



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **328224**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 1/21 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01)
A61K 39/07 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01)

Patentstyret

| | | | | | |
|------|-----------|------------|------|---------------------------|------------------------------|
| (21) | Søknadsnr | 19981746 | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 1996.10.21 PCT/GB96/02580 |
| (22) | Inng.dag | 1998.04.17 | (85) | Videreføringsdag | 1998.04.17 |
| (24) | Løpedag | 1996.10.21 | (30) | Prioritet | 1995.10.20, GB, 9521568 |
| (41) | Alm.tilgj | 1998.06.22 | | | |
| (45) | Meddelt | 2010.01.11 | | | |

| | | |
|------|------------|---|
| (73) | Innehaver | Actogenix NV, Technologiepark 4, 9052 ZWIJNAARDE, BE |
| (72) | Oppfinner | Lothar Steidler, Gent, BE Erik Remaut, Gent, BE Jeremy Mark Wells, Cambridge, England, GB Richard William Falla Lepage, Cambridge, England, GB |
| (74) | Fullmektig | Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO |

| | | |
|------|-----------------------|--|
| (54) | Benevnelse | Ikke-invasive, grampositive bakterier og anvendelse av disse til fremstilling av adjuvanser eller vaksiner. |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO 93/17117 A1 (LYNXVALE LIMITED) 1993.09.02, hele dokumentet, KOIVULA, T. et al., Isolation and Characterization of Lactococcus lactis subsp. lactis Promoters, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 57(2), 1991, side 333-340 van de GUCHTE M. et al., Heterologous Gene Expression in Lactococcus lactis subsp. lactis: Synthesis, Secretion, and Processing of the Bacillus subtilis Neutral Protease, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 56(9), 1990, side 2606-2611 KONG D. and KUNIMOTO D.Y., Secretion of Human Interleukin 2 by Recombinant Mycobacterium bovis BCG, Infection and Immunity, Vol 63(3), 1995, side 799-803 |
| (57) | Sammendrag | |

Fremgangsmåter for utlevering av biologisk aktive polypeptider og/eller antigener, sammen med utleveringsmidler og farmasøytiske formuleringer som omfatter slike utleveringsmidler.

Foreliggende oppfinnelse angår ikke-invasive, grampositive bakterier som for eksempel *Lactococcus*, som tilveiebringer biologisk aktive polypeptider i kroppen, spesielt i slimhinnene. Videre angår oppfinnelsen anvendelse av disse ikke-invasive, grampositive bakteriene til fremstilling av adjuvanser eller vaksiner.

Det begrensede antall adjuvanser som er godkjent for anvendelse i humane vaksiner (på grunn av toksisiteten eller patogeniteten av de fleste aktive midler, slik som freunds komplette adjuvans) og oppdagelsen i løpet av de siste 20 år av et stort antall polypeptider som er involvert i proliferasjon, differensiering og aktivering av B-celler og T-celler, har henledet oppmerksomhet på muligheten for å anvende disse faktorer (cytokiner) for å forsterke responser på vaksiner, og for å rette immunresponsen mot en spesiell vaksine langs ønskede reaksjonsveier. Behovet for denne fremgangsmåte har blitt enda mer tydelig fordi nylige immunologiske oppdagelser har markert at celleformidlede og antistoffformidlede immunresponser for en stor grad er to responser som gjensidig utelukker hverandre. Hvorvidt antistoffdannelse eller effektor-T-celler og makrofager aktiveres, bestemmes av hvilken spesiell rekke av cytokiner som utløses av et gitt antigen eller patogen eller en gitt vaksine. Mest viktig er den funksjonelle aktivitet av typene av hjelper-T-celler, TH1 eller TH2, som er involvert i responsen mot hvert spesielle antigen eller invaderende patogen.

Fordi beskyttende immunitet mot et patogent middel vanligvis enten oppstår som en konsekvens av antistoffdannelse (ekstracellulære patogener, oppløselige oksiner eller intracellulære patogener etter deres frigivelse i vevsfluider fra døde, døende eller produktive celler) eller av celleformidlede responser (intracellulære patogener), er det i prinsipp ytterst fordelaktig å være i stand til å styre immunresponser på en vaksine, enten mot antistoffdannelse eller T-celle- og makrofagaktivering. For at de beskyttende effekter av vaksiner skal vedvare så lenge som mulig, er det også viktig å være i stand til å øke amplituden, varigheten og hukommelses-

komponentene av immunresponsen.

Av disse årsaker har et stort antall forskere fokusert sin oppmerksomhet på muligheten til å utnytte ett eller flere av medlemmene av cytokinnettverket av signaleringsproteiner som vaksineadjuvaner. Denne fremgangsmåte kan 5 være enda mer signifikant når det tas i betraktning at tapet av hjelper-T-celler - og således deres cytokinproduksjon - kan være forbundet med svikten hos individer som lider av visse typer av nedarvede eller ervervede immunsvikttilstander til å 10 være i stand til å reagere på spesielle vaksiner.

Selv om mye oppmerksomhet har vært rettet på anvendelse av cytokiner for disse formål, er det kun rapportert om begrenset suksess med utnyttelse av cytokiner som adjuvaner. Det har medført betydelige vanskeligheter med å administrere 15 cytokinadjuvaner ved hjelp av fremgangsmåter som ville være egnede for inkludering i et vaksiner regime. Denne vanskelighet kan eksemplifiseres ved å referere til undersøkelser med anvendelse av IL-2' som et adjuvans.

IL-2 har tiltrukket seg spesiell oppmerksomhet som et 20 mulig adjuvans fordi, selv om dets hovedkilde antas å være T-hjelper 1-celler, dets hovedaktiviteter antas å inkludere involvering av en bred variasjon av aspekter av immunresponser, slik som T-celleproliferasjon, syntese av andre cytokiner, B-cellevekst og immunglobulinsyntese. IL-2 er 25 således et T-celleavledet cytokin som først ble beskrevet som en T-celle-vekstfaktor. Det er nå kjent å stimulere vekst og differensiering av T-celler, B-celler, NK-celler, monocytter, makrofager og oligodendrocytter. Generelt er adjuvansaktivitet med hensyn til IL-2, som er blitt rapportert av mange 30 forskere, funnet å være avhengig av anvendelse av mange injeksjoner av cytokiner eller dets inkorporering i liposomer eller oljeemulsjoner. For å unngå dette behov har andre forskere enten uttrykt IL-2 sammen med vaksineantigener i rekombinante bakterielle og virusvektorer, eller de har konstruert IL- 35 2:antigenfusjonsproteiner; de sistnevnte hevdes å tilveiebringe markert økning av den immunogene evne hos antigenkomponenten av fusjonspartneren.

Andre ønskelige egenskaper hos vaksiner inkluderer

behovet for at de er så ufarlige som mulig til å virke effektivt etter administrering av det minst mulige antall doser, for å være egnede for administrering via slimhinneoverflater (f.eks. oralt, intranasalt eller intravaginalt),
5 for således å unngå behovet for hypodermiske nåler og aktivering av lokale, slimhinneimmunresponser i tillegg til systemiske immunresponser. Kapasiteten for kontinuert proliferasjon av levende, svekkede patogener har resultert i et stort antall undersøkelser av anvendelse av rekombinante vaksinstammer av
10 virus og bakterier (slik som vaksinstammer av koppervirus eller salmonella- og tuberkelbakterier) som midler for utlevering av heterologe antigener.

I internasjonal patentsøknad med publikasjonsnummer W093/17117, som ble publisert 2. september 1993, beskrives
15 heterolog genekspressjon i *Lactococcus* ved hjelp av en T7- eller T7-lignende promoter, plassert under kontroll av en induserbar promoter. Det angis ikke noe i W093/17117 om konstitutive promotere.

Koivula et al. (Applied and Environmental
20 Microbiology (1992) 57:333-340) beskriver isolering og karakterisering av promotere fra *Lactococcus lactis* underart *lactis*. Disse promoterne anses ikke som særlig anvendbare som sådanne, ettersom bedre ekspressjons- og sekresjonsenheter vil kunne konstrueres fra separate promotere og signalsekvenser.

25 Van de Guchte et al. (Applied and Environmental Microbiology (1990) 56:2606-2611) anvender den heterologe genekspressjon i *Lactococcus lactis* underart *lactis* til syntese, sekresjon og prosessering av *Bacillus subtilis*-nøytralproteasen, med sikte på akselerert ostemodning.

30 Kong og Kunimoto (Infection and Immunity (1995) 63:799-813) beskriver sekresjon av humaninterleukin 2 etter intravenøs injeksjon av den svekkede patogen *Mycobacterium bovis* BCG, ved å anvende en endogen BCG-promoter og varmesjokk 60-promoteren (hsp60). Forfatterne bemerker at promoterne er
35 vertsspesifikke.

Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse har tidligere utviklet systemer for ekspressjon av heterologe antigener i den ikke-patogene, ikke-koloniserende, ikke-invasive matkvalitets-

bakterie *Lactococcus lactis* (se UK patent GB-2278358B). De har tidligere vist at *Lactococcus lactis* er i stand til å produsere og utskille biologisk aktivt muse-IL-2 når de dyrkes *in vitro* (Steidler et al., Applied and Environmental Microbiology, april 1995, vol. 61, nr. 4, s. 1627-1629). Det faktum at *Lactococcus lactis* er ikke-invasiv - den er slett ingen kommensal bakterie og den er heller ikke vanligvis forbundet med kolonisering av slimhinneoverflater hos dyr - var det imidlertid ikke innlysende at denne bakterie kunne anvendes med vellykket resultat i en vaksinasjonsstrategi som fordret dannelselse av et cytokinadjuvans *in vivo*. Oppfinnerne har tidligere vist (GB-2278358B) at heterologt antigen kan være fullstendig antigenisk når det akkumuleres i cytoplasmaet fra *Lactococcus lactis* (fra hvilket det antas å lekke *in vivo* når cellene fordøyes av fagocytceller).

Ved manipulering av de passende genetiske elementer har oppfinnerne frembrakt nukleinsyrekonstruksjoner (kunstige operoner - koordinert transkriberte multigenenheter) for koekspresjon i *Lactococcus lactis* av et antigenisk polypeptid (eksemplifisert her ved anvendelse av tetanustoksin fragment C - TTEFC) og et biologisk aktivt cytokinpolyptid (eksemplifisert her ved anvendelse av interleukin-2 og også interleukin-6).

IL-6-cytokinet er av andre forskere vist å ha kapasitet til å forsterke museantigenspesifikke antistoffresponser *in vivo* og *in vitro*, og den foreliggende oppfinnelser har også vært i stand til å fremstille ekspresjonsenheter for IL-6 i *L. lactis*. IL-6 er et multifunksjonelt cytokin som utskilles av både lymfoide og ikke-lymfoide celler som er kjent å besitte pleiotropiske aktiviteter som spiller en sentral rolle for vertsforsvar. IL-6 kan oppvise vekstinduserende, vekstinhiberende og differensieringsinduserende aktiviteter, avhengig av målcellene. Disse aktiviteter inkluderer differensiering og/eller aktivering av T-celler og makrofager, vekstfremmelse av B-celler (observert som vekstfremmelse av B-celle-tumorlinjer *in vitro*), terminal differensiering (sekresjon av immunglobuliner) i B-celler, og - med systematisk virkning - utløsning av den hepatisk akutfaseproteinrespons. Som mest viktig for slimhinneimmunisering er

IL-6 vist å indusere høy IgA-utskillelse i IgA-utsatte B-celler.

For å eksemplifisere foreliggende oppfinnelse ble operoner for samtidig ekspresjon av IL-2 og IL-6 separat
5 konstruert i en konstitutiv ekspresjonsvektor (pTREX1, også kjent som pEX1) slik at transkripsjonen av TTFC-genet og interleukingenet kunne kontrolleres av aktiviteten av et *Lactococcus*-promoterelement med tidligere definert aktivitet (såkalt P1). Konstruksjonene ble preparert slik at, etter
10 translasjon av mRNA transkribert fra de kunstige operoner, ville TTFC-antigenet akkumulere intracellulært.

Når preparater av disse bakterier ble administrert intranasalt til mus utviste bakterier konstruert for å uttrykke enten interleukin-2 eller interleukin-6 ca. 10 ganger
15 mer anti-TTFC-antistoff enn konstruksjonene som uttrykte TTFC alene. Hvert av disse interleukiner hadde således markert adjuvansaktivitet i eksperimentsystemet.

Det var ikke innlysende fra verken kapasiteten hos *Lactococcus lactis* til å utlevere et heterologt antigen, eller
20 dets evne til å produsere IL-2 *in vitro*, at det ville være en egnet vehikkel for utlevering av et cytokin *in vivo*, slik at tilstrekkelig aktivt cytokin ville tilveiebringes for å gi en adjuvanseffekt. *Lactococcus lactis* er ikke-invasiv og ikke-koloniserende, hvilket betyr at når disse bakterier anvendes
25 for å utlevere et antigen til immunsystemet, f.eks. via slimhinneoverflater, kommer de mest sannsynlig inn i lymfoidvev som en konsekvens av fagocytose av M (eller mikrofold) celler som prøver innholdet av slimhinnesekretjoner nær slimhinne-lymfoidvev. Mikropartikulære antigener (f.eks. tetanustoksoid
30 inkorporert i poly-L-laktid-mikropartikler (kommer på denne måte inn i lymfoidvev passivt, mens patogene bakterier) eller svekkede vaksiner (slik som arter av *Listeria*, *Salmonella* og *Shigella* er i stand til å invadere celler og vev ved aktiv stimulering av deres opptak i slimhinneepitelceller, i tillegg
35 til å komme inn via M-celler. Fordi aktiviteten av cytokinet som adjuvanse tidligere er funnet å kreve mange injeksjoner eller utlevering ved vedvarende frigivelse (Heath and Playfair (1992) Vaccine 7: 427-434), og fordi cytokinene kun vil be-

skyttes mot proteolytisk spaltning inne i fagocytiske celler, mens *Lactococcus lactis*-cellene forblir intakte eller levedyktige, er det uventet at *Lactococcus*-celler som uttrykker cytokiner skulle oppvise markert adjuvansaktivitet som vist 5 heri. Dette kan kanskje erkjennes dersom det blir forstått at død og oppløsning av bakteriepartiklene vil begunstige antigenfrigivelse, men forhindre mer enn meget kortvarig produksjon av cytokiner. Oppfinnernes undersøkelser indikerer allikevel at ekspresjon av IL-2 eller IL-6 av *Lactococcus* 10 *lactis* har en markert adjuvanseffekt. Selv om ekspressorbakteriene skulle administreres parenteralt i stedet for mukosalt, ville de samme vurderinger gjelde.

Fordi således *Lactococcus lactis* ikke er invasiv - den er da ikke en kommensal bakterie og den er også avhengig 15 av tilførsel av næringsstoffer i form av aminosyrer og peptider som lite sannsynlig er tilgjengelig *in vivo* - er det demonstrasjonen at de cytokinutskillende stammer av *L. lactis* allikevel er i stand til å forsterke antistoffproduksjon overraskende. Disse resultater viser således for første gang at 20 rekombinante stammer av *Lactococcus lactis* kan anvendes for å syntetisere og utlevere biologisk aktive molekyler *in vivo*. Av spesiell interesse er det faktum at disse resultater viser muligheten for å forsterke slimhinneresponsen så vel som den systemiske immunrespons, fordi IL-6 er blitt vist å være et 25 cytokin som er i stand til å indusere en høy IgA-utskillelse i IgA-utsatte B-celler.

Det funn at *Lactococcus lactis* er i stand til å bi-beholde dens biologiske aktivitet på en slimhinne-membran i tilstrekkelig lang tid til å utlevere en biologisk aktiv dose 30 av hvert av to forskjellige rekombinante cytokiner og dermed forsterke en immunrespons mot et heterologt antigen, demonstrerer bred anvendelig for utleveringen av polypeptider for andre formål enn adjuvansaktivitet alene.

Kapasiteten hos *L. lactis* til å produsere og utskille 35 polypeptider viser at det er mulig å benytte disse bakterier for *in vivo* produksjon og utlevering av polypeptider som er kjent for å være aktive i mikromolare, nanomolare eller pikomolare konsentrasjoner. Fordi nøyaktig dosering av disse poly-

peptider, og behovet for tilfeldig innføring av bakterieceller har mindre betydning for anvendelse på dyr enn mennesker, er det sannsynlig at denne metode for utlevering av rekombinante polypeptider vil være spesielt verdifull på veterinær-
5 medisinske anvendelsesområder. Selv i den humane medisin er imidlertid det faktum at cytokinproduksjon kan begrenses til stedene for avsettelse av uskadelige bakterieceller, og er tilgjengelig nær antigenet under de tidligste faser av immun-
responsen, kan begünstige anvendelsen i tilfeller - slik som
10 adjuvansaktivitet - hvor det biologisk aktive polypeptid er best lokalisert for å unngå toksiske systemiske bivirkninger.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer således:

Ikke-invasiv, grampositiv bakterie, kjennetegnet ved at den omfatter minst én nukleinsyresekvens som
15 uttrykkes under kontroll av en konstitutiv promoter og koder for et heterologt, biologisk aktivt polypeptid, hvori nukleinsyren som koder for det biologisk aktive polypeptid, omfatter en sekretorisk signalsekvens som tilveiebringer sekresjon av det
20 biologisk aktive polypeptid, hvori ekspresjonen av nevnte biologisk aktive polypeptid skjer uavhengig av enhver induser eller annet regulatorisk signal, for anvendelse som et medikament.

De biologisk aktive polypeptider kan enten være
25 homologe med bakterien eller heterologe, avledet fra enten eukaryote kilder eller prokaryote kilder, eller deres virusser.

I overensstemmelse med et annet aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes anvendelse av en ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge ethvert av kravene 1 til 7, for
30 fremstilling av en adjuvans, samt anvendelse av en ikke-invasiv, grampositiv bakterie som angitt i ethvert av kravene 8 til 10, for fremstilling av en vaksine.

"Biologisk aktivitet" refererer til evne til å utføre en biologisk funksjon, og impliserer med referanse til et
35 polypeptid at polypeptidet inntar en stabil konformasjon ("foldet form") som er den samme eller tilnærmet analog med den native konfigurasjon. Når det er foldet korrekt eller vesentlig korrekt, f.eks. med dannelse av passende foldede

enheter, α -spiraler, β -plater, domener, disulfidbroer etc., bør et polypeptid ha evnen til å utføre dets naturlige funksjon. Funksjonsenheten i et polypeptid er generelt et domene.

5 Kun evne til å bindes av et antistoff eller en annen reseptor, enten med eller uten utløsning av en immunrespons, er passiv og representerer ikke "biologisk aktivitet". Ethvert antigen har evnen til å bindes av et antistoff, men er ikke nødvendigvis biologisk aktivt.

10 Et "heterologt" polypeptid er et polypeptid som ikke er nativt for bakterier, dvs. at de ikke uttrykkes av bakterien i naturen eller før innføring i bakterien, eller en etterfølger av denne, av nukleinsyre som koder for polypeptidet.

15 En bakterie ifølge foreliggende oppfinnelse er som nevnt grampositiv og kan i prinsipp være enhver uskadelig bakterie, f.eks. *Listeria innocula*, *Staphylococcus xylosus* eller en *Lactococcus*. *Lactococcus*, spesielt *Lactococcus lactis*, representerer en foretrukket utførelsesform av
20 oppfinnelsen. Slike bakterier er ikke-koloniserende.

 En fagperson vil erkjenne at bakteriene ifølge oppfinnelsen kan anvendes for å utlevere et bredt område av biologisk aktive polypeptider. Eksempler på egnede polypeptider inkluderer de som er i stand til å virke lokalt eller
25 systemisk, f.eks. et polypeptid som er i stand til å oppvise endokrinaktiviteter som påvirker lokal metabolisme eller kroppens totale metabolisme og/eller de biologisk aktive polypeptider er slike som er i stand til å regulere aktiviteten av celler som tilhører det immunhemopoteiske system og/eller de
30 biologisk aktive polypeptider er slike som er i stand til påvirke levedyktigheten, veksten og differensieringen av mange forskjellige normale eller neoplastiske celler i kroppen eller indusere akutt fase-inflammatoriske responser mot skade og infeksjon, og/eller de biologisk aktive polypeptider er slike
35 som er i stand til å øke eller indusere resistens mot infeksjon av celler og vev formidlet av kjemokiner som virker på deres målcellereseptorer, eller proliferasjon av epitelceller eller fremmelse av sårheling, og/eller de biologisk

aktive polypeptider modulerer ekspresjon eller produksjon av stoffer i celler i kroppen.

Spesifikke eksempler på slike polypeptider inkluderer insulin, veksthormon, prolaktin, kalsitonin, luteiniserende
5 hormon, paratyreoidhormon, somatostatin, tyroidstimulerende hormon, vasoaktivt tarmpolypeptid, et strukturelt gruppe 1-cytokin som inntar en antiparallell 4α -heliksbundet struktur, slik som IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN- γ , EPO, G-CSF, LIF,
10 OSM, CNTF, GH, PRL eller IFN α/β , et strukturelt gruppe 2-cytokin som ofte er celleoverflateassosiert, formsymmetriske homotrimerer og subenhetene inntar konformasjonen " β -jelly roll" beskrevet for visse viruskappeproteiner, slik som TNF-familien av cytokiner, f.eks. TNF α , TNF β , CD40, CD27 eller
15 FAS-ligander, IL-1-familien av cytokiner, fibroblastvekstfaktorfamilien, blodplateavlede vekstfaktorer, transformerende vekstfaktorer β og nervevekstfaktorer, et strukturelt gruppe 3-cytokin som omfatter kortkjedete α/β -molekyler som produseres som store transmembran-forløpermolekyler som inneholder minst ett EGF-domene i det ekstracellulære område,
20 f.eks. den epidermale vekstfaktorfamilie av cytokiner, kjemokinene kjennetegnet ved at de har aminosyresekvenser gruppert rundt konserverte cysteinrester (C-C eller C-X-C kjemokinundergrupper) eller de insulinbeslektede cytokiner, et
25 strukturelt gruppe 4-cytokin som oppviser mosaikkstrukturer, slik som hereguliner eller neureguliner sammensatt av forskjellige domener, f.eks. EGF, immunglobulinlignende og kringledomener.

Alternativt kan det biologisk aktive polypeptid være
30 en reseptor eller en antagonist for biologisk aktive polypeptider som definert ovenfor.

Bakterien uttrykker det biologisk aktive polypeptid og antigenet fra nukleinsyre inneholdt i bakterien. Nukleinsyren kan omfatte én eller flere nukleinsyrekonstruksjoner
35 hvori nukleinsyre som koder for det biologisk aktive polypeptid og nukleinsyre som koder for antigenet er under kontroll av passende regulatoriske sekvenser for ekspresjon i bakterien.

Egnede vektorer omfattende nukleinsyre for innføring i bakterier kan velges eller konstrueres til å inneholde passende regulatoriske sekvenser, inkludert promotersekvenser, terminatorfragmenter, enhancersekvenser, markørgener og andre
5 passende sekvenser. Vektorer kan være plasmider, virus, f.eks. fag eller fagmid. For ytterligere detaljer se f.eks. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2. utgave, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Mange kjente teknikker og protokoller for manipulering av nukleinsyrer,
10 f.eks. ved fremstilling av nukleinsyrekonstruksjoner, mutageneser, sekvensering, innføring av DNA i celler og gen-ekspressjon, og analyse av proteiner, er beskrevet i detalj i *Short Protocols in Molecular Biology*, 2. utgave, Asubel et al., red., John Wiley & Sons, 1992. Publikasjonen av Sambrook
15 et al. og Asubel et al. er inkorporert heri ved referanse.

I en foretrukket utførelsesform er kodingssekvensene for det biologisk aktive polypeptid og antigenet inneholdt i et operon, dvs. en nukleinsyrekonstruksjon for multi-cistronisk ekspresjon. I et operon resulterer transkripsjon
20 fra promoteren i et mRNA som omfatter mer enn én kodings-sekvens der hver sekvens har sitt eget passende plasserte ribosombindingssete oppstrøms. Flere enn ett polypeptid kan således translateres fra et enkelt mRNA. Anvendelse av et operon muliggjør koordinering av ekspresjonen av det biologisk
25 aktive polypeptid og antigenet.

I en alternativ utførelsesform er kodingssekvensene for det biologisk aktive polypeptid og antigenet en del av den samme nukleinsyrevektor, eller separate vektorer, og er
30 individuelt under regulatorisk kontroll av separate promoterer. Promoterene kan være like eller forskjellige.

En nukleinsyrekonstruksjon eller en vektor som omfatter en kodingssekvens for et biologisk aktivt polypeptid og en kodingssekvens for et antigen, hvori hver kodingssekvens er under kontroll av en promoter for ekspresjon i en ikke-invasiv
35 bakterie (som beskrevet - spesielt en ikke-kommensal og/eller ikke-koloniserende bakterie, f.eks. en *Lactococcus*), enten som et operon eller ikke, tilveiebringes.

En benyttet promoter uttrykkes fortrinnsvis

konstitutivt i bakterien. Anvendelse av en konstitutiv promoter unngår behovet for å tilføre en induktor eller et annet regulatorisk signal for at ekspresjon skal finne sted. Promoterer dirigerer fortrinnsvis ekspresjon på et nivå hvor bakterievertscellen forblir levedyktig, dvs. at den bibeholder noe metabolsk aktivitet selv om veksten ikke opprettholdes. En slik ekspresjon kan således fordelaktig være på et lavt nivå. Når f.eks. ekspresjonsproduktet akkumulerer intracellulært, kan ekspresjonsnivået føre til akkumulering av ekspresjonsproduktet ved mindre enn ca. 10 % cellulært protein, fortrinnsvis ca. eller mindre enn ca. 5 %, f.eks. ca. 1-3 %. Promoterer kan være homolog med den anvendte bakterie, dvs. en promoter som finnes i denne bakterie i naturen. En *Lactococcus*-promoter kan f.eks. anvendes i en *Lactococcus*-bakterie. En foretrukket promoter for anvendelse i *Lactococcus lactis* (eller andre *Lactococci*) er "P1" avledet fra kromosomet til *Lactococcus lactis* (Waterfield N. R.; Le Page, R. W. F.; Wilson P. W. og Wells J. M., Gene (in press)) og sekvensene av denne er vist i den følgende (SEKV.ID NR: 1):

```

20 GATTAAGTCA TCTTACCTCT TTTATTAGTT TTTTCTTATA ATCTAATGAT
AACATTTTTTA TAATTAATCT ATAAACCATA TCCCTCTTTG GAATCAAAT
TTATTATCTA CTCCTTTGTA GATATGTTAT AATACAAGTA TC

```

Nukleinsyrekonstruksjonen eller -konstruksjonene kan omfatte en sekretorisk signalsekvens. Således kan nukleinsyren som koder for det biologisk aktive polypeptid tilveiebringe utskillelse av det biologisk aktive polypeptid (ved passende kobling av en nukleinsyresekvens som koder for en enkel sekvens til nukleinsyresekvensen som koder for polypeptidet). Evnen hos en bakterie som inneholder nukleinsyren til å utskille polypeptidet kan testes *in vitro* under dyrkingsbetingelser som opprettholder organismens levedyktighet. Egnede sekretoriske signalsekvenser inkluderer de med aktivitet i grampositive organismer, slik som *Bacillus*, *Clostridium* og *Lactobacillus*. Slike sekvenser kan inkludere α -amylasesekresjonslederen i *Bacillus amyloliquefaciens* eller sekresjonslederen i stafylokinaseenzymet som utskilles av noen stammer av *Staphylococcus* som er kjent for å funksjonere i både grampositive og gramnegative verter (se "Gene Expression

Using Bacillus", Rapoport (1990) Current Opinion in Biotechnology 1:21-27), eller ledersekvenser fra mange andre *Bacillus*-enzymmer eller S-lag-proteiner (se s. 341-344 i Harwood and Cutting, "Molecular Biological Methods for Bacillus", John Wiley & Co. 1990). For *Lactococcus* kan ledersekvensen for proteinet betegnet Usp45 være foretrukket (SEKV.ID NR: 2):

ATG AAA AAA AAG ATT ATC TCA GCT ATT TTA ATG TCT ACA GTG
 met lys lys lys ile ile ser ala ile leu met ser thr val
 10 ATA CTT TCT GCT GCA GCC CCG TTG TCA GGT GTT TAC GCT
 ile leu ser ala ala ala pro ley ser gly val tyr ala

Det kan imidlertid være foretrukket at antigenet akkumulerer intracellulært. Som diskutert burde fortrinnsvis akkumuleringsnivået tillate at bakterien forblir levedyktig, dvs. at den bibeholder noe metabolsk aktivitet, og kan være mindre enn ca. 10 % cellulært protein, fortrinnsvis ca. eller mindre enn ca. 5 % cellulært protein.

Antigenet kan i prinsipp være ethvert peptid eller polypeptid som en reseptor i immunsystemet, slik som et anti-20 stoff, kan bindes til. I en foretrukket utførelsesform er antigenet en bakteriell toksoidform av et toksin eller et antigenisk fragment av dette. For å oppnå god forenlighet av ekspresjon i *Lactococcus* som har en tilbøyelighet til bruk av A/T i forhold til G/C i dens kodingssekvenser (60 % A/T), kan 25 antigenet være ett hvis kodingssekvens er A/T-rikt (har et høyere A/T-innhold enn G/C). Antigenet kan f.eks. være et toksoid (eller et antigenfragment derav), eller en annen immunogenkomponent fra *Clostridium* eller *Pneumococcus* eller andre *Streptococcus*-arter. *Clostridium*-kodingssekvenser har 30 f.eks. ofte > 70 % A/T-baseparinnhold, hvilket også er tilfelle med gener fra den viktige humane malariaparasitt som tilhører slekten *Plasmodium*.

For anvendelse til økning av en immunrespons mot antigenet, dvs. antigen peptid eller polypeptid, som 35 diskutert heri, har det biologisk aktive polypeptid fortrinnsvis cytokinaktivitet. Cytokiner er diskutert i "The Cytokine Facts Book", Callard og Gearing (1994), Academic Press. Foretrukne polypeptider med cytokinaktivitet er interleukiner,

inkludert interleukin-2 (IL-2) og interleukin 6 (IL-6). Mange cytokiner inneholder en disulfidbro og de utskilles alle fra cellene som naturlig produserer dem. Det reduserende miljø i cytoplasmaet til bakterieceller ville forventes å forhindre
5 dannelsen av disulfidbroer. Det ville ikke være innlysende at et polypeptid som utskilles naturlig, spesielt et som naturlig inneholder en disulfidbro, ville være biologisk aktivt når det ble tilbakeholdt i en bakteriecelle.

I en utførelsesform er således det biologisk aktive
10 polypeptid et som utskilles fra celler som naturlig produserer det.

Anvendelsen av et cytokin for å øke en immunrespons mot antigenet i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse er spesielt egnet for antigener med lav immunogenitet. Appli-
15 sering av immunogen på en slimhinneoverflate utløser vanligvis en IgA-respons. En vaksines evne til å utløse en god (beskyttende nivå) slimhinneimmunrespons er et ytterst ønskelig trekk fordi det nå er kjent at sIgA-antistoffer spiller en vital rolle ved beskyttelse av slimhinneoverflater mot infeksjon.
20 sIgA som bindes til overflaten av kolerabasillen er f.eks. vist å være i stand til å forhindre eksperimentell kolera hos mus. sIgA som effektivt nøytraliserte HIV-1 kan spille en viktig rolle ved beskyttelse mot infeksjon av dette virus, fordi når først viruset har fått adgang til kroppen etableres
25 en livslang infeksjon. Metoder for pålitelig og langvarig induksjon av slimhinne sIgA-responser er derfor meget ettertraktet fordi majoriteten av humane virus og bakterielle patogener initierer infeksjoner ved å kolonisere slimhinneoverflater.

30 For å frembringe en bakterie ifølge foreliggende oppfinnelse innføres nukleinsyre i en bakterievertscelle ved en fremgangsmåte som omfatter innføring av en nukleinsyre i en ikke-invasiv bakterie, fortrinnsvis en grampositiv bakterie og helst en ikke-kommensal, ikke-koloniserende bakterie (slik som
35 *Lactococcus*). Ved innføringen kan det benyttes enhver tilgjengelig teknikk. For bakterieceller kan egnede teknikker inkludere kalsiumkloridtransformasjon, elektroporering og transfeksjon ved anvendelse av bakteriofag.

Innføringen kan etterfølges av og forårsake, eller tillate, ekspresjon fra nukleinsyre, f.eks. ved dyrking av vertsceller under betingelser for ekspresjon av genet. Dyrking av cellene i kultur under betingelser for ekspresjon av det biologisk aktive polypeptid og antigenet kan anvendes for å 5 verifisere at bakterien inneholder den kodende nukleinsyre og er i stand til å produsere det kodete materiale.

Selv om det tidligere er blitt vist mulig å uttrykke et heterologt polypeptid i en biologisk aktiv form i slike 10 bakterier, er dette kun alltid utført *in vitro* under dyrkingsbetingelser som er optimalisert for bakteriell levedyktighet og vekst. *In vivo*, f.eks. på slimhinne membranen, foreligger bakteriene i et miljø som ikke ville forventes å understøtte deres vekst eller levedyktighet. Det er således overraskende 15 at slike bakterier er i stand til å utlevere et polypeptid i en dose (mengde) som er tilstrekkelig for at den biologiske aktivitet av polypeptider skal føre til en påvisbar biologisk effekt.

I en foretrukket utførelsesform av bakterien har det 20 biologisk aktive polypeptid cytokinaktivitet og bakterien kan også uttrykke et antigen. Interleukiner, slik som IL-2 og IL-6, kan fordelaktig utleveres.

Økning av en immunrespons, slik som en antistoffrespons, tilveiebringer fortrinnsvis et immunresponsnivå som 25 beskytter et individ mot etterfølgende utfordring med antigenet i et patogen sammenheng. Dersom f.eks. antigenet er et bakterielt toksoid eller et toksinfragment, så kan nivået av en antistoffrespons på administrering av en bakterie i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse deretter beskytte 30 individet mot patogene konsekvenser på utfordring med det bakterielle toksin, f.eks. ved infeksjon med bakterier som produserer toksinet.

Administrering av bakterien ved applisering på en slimhinneoverflate kan være fordelaktig i visse sammenheng i 35 kraft av dannelse av en økt immunrespons på slimhinne membranen (f.eks. IgA-respons) i tillegg til en systemisk respons.

Bakterien kan appliseres i et næringsmedium, dvs. et medium som inneholder et stoff, eller stoffer, som bibeholder

(i det minste *in vitro*) metabolsk aktivitet i bakterien. Slike stoffer kan opprettholde levedyktighet, om enn ikke vekst av bakterien. Slike stoffer kan inkludere en energikilde som glukose, aminosyrer osv.

5 Individet som bakterien administreres til kan være et menneske eller et dyr, dvs. et ikke-humant pattedyr. Administreringen kan utføres nasalt, oralt, vaginalt eller analt. I sammenhenger hvor slimhinneadministrering ikke er foretrukket kan bakterien administreres på enhver annen egnet måte som
10 ligger innenfor kapasiteten til fagfolk, f.eks. parenteralt (i/v, i/p, s/c, i/m).

I en terapeutisk sammenheng, dvs. når den biologiske effekt av utlevering av polypeptidet til et individ er fordelaktig for dette individ, utføres administreringen fortrinnsvis
15 i en "terapeutisk effektiv mengde" som er tilstrekkelig til å være fordelaktig for en pasient. En slik fordel kan i det minste være lindring av minst et symptom. I en profylaktisk sammenheng kan mengden være tilstrekkelig til å redusere de skadelige virkninger på individets av en etterfølgende patogen
20 utfordring, f.eks. ved å øke immunresponsen. Den reelle mengde som administreres, og hastigheten og tidsforløpet for administreringen, vil avhenge av målet for administreringen, f.eks. den biologiske effekt som etterstrebes i betraktning av utfordringens natur og alvorlighet, og er gjenstand for rutine-
25 optimalisering. Forskrifter for behandling, inkludert profylaktisk vaksinasjon, f.eks. avgjørelser vedrørende dosering etc., ligger innenfor ansvaret til den behandlende lege og annet medisinsk personell.

Et preparat som omfatter bakterier kan administreres
30 alene eller i kombinasjon med andre behandlinger, enten samtidig eller sekvensielt.

Farmasøytiske preparater kan, i tillegg til bakterien, omfatte en farmasøytisk akseptabel eksipiens, bærer, buffer, stabilisator eller andre materialer som er velkjente for fagfolk. Slike materialer bør ikke være toksiske og
35 bør ikke forstyrre effektiviteten av den aktive bestanddel. Den nøyaktige beskaffenhet av bæreren eller et annet materiale kan avhenge av administreringsmåten. For intravenøs, kutan

eller subkutan injeksjon, eller injeksjon på stedet for en lidelse, kan det anvendes en parenteralt akseptabel vandig løsning som er pyrogenfri og som har egnet pH, isotonisitet og stabilitet. Fagfolk er i stand til å preparere egnede
5 løsninger. Konserveringsmidler, stabilisatorer, buffere, antioksidanter og/eller andre additiver kan inkluderes som nødvendig. Som diskutert kan et farmasøytisk preparat som omfatter en bakterie, omfatte ett eller flere næringsstoffer, f.eks. en energikilde som glukose, aminosyrer osv.

10 Oppfinnelsen tilveiebringer altså en ikke-invasiv, grampositiv bakterie som uttrykker et heterologt biologisk aktivt polypeptid, og muligens også et antigen, for farmasøytisk anvendelse, dvs. for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en menneskekropp eller dyrekropp ved kirurgi
15 eller terapi, inkludert profylakse ("vaksinasjon"). Bakterien kan være ikke-koloniserende og egnede eksempler inkluderer *Lactococcus*. Den administreres fortrinnsvis til en slimhinne-membran hos et individ, f.eks. for å forhøye en immunrespons hos individet.

20 Et ytterligere aspekt av oppfinnelsen tilveiebringer anvendelse av en bakterie ved fremstilling av en adjuvans eller en vaksine, dvs. et farmasøytisk preparat eller medikament, for administrering til et individ. Preparatet administreres fortrinnsvis til en slimhinne-membran hos
25 individet og kan være for å øke en immunrespons hos individet, f.eks. på et antigen som uttrykkes av bakterien.

Utførelsesformer for hvert aspekt av oppfinnelsen vil fremgå fra beskrivelsen, og fagfolk vil vite at det kan gjøres modifikasjoner. Ytterligere aspekter og utførelsesformer vil
30 fremgå. Som eksperimentell eksemplifisering vil anvendelse av en utførelsesform av oppfinnelsen for å oppnå et beskyttende nivå av immunrespons mot et antigen, nå beskrives i detalj med referanse til figurene.

Figur 1 viser et arbeidsskjema for plasmidkonstruksjoner. Det fremstilte plasmid pTTI2 kan anvendes for å ut-
35 trykke TTFC og IL-2, og det fremstilte plasmid pTTI6 kan anvendes for å uttrykke TTFC og IL-6, i en organisme som *Lactococcus lactis*.

Figur 2a viser vektoren pEX1 (også betegnet pTREX1), i hvilket et gen, slik som en operonkonstruksjon som omfatter kodingssekvenser for et antigen (f.eks. TTFC) og et biologisk aktivt polypeptid (f.eks. et cytokin som IL-2 eller IL-6), kan
5 innføres ved det multiple kloningssete (MCS).

Figur 2b viser en forstørret oversikt over et område av pEX1 (pTREX1) som viser P1-promoterens, Shine-Dalgarno-sekvensen (SD) og transkripsjonsterminatorsekvensen som er operabelt posisjonert for ekspresjon av et gen (inkludert en
10 multi-(di-)cistronisk kodingssekvens) når den er innføyset ved genet MCS (multiple kloningssete).

Figur 3 viser forbindelsen mellom TTFC og interleukincistronene i operonet anvendt for ekspresjon.

Figur 4 viser TTFC-spesifikke serum-IgG-titerte av grupper på 6 mus som er vaksinert intranasalt med rekombinant
15 *Lactococcus lactis* som uttrykker tetanustoksinfragment C (TTFC) med musecytokinene IL-2 eller IL-6.

Eksempel 1

20 For å oppnå samtidig ekspresjon av TTFC og enten mIL2 eller mIL6 er det valgt konstruksjon av operoner som driver de to cistroner som undersøkes. Det ble anvendt vektorer for konstitutiv ekspresjon. Generelt ble det forsøkt å flankere cistroner med et XbaI-sete umiddelbart forut for Shine-
25 Dalgarno (SD)-sekvensen og et SpeI-sete umiddelbart etter stoppkodonet. På denne måte kan multiple cistroner lett utbyttes og plasseres i forskjellige kombinasjoner i ethvert mønster, fordi XbaI og SpeI gir de samme "klebrige" ender. Oppfinnerne av den foreliggende oppfinnelse har tidligere
30 oppnådd ekspresjon av mIL2 og mIL6 ved hjelp av T7-promoter-T7-gen 10-ribosombindingssete, så det ble derfor valgt å anvende XbaI-setet som er til stede i g10-ribosombindingssetet. For dette arrangement var det kjent at SD-sekvensen var bra posisjonert. Det ble valgt å plassere TTFC-cistronet foran
35 interleukinene.

Konstruksjon av plasmider

Konstruksjonen av plasmidene er avbildet i figur 1. Plasmidet inneholdende *mIL2* og *mIL6* ble underkastet setestyrte mutagenese for å gi ekstra *SpeI*-seter umiddelbart etter stoppkodon. De resulterende plasmider ble betegnet hhv. *pL2MIL2A* og *pL2MIL6A*. Et plasmid inneholdende en fusjon av *USP45*-sekresjonslederen og *TTFc* ble anvendt som templat for PCR-amplifikasjon av de forskjellige *TTFc*-sekvenser som var nødvendige.

For operoner som driver intracellulær *TTFc*-produksjon ble genet amplifisert som et stump-*SpeI*/*BamHI*-fragment og klonet i vektoren *pTREX1* som ble kuttet med *SphI*, stumpet og kuttet på nytt med *BamHI*. Det resulterende plasmid ble betegnet *pT1TT*. Fra dette plasmid ble det 3'-terminale 150 bp *SpeI* *TTFc*-fragment isolert og klonet i *XbaI*-setet av *pL2MIL2A* og *pL2MIL6A*. De resulterende plasmider ble betegnet *p3TTIL2* og *p3TTIL6*. Det ble anvendt *KpnI*-restriksjonssete til stede i 3'-enden av *TTFc* for å rekonstruere *TTFc* og således oppnå de ønskede operoner ved å ligere *KpnI*-*SpeI*-fragmentet fra *p3TTIL2* og *p3TTIL6* med de passende *KpnI*-*PvuII*- og *SpeI*-*PvuII*-fragmenter fra *pT1TT*. De resulterende plasmidene ble betegnet *pTT12* og *pTT16*.

Ekspresjon av proteiner

Ekspresjon av proteiner ble analysert ved antistoffpåvisning. For dette formål ble kolonier av disse forskjellige stammer som ble undersøkt påsatt på nitrocellulosemembraner, plassert på *GM17* (*difco*) faste agarplater inneholdende egnede antibiotika. Platene ble inkubert over natten og blokkert i PBS inneholdende 2,5 % skummet melk-pulver. Filtrene ble fremkalt med kanin-anti-*TTFc* eller kanin-anti-*MIL2*. Eksperimentet viste klar *TTFc*-ekspresjon i alle konstruksjoner som inneholder *TTFc*-genet. For *pTT12* og *pTTAI2* ble det dessuten påvist koekspresjon av *IL2* og *TTFc*. Fordi forbindelsene mellom *TTFc*-enheter og *MIL6* er identiske med forbindelsene mellom *TTFc* og *MIL2*, kan det antas at *IL6* ble uttrykt sammen med *TTFc* like godt.

Preparering av celler for immuniseringer

Bakteriestammer for immuniseringer ble dyrket fra nye kulturer som var dyrket over natten og som ble tilbakefortynnet i en mengde på 1 ml kultur i 15 ml nytt GM17-medium inneholdende erytromycin i en mengde på 5 µg/ml, og dyrket ved 5 30 °C. Celler ble innhøstet ved en optisk tetthet ved 600 nm mellom 0,5 og 1,0. Celler ble vasket i 1/10 av det opprinnelige kulturvolum med 0,5 % kasaminyrer, 0,2 M natriumbikarbonat, 0,5 % glukose, før de ble resuspendert i 1/200 av 10 det opprinnelige kulturvolum, og bakteriecellekonsentrasjonen ble bestemt. Celler ble deretter fortynnet i den ovennevnte løsning for å gi det nødvendige antall celler pr. immunisering.

15 Immunisering

Mus ble lett bedøvet ved inhalasjon ved anvendelse av "Metofan". 10 µl av bakteriesuspensjonen, i en løsning av 0,5 % kaseinhydrolysat, 0,2 M natriumbikarbonat og 0,5 % glukose, ble applisert i hvert nesebor etter tur ved anvendelse av en automatisk pipette. Dyrene ble nøye observert for 20 pustevanskeligheter inntil de var fullstendig restituerte fra bedøvelsen.

Resultater

25 Resultater er vist i tabell 1 og figur 4. Bakterier som kan uttrykke enten interleukin-2 eller interleukin-6 utløste 10 ganger mer anti-TTFC-antistoff enn bakterier som uttrykker TTFC alene.

Det er regelen for bakterietoksiner at en beskyttende 30 effekt oppnås når antistofftiteret overskrider en terskelverdi. Nivåene av antistofftitere funnet hos mus inokulert med bakterier inneholdende pEX-TTFC/IL-2 og pEX-TTFC/IL-6 var langt høyere enn terskelverdien for etterfølgende beskyttelse mot tetanustoksinutfordring (se figur 4, titere ved 35 dager etter vaksinasjon).

Oppsummering av den eksperimentelle eksemplifisering

Kunstige operoner for koekspressjon av et antigenisk polypeptid (tetanustoksinfragment C-TTFC) og biologisk aktive polypeptider (interleukin-2; interleukin-6) ble separat konstruert i en konstitutiv ekspresjonsvektor (pTREX1), slik at transkripsjonen av TTFC-genet og interleukingenet kunne kontrolleres ved hjelp av aktiviteten av et *Lactococcus*-promoterelement med tidligere definerte aktivitet. Konstruksjonene ble preparert slik at, etter translasjon av mRNA transkribert fra de kunstige operoner, TTFC-1 antigenet ville akkumulere intracellulært. En sekresjonssignalsekvens ble operabelt bundet til interleukinet. Når preparater av disse bakterier ble administrert intranasalt til mus utløste bakterier konstruert for å uttrykke enten interleukin-2 eller interleukin-3 ca. 10 ganger mer anti-TTFC-antistoff enn konstruksjonene som uttrykte TTFC alene. Hver av disse interleukiner hadde således markant adjuvansaktivitet i eksperimentsystemet.

Lactococcus lactis er ikke en kommensal bakterie (i motsetning til beslektede arter av laktobasiller som finnes i kyllingkroer og som er til stede i tarmkanalen hos mange pattedyr), og er også avhengig av tilførsel av aminosyrer og peptider som lite sannsynlig er tilgjengelig *in vivo*, slik at påvisningen at cytokinuttrykkende stammer av *L. lactis* allikevel er i stand til å forsterke antistoffproduksjon er overraskende. Disse resultater viser for første gang at rekombinante stammer av en ikke-koloniserende ikke-invasiv bakterie, slik som *Lactococcus lactis*, kan anvendes for å syntetisere og utlevere biologisk aktive molekyler *in vivo*.

30

Tabell 1 (neste side)

I tabellen anvendes "TT/9" for å indikere inokulering med bakterier som uttrykker TTFC ved en dose på 5×10^9 bakterier, "TT/8" ved en dose på 1×10^8 bakterier, osv. "TT IL-2/9" og "TT IL-6/9" indikerer inokulering med bakterier som uttrykker hhv. TTFC og IL-2 og TTFC og IL-6, ved en dose på 1×10^9 bakterier, "TT IL-2/8" ved en dose på 1×10^8 bakterier, osv. De oppførte tall er ELISA-titere for individuelle mus.

35

Tabell 1
IMMUNRESPONSDATA - DAG 35

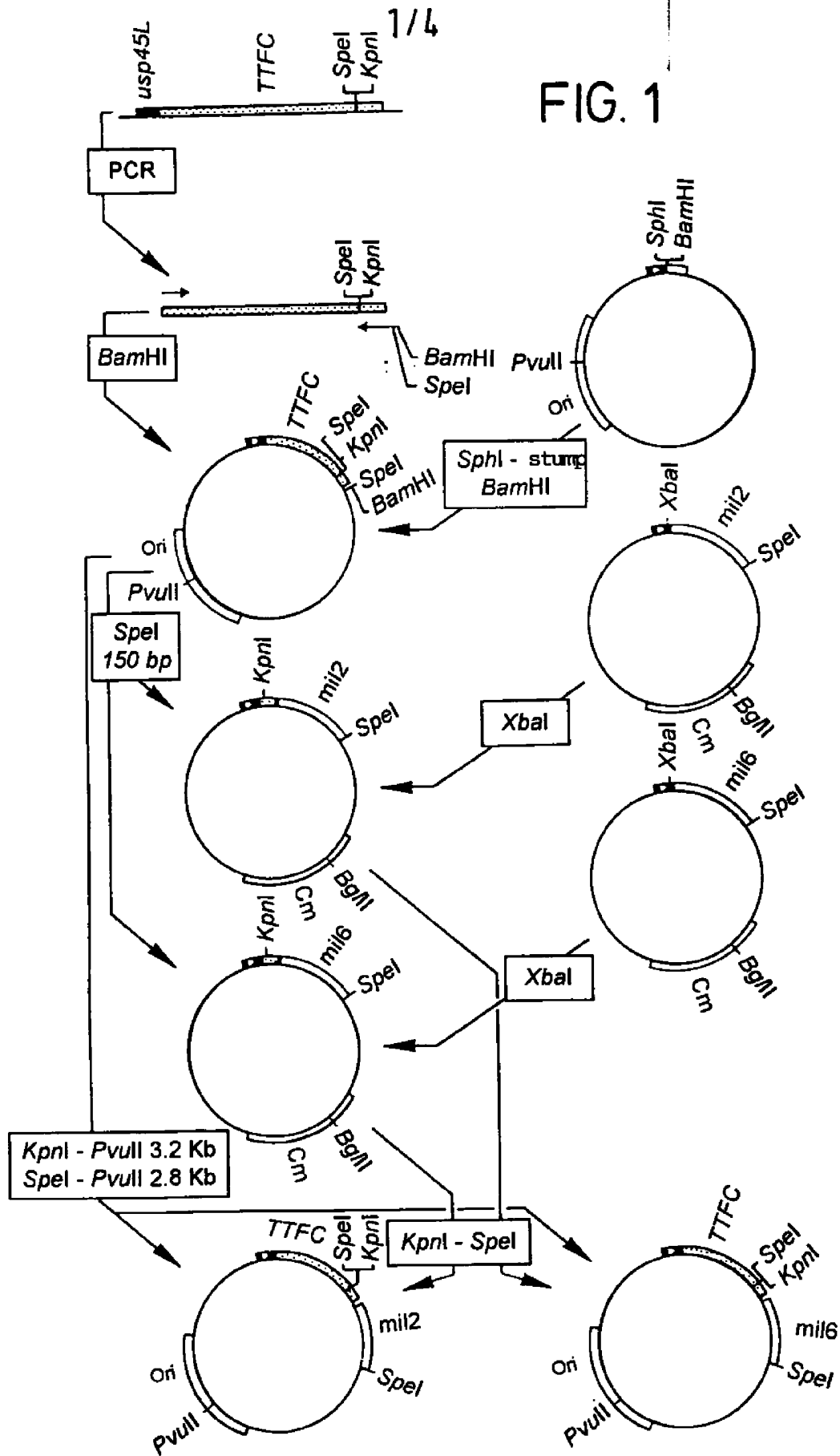
| <u>Endepunktittitære, blodprøve 3, nasalvaksinasjonsdata</u> | | | | | | |
|--|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 5 | | <u>TT/9</u> | <u>TT/8</u> | <u>TT/7</u> | <u>TT/6</u> | |
| | | 10000 | 50 | 50 | 50 | |
| | | 11000 | 60 | 50 | 50 | |
| | | 10000 | 50 | 50 | 75 | |
| | | 9000 | 50 | 50 | 50 | |
| 10 | | 4500 | 50 | 50 | 70 | |
| | | 600 | 110 | 55 | 250 | |
| | Gj. snitt | 7516,7 | 61,7 | 50,8 | 90,8 | |
| | sd, | 4089,2 | 24,0 | 2,0 | 78,8 | |
| | | <u>TT IL-2/9</u> | <u>TT IL-2/8</u> | <u>TT IL-2/7</u> | <u>TT IL-2/6</u> | |
| 15 | | 14000 | 50 | 50 | 50 | |
| | | 30000 | 50 | 50 | 150 | |
| | | 100000 | 50 | 50 | 50 | |
| | | 100000 | 105 | 150 | 50 | |
| | | 120000 | 50 | 80 | 50 | |
| | | 100000 | 100 | 50 | 50 | |
| 20 | Gj. snitt | 77333,0 | 67,5 | 71,7 | 66,7 | |
| | sd, | 43848,0 | 27,2 | 40,2 | 40,8 | |
| | | <u>TT IL-6/9</u> | <u>TT IL-6/8</u> | <u>TT IL-6/7</u> | <u>TT IL-6/6</u> | |
| 25 | | 80000 | 200 | 50 | 50 | |
| | | 170000 | 300 | 50 | 50 | |
| | | 190000 | 200 | 100 | 50 | |
| | | 100000 | 10000 | 50 | 50 | |
| | | 50000 | 750 | 50 | 50 | |
| | | 80000 | 260 | 400 | 50 | |
| | Gj. snitt | 111670,0 | 1951,7 | 116,7 | 50,0 | |
| | sd, | 55648,0 | 3948,3 | 140,2 | 0,0 | |
| 30 | | KONTROLLÉR | | | | |
| | | <u>pEX1/9</u> | <u>pEX1/8</u> | <u>pEX1/7</u> | <u>pEX1/6</u> | <u>Naturlige</u> |
| | | 75 | 75 | 55 | 75 | 60 |
| | | 75 | 50 | 75 | 55 | 60 |
| | | 50 | 55 | 75 | 75 | 55 |
| | | 55 | 50 | 55 | 50 | 55 |
| 35 | | 75 | 55 | 75 | 50 | 50 |
| | | 60 | 55 | 70 | 50 | 60 |
| | Gj. snitt | 65,0 | 56,7 | 67,5 | 59,2 | 56,7 |
| | sd, | 11,4 | 0,9 | 1,0 | 12,4 | 4,1 |

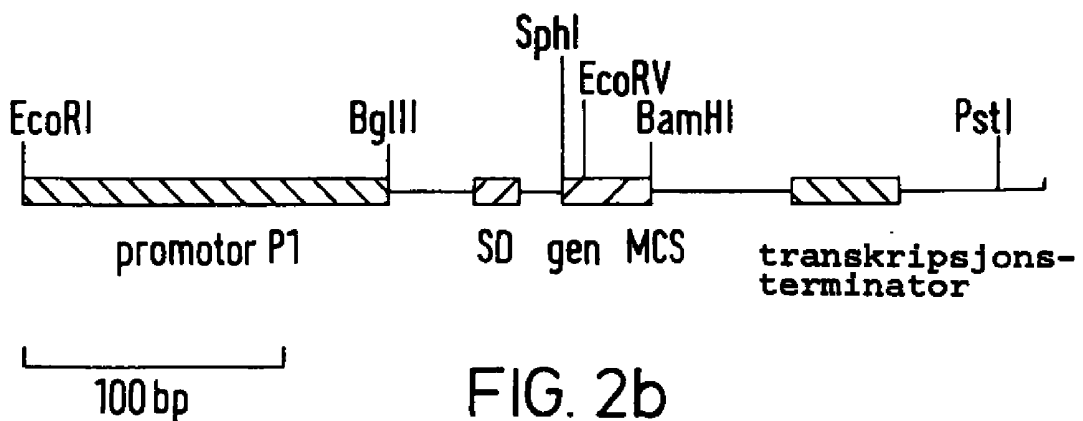
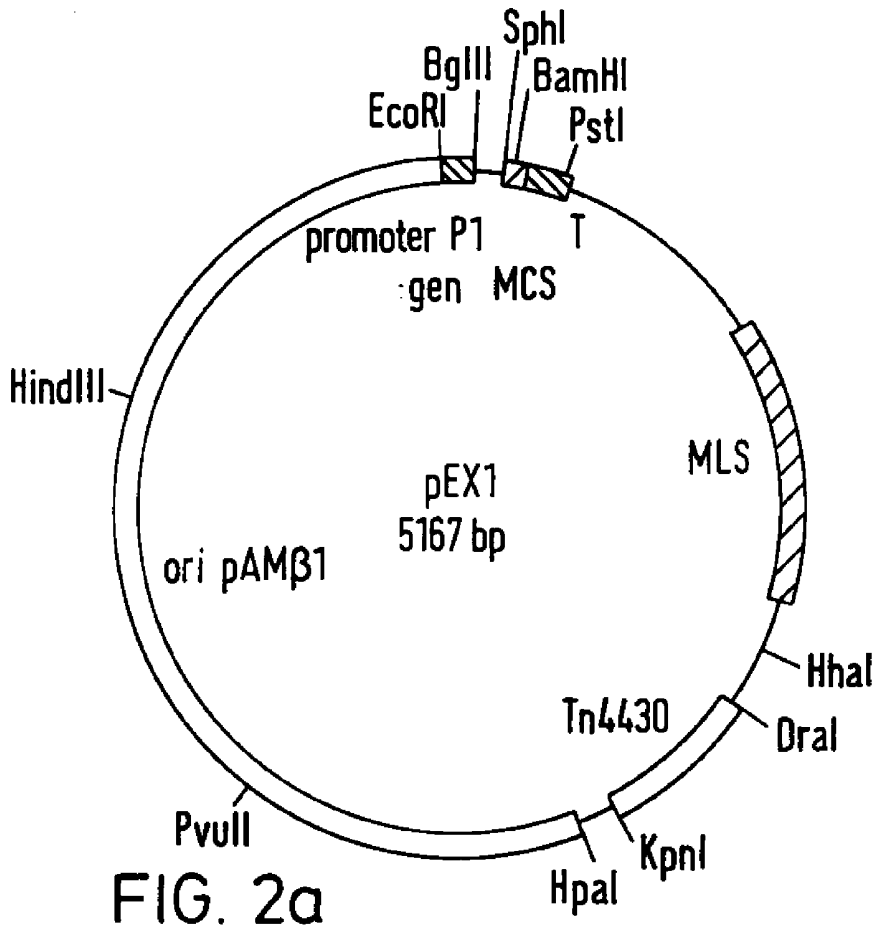
P a t e n t k r a v

1. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter minst én nukleinsyresekvens som uttrykkes under kontroll av en konstitutiv promoter og koder for et heterologt, biologisk aktivt polypeptid, hvori nukleinsyren som koder for det biologisk aktive polypeptid, omfatter en sekretorisk
10 signalsekvens som tilveiebringer sekresjon av det biologisk aktive polypeptid, hvori ekspresjonen av nevnte biologisk aktive polypeptid skjer uavhengig av enhver induser eller annet regulatorisk signal, for anvendelse som et medikament.
- 15 2. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakterien er ikke-koloniserende.
3. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge krav 1
20 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den grampositive bakterien er utvalgt fra gruppen bestående av *Listeria innocua*, *Staphylococcus xylosus* og en *Lactococcus*-art.
- 25 4. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at den grampositive bakterien er *Lactococcus lactis*.
5. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge ethvert av
30 kravene 1 til 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at det biologisk aktive polypeptid er et cytokin.
6. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge krav 5,
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at cytokinet er et interleukin.

7. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge krav 6, karakterisert ved at interleukinet er IL-2 eller IL-6.
- 5 8. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge ethvert av kravene 1 til 7, karakterisert ved at bakterien videre omfatter minst én nukleinsyresekvens som uttrykkes under kontroll av en promoter og koder for et antigen.
- 10 9. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge krav 8, karakterisert ved at antigenet er heterologt for bakterien.
- 15 10. Ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge krav 8 eller 9, karakterisert ved at antigenet akkumuleres intracellulært.
- 20 11. Anvendelse av en ikke-invasiv, grampositiv bakterie ifølge ethvert av kravene 1 til 7, for fremstilling av en adjuvans.
- 25 12. Anvendelse av en ikke-invasiv, grampositiv bakterie som angitt i ethvert av kravene 8 til 10, for fremstilling av en vaksine.

FIG. 1





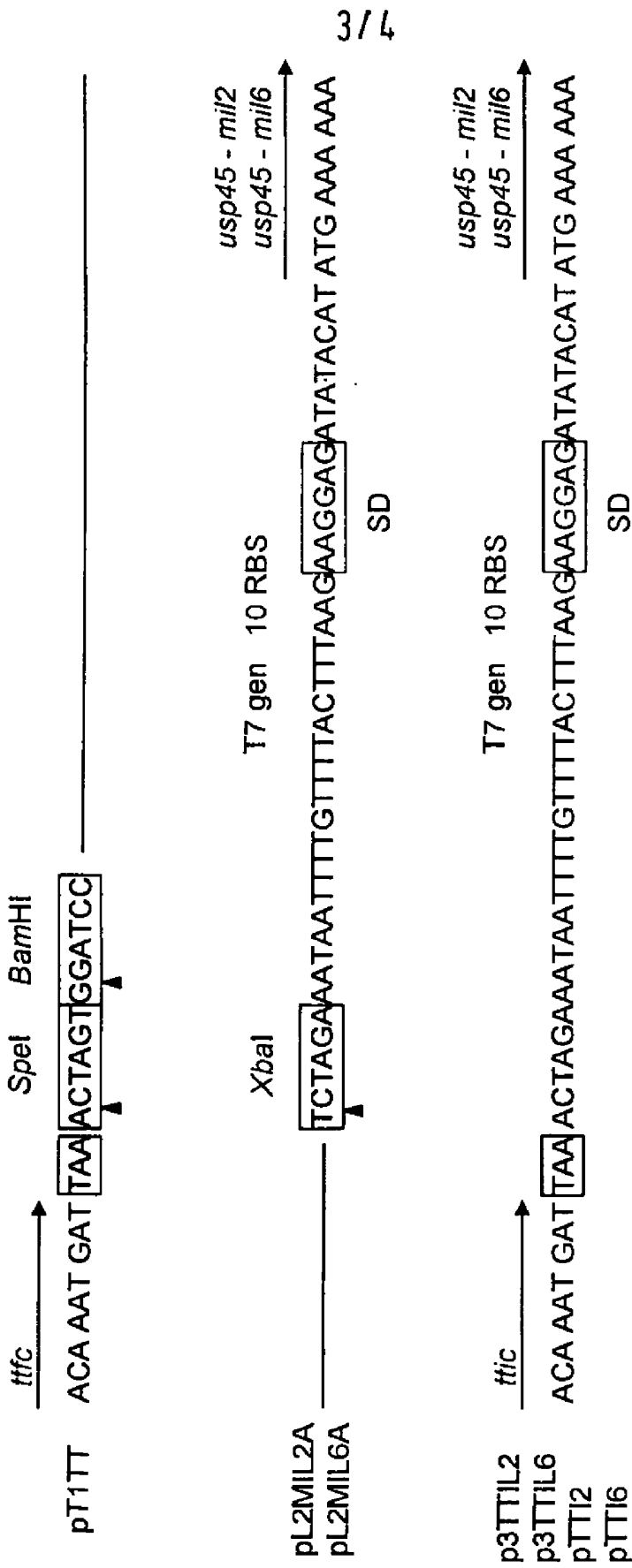


FIG. 3

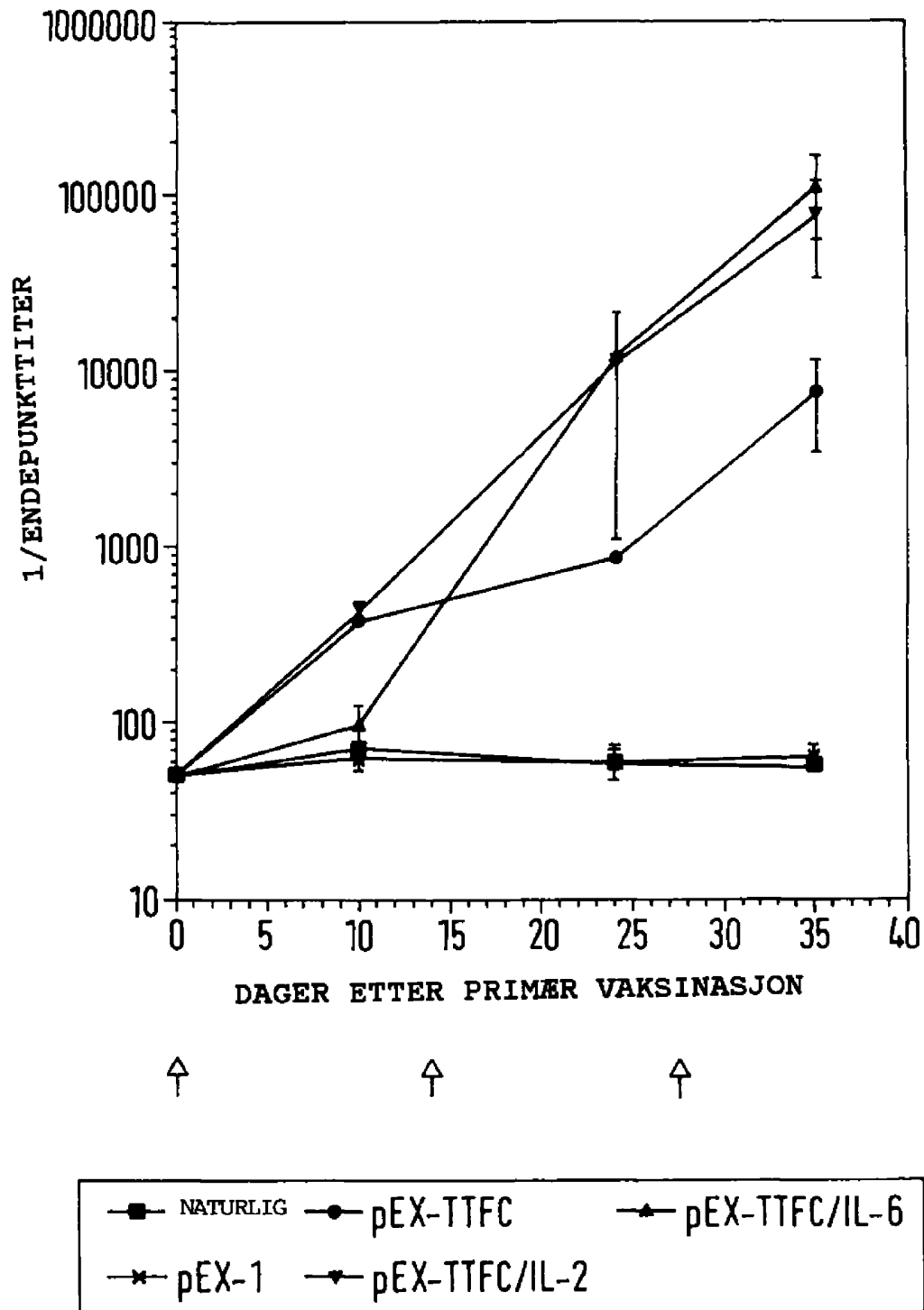


FIG. 4