modifikationen aufweisen.

[0119] Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzen, welche durch die stabile oder vorübergehende Einbringung von DNA hergestellt werden können, codierend ein LT-B oder CT-B enthaltendes Protein, wobei das Protein eine LT-B- oder CT-B-Sequenz, eine N-terminale ER-Signalsequenz und eine C-terminale ER-Retentionssequenz enthält. Diese Transformanten zeigen eine verstärkte Produktion des LT-B- oder CT-B-Proteins mit einer einhergehenden Retention der Proteine in Vesikeln in der Zelle. Die Erfinder haben ebenfalls festgestellt, daß die bevorzugten Transformanten diejenigen sind, welche LT-B-Pentamere aufweisen, die in den zellulären mikrosomalen Membranen in einem "Rettungs-Kompartiment" zurückgehalten werden. Die Erfinder erwarten in vollem Ausmaß, daß die CT-B-transformierten Pflanzengewebe auch

CT-B-Pentamere in den Zellen aufzeigen werden.

[0120] Es wird angenommen, daß die Zurückhaltung der Proteine durch Recycling über das Rettungskompartiment und das ER ein Faktor beim Erfolg dieser neuen transgenen Pflanzen in eßbaren Impfstoffen zur Induzierung sekretorischer Immunantworten in Tieren, einschließlich Menschen, ausmacht.

[0121] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung kann das LT-Holotoxin in transformierten Pflanzen durch stabile oder vorübergehende Einbringung von DNA hergestellt werden, welche für ein LT-B oder CT-B enthaltendes Protein und ein LT-A oder CT-A enthaltendes Protein codiert. Wiederum sind die bevorzugten LT-B oder CT-B enthaltenden Proteine diejenigen, welche C-Terminus-Modifikationen aufweisen, um eine ER-Retentionssequenz einzuschließen, wobei LT-B oder CT-B enthaltende Proteine, die N-terminale ER-Signalsequenzen und C-terminale ER-Retentionssequenzen aufweisen, besonders bevorzugt werden. Es wird angenommen, daß das Vorhandensein und die Retention von Holotoxin in den Pflanzenzellen unter manchen Umständen sogar als noch besseres Adjuvans für eine erhöhte sekretorische Immunantwort wirken kann.

[0122] Darüber hinaus können Fusionsproteine sowohl des LT-B als auch CT-B enthaltenden Proteins sowie des LT-A enthaltenden Proteins stabil oder vorübergehend in Pflanzenzellen auf eine solche Weise eingebracht werden, daß die Fusions-modifizierten LT-B- oder CT-B-Pentamere und/oder LT- oder CT-Holotoxine gebildet und in den Zellen in ER-Recycling-Vesikeln oder ER-Rettungsvesikeln zurückgehalten werden. Man nimmt an, daß sich diese Vesikel auf der ER-Oberfläche bilden oder dort abknospen, die Vesikel jedoch, anstelle zur Zellmaschinerie zu wandern, welche die Vesikel zu anderen Teilen der Zelle lenkt, zurück zum ER recyclieren. Daher kann das Fusionieren eines Gens für ein gegebenes Kolonisations- und/oder Virulenz-Antigen an eine N-terminale oder C-terminale Sequenz, codierend die LT-Enterotoxin-Untereinheiten oder die CT-Toxin-Untereinheiten, verwendet werden, um Immunantworten gegen andere Antigene, wie virale Antigene, wie das Norwalk-Virus-Caspidprotein, oder Antigene des NewCastle-Krankheit-Virus, zu verstärken. Selbstverständlich müssen die Fusionen von einer solchen Beschaffenheit sein, daß die Fähigkeit der B-Einheit von LT oder CT, Pentamere zu bilden, nicht zerstört wird, noch deren Fähigkeit zur Bindung an GM-1-Ganglioside inhibiert oder verhindert wird. Für LT oder CT codierende Raster, welche LT-A- oder CT-A-Elemente besitzen, müssen weiterhin die A- oder B-Untereinheit-Fusionen so entworfen werden, daß die A-Untereinheit noch mit der B-Untereinheit assoziieren kann, wobei vorzugsweise der A1-Teil der A-Untereinheit bewahrt wird, um die C-Terminus-Assoziation der A-Untereinheit mit dem B-Untereinheit-Pentamer zur Bildung von fusioniertem LT- oder CT-Holotoxin zu erleichtern.

[0123] Neben dem LT-Enterotoxin, dem Choleratoxin können in der vorliegenden Erfindung auch die PapG-Proteinadhäsion, welche spezifisch an alpha-D-Galactopyranosyl-(1,4)-beta-D-galactopyranosid bindet, oder die Invasionen, welche ein Eindringen von Bakterien durch Epithelzellmembranen verursachen, wie identifiziert in einem Klon von Yersinia pseudotuberculosis, Shigella und Salmonella, angewandt werden. Die Erfinder nehmen an, daß der Einschluß von DNA-Sequenzen codierend entweder LT-B, CT-B, LT-B und LT-A, oder CT-B und CT-A, den Transport der Genfusion von anderen Impfstoffantigenen in Zellen der Darmschleimhaut erleichtern wird und zu erhöhten mucosalen und humoralen Immunantworten gegenüber den anderen Antigenen führen wird. Daher sollten die LT-B- oder CT-B-Pentamere oder Holotoxin-Komponenten der Fusionsproteine als Adjuvantien wirken, um die Immunantwort gegen die fusionierten Antigene zu verstärken, speziell wenn die fusionierten LT-B- oder CT-B-Pentamere oder LT- oder CT-Holotoxin im Rettungskompartiment der transformierten Pflanzen zurückgehalten werden.

[0124] Diese Erfindung schließt Pflanzen, Samen und Pflanzengewebe, fähig zum Exprimieren mindestens einer DNA-Sequenz, codierend ein LT-B oder CT-B enthaltendes Protein und wahlfrei ein anderes Antigen, einschließlich Kolonisations- und/oder Virulenzantigenen, und/oder antigenen Determinanten davon und/oder Fusionsproteinen der Antigene oder Determinanten von Pathogenen, für die Stimulation einer sekretorischen Immunantwort in einem Säuger nützliche Zusammensetzungen, Verfahren zur Stimulierung einer sekretorischen Immunantwort in Säugern, so daß eine Kolonisierung und/oder Invasion durch Schleimhautoberflächen durch Pathogene inhibiert wird, einzigartige Vektoren mit DNA-Sequenzen, codierend für Kolonisierungs- oder Virulenz-Antigene, und ein Verfahren zur Herstellung von Kolonisierungs- oder Virulenz-Antigenen von pathogenen Mikroorganismen in Pflanzen ein. Wiederum schließt die LT-B oder CT-B codierende Sequenz vorzugsweise einen C-terminale ER-Retentionssequenz und/oder eine N-terminale ER-Signalsequenz ein.

[0125] Die Antigene von pathogenen Mikroorganismen, welche zum Fusionieren mit entweder den LT-B- oder LT-A-Untereinheiten des LT-Enterotoxins oder den CT-B- oder CT-A-Untereinheiten des CT-Toxins geeignet sind und in transgenen Pflanzen der vorliegenden Erfindung exprimiert werden, schließen, ohne Einschränkung darauf, Kolonisations-Antigene, Virulenz-Antigene, antigene Determinaten von Virulenz-Antigenen oder

einem Kolonisations-Antigen oder ein Fusionsprotein, enthaltend entweder das Antigen oder dessen Determinante, ein.

[0126] Weiterhin richtet sich die vorliegende Erfindung auf die Coexpression von Antigenen von pathogenen Mikroorganismen mit mindestens einer DNA, codierend LT-B oder CT-B, die eine C-terminale ER-Retentionssequenz enthält. Geeignete antigene Determinanten für die Coexpression in den transgenen Pflanzen der vorliegenden Erfindung schließen, ohne Einschränkung darauf, Kolonisierungs-Antigene, Virulenz-Antigene, antigene Determinanten von Virulenz-Antigenen oder Kolonisierungs-Antigenen oder ein Fusionsprotein, enthaltend entweder das Antigen oder dessen Determinante, ein.

[0127] Darüber hinaus richtet sich diese Erfindung ebenfalls auf die Transformation von Pflanzen oder Pflanzengeweben mit synthetischen DNA-Sequenzen, codierend LT-B und/oder LT-A und/oder CT-B und/oder CT-A, wobei die bakteriell bevorzugten Aminosäurecodons systematisch durch von Pflanzen bevorzugte Aminosäurecodons ersetzt worden sind. Diese Ersetzung oder Substitution der von Pflanzen bevorzugten Codons für die entsprechenden von Bakterien bevorzugten Codons wird die in transgenen Pflanzen erfolgende Expression der Proteine LT-B und/oder LT-A und/oder CT-B und/oder CT-A weiter verstärken und/oder die Expression des Proteins in einem besonderen Teil der Pflanze erleichtern.

[0128] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein immunogenes System, umfassend ein genetisch transformiertes Pflanzengewebe und ein antigenes Mittel, wobei das Gewebe eine DNA-Sequenz umfaßt oder exprimiert, codierend ein oder mehrere immunogene Mittel, wobei das Gewebe zur Induzierung einer Immunantwort gegen die exprimierten immunogenen Mittel in Tieren in der Lage ist, welche ausreicht, um die Tiere gegen die Mittel zu immunisieren, wenn das Pflanzenmaterial dem Tier durch orale Einnahme verabreicht wird.

[0129] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Lebensmittel, umfassend mindestens einen Teil bzw. eine Portion eines transgenen Pflanzenmaterials, umfassend oder exprimierend eine DNA-Sequenz, codierend ein oder mehrere immunogene Mittel, wobei das Material fähig zur Induzierung einer Immunantwort gegen die exprimierten immunogenen Mittel in Tieren ist, die ausreicht, um die Tiere gegen die Mittel zu immunisieren, wenn das Pflanzenmaterial dem Tier durch orale Einnahme verabreicht wird.

[0130] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls einen Plasmidvektor zur Herbeiführung der genetischen Transformation von Pflanzenzellen, um eine Pflanze zu erhalten, umfassend oder exprimierend Sequenzen, welche für eine mehrere immunogene Mittel codieren, wobei die Mittel fähig zum Induzieren einer Immunantwort in Tieren sind, die ausreicht, um die Tiere gegen die Mittel zu immunisieren, wenn das Pflanzenmaterial, welches den Vektor trägt, dem Tier durch orale Einnahme verabreicht wird.

[0131] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein DNA-Fragment, welches nützlich für die Mikroteilchen-Bombardierungs-Transformation von Pflanzenzellen ist, um eine Pflanze zu erhalten, umfassend oder exprimierend eine DNA-Sequenz, codierend ein oder mehrere immunogene Mittel, wobei die Mittel fähig zum Induzieren einer Immunantwort gegen die exprimierten immunogenen Mittel in Tieren sind, die ausreicht, um die Tiere gegen die Mittel zu immunisieren, wenn dem Tier das Pflanzenmaterial, welches das Fragment trägt, durch orale Einnahme verabreicht wird.

[0132] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein immunologische Protokoll, umfassen das Verabreichen einer ausreichenden oralen Dosis eines immunogenen Systems, umfassend eine transgene Pflanze, exprimierend eine DNA-Sequenz, welche ein oder mehrere immunogene Mittel codiert, wobei das System fähig zum Induzieren einer Immunantwort gegen die exprimierten immunogenen Mittel in dem Tier ist, die ausreicht, um die Tiere gegen die Mittel zu immunisieren.

[0133] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffs oder Impfstoffadjuvans, umfassend die Schritte des Konstruierens eines Plasmidvektors oder eines DNA-Fragments durch funktionstüchtiges Verknüpfen einer DNA-Sequenz, codierend ein oder mehrere immunogene Mittel, wobei das Material fähig zum Induzieren einer Immunantwort gegen die exprimierten immunogenen Mittel in Tieren ist, die ausreicht, um die Tiere gegen die Mittel zu immunisieren, und eines in Pflanzen funktionalen Promotors, funktionstüchtig verknüpft an die DNA-Sequenz, der zum Lenken der Expression der Mittel in einer Pflanze fähig ist, des Transformierens einer Pflanzenzelle mit dem Vektor oder DNA-Fragment, um eine transgene Pflanze herzustellen, des Aufzüchtens der transgenen Pflanze und des Herstellens einer wirksamen Dosis der transgenen Pflanze zur Verfütterung an Tiere.

[0134] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Plasmidvektor zum Transformieren einer Pflanze, um-

fassend eine DNA-Sequenz, codierend ein synthetisches LT-B oder CT-B enthaltendes Protein, entworfen zur Ersetzung der bakteriell bevorzugten Aminosäurecodons mit von Pflanzen bevorzugten Aminosäurecodons in der LT-B oder CT-B codierenden Region, und einen Pflanzen-funktionalen Promotor, funktionstüchtig verknüpft an die DNA-Sequenz, der zum Lenken der Expression des Proteins in der Pflanze fähig ist. Eine bevorzugte pflanzenspezifisch entworfene LT-B-DNA-Sequenz wird in Beispiel 20 gezeigt.

A. Kurze Beschreibung der experimentellen Daten

[0135] Die Erfinder konstruierten LT-B-Expressionsvektoren (pLTB110 und pLTB140) und LT-B-SEKDEL-Expressionsvektoren (pLTK110 und pLTK140) für die Pflanzentransformation. Die 110-Vektoren enthalten den 35S-Promotor, wohingegen die 140-Vektoren den Patatin-Promotor enthalten. Die Vektoren wurden durch Ligieren des LT-B-Gens 5' zum vegetativen Sojabohnen-Speicherprotein-Terminator (VSP-ter) in den Vektor p1BT200 konstruiert. Die Vektoren LTB110 und pLTK110 wurden konstruiert, um eine Pflanzenexpressions-Kassette zu enthalten, welche einen Nopalinsynthase-Promotor (Nos-pro), eine Neomycinphosphotransferase codierende Region (NPT II) für Kanamycinresistenz, eine Nopalinsynthase-Polyadenylierungsstelle (Nos-ter) und einen Blumenkohl-Mosaikvirus(CaMV)-35S-Promotor, verknüpft an die 5'-nicht-translatierte Leader-Sequenz von TEV (Tabak-Ätz-Virus), welche als ein translationaler Enhancer wirkt, einschließt. Diese Expressionskassette wurde in den Expressionsvektor pBI101 (erhältlich von Clonetech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) kloniert, um den pLTB110-Zielvektor zu erhalten. Für die Bildung eines Expressionsvektors (pLTK110), enthaltend ein LT-B-Gen mit einer endoplasmatischen Reticulum-Retentionssequenz, wurde das oben stehende Konstrukt ferner mittels eines Oligomers für die codierende Region des Polypeptids SEKDEL, ligiert an die SpeI-Stelle des LT-B-Gens, modifiziert.

[0136] Pflanzentransformationsexperimente wurden unter Verwendung eines Blattscheibchen-Systems mit Agrobacterium tumefaciens als dem Gentransfer-Agens durchgeführt. Triebe wurden aus transformiertem Kallus auf Medium, enthaltend das Antibiotikum Kanamycin zur Selektion, regeneriert. Diese Triebe wurden bewurzelt und zur Vermehrung in Erdreich umgepflanzt.

[0137] Weil die Agrobacterium-vermittelte Transformation von Pflanzenzellen zu einer statistischen nukleären Insertion der Transfer-DNA (T-DNA) führt, wurde von den individuellen Transformanten erwartet, wegen chromosomaler Positionseffekte schwankende Spiegel der Genexpression aufzuweisen, wobei jedoch alle, aufgrund des verbesserten Expressions-Entwurfs der vorliegenden Erfindung, unerwarteterweise höher als der Stand der Technik waren. Die Expression des LT-B-codierenden Gens in Tabak- oder Kartoffel-Pflanzentransformanten wurde durch Northern-Blots geassayed, und die Spiegel an rekombinanten Proteinen wurden durch ELISA quantifiziert. Die Transformanten, welche hohe Spiegel von LT-B exprimierten, wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt. Im allgemeinen wurden LT-B-Expressionsspiegel von zwischen etwa 1 bis etwa 15 µg pro Gramm gesamten löslichen Protein in dem Selektionsverfahren bevorzugt. Ein ausreichend hoher Spiegel an Antigenexpression in den Zellen von Transformanten ist notwendig, um sicherzustellen, daß die Antigenspiegel überhalb des Schwellenwerts zum Hervorrufen einer Immunantwort in Tieren liegen, wenn das transgene Pflanzenmaterial von einem Tier als Futter eingenommen wird.

[0138] Um dieses Selektionsverfahren zu erleichtern, haben die Erfinder eine Reihe neuer Verfahrensweisen zum Identifizieren der seltenen Kartoffeltransformanten ermittelt und perfektioniert, welche die ausreichend hohen Expressionsspiegel für ein gegebenes Antigen wie LT-B aufzeigen, um zu der gewünschten Immunantwort zu führen, wenn es in passender Weise an ein Tier dargereicht wird.

[0139] Nach visueller Inspektion der LT-B-Pentamer-Kristallstruktur stellten die Erfinder die Überlegung an, daß der C-Terminus von LT-B in dem Pentamer ausreichend an der Proteinoberfläche exponiert sein kann, um eine selektive gentechnische Manipulation zu gestatten. Die Manipulation war ausgelegt, um eine ER-Retentionssequenz wie KDEL an den C-Terminus des LT-B-Gens in der Hoffnung anzuhängen, daß die angefügte ER-Retentionssequenz die Proteinfaltung und Oligomerisierung nicht stören und möglicherweise zur Bildung von LT-B-Pentameren mit verstärkter endoplasmatischer Reticulum-Retention führen würde. Frühere Fusionsproteins-Untersuchungen haben die erfolgreiche Expression von Peptiden am C-Terminus von LT-B gezeigt, in welchen die Konformation sowohl von LT-B als auch des Peptids beibehalten wurde; F. Schodel, H. Will, S. Johansson, J. Sanchez, J. Holmgren, Gene. 99, 225 (1991); T. O. Nashar, T. Amin, A. Marcello, T. R. Hirst, Vaccine, 11, 235 (1993); L. Cardenas und J. D. Clements, Infect-Immun. 61, 4629 (1993). Allerdings ist von anderen Fusionsproteinen gezeigt worden, die Pentamerbildung von LT-B zu stören oder die Holotoxin-Bildung zu stören.

[0140] Um die stabilen Einbringung von Antigen-codierenden Sequenzen in transgene Pflanzen zu bestäti-

gen, verwendeten die Erfinder einen Vektor (pLTK110), codierend für ein LT-B-SEKDEL-Fusionsprotein, der im allgemeinen durch Ligieren eines Oligonukleotids, codierend für die Aminosäuren SEKDEL, an den Carboxy-Terminus des LT-B-Gens konstruiert wurde. Mit diesem Vektor transformierte Pflanzen zeigten signifikant erhöhte Spiegel des rekombinanten Proteins im Vergleich zu LT-B-Spiegeln aus Pflanzen, transformiert mit einem Vektor (pLTB110), welchem die C-Terminus-Modifikation fehlte. Tabakpflanzen, welche LT-B-SEKDEL exprimierten, akkumulierten 4 bis 14 µg pro Gramm lösliches Gesamtprotein; ein im Durchschnitt wesentlich höherer Spiegel als die LT-B-exprimierenden Pflanzen. Selbstverständlich wird die Vektorkonstruktion, welche diese alternativen ER-Retentionssequenzen beinhaltet, die dafür codierende DNA-Sequenz an der Stelle der DNA-Sequenz, codierend für SEKDEL, am C-Terminus einschließen.

[0141] Um die Oligomerisierung von LT-B und LT-B-SEKDEL zu untersuchen, wurden die Immunpräzipitate aus radioaktiv markierten Blättern von transformierten Tabakpflanzen analysiert. Diese Analyse zeigte, daß die Transformanten ähnliche Proteinmigrationen verglichen mit bakteriell synthetisiertem Protein ergaben.

[0142] Weiterhin nahm das Signal, bei welchem das Monomer wandert zu, als die Probe vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE gekocht wurde. Diese Zunahme des Monomersignals weist darauf hin, daß das LT-B-SEKDEL-Fusionsprotein tatsächlich innerhalb der Transformanten-Zellen oligomerisiert und daß die Oligomere von LT-B oder LT-B-SEKDEL in einer ähnlichen Weise zum in Bakterien produzierten rLT-B (Protein, gereinigt aus E. coli, welcher dieses von einem rekombinanten Plasmid aus exprimiert) zu Monomeren dissoziieren.

[0143] Das Gelfiltrationsprofil der Pflanzenprobe war ebenfalls das gleiche wie jenes des bakteriell abgeleiteten Proteins. Beide Moleküle eluierten mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 38 kDa, wie es früher für das LT-B-Pentamer gezeigt worden ist, was auf die Ähnlichkeit in der Quaternärstruktur der Proteine hinweist, welche in bakteriellen oder pflanzlichen Systemen exprimiert wurden.

[0144] Um die Immunogenität von aus Pflanzen stammenden LT-B-SEKDEL bei oraler Verfütterung zu bestimmen, erhielten Balb/c-Mäuse eine Gabe eines löslichen Extrakts der Tabakblätter, welche das LT-B-SEKDEL exprimierten. Eine andere Gruppe von Mäusen erhielt rLT-B, gereinigt aus E. coli, welcher das Antigen von einem rekombinanten Plasmid aus exprimierte. Eine antigen-äquivalente Dosis (wie bestimmt mittels ELISA) von 12,5 µg wurde durch Verabreichung an jede Maus gegeben. Serum- und Schleimhaut-Antikörperantworten wurden mittels ELISA für Antikörper untersucht. Anti-LT-B-Antikörper wurden sowohl in Serum- als auch Schleimhautextrakten der getöteten Mäuse nachgewiesen. Wir fanden sowohl Serum- als auch Schleimhaut-Antikörperantworten gegen rLT-B in Mäusen, welche entweder die Pflanzenextrakte oder das aus Bakterien abgeleitete Protein erhalten hatten.

[0145] Toxin-Neutralisierungs-Assays wurden durchgeführt, um die schützende Natur der in Mäusen durch die aus Pflanzen abgeleiteten Proben hervorgerufenen Antikörper zu bestimmen. Sowohl Serum- als auch Schleimhaut-Antikörper (humorale und sekretorische) aus Tieren, welche oral mit LT-B-SEKDEL-transformiertem Pflanzengewebe immunisiert worden waren, waren in der Lage, die biologische Aktivität von LT im gleichen Ausmaß zu neutralisieren, wie Serum- und Schleimhautantikörper aus Tieren, welche oral mit einer antigen-äquivalenten Dosis von rLT-B immunisiert worden waren.

[0146] Tabak war unser anfängliches Testsystem, da er umfassend als ein transgenes Expressionsmodell verwendet worden ist. Da jedoch Tabakblätter reich an toxischen Alkaloiden sind, war es wünschenswert, mit einem Pflanzensystem zu arbeiten, dessen eßbares Gewebe, welches das Impfstoff-Antigen exprimiert, in einer unmodifizierten Form an Tiere verfüttert werden konnte.

[0147] Um Alkaloid-Toxizitätsprobleme zu vermeiden, transformierten wir Kartoffeln, weil aus den transformierten Pflanzen in einer kurzen Zeitdauer Knollen erhalten werden können und von Mäusen ohne weiteres als Alternativen zu Laboratoriums-Futtermischungen akzeptiert werden. Blatt-Explantate aus der axenisch herangezüchteten Kartoffelvarietät "FL1607", H. Wenzler, G. Mignery, G. May, W. Park, Plant Science 63, 79 (1989), wurden mit A. tumefaciens transformiert, welcher pLTB110 und pLTK110 enthielt. Die Transformanten wurden selektiert und die Knollen wurden analysiert. Die Spiegel an LT-B oder LT-B-SEKDEL lagen im Bereich von 2 bis 30 µg pro Gramm bzw. 60 bis 110 µg pro Gramm lösliches Gesamtprotein, was eine Obergrenze der Expression von etwa 0,01% löslichem Fremdprotein repräsentiert.

[0148] Bei Verfütterung an Mäuse ergaben die Knollen eine ähnliche Immunantwort zu derjenigen für die transformierten Tabakblätter, was unsere Hypothese bestätigt, daß Antigenexprimierendes eßbares Gewebe bei Verfütterung in einer unmodifizierten Form eine Immunantwort induzieren kann.

[0149] Mäuse, welche mit den (nicht-transformierten) Kontrollknollen gefüttert wurden, entwickelten keine derartige Antwort. Ebenfalls gezeigt sind die Antworten aus Tieren, welche mit einer antigen-äquivalenten Dosis von löslichem bakteriell exprimierten LT-B gefüttert wurden. Diese Daten zeigen die Durchführbarkeit der Anwendung von transgenen Pflanzen als Expressions- und Zuführungssysteme für orale Immunogene zur Hervorrufung einer Immunantwort lediglich durch Verfüttern der eßbaren Gewebe. Die ist besonders bedeutsam, da das Immunogen noch mit dem sonstigen Pflanzenmaterial assoziiert war, welches in überhaupt keiner Weise modifiziert worden war.

[0150] Zusammengenommen zeigen unsere Ergebnisse die erfolgreiche Expression und Herstellung von LT-B- und LT-B-SEKDEL-Fusionsprotein in Pflanzen. Das aus Pflanzen abgeleitete rLT-B zeigt analoge Eigenschaften zu dem bakteriellen LT-B. Es ist antigen und bindet an GM-1-Gangliosid, seinen natürlichen Ligand auf dem Darmepithel. Wir haben ebenfalls die Wirksamkeit des transgenen Pflanzengewebes als orales Immunogen bei Verfütterung an Mäuse gezeigt. Dies ist die erstmalige Demonstration, daß in transgenen Pflanzen exprimierte Antigene immunogene Eigenschaften beibehalten und oral wirksame Immunogene sind.

[0151] Die folgenden Beispiele werden zur Veranschaulichung der Ausführung der Erfindung in größerer Ausführlichkeit dienen.

Beispiel 1

[0152] Dieses Beispiel veranschaulicht die Konstruktion von Expressions-Plasmidvektoren, welche eine LT-B codierende Region enthalten.

[0153] Plasmide (pDF82 und pJC217), enthaltend die codierenden Regionen für die A- und B-Untereinheiten des hitzelabilen Enterotoxins (LT) von E. coli, wurden von Dr. John D. Clements, Tulane University School of Medicine, New Orleans, LA, erhalten. pDF82 (Clements et al., Infect. Immunity, 40, 653 (1983)) enthält sowohl die LT-A als auch LT-B codierenden Sequenzen in einer überlappenden Konfiguration auf einem in pBR322 klonierten PstI-Fragment. pJC217 enthält die LT-B-codierende Sequenz aus einem 777 bp großen HindIII-Fragment aus pDF82, subkloniert in die HindIII-Stelle von pUC8.

[0154] Wir modifizierten den C-Terminus der LT-B-codierenden Region, um die Aminosäuren Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu (SEKDEL) zu enthalten, auf die folgende Weise. pJC217 wurde mit SpeI verdaut, welches an der Translationsterminationsstelle schneidet, und mit einem synthetischen DNA-Fragment ligiert, erhalten durch Annealing der folgenden Oligonukleotide:
5'-CTCTGAGAAAGATGAGCTATGA-3' (SEQ ID Nr.: 5) und
5'-CTAGTCATAGCTCATCTTTCTCAGAG-3' (SEQ ID Nr.: 6).

[0155] Der verbleibende freie SpeI-Terminus wurde mit Mungbohnen-Nuklease zu einem glatten Ende verdaut, und das Plasmid wurde unter Bildung von pLTK217 zirkularisiert. Das 3'-Ende des modifizierten C-Terminus lautet deshalb (die SpeI-Stelle ist unterstrichen):

```
AGT ATG GAA AAC TCT GAG AAA GAT GAG CTA TGA CTA GT
 S   M   E   N   S   E   K   D   E   L Stop
```

(SEQ ID Nr.: 7)

wobei die obere Zeile die Nukleotidsequenz zeigt und untere Zeile die entsprechende Aminosäuresequenz zeigt.

[0156] Die LT-B codierenden Regionen und flankierenden Sequenzen aus dem unmodifizierten (pJC217) und C-terminal SEKDEL-modifizierten (pLTK217) wurden in pBluescript KS (Stratagene, La Jolla, CA) unter Verwendung von EcoRI und HindIII subkloniert, wodurch man pLTB10 bzw. pLTK10 erhielt. Die EcoRI-Stellen in pLTB10 und pLTK10 wurden durch Glattmachen mit Mungbohnen-Nuklease und Rezirkularisieren zerstört, wodurch man pLTB11 bzw. pLTK11 erhielt. Die codierenden Sequenzen wurden dann aus pLTB11 bzw. pLTK11 mit BamHI und DraI herausgeschnitten, und in pIBT200, verdaut mit BamHI und SmaI, ligiert, wodurch pLTB200 bzw. pLTK200 gebildet wurden.

[0157] pLBT200 enthält regulatorische Elemente, welche für die Expression von inserierten codierenden Sequenzen in Pflanzenzellen benötigt werden, und wurde wie folgend konstruiert. Ein 576 bp großes Fragment, enthaltend ein Polyadenylierungssignal aus der 3'-flankierenden Region des Sojabohnen-vspB-Gens (Mason et al., Plant Cell, 5, 241 (1993)), wurde in die SacI- und EcoRI-Stellen von pUC19 (Gibco-BRL, Bethesda, MD)

ligiert, wodurch man pUC-V erhielt. Ein 950 bp großes Fragment, enthaltend den Blumenkohl-Mosaikvirus-35S-Promotor mit dupliziertem Enhancer, fusioniert an das 5'-UTR von Tabak-Ätz-Virus (TEV-Leader), wurde durch Verdau von pRTL2-GUS (Carrington et al., Plant Cell, 3, 953 (1991)) mit NcoI, Glattmachen der resultierenden Enden mit Mungbohnen-Nuklease und Verdau mit HindIII erhalten. Das resultierende Fragment wurde in pUC-V, verdaut mit SmaI und HindIII, inseriert, wodurch man pIBT200 erhielt, welcher einen Polylinker enthält, der die Stellen BamHI, SmaI, KpnI und SacI zwischen dem 35S-Promotor-TEV-Leader und dem vspB-3'-Ende für die Insertion von fremden codierenden Sequenzen zur Expression in Pflanzenzellen trägt.

[0158] Wir modifizierten die Translationsinitiationsstelle von LT-B, um eine NcoI-Stelle zu enthalten, unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und mutagener Primer. Ein 68 bp großes Fragment, umfassend das 5'-Ende der LT-B-codierenden Sequenz, wurde durch PCR unter Verwendung von pDF82 als Matrize und der folgenden Primer erhalten:
5'-GGGGCCATGGTTAAAGTAAAATGTTATGTTTTA-3' (SEQ ID Nr.: 8) und
5'-AGACTGGGGAGCTCCGTATG-3' (SEQ ID Nr.: 9). Die NcoI-Stelle ist unterstrichen.

[0159] Das resultierende PCR-Fragment wurde mit NcoI und SacI verdaut und in gleicherweise verdauten pIBT210.1 ligiert, wodurch man pLTB5' erhielt.

[0160] pIBT210.1 ist ähnlich zu pIBT200, außer daß sein Polylinker die Stellen NcoI, BamHI, SmaI, KpnI und SacI trägt. Es wurde wie folgt konstruiert. Die 35S-Promotor-TEV-Leader-Fusion aus pRTL2-GUS wurde modifiziert, um die EcoRI-Stelle an der Promotor-Leader-Grenze zu entfernen, indem mit Klenow-Enzym aufgefüllt und rezirkuliert wurde, wodurch man pRTL4 erhielt. pRTL4 wurde mit NcoI verdaut, und die resultierenden Enden durch Auffüllen mit Klenow-Enzym glattgemacht, und die resultierende DNA wurde mit HindIII verdaut, um das Promotor-Leader-Fragment freizusetzen. In gleicher Weise wurden pUC-V mit BamHI verdaut, und die resultierenden Enden wurden durch Auffüllen mit Klenow-Enzym glattendig gemacht, und die resultierende DNA wurde mit HindIII verdaut. Der Vektor pUC-V und das so hergestellte pRTL4-Promotor-Leader-Fragment wurden ligiert, wodurch pIBT210.1 gebildet wurde.

[0161] Das modifizierte 5'-Ende von LT-B in pLTB51 wurde dann mit den unmodifizierten (pLTB200) und modifizierten (pLTK200) 3'-Enden der codierenden Sequenz wie folgend kombiniert. pLTB200 und pLTK200 wurden mit SacI verdaut, um die das 3'-Ende codierenden Sequenzfragmente zu erhalten, welche separat in mit SacI verdauten pLTB5' ligiert wurden, wodurch man pLTB210 bzw. pLTK210 erhielt. Diese Plasmide enthalten die LTB-codierende Sequenz mit modifiziertem 5'-Ende und den unmodifizierten (pLTB210) oder modifizierten (pLTK210) 3'-Enden zwischen dem 35S-Promotor-TEV-Leader und dem Polyadenylierungssignal und der 3'-flankierenden Region von vspB.

[0162] Die Expressionskassetten in pLTB210 und pLTK210 wurden in den Agrobacterium-T-DNA-Vektor pBI101 (Clonetech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) transferiert durch Verdau mit HindIII und EcoRI und Ligieren mit gleicherweise verdautem pBI101, wodurch man pLTB110 bzw. pLTK110 erhielt. Somit enthalten pLTB110 und pLTK110 die codierenden Sequenzen von LT-B mit einem modifizierten 5'-Ende und entweder unmodifizierten (pLTB110) oder modifizierten (pLTK110) 3'-Enden, positioniert zwischen dem 35S-Promotor-TEV-Leader und dem Polyadenylierungssignal und der 3'-flankierenden Region von vspB, alles innerhalb der T-DNA-Borders aus pBI101, welche den Transfer der Expressionskassetten in die Zellkern-DNA von Pflanzenzellen mittels Agrobacterium-vermittelter Transformation und Selektion von Transformanten auf Kanamycin-enthaltenden Medien gestatten.

[0163] Eine weitere Modifikation von pLTB110 wurde Substitution des Patatin-Promotors aus Kartoffel für den 35S-Promotor konstruiert. Der Patatin-Promotor aus pPS20 (Wenzler et al., Plant Mol. Bio., 12, 41 (1989)) wurde erhalten durch Verdau von pPS20 mit BamHI, gefolgt von teilweisem Auffüllen mit Klenow-Enzym und nur dGTP und dATP. Die resultierende DNA wurde mit HindIII verdaut, um das 2,3 kpb große Promotorfragment freizusetzen. pLTB110 wurde mit XhoI verdaut, gefolgt von partiellen Auffüllen mit dem Klenow-Enzym und lediglich dCTP und TTP, und wurde letztendlich mit HindIII verdaut. Das pLTB110-Vektorfragment wurde von dem so freigesetzten 35S-Promotor-Fragment gereinigt, und der resultierende Vektor wurde mit dem wie oben stehend beschrieben hergestellten Patatin-Promotorfragment ligiert, wodurch pLTB140 erhielt.

[0164] Ein ähnliches Konstrukt (enthaltend den modifizierten SEKDEL-C-Terminus) wird durch Substitution von pLTK110 für pLTB110 im vorausgehenden Abschnitt hergestellt.

[0165] Die Strukturen von pLTB140 und pLTK110 sind in den **Fig. 1A** bzw. **Fig. 1B** gezeigt, wohingegen die Struktur von pLTB110 in der **Fig. 1C** gezeigt wird.

Beispiel 2

[0166] Dieses Beispiel veranschaulicht die Konstruktion von Expressionsplasmidvektoren, welche eine LT-A-codierende Region enthalten.

[0167] Wir modifizierten die Translationsinitiationsstelle von LT-A, um eine NcoI-Stelle zu erhalten, unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und mutagener Primer. Ein 88-bp-Fragment, umfassend das 5'-Ende der LT-A-codierenden Sequenz, wurde durch PCR unter Verwendung von pDF82 als Matrize und der folgenden Primer erhalten:
5'-GGGGCCATGGTTAAAAATATAACTTTCATTTTT-3' (SEQ ID Nr.: 10) und
5'-ATCTGGGGGTCTAGAGTC-3' (SEQ ID Nr.: 11). Die NcoI-Stelle ist unterstrichen.

[0168] Das resultierende PCR-Fragment wurde mit NcoI und XbaI verdaut und mit pRTL4 von Beispiel 1, welcher in gleicherweise verdaut war, ligiert, wodurch man pLTA5' erhielt. Dieses Plasmid enthält den 35S-Promotor-TEV-Leader, fusioniert an das modifizierte 5'-Ende der LT-A codierenden Sequenz, wobei dieses Fragment erhalten wurde durch Verdau von pLTA5' mit HindIII und XbaI, und wurde mit gleichermaßen verdauten pUC-V, unter Erhalt von pLTA210.5, ligiert. Das 3'-Ende der LT-A codierenden Sequenz wurde durch Verdau von pDF82 mit XbaI und SacI erhalten und mit gleicherweise verdautem pLTA210.5 ligiert, wodurch man pLTA210 erhielt. Daher enthält pLTA210 die LT-A-codierende Sequenz mit einem modifizierten 5'-Ende, positioniert zwischen dem 35S-Promotor-TEV-Leader und dem Polyadenylierungssignal und der 3'-flankierenden Sequenz von vspB.

[0169] Die Expressionskassette in pLTA210 wurde in den Agrobacterium-T-DNA-Vektor pIBT100 transferiert, welcher wie folgend konstruiert worden war. pIBT200 aus Beispiel 1 wurde mit HindIII und EcoRI verdaut, um ein Fragment zu ergeben, enthaltend den Polylinker (BamHI, SmaI, KpnI, SacI) zwischen dem 35S-Promotor-TEV-Leader und dem vspB-3'-Ende, welches mit gleicherweise verdautem pBI101 ligiert wurde, wodurch man pIBT100 erhielt. pLTA210 wurde mit XhoI und SacI verdaut, um ein Fragment zu ergeben, enthaltend die TEV-Leader-LTA codierende Sequenz, welche mit gleicherweise verdauten pIBT100 ligiert wurde, wodurch man pLTA110 erhielt. Daher enthält pLTA110 die LT-A codierende Sequenz mit einem modifizierten 5'-Ende, positioniert dem 35S-Promotor-TEV-Leader und dem Polyadenylierungssignal und der 3'-flankierenden Region von vspB, alles innerhalb der T-DNA-Borders aus pBI101, welche den Transfer der Expressionskassette in die Zellkern-DNA von Pflanzenzellen durch Agrobacterium-vermittelte Transformation gestatten.

Beispiel 3

[0170] Dieses Beispiel veranschaulicht die Konstruktion von Vektoren für die koordinierte Expression von LT-A und LT-B.

[0171] Hier beschreiben wir die Konstruktion von Plasmiden, welche die koordinierte Expression von LT-A und LT-B für den Zusammenbau von Holotoxin-LT in Kartoffelknollenzellen gestatten. Weil die A- und B-Untereinheiten in LT im Verhältnis 1:5 kombiniert werden, ist es notwendig, die Transkriptionsspiegel für diese Gene in transgenen Pflanzen so zu modulieren, daß ein ähnliches Verhältnis der mRNAs für LT-A und LT-B in den transformierten Zellen angenähert wird. Wir haben dies unter Verwendung von Promotoren mit unterschiedlichen Aktivitäten in Kartoffelknollen zur Steuerung der Transkription der LT-A- und LT-B-codierenden Sequenzen bewerkstelligt.

[0172] Das 5'-Ende der LT-A-codierenden Sequenz in pLTA210.5 wurde mit zwei verschiedenen Promotoren wie folgend fusioniert. In einem Fall wurde der Patatin-Promotor trunkiert, um lediglich die 3'-terminalen 350 bp zu enthalten. Das 2,3 kb große HindIII/BamHI-Patatin-Promotorfragment aus pPS20 von Beispiel 1 wurde in pUC19 subkloniert, wodurch pUC-PS gebildet wurde. pUC-PS wurde mit XbaI und SalI verdaut, gefolgt von Glätten der Enden durch Auffüllen mit Klenow-Enzym und Rezirkularisieren, um die 5'-terminalen 1,95 kb des Patatin-Promotors auszuschließen, wodurch man pPSX erhielt. Der trunkierte 350-bp-Patatin-Promotor wurde erhalten durch Verdau von pPSX mit BamHI, gefolgt von Glätten der Enden durch Auffüllen mit Klenow-Enzym und schließlich Verdau mit HindIII, und wurde mit pLTA210.5 ligiert, welches hergestellt worden war durch Verdau mit NcoI, gefolgt von Glätten der Enden durch Auffüllen mit Klenow-Enzym und schließlich Verdau mit HindIII. Der resultierende pLTA-PX enthält den trunkierten 350 bp-Patatin-Promotor, fusioniert an das modifizierte 5'-Ende der LT-A codierenden Sequenz.

[0173] Im zweiten Fall wurde die LT-A-codierende Sequenz in pLTA210.5 mit einer trunkierten Form des Sojabohne-vspB-Promotors fusioniert. Ein 1534 bp großes vspB-Promotorfragment in pKS-vspBXP (Mason et

al., Plant Cell, 5, 241 (1993)) wurde aus dem 3'-Ende bis zu einem Punkt 7 bp stromaufwärts des Initiationscodons für vspB unter Verwendung von Exonuklease III und Mung-Bohnen-Nuklease deletiert, wodurch man pKS-vspBXΔ10 erhielt. Eine 5'-Deletion von 665 bp wurde erhalten, indem zuerst pKS-vspBXΔ10 mit KpnI verdaut wurde, gefolgt von Glätten der Enden mit T4-DNA-Polymerase und schließlich Verdau mit HindIII, und das resultierende 835 bp große Fragment wurde gereinigt. Dieses trunkierte Promotorfragment wurde mit pLTA210.5 ligiert, welcher hergestellt wurde durch Verdau mit NcoI, gefolgt von Glätten der Enden durch Auffüllen mit Klenow-Enzym und schließlich Verdau mit HindIII, wodurch man pLTA-VH erhielt, der den trunkierten 835-bp-vspB-Promotor, fusioniert an das modifizierte 5'-Ende der LT-A codierenden Sequenz, enthält.

[0174] Das 3'-Ende der LT-A-codierenden Sequenz wurde wie folgend an das Nopalinsynthasse (NOS)-Polyadenylierungs-Signal fusioniert. Das 756 bp große XbaI/SacI-Fragment aus pDF82 (enthaltend das 3'-Ende der LT-A-codierenden Sequenz) wurde zusammen mit dem 250 bp großen SacI/EcoRI-Fragment aus pBI101 (enthaltend das NOS-Polyadenylierungssignal) und pBluescriptKS, verdaut mit XbaI und EcoRI, ligiert, wodurch man pLTA-3N erhielt.

[0175] Die zwei unterschiedlichen Promotor-5'-codierende-Sequenz-Fusionen wurden wie folgend separat mit der 3'-codierenden-Sequenz-NOS-Polyadenlierungssigal-Fusion kombiniert. pLTA-PX und pLTA-VH wurden mit HindIII und XbaI verdaut, und die Promotor-5'-codierende-Sequenz-Fragmente wurden gereinigt. pLTA-3N wurde mit XbaI und SalI verdaut, und das 3'-codierende-Sequenz-NOS-Polyadenylierungssignal-Fragment wurde gereinigt. Das pLTA-PX-HindIII/XbaI-Fragment wurde mit dem pLTA-3N-XbaI/SalI-Fragment und pLTB110 von Beispiel 1, der mit HindIII und SalI verdaut worden war, zusammen ligiert, wodurch man pLT101 erhielt. In ähnlicher Weise wurde das pLTA-VH-HindIII/XbaI-Fragment zusammen mit dem pLTA-3N-XbaI/SalI-Fragment und pLT'B110, verdaut mit Hin-dIII und SalI, ligiert, wodurch man pLT100 erhielt. Somit enthalten pLT101 und pLT100 Expressionskassetten sowohl für LT-A als auch LT-B, unter der Steuerung verschiedener 5'- und 3'-regulatorischer Elemente, alles innerhalb der T-DNA-Borders, welche die Insertion des Konstrukts in die Zellkern-DNA von Pflanzenzellen unter Anwendung von Agrobacterium-vermittelter Transformation erlauben.

Konstruktion von pLT102 und pLT103:

[0176] Genauer gesagt beschreibt dies die Konstruktion von zwei Plasmiden für die koordinierte Expression von LT-A und LT-B-SEKDEL in Kartoffelknollenzellen für den Zusammenbau eines rekombinanten Holotoxin-LT, wobei die B-Untereinheit modifiziert ist, um ein mikrosomales Retentionssignal am Carboxy-Terminus (SEKDEL) zu enthalten. Die resultierenden Plasmide, pLT102 und pLT103, sind jeweilig identisch zu pLT100 bzw. pLT101, mit der einzigen Ausnahme, daß die LT-B-codierenden Sequenzen modifiziert sind, um SEKDEL an den 3'-Enden zu codieren.

[0177] LT-B-SEKDEL ist ein Beispiel eines LT-B-enthaltenden Proteins. LT-B-SEKDEL enthält mindestens eine Aminosäuredomäne, welche im wesentlichen homolog mit der Aminosäuresequenz von bakteriell abgeleiteten LT-B- und CT-B-Proteinen ist, wobei sich die Aminosäuresequenz-Homologie auf mindestens etwa 90% beläuft, und weiterhin ist LT-B-SEKDEL im wesentlichen funktionell ähnlich zu bakteriell abgeleitetem LT-B oder CT-B hinsichtlich der Bindung an GM-I-Ganglioside.

[0178] Um pLT102 zu konstruieren, wurde pLT100 mit SpeI und SalI verdaut, um die Patatinpromotor-LT-B-codierende-Sequenz-Fusion freizusetzen, und es wurde das 12 kbp große Vektorfragment gereinigt, enthaltend die vspB-Promotor-LT-A-codierende-Sequenz-NOS-3'-Ende-Kassette auf der SalI-Seite und das vspB-3'-Ende auf der SpeI-Seite. Das TEV-5'-UTR, fusioniert an die LT-B-codierende Sequenz, modifiziert zum Codieren von SEKDEL am Carboxyl-Terminus, erhielt man aus pLTK210 von Beispiel 1 durch Verdauen mit XhoI, gefolgt von teilweisem Auffüllen mit Klenow-Enzym und lediglich dCTP und TTP und schließlich Verdau mit SpeI. Der Patatin-Promotor aus pPS20 (Wenzler et al., Plant Mol. Bio., 12, 41 (1989)) wurde durch Verdau von pPS20 mit BamHI, gefolgt vom partiellen Auffüllen mit Klenow-Enzym und lediglich dGTP und dATP und schließlich Verdau mit SalI, zur Freisetzung des 2,3 kbp großen Promotorfragments erhalten. Alle drei Fragmente wurden unter Bildung von pLT102 zusammen ligiert, was in der **Fig. 11** gezeigt wird.

[0179] Zur Bildung von pLT103, wurde pLT102 verdaut (oben stehend beschrieben) mit HindIII und SalI, um die LT-A-Expressionskassette freizusetzen, und das Vektorfragment, enthaltend die LT-B-SEKDEL-Expressionskassette, wurde gereinigt. Die LT-A-Kassette wurde rekonstruiert durch Verdau von pLTA-PX (siehe oben) mit HindIII und XbaI, um das 450-bp-Fragment zu erhalten, sowie durch Verdau von pLTA-3N (siehe oben) mit XbaI und SalI, um das 700 bp-Fragment zu erhalten. Alle drei Fragmente wurden zusammen ligiert, um pLT103 zu bilden, was in **Fig. 11** gezeigt wird.

Konstruktion von pLTK140:

[0180] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von pLTK140, welcher identisch zu pLTB140 von Beispiel 1 ist, mit der einzigen Ausnahme, daß die LT-B codierende Sequenz modifiziert ist, um am 3'-Ende SEKDEL zu codieren. Das Plasmid pLT103 (Fig. 11) wurde mit SalI verdaut, um die LT-A-Expressionskassette freizusetzen, gefolgt von Relegation des Vektors, um pLTK140 zu erhalten, was ebenfalls in Fig. 11 gezeigt ist. pLTK140 verwendet den Patatin-Promotor zur Steuerung der Knollen-spezifischen Expression von LT-B-SEKDEL in Kartoffelpflanzen.

Konstruktion von pLT104 und pLT105:

[0181] Das Plasmid pLT104 wurde als eine bicistronische Kassette für die koordinierte Expression von LT-A und LT-B-SEKDEL erzeugt, und pLT105, eine bicistronische Kassette für die koordinierte Expression von LT-A und LT-B, wurde für die effizientere Bildung des Holotoxin-LT erzeugt. Weil die Assoziation des LT-A-Polypeptids mit dem LT-B-Pentamer ineffizient ist, nachdem sich die LT-B-Polypeptide zu dem Pentamer aggregiert haben, kann eine engere Nähe der sich faltenden Polypeptide eine effizientere Holotoxin-Bildung gestatten. Daher kann eine Translation von LT-A und LT-B auf getrennten mRNAs keine enge Nähe der LT-A- und LT-B-Polypeptide während der Faltung zulassen, welche von einer Translation von LT-A und LT-B von einer einzigen RNA, enthaltend beide codierenden Sequenzen, gewährt werden könnte. Die Strategie verknüpft den Patatin-Promotor an eine TEV-5'-UTR/LT-B-SEKDEL (pLT104)- oder TEV 5'UTR/LT-B (pl.T105)-Fusion, worauf eine TEV-5'-UTR/LT-A-Fusion und das vspB-3'-Ende folgen. Die von diesem Konstrukt aus erzeugte mRNA in Kartoffelknollenzellen wird sowohl die codierenden LT-B-SEKDEL- als auch LT-A-Sequenzen enthalten.

[0182] Zuerst wurde eine BamHI-Stelle am 3'-Ende der LT-B-SEKDEL codierenden Sequenz erzeugt durch Subklonieren des 300 bp großen SacI/SpeI-Fragmentes aus pLTK210 von Beispiel 1 in pBluescriptKS (Stratagene), wodurch man pLTK-SS erhielt. pLTK-SS wurde dann mit Bam-HI verdaut, gefolgt von teilweisem Auffüllen mit Klenow-Enzym und lediglich dGTP und dATP, und die resultierende DNA wurde mit SacI verdaut, um das 300 bp-Fragment zu erhalten. Das TEV 5'-UTR/LT-A-Fragment wurde durch Verdau von pLTA210 von Beispiel 2 mit XhoI, gefolgt von teilweisen Auffüllen mit Klenow-Enzym und lediglich dCTP und TTP und schließlich Verdauen mit SacI erhalten. Diese zwei Fragmente wurden dann mit pLTK140, welcher mit SacI verdaut und gereinigt worden war, um das Vektorfragment zu erhalten, zusammen ligiert, wodurch man pLT104 erhielt, was in der Fig. 11 gezeigt wird.

[0183] pLT105 wurde erzeugt durch Ligation des 2,8 kbp großen SpeI/SalI-Fragments aus pLTB140 von Beispiel 1 mit dem Vektorfragment, erhalten durch Verdau von pLT104 (dieses Beispiel) mit SpeI/SalI. pLT105 ist in der Fig. 11 gezeigt.

Beispiel 4

[0184] Dieses Beispiel veranschaulicht die Konstruktion von Expressionsvektoren, welche koordiniert LT-A- und LT-B-codierende Sequenzen exprimieren, modifiziert, um die C-Terminus-SEKDEL-Aminosäuresequenz zu enthalten.

[0185] Konstrukte werden für die koordinierte Expression von LT-A und der LT-B codierenden Sequenzen, modifiziert zum Enthalten der C-terminalen SEKDEL-Aminosäuresequenz, hergestellt, indem man einfach pLTK110 anstelle von pLTB110 in den letzten Schritten des in Beispiel 3 beschriebenen Verfahrens verwendet.

Beispiel 5

[0186] Dieses Beispiel veranschaulicht die Konstruktion von Vektoren für die koordinierte Expression von LT-B und anderen Antigenen.

[0187] Um die Fähigkeit von LT-B zu testen, als ein Immunsystem-Stimulans oder Adjuvans zu wirken, wenn es in Pflanzenzellen koordinativ mit anderen Antigenen exprimiert und an Tiere verfüttert wird, haben wir einen Plasmidvektor konstruiert, der die koordinierte Expression von LT-B neben dem Norwalk-Virus-Capsidprotein (NVCP) (Jiang et al., J. Virol, 66, 6527 (1992)) gestatten wird. Ein Expressionsplasmid für NVCP wurde auf ähnliche Weise konstruiert, wie jener welcher oben stehend für pLTB140 von Beispiel 1 beschrieben wurde, wodurch man pNVI40 erhielt, welches den Patatin-Promotor, TEV-Leader, NVCP codierende Sequenz und das NOS-Polyadenylierungssignal enthält.

[0188] Das 4,2 kb große pNVI40-SalI/SacI-Fragment, enthaltend den Patatin-Promotor, TEV-Leader und die NVCP codierende Sequenz, wurde gereinigt. Das 1,3 kb große HindIII/SpeI-Fragment aus pLTK210 von Beispiel 1, enthaltend den 35S-Promotor, TEV-Leader und die LT-B-codierende Sequenz, wurde gereinigt. Das 0,6 kb große SpeI/EcoRI-Fragment aus pLTK210, enthaltend das vspB (SEKDEL codierende Sequenz und das Polyadenylierungssignal), wurde gereinigt. Diese drei Fragmente, pNV140 SalI/SacI, pLTK120 HindIII/SpeI und pLTK210 SpeI/EcoRI wurden zusammen mit pBI101, verdaut mit HindIII und EcoRI, ligiert, wodurch man pLTK-NV erhielt. Somit enthält pLTK-NV eine LT-B-Expressionskassette mit dem modifizierten C-terminalen SEKDEL, und eine NVCP-Expressionskassette, alles innerhalb der T-DNA-Borders, welche die Insertion des Konstruktes in die Zellkern-DNA von Pflanzenzellen unter Verwendung von Agrobacterium-vermittelter Transformation gestatten.

Beispiel 6

[0189] Dieses Beispiel veranschaulicht die Transformation von Tabakblättern mit einem Vektor, enthaltend DNA, codierend für ein LT-B-Protein mit einer C-terminalen SEKDEL-ER-Retentionssequenz, pLTK110.

[0190] Das Plasmid pLTK110 wurde zuerst in Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Clonetech Laboratories, PaloAlto, CA) durch das direkte Frier-Tau-Verfahren mobilisiert, An G. Meth, Enzymol. 153: 292–305 (1987). Transformierte Klone wurden durch Selektion auf 50 mg/l Kanamycin isoliert, und Plasmid wurde aus Flüssigkulturen durch alkalische Lyse präpariert.

[0191] Die Struktur von Plasmiden aus Agrobacterium wurde durch Restriktionsendonuklease-Verdau bestätigt.

[0192] Die Technik der in vitro-Transformation von Pflanzen durch das Agrobacterium-Ti-Plasmidsystem basiert auf der Co-Kultivierung von Pflanzengeweben oder Zellen und den transformierten Agrobacterium während etwa zwei Tagen mit einem anschließenden Transfer von Pflanzenmaterialien in ein passendes Selektivmedium. Bei dem Material kann es sich entweder um Protoplasten, Kallus oder Organgewebe handeln, abhängig von der Pflanzenspezies. Die Organ-Co-Kultivierung mit Blattstückchen ist ein zweckmäßiges Verfahren.

[0193] Tabakblätter wurden unter Verwendung eines Blattscheibchen-Systems mit Agrobacterium tumefaciens als dem Gentransfer-Mittel transformiert. Die Blattscheiben-Transformation wurde gemäß der Vorgehensweise durchgeführt, beschrieben in R. B. Horsch et al., in Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer 5 Academic Publishers, Dordecht (1988), S. 1–9. Tabak-Keimlinge wurden aseptisch in Gewebekultur-Boxen bis zu einer Größe von 8–10 cm herangezogen. Die Blätter wurden in schmale Streifen oder Quadrate zerschnitten, um eine Verwundungs-Kante herzustellen.

[0194] Blattscheiben wurden ein bis zwei Tage lang mit der Oberseite nach unten auf MS 104-Medium vorkultiviert, um ein Anfangswachstum zu gestatten und diejenigen Scheiben zu eliminieren, welche während der Sterilisierung oder Behandlung beschädigt worden waren. Nur die Blattscheiben, welche Lebensfähigkeit zeigten, wie angezeigt durch Quellung, wurden für eine anschließende Inokulation verwendet. Der A. tumefaciens, enthaltend pLTB110 oder pLTK110, welcher in YEP-Medium (10 g/l Bacto-Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) herangezogen worden war, wurde 1:10 mit MSO für Tabakscheiben verdünnt. Die Blattscheibchen wurden durch Eintauchen in der verdünnten transformierten A. tumefaciens-Kultur inokuliert und auf Regenerations-Medium MS104 drei Tage lang co-kultiviert. Die Blattscheiben wurden dann mit sterilem Wasser gewaschen, um die freien A. tumefaciens-Zellen zu entfernen, und auf frischem MS-Selektionsmedium aufgebracht, welches 100 µg/ml Kanamycin zum Selektieren nach transformierten Pflanzenzellen und 500 µg/ml Carbenicillin zur Abtötung jedweden verbleibenden A. tumefaciens enthielt. Die Blattscheiben wurden dann in zweiwöchigen Intervallen auf frisches MS-Selektionsmedium überführt. Als sich Triebe an der Kante der Blattscheiben bildeten und groß genug für eine manuelle Manipulation herangewachsen waren, wurden sie abgeschnitten (üblicherweise drei bis sechs Wochen nach der Co-Kultivierung mit transformierten A. tumefaciens) und in ein Wurzel-induzierendes Medium, z. B. MS-Bewurzelungsmedium, transferiert. Als die Wurzeln erschienen, wurden die Pflänzchen entweder fortgesetzt unter sterilen Gewebekulturbedingungen wachsen gelassen oder in Erdreich überführt und in einer kontrollierten Umgebungs-Kammer wachsen gelassen.

Beispiel 7

[0195] Dieses Beispiel veranschaulicht die ELISA-Analyse von Pflanzenextrakten, spezifisch Tabakblatt-Extrakten, hinsichtlich der Menge der zellulären Expression des LT-B- und LT-B-SEKDEL-Proteins.

[0196] ELISA hinsichtlich LT-B in Pflanzenextrakten: gelöst in GM-X Gangliosid (Sigma, G2375)-Carbonatpuffer (pH 9,6), wurde auf Polystyrol-ELISA-Platten aufbeschichtet. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Puffer mit PBST abgewaschen und die Vertiefungen wurden hinsichtlich nicht-spezifischer Bindung mit 5% Milch in PBST geblockt. Die zu testenden Proben wurden in die Vertiefungen mit PBST in zweifacher Ausfertigung aufgetragen. Um eine Eichkurve für die Quantifizierung von LT-B zu erhalten, wurden verschiedene Verdünnungen von bakteriell abgeleitetem LT-B auf die gleiche Platte aufgetragen. Die Platten wurden mit PBST nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur gewaschen. Ziegen-Antiserumn gegen LT-B, 1:1000 verdünnt in PBST und 2% BSA, wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur in den Vertiefungen inkubieren gelassen. Nach 4-maligem Waschen mit PBST wurde dies mit Kaninchen-Antiserum gegen Ziegen-IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Sigma A7650), 1:200 verdünnt in PBST und 2% BSA, sondiert. Nach dem Waschen der Vertiefungen mit PBST wurden sie mit Nitrophenylphosphat-Substrat in Diethanolamin-Puffer, pH 9,8, inkubiert. Nach 10 bis 30 Minuten langer Inkubation wurde die Reaktion durch Zugeben von NaOH gestoppt, und die Extinktion wurde bei 410 nm abgelesen.

Beispiel 8

[0197] Dieses Beispiel veranschaulicht die ELISA-Analyse von Tabakpflanzen-Transformanten hinsichtlich der Expression von LT-B und LT-B-SEKDEL.

[0198] Die Expression des LT-B codierenden Gens in Tabakpflanzen-Transformanten wurde durch die Quantifizierung der Spiegel von rekombinanten Proteinen mittels ELISA, wie gezeigt in **Fig.** 2, geassayed. ELISA-Spiegel von rekombinantem Protein wurden aus löslichen Proteinextrakten aus unabhängigen Tabak-Transformanten (in der **Fig.** 2 markiert mit "A") bestimmt, welche entweder die native LT-B-codierende Region (offene Balken) oder LT-B-SEKDEL (ausgefüllte Balken) codierende Region mit einer ER-Retentionssequenz Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu (SEKDEL) am LT-B-Gen-C-Terminus trugen. Extrakte aus den Tabaktransformanten in PBST (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, 2 mM PMSF, 20 mM Ascorbat und 0,05% TWEEN) wurden bei 12000 × g zentrifugiert, und die erhaltenen Überstände wurden durch Gangliosid-abhängigen ELISA von Beispiel 7 getestet. Die 4 Transformanten, welche die höchsten Antigenspiegel nach Abziehen des Hintergrunds aufzeigten, sind in der **Fig. 2A** gezeigt.

Beispiel 9

[0199] Dieses Beispiel veranschaulicht die Anti-LT-B-Antikörper-Immunpräzipitations-Analyse von Tabaktransformanten, enthaltend Gene, codierend für LT-B und LT-B-SEKDEL.

[0200] Die **Fig. 3** zeigt ein Radiogramm von Immunpräzipitaten unter Verwendung von Antikörpern gegen LT-B. Immunpräzipitate von Extrakten aus radiaktiv markierten transgenen Tabakblättern, exprimierend LT-B (Spuren 1 und 2), LT-B-SEKDEL (Spuren 3 und 4), oder negativen Kontrollpflanzen (Spuren 5 und 6) wurden verwendet. Die Blätter wurden abgeschnitten, und die petiolare bzw. Blattstiel-Aufnahme von ^{35}S-markiertem Met und Cys wurde zwei Stunden lang bei Raumtemperatur und Beleuchtung von 5380 Lux durchgeführt. Die Blätter wurden in einem PYREX-Ten Broeck-Gewebezerkleinerer mit 0,15 mm Spalt homogenisiert und in IP-Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 0,2 M NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 5 mM DTT, 0,1% BSA und 1% Triton X 100) extrahiert. Die Extrakte wurden 10 Minuten lang bei 12000 × g zentrifugiert, und der Überstand wurde immunpräzipitiert (Mason et al., Plant Mol. Biol. 11, 845–856 (1988)), und in Laemmli-Probenpuffer eluiert, in einem kochenden Wasserbad 5 Minuten lang erhitzt (+), und danach auf einem 15%igen SDS-Polyacyrlamidgel laufen gelassen. Die Migration von vorgefärbten Breitband-Molekulargewichts-Proteinstandards ist auf der linken Seite angegeben. Die Migration von bakteriell synthetisiertem Protein war ähnlich zu LT-B-SEKDEL.

Beispiel 10

[0201] Dieses Beispiel veranschaulicht die Analyse der LT-B-SEKDEL-Proteine in Tabaktransformanten durch Größenausschluß-Chromatographie, ausgelegt, um die Oligomerisierung des Proteins in Transformantenzellen zu demonstrieren.

[0202] Tabak-Transformanten-Zellextrakte wurden hergestellt und durch Größenausschlußchromatographie analysiert. Blätter von Tabakpflanzen, welche hinsichtlich LT-B-SEKDEL transgen waren, wurden mit PBS, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF und 20 mM Ascorbat extrahiert.

[0203] Nach Zentrifugation bei 12 000 × g wurde der Überstand auf eine Säule von Sephacryl® 200 aufgetragen und mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl, 20 mM EDTA, 2 mM PMSF, 0,05% Triton X-100, eluiert.

Fraktionen wurden aufgefangen und durch Gangliosidabhängigen LT-B-ELISA geassayt (O.D.405-Profil). Ein repräsentatives Chromatogramm ist in der Fig. 4 gezeigt. Die Pfeile in der Fig. 4 markieren die Positionen des Leervolumens (Vo) und Molekulargrößen-Standards. Der hauptsächliche Antigen-Peak eluierte bei einer M_r von 38 kDa, koinzident mit der Position von rLF-B aus E. coli.

Beispiel 11

[0204] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung von Tabakblattextrakten zur Verabreichung an Mäuse, um sekretorische Immunantworten in Mäuse-GALT gegen das LT-B-Protein zu induzieren, welches eine C-terminate ER-Retentionssequenz SEKDEL enthält (LT-B-SEKDEL).

[0205] Tabakblätter, welche entweder LT-B oder LT-B-SEKDEL exprimieren, wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Waring-Blender homogenisiert. Das lösliche Protein wurde in PBST, 40 mM Ascorbat, 20 mM EDTA und 1 mM PMSF, extrahiert. Der unlösliche Pflanzen-Zell-Debris wurde durch Zentrifugation bei 15000 × g entfernt. Dieser Pflanzenextrakt wurde mit 40% Ammoniumsulfat bei 4°C präzipitiert. Der nach Zentrifugation bei 15000 × g erhaltene Überstand wurde weiter bei 60% Ammoniumsulfat Endkonzentration bei 4°C präzipitiert, und das nach Zentrifugation bei 15000 × g derartig erhaltene Präzipitat wurde in PBS solubilisiert und für orale Immunisierungsuntersuchungen verwendet.

Beispiel 12

[0206] Dieses Beispiel veranschaulicht die Induktion von Anti-LT-B-Serum- und -Schleimhaut-Immunantworten in Mäusen nach Fütterung mit Extrakten aus Tabakpflanzen, transformiert mit einem Vektor, codierend das LT-B-SEKDEL-Protein.

[0207] Balb/c-Mäuse erhielten einen löslichen Extrakt der Tabakpflanzenblätter von Beispiel 10, welche das LT-B-SEKDEL exprimierten. Eine andere Gruppe von Mäusen erhielt rLT-B, gereinigt aus E. coli, der das Antigen von einem rekombinanten Plasmid aus exprimierte. Eine Antigen-äquivalente Dosis (wie bestimmt mittels ELISA) von 12,5 µg wurde jeder Maus durch Gabe an den Tagen 0, 4, 21 und 25 verabreicht. Die Serum- und Schleimhaut-Antikörperantworten wurden mittels ELISA hinsichtlich Antikörpern aus Proben, abgesammelt an den Tagen 30–32, untersucht. Anti-LT-B-Antikörper wurden sowohl in Serum- als auch Schleimhaut-Extrakten der getöteten Mäuse nachgewiesen.

[0208] Die Isolierung von Serum- und Schleimhautextrakten aus Mäusen erfolgte, indem die Mäuse zuerst mit Xylazin/Ketamin betäubt wurden. Das Serum wird durch Herzpunktur entnommen und die Mäuse werden durch Genickbruch getötet. Der Dünndarm wird vom Duodenum bis zum Blinddarm entfernt und in ein verschlossenes Kunststoffröhrchen gegeben, welches eiskaltes EDTA/STI (50 mM EDTA, 0,1 mg/ml Sojabohne-Trypsin-Inhibitor) enthielt. Der Darm wird in EDTA/STI unter Verwendung eines Gewebehomogenisators homogenisiert, und dann bei 32 000 × g zentrifugiert. Der Überstand wird über Nacht lyophilisiert, resuspendiert und dialysiert in TEAN-Puffer und mittels ELISA geassayt. ELISA hinsichtlich Maus-IgA und -IgG gegen LT-B: Polystyrol-ELISA-Platten wurden mit Gangliosid G_{MX} wie oben stehend beschrieben beschichtet. 100 µl LT-B wurden in jede Vertiefung zugesetzt (10 µg LT-B/Vertiefung) und 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. In einer getrennten 96-Vertiefungsplatte (Verdünnungsplatte) wurden 2-fach-Verdünnungen einer 1/16-Verdünnung von Serum aus immunisierten Mäusen hergestellt (in der ersten Vertiefung). Verdünnungen wurden in mindestens 12 Vertiefungen (125 µl in 125 µl) ausgeführt. Platten, welche LT-B enthielten, wurden viermal mit PBST gewaschen, und nach der letzten Waschung wurden 100 µl der Verdünnungen des Serums (niedrigste zur höchsten Konzentration) von der Verdünnungsplatte auf die LT-B-beschichtete Platte aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mit PBST gewaschen, und 100 µl der 1:4-Verdünnung von mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Kaninchen-Antiserum gegen Maus-IgG (Sigma A1902) in PBST wurden in jede Vertiefung zugesetzt. Die Platten wurden viermal mit PBST gewaschen, und 100 µl 1 mg/ml Nitrophenyl-Substrat in Diethanolamin-Puffer wurden in jede Vertiefung zugesetzt. Nach Inkubation während 10 bis 30 Minuten wurde die Reaktion mit 25 µl 3 N NaOH pro Vertiefung gestoppt. Die Extinktion der Vertiefungen wurde bei 410 nm abgelesen. Der ELISA zum Abschätzen des IgA in Schleimhautmaterial war ähnlich wie für IgG, außer daß das Material mit einer 1:500-Verdünnung von Ziegen-Antiserum gegen Maus-IgA (Sigma M7144) sondiert wurde, welches seinerseits mit einer 1:100-Verdünnung von mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Kaninchen-Antiserum gegen Ziegen-IgG (Sigma A7650) sondiert wurde. Die Werte für IgG und IgA wurden aus einer Eichkurve mit gereinigten Maus-Myelomproteinen (MOPC315), gA (IgA12); MOPC21 (gGil Litton Bionetics, Inc., Charleston, SC) bestimmt. Die Kreuzreaktivität wurde durch Kreuzungsreagenzien bestimmt (d. h. IgG, gebunden an Platten zur Überprüfung von Antiserum gegen IgA). Die Kreuzreaktivität für unsere Reagenzien = 2,4% für IgG und 6,7% für IgA. Die Werte wurden hinsichtlich der Kreuz-

reaktivität berichtigt. Die Schleimhaut-IgA-Werte wurden ferner hinsichtlich einer Kontamination der Schleimhaut mit Serum korrigiert (korrigierte Schleimhaut-IgA = Schleimhaut-IgA – [Serum-IgA × [Schleimhaut-IgG/Serum-IgG]]).

[0209] Nachstehend erscheint die Formel, verwendet zur Berechnung der Menge an Antigenspezifischen IgG (oder IgA) in den unbekannten Proben. Eine lineare Regressionslinie wird für den Standard und den Wert (in ng/ml) des linearen Mittelpunkts (angenommenerweise gleich 1,0) ermittelt. Jede Unbekannte wird dann separat durch Heranziehen von fünf Datenpunkten entlang des linearen Bereichs jeder Verdünnungskurve, Feststellen der Steigung, des y-Achsenabschnitts, und letztendlich der Verdünnung, welche den Extinktionswert von 1,0 (d. h. linearer Mittelpunkt) ergibt, ausgewertet. Diese Verdünnung wird dann mit dem Standardwert in dem Produkt multipliziert, wobei durch 1000 dividiert wird, um einen Wert in µg/ml auszugeben.

Steigung (b) = $(Sxy – [(Sx)(Sy)]/n)/(SX^2 – (Sx)^2/n)$

y-Achsenabschnitt (a) = (Sy/n) – (Steigung(b)/n)

Log Stdx = [1,0 – y-Achsenabschnitt (a)]/Steigung (b)

Std (x) = Exp (Log Std (x))

Beispiel 13

[0210] Dieses Beispiel veranschaulicht die Fähigkeit von Antikörpern von Beispiel 12 aus Mäusen, die mit Pflanzen-abgeleitetem LT-B-SEKDEL gefüttert wurden, um das Enterotoxin LT zu neutralisieren.

[0211] Wie in der Tabelle I gezeigt, waren sowohl Serum- als auch Schleimhaut-Immunglobuline aus oral mit LT-B-SEKDEL-transformiertem Pflanzengewebe immunisierten Tieren in der Lage, die biologische Aktivität von LT zum gleichen Ausmaß wie Serum- und Schleimhaut-Antikörper aus Tieren, welche oral mit einer Antigen-Äquivalent-Dosis von bakteriellem rLT-B immunisiert worden waren, zu neutralisieren. Diese Befunde zeigen, daß Pflanzenexprimierte Antigene native Epitope beibehalten und somit einen potentiellen Wert als Impfstoffe besitzen.

Tabelle I

ANTIKÖRPERPROBEN	TITER
Bakterielle LT-B-Seren	320
Pflanzen-LT-B-KDEL-Seren	320
Bakterielle LT-B-Schleimhaut	5120
Pflanzen-LT-B-KDEL-Schleimhaut	5120

[0212] Neutralisierung von Nebennierenzell-Aktivität von E. coli-Enterotoxin. Der Nebennieren-Zell-Assay wurde unter Verwendung von Maus-Y-1-Adrenalzellen in Minikultur durchgeführt. Eine ausgewählte Dosis von Toxin wurde mit Verdünnungsreihen von vereinigten Seren oder Schleimhautproben aus Mäusen vermischt, welche entweder mit Tabakpflanzenextrakt (Pflanzen-LT-B-KDEL) oder mit bakteriell abgeleitetem LT-B (bakterielles LT-B) oral immunisiert worden waren. Im Anschluß an eine Präinkubation während einer Stunde bei 37°C wurden die Proben auf eine Monoschicht von Maus-YI-Adrenalzellen (ATCC CCL79) aufgetragen, und die Inkubation wurde 18 Stunden lang fortgesetzt. Der Titer ist als der Kehrwert der höchsten Serumverdünnung definiert, welche eine vollständige Neutralisation der biologischen Aktivität von 50 Pikogramm (ungefähr 10 Rundungs-Dosierungen) Toxin zeigt.

Beispiel 14

[0213] Dieses Beispiel veranschaulicht die Transformation von Kartoffel mit pLTK110 und die Selektion von transgenen Pflanzen.

[0214] Der T-DNA-Plasmidvektor pLTK110 von Beispiel 1 wurde verwendet, um Kartoffelpflanzen unter Verwendung von Agrobacterium-vermittelter Transformation zu transformieren. Das Plasmid pLTK110 wurde zuerst mit Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Clonetech Laboratories, Palo Alto, CA) hinein mobilisiert durch

das direkte Frier-Tau-Verfahren, An G. Meth. Enzymol. 153: 292–305 (1987). Transformierte Klone wurden isoliert durch Selektion auf 50 mg/l Kanamycin, und Plasmid wurde aus Flüssigkulturen durch alkalische Lyse präpariert. Die Struktur von Plasmiden aus Agrobacterium wurde durch Restriktionsendonuklease-Verdau bestätigt. Positive Klone wurden für die Transformation von Kartoffelpflanzen verwendet, wie beschrieben in Wenzler H., Mignery G., May G., Park W., Plant Science 63, 79–85 (1989).

[0215] Die Kartoffel-Varietät FL1607 (erhältlich von Frito-Lay, Inc., Rhinelander WI) wurde aseptisch in sterilen Medien, enthaltend Basalmedium (MS-Salze, 100 mg/l myo-Inositol, 0,4 mg/l Thiamin-HCl und 60 mM Saccharose, verfestigt mit 0,8% Agar) in GA-7-Gefäßen (Magenta Corp.), bei 25°C unter diffusem Fluoreszenzlicht aus gleichen Anzahlen von kaltweißen und "Grow-lux"(Sylvania)-Lampen, Energiefluß 10 W/m^2, mit einer 16-Stunden-Lichtperiode abwechselnd mit 8 Stunden Dunkelheit, kultiviert. Blätterstreifen mit einer Breite von 2–3 mm wurden unter aseptischen Bedingungen aus 3–4 Wochen alten kultivierten Trieben geschnitten und mit der abaxialen Seite nach unten auf 100 × 20 mm große Petriplatten plaziert, welche Stufe-I-Medium enthielten (Basalmedium, ergänzt mit 10 mg/l Gibberellinsäure, 0,2 mg/l Naphthalinessigsäure und 2,24 mg/l 6-Benzylaminopurin), und 4 Tage lang bei 25°C mit 16 Stunden Licht pro Tag inkubiert.

[0216] Flüssigkulturen von Agrobacterium wurden in 5 ml YEP-Medium (10 g/l Bacto-Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0) bei 29°C aus einer einzelnen Kolonie herangezüchtet, welche auf mit 15 g/l Agar verfestigtem YEP-Medium herangezogen worden war. Blattstreifen wurden 10 Minuten lang in eine sterile Petrischale gebracht, enthaltend eine 1:50-Verdünnung mit sterilem Wasser einer gesättigten Flüssigkultur von A. tumefaciens, welcher das zu transferierende Plasmid beinhaltete. Überschüssige Flüssigkeit wurde durch Abtrocknen der Blattstreifen auf sterilen Papierhandtüchern entfernt, und die Explantationen wurden in Stufe-I-Medium zurückgebracht und wie oben stehend 3–4 Tage lang inkubiert, bis ein leichter Ring von bakteriellem Wachstum umgebend um die Blatt-Explantate sichtbar war. Die Explantate wurden dann in GA-7-Gefäße überführt, enthaltend Stufe-I-Medium, supplementiert mit 50 mg/l Kanamycinsulfat und 500 mg/l Carbenicillen (die Antibiotika wurden vor der Verwendung mittels Filter sterilisiert).

[0217] Um Triebe zu erzeugen, wurden die Explantationen wie oben stehend beschrieben 12 Tage lang inkubiert und dann in GA-7-Gefäße überführt, enthaltend Stufe II-Medium (Stufe I-Medium ohne Naphthalinessigsäure und enthaltend 50 mg/l Kanamycinsulfat und 500 mg/l Carbenicillen). Als sich Triebe, enthaltend mindestens zwei Knoten bzw. Nodien und mit einem Maß von mindestens 2 cm Größe, gebildet hatten, wurden sie in Bewurzelungsmedium transferiert (Basalmedium, enthaltend 50 mg/l Kanamycinsulfat und 500 mg/l Carbenicillen). Als sich Wurzeln gebildet hatten (nach ungefähr 2 Wochen), konnten die Triebe in Töpfe mit Erdboden überführt und in einer Wachstumskammer oder einem Gewächshaus herangezogen werden.

[0218] Um Transformanten hinsichtlich der Expression der Proteine LT-B und LT-B-SEKDEL in Wurzelknollen zu untersuchen, erzeugten wird Mikroknollen in aseptischer Gewebekultur gemäß Perl A., Aviv L., Willmitzer L., Galum E., Plant Science 73: 87–89 (1991). Auf Bewurzelungsmedium kultivierte Triebe wurden wachsen gelassen, bis sie 5–8 Knoten aufwiesen, und wurden unter sterilen Bedingungen zerschnitten. Individuelle Knoten wurden in Petrischalen, enthaltend Knollenbildungs-Medium (0,5 × MS-Salze, 8% Saccharose, 5 mg/l Kinetin und 5 mg/l Ancymidol [Handelsname A-Rest, DowElanco, Indianapolis, IN)) im Dunklen bei 18°C kultiviert. Nach 2 Wochen bildeten sich Mikroknollen am Axillar-Meristem, wie gezeigt in der **Fig. 8**. Die Mikroknollen wurden abgeschnitten und extrahiert, wie beschrieben in Beispiel 8, und hinsichtlich LT-B mittels ELISA geassayt, wie beschrieben in Beispiel 7.

Beispiel 15

[0219] Dieses Beispiel veranschaulicht die ELISA-Analyse von Mikroknollen aus Kartoffelpflanzen-Transformanten hinsichtlich der Expression von LT-B und LT-B-SEKDEL.

[0220] Die Expression des LT-B codierenden Gens in Mikroknollen aus Kartoffelpflanzen-Transformanten wurde durch Quantifizierung der Spiegel an rekombinanten Proteinen, quantifiziert mittels ELISA, geassayt, wie gezeigt in der **Fig.** 2. Die ELISA-Spiegel von rekombinantem Protein wurden aus löslichen Protein-Extrakten aus unabhängigen Kartoffel-Transformanten bestimmt (markiert "B" in der **Fig.** 2), welche entweder die native LT-B codierende Region (offene Balken) oder die LT-B-SEKDEL (gefüllte Balken) codierende Region trugen, in welcher das LT-B-Gen modifiziert war, um die Sequenz Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu (SEKDEL) für die Retention im endoplasmatischen Reticulum (ER) am C-Terminus des LT-B-Gens zu codieren. Extrakte aus den Kartoffeltransformanten in PBST (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 2 mM PMSF, 20 mM Ascorbat und 0,05% TWEEN) wurden bei 12 000 × g zentrifugiert, und der erhaltene Überstand wurde mittels ELISA wie beschrieben in Beispiel 7 getestet. Die 4 Transformanten, welche die höchsten Antigenspiegel zeigten, sind in

der **Fig.** 2 gezeigt.

Beispiel 16

[0221] Dieses Beispiel veranschaulicht das Wachstum von Kartoffelpflanzen-Transformanten für die Knollenproduktion.

[0222] Diejenigen individuellen Transformanten, deren Mikroknollen die höchsten Spiegel an LT-B- oder LT-B-SEKDEL-Akkumulation (wie beschrieben in Beispiel 14) zeigten, wurden durch aseptisches Kultivieren der Knoten auf Bewurzelungsmedium kloniert. Bewurzelte Triebe wurden in Erde überführt und in einer Wachstumskammer bei 22°C mit 16 h Licht am Tag herangezogen und nach Bedarf mit Peters "Plant Starter" 9-45-15-Dünger (Hiummert Seed Co., St. Louis, MO) bewässert. Nach 4–6 Wochen hatten sich die Pflanzen zu einer Höhe von etwa 10 cm entwickelt, und sie wurden in eine Kurztag-Wachstumskammer (8 Stunden Licht am Tag) bei 18°C überführt und ohne Dünger bewässert. Es wurde lediglich genug Wasser, um die Pflanzen zu halten, verwendet, weil festgestellt wurde, daß eine Überwässerung eine Verrottung der sich entwickelnden Wurzelknollen verursachen könnte. Nach 4–6 Wochen hatten sich Knollen in variierender Größe von 1 cm bis 4 cm Durchmesser gebildet, wie gezeigt in der **Fig. 9**. Die Knollen wurden entfernt, von Erdreich freigewaschen, an der Luft getrocknet und im Dunklen verschlossen in Polyethylen- oder Papierbeuteln bei 4°C aufbewahrt, bis sie für Fütterungsuntersuchungen verwendet wurden. An Licht belassene Knollen entwickelten festgestelltermaßen eine grüne Färbung, welche anzeigt, daß Toxine in der Haut vorhanden sind, welche bei einer Verfütterung an Tiere schädlich sein könnten. Nach Entfernung der Knollen wurden die Pflanzen unter Kurztag-Bedingungen, wie oben stehend beschrieben, für die weitere Knollenentwicklung kultiviert.

Beispiel 17

[0223] Dieses Beispiel beschreibt die Herstellung und Selektion von transgenen Kartoffelpflanzen, welche manipuliert sind, um LT-A und LT-B innerhalb der gleichen Zellen des Knollengewebes herzustellen.

[0224] pLT100 und pLT101 von Beispiel 3 wurden verwendet, um Agrobacterium zu transformieren, wie beschrieben in Beispiel 14. Nach der Bestätigung der Plasmidstruktur in Agrobacterium, wie beschrieben in Beispiel 14, wurden die entsprechenden Stämme verwendet, um die Kartoffelvarietät FL1607 zu transformieren, wie beschrieben in Beispiel 14. Mikroknollen wurden erzeugt, wie beschrieben in Beispiel 14, und hinsichtlich der Expression von LT-A- und LT-B-Genen mittels RNA-Blot-Analyse getestet.

[0225] Gesamt-RNA wurde aus Mikroknollen durch Zerkleinern von 50 mg Gewebe in einem 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit einem Pellet-Pistill in 0,25 ml Puffer (0,2 M Tris-HCl, pH 8,6; 0,2 M NaCL; 20 mM EDTA; 2% SDS) extrahiert. Das Homogenat wurde 2 Minuten lang gründlich mit 0,25 ml Phenol (äquilibriert mit TE, pH 8,0) und 0,25 ml $CHCl_3$ gemischt und in einer Mikrozentrifuge bei 14 000 × g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde zurückgewonnen und mit 0,1 Volumen 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 und 2,5 Volumen Ethanol gemischt und über Nacht bei –20°C aufbewahrt, um Nukleinsäuren zu fällen. Die Proben wurden bei 14 000 × g 10 Minuten lang zentrifugiert, um Nukleinsäuren zu pelletieren, und die Pellets wurden mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet und wiederum in 50–100 µl sterilem Nuklease-freien Wasser gelöst. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration durch spektrophotometrische Extinktion bei 260 nm wurden 5 µg RNA aus jeder Probe aliquotiert und in 20 µl Gesamtvolumen denatµriert, enthaltend 10 µl Formamid, 3,5 µl Formaldehyd und 20 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), pH 7,0, 40 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, und bei 65°C 15 Minuten lang erwärmt. Die Proben wurden dann mit 2 µl 50% Glycerin, 20 mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau gemischt und auf einem 1,5%igem Agarosegel in 20 mM MOPS, pH 7,0, 40 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA bei 80 V während 1,5 Stunden elektrophoretisch behandelt.

[0226] Die RNA in dem Agarosegel wurde dann auf eine Nylonmembran (Zeta-Probe, BioRad, Hercules, CA) durch Kapillar-Blotten in 25 mM Natriumphosphat, pH 6,5, 16 Stunden lang geblottet und mittels UV-Bestrahlung unter Verwendung eines Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA) oder durch Backen bei 80°C während 1 Stunde an die Membran vernetzt. RNA wurde (zur Bestätigung der Auftragdichte) durch Färben mit 0,25% Methylenblau in 0,1 M Natriumacetat, pH 5,0, und Entfärben mit Wasser auf dem Blot sichtbar gemacht. Die Membran wurde dann 1 Stunde lang in Hybridisierungspuffer (0,25 M Natriumphosphat, pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS) bei 65°C inkubiert, wonach der Puffer durch frischen Hybridisierungspuffer bei 65°C ersetzt wurde, welcher ungefähr 10 cpm/ml statistisch geprimte ^{32}P-markierte DNA-Sonde unter Verwendung codierender Sequenzen von LT-A und LT-B als Matrize enthielt. Die Matrizen waren das XhoI/SacI-Fragment aus pLTA210 von Beispiel 2 und das XhoI/SpeI-Fragment aus pLTB210 von Beispiel 1. Die Membran wurde 16 Stunden lang bei 65°C inkubiert, dann zweimal mit Waschpuffer 1 (40 mM Natriumphospat, pH 7,2; 5% SDS, 1 mM EDTA)

20 Minuten lang bei 65°C, sowie zweimal mit Waschpuffer 2 (40 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 1% SDS, 1 mM EDTA) 20 Minuten lang bei 65°C gewaschen, an der Luft getrocknet und an Kodak X-Omat AR-Film mit einer Verstärkerfolie 4 Tage lang bei –80°C exponiert.

[0227] Das in der Fig. 10 gezeigte, resultierende Radiogramm zeigt, dass Sequenzen, codierend sowohl LT-A (A-Sonde) als auch LT-B (B-Sonde), in RNA aus Pflanzen vorhanden sind, welche mit pLT100 (Proben 0–16, 0–20) und pLT101 (1–9, 1–11) transformiert worden sind. Obwohl das Experiment hinsichtlich der Absolutspiegel von LT-A und LT-B codierender mRNA nicht quantitativ ist, zeigt es, dass die mit pLT100 transformierten Pflanzen ein günstigeres Verhältnis von LT-A- zu LT-B-mRNA zu besitzen scheinen.

Beispiel 18

[0228] Dieses Beispiel dient zur Veranschaulichung eines Verfahrens zum Testen der Knollen von Beispiel 17 (oben stehend) hinsichtlich des Vorhandenseins von Holotoxin-LT.

[0229] Knollen (von Beispiel 17) aus mit pLT100 oder pLT101 von Beispiel 16 transformierten Pflanzen wurden extrahiert und, wie in Beispiel 11 beschrieben, mit 40% und 60% Ammoniumsulfat präzipitiert. Das Material wird dann in dem adrenalen Y-1-Zell-Assay hinsichtlich LT, wie beschrieben in Beispiel 13, verwendet.

[0230] Alternativ dazu wird der Extrakt durch Gangliosid-abhängigen ELISA auf LT-A gestestet, wie beschrieben in Beispiel 7, außer dass die Antikörpersonde eher spezifisch für LT-A als für LT-B ist.

Beispiel 19

[0231] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung von Kartoffeln zur Verabreichung an Mäuse, zum Induzieren einer sekretorischen Immunantwort in Maus-GALT gegen das LT-B-Protein, welches eine C-terminale ER-Retentionssequenz SEKDEL enthält (LT-B-SEKDEL).

[0232] Fütterung von Mäusen mit Kartoffelknollen: Gruppen von Balb/C-Mäusen, welche einzeln in Käfigen gehalten wurden, wurden mit 5 Gramm Antigen-exprimierenden Kartoffelscheiben an den Tagen 0, 4, 14 und 18 gefütter. Die Mäuse wurden von Futter und Wasser ferngehalten vor der Fütterung und bis die gesamten 5 Gramm Kartoffelscheiben aufgebraucht worden waren. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen mit nicht-transformierten Kartoffeln gefüttert. Am Tag 28 wurden die Tiere getötet, und Serum- und Schleimhautmaterialien wurden mittels ELISA hinsichtlich des Vorhandenseins von Anti-LT-B-Antikörpern untersucht. Die Fig. 6 zeigt, dass Mäuse, welche mit transformierten Knollen gefüttert wurden, signifikante Spiegel an Serum-IgG und Schleimhaut-IgA entwickelten, gerichtet gegen das (bakterielle) Fremd-Antigen, das in den Knollen exprimiert worden war.

Beispiel 20

[0233] Dieses Beispiel veranschaulicht die Konstruktion eines synthetischen LT-B-Gens mit einer modifizierten Nukleotidsequenz, welche Codons aufweist, optimiert für eine Expression in Pflanzen im Gegensatz zu Bakterien.

[0234] Die codierende Sequenz von LT-B wurde hinsichtlich ihrer Codon-Verwendung analysiert. Sie wurde mit der Häufigkeit der Codon-Verwendung in reichlich vorhandenen Proteinen verglichen, welche in Kartoffel und Tabak und Pflanzen im allgemeinen gefunden werden, wie gezeigt in der Tabelle 2.

Tabelle 2

AA	CODON	LT-B		Kartoffel	Tabak
		Zählung	% Verwendung	% Verwendung	% Verwendung
ARG	CGA	-	-	14	11,2
	CGC	1	25	6,5	9
	CGG	-	-	4,4	5
	CGU	-	-	23	21
	AGA	2	50	28	27
	AGG	1	25	24	27

LEU	CUA	3	50	10.4	9
	CUC	-	-	11.6	16
	CUG	1	16.7	8.5	8
	CUU	-	-	28	29
	UUA	2	33.3	17	12
	UUG	-	-	24	26
SER	UCA	2	20	25	20
	UCC	1	10	12	14
	UCG	2	20	6	6
	UCU	2	20	27	30
	AGC	1	10	10	14
	AGU	2	20	4	17
THR	ACA	6	55	31	32
	ACC	3	27	16	21
	ACG	2	18	6	8
	ACU	-	-	47	39
PRO	CCA	-	-	39	43
	CCC	2	67	15	13
	CCG	1	33	7.5	7
	CCU	-	-	39	37
ALA	GCA	3	50	32	27
	GCC	1	16.6	15	21
	GCG	1	16.6	5.2	5
	GCU	1	16.6	47	47
ASN	AAC	2	33	31	49
	AAU	4	67	69	51
GLY	GGA	-	-	39	35
	GGC	3	100	16	17
	GGG	-	-	12	11.5
	GGU	-	-	33	37
VAL	GUA	1	25	16	15.5
	GUC	2	50	15	21
	GUG	-	-	23	22
	GUU	1	25	46	42
LYS	AAA	7	70	48	43
	AAG	3	30	52	57
GLN	CAA	3	60	64	63

	CAG	2	40	36	37
HIS	CAC	-	-	32	46
	CAU	1	100	68	64
GLU	GAA	7	70	60	51
	GAG	3	30	40	49
ASP	GAC	3	60	28	36
	GAU	2	40	72	64
TYR	UAC	-	-	44	47
	UAU	4	100	56	53
CYS	UGC	-	-	42	47
	UGU	2	100	58	53
PHE	UUC	-	-	36	43
	UUU	2	100	64	57
ILE	AUA	4	33	18	18
	AUC	3	25	26	28
	AUU	5	42	56	54
MET	AUG	4	100	100	100
TRP	UGG	1	100	100	100
TER	UAA	-	-	50	42
	UAG	-	-	16	16
	UGA	1	100	34	42

[0235] Die Codons des nativen LT-B-Gens, welche eine geringe Häufigkeit oder eine Häufigkeit von Null bei der Verwendung in Pflanzen aufweisen, wurden modifiziert, um mit den Pflanzen-Codons übereinzustimmen, welche in den Genen für die reichlich exprimierten Pflanzenproteine verwendet werden. Die Segmente von Codons mit möglichen Poly-A-Signalsequenzen wurden zu anderen Codons für die gleichen Aminosäuren modifiziert. Das Codon für Asparagin, Position 90 und/oder Treonin, Position 92, im Gycosylierungs-Signal wurden zu Codons von anderen Aminosäuren modifiziert. Die Austausch-Aminosäuren wurden durch Beobachten des Effekts des Reste-Austauschs in der Sekundärstruktur durch Befolgen der Strukturvorhersage nach Chou und Fasman und durch Computersimulation in der 3-dimensionalen Struktur von LT-B bestimmt. Das Designer-Gen wurde in Abschnitten von ~50 Nukleotiden mit komplementären Sequenzen synthetisiert und wie nachstehend beschrieben zusammenligiert.

[0236] Die Sequenz dieses neu entworfenen LT-B-Gens wird nachstehend in der Tabelle 3 zusammen mit dem nativen Gen und der Aminosäuresequenz, für welche sie codieren, gezeigt.

[0237] Betrachtet man zuerst die Klonierung des synthetischen LT-B-Gens, so zeigen die Fig. 12 und Fig. 13 die Konstruktion der A-Satz-Region, aufgebaut aus den Segmenten A1, A2, A3 und A4 (jeweilig SEQ ID Nr.: 12–15), welche wie folgend hergestellt wurden.

[0238] Die Fig. 12 zeigt die Oligonukleotide, umfassend den A-Satz von Fragmenten des synthetischen Gens. Die zur Konstruktion des designten synthetischen Gens für LT-B synthetisierten Oligonukleotide sind in Anlagerung an ihre komplementären Stränge abgebildet. Die 5'- und die 3'-Überhänge zum Zulassen der Anlagerung bzw. des Annealing und der Ligation an die benachbarten Fragmente sind gezeigt. Die nützlichen Restriktionsenzym-Stellen zum Gestatten der Klonierung sind gezeigt.

[0239] Die Fig. 13 zeigt, dass komplementäre Oligonukleotide durch Elektrophorese auf einem Sequenziergel mit 6% Harnstoff, 12% Polyacrylamid gereinigt wurden. Die Banden wurden durch UV-Shadowing beobachtet, herausgeschnitten und in einem Mikrozentrifugenröhrchen zerkleinert. Die Oligonukleotide wurden über Nacht in Wasser eluiert und bei 12 000 × g zentrifugiert, um das Acrylamid zu entfernen. Der Überstand wurde entfernt und durch Glaswolle filtriert, um jedwedes Polyacrylamid zu entfernen. Die Oligonukleotide wur-

den quantifiziert und mit Polynukleotidkinase und ATP kinasiert. Äquimolare Verhältnisse der Oligonukleotide wurden vermischt und unter Verwendung der thermostabilen Ligase "Ampligase" gemäß den Angaben des Herstellers ligiert. Der A-Satz wurde dann in die KpnI- und PstI-Stellen des pKSBluescript-Plasmids ligiert.

[0240] Die Fig. 14 und Fig. 15 zeigen die Konstruktion einer B-Satz-Region von Fragmenten, aufgebaut aus den Segmenten B1, B2 und B3 (jeweils SEQ ID Nr.: 16–18), welche wie folgend hergestellt wurden.

[0241] Die Fig. 14 zeigt die Oligonukleotide, umfassend den B-Satz von Fragmenten des synthetischen Gens. Oligonukleotide, welche den B-Satz von Fragmenten des synthetischen Gens ausmachen.

[0242] Die Oligonukleotide, synthetisiert zum Konstruieren des designten synthetischen Gens für LT-B, sind in Anlagerung an ihre komplementären Stränge abgebildet. Die 5'- und 3'-Überhänge zum Zulassen von Annealing und Ligation an die benachbarten Fragmente sind gezeigt. Die zum Gestatten einer Klonierung nützlichen Restriktionsenzymstellen sind gezeigt.

[0243] Die Fig. 15 zeigt, dass die komplementären Oligonukleotide durch Elektrophorese auf einem Sequenziergel von 6% Harnstoff, 12% Polyacrylamid, gereinigt wurden. Die Banden wurden durch UV-Shadowing beobachtet, ausgeschnitten und in einem Mikrozentrifugenröhrchen zerkleinert. Die Oligonukleotide wurden über Nacht in Wasser eluiert und bei 12 000 × g zentrifugiert, um das Polyacrylamid zu entfernen. Der Überstand wurde entfernt und durch Glaswolle filtriert, um jedwedes Polyacrylamid zu entfernen. Die Oligonukleotide wurden quantifiziert und mit Polynukleotidkinase und ATP kinasiert. Äquimolare Verhältnisse der Oligonukleotide wurden gemischt und annealt. Benachbarte Segmente vom B-Satz wurden aneinander ligiert, und das richtige Ligationsprodukt durch PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf 2%igem Agarosegel elektrophoretisch behandelt, und das Fragment mit der korrekten Größe wurde durch Banden-Arrest gereinigt. Das B-Satz-Fragment wurde in einen mit einem T-Ende versehenen bzw. T-getailten pUC-19-Vektor kloniert.

[0244] Die Fig. 16 zeigt danach die Konstruktion der LT-B-Expressionsvektoren p210TH1 und p110TH1 durch das folgende Vorgehen: (1) Das A-Satz-Segment des synthetischen Gens (siehe nachstehend) wurde in den mit XhoI und PstI verdauten pBluescriptKS (Stratagene) ligiert, um pTH1-A zu bilden. Das Plasmid wurde in einem Dam-Methylase-mutanten E. coli-Stamm amplifiziert; (2) Der A-Block wurde durch Verdauen mit NcoI und ClaI herausgeschnitten und durch Elektrophorese auf einem 2%igem Agarosegel gereinigt; (3) Der B-Satz von Segmenten wurde in einen T-getailten Vektor ligiert, um pTH1-B zu bilden, und das Plasmid wurde in einem Dam-Methylase-mutanten E. coli-Stamm amplifiziert; (4) Der B-Satz wurde durch Verdau mit ClaI und PstI herausgeschnitten und durch Elektrophorese auf einem 2%igem Agarosegel gereinigt; (5) Der A- und der B-Satz wurden in den Vektor pIBT210.1, welcher mit NcoI und PstI verdaut worden war, ligiert, um pIBT210.1TH1 zu bilden; und (6) Die Expressionskassette aus pIBT210.1TH1 wurde mittels EcoRI und HindIII verdaut und in die EcoRI- und HindIII-Stellen des Agrobacterium-T-DNA-Vektors pIBT110.1 ligiert, um pIBT110.1TH1 zu bilden.

[0245] Die Tabelle 3 zeigt die Sequenz des neu designten LT-B-Gens zusammen mit dem nativen Gen und der Aminosäuresequenz, für welche sie codieren. Die Tabelle zeigt den Vergleich des nativen LT-B-Gens (N) und des Designer-LT-B-Gens (D). Die Codons wurden modifiziert, um mit der Codonverwendung in Pflanzen für die jeweilige Aminosäure übereinzustimmen. Die Basenänderungen sind durch Buchstaben in Fettdruck angegeben. Die Aminosäuresequenz wird unter der nativen Gensequenz gezeigt. Die unterstrichene Sequenz (an den Nukleotidpositionen 268 bis 273) repräsentiert die vermeintliche Polyadenylierungssignal-Sequenz in dem nativen Gen. Die Sequenz, codierend für die mRNA-destabilisierende Sequenz AUUUA in dem nativen Gen, ist unterstrichen (an Nukleotidpositionen 123 bis 127).

[0246] AT-reiche Regionen wurden modifiziert, um potenzielle mRNA-destabilisierende Sequenzen oder kryptische Splice-Stellen zu entfernen. Die Gene sind ohne die Sequenz gezeigt, welche für das bakterielle Leader-Peptid codiert.

Tabelle 3

```
N   GCT CCC CAG TCT ATT ACA GAA CTA TGT TCG GAA TAT CGC AAC ACA CAA
D   GCT CCA CAA TCC ATC ACT GAG CTT TGC TCT GAG TAC AGG AAC ACT CAG
    Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Asn Thr Gln
    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10  11  12  13  14  15  16

        54          63          72          81          90
N   ATA TAT ACG ATA AAT GAC AAG ATA CTA TCA TAT ACG GAA TCG ATG GCA
D   ATC TAC ACC ATC AAT GAC AAG ATC CTC TCT TAC ACT GAG AGC ATG GCT
    Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu Ser Met Ala
    17  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32

     99         108         117         126         135         144
N   GGC AAA AGA GAA ATG GTT ATC ATT ACA TTT AAG AGC GGC GCA ACA TTT
D   GGC AAG AGG GAG ATG GTG ATC ATC ACC TTC AAG TCA GGA GCC ACT TTC
    Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly Ala Thr
Phe
    33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46  47  48

    153         162         171         180         189
N   CAG GTC GAA GTC CCG GGC AGT CAA CAT ATA GAC TCC CAA AAA AAA GCC
D   CAG GTG GAG GTT CCA GGC TCA CAA CAC ATC GAT TCC CAG AAG AAG GCC
    Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala
    49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60  61  62  63  64
```

```
          198        207        216        225        234
N     ATT GAA AGG ATG AAG GAC ACA TTA AGA ATC ACA TAT CTG ACC GAG ACC
D     ATT GAG AGG ATG AAG GAC ACC TTG AGG ATC ACC TAC CTC ACT GAG ACC
      Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu ArG Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr
      65  66   67  68  69  70  71  72  73  74  75  76  77  78  79
80

      243        252        261        270        279        288
N     AAA ATT GAT AAA TTA TGT GTA TGG AAT AAT AAA ACC CCC AAT TCA ATT
D     AAG ATT GAC AAG CTC TGT GTG TGG AAC AAC AAG ACT CCA AAC TCC ATT
      Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile
      81  82  83  84  85  86  87   88  89  90  91  92  93  94  95
96

            297            306
N     GCG GCA ATC AGT ATG GAA AAC TGA
D     GCT GCC ATC AGC ATG GAG AAC TAA
      Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn Ter
      97  98  99  100 101 102 103 104
```

[0247] Die Tabelle 4 zeigt einen Vergleich des nativen LT-B-Gens und des designten synthetischen Gens in Bezug auf den AT-Gehalt, die Anzahl von CG-Doubletten und der TA-Doubletten. Man bemerke, dass "N" für die SEQ ID Nr.: 19 steht, "D" die SEQ ID Nr.: 20 ist und die Aminosäuresequenz SEQ WO: 21 ist.

Tabelle 4

	% AT	CG Doubletten	TA Doubletten
Natives LT-B-Gen	62,9	14	47
Synthetisches LT-B-Gen (TH1)	51,2	1	7

Beispiel 21

[0248] Dieses Beispiel veranschaulicht die Konstruktion eines Expressionsvektors für LT-B, bei welchem die bakterielle Signalsequenz fehlt, zur Erleichterung der Insertion von pflanzlichbevorzugten ER-Signalsequenzen, flankiert von NcoI-Stellen.

[0249] Die bakterielle Signalsequenz auf der LT-B codierenden Sequenz wurde entfernt, und eine NcoI-Stelle an der Stelle des reifen prozessierten N-Terminus von LT-B durch PCR-vermittelte Mutagenese wie folgend inseriert. Ein 104 bp großes PCR-Fragment wurde unter Verwendung von pDF82 als Matrize und der Primer 5'GGGGCCATGGCTCCCCAGTCTATT-3' (SEQ ID Nr.: 22) (NcoI-Stelle ist unterstrichen) und 5'TGCCATCGATTCCGTATA-3' (SEQ ID Nr.: 23) erhalten. Das PCR-Fragment wurde mit NcoI und ClaI verdaut und mit gleichermaßen verdautem pLTB210 von Beispiel 1 ligiert und gereinigt, um die bakterielle Signalsequenz zu entfernen, wodurch man pLTB212 erhielt. Die gesamte Expressionskassette in pLTB212, einschließlich des 35S-Promotors, TEV-Leaders, der LT-B codierenden Sequenz ohne die bakerielle Signalsequenz, und des Po-

lyadenylierungssignals und der 3'-flankierenden Sequenz von vpsB, wurde erhalten durch Verdau mit HindIII und EcoRI, und wurde mit gleichermaßen verdautem pBI101 ligiert und gereinigt, um die GUS-codierende Sequenz zu entfernen, wodurch man pLTB112 erhielt. Somit ist pLTB112 ein T-DNA-Vektor für die Agrobacterium-vermittelte Transformation von Pflanzenzellen unter Verwendung von Selektion auf Kanamycin-enthaltenden Medien.

[0250] Ein ähnliches Konstrukt, wobei der C-Terminus von LT-B modifiziert ist, um SEKDEL zu enthalten, wird durch Substitution mit pLTK210 von Beispiel 1 für pLTB210 hergestellt.

Beispiel 22

[0251] Dieses Beispiel veranschaulicht die Konstruktion eines Expressionsvektors für LT-B oder LT-B-SEKDEL, enthaltend eine von Pflanzen bevorzugte ER-Signalsequenz am N-Terminus.

[0252] Ein Plasmid, enthaltend die ER-Signalsequenz des vegetativen Speicherproteins VSPa von Sojabohne (Mason et al., 1988, Plant Mol. Biol, 11, 845) auf einem 66-bp-NcoI-Fragment, pαSIG-GUS, ist von H. Mason, Institute of Biosciences & Technology, Texas A&M University, Houston, TX 77030, erhältlich. pαSIG-GUS wird mit NcoI verdaut, und das 66 bp große Fragment wird gereinigt und mit pLTB212 oder pLTK212 von Beispiel 21, verdaut mit NcoI, ligiert. Die resultierenden Plasmide, pLTB213 und pLTK213, werden hinsichtlich der richtigen Orientierung des Inserts durch DNA-Sequenzierung gescreent, wobei Primer verwendet werden, die aus den flankierenden Sequenzen abgeleitet wurden. Die gesamten Expressionskassetten in pLTB213 und pLTK213 werden durch Verdau der Plasmide mit HindIII und E-coRI erhalten, und mit gleichermaßen verdautem pBI101 ligiert und gereinigt, um die GUS-codierende Sequenz zu entfernen, wodurch man pLTB113 und pLTK113 erhält. Somit sind pLTB113 und pLTK113 T-DNA-Vektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation von Pflanzenzellen unter Verwendung von Selektion auf Kanamycin-enthaltenden Medien.

Beispiel 23

[0253] Dieses Beispiel veranschaulicht die Konstruktion von Vektoren für die Expression von Fusionsproteinen in Pflanzen, welche aufgebaut sind aus dem LT-B-Protein und anderen antigenen Determinanten, entweder mit oder ohne ein C-terminales SEKDEL für die ER-Retention.

[0254] Das Plasmid pLTB210 (von Beispiel 1) wird mit SpeI verdaut und mit einem synthetischen DNA-Fragment ligiert, codierend eine fremde antigene Determinante, hergestellt durch Annealing von Oligonukleotiden, sodass ein glattes Ende an der N-terminal codierenden Seite des Fremdinserts gebildet wird, während eines SpeI-komplementäre Stelle an der C-terminalen codierenden Seite des Fremdinserts gebildet wird (wie gezeigt für SEKDEL-Addition in Beispiel 1). Wenn ein C-terminales SEKDEL gewünscht wird, werden die verwendeten synthetischen Oligonukleotide die entsprechenden Nukleotide, codierend SEKDEL, am C-Terminus des Fremdinserts enthalten. Die resultierenden Ligationsprodukte werden mit Mung-Bohnen-Nuklease verdaut, um die verbleibende SpeI-Stelle am 3'-Ende der LT-B codierenden Sequenz in ein glattes Ende umzuwandeln, und erneut ligiert, um das Plasmid zu zirkularisieren. Es ist notwendig, das synthetische Fragment so zu entwerfen, dass die Fusion des Fremdantigens im gleichen Leseraster wie die LT-B codierende Sequenz vorliegt. Die resultierenden Plasmide werden hinsichtlich der Orientierung des Inserts gescreent, welches in entweder der Vorwärts-(bevorzugt) oder Rückwärts-Orientierung ligieren kann, sowie hinsichtlich der korrekten Leserasterfusion, und zwar durch DNA-Sequenzierung unter Verwendung von Primern, welche die Insertstelle flankieren. Plasmide mit korrekten Fusionen werden dann amplifiziert, und für transiente Expressionsuntersuchungen verwendet, wie beschrieben in Beispiel 24.

[0255] Für eine stabile Expression werden LT-B-Fusions-Expressionskassetten, beschrieben im vorausgehenden Abschnitt, durch Verdau der Fusionsplasmide mit HindIII und EcoRI und Ligation mit gleicherweise verdautem pBI101 erhalten und gereinigt, um die GUS-codierende Sequenz zu entfernen. Die resultierenden Plasmide werden für die Transformation von A. tumefaciens LBA4404, wie beschrieben in Beispiel 6, verwendet, und die resultierenden A. tumefaciens-Stämme werden für die Transformation von Tabak, wie beschrieben in Beispiel 6, oder Kartoffel, wie beschrieben in Beispiel 14, verwendet.

Beispiel 24

[0256] Dieses Beispiel veranschaulicht die transiente Expression in Protoplasten unter Verwendung der Expressionsvektoren von Beispiel 23.

[0257] Die Halbwertszeit von Fusionsproteinen wird unter Verwendung von transienter Expression von Genkonstrukten und Puls-Chase-Markierung von Blätter-Protoplasten wie beschrieben bestimmt. Suspensions-Kulturen von Pflanzenzellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase oder Blättern werden verwendet, um Protoplasten abzuleiten (Power und Davey, Methods in Molecular Biology, Band 6, Plant Cell and Tissue Culture, Hrsg.: J. W. Pollard und J. M. Walker, S. 237–259 (1990)). Die Epidermis der Blätter aus aseptisch gewachsenen Tabak- oder Kartoffelpflanzen (siehe Beispiel 6) wurde entfernt, und die Blattstücke wurden auf Enzymlösung schwimmen gelassen (Meicelase 1,5%, Macerozyme, 0,05%, Pectolyase 0,1%, 0,4 M Glucose in Pflanzenkulturmedium). Nach der Inkubation wurden die Blattstücke ausgedrückt, und die Protoplasten-Suspension in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 100 × g wird die Protoplastensuspension von der Oberfläche entfernt und für die transiente Expression von eingeführten Genen durch Elektroporation verwendet. Die Lebensfähigkeit von Protoplasten wird durch Färbung mit Fluoresceindiacetat bestimmt.

[0258] Die Protoplasten werden in HBS (HEPES-gepufferte Kochsalzlösung: 150 mM LCl, 4 mM CaCl2, 10 mM HEPES (pH 7,2) und Mannitol) gewaschen. Gleiche Volumina von Protoplasten werden mit "Supercoiled"-Plasmid, welches Konstrukte von Genfusionen trägt, gemischt, und in eine sterile Elektroporationskammer überführt, und eine Spannung wird über die Kammer angelegt. Die elektroporationsbehandelten Protoplasten werden in Kulturmedium resuspendiert und bei 28°C inkubiert.

[0259] Die pulsmarkierten Protoplasten werden mit einem ^{35}S-Met/^{35}S-Cys-enthaltendem Medium gemischt und kultiviert, um die Expression von markierten Proteinen zu gestatten. Die kultivierten Protoplasten werden dann während unterschiedlicher Zeitintervalle mit einer unmarkierten Met-/Cys-Mischung "gechased". Dann werden die Protoplasten durch Zentrifugation gesammelt und extrahiert. Die Proteinproben werden mit spezifischen Antiseren gegen des exprimierte Protein und/oder Signalsequenzen immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate werden dann durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese fraktioniert. Die Banden in den Gelen werden nachgewiesen und unter Verwendung von Phosphor-Bilderzeugung quantifiziert.

Beispiel 25

[0260] Dieses Beispiel veranschaulicht die Antigenität und die Ligandenbindung von rekombinanten Proteinen, abgeleitet aus den Transformanten von Beispiel 23.

[0261] Die Antigenität und Ligandenbindungs-Fähigkeiten von rekombinanten Fusionsproteinen werden durch kompetitive Gangliosid-Bindungsassays analysiert. Verschiedene Verdünnungen von rekombinanten Proteinen werden mit konstanten Konzentrationen von Biotinmarkiertem LT vermischt und mit Gangliosid (GMx), adsorbiert auf ELISA-Platten, inkubiert. Die Platten werden anschließend gewaschen und mit Meerrettichperoxidasekonjugiertem Streptavidin inkubiert. Die Peroxidase wird unter Verwendung ihres Substrats ABTS nachgewiesen. Die Extinktion wird spektrophotometrisch bestimmt, und die resultierende mittlere Extinktion jeder Verdünnung gegen die Konzentration des Kompetitors graphisch aufgetragen.

Beispiel 26

[0262] Dieses Beispiel veranschaulicht die Expression von Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) in Kartoffelknollen und das Verfüttern von rekombinanten Knollen an Mäuse zum Testen der immunogenen Antworten.

[0263] Der HBsAg-Expressionsvektor pHB102 (Mason et al., 1992. Proc. Natl. Acad, Sci, USA, 89, 11745) wurde verwendet, um die Kartoffelvarietät FL1607 zu transformieren, wie beschrieben in Beispiel 14. Kartoffelknollen wurden aus selektierten Transformanten erhalten, welche ungefähr 0,01% des löslichen Knollenproteins als HBsAg aufwiesen.

[0264] Zum Testen der oralen Immunogenität des Knollenmaterials, welches HBsAg exprimierte, werden die Knollen hergestellt und an Mäuse verfüttert, wie beschrieben in Beispiel 19, außer, dass 10 µg Choleratoxin (CT) pro Dosis als ein orales Adjuvans zugegeben werden. Die Mäuse werden hinsichtlich Serum- und Schleimhaut-Immunglobulin-Produktion getestet, wie beschrieben in Beispiel 12. Mindestens 25% der Mäuse zeigen festgestelltermaßen eine Immunantwort gegen HBsAg, als mit Standardkontrollen verglichen wurde.

Beispiel 27

Fütterung von Hühnern mit LTK110-4-Knollen

[0265] Hühner und anderes Geflügel stellen einen beachtlichen Markt für Tier-Impfstoffe zum Schutz gegen bakterielle, pilzliche und virale Erkrankungen, welche die Produktion wesentlich einschränken, dar. Als Test auf die Fähigkeit von im Futter befindlichen Antigenen, in Geflügel Immunantworten zu verursachen, haben wir Hühner mit rohen transgenen Kartoffelknollen gefüttert, welche die hitzlabile Enterotoxin B-Untereinheit (LT-B) von Escherichia coli exprimieren, und anschließend das Serum aus diesen Hühnern hinsichtlich IgG, der spezifisch für LT-B ist, getestet. Einen Tag alte syngeneische Leghorn-B12/B12-Küken erhielten Knollen aus der transgenen Kartoffellinie LTK110-4 (Haq. et al., 1995), enthaltend ungefähr 5 µg LT-B pro Gramm Knollengewicht. Den Küken wurde 4–6 Stunden vor der Verfütterung der Kartoffeln das Futter entzogen. Die Kartoffeln wurden in Stücke von 1–2 mm zerhackt, und die Küken konnten diese sehr gut aufnehmen. An den Tagen 0, 4, 14 und 18 wurden 5 g transgene Kartoffelknolle an jedes Küken gegeben, und am Tag 28 wurde Blut aus den Küken erhalten und das Serum wurde präpariert. Das Serum wurde hinsichtlich Anti-LT-B durch das Verfahren von Cardenas & Clements (1993, Infect. Immun. 61: 4629–2636) wie folgend geassayt.

ELISA auf Anti-LT-B

Reagenzien

Beschichtungspuffer: pro 300 ml 0,48 g Na_2CO_3, 0,88 g $NaHCO_3$, 0,06 g NaN_3 (pH = 9,6). Aufbewahrung bei 4°C nicht länger als 2 Wochen.
PBS: 10-fach konzentriert, pro Liter 15 g Na_2HPO_4, 61,2 g NaCl (pH von 1X = 7,2)
PBS: PBS + 0,05% Tween-20
1 N H_2SO_4
GMx: Sigma Typ III (G2375). Zugabe von 2,5 ml H_2O zu 25 mg zur Einstellung von 10 mg/ml. Aufbewahrung bei –20°C. Verdünnung 1 : 100 mit Beschichtungspuffer zur Anfertigung von Platten.
LT-B: Rekonstituiere lyophilisiertes Pulver auf das angegebene Volumen mit sterilem destilliertem Wasser, Aufbewahrung bei 4°C. Endpuffer ist 0,05 M Tris, 1 mM EDTA, 3 mM NaN_3, 0,2 M NaCl (pH 7,5).
Kaninchen-Anti-Huhn-IgG-HRP-Konjugat (Sigma A9046)
Langsames TMB-Substrat (Pierce 34024)

Vorgehensweise

1. Beschichte Mikrotiterplatten (Polyvinylchlorid) mit 75 µl/Vertiefung (1,5 µg) des verdünnten GMx (20 µg/ml) in Beschichtungspuffer. Inkubieren während 1 Stunde bei RT.
2. Waschen 3 × mit PBST.
3. Blockieren der Vertiefung mit 200 µl/Vertiefung von 5% Trockenmilch (DM) in PBST, 37°C während 1 Stunde.
4. Waschen 3 × mit PBST.
5. Zugeben von LT-B, verdünnt auf 13,3 µg/ml in PBST, 75 µl (1 µg) pro Vertiefung. Inkubieren während 1 Stunde bei 23°C.
6. Waschen 3 × mit PBST.
7. Zugeben von 75 µl/Vertiefung Serumproben, verdünnt (1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400) in 2% DM/PBST. Inkubieren über Nacht oder 16 h bei 4°C.
8. Waschen 4 × mit PBST.
9. Zugeben von 75 µl/Vertiefung Kaninchen-Anti-Huhn-IgG-HRP-Konjugat, verdünnt 1 1000 in 2% DM/PBST. Inkubieren 2 h bei 37°C.
10. Waschen 4 × mit PBST.
11. Zugeben von 75 µl/Vertiefung des langsamen TMB-Substrats. Inkubieren bei RT während 15–30 min.
12. Zugeben von 75 µl/Vertiefung von 1 N H_2SO_4.
13. Ablesen der Extinktion bei 450 nm.

[0266] Die Serumproben aus vier unterschiedlichen Küken wurden verdünnt, wie oben stehend beschrieben und in zweifacher Ausfertigung geassayt, und die Ergebnisse wurden gemittelt und sind in der Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 5. Anti-LT-B-ELISA auf Hühner-Seren

Extinktion bei 450 nm für Verdünnung

Probe	25	50	100	200	400
A	0,470	0,370	0,233	0,134	0,067
B	0,038	0,019	0,012	0,007	0,007
C	0,473	0,454	0,383	0,305	0,214
D	0,027	0,018	0,011	0,008	0,005

[0267] Die Daten zeigen, dass zwei der vier Hühner, welche die LT-B enthaltenden Knollen aßen, eine starke humorale IgG-Antwort gegen LT-B entwickelten. Dieses Ergebnis zeigt, dass Hühner gegen ein Fremdantigen, exprimiert in einem essbaren Gewebe von transgenen Pflanzen, lediglich durch Essen des ungekochten Pflanzengewebes immunisiert werden können.

Beispiel 28

Koordinierte Expression von LT-B-SEKDEL und Norwalk-Virus-Capsidprotein

[0268] Dieses Beispiel beschreibt die Analyse von Kartoffelpflanzen, welche mit pLTK-NV von Beispiel 5 gebildet wurden. Die RNA-Blot-Analyse wurde an Blatt-RNA-Proben aus 19 unabhängigen Transformanten unter Verwendung einer LT-B-codierenden-Region-Sonde und des Verfahrens von Mason et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11745–11749, durchgeführt. Die 6 Transformanten, welche die höchsten Spiegel an LT-B-RNA zeigten, wurden weiter propagiert und dazu veranlasst, Mikroknollen zu bilden, wie beschrieben in Beispiel 14.

[0269] Wir stellten lösliche Extrakte der Mikroknollen her und führten ELISA-Assays hinsichtlich des Norwalk-Virus-Capsidproteins (NVCP) durch. Der NVCP-ELISA wurde durchgeführt wie früher beschrieben (Jiang, X., Wang, M., Graham, D. Y., und Estes, M. J., 1992, J. Virol. 66, 6527–6532), wobei Kaninchen-Anti-i-rNV als der Einfangantikörper und Meerschweinchen-Anti-i-rNV als der Detektor-Antikörper verwendet wurden. Kaninchen-Antiserum, verdünnt 1 : 10000 in 0,01 M Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) (50 µl/Vertiefung), wurde 4 Stunden lang bei 23°C an 96-Vertiefungs-Polyvinylchlorid-Mikrotiterplatten gebunden und dann 1 Stunde lang bei 37°C mit 5% fettfreier Trockenmilch in PBS (DM/PBS) geblockt. Nach dreimaligem Waschen der Vertiefungen mit PBS + 0,05% Tween-20 (PBST) wurden in PBS verdünnte Proben (50 µl/Vertiefung) zugesetzt und 16 h bei 4°C inkubiert. Die Vertiefungen wurden gewaschen und aufeinanderfolgend mit Meerschweinchen-Anti-NVCP-Serum und Kaninchen-Anti-Meerschweinchen-IgG-HRP-Konjugat, jeweils verdünnt 1 : 5000 in 2% DM/PBS, während 2 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde mit langsamem TMB-Substrat (Pierce) 15–20 Minuten lang bei 23°C entwickelt, die Reaktion wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens an 1 N N_2SO_4 beendet, und die Extinktion wurde bei 450 nm abgelesen. Für die Aufstellung einer Eichkurve wurde NVCP, welches in einem Baculovirusinfizierten Insektenzellsystem hergestellt wurde (Jiang, X., Wang, M., Graham, D. Y., und Estes, M. K., 1992, J. Virol. 66, 6527–6532), mit PBS auf Konzentrationen zwischen 1,4 und 45 ng/ml verdünnt und wie oben verarbeitet. Die Mikroknollen-Extrakte wurden ebenfalls hinsichtlich des Gesamtproteins unter Verwendung des Coomassie-Farbstoff-Bindungsassays (BioRad) mit Rinderserumalbumin als einem Standard geassayt, und der Spiegel an NVCP wurde in µg pro mg Gesamtprotein ausgedrückt (Tabelle 6).

Tabelle 6

Spiegel an NVCP in Mikroknollen von pLTK-NV-Transformanten

Transformante	µg NVCP pro g Gesamtprotein
4	540
8	540
10	400
13	850
17	180
19	760

[0270] Pflanzen aus jeder Transformante wurden in Erde umgepflanzt und in einer Kammer mit gesteuerter Umgebung wachsen gelassen, um Knollen zu entwickeln, wie im Beispiel 16. Aus jeder Transformante erhaltene Knollen wurden gewogen, und Knollen von ähnlicher Größe (6 bis 8 g) wurden gewaschen und geschält, und eine Probe des Speicher-Parenchyms aus jeder Knolle wurde gewogen und in 4 ml pro Gramm an Puffer (25 mM Natriumphosphat, pH 6,6; 100 mM NaCl; 25 mM Natriumascorbat; 5 mM EDTA; 0,1% Tween-20; 1,0 µg/ml Leupeptin) extrahiert. Die Extrakte wurden mit PBST verdünnt und mittels ELISA hinsichtlich LT-B und NVCP geassayt, sowie hinsichtlich Gesamtprotein wie oben stehend beschrieben, und die Ergebnisse wurden als µg Antigen pro Gramm Knollenmasse oder µg Antigen pro Gramm Gesamtprotein ausgedrückt (Tabelle 7).

Tabelle 7

Spiegel an LT-B-SEKDEL und NVCP in Knollen von pLTK-NV-Transformanten

µg Antigen pro Gramm Knollengewebe

Transformante	LT-B-SEKDEL	NVCP
4	2,20	1,73
10	3,73	2,07
13	5,02	4,18
17	5,17	0,0
19	2,00	2,81

µg Antigen pro Gramm Knollenprotein

Transformante	LT-B-SEKDEL	NVCP
4	205	160
10	390	215
13	625	520
17	585	0
19	290	400

[0271] Diese Daten zeigen, dass LT-B-SEKDEL-Spiegel in pLTK-NV-Transformanten, welche für eine hohe LT-B-mRNA-Expression selektiert wurden, höher als diejenigen sind, über welche früher in Beispiel 15 und der **Fig.** 2 berichtet wurde. Der höchste Spiegel an LT-B-SEKDEL in Mikroknollen von pLTK110-Transformanten betrug 120 µg pro Gramm Mikroknollenprotein, wohingegen pLTK-NV-Transformanten zwischen 205 und 625 µg pro Gramm Knollenprotein aufzeigten. Dies kann ein Effekt der transkriptionellen Verstärkung aufgrund der Nähe des Patatin-Promotors stromabwärts der LT-B-SEKDEL-Kassette in pLTK-NV sein, aber derzeit sind keine Daten verfügbar, um dies zu überprüfen. Ferner akkumulierte sich NVCP in denselben Knollen zu Spiegeln von bis zu 4,18 µg pro Gramm Knollenmasse und 520 µg pro Gramm Gesamt-Knollenprotein. In allen Transformanten außer der Nummer 17 akkumulierten sich LT-B-SEKDEL und NVCP zu ähnlichen Spiegeln. Somit ist es deutlich, dass mehrere Antigene in den gleichen transgenen Pflanzen exprimiert werden können, was die Verwendung von LT-B exprimierenden Pflanzen als Adjuvantien für die Immunisierung mit anderen Antigenen aufzeigt.

Beispiel 29

Immunogenität und Adjuvans-Eigenschaft von LT-B-SEKDEL, exprimiert in Kartoffelknollen

[0272] Dieses Beispiel veranschaulicht die Verwendung von transgenen Kartoffelknollen, welche LT-B-SEKDEL exprimieren, als ein Adjuvans in Hühnern bei oraler Bereitstellung mit einem heterologen Antigen (in diesem Fall einem Virus) und veranschaulicht ferner die Immunogenität von Kartoffelknollen, welche LT-B-SEKDEL exprimieren, in Hühnern.

[0273] Das in dieser Untersuchung verwendete Virus war der Ulster-Stamm des Newcastle-Krankheits-Virus (NDV). Es wurde 1967 in Ulster isoliert (McFerran, et al. 1968, Vet. Rec. 82: 589.) und ist in einigen wenigen

Untersuchungen als ein "enterotropes, nicht-pathogenes NDV" verwendet worden (Cheville, et al. 1972, Vet. Path 9, 38–52; Russell, P. H. 1994, Vet. Immuno and Immunopathology 42: 357–365). Es ist des weiteren vor kurzem als Impfstoff in Europa entwickelt worden; Van Eck und Goren, 1991, Avian Pathology 20: 497–507. NDV ist ein Paramyxovirus mit einzelsträngiger Negativ-Sinn-RNA, welches alle Ordnungen von Vögeln infiziert und mehr oder weniger weltweit verbreitet ist. Es gibt 3 Varietäten von NDV, Lentogene (wenig pathogen, wie der Ulster), Mesogene (intermediäre Pathogene) und Velogene (stark pathogen).

[0274] Wir führten das folgende Experiment durch. Kartoffelknollen (Beispiele 14 und 16, Transformante LTK110-4), transformiert mit pLTK110 von Beispiel 1, oder untransformierte Kontroll-Kartoffelknollen (FK1607, Beispiel 14) wurden geschält und durch 30 Sekunden langes Mischen in einem Waring-Blender homogenisiert. Die LTK110-4-Knollen enthielten ungefähr 2,5 µg LT-B-SEKDEL pro Gramm Knollenmasse. In manchen Fällen wurde die Knollen-Aufschlämmung mit Newcastle-Disease-Virus gemischt (10^9 Viren pro Dosis). Die Mischungen wurden durch Verabreichung unter Verwendung einer 10-ml-Kunststoffpipette an weiße Leghorn-Küken beiderlei Geschlechts mit einem Alter von 4 Wochen am Tag 1 zugeführt. Dosierungen, welche 10 ml enthielten, wurden an den Tagen 1, 2, 3, 8 und 10 gegeben, und den Vögeln wurde Blut durch Flügel-Venenpunktur am Tag 14 entnommen. Die erhaltenen Seren wurden verdünnt und verwendet, um die Hämagglutinin-Inhibitions-Aktivität zu messen (Beard, C. W., S. R. Hopkins und J. Hammond, 1975, "Preparation of Newcastle disease virus hemagglutinin-inhibition test antigen". Avian Diseases 19: 692–699) und hinsichtlich LT-B-spezifischem IgG zu assayen, wie oben stehend in Beispiel 27 beschrieben. Jede Gruppe enthielt 5 individuelle Vögel.

A. Immunantwort gegen NDV

[0275] Die Daten für die Hämagglutinin-Inhibitionsaktivität, welche die für NDV-Hämagglutinin-Protein spezifische Antikörperantwort anzeigt, wurden als die höchste Verdünnung von Seren, welche Aktivität ergab, erhalten. Die Verdünnungsfaktoren für alle Vögel in einer Gruppe wurden verwendet, um den geometrischen Mittel-Titer (GM) für diese Gruppe zu berechnen durch 1) Erhalten des $\log_{10}$ für jeden Verdünnungsfaktor, 2) Bestimmen des Mittelwerts und der Standardabweichung für die $\log_{10}$-Werte, und 3) Erhalten der Anti-Logs des Mittelwerts und der Standardabweichung. Die Tabelle 8 zeigt die Daten für Vögel, welche 10^9 Viren mit 4 g Kontroll-Knolle (Gruppe 1), 10^9 Viren mit 1 g LTK110-4-Knolle (Gruppe 2) und 4 g LTK110-4-Knolle ohne Virus (Gruppe 3) erhielten.

Tabelle 8. Hämagglutinin-Inhibitions-Aktivität in Seren von Hühnern, welche NDV mit oder ohne LTK110-4-Kartoffelknollen erhielten

Geometrisches Mittel der höchsten Verdünnung, welche Aktivität zeigt, ± Standardabweichung

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
10^9 Viren	10^9 Viren	Kein Virus
4 g Kontrollknolle	1 g LTK110-4-Knolle	4 g LTK110-4-Knolle
16,65 ± 4,96	40 ± 2,34	0

[0276] Diese Daten zeigen, dass die Zugabe von 1 g transgener Knolle, enthaltend ungefähr 2,5 µg LT-B-SEKDEL pro oraler Dosis an NDV, die Immunantwort gegen NDV erhöhte. Somit besitzt in Kartoffelknollen exprimiertes LT-B-SEDEL einen potenziellen Wert als ein orales Adjuvans für essbare Impfstoffe in Vögeln.

B. Immunantwort gegen LT-B

[0277] Wir haben die Serum-Antikörperantwort gegen LT-B in dem in Tabelle 8 beschriebenen Experiment gemessen, um den Nutzen der transgenen LTK110-4-Knollen als potenzieller Impfstoff gegen mit E. coli zusammenhängende Durchfallerkrankung aufzuzeigen. Diese Daten sind in der Tabelle 9 als Extinktions-Werte für den ELISA von 1 : 100 verdünnten Serumproben präsentiert.

Tabelle 9. Serum-Anti-LT-B-IgG-Antworten in Hühnern, welche LTK110-4-Kartoffelknollen erhielten

	A450 des Assay, 14 Tage, Individuelle Seren					Gruppen-Mittelwert
Gruppe 1 4 g Kontrollknolle + 10^9 Viren	0,063	0,015	0,019	0,015	0,024	0,028
Gruppe 2 1 g LTK110-4 Knolle + 10^9 Viren	0,006	0,037	0,259	0,446	0,304	0,210
Gruppe 3 4 g LTK110-4 Knolle kein Virus	0,193	0,542	0,385	0,503	0,500	0,425

[0278] Diese Daten zeigen, dass so wenig wie 1 g transgene LTK110-Kartoffelknollen, enthaltend ungefähr 2,5 µg LT-B-SEKDEL pro oraler Dosis, eine signifikante Anti-LT-B-IgG-Antwort in den Seren von 3 von 5 Vögeln in der Gruppe 2 stimulierten. Ferner störte das Vorhandensein des NDV in den oralen Dosen in Gruppe 2 nicht die Antwort gegen das LT-B-SEKDEL. In der Gruppe 3 verursachte eine erhöhte Dosis von 4 g transgenen LTK110-Kartoffelknollen, enthaltend ungefähr 10 µg LT-B-SEKDEL je oraler Dosis, eine Antwort in allen 5 Vögeln, und erhöhte die durchschnittliche Intensität der Antwort. Somit besitzt in Kartoffelknollen exprimiertes LT-B-SEDEL einen potenziellen Nutzen als ein oraler essbarer Impfstoff gegen mit E. coli zusammenhängende Durchfallerkrankungen in Vögeln.

Beispiel 30

Verstärkende Qualität von Pflanzenexpressionsvektor-Modifikationen

[0279] Dieses Beispiel beschreibt Daten, welche zeigen, dass Modifikationen von kommerziell erhältlichen Pflanzenexpressionsvektoren die Expression von Fremdgenen verstärken können.

[0280] Der anfängliche Plasmidvektor, den wir für die LT-B-Expression in Pflanzen konstruierten, ergab wenig oder kein messbares LT-B-Protein in stabil transformierten Tabakpflanzen. Dieses Konstrukt (pLTB120) verwendete die genetischen regulatorischen Elemente, welche in dem kommerziell erhältlichen Pflanzenexpressionsvektor pBI121 (Clonetech, Palo Alto, CA; Jefferson et al., 1987, EMBO J. 6: 3901–3907) vorhanden sind, einschließlich des 35S-Promotors von Blumenkohlmosaikvirus und des Nopalinsynthase(NOS)-$_{\text{Polyadenylierungssignals}}$ aus Agrobacterium tumefaciens. Unsere anschließenden Vektoren, beschrieben in den Beispielen 1–5, verwendeten Modifikationen der regulatorischen 5'- und 3'-Regionen.

[0281] Es folgt eine Beschreibung der Konstruktion von pLTB120. Wir verdauten pJC217 von Beispiel 1 mit EcoRI und HindIII, um ein 580 bp großes Fragment zu ergeben, welches mit pBluescript KS (Stratagene) unter Erhalt von pLTB10 ligiert wurde. Die EcoRI-Stelle in pLTB10 wurde durch Verdau mit EcoRI und Mung-Bohnen-Nuklease entfernt, wonach das Plasmid erneut ligiert wurde, wodurch man pLTB11 erhielt. Die LT-B codierende Region wurde auf einem 410 bp großen Fragment aus pLTB11 durch Verdau mit BamHI und DraI erhalten und mit pBI221 (Clonetech, Palo Alto, CA), welcher mit SacI verdaut, mit Mung-Bohnen-Nuklease glattendig gemacht und mit BamHI verdaut worden war, ligiert. Das resultierende Plasmid, pLTB220, weist die LT-B codierende Sequenz substituiert für die GUS codierende Sequenz in pBI221 auf. Die LT-B-Expressionskassette in pLTB220 wurde durch Verdau mit HindIII und EcoRI entfernt und mit gleicherweise verdautem pBI101 (Clonetech, Palo Alto, CA) ligiert, wodurch man pLTB120 erhielt. Somit ist pLTB120 ein T-DNA-Vektor, der die linken und rechten Borders, welche für Agrobacterium-vermittelte Integration in Pflanzenzellkern-DNA erforderlich sind, den 35S-Promotor und den NOS-Terminator, welche die Expression der LT-B codierenden Sequenz regulieren, enthält (Fig. 11).

[0282] Wir transformierten Tabakpflanzen mit pLTB120, wie beschrieben in Beispiel 6, und analysierten Gesamt-RNA aus Blättern, durch Northern-Blotting, wie beschrieben in Beispiel 17. Auf dem gleichen Gel analysierten wir RNA aus Tabakzellen, welche mit pLTB112 von Beispiel 21 und pLT100 und pLT101 von Beispiel 3 transformiert worden waren. Diese Proben repräsentieren mRNA, enthaltend die LT-B codierende Sequenz, fusioniert an die 3'-untranslatierte Region und das Polyadenylierungssignal von NOS (pLTB120) oder die 3'-untranslatierte Region und das Polyadenylierungssignal von Sojabohnen-vspB (pLTB112, pLT100, pLT101). Das in der Fig. 17 gezeigte Radiogramm weist darauf hin, dass die pLTB120-Kassette zwei unterschiedliche Spezies von mRNA ergibt, wie gezeigt durch zwei distinkte Banden, welche mit der LT-B-Sonde hybridisieren. Allerdings zeigten die LT-B-mRNAs, abgeleitet aus den Expressionskassetten in pLTB112, pLT100 und pLT101, alle nur eine einzelne Bande, was eine einzige Spezies von mRNA anzeigt. Diese Bande ist größer als die grö-

ßere pLTB120-Bande aufgrund des Vorhandenseins der 5'-untranslatierten TEV-Region.

[0283] Das Auftreten von zwei mRNA-Spezies in der pLTB120-Transformante beruht wahrscheinlich auf der Polyadenylierung der entstehenden Transkripte an alternativen Stellen. Die native codierende Sequenz von LT-B enthält ein kononisches Polyadenylierungssignal "AAUAAA" nahe seinem 3'-Ende, welches bei Fusionierung an die NOS-3'-Region in pLTB120 die Erkennung und 3'-Ende-Prozessierung unter Erhalt einer mRNA-Spezies erlaubt, welche kürzer als jene ist, die durch Prozessierung aufgrund des "AAUAAA"-Signals in der NOS-3'-Region erzeugt wird. Bei visueller Untersuchung des Radiogramms erscheint es so, dass die zwei alternativen Stellen mit ungefähr gleicher Häufigkeit in den Tabakzellen verwendet werden. Eine trunkierte mRNA kann nicht-funktional sein, um zu einer niedrigeren Expression von LT-B-Protein führen. Wenn, im Gegensatz dazu, die LT-B codierende Sequenz an die 3'-Region von Sojabohne-vspB fusioniert wird, resultiert lediglich eine einzige Volllängen-mRNA-Spezies, vielleicht dank einer längeren 3'-untranslatierten Sequenz, welche das kryptische Polyadenylierungssignal in der LT-B codierenden Sequenz von demjenigen in der vspB-3'-Region trennt.

[0284] Wie in der **Fig. 17** gezeigt, wurden Gesamt-RNA-Proben aus Tabakblättern (LTB120 und LTB112) oder Mikroknollen (LT100 und LT101) hergestellt, und 3 µg (LTB120) oder 6 µg (LTB112, LT100, LT101) von jeder Probe wurden mit Formaldehyd denaturiert und in einem 1,7%igem Agarosegel elektrophoretisch behandelt. Das Gel wurde auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer Sonde hybridisiert, welche spezifisch für die LT-B codierende Sequenz war. Nach Waschen wurde die Membran an Röntgenfilm exponiert, und das entwickelte Radiogramm wurde mit einem Flachbett-Scanner gescannt. Die Zahlen geben die individuellen transformierten Pflanzen an.

Beispiel 31

[0285] Dieses Beispiel veranschaulicht die Verstärkung der Expression von LT-B in Pflanzenzellen unter Verwendung des synthetischen Gens mit modifizierter Nukleotidsequenz von Beispiel 20.

[0286] Kartroffelpflanzen des Stamms "FL1607" wurden durch Agrobacterium-vermittelten T-DNA-Transfer unter Verwendung von pTH110 von Beispiel 20 durch das Verfahren von Beispiel 14 transformiert. Transformanten wurde auf selektivem Medium mit Kanamycin regeneriert, und die Blätter von sich regenerierenden Trieben wurde abgeschnitten und für einen LT-B-ELISA extrahiert.

[0287] Fünfzehn unabhängige pTH110-Transformanten wurden neben Kontrollpflanzen analysiert: 1) Untransformierte Kartoffelpflanzen, 2) Kartoffelpflanze, transformiert mit pLTB110 von Beispiel 1 und exprimierend LT-B bei einem hohen Spiegel im Vergleich zu anderen pLTB110-Transformanten, und 3) eine Kartoffelpflanze, transformiert mit pLTK110 von Beispiel 1 und exprimierend LT-B-SEKDEL bei einem hohen Spiegel im Vergleich zu anderen pLTK110-Transformanten. Die beste Schätzung des Spiegels der Verstärkung von LT-B-Expression in pTH110-Transformanten wird durch Vergleich der pTH110-Transformanten mit der pLTB110-Transformante erhalten, weil die Aminosäuresequenz dieser LT-B-Gene identisch ist, wohingegen die pLTK110-Kassette eine carboxyterminale Verlängerung von 6 Aminosäuren (SEKDEL) aufweist, welche die mikrosomale Retention und verstärkte Akkumulation des Antigens erlaubt.

[0288] Blätter mit einem Durchmesser von 4 mm wurden vom oberen Teil der Pflanzen abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde in 250 Mikrolitern eiskaltem Extraktionspuffer (25 mM Natriumphosphat (pH 6,6), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 25 mM Natriumascorbat, 10 Mikrogramm/ml Leupeptin und 0,1% Tween-20) homogenisiert. Die Proben wurden bei 4°C in einer Mikrozentrifuge bei 14000 U/min 2 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommmen und 1:100 mit 1% Trockenmilch in PBST (10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2), 105 mM NaCl und 0,05% Tween 20) verdünnt, und das LT-B wurde mittels des ELISA-Protokolls von Beispiel 7 bestimmt, welches wie folgend modifiziert war. Nach Inkubation der Platten mit dem primären Antikörper (Ziege-Anti-LT-B) und Waschen wurden die Platten mit Kaninchen-Anti-Ziege-IgG, konjugiert an Meerrettichperoxidase (HRP), verdünnt 1:3000 in 1% Trockenmilch/PBST, 2 Stunden lang bei 37°C behandelt. Nach dem Waschen wurden die Platten mit langsamem TMB-Substrat für HRP (Pierce, Rockford, IL) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur entwickelt.

[0289] Das Gesamtprotein der Blattextrakte wurde unter Verwendung des BIORAD-Protein-Assay-Kits und BSA als Standard quantifiziert. Die Werte wurden gemittelt und als ELISA-Äquivalent LT-B in Nanogramm pro Mikrogramm lösliches Gesamtprotein tabellenartig aufgelistet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 gezeigt. Diese Daten weisen darauf hin, daß die sechs pTH110-Transformanten, welche LT-B bei den höchsten Spiegeln exprimierten, eine 3- bis 14mal höhere LT-B-Akkumulation aufwiesen als die pLTB110-2-Transformante,

und eine bis zu 5mal höhere als die pLTK110-4-Transformante. Dieses Ergebnis zeigt deutlich den Nutzen der Verwendung einer modifizierten Nukleotidsequenz der codierenden Region des LT-B-Gens.

Tabelle 10. LT-B-Spiegel in Blättern von Kartoffelpflanzen, transformiert mit synthetischen oder nativen LT-B-Genexpressionsplasmiden

Transformante	Gen	T-B ng/µg lösliches Gesamtprotein
TH110-2	synthetisch	0,99
TH110-3	"	0,88
TH110-4	"	0,44
TH110-7	"	0,61
TH110-9	"	0,19
TH110-12	"	0,46
LTB110-2	Natives LT-B	0,07
LTK110-4	Natives LT-B + SEKDEL	0,19
Untransformiert	Keines	0,00

SEQUENZAUFLISTUNG

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: The Texas A&M University System
310 Wisenbaker
College Station, Texas 77843-3369

The Administrators of the Tulane Educational Fund
1430 Tulane Avenue
New Orleans, Louisiana 70012-2699

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Orale Immunisierung mit transgenen Pflanzen

(iii) ANZAHL VON SEQUENZEN: 23

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Pravel, Hewitt, Kimball & Krieger
(B) STRASSE: 1177 West Loop South, 10th Floor
(C) STADT: Houston
(D) STAAT: TX
(E) LAND: USA
(F) PLZ (ZIP): 77027-9095

(v) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) MEDIUMTYP: Floppy-Diskette
(B) COMPUTER: IBM-PC-Kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDUNGSNUMMER:
(B) EINREICHUNGSDATUM:
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) FRÜHERE ANMELDUNGS-DATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: US 08/328 716
(B) EINREICHUNGSDATUM: 24. Okt. 1994

(viii) ANWALT/VERTRETER-INFORMATION:

(A) NAME: Jones, John W.
(B) REGISTRIERUNGS-NUMMER: 31 380
(C) REFERENZ/AKTENDECKEL-NUMMER: 36170/3P

(ix) TELEKOMMUNIKATIONS-INFORMATION:

(A) TELEFON: 713-850-0909
(B) TELEFAX: 713-850-0165

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 1:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 1:

Lys Asp Glu Leu
1

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 2:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 2:

His Asp Glu Leu
1

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 3:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 3:

Ser Glu Lys Asp Glu Leu
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 4:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	6 Aminosäuren
(B)	TYP:	Aminosäure
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 4:

```
Ser Glu His Asp Glu Leu
1               5
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 5:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	22 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	einzelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 5:

CTCTGAGAAA GATGAGCTAT GA 22

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 6:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	26 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	einzelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 6:

CTAGTCATAG CTCATCTTTC TCAGAG 26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 7:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	38 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	einzelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 7:

AGTATGGAAA ACTCTGAGAA AGATGAGCTA TGACTAGT 38

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 8:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	33 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	einzelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 8:

GGGGCCATGG TTAAAGTAAA ATGTTATGTT TTA 33

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 9:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	20 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	einzelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 9:

AGACTGGGGA GCTCCGTATG 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 10:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGART: einzelstängig
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 10:

GGGGCCATGG TTAAAAATAT AACTTTCATT TTT 33

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 11:
(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGART: einzelstängig
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 11:

ATCTGGGGGT CTAGAGTC 18

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 12:
(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 70 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGART: doppelstängig
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 12:

TCGACGCCAT GGTGAAGGTG AAGTGCTATG TGCTCTTCAC TGCTCTCCTC AGCTCTCTTT 60
GTGCTTATGG 70

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 13:
(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 70 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGART: doppelstängig
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 13:

```
TGCTTATGGA GCTCCACAAT CCATCACTGA GCTTTGCTCT GAGTACAGGA ACACTCAGAT      60
CTACACCATC                                                             70
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 14:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 72 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGART: doppelstängig
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 14:

```
TACACCATCA ATGACAAGAT CCTCTCTTAC ACTGAGAGCA TGGCTGGCAA GAGGGAGATG      60
GTGATCATCA CC                                                          72
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 15:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 68 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGART: doppelstängig
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 15:

```
ATCATCACCT TCAAGTCAGG AGCCACTTTC CAGGTGGAGG TTCCAGGCTC ACAACACATC      60
GATCTGCA                                                               68
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 16:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	65 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	doppelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 16:

```
TCGAGATCGA TTCCCAGAAG AAGGCCATTG AGAGGATGAA GGACACCTTG AGGATCACCT      60
ACCTC                                                                  65
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 17:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	65 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	doppelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 17:

```
CCTACCTCAC TGAGACCAAG ATTGACAAGC TCTGTGTGTG GAACAACAAG ACTCCAAACT      60
CCATT                                                                  65
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 18:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	52 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	doppelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 18:

```
AACTCCATTG CTGCCATCAG CATGGAGAAC TAAGTCTTCG GTACCTATCT AG              52
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 19:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	312 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	doppelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 19:

```
GCTCCCCAGT CTATTACAGA ACTATGTTCG GAATATCGCA ACACACAAAT ATATACGATA      60
AATGACAAGA TACTATCATA TACGGAATCG ATGGCAGGCA AAAGAGAAAT GGTTATCATT     120
ACATTTAAGA GCGGCGCAAC ATTTCAGGTC GAAGTCCCGG GCAGTCAACA TATAGACTCC     180
CAAAAAAAAG CCATTGAAAG GATGAAGGAC ACATTAAGAA TCACATATCT GACCGAGACC     240
AAAATTGATA AATTATGTGT ATGGAATAAT AAAACCCCCA ATTCAATTGC GGCAATCAGT     300
ATGGAAAACT GA                                                         312
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 20:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	312 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	doppelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 20:

```
GCTCCACAAT CCATCACTGA GCTTTGCTCT GAGTACAGGA ACACTCAGAT CTACACCATC      60
AATGACAAGA TCCTCTCTTA CACTGAGAGC ATGGCTGGCA AGAGGGAGAT GGTGATCATC     120
ACCTTCAAGT CAGGAGCCAC TTTCCAGGTG GAGGTTCCAG GCTCACAACA CATCGATTCC     180
CAGAAGAAGG CCATTGAGAG GATGAAGGAC ACCTTGAGGA TCACCTACCT CACTGAGACC     240
AAGATTGACA AGCTCTGTGT GTGGAACAAC AAGACTCCAA ACTCCATTGC TGCCATCAGC     300
ATGGAGAACT AA                                                         312
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 21:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	103 Aminosäuren
(B)	TYP:	Aminosäure
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 21:

```
Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Asn Thr Gln
1               5                  10                  15

Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu Ser Met Ala
            20                  25                  30

 Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly Ala Thr Phe
         35                  40                  45

 Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala
     50                  55                  60

 Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr
 65                  70                  75                  80

 Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile
                 85                  90                  95

 Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn
             100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 22:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	24 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	einzelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 22:

```
GGGGCCATGG CTCCCCAGTC TATT                                          24
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 23:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A)	LÄNGE:	18 Basenpaare
(B)	TYP:	Nukleinsäure
(C)	STRANGART:	einzelstängig
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 23:

```
TGCCATCGAT TCCGTATA                                                 18
```

Patentansprüche

1. Transgenes Pflanzenmaterial, welches entweder eine DNA-Sequenz, die mindestens ein immunogenes Mittel codiert, umfasst oder exprimiert,
wobei die DNA-Sequenz ferner eine endoplasmatisches Reticulum (ER)-Retentionssequenz, die mit der das immunogene Mittel codierenden DNA-Sequenz fusioniert ist, umfasst, und

wobei das Material in der Lage ist, eine immune Antwort auf das exprimierte immunogene Mittel in Tieren zu induzieren, die ausreicht, um die Tiere gegen das Mittel zu immunisieren, wenn dem Tier das transgene Pflanzenmaterial durch orale Einnahme verabreicht wird.

2. Material gemäß Anspruch 1, wobei die DNA-Sequenz ferner eine ER-Signalsequenz, die mit der das immunogene Mittel codierenden DNA-Sequenz fusioniert ist, umfasst.

3. Material gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das immunogene Mittel ein LT-B- oder CT-B-haltiges Protein umfasst.

4. Material gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das immunogene Mittel ein Protein mit mindestens einer Aminosäuredomäne mit mindestens etwa 90% Aminosäurehomologie zu LT-B oder CT-B umfasst.

5. Material gemäß Anspruch 3 oder 4, wobei die DNA-Sequenz DNA enthält, die sowohl ein LT-B-haltiges Protein als auch ein LT-A-haltiges Protein codiert, oder eine DNA, die sowohl ein CT-B-haltiges Protein als auch ein CT-A-haltiges Protein codiert, enthält.

6. Material gemäß Anspruch 5, wobei das LT-B mit dem LT-A unter Bildung eines Holotoxins oligomerisiert oder das CT-B mit dem CT-A unter Bildung eines Holotoxins oligomerisiert.

7. Material gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 bis 6, ferner umfassend ein zweites immunogenes Mittel, welches ein anderes als ein LT-B- oder CT-B-haltiges Protein ist, das zur Induktion einer Immunantwort in Tieren in der Lage ist.

8. Material gemäß Anspruch 7, wobei das LT-B- oder CT-B-haltige Protein in der Lage ist, einen Hilfseffekt bezüglich des zweiten immunogenen Mittels auszulösen.

9. Material gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 bis 8, wobei das immunogene Mittel durch die synthetische LT-B-Gensequenz, dargelegt in der SEQ ID Nr.: 20, codiert.

10. Material gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche zur Verwendung bei einem Verfahren der Immunisierung eines Tieres durch orale Verabreichung des Materials.

11. Verwendung von transgenem Pflanzenmaterial gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 bei der Herstellung eines Medikamentes zur Impfung eines Tieres durch orale Verabreichung des Materials.

12. Verfahren zur Herstellung von transgenem Pflanzenmaterial, wie in mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 definiert, umfassend:
Konstruieren mindestens eines Vektors mit einer DNA-Sequenz, welche mindestens ein immunogenes Mittel codiert, wobei die DNA-Sequenz ferner eine endoplasmatisches Reticulum (ER)-Retentionssequenz, fusioniert mit der das immunogene Mittel codierenden DNA-Sequenz, umfasst;
Transformieren von Pflanzenmaterial zur Erzeugung von transgenem Pflanzenmaterial mit dem Vektor; und
Exprimieren des immunogenen Mittels aus dem Vektor innerhalb des transgenen Pflanzenmaterials, wobei der Grad der Expression des immunogenen Mittels ausreichend ist, um eine Immunantwort in dem Tier zu induzieren, die ausreicht, um das Tier gegen das immunogene Mittel zu immunisieren, wenn das Pflanzenmaterial dem Tier durch orale Einnahme verabreicht wird.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

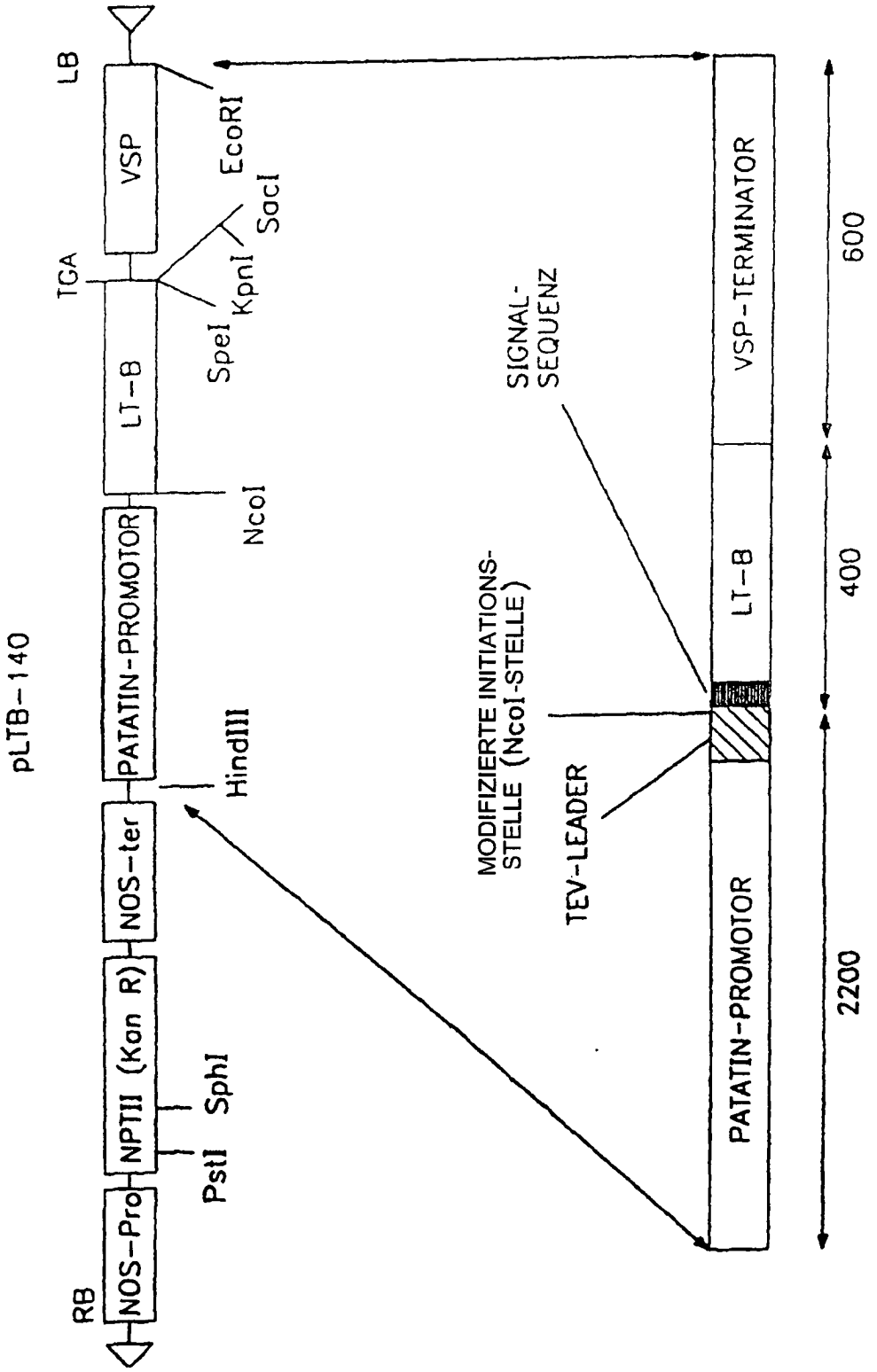


FIG. 1A

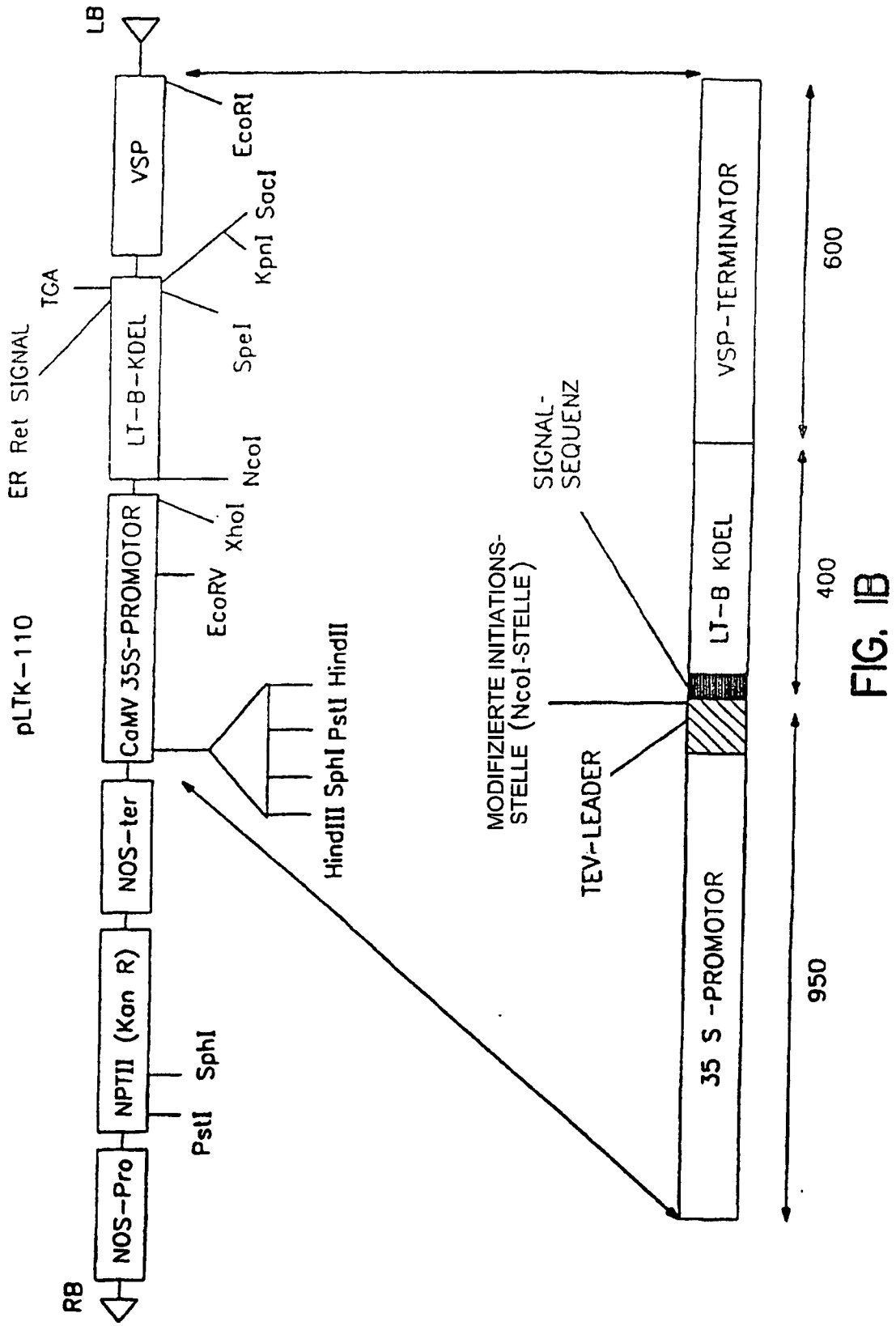

LB
VSP
EcoRI
KpnI SacI
TGA
ER Ret SIGNAL
LT-B-KDEL
SpeI
NcoI
XhoI
EcoRV
CaMV 35S-PROMOTOR
HindIII SphI PstI HindII
pLTK-110
NOS-ter
NPTII (Kan R)
PstI SphI
NOS-Pro
RB
SIGNAL-SEQUENZ
MODIFIZIERTE INITIATIONS-STELLE (NcoI-STELLE)
TEV-LEADER
VSP-TERMINATOR
LT-B KDEL
35 S -PROMOTOR
600
400
950

FIG. IB

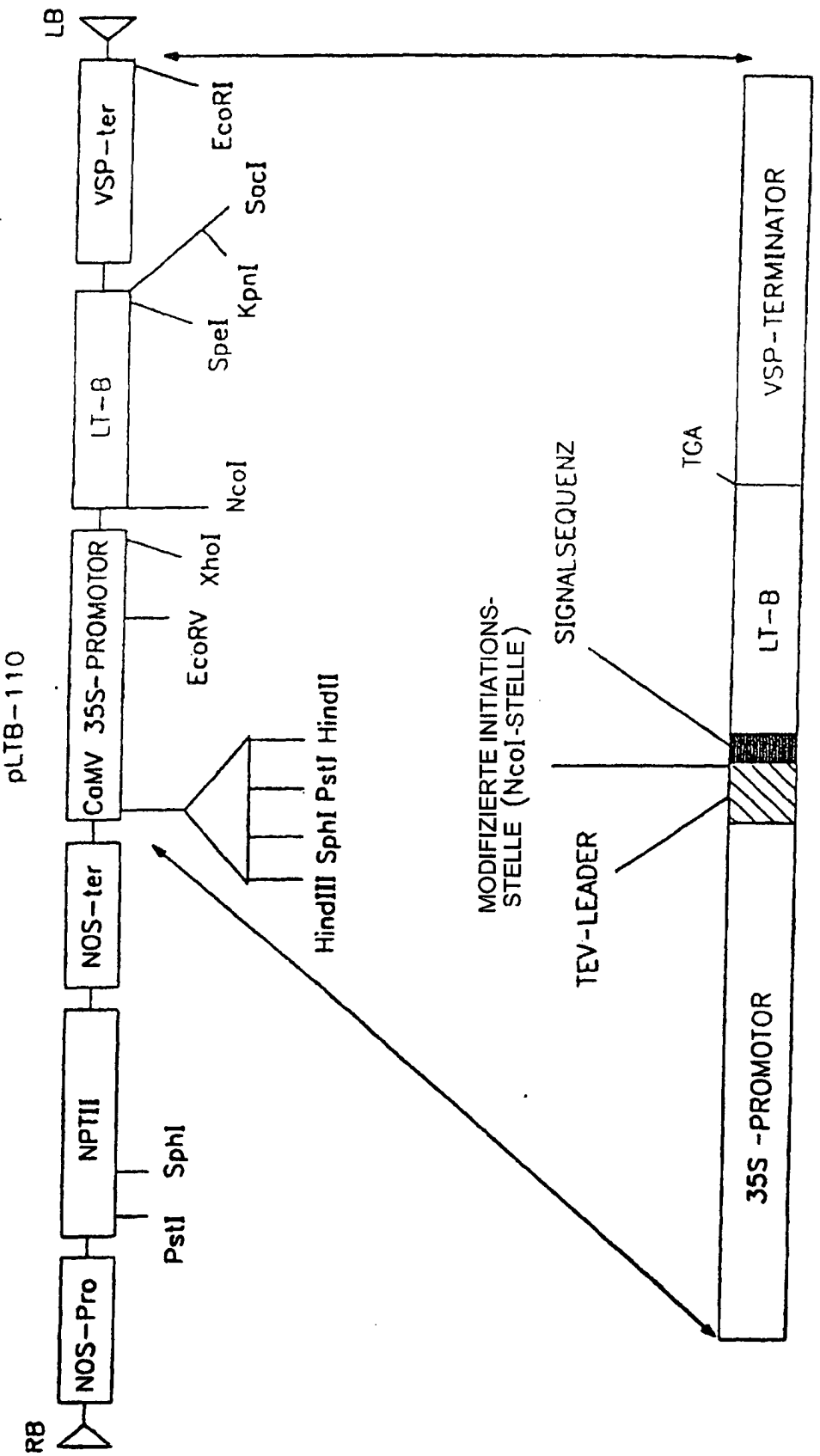

pLTB-110
LB
RB
NOS-Pro
NPTII
NOS-ter
CaMV 35S-PROMOTOR
LT-B
VSP-ter
PstI
SphI
HindIII SphI PstI HindII
EcoRV
XhoI
NcoI
SpeI
KpnI
SacI
EcoRI
MODIFIZIERTE INITIATIONS-STELLE (NcoI-STELLE)
TEV-LEADER
SIGNALSEQUENZ
TGA
35S -PROMOTOR
LT-B
VSP-TERMINATOR

FIG. IC

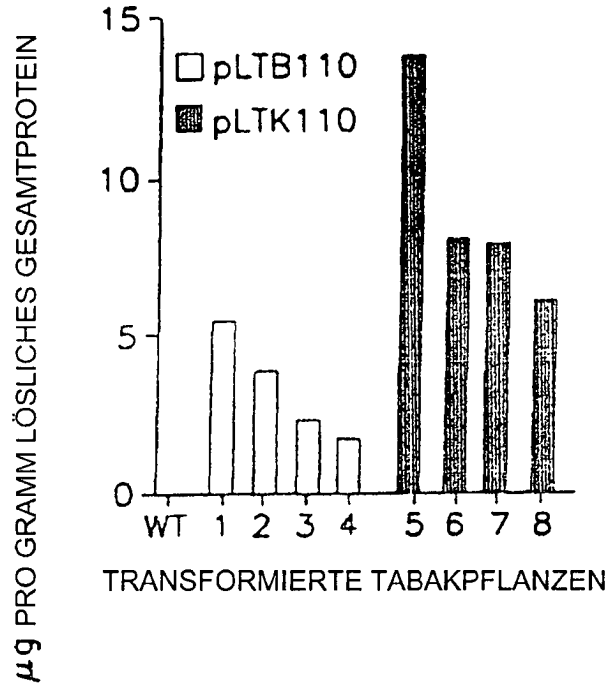

15
10
5
0
pLTB110
pLTK110
WT 1 2 3 4 5 6 7 8
TRANSFORMIERTE TABAKPFLANZEN
µg PRO GRAMM LÖSLICHES GESAMTPROTEIN

FIG. 2A

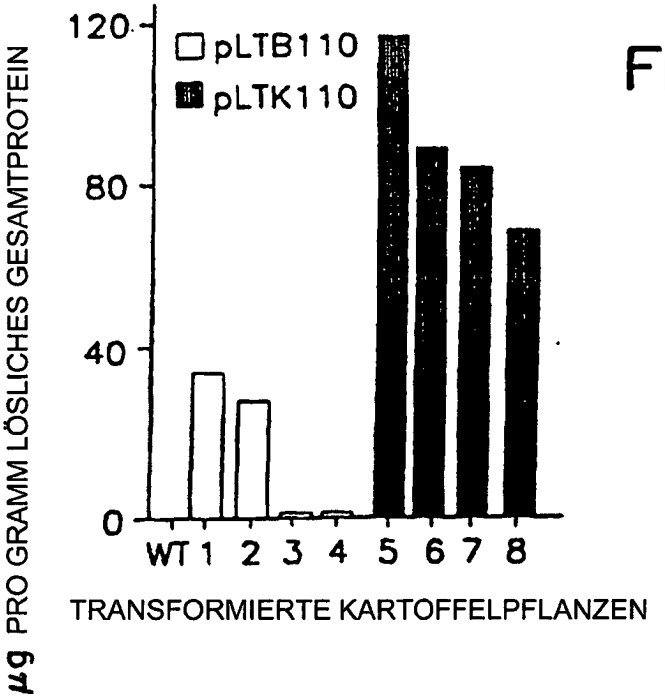

120
80
40
0
pLTB110
pLTK110
WT 1 2 3 4 5 6 7 8
TRANSFORMIERTE KARTOFFELPFLANZEN
µg PRO GRAMM LÖSLICHES GESAMTPROTEIN

FIG. 2B

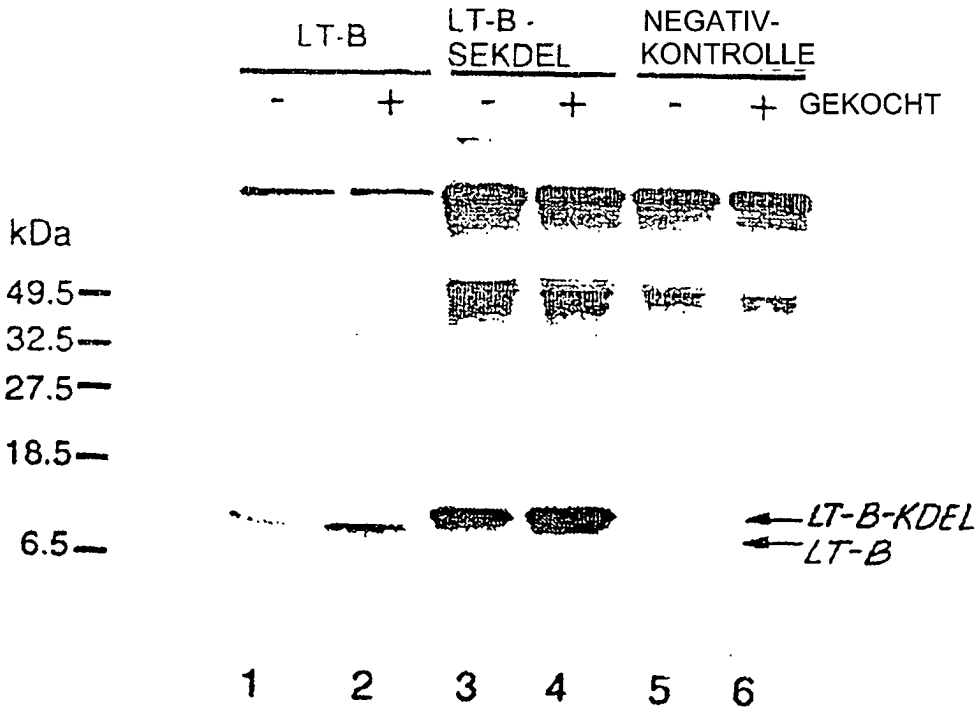

LT-B
LT-B - SEKDEL
NEGATIV-KONTROLLE
- + - + - + GEKOCHT
kDa
49.5
32.5
27.5
18.5
6.5
LT-B-KDEL
LT-B
1 2 3 4 5 6

FIG. 3

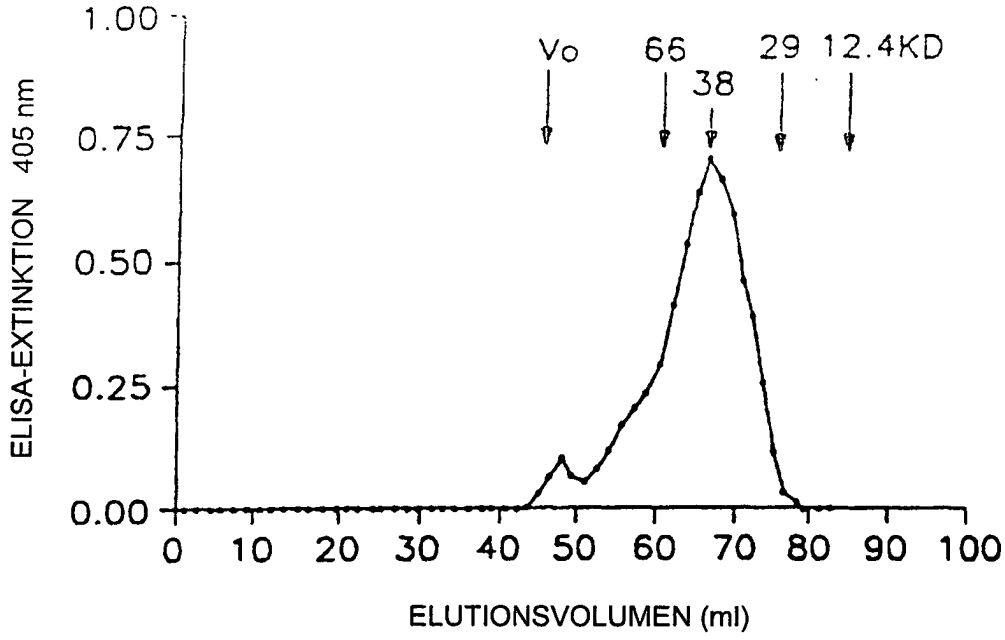

1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
ELISA-EXTINKTION 405 nm
Vo
66
38
29
12.4KD
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
ELUTIONSVOLUMEN (ml)

FIG. 4

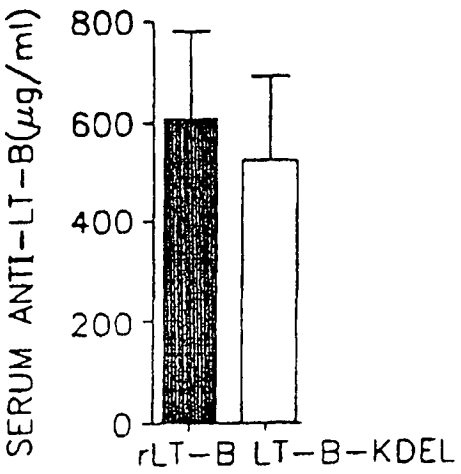


FIG. 5A

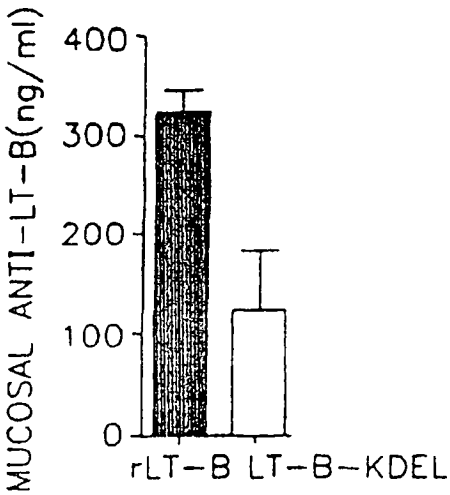


FIG. 5B

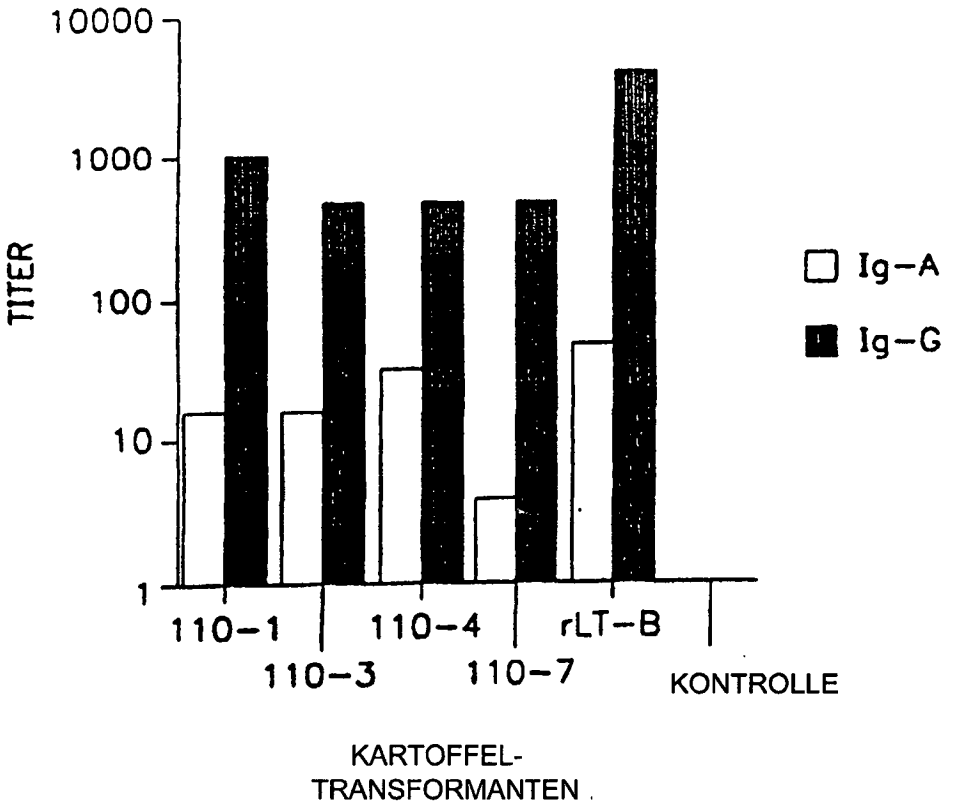
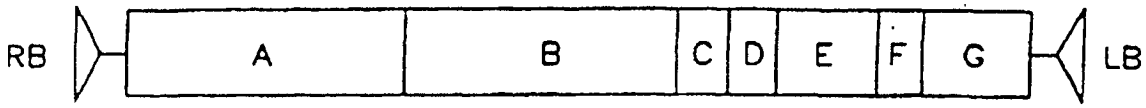


FIG. 6



(A) 5'NOS-PROMOTOR, nptII 3'NOS-TERMINATOR

(B) PROMOTOR UND 5'-REGULATORISCHE ELEMENTE:
1. CaMV 35S-PROMOTOR
2. PATATIN-PROMOTOR
3. vspB-PROMOTOR

(C) TRANSLATIONALER ENHANCER:
5'-UTR DES TABAK-ÄTZ-VIRUS

(D) SUBZELLULÄRE TARGETING-DOMÄNEN:
1. N-TERMINALE SIGNALSEQUENZ VON SPORAMIN A
2. VSP-SIGNALSEQUENZ

(E) E COLI-HITZELABILE ENTEROTOXIN-UNTEREINHEIT B (LT-B) CODIERENDE SEQUENZ.

(F) ENDOPLASMATISCHES RETICULUM-RETENTIONSSEQUENZ (KDEL)

(G) vspB-POLYADENYLIERUNGSSIGNAL

LINKE UND RECHTE BORDER-SEQUENZEN

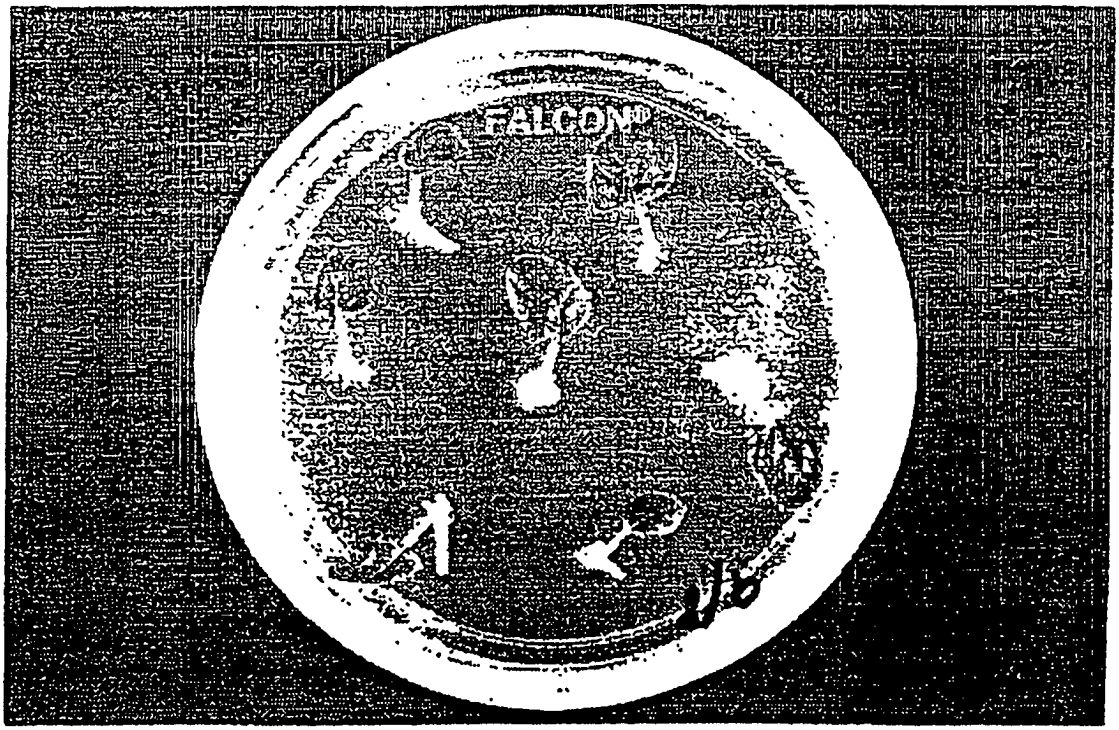


FIG. 8

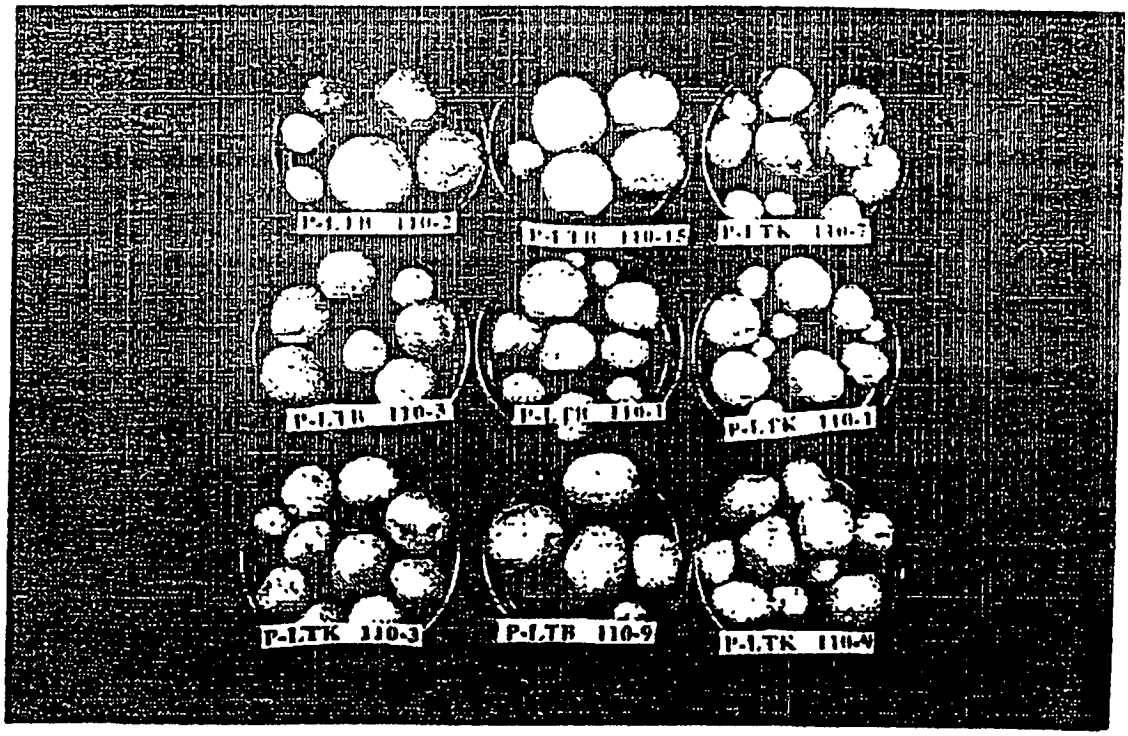
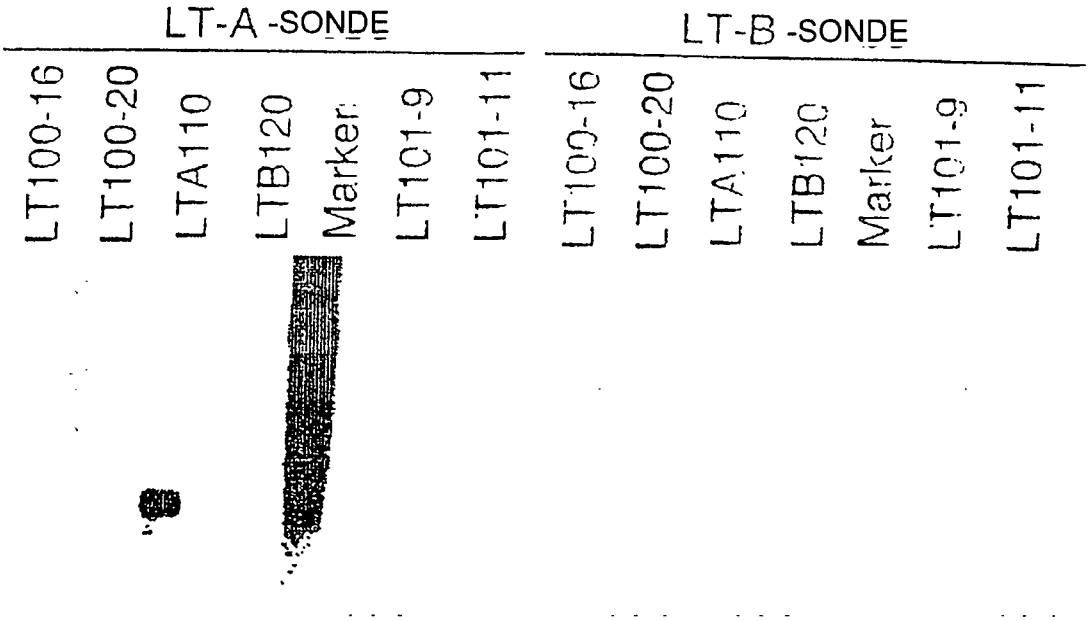

P-LTB 110-2
P-LTB 110-15
P-LTK 110-7
P-LTB 110-3
P-LTB 110-1
P-LTK 110-1
P-LTK 110-3
P-LTB 110-9
P-LTK 110-4

FIG. 9

LT-A- und LT-B-mRNAs in mit pLT100 und pLT101 transformierten Kartoffelknollen



FIGUR 10

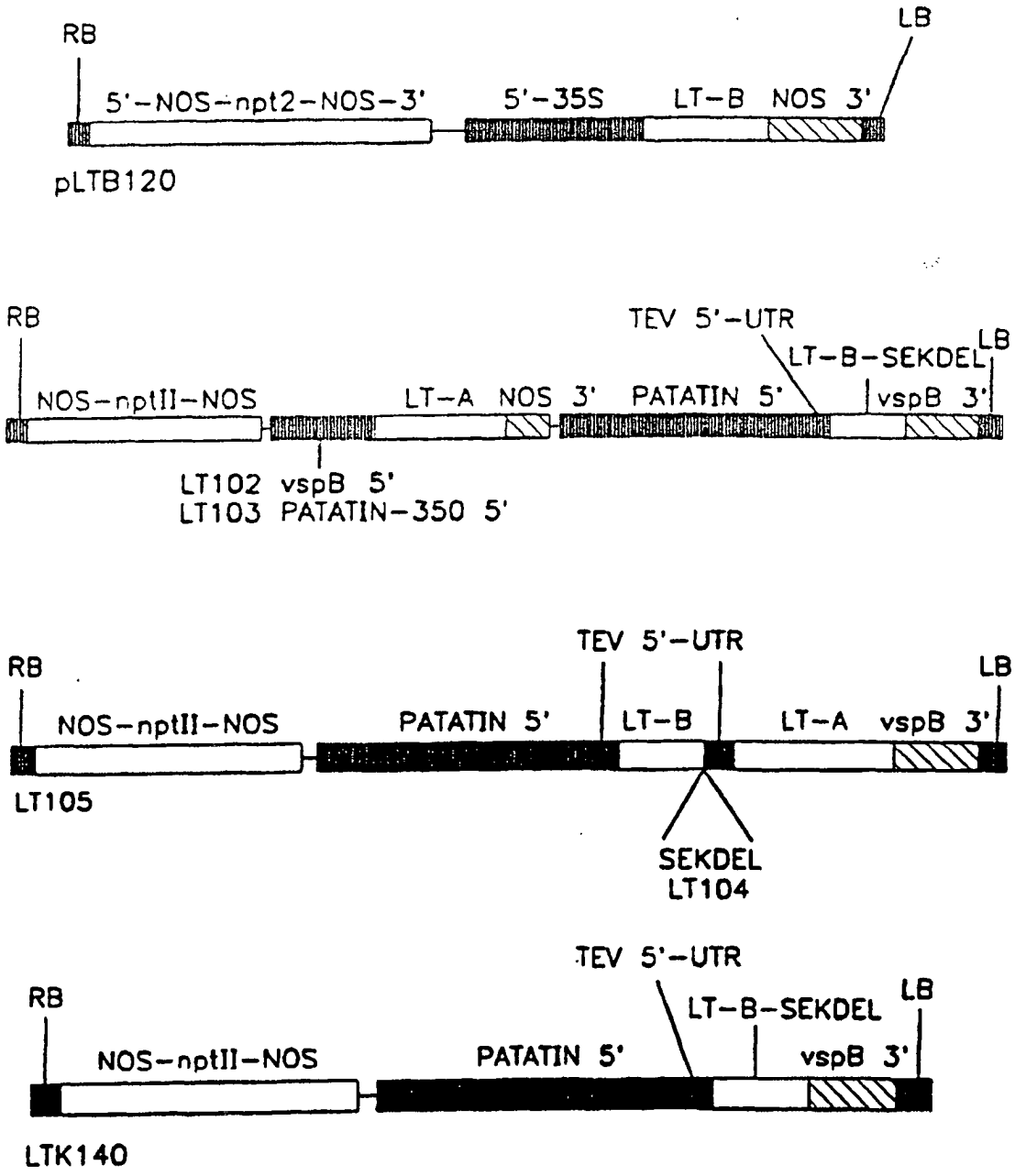

RB
LB
5'-NOS-npt2-NOS-3'
5'-35S
LT-B
NOS 3'
pLTB120
RB
TEV 5'-UTR
LT-B-SEKDEL
LB
NOS-nptII-NOS
LT-A
NOS 3'
PATATIN 5'
vspB 3'
LT102 vspB 5'
LT103 PATATIN-350 5'
RB
TEV 5'-UTR
LB
NOS-nptII-NOS
PATATIN 5'
LT-B
LT-A
vspB 3'
LT105
SEKDEL
LT104
TEV 5'-UTR
RB
LT-B-SEKDEL
LB
NOS-nptII-NOS
PATATIN 5'
vspB 3'
LTK140

FIG. 11

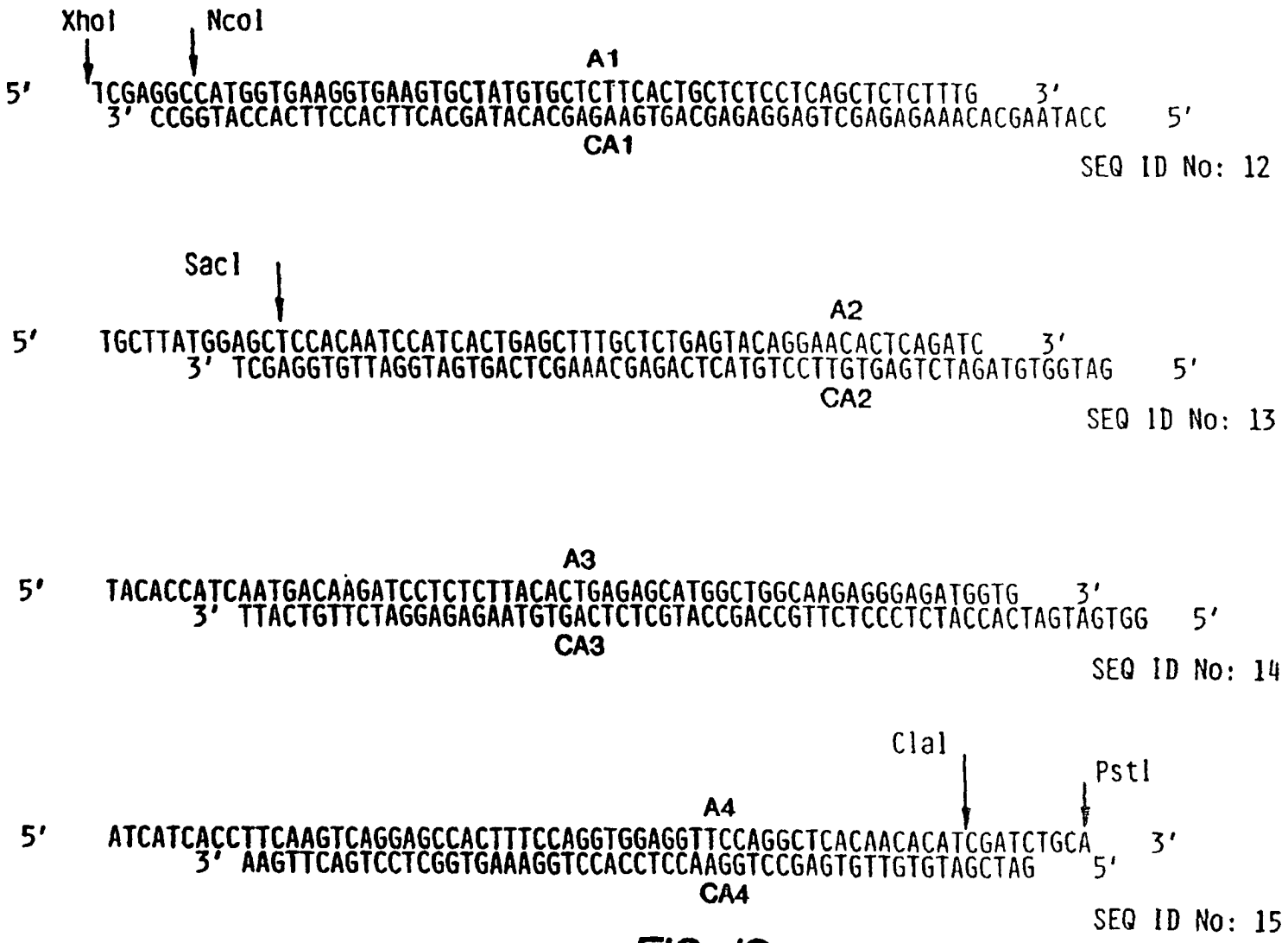

XhoI
NcoI
A1
5' TCGAGGCCATGGTGAAGGTGAAGTGCTATGTGCTCTTCACTGCTCTCCTCAGCTCTCTTTG 3'
3' CCGGTACCACTTCCACTTCACGATACACGAGAAGTGACGAGAGGAGTCGAGAGAAACACGAATACC 5'
CA1
SEQ ID No: 12
SacI
A2
5' TGCTTATGGAGCTCCACAATCCATCACTGAGCTTTGCTCTGAGTACAGGAACACTCAGATC 3'
3' TCGAGGTGTTAGGTAGTGACTCGAAACGAGACTCATGTCCTTGTGAGTCTAGATGTGGTAG 5'
CA2
SEQ ID No: 13
A3
5' TACACCATCAATGACAAGATCCTCTCTTACACTGAGAGCATGGCTGGCAAGAGGGAGATGGTG 3'
3' TTACTGTTCTAGGAGAGAATGTGACTCTCGTACCGACCGTTCTCCCTCTACCACTAGTAGTGG 5'
CA3
SEQ ID No: 14
ClaI
PstI
A4
5' ATCATCACCTTCAAGTCAGGAGCCACTTTCCAGGTGGAGGTTCCAGGCTCACAACACATCGATCTGCA 3'
3' AAGTTCAGTCCTCGGTGAAAGGTCCACCTCCAAGGTCCGAGTGTTGTGTAGCTAG 5'
CA4
SEQ ID No: 15

FIG. 12

REINIGUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN DURCH
ELEKTROPHORESE AUF EINEM DENATURIERENDEN 12%IGEN
POLYACRYLAMID-GEL



REINIGEN VON OLIGONUKLEOTIDEN UND KINASIEREN DER 5'-ENDEN



KOMBINIERE SEGMENT A1 + SEGMENT A2 + SEGMENT A3 + SEGMENT A4



A-SATZ
AMPLIFIKATION DER KORREKTEN LIGATIONSPRODUKTE DURCH
AMPLIGASE
(EINE THERMOSTABILE LIGASE)



LIGIEREN IN pBLUESCRIPT KS

FIG. 13


XhoI
ClaI
B1
5' TCGAGATCGATTCCCAGAAGAAGGCCATTGAGAGGATGAAGGACACCTTGAGGATCACCTACCTC 3'
3' CTAGCTAAGGGTCTTCTTCCGGTAACTCTCCTACTTCCTGTGGAACTCCTAGT 5'
CB1
SEQ ID No: 16
B2
5' ACTGAGACCAAGATTGACAAGCTCTGTGTGTGGAACAACAAGACTCCAAACTCCATT 3'
3' GGATGGAGTGACTCTGGTTCTAACTGTTCGAGACACACACCTTGTTGTTCTGAGGT 5'
CB2
SEQ ID No: 17
BbsI
KpnI
XbaI
B3
5' GCTGCCATCAGCATGGAGAACTAAGTCTTCGGTACCTAT 3'
3' TTGAGGTAACGACGGTAGTCGTACCTCTTGATTCAGAAGCCATGGATAGATC 5'
CB3
SEQ ID No: 18

FIG. 14

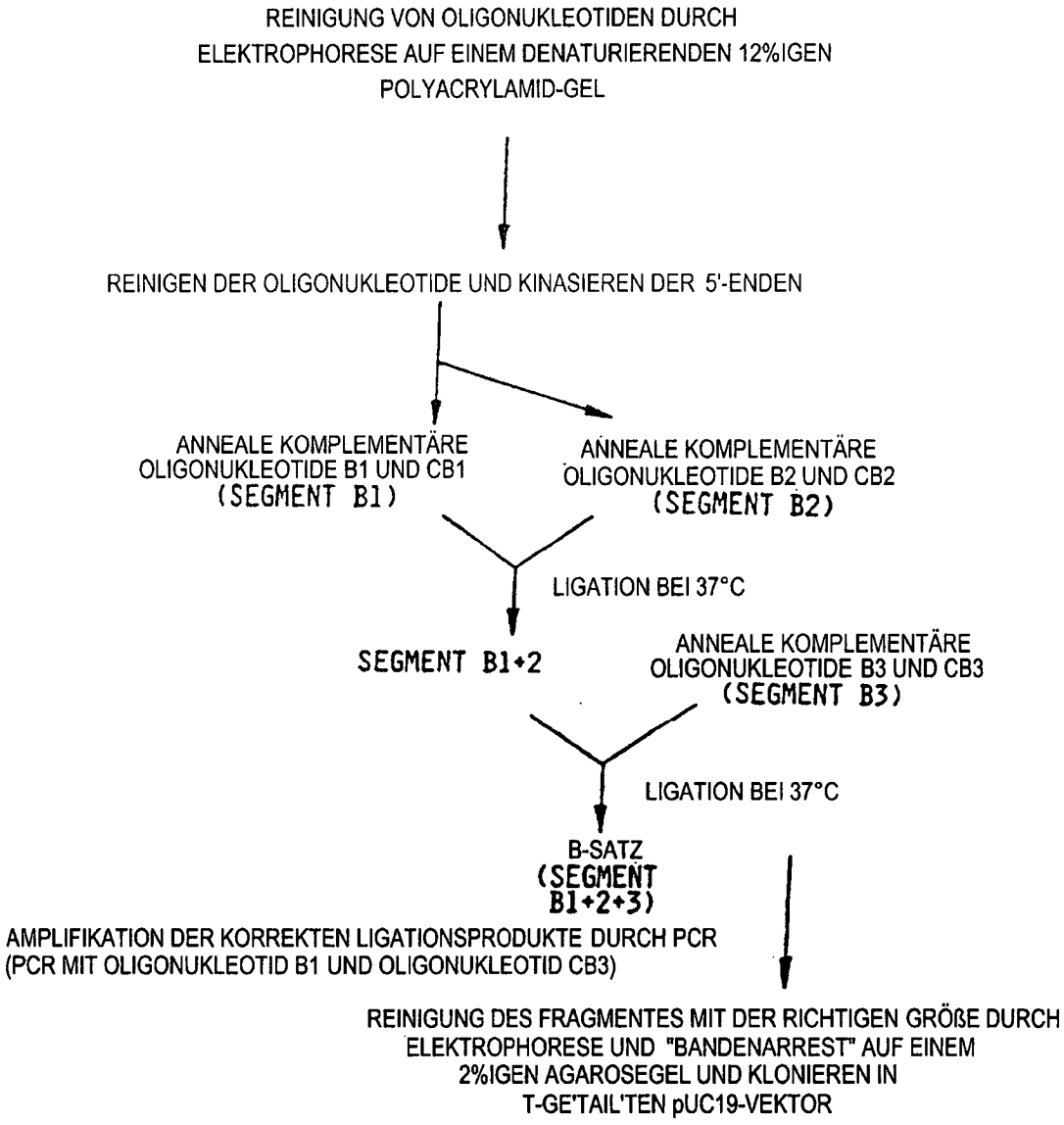

REINIGUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN DURCH ELEKTROPHORESE AUF EINEM DENATURIERENDEN 12%IGEN POLYACRYLAMID-GEL
REINIGEN DER OLIGONUKLEOTIDE UND KINASIEREN DER 5'-ENDEN
ANNEALE KOMPLEMENTÄRE OLIGONUKLEOTIDE B1 UND CB1 (SEGMENT B1)
ANNEALE KOMPLEMENTÄRE OLIGONUKLEOTIDE B2 UND CB2 (SEGMENT B2)
LIGATION BEI 37°C
SEGMENT B1+2
ANNEALE KOMPLEMENTÄRE OLIGONUKLEOTIDE B3 UND CB3 (SEGMENT B3)
LIGATION BEI 37°C
B-SATZ (SEGMENT B1+2+3)
AMPLIFIKATION DER KORREKTEN LIGATIONSPRODUKTE DURCH PCR (PCR MIT OLIGONUKLEOTID B1 UND OLIGONUKLEOTID CB3)
REINIGUNG DES FRAGMENTES MIT DER RICHTIGEN GRÖßE DURCH ELEKTROPHORESE UND "BANDENARREST" AUF EINEM 2%IGEN AGAROSEGEL UND KLONIEREN IN T-GE'TAIL'TEN pUC19-VEKTOR

FIG. 15

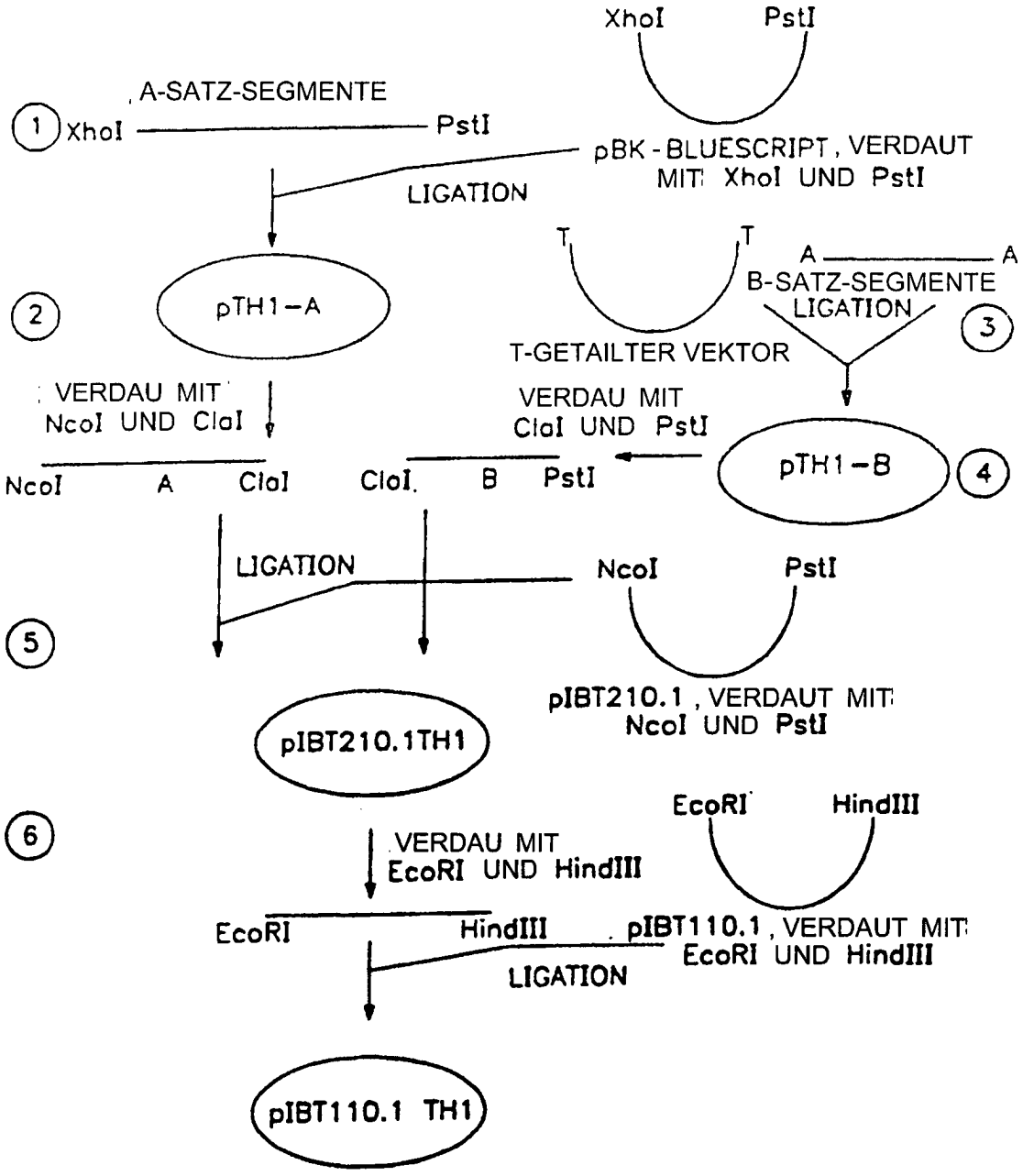

XhoI
PstI
A-SATZ-SEGMENTE
1
XhoI
PstI
pBK-BLUESCRIPT, VERDAUT MIT XhoI UND PstI
LIGATION
T
T
A
A
B-SATZ-SEGMENTE
LIGATION
3
2
pTH1-A
T-GETAILTER VEKTOR
VERDAU MIT NcoI UND ClaI
VERDAU MIT ClaI UND PstI
NcoI
A
ClaI
ClaI
B
PstI
pTH1-B
4
LIGATION
NcoI
PstI
5
pIBT210.1, VERDAUT MIT NcoI UND PstI
pIBT210.1TH1
EcoRI
HindIII
6
VERDAU MIT EcoRI UND HindIII
EcoRI
HindIII
pIBT110.1, VERDAUT MIT EcoRI UND HindIII
LIGATION
pIBT110.1 TH1

FIG. 16

LT-B-mRNA aus verschiedenen Konstrukten

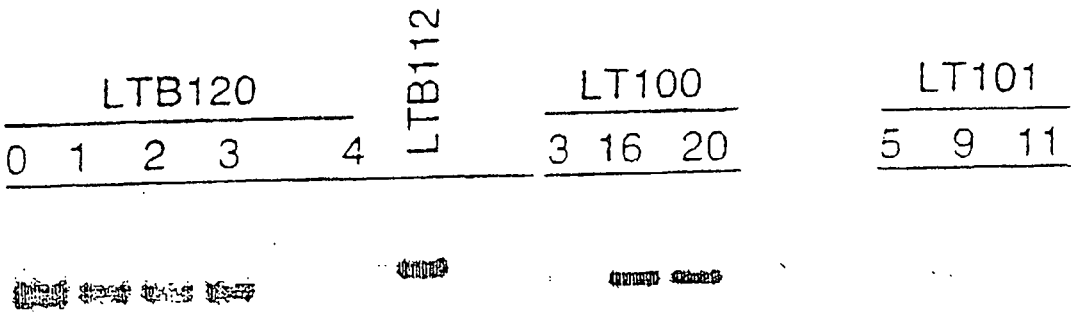


FIG. 17