FI000110008B

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 110008 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **15.11.2002**

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/74, 15/70, 15/31, A61K 39/112, 39/10

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **933757**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **26.08.1993**

(24) Alkupäivä - Löpdag **05.03.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **26.08.1993**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/GB92/00387**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

05.03.1991 GB 9104596 P 04.10.1991 GB 9121208 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •The Wellcome Foundation Limited, Unicorn House, 160 Euston Road, London NW1 2BP, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Charles,Ian George, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, ISO-BRITANNIA, (GB)
2 •Chatfield,Steven Neville, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, ISO-BRITANNIA, (GB)
3 •Fairweather,Neil Fraser, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä heikennetyn bakteerin ja sitä sisältävän rokotteen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av en försvagad bakterie och vaccin som innehåller denna

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 285152 (C12N 15/70), EP A 357208 (A61K 39/112), EP A 400958 (A61K 39/02), EP A 322237 (C12N 15/01), Molecular Microbiology 2, 1988, 527-530, Jayaraman, P.-S., Molecular Microbiology 4, 1990, 1753-1763, Bell, A.I. et al., Res. Microbiol. 141, 1990, 769-773, Fairweather, N.F. et al., Infection and Immunity 58, 1990, 1323-1326, Fairweather, N.F. et al.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Attenuoitua bakteeria, joka kykenee ekspressoimaan heterologista proteiinia heterologisen proteiinin ekspression ollessa sellaisen promoottorin säätelyn alaisena, jonka promoottorin aktiivisuuden indusoi anaerobiset olosuhteet, voidaan käyttää rokotteena. Sopiva promoottori on nirB-promoottori.

En attenuerad bakterie som är kapabel till expression av ett heterologt protein, vilken expression av heterologt protein kontrolleras av en promotor vars aktivitet induceras av anaeroba förhållanden, kan användas som ett vaccin. En lämplig promotor är nirB-promotorn.

Menetelmä heikennetyn bakteerin ja sitä sisältävän rokotteen valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää heikennetyn bakteerin valmistamiseksi, joka kykenee ekspressoimaan heterologista proteiinia. Keksintö koskee myös menetelmää bakteeria sisältävän rokotteen valmistamiseksi.

Virulentit Salmonella-kannat voidaan heikentää tekemällä spesifiset mutaatiot geeneihin, joita tarvitaan eloonjääntiin ja kasvuun in vivo. Heikentämismuunnokset, jotka saavat aikaan itserajoittuvia, kliinisesti merkityksettömiä infektoita, voidaan pitää mahdollisina elävinä suun kautta annettavina rokotteina Salmonella-infektioita vastaan. Ty21a on Salmonella typhi -bakteerin heikennetty muunnos, joka sisältää galE-geenin mutaatiot ja muita tuntemattomia heikentäviä vaurioita ja se on lisensioitu käytettäväksi monissa maissa elävänä suun kautta annettavana lavantautirokotteena.

Aivan äskettäin geneettisesti määriteltyjä Salmonella-kantoja, jotka sisältävät yksittäiset spesifiset mutaatiot eri geeneissä, on testattu suun kautta annettavina koerokotteina useilla kohdelajeilla. Esimerkiksi Salmonella-bakteerin aro-mutanttien, joilla on auksotrooppinen tarve useiden aromaattisten yhdisteiden suhteen, on osoitettu olevan tehokkaita suun kautta annettavia rokotteita hiirillä, lampailla, nautakarjalla, kanoilla ja aivan äskettäin niiden on osoitettu vapaaehtoisilla olevan heikennettyjä ja immunogeenisiä. Salmonella-bakteerin aro-kaksoismutantit on kuvattu julkaisussa EP-A-0 322 237. Salmonella-bakteerin cya crp -kaksoismutantit ovat myös tehokkaita suun kautta annettavia rokotteita.

Yhtä hyvin kuin bakteerit ovat rokotteita omien ansioidensa perusteella salmonelloosia vastaan, heikennettyjä Salmonella-lajeja voidaan harkita käytettäväksi heterologisten antigeenien kantajina immuunisysteemissä suun kautta annettuina. Tämä johtuu siitä, että Salmonella-lajeja voi-

daan antaa suun kautta ja ne ovat tehokkaita immunogeenejä kyeten stimuloimaan systeemiset ja paikalliset solu- ja vasta-ainevasteet. Bakteerien, virusten ja parasiittien heterologiset antigeenit voidaan antaa isännälle käyttäen Salmonella-rokotteita.

Yksi mahdollisesti vakava haitta, kun käytetään näitä eläviä rokotteita antigeenin kuljetukseen, koskee vieraan antigeenin in vivo ekspression stabiilisuusongelmia. Vieraan proteiinin korkean tason säätelemätön ekspressio bakteereissa monikopioisista plasmideista johtaa tavallisesti plasmidin tai ekspressoitavan geenin nopeaan katoamiseen soluista. Tätä ongelmaa voidaan säädellä fermentoreissa käyttäen indusoituvia promoottorisysteemeitä, kuten trp- tai lac-systeemeitä niin, että sallitaan geeniekspression säädelty induktio, kun sopiva biomassa on saatu aikaan. Näitä promoottoreita ei aivan ilmeisesti voida indusoida ulkopuolelta lisätyillä indusoijilla, kuten PP-tai IPTG-indusoijalla, kun bakteerit kasvavat isännän kudoksissa itserajoittuvassa kasvuvaiheessa rokotuksen jälkeen.

Elävien bakteerien vektoriplasmidien epästabiilisuus in vivo on itse asiassa julkaistu monien tutkijoiden toimesta (Maskell et al., Microb. Path. 2, 295 - 305, 1987; Nakayama et al., Bio/Technology 6, 693 - 697, 1988; Tite et al., Immunology 70, 540 - 546, 1990). Useita lähestymistapoja on yritetty ongelman ratkaisemiseksi sisältäen integraatiosysteemien käytön heterolgisen antigeenin ekspressoimiseksi bakteerin kromosomista (Hone et al., Microbiol. Path. 5, 407 - 418, 1988; Strugnell et al., Gene 88, 57 - 63, 1990). Tämä lähestymistapa on kuitenkin sopiva käytettäväksi ainoastaan joidenkin antigeenien kanssa, koska ekspressiotasot ovat usein melko matalia (Maskell et al., 1987). Nakayama et al. kuvasivat käytön, jossa elintärkeä geeni liitettiin ekspressioplasmidiin in vivo ekspression stabiloimiseksi. Vaikka tämä on erittäin tehokas lähestymistapa, se ei estä plasmidivapaiden muunnosten muodostumista vaan yksinkertaisesti varmistaa, että ne eivät säily

elossa. Lisäksi vieraan antigeenin stabiili, mutta konstitutiivinen korkean tason ekspressio Salmonella-rokotekannassa voisi hidastaa kasvunopeutta ja sen vuoksi mahdollisesti vaikuttaa elävän rokotteen immunogeenisyyteen.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti on esitetty menetelmä heikennetyn bakteerin valmistamiseksi, joka kykenee ekspressoimaan heterologista proteiinia, jonka heterologisen proteiinin ekspressio on sellaisen promoottorin säätelyn alaisuudessa, jonka aktiivisuuden indusoi anaerobiset olosuhteet. Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 10 esitetään.

Heterologisen proteiinin stabiili ekspressio voidaan saada aikaan in vivo. Sen vuoksi heikennettyä bakteeria voidaan käyttää rokotteena. Keksinnön mukaiselle menetelmälle rokotteen valmistamiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään. Mitä tahansa sopivaa bakteeria voidaan käyttää, esimerkiksi gram-negatiivista bakteeria. Jotkin gram-negatiiviset bakteerit, kuten Salmonella, tunkeutuvat eukaryoottisiin soluihin ja kasvavat niissä ja kolonisoivat limakalvojen pinnat.

Sen vuoksi heikennetty bakteeri voidaan valita Salmonella-, Bordetella-, Vibrio-, Haemophilus-, Neisseria-ja Yersinia-sukujen joukosta. Heikennetty bakteeri voi vaihtoehtoisesti olla enterotoksigeenisen Escherichia coli -bakteerin heikennetty kanta. Erikoisesti seuraavat lajit voidaan mainita: S. typhi - aiheuttaa ihmisen lavantaudin; S. typhimurium - aiheuttaa salmonelloosin useissa eläinlajeissa; S. enteritidis - aiheuttaa ruokamyrkytyksen ihmisillä; S. choleraesuis - aiheuttaa salmonelloosin sioilla; Bordetella pertussis - aiheuttaa hinkuyskän; Haemophilus influenzae - aiheuttaa aivokalvontulehduksen; Neisseria conorrhoeae - aiheuttaa tippurin; ja Yersinia - aiheuttaa ruokamyrkytyksen.

Bakteerin heikkous voi johtua palautumattomasta mutaatiosta bakteerin aromaattisten aminohappojen biosynteettisen reitin geenissä. On olemassa ainakin kymmenen geeniä,

jotka ottavat osaa korismaatin synteesiin, joka on yhdiste aromaattisten aminohappojen biosynteettisen reitin haarautumakohdassa. Useat näistä paikallistuvat laajasti eroaviin kohtiin bakteerin genomissa, esimerkiksi aroA (5-enolipyruvyylisikimaatti-3-fosfaattisyntaasi), aroC (korismaattisyntaasi), aroD (3-dihydrokinaattidehydrataasi) ja aroE (sikimaattidehydrogenaasi). Mutaatio voi sen vuoksi tapahtua aroA-, aroC-, aroD- tai aroE-geenissä.

Heikennetty bakteeri sisältää kuitenkin suositeltavasti palautumattoman mutaation kummassakin kahdessa erillisessä geenissä sen aromaattisten aminohappojen biosynteesireitissä. Sellaiset bakteerit on kuvattu julkaisussa EP-A-0322237. Sopivat aro-kaksoismutantit ovat aroA aroC, aroA aroD ja aroA aroE -mutanttibakteerit. Muut bakteerit, joissa on aroA-, aroC-, aroD- ja aroE-geenien mutaatioiden muut yhdistelmät, ovat kuitenkin käyttökelpoisia. Erikoisen suositeltavia ovat Salmonella-kannan aro-kaksoismutantit, esimerkiksi S. typhi tai S. typhimurium -bakteerien aro-kaksoismutantit, erikoisesti aroA aroC, aroA aroD ja aroA aroE -mutantit.

Heikennetty bakteeri voi vaihtoehtoisesti sisältää palautumattoman mutaation geenissä, joka ottaa osaa yhden tai useamman muun geenin säätelyyn (julkaisu EP-A-0 400 958). Mutaatio tapahtuu suositeltavasti ompR-geenissä tai muussa geenissä, joka ottaa osaa säätelyyn. On olemassa suuri joukko muita geenejä, jotka ottavat osaa säätelyyn ja joiden tunnetaan respondoivan ympäristön stimulaatioon (Ronson et al., Cell 49, 579 - 581).

Tämäntyyppinen heikennetty bakteeri voi sisältää toisen mutaation toisessa geenissä. Toinen geeni on suositeltavasti geeni, joka koodittaa entsyymiä, joka ottaa osaa keskeiseen biosynteettiseen reittiin, erikoisesti geenit, jotka ottavat osaa prekorismaattireittiin aromaattisten yhdisteiden biosynteesissä. Sen vuoksi toinen mutaatio on suositeltavasti aroA-, aroC- tai aroD-geenissä.

Toinen heikennetty bakteerityyppi on se, jossa heikennys johtuu bakteerin DNA:ssa olevan palautumattoman mutaation läsnäolosta, joka DNA koodittaa, tai joka DNA säätelee sen DNA:n ekspressiota, joka koodittaa proteiinia, jota tuotetaan vasteena ympäristön aiheuttamalle stressille. Sellaiset bakteerit on kuvattu julkaisussa WO 91/15 572. Palautumaton mutaatio voi olla deleetio, insertio, inversio tai substituutio. Deleetio voidaan muodostaa käyttämällä transposonia.

Esimerkit proteiineista, joita tuotetaan vasteena ympäristön aiheuttamalle stressille, sisältävät lämpösokkiproteiinit (joita tuotetaan vasteena lämpötilan nousulle yli 42 °C:een); ravinnonpuutosproteiinit (joita tuotetaan vasteena elintärkeiden ravinteiden, kuten fosfaattien tai typen, tasoille, jotka ovat alle sen, jonka mikro-organismi tarvitsee jäädäkseen eloon); myrkkystressiproteiinit (joita tuotetaan vasteena myrkyllisille yhdisteille, kuten väreille, hapoille tai mahdollisesti kasvien eritteille); ja metaboliset hajotusproteiinit (joita tuotetaan vasteena esimerkiksi ionitasojen vaihteluille, jotka vaikuttavat mikro-organismin kykyyn osmoreguloida, tai vitamiinin tai kofaktorin tasoihin, jotka ovat sellaisia, että ne hajottavat metabolian).

Lämpösokkiproteiini on suositeltavasti sellainen, jota koodittaa htrA-geeni, joka tunnetaan myös nimellä degP. Muita proteiineja koodittavat geenit, joiden tiedetään ottavan osaa stressivasteeseen, kuten grpE, groEL, (moPA), dnaK, groES, lon ja dnaJ. On olemassa monia muita proteiineja, joita koodittavat geenit, joiden tiedetään indusoituvan vasteena ympäristön aiheuttamaan stressiin (Ronson et al., Cell 49, 579 - 581). Näiden joukosta voidaan manita seuraavat: E. coli -bakteerin ntrB/ntrC-systeemi, joka indusoituu vasteena typen puutokselle ja säätelee positiivisesti glnA- ja nifLA-geenejä (Buck et al., Nature 320, 374 - 378, 1986; Hirschman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7525, 1985; Nixon et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 83, 7850 - 7854, 1986; Reitzer ja Magansanik, Cell 45, 785, 1986); E. coli -bakteerin phoR/phoB-systeemi, joka indusoituu vasteena fosfaatin puutokseen (Makino et al., J. Mol. Biol. 192, 549 - 556, 1986b); E. coli -bakteerin cpxA/sfrA-systeemi, joka indusoituu vasteena väreille ja muille myrkyllisille yhdisteille (Albin et al., J. Biol. Chem. 261, 4698, 1986; Drury et al., J. Biol. Chem. 260, 4236 - 4272, 1985). Analoginen systeemi Rhizobium-bakteerissa on dctB/dctD, joka respondoi 4C-diskarboksyylihapoille (Ronson et al., J. Bacteriol. 169, 2424 ja Cell 49, 579 - 581, 1987). Tämäntyyppinen virulenssisysteemi on kuvattu Agrobacterium-bakteerissa. Se on virA/virG-systeemi, joka indusoituu vasteena kasvien erityteille (le Roux et al., EMBO J. 6, 849 -856, 1987; Stachel ja Zambryski, Am. J. Vet. Res. 45, 59 -66, 1986; Winans et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8278, 1986). Samalla tavalla Bordetella pertussis -bakteerin bvgC-bvgA-systeemi (joka aiemmin tunnettiin nimellä vir) säätelee virulenssideterminanttien tuottoa vasteena Mg^{2+}-ionien ja nikotiinihapon tasojen vaihteluille (Arico et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6671 - 6675).

Kun bakteeria käytetään elävänä rokotteena, heikennetyn bakteerin ei tulisi palautua takaisin virulenttiin tilaan. Mahdollisuutta tämän tapahtumiseksi, kun mutaatio on läsnä yhdessä DNA-sekvenssissä, pidetään pienenä. Kuitenkin palautumismahdollisuuden riskiä bakteerilla, joka on heikennetty mutaatioilla, jotka ovat läsnä kummassakin kahdessa erillisessä DNA-sekvenssissä, pidetään merkityksettömänä. Sen vuoksi suositeltava heikennetty bakteeri on sellainen, jossa heikennys saadaan aikaan mutaatiolla, joka on läsnä DNA-sekvenssissä, joka koodittaa, tai joka säätelee sellaisen DNA:n ekspressiota, joka koodittaa proteiinia, jota tuotetaan vasteena ympäristön aiheuttamalle stressille, ja mutaatiolla toisessa DNA-sekvenssissä.

Toinen DNA-sekvenssi koodittaa suositeltavasti entsyymiä, joka ottaa osaa keskeiseen auksotrofiseen reittiin

tai on sekvenssi, jonka tuote kontrolloi osmoottisesti respondoivien geenien säätelyä, se on ompR (Infect. and Immun., 1989, 2136 - 2140). Suositeltavimmin mutaatio on DNA-sekvenssissä, joka ottaa osaa aromaattisten aminohappojen biosynteettiseen reittiin, erikoisemmin DNA-sekvensseissä, jotka koodittavat aroA-, aroC- tai aroD-geenejä.

Heikennetyt bakteerit voidaan rakentaa muodostamalla mutaatio DNA-sekvenssiin alan asiantuntijoiden tuntemilla menetelmillä (Maniatis, Molecular Cloning and Laboratory Manual, 1982). Palautumattomat mutaatiot voidaan muodostaa viemällä hybriditransposoni TnphoA esimerkiksi S. typhimurium -kantoihin. TnphoA voi muodostaa entsymaattisesti aktiiviset alkalisen fosfataasin ja periplasmisten tai membraaniproteiinien väliset proteiinifuusiot. TnphoA-transposoni sisältää geenin, joka koodittaa kanamysiiniresistenssiä. Valitaan kanamysiiniresistenssit transduktantit kasvattamalla pesäkkeitä sopivalla selektioalustalla.

Vaihtoehtoiset menetelmät sisältävät DNA-sekvenssin kloonauksen vektoriin, esim. plasmidiin tai kosmidiin, selektiomerkkigeenin insertoimisen kloonattuun DNA-sekvenssiin, joka johtaa sen inaktivoitumiseen. Inaktiivisen DNA-sekvenssin ja erilaisen selektiomerkin sisältävä plasmidi voidaan viedä organismin sisään tunnetuilla menetelmillä (Maniatis, Molecular Cloning and Laboratory Manual, 1982). Sitten on mahdollista sopivalla selektiolla tunnistaa mutantti, jossa inaktivoitu DNA-sekvenssi on rekombinoitunut mikro-organismin kromosomiin ja villityypin DNA-sekvenssi on tehty toimimattomaksi prosessin avulla, joka tunnetaan nimellä alleelivaihto. Käytetty vektori on erikoisen suositeltavasti epästabiili mikro-organismissa ja häviää spontaanisti. Plasmidissa oleva mutatoitu DNA-sekvenssi ja villityypin DNA-sekvenssi voidaan vaihtaa geneettisellä tekijäinvaihtotapahtumalla. Lisämenetelmät eliminoivat vieraan DNA:n kulkeutumisen rokotekantoihin mutaatioiden kohdille ja antibioottiresistenssimerkkien kulkeutumisen kantoihin.

Heterologinen antigeeni, jota heikennetty bakteeri kykenee ekspressoimaan, voi sisältää esimerkiksi patogeenisen organismin antigeenideterminantin. Antigeeni voi olla peräisin viruksesta, bakteerista, sienestä, hiivasta tai parasiitista. Sen vuoksi heterologinen proteiini sisältää tyypillisesti antigeenisen sekvenssin, joka on peräisin viruksesta, bakteerista, sienestä, hiivasta tai parasiitista. Erikoisemmin antigeeninen sekvenssi voi olla peräisin ihmisen immuunipuutosvirustyypistä (HIV), kuten HIV-1- tai HIV-2-viruksesta, hepatiitti-A- tai hepatiitti-B-viruksesta, ihmisen rinoviruksesta, kuten tyypin 2 tai tyypin 14 viruksesta, herpes simplex -viruksesta, poliovirustyypistä 2 tai 3, suu- ja sorkkatautiviruksesta, influenssaviruksesta, coxsackieviruksesta, solupinta-antigeenista CD4 ja Chlamydia trachomatis -bakteerista. Antigeeni voi sisältää HIV-viruksen CD4-reseptorin sitoutumiskohdan esimerkiksi HIV-1- tai HIV-2-viruksesta. Muut käyttökelpoiset antigeenit sisältävät E. coli -bakteerin lämpölabiilin toksiinin B alayksikön (LT-B), E. coli -bakteerin K88-antigeenit, B. pertussis -bakteerin P.69-proteiinin, tetanustoksiinin fragmentin C ja antigeenit imumadoista, mykoplasmoista, sukkulamadoista, heisimadoista, rabiesviruksesta ja rotaviruksesta.

Promoottori, jota käytetään säätelemään heterologisen proteiinin ekspressiota, on nirB-promoottori. NirB-promoottori on eristetty E. coli -bakteerista, jossa se ohjaa sellaisen operonin ekspressiota, joka sisältää nitriittireduktaasigeenin nirB (Jayaraman et al., J. Mol. Biol. 196, 781 - 788, 1987) ja nirD-, nirC- ja cysG-geenit (Peakman et al., Eur. J. Biochem. 191, 315 - 323, 1990). Sitä säätelee sekä nitriitti että muutokset ympäristön happipaineessa sen tullessa aktiiviseksi, kun hapesta on puutetta (Cole, Biochim. Biophys. Acta 162, 356 - 368, 1968). Vastetta anaerobioosille välittää FNR-proteiini, joka toimii transkription aktivaattorina mekanismissa, joka on yhteinen monille anaerobiseen hengitykseen osaaottaville geeneille.

Deleetio- ja mutaatioanalyyseillä se osa promoottoria, joka respondoi yksinomaan anaerobioosille, on eristetty ja kun on verrattu muihin anaerobisesti säädeltyihin promoottoreihin, tunnistettiin FNR-konsensussitoutumiskohta (Bell et al., Nucl. Acids Res. 17, 3865 - 3874, 1989; Jayaraman et al., Nucl. Acids Res. 17, 135 - 145, 1989). Osoitettiin myös, että etäisyys mahdollisen FNR-sitoutumiskohdan ja homologia-alueen-10 välillä on kriittinen (Bell et al., Molec. Microbiol. 4, 1753 - 1763, 1990). Sen vuoksi on suositeltavaa käyttää ainoastaan sitä osaa nirB-promoottorista, joka respondoi ainoastaan anaerobioosille. Tässä käytettynä viittaukset nirB-promoottoriin viittaavat promoottoriin itseensä tai sen osaan tai johdannaiseen, joka kykenee edistämään koodittavan sekvenssin ekspressiota anaerobisissa olosuhteissa. Sekvenssi, jota itse asiassa on käytetty ja joka sisältää nirB-promoottorin, on:

AATTCAGGTAAATTTGATGTACATCAAATGGTACCCCTTGCTGAATCGTTAAGGTAGGC GGTAGGGCC

Tässä kuvattu heikennetty bakteeri voidaan valmistaa transformoimalla heikennetty bakteeri DNA-rakenteella, joka sisältää promoottorin, jonka aktiivisuuden indusoi anaerobiset olosuhteet, kuten nirB-promoottorin, joka promoottori on toiminnallisesti liitetty heterologista proteiinia koodittavaan DNA-sekvenssiin. Mitä tahansa sopivaa transformaatiomenetelmää, kuten elektroporaatiota, voidaan käyttää. Tällä tavalla voidaan saada aikaan heikennetty bakteeri, joka kykenee ekspressoimaan bakteerille heterologista proteiinia. Heikennetyn bakteerin viljelmä voidaan kasvattaa aerobisissa olosuhteissa. Näin valmistetaan riittävä määrä bakteeria rokotteen formuloimiseksi niin, että tapahtuu pienin mahdollinen heterologisen proteiinin ekspressio.

DNA-rakenne on tyypillisesti replikoituva ekspressiovektori, joka sisältää nirB-promoottorin toiminnallisesti yhteenliitettynä heterologista proteiinia koodittavan

DNA-sekvenssin kanssa. NirB-promoottori voidaan insertoida ekspressiovektoriin, joka jo sisältää heterologista proteiinia koodittavan geenin, ekspressiota säätelevän jo olemassa olevan promoottorin paikalle. Ekspressiovektorin tulee tietysti olla yhteensopiva sen heikennetyn bakteerin kanssa, johon vektori insertoidaan.

Ekspressiovektori sisältää sopivat transkription ja translaation säätelyelementit sisältäen nirB-promoottorin lisäksi transkription terminaatiokohdan ja translaation aloitus- ja lopetuskodonit. Sopiva ribosomin sitoutumiskohta sisältyy vektoriin. Vektori sisältää tyypillisesti replikaatio-origon ja, jos halutaan, selektiomerkkigeenin, kuten antibioottiresistenssigeenin. Vektori voi olla plasmidi.

Tässä kuvattua heikennettyä bakteeria voidaan käyttää rokotteena. Rokote sisältää farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimentimen ja aktiivisena aineksena heikennettyä bakteeria.

Rokote on edullisesti lyofilisoidussa muodossa, esimerkiksi kapselin muodossa, kun se annetaan potilaalle suun kautta. Sellaiset kapselit voivat sisältää suolipäällyksen, joka koostuu esimerkiksi Eudragate "S" -aineesta, Eudragate "L" -aineesta, selluloosaasetaatista, selluloosaftalaatista tai hydroksipropyylimetyyliselluloosasta. Nämä kapselit voidaan käyttää sellaisinaan tai lyofilisoitu materiaali voidaan vaihtoehtoisesti liuottaa veteen ennen antoa esim. suspensiona. Liuottaminen suoritetaan edullisesti sopivassa pH:ssa olevaan puskuriin niin, että varmistetaan organismien elinkyky. Heikennettyjen bakteerien ja rokotteen suojaamiseksi mahan happamuudelta, natriumbikarbonaattivalmistetta annetaan edullisesti ennen kutakin rokotteen antoa. Rokote voidaan vaihtoehtoisesti valmistaa parenteraalista antoa, nenän kautta antoa tai nisän kautta antoa varten.

Tässä kuvattua heikennettyä bakteeria voidaan käyttää isännän profylaktiseen käsittelyyn, erikoisesti ih-

misisännän, mutta myös mahdollisesti eläinisännän, käsittelemiseksi. Mikro-organismin, erikoisesti patogeenin, aiheuttama infektio voidaan sen vuoksi estää antamalla tehokas annos keksinnön mukaisesti valmistettua heikennettyä bakteeria. Sitten bakteeri ekspressoi heterologista proteiinia, joka kykenee kehittämään vasta-aineita mikro-organismia vastaan. Käytetty annosmäärä riippuu eri tekijöistä sisältäen isännän koon ja painon, formuloidun rokotetyypin ja heterologisen proteiinin luonteen. Kuitenkin, heikennetylle S. typhi -bakteerille annos, joka sisältää suun kautta antoa varten 10^9 - 10^{11} S. typhi -organismia per annos, on yleensä sopiva 70 kg painavalle aikuiselle ihmisisännälle.

Seuraava esimerkki kuvaa keksintöä. Mukana seuraavissa kuvioissa:

Kuviot 1 - 4 kuvaavat S. typhimurium -isolaattien kyvyt kasvaa in vivo maksassa, pernassa, Peyerin levyissä ja suoliliepeen imusolmukkeissa, vastaavassa järjestyksessä, BALB/c-hiirissä. X-akseli osoittaa vuorokaudet infektion jälkeen, y-akseli osoittaa elävien organismien $\log_{10}$-arvon per elin, Δ osoittaa BRD509-isolaattia, □ osoittaa BRD847-isolaattia, o osoittaa BRD743-isolaattia, _____ osoittaa ampisilliinin poissaolon ja ----- osoittaa ampisilliinin lisäyksen.

Kuvio 5 kuvaa anti-tetanustoksiini fragmentti C -tiitterit hiiren seerumeissa. X-akseli osoittaa ne bakteerityypit, joita käytettiin hiirien altistukseen. Annosten lukumäärät esitetään hakasulkeissa. Y-akseli osoittaa absorbanssilukemat 492 nm:ssa.

Esimerkki

Plasmidin pTETnir15 rakennus

Ekspressioplasmidi pTETnir15 rakennettiin plasmidista pTETtac115 (Makoff et al., Nucl. Acids Res. 17, 10191 - 10202, 1989) korvaamalla EcoRI-ApaI-alue (1345 emäsparia), joka sisältää lacI-geenin ja tac-promoottorin, seuraavalla oligojen 1 ja 2 parilla:

Oligo-1 5'-AATTCAGGTAAATTTGATGTACATCAAATGGTACCCCTTGCTG-AATCGTTAAGGTAGGCGGTAGGGCC-3'

Oligo-2 3'-GTCCATTTAAACTACATGTAGTTTACCATGGGGAACGACTTAG-CAATTCCATCCGCCATC-5'

Oligonukleotidit syntetisoitiin Pharmacia Gene Assembler -laitteessa ja tuloksena syntyneet plasmidit varmistettiin sekvensoimalla (Makoff et al., Bio/Technology 7, 1043 - 1046, 1989).

Plasmidin pTETnir15 sisältävän SL1334 aroA aroD -mutantin valmistus

Sellaisen Salmonella-rokotekannan rakentamiseksi, joka ekspressoi tetanustoksiinin fragmenttia C nirB-promoottorin säätelyn alaisuudessa, transformoitiin S. typhimurium LB5010 -välikanta (r^{-m+})(Bullas ja Ryo, J. Bact. 156, 471 - 474, 1983) plasmidilla pTETnir15. Pesäkkeet, jotka ekspressoivat fragmenttia C, tunnistettiin antibioottiselektiolla, jonka jälkeen suoritettiin pesäkkeiden immunoblottaus anti-tetanustoksiini fragmentti C -seerumilla. Pesäkkeet kasvatettiin yli yön nitroselluloosasuodattimilla aerobisesti ja sitten ne indusoitiin inkuboimalla anaerobisissa olosuhteissa neljä tuntia ennen immunoblottausta. Yhtä kantaa, joka ekspressoi stabiilisti fragmenttia C, käytettiin plasmidi-DNA:n valmistukseen. Tätä käytettiin transformoitaessa S. typhimurium SL1334 aroA aroD -isolaatti, jolle annettiin nimi BRD509, elektroporaatiolla. Kanta, joka ekspressoi stabiilisti fragmenttia C (tarkistettiin immunoblottauksella, kuten yllä on kuvattu), valittiin in vivo tutkimuksia varten ja sille annettiin nimi BRD847.

BRD743- ja BRD847-kannan in vivo kinetiikkojen vertailu BALB/c-hiirissä

Kantojen BRD743 (BRD509, joka sisältää plasmidin pTET85) ja BRD847 kykyä kasvaa in vivo verrattiin sen jälkeen, kun ne oli annettu suun kautta BALC/c-hiirille. Plasmidi pTET85 rakennettiin plasmidista pTETtac115 (Makoff et al., Nucl. Acids Res. 17, 10191 - 10202, 1989) deletoimalla

1,2 kiloemäksen pituinen fragmentti, joka sisältää lacI-geenin. Tämä johti fragmentin C konstitutiiviseen ekspressioon Salmonella-kannoissa. Bakteerien määrät maksoissa, pernoissa, Peyerin levyissä ja suoliliepeen imusolmukkeissa laskettiin. Hiiristä eristetyt bakteerit arvioitiin myös niiden kyvyn suhteen kasvaa maljoilla, jotka sisälsivät ampisilliinia, joka oli osoitus niiden organismien prosenttimääristä, jotka yhä sisälsivät fragmenttia C ekspressoivan plasmidin. Tulokset on esitetty kuvioissa 1 - 4.

Kun hiirien infektoimiseen käytettiin samanlaiset alkumäärät organismeja (5×10^9) havaittiin, että sekä BRD743 että 847 kykenivät tunkeutumaan kaikkiin tutkittuihin hiiren kudoksiin ja pysymään elossa niissä, mutta alempina tasoina kuin kanta BRD509. Mielenkiintoinen piirre on kuitenkin se, että niiden ampisilliiniresistenttien organismien määrä, joka saatiin kannalla BRD743 infektoiduista hiiristä, laskee nopeasti ja kaikki talteen saadut organismit olivat ampisilliinille herkkiä vuorokauteen 14 mennessä. Tämä osoittaa, että in vivo selektio johtaa nopeasti plasmidin pTET85 häviämiseen Salmonella-rokotekannasta. Päinvastaisesti kannan BRD847 määrät ampisilliinin kanssa ja ilman sitä olivat oleellisesti samat koko sen ajan, kun infektioita tarkkailtiin. Tämä osoittaa plasmidin pTETnir15 lisäedun S.typhimurium -rokotekannalle johtaen organismeihin, joilla on mahdollisuus ekspressoida fragmenttia C in vivo pidempi aikajakso, josta on ilmeisiä etuja immunogeenisuuden suhteen.

BALB/c-hiirien immunisaatio käyttäen Salmonella-kantoja, jotka sisältävät plasmidin pTET85 (BRD743) tai pTETnir15 (BRD847)

Ryhmät, joissa oli 20 hiirtä, ympättiin suun kautta määrällä 5×10^9 solua per hiiri kannoilla BRD743, BRD847 tai BRD509. Vuorokautena 25 kaikista hiiristä kerättiin seerumit ja ne analysoitiin ELISA-testillä anti-tetanus-vasta-aineiden suhteen. Kaikilla hiirillä, jotka oli rokotettu kannalla BRD847, oli tunnistettava anti-fragmentti

C -vasta-aine vuorokautena 25, kun taas niillä, jotka oli rokotettu kannalla BRD743 tai BRD509, ei ollut (kuvio 5). Vuorokautena 25 kymmenelle hiirelle kussakin ryhmässä annettiin tehosteannos ympäten suun kautta samanlainen annos homologisia organismeja. Näistä hiiristä vuorokautena 46 otetun seerumin ELISA-analyysi osoitti, että anti-fragmentti C -vasteet olivat tehostuneet ryhmillä, jotka oli ympätty kannoilla BRD743 ja BRD847. Kannalla BRD847 tehostettujen hiirien tiitterit olivat merkittävästi korkeampia kuin niiden hiirien, jotka oli tehostettu kannalla BRD743. Hiiret, joille oli annettu tehosteannos suun kautta kannalla BRD509, eivät onnistuneet tuottamaan tunnistettavaa vasta-aineresponssia fragmentille C.

Kannoilla BRD847 ja 743 suun kautta immunisoitujen hiirien tetanustoksiinialtistus

Hiiret, jotka oli rokotettu suun kautta kannoilla BRD743, 847 ja 509, testattiin immuniteetin suhteen tetanustoksiinialtistusta vastaan sen jälkeen, kun oli annettu yksi tai kaksi annosta immunisoivaa kantaa. Ryhmät, joissa oli 20 hiirtä, saivat yhden ainoan 5 $x10^9$ organismia sisältävän annoksen suun kautta ja ryhmät, joissa oli 10 hiirtä, altistettiin vuorokautena 25 500 sellaiselle annokselle tetanustoksiinia, joka aiheutta kuoleman 50 prosentissa (katso taulukko 1). Hiiret, jotka oli rokotettu kannalla BRD847, olivat täysin suojattuja altistusta vastaan yhden suun kautta annetun annoksen jälkeen, kun taas ne hiiret, jotka oli rokotettu kannalla BRD743, olivat ainoastaan osittain suojattuja (2/10 eloonjäänyttä). Jäljelle jääneet 10 hiiren ryhmät saivat toisen annoksen organismeja (5 x 10^9) vuorokautena 25 ja ne altistettiin vuorokautena 46 (ensimmäisen annoksen jälkeen). Jälleen hiiret, jotka oli immunisoitu kannalla BRD847 olivat täysin suojattuja tetanustoksiinlla tapahtuneen altistuksen jälkeen, kun taas ne hiiret, jotka oli immunisoitu kannalla BRD743, olivat ainoastaan osittain suojattuja (5/10). Kaikki hiiret, jotka immunisoitiin yhdellä tai kahdella BRD509-kannan annoksella

ja altistettiin tetanustoksiinilla, kuolivat. BRD847 on tehokas yhtenä annoksena suun kautta annettava rokote tetanustoksiinialtistusta vastaan hiirissä. Hiiriryhmät altistettiin myös tetanustoksiinille sen jälkeen, kun ne olivat saaneet yksi ja kaksi 10^5 organismin suuruista annosta laskimonsisäisesti kantoja BRD847 ja BRD743. Kaikki hiiret olivat täysin suojattuja tetanustoksiinialtistusta vastaan sen jälkeen, kun ne olivat saaneet yksi tai kaksi annosta rokotekantaa.

Taulukko 1

Hiirien immunisaatio suun kautta tetanusta vastaan käyttäen S. typhimurium SL1334 aroA aroD pTET85 -kantaa ja S. typhimurium SL1334 aroA aroD pTETnir15 -kantaa

Rokote	Annos	Annosten lukumäärä	Tetanusaltistuksesta eloonjääneiden hiirien lukumäärä
SL1344 aroA aroD	**$8,6x10^9$**	**1**	**0/10**
(BRD509)	**$7,4x10^9$**	**2**	**0/10**
SL1344 aroA aroD	**$6,4x10^9$**	**1**	**2/10**
pTET85(BRD743)	**$8,2x10^9$**	**2**	**5/10**
SL1344aroA aroD	**$9,5x10^9$**	**1**	**10/10**
pTETnir15(BRD847)	**$7,5x10^9$**	**2**	**9/9**

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä rokotteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että sekoitetaan farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja tai laimennin, ja aktiivisena aineosana heikennetty bakteeri, joka sisältää nirB-promoottorin, jonka aktiivisuuden anaerobiset olosuhteet indusoivat, toiminnallisesti liitettynä DNA-sekvenssiin, joka koodittaa heterologista proteiinia, joka sisältää patogeenisen organismin antigeenisen determinantin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heikennetty bakteeri on Salmonella-bakteerin heikennetty kanta.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heikennetty bakteeri on Salmonella typhi tai Salmonella typhimurium -bakteerin heikennetty kanta.

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteerin heikkous johtuu palautumattomasta mutaatiosta aromaattisten aminohappojen biosynteettisen reitin geenissä.

5. Minkä tahansa edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteerin heikkous johtuu palautumattomasta mutaatiosta bakteerin DNA:ssa, joka koodittaa proteiinia, jota tuotetaan vasteena ympäristön aiheuttamalle stressille, tai bakteerin DNA:ssa, joka koodittaa proteiinia, joka säätelee sellaisen DNA:n ekspressiota, joka koodittaa proteiinia, jota tuotetaan vasteena ympäristön aiheuttamalle stressille.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heikennetty bakteeri sisältää palautumattoman mutaation kummassakin kahdesta erillisesta geenistä sen aromaattisten happojen biosynteettisessä reitissä.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heikennetty bakteeri on aroA aroC, aroA aroD tai aroA aroE -mutantti.

8. Minkä tahansa edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteeriin sisältyvä heterologista proteiinia koodittava sekvenssi koodittaa antigeenisen sekvenssin, joka on peräisin viruksesta, bakteerista, sienestä, hiivasta tai parasiitista.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heterologista proteiinia koodittava sekvenssi koodittaa Bordetella pertussis -bakteerin P.69-proteiinia tai tetanustoksiinin fragmentti C:tä.

10. Menetelmä heikennetyn bakteerin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että heikennetty bakteeri transformoidaan DNA-rakenteella, joka sisältää nirB-promoottorin, jonka aktiivisuuden anaerobiset olosuhteet indusoivat, toiminnallisesti liitettynä DNA-sekvenssiin, joka koodittaa heterologista proteiinia, joka sisältää patogeenisen organismin antigeenisen determinantin.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen mentelmä, t u n n e t t u siitä, että heikennetty bakteeri on Salmonella-bakteerin heikennetty kanta.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heikennetty bakteeri on Salmonella typhi tai Salmonella typhimurium -bakteerin heikennetty kanta.

13. Patenttivaatimuksen 10, 11 tai 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteerin heikkous johtuu palautumattomasta mutaatiosta aromaattisten aminohappojen biosynteettisen reitin geenissä.

14. Jonkin patenttivaatimuksista 10 - 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteerin heikkous johtuu palautumattomasta mutaatiosta bakteerin DNA:ssa, joka koodittaa proteiinia, jota tuotetaan vasteena ympäristön aiheuttamalle stressille, tai bakteerin DNA:ssa, joka koodittaa proteiinia, joka säätelee sellaisen DNA:n ekspres-

siota, joka koodittaa proteiinia, jota tuotetaan vasteena ympäristön aiheuttamalle stressille.

15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heikennetty bakteeri sisältää palautumattoman mutaation kummassakin kahdesta erillisestä geenistä sen aromaattisten happojen biosynteettisessä reitissä.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heikennetty bakteeri on aroA aroC, aroA aroD tai aroA aroE -mutantti.

17. Jonkin patenttivaatimuksista 9 - 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteeriin sisältyvä heterologista proteiinia koodittava sekvenssi koodittaa antigeenisen sekvenssin, joka on peräisin viruksesta, bakteerista, sienestä, hiivasta tai parasiitista.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heterologista proteiinia koodittava sekvenssi koodittaa Bordetella pertussis -bakteerin P.69-proteiinia tai tetanustoksiinin fragmentti C:tä.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett vaccin, k ä n n e t e c k n a t av att man blandar en farmaceutiskt acceptabel bärare eller diluent och, som aktiv ingrediens, en försvagad bakterie vilken innehåller promotorn nirB, vars aktivitet induceras av anaeroba förhållanden, funktionellt kopplad till en DNA-sekvens som kodar ett heterologt protein som innehåller en antigen determinant från en patogen organism.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att den försvagade bakterien är en försvagad stam av bakterien Salmonella.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t av att den försvagade bakterien är en försvagad stam av bakterien Salmonella typhi eller Salmonella typhimurium.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a t av att bakteriens försvagning kan tillskrivas en irreversibel mutation i en gen i den biosyntetiska rutten för aromatiska aminosyror.

5. Förfarande enligt vilket som helst av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t av att bakteriens försvagning kan tillskrivas en irreversibel mutation i bakteriens DNA som kodar ett protein som produceras som svar på en yttre påfrestning, eller i bakteriens DNA som kodar ett protein som reglerar expressionen av DNA som kodar ett protein som produceras som svar på yttre påfrestning.

6. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t av att den försvagade bakterien innehåller en irreversibel mutation i vardera av två skilda gener i dess biosyntetiska rutt för aromatiska aminosyror.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, k ä n n e t e c k n a t av att den försvagade bakterien är en aroA aroC, aroA aroD eller aroA aroE -mutant.

8. Förfarande enligt vilket som helst av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t av att sekvensen som kodar det heterologa proteinet och som ingår i bakterien kodar en antigen sekvens som härstammar från ett virus, en bakterie, svamp, jäst eller en parasit.

9. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a t av att sekvensen som kodar det heterologa proteinet kodar proteinet P.69 från bakterien Bordetella pertussis eller tetanustoxinets fragment C.

10. Förfarande för framställning av en försvagad bakterie, k ä n n e t e c k n a t av att man transformerar en försvagad bakterie med en DNA-konstruktion som innehåller promotorn nirB, vars aktivitet induceras av anaeroba förhållanden, funktionellt kopplad till en DNA-sekvens som kodar ett heterologt protein, som innehåller en antigen determinant från en patogen organism.

11. Förfarande enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t av att den försvagade bakterien är en försvagad stam av bakterien Salmonella.

12. Förfarande enligt patentkrav 11, k ä n n e t e c k n a t av att den försvagade bakterien är en försvagad stam av bakterien Salmonella typhi eller Salmonella typhimurium.

13. Förfarande enligt patentkrav 10, 11 eller 12, k ä n n e t e c k n a t av att bakteriens försvagning kan tillskrivas en irreversibel mutation i en gen i den biosyntetiska rutten för aromatiska aminosyror.

14. Förfarande enligt något av patentkraven 10 - 13, k ä n n e t e c k n a t av att bakteriens försvagning kan tillskrivas en irreversibel mutation i bakteriens DNA som kodar ett protein som produceras som svar på en yttre påfrestning, eller i bakteriens DNA som kodar ett protein som reglerar expressionen av DNA som kodar ett protein som produceras som svar på yttre påfrestning.

15. Förfarande enligt patentkrav 13, k ä n n e t e c k n a t av att den försvagade bakterien innehåller en irreversibel mutation i vardera av två skilda gener i dess biosyntetiska rutt för aromatiska aminosyror.

16. Förfarande enligt patentkrav 15, k ä n n e t e c k n a t av att den försvagade bakterien är en aroA aroC, aroA aroD eller aroA aroE -mutant.

17. Förfarande enligt något av patentkraven 9 - 16, k ä n n e t e c k n a t av att sekvensen som kodar det heterologa proteinet och som ingår i bakterien kodar en antigen sekvens som härstammar från ett virus, en bakterie, svamp, jäst eller en parasit.

18. Förfarande enligt patentkrav 17, k ä n n e t e c k n a t av att sekvensen som kodar det heterologa proteinet kodar proteinet P.69 från bakterien Bordetella pertussis eller tetanustoxinets fragment C.

Fig. 1.

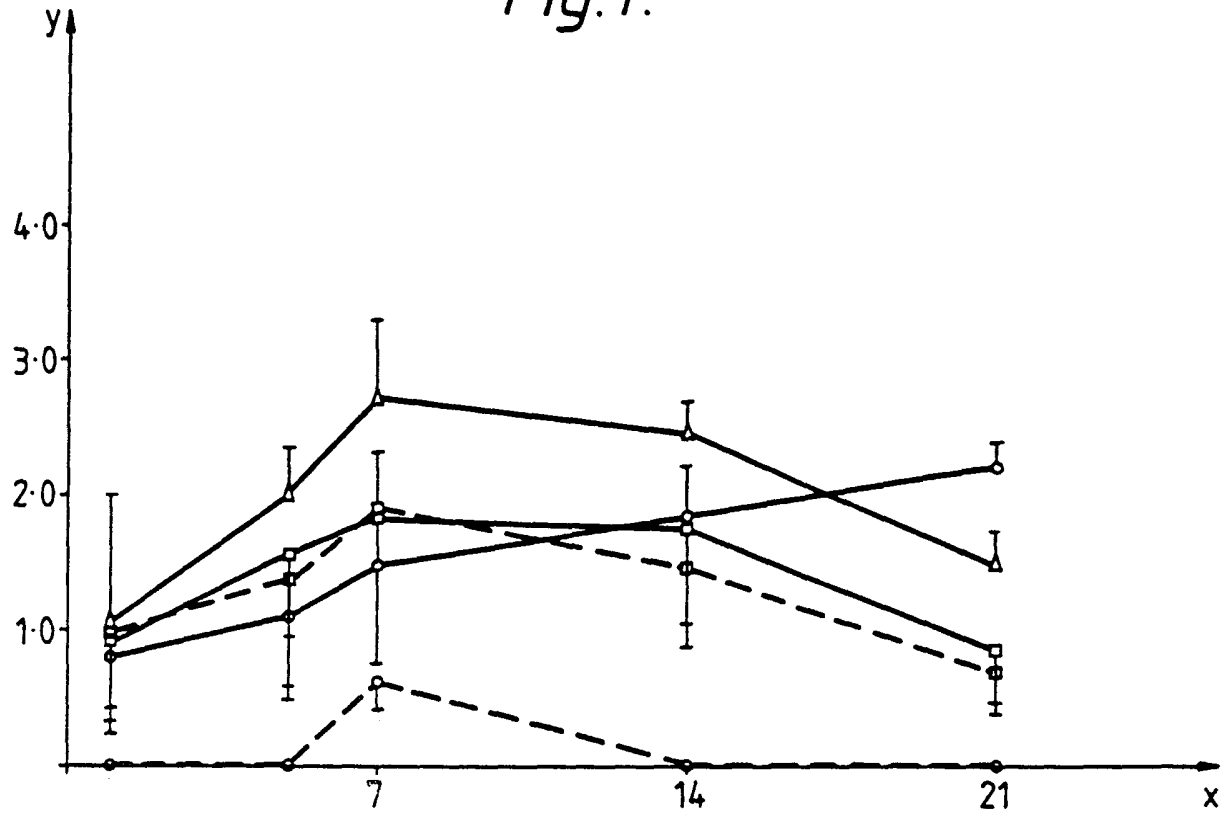


Fig. 2.

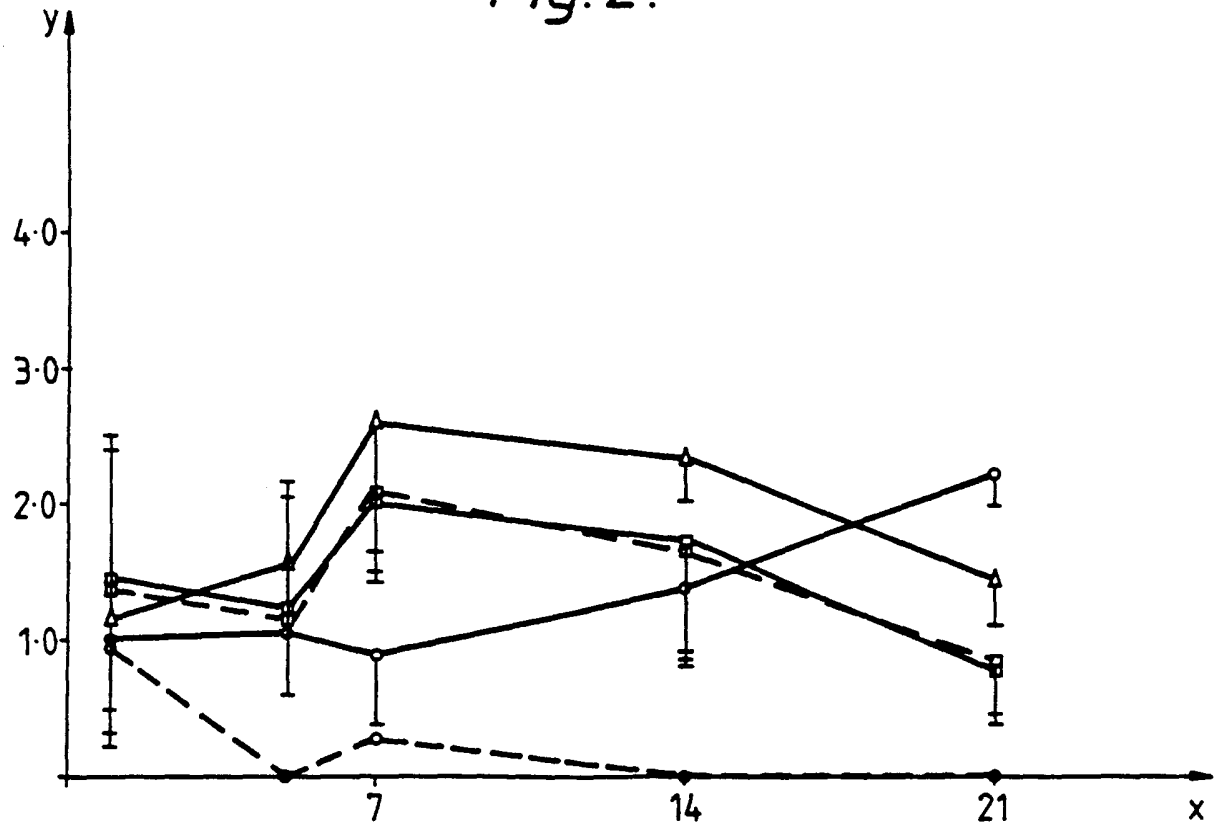


Fig.3.

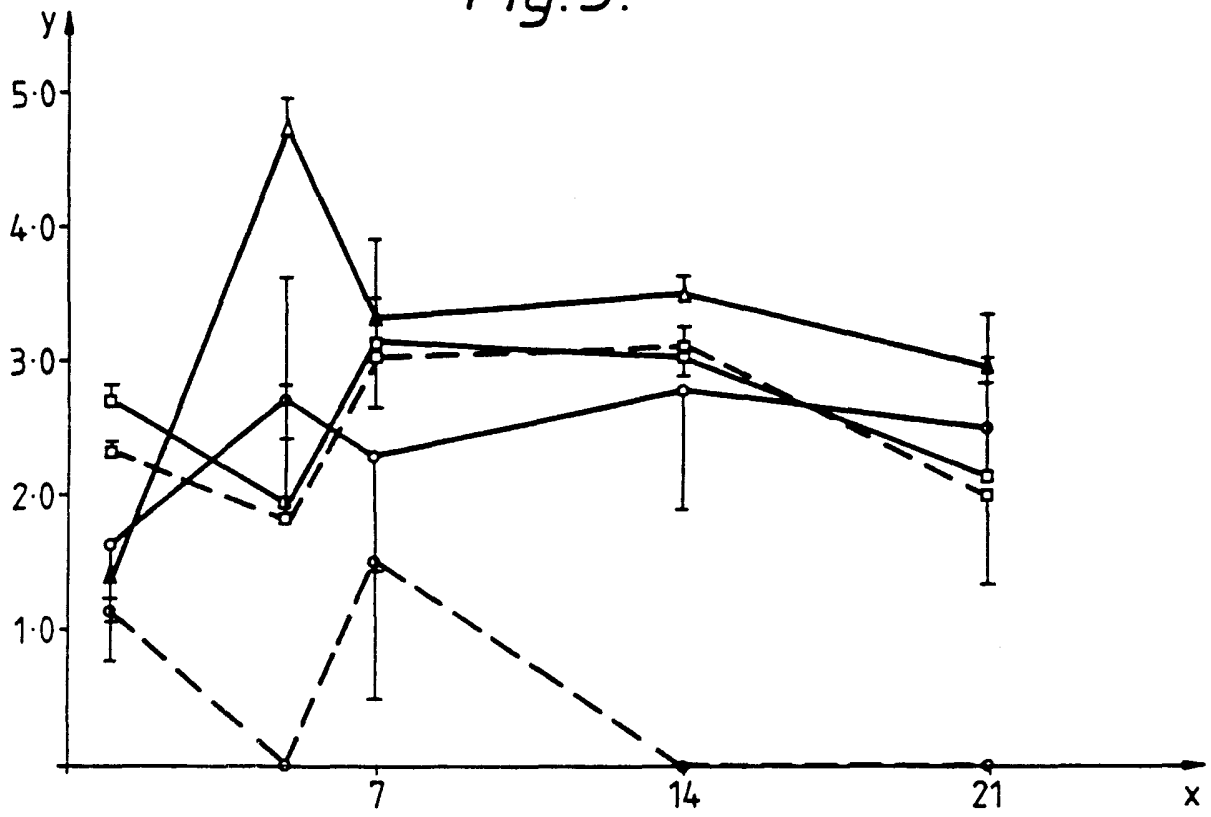


Fig.4.

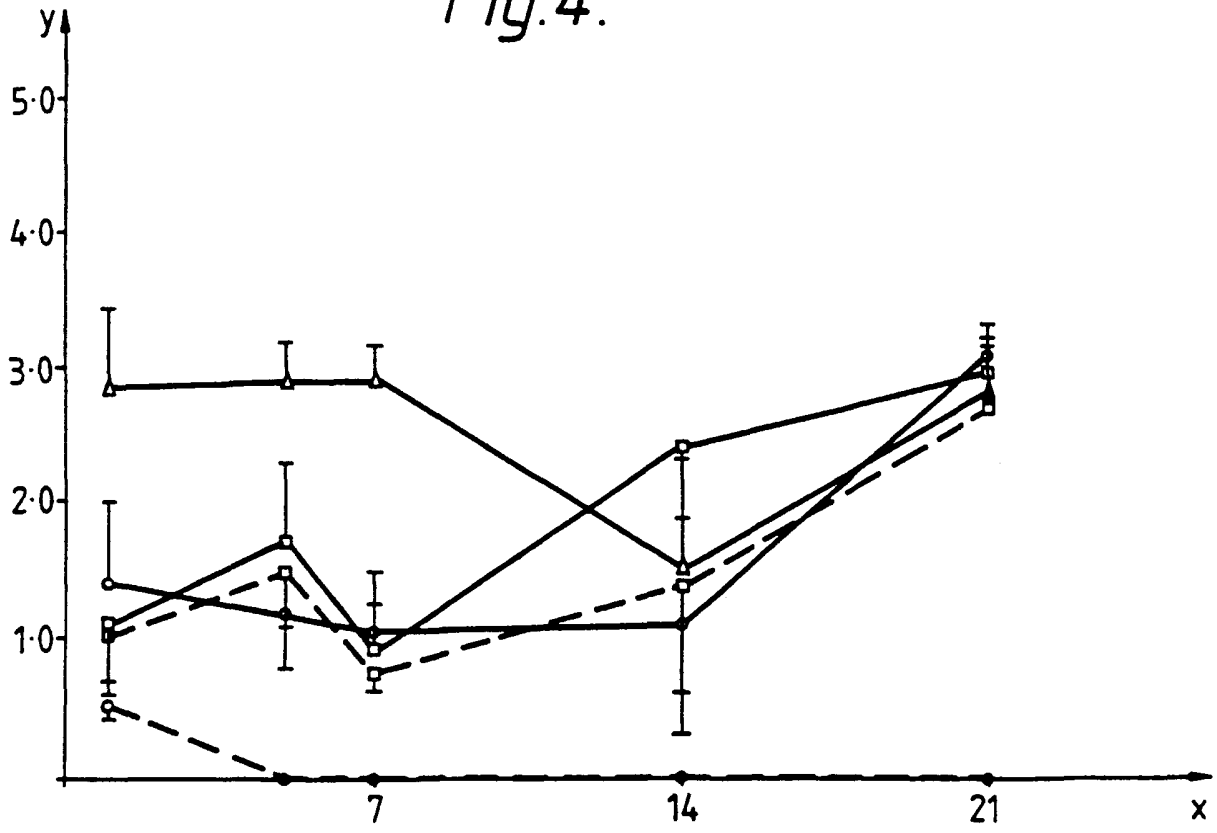


Fig.5.

