



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314043**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 N 15/74

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19921729	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1992.04.30	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	1992.04.30	(30) Prioritet	1991.05.03, US, 695706
(41) Alm. tilgj.	1992.11.04		
(45) Meddelt dato	2003.01.20		
(71) Patenthaver	American Cyanamid Co, One Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470, US		
(72) Oppfinner	Robert Newton Brey III, Rochester, NY, US James Peter Fulginiti, Canandaigua, NY, US Algis Anilionis, Huntigton, NY, US		
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo		

(54) Benevnelse **Plasmid eller fagvektor som ikke inneholder en antibiotisk resistens determinant, Pur A-bakterievert som inneholder plasmidet eller vektoren, farmasøytisk preparat som omfatter bakterien og fremgangsmåte for seleksjon og opprettholdelse av bakterielle transformanter**

(56) Anførte publikasjoner EP A 286303, EP A 184086, EP A 322237, WO A 8902924, WO A 9012086
Vaccine, 8(1), febr. 1990, s. 5-11
The J. of Biol.Chem., 263, 35, 15. des. 1988, s 19147-19153
The J. of Chemical Investigation, 79, 3.mars 1987, s. 888-902

(57) Sammendrag

Komplementeringssystem for seleksjon og opprettholdelse av uttrykte gener i bakterielle verter. Oppfinnelsen tilveiebringer stabile vektorer som kan selekteres og opprettholdes ved komplementering av kromosom-delesjonsmutasjoner av purA (adenylsuksinatsyntetase) og unngå bruk av antibiotika resistensgener. Dette system er anvendelig ved fremstilling av organismer under fermentering og ved levende vaksinebakterier så som svekket salmonella tyfi. Dette system muliggjør seleksjon av kromosomale integranter og seleksjon og stabil plasmid opprettholdelse i den vaksinerte vert uten anvendelse av et ytre seleksjonstrykk.

Foreliggende oppfinnelse angår plasmid eller fagvektor som ikke inneholder en antibiotisk resistens determinant, Pur A-bakterievert som inneholder plasmidet eller vektoren, farmasøytisk preparat som omfatter bakterien og fremgangsmåte for seleksjon og opprettholdelse av bakterielle transformanter.

Plasmider funnet i naturen blir fordelt blant delende celler, slik at dattercellene mottar minst én kopi. Bakterielle plasmidsystemer benytter forskjellige strategier for å sikre korrekt fordeling av plasmidene til etterkommerne. Å opprettholde plasmidene i høyt kopitall øker sannsynligheten for at dattercellene arver minst ett plasmid ut i fra vilkårlig fordeling, slik at sannsynligheten for at etterkommerne arver ikke noe plasmid er meget lav. Skjønt tilfeldige fordelingssystemer kan teoretisk funksjonere ved å fordele plasmidene blant delende celler, må plasmider som beholdes som én eller i et lavt kopitall pr. celle avhenge av aktiv fordelingsmekanisme. F.eks. må plasmider som blir opprettholdt i lavt kopitall eller en kopi pr. celle slik som E. coli F-faktor (incF1), plasmid profag P1 (incY) og R1 og NR1 (incF2), benytte aktive fordelingssystemer for å opprettholde plasmider i den celledelende populasjonen, siden vilkårlig fordeling av plasmider ville forutsette en tapsrate på 25% pr. generasjon. Videre, er noen høyere kopitallplasmider avhengig av setespesifikke rekombinasjoner for å løse opp multimerdannelse, som funksjonelt reduserer kopitalet av plasmider i celler og deres evne til vilkårlig fordeling ved hjelp av fri diffusjon.

Flere aktive fordelingssystemer er blitt beskrevet for flere familier av bakterielle plasmider. Disse systemene har visse felles egenskaper. Plasmidreplikasjonsfunksjoner kan vanligvis tilskrives bestemte regioner av plasmider. Plasmid replikasjonsregioner (rep) for f.eks. P1 eller F, kan bli uavhengige beholdt i celler. Imidlertid, er miniF eller miniP1-plasmider som mangler fordelingsregionene ustabile og tapes fra populasjonen i frekvenser som kan forutsies ut i fra vilkårlig fordeling.

Utviklingen av plasmidvektorer for den bakterielle produksjon av heterologe gener for kommersielle formål er blitt i utstrakt grad dokumentert. En rekke kloningshjelpemidler basert på forskjellige plasmidreplikoner er blitt beskrevet og benyttet for produksjon av proteiner i E. coli og andre bakterier. I utviklingen av kloningshjelpemidler som er passende for produksjon av fremmede proteiner har den vanlige strategien vært å lage plasmider med lav molekylvekt med høyt eller regulert kopitall.

Disse strategiene har noen ganger ledet til elimineringen av fordelingsfunksjonene som ville på annen måte lede til stabil plasmidarv. Høyt kopitall kloningsvektorer for konstruksjon av produksjonsorganismer viser ofte fordelingsustabilitet.

Den mest vanlige strategien for å oppnå stabil plasmidreplikasjon og arv i vertscellepopulasjonen under fermentering har blitt å inkludere legemiddelresistensdeterminanter på kloningshjelpemiddelet. Skjønt tilsetning av legemidler til vekstmedium tillater seleksjon med hensyn til celler som inneholder plasmid, blir tilsetning av antibiotika uakseptabelt i mange tilfeller på grunn av omkostninger og mulig forurensning av endeproduktet.

Flere alternative strategier er blitt utviklet for å oppnå stabil plasmidopprettelse under fermentering. F.eks., *parB* locus i R1 er blitt subklonet inn i en rekke plasmider som er vanlige kloningsvektorer. De resulterende plasmidene som inneholder R1 *parB*-regionen viste øket stabilitet når de ble dyrket i fravær av seleksjonspress. På samme måte kan *sopp*-regionen i F stabilisere ikke-stabile *oriC*-plasmider, og P1 *par* kan stabilisere en mini-F-plasmid som mangler sine egne fordelingsfunksjoner. Stabiliteten til kloningsvektorene som inneholder tryptofanoperongener ble øket ved tilsetning av *par*-locus i pSC101 og den ikke-stabile multikopi vektor som stammer fra p15a (pACYC184) ble stabilisert av pSC101 *par*-locus. Andre fordelingsregioner, slik som en fordelingsregion fra en *Salmonella typhimurium* virulensplasmid er også blitt benyttet med hell for å stabilisere kloningshjelpemidler.

Skjønt kloningshjelpemidler kan i det vesentlige bli stabilisert ved tilsetning av fordelingsregionene fra stabile plasmider, blir legemiddelresistensdeterminanter fremdeles vanlig brukt under fermentering. Legemiddel-resistensmarkører er passende for å innføre plasmider i bakterievertsceller. Alternativt kan plasmider bli innført i mottakende bakterieceller ved komplementering av vertskromosomale mutasjoner ved hjelp av plasmidbårede gener. Komplementeringssystemer avhenger av konstruksjonen av spesielle vertkromosomale mutasjoner, men kan bli benyttet på en pålitelig måte til å omgå bruken av antibiotika i kulturmedia. F.eks., komplementering av næringsdefekter kan lede til plasmidstabilisering. Komplementering av kromosomal mutasjon for aspartat semialdehyd dehydrogenase (*asd*) i *Salmonella typhimurium* eller D-alanin racemasemutasjon (*dal*) i *Bacillus subtilis*, som hver leder til feilaktig cellevegg

biosyntese og cellelysis, gir stabil plasmidarv i fravær av seleksjon av alle levedyktige celler i kulturen. Både *asd* og *dal*-mutasjonene kan bli fenotypisk reparert ved supplering med næringstilsetninger. På den annen side, komplementering av et essensielt gen i verten, hvis defekt ikke kan bli overvunnet ved næringssupplering, kan også stabilisere plasmidene. F.eks., et *E. coli*-gen, *ssh*, blir krevet for DNA-replikasjon og celleviabilitet og hindrer oppsamlingen av plasmid-løse celler under fermentering i en bioreaktor når det blir satt inn i et plasmid og kan bli benyttet for å komplettere en kromosomal *ssh*-defekt. På analog måte stabiliserer en plasmid-båren kopi av valyl tRNA syntetase plasmidene i *E. coli* som inneholder en kromosomal temperaturfølsom valyl tRNA syntetase. Plasmidene kan også bli stabilisert ved innbygging av et bakteriofag repressorgen, tapet av det leder til induksjon av vertsprofag og celledød.

Et stabilt plasmid eller bakteriofag vektorsystem for seleksjon og opprettholdelse har blitt utviklet for bakterier som kan produsere heterologe genprodukter under fermentering, eller for bruk i separat stabilisering av antigenproduksjon i levende svekkete bakterielle vaksiner. Dette system er basert på komplementering av en kromosomal mangelmutasjon ved å uttrykke et funksjonelt gen for adenylsuksinat-syntetase (*purA* genprodukt).

Tre fremgangsmåter kan bli benyttet for å gi funksjonell *purA* genprodukt (adenylsuksinatsyntetase) for seleksjon og opprettholdelse. Først, et lav kopitallplasmid kan bli benyttet som vektoren fra hvilken produksjon av *purA*-genet er tilstrekkelig til å komplettere den kromosomale *purA*-defekten uten å overlesse cellen med en overproduksjon av *purA* proteinproduktet. En annen fremgangsmåte er å gi *purA*-genet på et høyt kopitall plasmid hvorfra det blir ineffektivt uttrykt. Dette kan bli oppnådd ved hjelp av en rekke fremgangsmåter vel kjent i feltet for nedstrømsregulering av gen-ekspressjon, inklusive basespesifikk mutagenese av promotoren eller ribosom bindings-sekvensene for å redusere transkripsjonseffektiviteten og derfor ekspressjon av *purA*-genet. En tredje fremgangsmåte er å gi et funksjonelt *purA*-gen på en integreringsvektor, slik som et plasmid eller bakteriofag, som ikke er i stand til å replikere i den mottagende *purA*-vert, og således selektene for integrering av *purA*-vektoren.

Dette systemet forebygger behovet for å selektene bakterielle transformanter ved hjelp av antibiotikaresistens, og for bruk av levende bakterielle vaksinevektorer,

forhindrer frigjøringen av legemiddel-resistensgener til omgivelsene og tilførsel til annen tarmflora ved hjelp av kjente genetiske mekanismer. Denne oppfinnelse er spesiell anvendbar i seleksjon og vedlikehold av plasmider, eller for integrering av vektorer i levende svekkede bakterielle vaksinstammer, begge for vekst og vaksineproduksjon og i antigene tilførselsfaser i den vaksinerte verten.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1 viser konstruksjonen av plasmid pPX3001, som inneholder *E. coli* *purA*-genet under kontrollen av *lacZ*-promotoren.

Fig. 2 viser konstruksjonen av plasmid pPX3003 som inneholder *E. coli* *purA*-genet og genet som koder for bindings subenheten til det varmelabile enterotoksin (LT-B) til *E. coli* under kontrollen av *lacZ*-promotoren.

Fig. 3 er en fremstilling av prosent av *S. dublin* SL5653-celler som bærer *purA*-plasmidene under selektiv (uten tilsatt adenin) og ikke-selektive betingelser (med adenin tilsatt).

Fig. 4A viser en SDS polyakrylamidgel av total celleprotein fra kulturene til SL5653/pPX3003 dyrket i medium som inneholder adenin (+ad) eller uten adenin (-ad). Fig. 4B viser et western blot av total celleprotein i SL5653/pPX3003 undersøkt med geit anti-LT-B-antiserum og synliggjort med HRP-merket protein A.

Fig. 5 viser konstruksjonen av to lavkopitall plasmidvektorer. Plasmid pPX3005 inneholder hele den LT-B-kodende sekvensen og en Kanamycin-resistens determinnt. Plasmid pPX3006 inneholder *purA*-genet under kontrollen av *lacZ*-promotoren.

Fig. 6 viser konstruksjonen av tre *purA* plasmidvektorer som inneholder den kodende sekvensen til LT-B (pPX3010), malariacirkumsporozoitt (CS) proteingen (pPX3009) og nukleotidsekvensen som koder for en LT-B/CS fusjonsprotein (pPX3007).

Fig. 7 viser resultatene av *in vivo* stabiliseringsstudier av *Salmonelle typhimurium*-stammene ved *purA*-komplementering. *S. typhimurium* gjenvunnet fra A: milt, B: lever og C: Payerske områder.

Fig. 8 viser resultatene av *in vivo* stabiliseringsstudier av *S. typhi*-stammene av *purA*-komplementering. *S. typhi* gjenvunnet fra A: lever og B: milt.

I et første aspekt av oppfinnelsen omfattes et plasmid eller fagvektor som ikke inneholder en antibiotisk resistens determinant, kjennetegnet ved at den er blitt stabilisert ved innsetting av DNA som inneholder *purA*-genet som koder for adenylosuksinatsyntetase, og at den er et lavkopitallplasmidvektor, eller et høykopitall-
 5 plasmid som inneholder et nedregulert *purA*-gen, eventuelt at det/den ytterligere omfatter minst en annen nukleotidsekvens som koder for et antigen eller fragment av dette.

Vektoren kan fortrinnsvis ytterligere omfatte minst en annen nukleotidsekvens som koder for et antigen eller fragment av dette.

10 Antigenet er foretrukket et viralt antigen valgt fra gruppen som består av human immunsviktvirus (typene I og II), human T lymfocytvirus (typene I, II og III), respiratorisk syncytialt virus, hepatitt A, hepatitt B, hepatitt C, non-A og non-B hepatittvirus, herpes simplex-virus (typene I og II), cytomegalovirus, influensavirus, parainfluenzavirus, poliovirus, rotavirus, coronavirus, røde hunder-virus, meslingvirus,
 15 vannkoppe-virus, Epstein Barr-virus, adenovirus, papillomavirus og gulfebervirus, et bakterielt antigen valgt fra gruppen som består av *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Branhamella catarrhalis*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhea*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas*
 20 *aeruginosa*, *Straphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* og *Clostridium tetani*, sopp eller parasittantigen eller et varmblodig dyr eller humanpatogen.

Spesielt foretrukne plasmidvektorer ifølge foreliggende oppfinnelse er kjennetegnet at de er stabile lavkopitall plasmidvektorer valgt fra gruppen som består av pPX3005 (ATCC 68451), pPX3006 (ATCC 68452), pPX3009 (ATCC 68612),
 25 pPX3010 (ATCC 68453) og pPX3007.

I en annen foretrukken utførelsesform omfatter plasmidet ifølge oppfinnelsen et gen som koder for et antigen som er en epitop av et malaria cirkumsporozoittprotein, som uttrykkes som del av fusjonsproteinet, som omfatter cirkumsporozoittepitopen og B-under-enheten til det varmeustabile enterotoksin til *E. coli* eller en del av dette
 30 protein som kombinert med cirkumsporozoittepitopen lager et immunaktivt fusjonsprotein.

Fortrinnsvis kjennetegnes plasmidet ved at det ytterligere omfatter et gen som koder et funksjonelt delingslocus for eksempel par B.

I et andre aspekt av foreliggende oppfinnelse omfatter et *Pur A*-bakterievert som er kjennetegnet ved at den inneholder plasmidet eller vektoren ifølge ethvert av kravene 1-7.

I et ytterligere aspekt omfattes en *Pur A*-svekket bakterie kjennetegnet ved at den inneholder et stabilt plasmid ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, som ikke inneholder et antibiotisk resistens locus, hvor plasmidet er en lavkopitallplasmidvektor eller et høykopitall-plasmid som inneholder et nedregulert *purA*-gen og hvor plasmidet inneholder et heterologt *purA*-gen som koder for adenylosuksinat-syntetase og minst ett annet gen som koder for et heterologt genprodukt.

Foretrukne bakterier ifølge foreliggende oppfinnelse har en *pur A*-kromosomal genmutasjon og eventuelt en kromosom mutasjon i ett eller flere gener som er funksjonelle med hensyn til biosyntese av aromatiske forbindelser, eller galaktose-metabolisme.

I en foretrukken utførelsesform er genproduktet fra virus-, bakteriell-, sopp- eller parasitt-opprinnelse av et varmblodig eller human patogen.

Andre aspekter ved foreliggende oppfinnelse vedrører farmasøytisk preparat som omfatter bakterier ifølge oppfinnelsen, og en fysiologisk akseptabel bærer og eventuelt adjuvans., og en fremgangsmåte for å selektere og beholde bakterielle transformanter av interesse ved bruk av ikke-antibiotiske seleksjons-fremgangsmåter, kjennetegnet ved at den omfatter innsetting av en stabil *purA*-vektor ifølge krav 1 inn i vertsbakterie som mangler *purA*-genet, og selektivt dyrke bakterien i adenin-manglende medium og selektere for *purA* plasmid-inneholdende bakteriekolonier som vokser på det.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også et plasmid eller fag som ikke inneholder en antibiotisk resistensdeterminant, kjennetegnet ved at plasmidet eller fagen bærer et *purA*-gen hvis innsetting i en vertscelle kan selekteres ved dyrking av vertscellen i et medium som ikke trenger purinsupplementering., og en fremgangsmåte for å selektere og opprettholde bakterielle transformanter av interesse for anvendelse i en vaksine ved bruk av ikke-antibiotiske fremgangsmåter, kjennetegnet ved at

fremgangsmåten omfatter innsetting av en stabil *purA*-vektor ifølge krav 1 inn i vertsbakterie som mangler *purA*-genet ifølge ethvert av kravene 8-15, og selektivt dyrke bakterien i adenin-manglende medium og selektene for *purA*-plasmid-inneholdende bakteriekolonier som vokser på det.

5 Stabile plasmidvektorer for komplementering av kromosomale delesjons-mutanter i *purA*-locus er beskrevet. Disse vektorene kan bli benyttet som et hjelpemiddel for å selektene kloner som bærer ikke-selekterbare markører eller andre passasjer-gener under kloningen. Vektorene i denne oppfinnelse kan også bli benyttet for å opprettholde disse klonene under vekst for dyrkningsmangfoldiggjøring,
10 vaksinstammeproduksjon og genproduktisolering.

Stabile *purA*-vektorer i oppfinnelsen gir et funksjonelt *purA*-gen som er istand til å uttrykke adenylsuksinat-syntetase, og reparere enhver defekt i purinbiosyntese og tillate vekst. I kontrast, i stammene med et defekt *purA*-gen, kan purinbehovene bare bli tilfredsstilt ved næringssupplering med ekstracellulært adenin eller adenosin.

15 Således sikrer vekst av celler som har *purA*-vektoren, i adenin-manglende medium den fortsatte seleksjon og opprettholdelse av plasmidvektoren. Delesjoner av vert *purA*-genet blir foretrukket siden disse mutasjonene ikke går tilbake. Omfattende delesjoner er mer foretrukne fordi disse fjerner omfattende homologi mellom plasmid *purA* og kromosom, hvilket kunne føre til kromosomintegrering av plasmidet og til markørgjenvinning av *purA*-genet i et dobbelt kryssoverhendelse med samtidig tap av det
20 uttrykte passasjergen. Bruk av komplementerende *purA*-gen fra en heterolog bakteriell kilde reduserer frekvensen av disse mulige uønskede homologe rekombinasjonsbegivenhetene.

Dette systemet baserer seg på komplementeringen av en kromosomal mangel-
25 mutasjon ved å uttrykke et funksjonelt gen for adenylsuksinat-syntetase (*purA* genprodukt). *purA*-locus er spesielt viktig i tillagningen av levende svekkede *Salmonella* og relaterte tarmvaksinevektorer siden nærværet av *purA*-mutasjoner på kromosomet fører til svekkelse av virulensen. *In vivo* forhindrer nærværet av *purA* på et plasmid eller bakteriofag vektor, som også koder for produksjon av minst ett polypeptid-
30 immunogen, tilsynekomsten av organismer som mangler immunogenproduksjon i den vaksinerte verten. Når det blir kombinert med andre svekkende loci, slik som dem som

bestemmer auxotrofe behov for aromatiske forbindelser, fører *purA* til videre svekkelse av virulens. Kromosomal delesjon av disse genene fører til nedsatt evne til å replikere i verten, pga. mangel på tilgjengelighet av frie puriner, slik som adenin eller adenosin eller vitaminforstadier (slik som folsyre) som er avhengig av biosyntese av aromatisk forbindelse. Således er *Salmonella typhimurium* som har delesjons-
 5 mutasjoner i både *aroA* og i *purA* ineffektive i å gi et skikkelig immunsvaret mot bakterien, mens bakterien som har bare defekter i de aromatiske biosyntetiske genene (slik som *aroA*) er effektive i å gi immunsvaret. Selv om *Salmonella* som har *aroA*-mutasjoner er istand til å replikere i et begrenset omfang intracellulært, er de som
 10 inneholder ytterligere *purA*-mutasjon ikke istand til å replikere i verten. Ved å gi *purA*-produktet til *E. coli* lokalisert på et plasmid til en *aro purA*-vertbakterie, har den komplementerte vaksine *in vivo* vekstegenskaper som er identiske til dem til *Aro*-mutanten.

Flere generelle fremgangsmåter for valg og stabilisering av ekspresjon er
 15 beskrevet her ved bruk av lavkopi plasmidbærere, høykopiplasmidbærere og vektorer som tillater gjenvinning av enkel kopikromosomale integreringsbegivenheter. I tilfelle med lav kopitallvektorer, kan komplementering av *purA* kromosomale defekter gi ytterligere stabilitet til plasmider som også inneholder funksjonelle fordelingsloci.

I tilfelle med høykopi tallvektorer i denne oppfinnelse blir *purA*-genet for-
 20 trinnvis mutert for å redusere ekspresjonseffektiviteten av genproduktet og derfor hindre veksthemming pga. skadelige effekter av en overproduksjon av adenylosuksinat-syntetase (*purA*) enzymet.

Konstruksjon av *purA* plasmidvektorer

25 Rekombinant DNA-teknologi ble benyttet i konstruksjonen av *purA*-plasmidene. Rekombinante teknikker omfatter innsetting av spesifikke DNA-sekvenser i en DNA-bærer (vektor) for å lage et rekombinant DNA-molekyl som er i stand til å replikere i en vertscelle. Den innsatte DNA-sekvensen kan være formet til den mottakende DNA-bærer, dvs. den innsatte DNA-sekvensen og DNA-vektoren stammer fra organismer
 30 som ikke utbytter genetisk informasjon i naturen, eller den innsatte DNA-sekvensen kan bli helt eller delvis laget syntetisk. Flere generelle fremgangsmåter har blitt utviklet som tillater konstruksjon av rekombinante DNA-molekyler.

Uavhengig av fremgangsmåtene som benyttes for konstruksjon, må det rekombinante DNA-molekylet være forenlig med vertscellen, dvs. istand til autonom replikasjon i vertscellen eller stabilt integrert inn i ett eller flere av vertscellens kromosomer eller plasmider. Det rekombinante DNA-molekylet skulle fortrinnsvis
 5 også ha en markørfunksjon som tillater seleksjonen av det ønskete rekombinante DNA-molekyl(ene). I tillegg, hvis alle de riktige replikasjons-, transkripsjons- og translasjonssignalene blir riktig arrangert på den rekombinante vektoren, vil det fremmede genet bli riktig uttrykt i, f.eks., de transformerte bakteriecellene, i tilfelle med bakterielle ekspresjonsplasmider, eller i permissive cellelinjer eller verter som er
 10 infisert med et rekombinant virus eller som bærer et rekombinant plasmid som har det passende startsted for replikasjon.

Forskjellige genetiske signaler og prosesseringshendelser kontrollerer nivået for genekspresjon slik som DNA-transkripsjon og budbringer-RNA (mRNA) translasjon. Transkripsjon av DNA er avhengig av nærværet av en promotor, som er en DNA-
 15 sekvens som dirigerer bindingen av RNA-polymerasen og derved fremmer mRNA-syntese. DNA-sekvensen i eukaryote promotorer avviker fra de i prokaryote promotorer. Videre kan eukaryote promotorer og etterfølgende genetiske signaler ikke bli gjenkjent i eller kan ikke fungere i et prokaryot system, og videre, prokaryote promotorer er ikke gjenkjent og fungerer ikke i eukaryote celler.

På samme måte, translasjon av mRNA i prokaryote avhenger av nærvær av de
 20 riktige prokaryote signalene, som varierer fra de i eukaryoter. Effektiv translasjon av mRNA i prokaryote krever et ribosomalt bindingssete kalt Shine-Dalgarno (S/D)-sekvensen (J. Shine og L. Dalgarno, Nature, 254:34-38 (1975)) på mRNA. Denne sekvens er en kort nukleotidsekvens i mRNA som er lokalisert foran startkodon, vanligvis AUG, som koder for den aminoterminal (formyl-) metionin i proteinet.
 25 S/D-sekvensene er komplementære til 3'-enden av 16S rRNA (ribosomalt RNA), og gir vanligvis binding av mRNA til ribosomer ved å dupleksbinde til rRNA for å tillate riktig posisjonering av ribosomet.

Vellykket ekspresjon av et klonet gen krever tilstrekkelig transkripsjon av DNA,
 30 translasjon av mRNA og i visse tilfeller posttranslasjonell modifikasjon av proteinet. Ekspresjonsvektorer har blitt benyttet for å uttrykke gener under kontroll av en aktiv

promotor i en passende vert, og for å øke proteinproduksjonen.

Forskjellige regulatoriske ekspresjonselementer kan bli benyttet, som er et av flere passende transkripsjons- og translasjonselementer som er aktive i bakterier. F.eks., promotorer som kan bli benyttet for å dirigere ekspresjonen av de rekombinante gensekvensene omfatter, men er ikke begrenset til, laktoseoperonpromotoren i *E. coli*, hybrid *trp-lac* UV-5 promotoren (*lac*) (H. DeBoer et al., In *Promoter Structure and Function*, (1982); R.L. Rodriguez og M.J. Champerlain, red., Praeger Publishing, New York), de venstrerettede (PL) og de høyrerettede (PR) promotorene i bakteriofag lambda, bakteriofag T7-promotorer, *trp* operonpromotoren, *lpp*-promotoren (*E. coli* lipoprotein genpromotor; K. Nakamura og I. Inouye, *Cell*, 18:1109-1117 (1979), etc. Andre promotorer laget ved hjelp av rekombinant DNA eller syntetiske fremgangsmåter kan også bli benyttet for å gi transkripsjon av de innsatte sekvensene.

Spesifikke startsignaler er også krevet for effektiv translasjon av innsatte proteinkodende sekvenser. Disse signalene omfatter ATG-startkodon og tilstøtende sekvenser. I tilfeller hvor de naturlige gensekvensene som koder for sitt eget startkodon og tilstøtende sekvenser er innsatt i de riktige ekspresjonsvektorene, er ingen ytterligere translasjons kontrollsignaler nødvendige. Imidlertid, i tilfeller hvor naturlige translasjonssignaler ikke er tilstede, må eksogene translasjons kontrollsignaler, inklusive ATG startkodon, bli gitt. Startkodonet må videre bli i fase med leserammen til de proteinkodende sekvensene for å sikre translasjon av hele innskuddet. Disse ytre tilførte translasjons kontrollsignaler og startkodoner kan være av en rekke typer, både naturlige og syntetiske.

Fremgangsmåte for å lage de passende ekspresjonsvektorene kan omfatte *in vitro* rekombinant DNA og syntetiske fremgangsmåter og *in vivo* rekombinasjoner (genetisk rekombinasjon).

For oversikt med hensyn på maksimal genekspresjon, se Roberts og Lauer, *Meth. Enzymol.* 68:473 (1979); og W. Reznikoff og M. Gold, *Maximizing Gene Expression*, Plenum Press, New York (1986).

US-patent nr. 4 237 224 til Cohen og Boyer beskriver produksjon av rekombinante plasmider ved bruk av fremgangsmåter for spalting med restriksjonsenzymer og sammenbinding med DNA-ligase ved hjelp av kjente fremgangsmåter for ligering.

Disse rekombinante plasmidene blir så innført ved hjelp av transformasjon og replikert i encellekulturer inklusive prokaryote organismer og eukaryote celler dyrket i vevs-kultur.

En annen fremgangsmåte for å innføre rekombinante DNA-molekyler i uni-cellulære organismer er beskrevet av Collins og Hohn i US-patent nr. 4 304 863. Denne fremgangsmåte benytter et pakke/transduksjonssystem med bakteriofage vektorer (kosmider).

Ekspresjonsvektoren som omfatter den rekombinante genssekvensen skulle så bli overført inn i en bakterie vertscelle hvor den kan replikere og bli uttrykt eller undergå betinget replikasjon. Dette kan bli utført ved hjelp av en rekke metoder kjent i feltet inklusive, men ikke begrenset til, transformasjon (f.eks. av isolert plasmid-DNA i den svekkede bakterielle vert), fagtransduksjon (Schmeiger, Mol. Gen. Genetics, 119:75 (1972)), konjugering mellom bakterievertsarter, elektroporering osv.

15 Produksjon i svekkede invasive bakterier

I en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse blir ekspresjonsvektoren som består av *purA*-genet overført til en svekket invasiv bakterie, hvor den er uttrykt, og således fremkommer en bakteriestamme som er passende for bruk som levende vaksine.

En av en rekke svekkede invasive bakterier kan bli benyttet som bærer for å produsere det rekombinante gen(ene) slik at det heterogene antigen blir effektivt presentert for vertens immunsystem, i form av vaksineformuleringer fra den foreliggende oppfinnelsen. Bakterien beholder sine invasive egenskaper, men taper en stor del av sine virulente egenskaper, og gjør det mulig for dem å dele seg i verten i et begrenset omfang, men ikke så meget at det forårsaker nevneverdig sykdom eller ulempe. Eksempler på invasive bakterier som i svekket form kan bli benyttet i vaksineformuleringer i oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til, *Salmonella* spp., invasiv *E. coli* (EIEC), og *Shigella* spp. I en foretrukket utførelsesform blir invasive bakterier som befinner seg i lymfoid vev slik som milten (f.eks. *Salmonella* spp) benyttet. Slike bakterier kan invadere tarmepitelvev og/eller Peyerske plakk og spre seg gjennom det retikuloendoteliale system, og få tilgang til mesenterielt lymfatisk

vev, lever og milt, hvor de deler seg eller kan minst overleve for en tid, og sette igang humoral og celle-formidlet immunitet.

Svekkede invasive bakterier kan bli oppnådd via forskjellige fremgangsmåter inklusive, men ikke begrenset til, kjemisk mutagenese, genetisk innsetting, delesjon (J. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) eller rekombinant DNA-metodologi (T. Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), laboratorieseleksjon blant naturlige mutasjoner etc. Fremgangsmåter for å oppnå svekkede *Salmonella*-stammer som er ikke-reverserende ikke-virulente auxotrofie mutanter som passer for bruk som levende vaksine blir beskrevet i US-patent nr. 4 550 081 (utstedt 29. oktober 1985), 4 735 801 (utstedt 5. april 1988) og 4 837 151 (utstedt 6. juni 1989), informasjonen fra disse er herved i sin helhet inntatt som referanse. En pålitelig fremgangsmåte for å oppnå svekkelse av *Salmonella* er blitt beskrevet (S.K. Hoiseth og B.A.D. Stocker, Nature, 291:238 (1981); B.A.D. Stocker et al., Develop. Biol. Standard, 53:47 (1982)) og kan bli benyttet som en spesiell utførelsesform innenfor oppfinnelsen.

Svekkede *Salmonella* som kan bli benyttet i levende vaksineformuleringer innenfor oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til de arter som er oppført i tabell 1 nedenfor.

Tabell 1

Salmonella-arter som, i svekket tilstand, kan bli benyttet i vaksineformuleringer innenfor den foreliggende oppfinnelse*

S. typhi

S. typhimurium

S. paratyphi A

S. paratyphi B

S. enteritidis

(f.eks. serotype dublin)

* For en fullstendig beskrivelse av *Salmonella*-serotypene, se Edward og Ewing, 1986, Classification of the Enterobacteriaceae, 4. utg., Elsevier, N.Y.

I spesifikke utførelsesformer har *Salmonella*-bakterier som er blitt svekket ved kromosomal delelesjon av gen(er) for biosyntese av aromatiske forbindelser (*aro*), eller mutasjon i *galE*-genet, eller som er *Cya*-, *Crp*- eller mangler *Vir*-plasmidet, etc., kan bli benyttet. *Aro*-mutanter som kan bli benyttet omfatter, men er ikke begrenset til, *S.* *typhi*-stammene 543Ty og 541Ty, for bruk i vaksiner for humane, *S. typhimurium* SL3261 og SL1479, og *S. enteritidis* serotype dublin SL1438 (også betegnet *S. dublin*) for bruk i dyr (se US-patent nr. 4 550 081 for beskrivelse av *S. typhimurium*-stammer slik som 543Ty og 541Ty som er avirulente i mennesker på grunn av svekkelse ved å fjerne affiserte gener *aroA* og/eller *purA* (M.M. Levine et al., J. Clin. Invest. 79:888 (1987)). Mutanter av *S. dublin*, slik som SL1438 og *S. typhimurium*, slik som SL3261. Disse kan bli benyttet i utvikling av dyremodellsystemet, siden disse artene er i stand til å forårsake dyresykdommer som er ekvivalente til tyfoidfeber. *galE*-mutanter som kan benyttes omfatter, men er ikke begrenset til, *Salmonella typhi*-stammene Ty21a (Germanier, *Bacteria Vaccines*, Academic Press, NY, s. 137-165) *Salmonella typhimurium* G30D, osv.

Produksjon av genprodukter og anvendelser

Oppfinnelsen omhandler også fremgangsmåter for å innføre, selekttere og vedlikeholde enkle eller multiple kopier for homologe og/eller heterogene gener, enten i lavkopi tallplasmider, høykopi tallplasmider eller integrert i vertens bakterielle kromosom som enkle eller multiple kopier.

Gener som kan uttrykkes kan bli oppnådd fra eukaryote kilder og kan kode for antigene determinanter fra patogene parasitter, humane immunoaktive peptider og proteiner, hormoner, vekstfaktorer, allergener, tumorforbundne antigener og andre proteiner. Slike gener kan stamme fra virale kilder og kan kode for antigene proteiner, strukturelle komponenter eller enzymer som er av betydning for viral replikasjon eller forankring. Homologe gener, såvel som hetero gener, kan stamme fra bakterielle, virale, parasitter, sopp eller pattedyrkilder og kan omfatte gener som koder for virulensfaktorer til patogene organismer, inklusive toksiner, beskyttende immunogene proteiner eller gener som koder for proteiner som har mer regulering eller syntese av antigene polysakkarider og, i tillegg, kan være enzymer som er fremmede for verts-bakterien.

Blant de bakterielle antigenene av interesse er de som er tilknyttet humane bakterielle patogener inklusive *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Branhamella catarrhalis*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Chlamydia trachomatis*,
 5 *Neisseria gonorrhea*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Straphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* og *Clostridium tetani*. Eksempler på spesifikke bakterielle antigener av interesse omfatter bakterielle proteiner der spesielt nyttige eksempler er yttermembranproteiner (f.eks. fra *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis* eller *Neisseria meningitidis*), bakterielle toksiner (f.eks. pertussis-toksiner, difteritoksin, tetanustoksin og *Pseudomonas* exotoxin A) og bakterielle overflate-
 10 proteiner (f.eks. flagelliner, hemagglutinin og M-proteinet fra *Streptococcus pyogenes*).

Virale antigener fra patogene virus omfatter, men er ikke begrenset til human immunmangelvirus (typene I og II), human T-celle leukemivirus (typene I, II og III),
 15 respiratorisk syncytialt virus, hepatitt A, hepatitt B, hepatitt C, non-A og non-B hepatittvirus, herpes simplex-virus (typene I og II), cytomegalovirus, influensavirus, parainfluenzavirus, poliovirus, rotavirus, coronavirus, rubellavirus, meslingvirus, varicellavirus, Epstein Barr-virus, adenovirus, papillomavirus og gulfebervirus.

Flere spesifikke virale antigener fra disse patogene virus omfatter F-proteinet
 20 (spesielt antigener som inneholder F-peptidet 283-315, beskrevet i WO89/02935 med tittel "Respiratorisk syncytialt virus: Vaksiner og diagnostiske metoder" av Paradiso, P. et al.) og N- og G-proteiner fra respiratorisk syncytialt virus (RSV), VP4 (tidligere kjent som VP3), VP6 og VP7 polypeptider fra rotavirus, kapselglykoproteiner fra human immunmangelvirus og ytre og nær overflateantigener av hepatitt B og herpes
 25 glykoproteinene B og D.

Soppantigen som kan bli benyttet er de som stammer fra sopp inklusive, men ikke begrenset til, *Candida* spp. (spesielt *albicans*), *Cryptococcus* spp. (*Cryptococcus* spp. (spesielt *neoformans*), *Blastomyces* spp. (f.eks. *dermatitidis*), *Histoplasma* spp. (spesielt *capsulatum*), *Coccidioides* spp. (spesielt *immitis*), *Paracoccidioides* spp. (spesielt *brasiliensis*) og *Aspergillus* spp. Eksempler på parasittantigener omfatter, men
 30 er ikke begrenset til, *Plasmodium* spp., *Eimeria* spp., *Schistosoma* spp., *Trypanosoma*

spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp., *Cryptosporidia* spp., *Toxoplasma* spp. og *Pneumocystis* spp.

Også av interesse er forskjellige antigener forbundet med autoimmun-sykdommer, slik som reumatoid artritt og lupus erythematosus, tumorantigener, cancer-
5 ntigener og enkle eller multiple kopier av gener som koder for hormoner, bioaktive peptider, cytokiner, lymfokiner og vekstfaktorer, så vel som enzymer og strukturelle proteiner av prokaryot eller eukaryot opprinnelse, spesielt for bruk i vaksiner eller legemidler.

For å gi nye vaksineformuleringer, kan gener som koder for beskyttelses-
10 ntigener bli innført i svekkede bakterier, som virker som avleveringsbærere for stimulering av immunsvaret mot patogenet fra hvilke det uttrykte genet stammer. Se Dougan og Tite, *Seminars in Virology* 1:29 (1990). Gener som koder for antigener som stammer fra patogene bakterier, virus eller parasittkilder kan bli innført i svekkede *Salmonella typhi* for bruk som levende vaksiner i mennesker, for å beskytte mot f.eks.
15 tyfoidfeber, diaré-sykdommer og seksuelt overførte sykdommer inklusive AIDS. Alternativt kan slike gener bli innført i andre *Salmonella* som er istand til å infisere dyrearter, f.eks. *S. dublin* for bruk som levende svekkede kvegvaksiner (f.eks. mot shippingfeber eller storfe rotavirus), *S. choleraesuis* for bruk som levende svekkede vaksiner for gris og *S. gallinarum* eller *S. pullorum* for bruk som levende svekkede
20 vaksiner for hønseoppdrett. I en spesiell utførelsesform kan antigener som stammer fra *Eimeria*-parasitter bli innført i svekkede *S. gallinarum* for å lage en oral vaksine for coccidial sykdom.

Alternativt kan gener som koder for antigener bli innført i andre bakterier for bruk som levende vaksineavleveringsbærere. Eksempler på slike kan omfatte
25 enteroinvasive *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter jejuni* og *Vibrio cholerae*.

I tillegg kan slike gener bli innført i bakterieverter for å gi effektiv produksjon av antigenmateriale for vaksineproduksjon. Produksjon av naturlige eller muterte gener som stammer fra bakterielle patogener kan føre til øket og effektiv antigen-
30 produksjon. F.eks., genene som koder for muterte toksiner, gener som koder for virulensfaktorer eller andre naturlige proteiner eller muterte beskyttelsesimmunogener

kan bli innført i homologe eller heterologe bakterielle stammer. I mange tilfeller kan virulensfaktorer eller beskyttelsesantigener bli laget effektivt bare i en spesiell vertsbakterie. I tillegg, gener som koder for produkter som har betydning i kompliserte biosyntetiske reaksjonsveier som fører til bakteriell overflatepolysakkarid eller kapselproduksjon kan ikke bli klonet på enkel måte og produsert i andre bakterier med formål å lage antigen materiale for vaksinebruk. Eksempler på slike anvendelser omfatter innføring av gener som koder for muterte kryssreagerende toksiner fra *Bordetella pertussis* i toksindefekte organismer for å produsere en kikhostevaksine.

Bakterier som har de stabile *purA*-plasmidene fra denne oppfinnelse kan bli benyttet som levende vaksine for å utløse et immunsvare overfor et immunogen i et varmblodig dyr. Denne fremgangsmåte omfatter tilførsel av levende vaksine til dyret, slik at bakterien som er i vaksinesammensetningen kan produsere immunogenet i en immunologisk effektiv mengde som er istand til å utløse et immunsvare. Vaksinene er anvendbare for å forhindre mikrobielle infeksjoner. Vaksinene kan bli tilført i en farmasøytisk akseptbar bærer, slik som fysiologisk saltvann, eller etanolpolyoler (slik som glycerol eller propylenglycerol).

Vaksinene kan bli tilført til menneske eller dyr på en rekke måter. Disse omfatter intradermal, transdermal, intramuskulær, intraperitoneal, intravenøs, subkutan, oral og intranasale veier for tilførsel. Mengden av levende svekkede bakterier som blir benyttet i en slik vaksine vil variere avhengig av naturen til antigenet som blir produsert. Justering og håndtering av etablerte doseområder er godt innenfor evnen til de som er erfarne i feltet. De levende vaksinene i den foreliggende oppfinnelse er ment for bruk i behandlingen av både unge og voksne varmblodige dyr, og spesielt i mennesker.

Det er typisk at vaksineopplegget krever tilførsel av antigen over en periode på uker eller måneder for å stimulere et "beskyttelse" immunsvare. Et beskyttende immunsvare er et immunsvare som er tilstrekkelig til å beskytte den immuniserte organisme fra produktiv infeksjon av en spesiell patogen eller patogener som vaksinen er rettet mot.

Oppfinnelsen vil bli videre illustrert ved hjelp av de følgende eksemplene:

EKSEMPLER

MATERIALER OG FREMGANGSMÅTER

5 Bakterielle stammer og plasmider

De bakterielle stammene og plasmider er beskrevet i tabell 2 nedenfor.

Tabell 2 Stammer benyttet i utvikling av stabile ekspresjonsplasmider for Salmonella vaksinstammer

10

Arter/stamme betegnelse	Genotype
<u>Escherichia coli</u>	
JM103	<i>supE thi Δ(lac-proAB)hsdR4/F' [traDproAB+lacI^q lacZm15</i>
TX595	<i>purA::mudlac T^r (amp^r)</i>
TX595 . λPB100	<i>purA::mudlac T^r (amp^r) λPB100 (cm^r)</i>
Salmonella-arter	
<u>S. typhimurium</u>	
SL5495	<i>zbf-908::Tn10 purAΔ155</i>
SL3261	<i>hisG46 aroADEL407</i>
SL3261 pur	<i>hisG46 aroADEL407 CRR[zbf-908::Tn10]Tc^S purAΔ155</i>
<u>S. dublin</u>	
SL5653	<i>SVA47 aroAΔ148 CRR[zbf-908::Tn10]Tc^S purAΔ155</i>
<u>S. typhi</u>	
CDC10-80	wild type
679Ty	<i>aroADEL148</i>
BB1333	<i>aroADEL148 aroDΔ9</i>
BB1354	<i>aroADEL148 aroDΔ9 CRR[zbf-908::Tn10]Tc^S purAΔ155</i>

15

Medium og vekst av bakterier

Bakterier ble dyrket i M9-medium supplert med 0,5% kasaminyrer, 0,2% glukose, 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ tiamin, 1 mM natriumcitrat, 5 $\mu\text{g/ml}$ nikotinsyre, 30 $\mu\text{g/ml}$ ver av fenylalanin, tyrosin og tryptofan, 10 $\mu\text{g/ml}$ 2,3-dihydroksybenzoesyre, 10 $\mu\text{g/ml}$ para-aminobenzoesyre og 1 $\mu\text{g/ml}$ adenin. Skåler som inneholder 15 g agar pr. liter. Ampicillin ble tilsatt i 100 $\mu\text{g/ml}$.

Genetisk transformasjon og transduksjon

Plasmider ble innført direkte i *Salmonella* ved hjelp av elektroporering med en BTX transfaktor 100 med 0,5 mm elektrode og en feltstyrke på 15 kV/cm.

Plasmidkonstruksjoner som er et resultat av kobling av syntetiske oligonukleotider inn i plasmider ble transformert inn i vanlige laboratoriestammer av *Escherichia coli* (for detaljer se Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)). Plasmidkonstruksjonene ble isolert og karakterisert først i *E. coli*, før de ble overført til *Salmonella* spp., på grunn av de høye transformasjonsfrekvensene til *E. coli* K-12 i forhold til de i *S. typhimurium*. Plasmidene ble overført til *S. typhimurium* LT-2 LB5010, en stamme som er restriksjons-negativ (men med modifikasjonsmuligheter) for tre restriksjonssystemer i *Salmonella typhimurium*, og også inneholder en mutasjon i *galE*, hvilket resulterer i høyere transformasjonsfrekvenser (for en beskrivelse av restriksjonssystemene til *Salmonella typhimurium*, se Bullas et al., J. Bacteriol. 141:275 (1980)).

Plasmider ble så satt inn i svekkede *Salmonella* ved hjelp av transformasjonsmetoder. LB5010 som inneholdt det ønskede plasmidet ble dyrket i Luria-medium (LB) til en tetthet på 3×10^8 celler/ml, på det punktet ble D-galaktose (i endelig konsentrasjon på 1%) tilsatt vekstmediet for å stimulere syntese av "glatt" lipopolysakkarid (LPS). Etter 1,5 timer med vekst i nærvær av D-galaktose, ble bakteriofag P22 HT 105/1 int tilsatt kulturen i et infeksjonsforhold 1:1. Etter absorpsjon av fagen, ble cellene immobilisert i LB som inneholdt 0,7% agar. Fag ble høstet og benyttet for å overføre plasmider inn i svekkede P22-svekkede *Salmonella*.

Elektrooverføringsfremgangsmåte for antigenpåvisning

Heterolog rekombinant proteinsyntese ble påvist i *E. coli* og *Salmonella* vaksinstamme vertsceller ved blottingsoverføring av proteinprøver separert ved hjelp av polyakrylamid gelelektroforese til nitrocellulosemembraner, blokkering med 1,5% Tween-20 i PBS, etterfulgt av antistoffbinding i 0,1% Tween-20. Bundet antistoff ble påvist med pepperrot-peroksidase merket protein A (Kirgegaard og Perry, Gaithersburg, MD). For påvisning av LT-B antigen, var det primære antistoffet geit α -LT-B polyklonal reagens, delvis renset ved å eluere bundet materiale fra en Sepharose 4B protein A affinitetskolonne.

Restriksjonsenzymanalyse

Horisontal gelelektroforese av DNA ble utført ved bruk av standard fremgangsmåter (Maniatis et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor, NY). Restriksjonsenzymene ble kjøpt fra Boehringer Manneheim (Indianapolis, IN) og New England Biolabs Inc. (Beverly, MA).

In vitro stabilitetstester

Stabilitetstester for plasmidinnholdende stammer ble utført ved bruk av fortynninger på 1:1000 fra over natts kulturer i M9-medium forsynt som beskrevet ovenfor. Fortynningene ble sådd ut i duplikater på selektive og ikke-selektive medium for å bestemme plasmidinnhold. I tillegg ble kolonier fra ikke-selektive skåler replikert ved bruk av FMC RepliPlate (Rockland, ME) på selektive skåler for å bekrefte plasmidretensjon.

Immunisering av mus

Inokulater ble dyrket i M9-medium supplert som beskrevet ovenfor til en tetthet på 3×10^8 organismer/ml som bestemt ved en Klett-Sommerson Colorimeter. Cellene ble bunnfelt ved 5000 rpm i 15 min. ved 4°C og resuspendert i 1,5% (vekt/volum) natriumbikarbonat til 2×10^{10} organismer/ml (Klett 100) for intragastrisk (mage-tilførsel) (i.g.) tilførsel og i fosfatbuffret saltvann pH 7,2 til 1×10^7 organismer/ml for intravenøs (i.v.) og intraperitoneal (i.p.) tilførsel. Seks uker gamle BALB/c hunnmus ble benyttet rutinemessig (Jackson Laboratories). Mat og vann ble tilbakeholdt i 4 timer før i.g.-inokulering og tilbakeført 30 minutter etter inokuleringen. 1×10^{10} organismer/ml (0,5 ml inokulum) ble tilført i.g. ved bruk av en Perfektum inkuberingsnål (10G x 2"). 1×10^6 organismer/ml (0,1 ml) ble benyttet for i.v.- og i.p.-tilførsler.

Prøvesamling

Mus ble avlivet på forskjellige tidspunkter etter tilførsel. Lever, milt og 3 Peyerske plakkområder ble fjernet fra hvert dyr, plassert i individuelle sterile poser og homogenisert i 30 sekunder med en Stomacher modell 80 blander (A.J. Seward, London) ved bruk av 5 ml PBS (pH 7,2) for hver leverprøve og 2 ml for hver milt og Peyerske plakkområdeprøve.

Bakteriell kolonidannelse og plasmidstabilitet

Organhomogenatene ble sådd ut på selektive og ikke-selektive M9-medium supplert som beskrevet ovenfor for å bestemme plasmidinnhold. Kolonier dyrket på ikke-selektive skåler ble replikert på SS-agar (Difco, Detroit, Michigan) og på selektive skåler for å bekrefte prosent plasmid-inneholdende kolonier.

RESULTATER

Komplementering av *purA* auxotrofi i *E. coli* og *Salmonella*

Produktet av *purA*-genet, adenylosuksinatsyntetase (EC 6.3.4.4) katalyserer syntesen av adenylosuksinat fra inosinmonofosfat (IMP). Dette enzym katalyserer det første bestemmende trinn i syntesen av adeninmonofosfat (AMP) og er også innblandet i redningsreaksjonsveier og omdannelsen av nukleotider. Mutanter av *E. coli* og andre nær relaterte tarmbakterier som mangler det strukturelle genet for adenylosuksinatsyntetase (*purA*) avhenger av eksogent adenin eller adenosin, forsynt i næringen, for vekst.

Genet for *E. coli purA* blir inneholdt i 3,2 kilobasepar KpnI restriksjons enzymfragment i plasmid pJS76 (S.A. Wolfe og J.M. Smith, "Nucleotide sequence and analysis of the *purA* gene encoding adenylosuccinate synthetase of *Escherichia coli* K12", J. Biol. Chem. 263:19147-19153 (1988)). For konstruksjon av plasmider som komplementerer enten *E. coli* eller *Salmonella purA* auxotrofer, ble plasmid pJS76 (oppnådd fra John M. Smith, Seattle Biomedical Research Institute) benyttet som kilde for *E. coli purA* genproduktet. Først ble *purA*-genet satt inn i pUC19 ved å ligere en butt ende 1,75 kilobasepar AccI-fragment med DraI-SmaI-fragment av pUC19, som vist på diagram i fig. 1. Plasmid pPX3001 ble gjenvunnet i *E. coli* TX595 ved å selektere for adenin-uavhengige kolonier. Denne første konstruksjonen, pPX3001, beholdt hovedsakelig starten for replikasjon i start-pUC-vektoren og erstattet β -laktamasegenet med *purA*, mens på den samme tid beholdt flere nyttige kloningsseter for videre modifikasjon av plasmidet. Dette plasmidet komplementerte effektivt *purA* gendefekter i *E. coli* TX595 og resulterte i et høyt kopitall plasmid fenotype karakteristisk for pUC-plasmider.

Plasmid pPX3001 ble videre modifisert til å inneholde ytterligere uttrykt genprodukt. Genet for den atoksiske subenheten i enterotoksigenisk *E. coli* labil toksin (LT-B) på en 600 basepar like-endet EcoRI-HindIII ble klonet inn i pPX3001 ved bruk av like-endet BamHI-sete, som vist i fig. 2. Denne plasmidkonstruksjon, pPX3003, ble

gjenvunnet ved å transformere *E. coli* TX595 og selektene adenin-uavhengige kloner som uttrykte protein gjenkjent på koloniblot ved polyklonal anti-LT-B antistoffer.

For å undersøke stabiliteten til *purA*-vektoren, ble plasmid pPX3001 og derivatet LT-B ekspresjonsplasmid pPX3001 transformert inn i *S. dublin* SL5653 eller
5 inn i *S. typhimurium* BB1231, derivater av *Salmonella* vaksinstammer som beholdt delesjonsmutasjoner i *purA*-genet. *Salmonella*-transformantene ble undersøkt for nærvær av antatte plasmider ved DNA-analyse, og i tilfelle med pPX3003, for ekspresjon av LT-B. Passende isolater av hver stamme ble undersøkt for nærvær av plasmid etter passasje *in vitro* under selektive og ikke-selektive betingelser. Som vist i
10 fig. 3 ble plasmidinnholdende kolonier først dyrket under selektive betingelser, dvs. i definert medium som manglet adenin, i over-natt kulturer. Prøver fra over-natt kulturer ble vasket og fortynnet i friskt medium enten med, eller uten adeninsupplering. Etter 10 vekstgenerasjoner ble kulturrene overført til samme friske medium. For hver 10. generasjons øking ble prøver tatt fra kulturrene, fortynnet og sådd ut på enten selektiv eller ikke-selektiv agarmedium. Delene av kolonier som var istand til å gro på ikke-supplert medium representerer delen av kulturpopulasjonen som inneholdt en *purA*-komplementerende plasmid. I ikke-supplert medium inneholdt 100% av koloniene *purA*-komplementerende plasmider, mens bare en liten prosent av de resulterende koloniene fra passasje under adeninsupplering (ikke-selektive betingelser) inneholder
15 plasmider etter 40 vekstgenerasjoner. Videre, i kulturer av SL5653 som inneholdt LT-B ekspresjonsplasmidet pPX3003, er LT-B produksjon og antigenisitet beholdt i kulturen som ble dyrket under selektive betingelser, men er tapt under ikke-selektive betingelser. Etter 40 generasjoner uttrykker hver av koloniene fra pPX3002/SL5653
20 dyrket under selektive betingelser på selektiv agar LT-B, hvilket antyder at segregering av *purA* og LT-B-ekspresjon ikke har funnet sted (se tabell 3 og fig. 4).
25

Tabell 3 Vedlikehold av medium og høykopi tallekspresjonsplasmider under dyrkning av Salmonella under selektive og ikke-selektive dyrkningsbetingelser

Plasmid- betegnelse	Avledet fra	Markør/ utr-gen	Verts- stamme	Seleksjons- betingelser	% plasmid inneholdende kolonier				
					Generasjoner av vekst				
					10	20	30	40	80
pUC8		Amp	SL3261	+ amp - amp	100 50	100 63	100 50	100 43	100 n.d
pPX100	pUC8	Amp/LT-B	SL3261	+ amp - amp	100 58	100 n.d	100 71	100 41	100 n.d
pPX1601	pBR322	Amp/CS-LT-B	SL3261	+ amp - amp	100 100	100 100	100 85	100 54	100 33
pPX3001	pUC8	purA	SL5653	+ ade - ade	100 92	100 46	100 11	100 4	100 n.d
pPX3003	pUC8	purA/LT-B	SL5653	- ade + ade	100 48	100 10	100 6	100 1	100 n.d

1. Plasmidinnhold ble bedømt ved å telle kolonier fra kulturfortynninger på medium med, og uten seleksjon; n.d = ikke bestemt.

Disse resultatene indikerer at det uttrykte *purA*-genet på høykopitall pUC-plasmidet fungerer til å stabilisere plasmider i fravær av utenfra tilført adenin. Skjønt *purA*-komplementering stabiliserer et LT-B ekspresjonsplasmid *in vitro*, er de bestemte plasmidene, pPX3001 og pPX3003, sannsynligvis ikke optimale for bruk i en levende *Salmonella*-vaksine, siden en kombinasjon av *purA* og/eller LT-B produksjon *per se* i sammenhengen ovenfor hindrer veksthastigheten til verts-*Salmonella*. I definert saltmedium (M9) som inneholder kasaminyr, har pPX3001/SL5653 og pPX3003/SL5653 en fordoblingstid på 1 time, mens SL5653 dyrket i det samme medium supplert med adenin har en doblingstid på omtrent 30 minutter. Skjønt vekstindringen ville føre til en videre svekkelse av bakterien etter oral tilførsel, er det også sannsynlig at nedsatt evne til å etablere en forbigående infeksjon i dyreverten ville resultere i nedsatt immunogenitet. Således, skjønt plasmider blir stabilisert ved komplimentering av kromosomal *purA*-delesjon, vil overproduksjon av kandidatantigenet øke svekkelsen av vaksinstammen.

Det er velkjent at høykopitall pUC vektorplasmider er stabile i *E. coli* og *Salmonella*-stammer. Den observerte ustabiliteten til *purA*-derivater av pUC-plasmidene er sannsynligvis på grunn av produksjon av høyt nivå av *purA* genproduktet (sett som et 40K dalton protein på SDS PAGE). Vektorene i den foreliggende oppfinnelse overvinner denne farlige overproduksjon av *purA*-genet ved en av to fremgangsmåter: Først ved bruk av lavkopitallplasmider for å redusere *purA* genkopitallet og derfor dens ekspresjon; og for det andre ved bruk av høykopitallplasmider som bærer et *purA*-gen som er lite effektivt uttrykt.

Lavkopitall ekspresjonsplasmider og integrerte uttrykte gener

Resultatene ovenfor antyder at genekspresjon som er laget for å være nøytral med hensyn til *in vivo* vekstegenskaper i en levende *Salmonella* vaksinstamme, kombinert med genetisk stabilitet, kunne gi en maksimal immunogen vaksinekonfigurasjon. Passende nivåer på genproduksjon kan stå i forhold til egenskapene til det uttrykte antigenet såvel som nivået som det blir uttrykt i, i *Salmonella* vaksinstammen. Flere faktorer som kan influere toleranse ovenfor den bakterielle vertsstammen til antigen ekspresjon omfatter intracellulær lokalisering av antigenet, nivået

på produksjon og stabilitet av antigenet vis a vis proteolytisk prosessering. Noen av disse faktorene kan til gjengjeld bli influert av transkripsjoelle og translasjonelle signaler slik som promotorstyrke, ribosom rekrutteringseffektivitet og genkopitall.

For å lage en situasjon hvor LT-B produksjon ble stabilisert av *purA*-komple-
 5 mentering og laget for å være nøytral med hensyn til *Salmonella* vaksinstamme-
 veksten, ble effekten av genkopitallet på LT-B-ekspresjon og toleranse av *Salmonella*-
 verten undersøkt. Dette ble undersøkt under flere betingelser, én av disse omfattet en
 lac-promotor kontrollert LT-B som var uttrykt på en lavkopitall plasmidvektor og én
 hvor LT-B ble uttrykt som en enkel kromosomal kopi.

10 For å konstruere et lavkopitall LT-B ekspresjonsplasmid, ble plasmid pGD103
 (R.A. Deich et al., (1988) J. Bacteriol. 170, 489-498), spaltet med EcoRI og HincII og
 et EcoRI-RsaI DNA-fragment som inneholdt hele den LT-B-kodende sekvensen ble
 kodet inn i vektoren for å gi pPX3005, en LT-B-produserende plasmid som også
 inneholdt en kanamycin-resistent determinant (se fig. 5). Plasmid pPX3005 ble
 15 transformert ved elektroporering inn i *S. typhimurium* SL3261. Veksten av SL3261
 som inneholdt pPX3005 ble sammenliknet med SL3261 som inneholdt utgangs-
 plasmidet og med SL3261 selv. I M9-medium som inneholdt 0,5% kasaminyre ble
 ingen forskjell i veksthastigheten observert mellom de tre stammene, hver hadde en
 doblingstid på omtrent 45 minutter. Dette resultatet antydte at produksjonsnivået til
 20 LT-B i denne konfigurasjonen var nøytral vis a vis vekstegenskapene til verten
 SL3261.

En kromosomal integrerende LT-B ble oppnådd på følgende måte: Et plasmid
 som inneholdt en 31 base invertert repetert sekvens som stammet fra de ytterste delene
 av Tn10 og uttrykte transposongen til Tn10 under kontroll av tac-promotoren
 25 lokalisert på utsiden av de inverterte repeterte sekvensene ble benyttet for å lage en
 transposon som produserte LT-B. Et 800 basepar HaeII-restriksjonsenzymfragment
 som hadde lac promotorregionen og det strukturelle genet for LT-B ble klonet inn i
 transposonvektoren, som også inneholdt en kanamycin-resistent determinant. I denne
 konfigurasjonen ble genet for LT-B og kanamycinresistens flankert av de inverterte
 30 repeterte sekvensene. For å lage en selvmordsvektor for bruk i *Salmonella*-stammer ble
 transposonet som bar LT-B og kanamycinet krysset inn i et derivat av λ gt11 slik at

hybridfagpartikkelen som bar LT-B-transposonet og Tn10-transposase ble konstruert. En full forklaring for denne fremgangsmåten kan bli funnet i US-serie nr. 07/590 364, innlevert 28. september 1990, denne informasjonen er herved inntatt ved referanse, og er lik de modifiserte transposonene beskrevet av Herrero *et al.*, J. Bacteriol. 172: 6537-67 (1990). Den modifiserte λ -fag som bærer LT-B-transposonet ble benyttet for å infisere *Salmonella* LB5010/F112, som bar en uttrykt λ -fagreseptor. Siden DNA i fag λ ikke replikerer *Salmonella*, vil kloner som er valgt for kanamycinresistens resultere fra transposisjon av det modifiserte transposon over på kromosomet. Flere uavhengige isolater ble oppnådd; alle produserte LT-B-antigenet. Flere av *S. typhimurium* LB5010-isolatene ble beholdt, og P22 faglysater ført videre på dem ble benyttet for å overføre den kromosomlokaliserende ekspresjonskassetten inn i *Salmonella* vaksinstammen SL3261 LT-B. To uavhengige SL3261 LT-B kromosomalt integrerte som resulterte fra transduksjon fra to separate alleler lokalisert i forskjellige loci i *Salmonella*-kromosomet, ble funnet å være stabile *in vitro* og *in vivo*.

Konstruksjon av en lavkopitall *purA*-vektor

Plasmid pGD103 ble modifisert til å inneholde *E. coli purA*-genet og flere enkeltstående kloningsseter. Det 1,7 kilobasepar *AccI*-fragmentet til pJS76 ble satt inn i *XmnI* *XhoI*-setene til pGD103 for å gi pPX3006 (se fig. 5). I dette plasmidet ble kanamycin-resistensdeterminanten erstattet helt med *purA*, hvilket ga en vektor med enkeltstående *BamHI*, *SmaI*, *PstI* og *Sall*-seter.

Lavkopitall *purA*-vektor som inneholder PL-promotor ekspresjonskassetter

Plasmid pPX3006 ble benyttet som vektor for å konstruere flere lavkopitall-plasmider som uttrykte genprodukter under kontroll av den sterke λ PL-promotoren. Det er ventet at visse genprodukter hvis transkripsjon er regulert av *P1*-promotoren vil bli laget i vertsbakteriecellen i høye nivåer sammenliknet med gener under kontroll av svakere promotorer slik som *lac*-promotoren. Videre, på grunn av at *Salmonella*-stammer er kjent for ikke å være lysogene for bakteriofag λ , vil ekspresjon av plasmidbåret PL-produserte proteiner være konstitutive. Sammen med stabilisering ved hjelp av komplementering av *purA*, vil slike konfigurasjoner muligens overkomme

lave nivåer av genekspresjon forbundet med lavt kopitall i vektorplasmidet, pPX3006 og vil øke immunogenisiteten av levende svekkede rekombinante *Salmonella*-stammer.

Flere versjoner av *Plasmodium berghei* cirkumsporosittprotein (CS) gen ble stabilisert i pPX3006. CS-genet er blitt nevnt som en av hovedimmunogenene av

5 malariasporosittkapselen og, som sådan, er en kandidat for subenhetbruk med tanke på en malariavaksine. Strukturene til flere CS-gener er blitt undersøkt, hvilket har vist at alle har en liknende totalstruktur. Den enkelte fremhevende evnen for hver er at de inneholder et sentralt repeterende peptid, hvilket består av opptil en tredjedel av proteinet. De repetererte områdene er immundominerende, siden hoveddelen av anti-

10 sporositt antistoffer er dirigert mot disse områdene. Skjønt antistoffene til de repetererte områdene er blitt nevnt å være innblandet i beskyttelse mot sporozittstadiet av malaria er antistoffer alene ikke tilstrekkelig for å oppnå beskyttelse mot sporozittinfeksjon. Det er sannsynlig at beskyttelse mot sporozittstadiet av malariaparasittene omfatter ikke bare en humoral respons, men også en sterk T-cellerespons. Mest sannsynlig

15 kreves aktivering av cytotoksiske T-lymfocytter som gjenkjenner deler av CS-proteinene og andre proteiner i den voksne sporozitten på overflaten til sporozitt-infiserte hepatocytter for beskyttelse. Således er vaksiner som er laget for å stimulere disse responsene spesifikt, og sammen med humorale responser, nødvendig for å oppnå effektive malariavaksiner. Stimulering av cellulær immunitet på nivå av cytotoksiske

20 T-celler kan bli oppnådd ved å fremvise antigenet til antigenpresenterende celler på en måte slik at de sannsynligvis blir prosessert ved hjelp av en intern prosesseringsvei. Presentering av antigener via interne reaksjonsveier kan resultere i en foretrukket overflateproduksjon av antigenet sammen med klasse-I-begrenset MHC, vanligvis forbundet med stimulering av CD8[±] cytotoksiske T-celler. Produksjon av CS-proteinene

25 av *P. berghei* og *P. falciparum* i svekkede *Salmonella* og deretter oral immunisering har resultert i aktivering av spesifikke CD⁺ cytotoksiske T-celler som gjenkjenner peptider for disse CS-proteinene. Videre, oral immunisering av mus med *P. berghei* CS-proteinkonstruksjoner resulterte i betydelig beskyttelse mot sporozittutfordring, hvilket vanligvis bare blir oppnådd ved vaksinerings av dyr med gammabestrålt

30 inaktiverede sporozitter.

Skjønt beskyttelse mot sporozoitinfeksjon er blitt vist ved vaksinerings med CS protein-produserende *Salmonella*, var beskyttelsen ufullstendig, hvilket antydte at adekvat induksjon av immunitet hadde ikke oppstått. Videre, dette antyder at faktorer som har med CS proteinproduksjon i den svekkede *Salmonella* vaksinstammen kan bli manipulert for øket immunogenisitet. Slike faktorer omfatter, som nevnt ovenfor, genregulerende signaler, antakelig påvirker dette nivået av proteinproduksjon, stabilitet av det uttrykte proteinet og genetisk stabilitet til det uttrykte proteinet. Hvis under forløpet av den forbigående infeksjon på grunn av den svekkede *Salmonella*, en betydelig del av de immuniserende bakteriene mister plasmidet på grunn av segregering, vil effektiv immunisering ikke opptre.

For å evaluere stabiliteten til CS proteinkonstruksjonene ved komplementering av *purA*, ble en full-lengde CS proteinkonstruksjon satt inn i BamHI-setet til pPX3006. Denne konstruksjon inneholder den hele kodende sekvensen til *P. berghei* (ANKA) CS proteingenet uttrykt fra PL-promotoren og ble betegnet pPX3009 (fig. 6). En annen konstruksjon som inneholdt en trunkert CS-protein (pPX1601) uttrykt fra P1-promotoren som et fusjonsprotein med de første 30 aminosyrene til LT-B ble satt inn i BamHI-setet til pPX3006. Denne konstruksjon inneholder en LT-B fusjonsprotein med en uttrykt del av CS-proteinet som mangler 60 aminosyrer av den N-terminale delen og 30 aminosyrer av den karboksylterminale delen. Denne konstruksjonen ble betegnet pPX3007 (fig. 6). Begge konstruksjonene ble transformert inn i *S. typhimurium* BB1231 ($\Delta purA$), for seleksjon for purinuavhengighet. Når ekspresjon ble sammenliknet med deres tilsvarende høyere kopitall utgangsplasmider (avledet fra pBR322), ble ingen forskjell i ekspresjonsnivåer i SL3261 observert, hvilket antydte at gen-ekspresjon ikke var koplet til genkopitall.

En tredje promotorkontrollert ekspresjonskassett ble undersøkt for stabilisering av *purA*-komplementering. Den kodende sekvensen for LT-B (på en 590 basepar EcoRI-HindIII-fragment, gjort like-endet ved bruk av Klenow-enzym) ble satt inn i HpaI-setet til pPL₁ (Pharmacia Molecular Biologicals, Piscataway, NJ) for å gi pPX1602. Den kodende sekvensen til LT-B, nå lokalisert på et 1,7 kilobasepar BamHI-fragment ble satt inn i BamHI-setet til pPX3006 for å gi pPX3010 (fig. 6).

Dette plasmidet ble transformert i BB1231. Ekspresjons av LT-B-antigenet ble sammenliknet på forskjellige punkter i vekstsyklus til *Salmonella* og ble sammenliknet med gen-integrerte former, høykopitall plasmidformer og lavkopitall plasmidformer.
 5 Maksimal genekspresjon ble sett i over natts kulturer av bakterien. Ekspresjonsnivået ble relatert til genkopitallet når ekspresjon av LT-B ble kontrollert av lac-promotoren. Produksjonen var størst i kulturer som inneholder pPX100, etterfulgt av pPX3005; med minst produksjon i kulturer av SL3261 Δ 3. Imidlertid, produksjon av LT-B fra pPX3010 gikk ut over de som ble observert i kulturer av pPX100, hvilket viste at sterk
 10 PL-promotor hadde overkommet genkopitall-effektene for produksjon av LT-B-antigen.

In vitro-stabilitet av lavkopitall og kromosomal integrerende ekspresjonskassetter

15 *S. typhimurium* SL3261-stammer med ekspresjonskassetter på pPB322, pUC eller pSC101-derivater ble sammenliknet for stabilitet ved dyrkning i fravær av seleksjon. Som vist i tabell 3 ble pUC vektorplasmidene eller ekspresjonsplasmidene basert på pUC-plasmider dramatisk ustabile når de ble dyrket *in vitro* uten ampicillin-
 20 seleksjon. Videre, et plasmid (pPX1601) som stammer fra pBR322 som uttrykte en forkortet *P. berghei* CS/LT-B-fusjonsprotein (beskrevet ovenfor) viste betydelig tap ved passasje av kulturene i fravær av ampicillin.

Når én av disse ekspresjonskassetene ble klonet inn i enten pGD103 eller dets *purA*-derivat (pPX3006) ble 100% tilbakeholdelse av ekspresjonsplasmidene observert
 25 for opptil 80 generasjoner. Dette resultatet indikerer at plasmidene basert på pSC101-replikon er iboende stabile i *S. typhimurium*. Videre, at *purA*-genet til *E. coli* er effektiv i å erstatte antibiotika-resistensdeterminanter som vanligvis er forbundet med kloningsplasmider (se tabell 4).

Tabell 4 Vedlikehold av lavkopiitalekspresjonsplasmider som inneholder parB under dyrkning av *Salmonella typhimurium* under selektive og ikke-selektive dyrkningsbetingelser

Plasmid- betegnelse	Avledet fra	Markør/ uttrykt gen	Verts- stamme	Seleksjons- betingelser	% plasmid inneholdende kolonier				
					Vekstgenerasjoner ¹				
					10	20	30	40	80
pGD103	pSC101	Kan	SL3261	+ kan - kan	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100
pPX3005	pGD103	Kan/LT-B	SL3261	+ kan - kan	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100
pPX3006	pGD103	purA/LT-B	SL3261pur	+ ade - ade	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100
pPX3007	pPX3006	purA/LT-B CS	SL3261pur	+ ade - ade	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100
pPX3009	pPX3006	purA/CS	SL3261pur	- ade + ade	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100
pPX3010	pPX3006	purA/LT-B	SL3261pur	- ade + ade	100 100	100 100	100 100	100 100	100 100

¹ 1. Plasmidinnhold ble bedømt ved å telle kolonier fra kulturfortynninger på medium med og uten seleksjon; n.d = ikke bestemt.

Plasmidvektorer som inneholder de deltagende områdene og funksjonene forbundet med pSC101 er stabile i *E.coli* og *Salmonella* under "sats-"kulturbetingelser. Skjønt par-regionen til pSC101 blir beholdt i pGD103 og *purA*-derivatene som er beskrevet her, kan fordelingsfunksjoner alene ikke være tilstrekkelig til å tillate effektiv plasmidstabilisering under fermentering av de rekombinante vaksinstammer under produksjon (Nilsson og Skogman 1986, *Biotechnology* 4:901-903). Plasmid-komplementering av en *purA* delesjonsmutasjon på kromosomet kombinert med retensjon av fordelingsfunksjonene tillater effektiv stabilisering under cellevekst, vekst under næringsbegrensende betingelser og under fermentering.

In vivo-stabilisering av *Salmonella typhimurium* vaksinstammer ved *purA*-komplementering

For å undersøke stabilisering av pSC101-plasmider ved *purA*-komplementering under vaksineringsbetingelser, ble mus immunisert oralt med SL3261, BB1231 (SL3261+*purA*) og pPX3006/BB1231. Organprøver ble tatt og undersøkt for nærvær av de immuniserende organismene opptil 30 dager etter oralt inntak av bakterien. Som det kan sees i fig. 7, kunne BB1231 bli dyrket fra prøvene i milt, lever og peyerske områder i meget lave nivåer bare to dager etter inokulering, mens SL3261 og komplementert BB1231 kunne bli gjenvunnet i vevsprøver i flere uker. Den komplementerte vaksinstammen ga *in vivo*-vekst som hadde karakteristika som var like, hvis ikke identiske, innenfor statistisk variasjon, med SL3261. Dette viser at *purA*-komplementering fører effektivt tilbake den kromosomale *purA*-delesjon til *pur*⁺-oppførsel og er effektivt nøytral overfor invasjon og bakterielle replikasjonsegenskaper i vaksinstammen.

Plasmidene basert på pSC101 blir også stabilisert *in vivo*. Som vist i tabell 5, til støtte for *in vitro* stabiliseringsresultatene, blir plasmidene basert på pSC101, hvorvidt de er ytterligere stabilisert ved *purA*-komplementering eller ikke, fullstendig stabile i organprøver som ble oppnådd opp til 29 dager etter inokulering. For disse dyrene som ble immunisert med LT-B ekspresjonsplasmidet, uttrykte alle isolatene som ble karakterisert til å inneholde plasmider, antigenet. En minoritet av organismene som ble gjenvunnet fra dyr immunisert med enten pUC-vektor eller pPX100 inneholdt plasmid, slik at ikke noe plasmidinneholdende organismer kunne bli dyrket fra organprøven 15

dager etter inokulering. I tillegg, de dyrene som mottok en genintegrert form av LT-B viste også 100% retensjon av produksjonen (av kanamycin-resistens og LT-B).

Tabell 5. Tilstedeværelse av plasmid-inneholdende *S. typhimurium* *aroA* i peyerske plakkområder.

Immuniserende bakterier, 10^9 p.o.	Dyr #	Dag 10			Dag 15			Dag 29		
		total	drugR	% med plasmid	total	drugR	% med plasmid	total	drugR	% med plasmid
pUC8/SL3261 (vektor-kontroll)	#1	2	2	100	1	1	100	0	0	na
	#2	0	0	na	0	0	na	6	0	0
	#3	1	1	100	158	3	2	0	0	na
pPX100/SL3261 (pUC LT-B)	#1	3	3	100	59	0	0	1	0	0
	#2	36	0	0	44	0	0	1	0	0
	#3	360	0	0	0	0	na	1	0	0
pGD103/SL3261 (pSC101-derived avledet vektor)	#1	612	612	100	0	0	na	8	8	100
	#2	370	370	100	103	103	100	0	0	100
	#3	456	456	100	102	102	100	8	8	100
pPX3005/SL3261 (pGD103 LT-B)	#1	600	600	100	40	40	100	1	1	100
	#2	218	218	100	31	31	100	0	0	na
	#3	436	436	100	30	30	100	0	0	na
3261Δ3 (LT-B integrant)	#1	28	28	100	18	18	100	1	1	100
	#2	300	300	100	43	43	100	1	1	100
	#3	480	480	100	29	29	100	1	1	100

Stabilisering av genekspresjon i *S. typhi* vaksinstammer

Skjønt *S. typhimurium* og *S. dublin*-svekkede stammer kan bli benyttet for å bedømme immunogenisiteten i dyremodeller eller kunne bli utviklet til rekombinante vaksiner for veterinærbruk, er de ikke ideelle for bruk i mennesker som enten tyfoid-febervaksineringsprogram eller som vektorer for å gi heterologe antigener til det humane immunsystemet. For å demonstrere nytten av *purA*-komplementering ble svekkede *S. typhi*, pPX3006 og pPX3001 transformert ved elektroporering inn i *aroA* *S. typhi*-kandidat BB1354 (679 Ty +*purA*). Nærvær av plasmid ble bekreftet og

produksjon av LT-B i pPX3010-transformanter ble bekreftet ved western blot-analyse. De to stammene ble undersøkt for vekstegenskaper: fordoblingstider for plasmid som inneholdt transformanter var lik de ikke-transformerte foreldre. De to plasmid-inneholdende stammene ble undersøkt for plasmidstabilitet *in vitro* ved passasje i fravær og nærvær av adenin. Begge plasmider var 100% stabile opptil 80 generasjoner med og uten seleksjon.

S. typhi-stammer 679Ty, BB1354 og pPX3006/BB1354 ble sammenliknet for evnen til å bestå i dype vev etter parenteral inokulering. *S. typhi* i sin naturlige tilstand er ikke patogen for mus og infiserer ikke mus oralt. Når pPX3006/BB1354 eller 679Ty (10^7 bakterier pr. dyr) ble benyttet for å inokulere mus, organismer gjenvunnet fra leveren og milt for opptil 10 dager etter inokulering. På den annen side, BB1354 (10^7 organismer pr. dyr) ble gjenvunnet bare i meget lave nivåer etter flere dager, hvilket viste begrenset evne for disse stammene å vokse i dyrevev. Videre, komplementering av den kromosomale *purA*-mangel med *purA*-genet på plasmid pPX3006 også komplementerer evnen av delesjonen til å vedvare i vev (se fig. 8).

In vivo- og *in vitro*-resultatene i *S. typhimurium* og *S. typhi aroA purA*-stammer viser klart evnen til plasmid-båret *purA*-gen i *E. coli* å komplementere kromosomale mangler i disse stammene. Mer betydningsfull er komplementering av *purA*-defekten på en lavkopistabil plasmidvektor nøytral til *in vivo*-vekstoppførsel av vaksinebakterien. Dette peker sterkt på at rekombinante bakterier som benytter *purA*-komplementering skulle tillate stabil produksjon av heterologe antigener som er verdifulle for oral inokulering.

***purA*-gen som en markør for kromosomal integrering**

For å lage flere fleksible måter å manipulere *E. coli purA*-genet, ble det 1,74 kilobasepar *AccI*-inneholdende fragmentet tilpasset forskjellige linkere for å inneholde symmetriske og enkeltstående restriksjonsseter. Én linker inneholdt et enkelt restriksjonssete *Sall*; *Sall*-bundet *purA*-genet ble klonet inn i *Sall*-setet til pUC18. Dette plasmidet ble deretter benyttet som en kilde for *purA*-genet flankert av de enkeltstående *Sall*-setene.

En modifisert transposon ble konstruert for å inneholde både *purA*-genet og LT-B

(PL-kontrollert) på den følgende måten. Fag λ 112 ble først konstruert ved subkloning av BamHI-fragmentet som inneholdt PL-promotoren og det LT-B strukturelle gen fra pPX1602 inn i et transposisjonsplasmid hvor de inverterte 31 repeterte sekvensene av Tn10 flankerte en kanamycin-resistens determinant. Det resulterende plasmid, betegnet

5 pPX1584, inneholdt LT-B og kanamycin-resistens flankert av inverterte repeterte sekvenser. Den transposerbare kassetten ble kryssset inn i et derivat av λ gt11 ved homolog rekombinasjon mellom endene til Tn10. Evnen av transposonet til å gi transposisjonshendelser ble bedømt ved transformasjon av LB5010/F112. Ekspresjon av LT-B ble bedømt i uavhengig isolat. SalI linkerbundet *E. coli* purA-genet ble

10 benyttet for å erstatte kanamycin-resistensdeterminanten til λ 112 ved direkte å subklone biten inn i XhoI-setet til λ 112 og selektert purA⁺-lysogener i *E. coli* TX595. Det modifiserte faget inneholder purA-gen og LT-B og blir benyttet for å transformere *S. typhimurium* LB5010 Δ purA/F112 eller *S. typhi* aroA Δ purA/F112 til purin-uavhengighet. Slike transduktanter opptrår alltid fra transposisjonen av purA og LT-B

15 til vilkårlige steder på *Salmonella*-kromosomet.

Stammedeponering

De følgende stammene ble deponert ved (ATCC) Rockville, Maryland, under reglene til Budapest Treaty:

20	Stamme	ATCC reg.nr.	Deponerings- dato
	<i>S. typhimurium</i> BB1231 (aroA purA)	55107	29. oktober 1990
	<i>S. typhimurium</i> pPX3005/BB1231	68451	29. oktober 1990
	<i>S. typhimurium</i> pPX3006/BB1231	68452	29. oktober 1990
25	<i>S. typhimurium</i> pPC3010/BB1231	68453	29. oktober 1990
	<i>S. typhimurium</i> pPX3009/BB1231	68612	3. mai 1991
	<i>S. typhi</i> BB1354	-----	3. mai 1991

De som er erfarne i feltet vil forstå, eller være istand til å forsikre seg om at ved

30 å ikke bruke annet enn rutineeksperimentering, kan mange tilsvarende deler i forhold til de spesifikke utførelsesformene av oppfinnelsen beskrevet her bli foretatt. Slike ekvivalenter er omfattet av de følgende krav:

Patentkrav

1. Plasmid eller fagvektor som ikke inneholder en antibiotisk resistens
5 determinant, karakterisert ved at den er blitt stabilisert ved innsetting av
DNA som inneholder purA-genet som koder for adenylosuksinatsyntetase, og at den er
et lavkopitallplasmidvektor, eller et høykopitallplasmid som inneholder et nedregulert
purA-gen, eventuelt at det/den ytterligere omfatter minst en annen nukleotidsekvens
som koder for et antigen eller fragment av dette.

10 2. Vektor ifølge krav 1, karakterisert ved at den ytterligere omfatter
minst en annen nukleotidsekvens som koder for et antigen eller fragment av dette.

3. Vektor ifølge krav 2, karakterisert ved at antigenet er et viralt antigen
15 valgt fra gruppen som består av human immunsviktvirus (typene I og II), human T
lymfocytvirus (typene I, II og III), respiratorisk syncytialt virus, hepatitt A, hepatitt B,
hepatitt C, non-A og non-B hepatittvirus, herpes simplex-virus (typene I og II),
cytomegalovirus, influensavirus, parainfluensavirus, poliovirus, rotavirus, coronavirus,
røde hunder-virus, meslingvirus, vannkoppe-virus, Epstein Barr-virus, adenovirus,
20 papillomavirus og gulfebervirus, et bakterielt antigen valgt fra gruppen som består av
Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Neisseria meningitidis, Streptococcus
pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Branhamella catarrhalis, Vibrio cholerae,
Corynebacterium diphtheriae, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhea,
Bordetella pertussis, Pseudomonas aeruginosa, Straphylococcus aureus, Klebsiella
25 pneumoniae og Clostridium tetani, sopp eller parasittantigen eller et varmblodig dyr
eller humanpatogen.

4. Plasmidvektor ifølge krav 1, karakterisert ved at den er en stabil
lavkopitall plasmidvektor valgt fra gruppen som består av pPX3005 (ATCC 68451),
30 pPX3006 (ATCC 68452), pPX3009 (ATCC 68612), pPX3010 (ATCC 68453) og
pPX3007.

5. Plasmid ifølge kravene 1-4, k a r a k t e r i s e r t ved at det omfatter et gen som koder for et antigen som er en epitop av et malaria cirkumsporozoittprotein, som uttrykkes som del av fusjonsproteinet, som omfatter cirkumsporozoittepitopen og B-underenheten til det varmeustabile enterotoksin til *E. coli* eller en del av dette protein
5 som kombinert med cirkumsporozoittepitopen lager et immunaktivt fusjonsprotein.
6. Plasmid eller vektor ifølge kravene 1-5, k a r a k t e r i s e r t v e d at det/den ytterligere omfatter et gen som koder et funksjonelt delingslocus for eksempel par B.
- 10 7. Vektor ifølge krav 1-6, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter i det minste ett annet gen som koder for et antigen eller fragment derav.
8. PurA-bakterievert, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder plasmidet eller vektoren ifølge ethvert av kravene 1-7.
- 15 9. PurA-svekket bakterie, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder et stabilt plasmid ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, som ikke inneholder et antibiotisk resistens locus, hvor plasmidet er en lavkopitallplasmidvektor eller et høykopitallplasmid som inneholder et nedregulert *purA*-gen og hvor plasmidet inneholder et
20 heterologt *purA*-gen som koder for adenylosuksinat-syntetase og minst ett annet gen som koder for et heterologt genprodukt.
10. Bakterie ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har en *purA*-kromosomal genmutasjon og eventuelt en kromosom mutasjon i ett eller flere gener
25 som er funksjonelle med hensyn til biosyntese av aromatiske forbindelser, eller galaktosemetabolisme.
11. Bakterie ifølge krav 9-10, k a r a k t e r i s e r t v e d at genproduktet er fra virus-, bakteriell-, sopp- eller parasitt-opprinnelse av et varmblodig eller human
30 patogen.

12. Bakterie ifølge krav 8-11, karakterisert ved at den er en enteroinvasiv (tarminvaderende) bakterie av slekten *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Vibrio* og *Campylobacter*.

5 13. Bakterie ifølge krav 8-12, karakterisert ved at den omfatter et gen som koder for et antigen som er en epitop av et malaria cirkumsporozoittprotein, som uttrykkes som del av fusjonsproteinet, som omfatter cirkumsporozoittepitopen og B-underenheten til det varmeustabile enterotoksin til *E. coli* eller en del av dette protein som kombinert med cirkumsporozoittepitopen lager et immunaktivt fusjonsprotein.

10 14. Bakterie ifølge krav 9-12, karakterisert ved at den ytterligere omfatter et funksjonelt delingslocus par B.

15 15. Bakterie ifølge krav 9-12, karakterisert ved at den ytterligere omfatter i det minste ett annet gen som koder for et antigen eller fragment derav.

16. Farmasøytisk preparat, karakterisert ved at den omfatter bakterien i ett av kravene 9-12, og en fysiologisk akseptabel bærer og eventuelt adjuvans.

20 17. Farmasøytisk preparat ifølge krav 16, karakterisert ved at det omfatter et gen som koder for et antigen som er en epitop av et malariacirkumsporozoittprotein, som uttrykkes som del av fusjonsproteinet, som omfatter cirkumsporozoittepitopen og B-underenheten til det varmeustabile enterotoksin til *E. coli* eller en del av dette protein som kombinert med cirkumsporozoittepitopen lager et immun-
25 aktivt fusjonsprotein.

18. Fremgangsmåte for å selektere og beholde bakterielle transformanter av interesse ved bruk av ikke-antibiotiske seleksjons-fremgangsmåter, karakterisert ved at den omfatter innsetting av en stabil *purA*-vektor ifølge
30 krav 1 inn i vertsbakterie som mangler *purA*-genet, og selektivt dyrke bakterien i adenin-manglende medium og selektere for *purA* plasmid-inneholdende bakterie-kolonier som vokser på det.

19. Fremgangsmåte ifølge krav 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter et funksjonelt delingslocus for eksempel par B.

20. Fremgangsmåte ifølge krav 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere
5 omfatter i det minste ett annet gen som koder for et antigen eller et fragment derav.

21. Plasmid eller fag som ikke inneholder en antibiotisk resistensdeterminant,
k a r a k t e r i s e r t v e d at plasmidet eller fagen bærer et *purA*-gen hvis innsetting i
en vertscelle kan selekteres ved dyrking av vertscellen i et medium som ikke trenger
10 purinsupplementering.

22. Fremgangsmåte for å selektere og opprettholde bakterielle transformanter av
interesse for anvendelse i en vaksine ved bruk av ikke-antibiotiske fremgangsmåter,
k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter innsetting av en stabil *purA*-
15 vektor ifølge krav 1 inn i vertsbakterie som mangler *purA*-genet ifølge ethvert av
kravene 8-15, og selektivt dyrke bakterien i adenin-manglende medium og selektere
for *purA*-plasmid-inneholdende bakteriekolonier som vokser på det.

0 1740 BASEPAR



TRANSKRIPSJON

purA GEN

Klenow-enzym + dNTP
Liger til pUC19 DraI SmaI

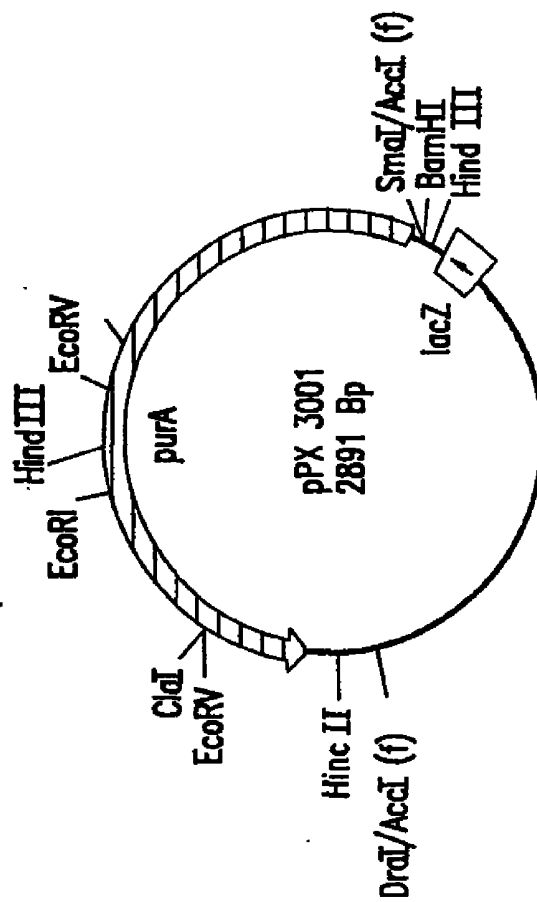
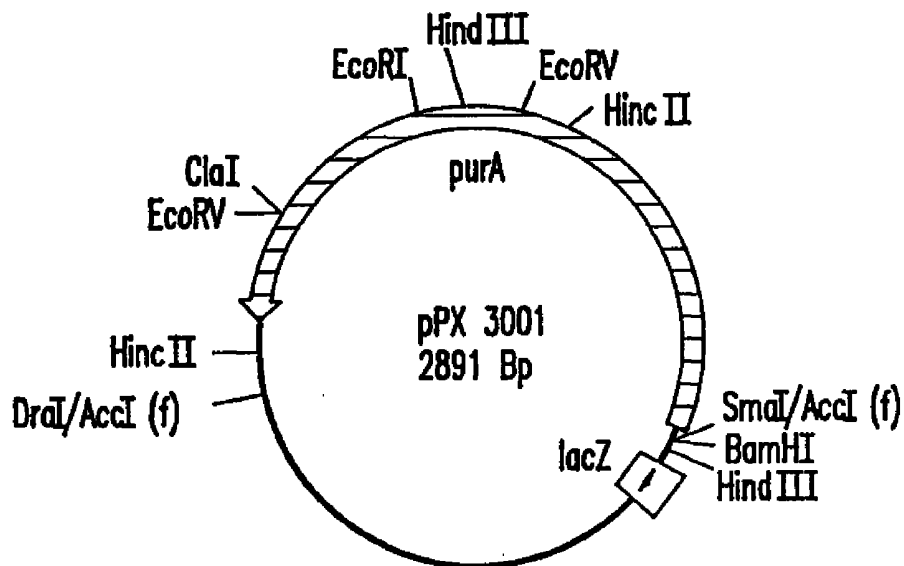


FIG.1

FIG.2



↓ Spalt med BamHI
 Behandle med Klenow + dNTP
 ↓ Liger med LT-B EcoRI-HindIII
 gjort like-endet med Klenow + dNTP

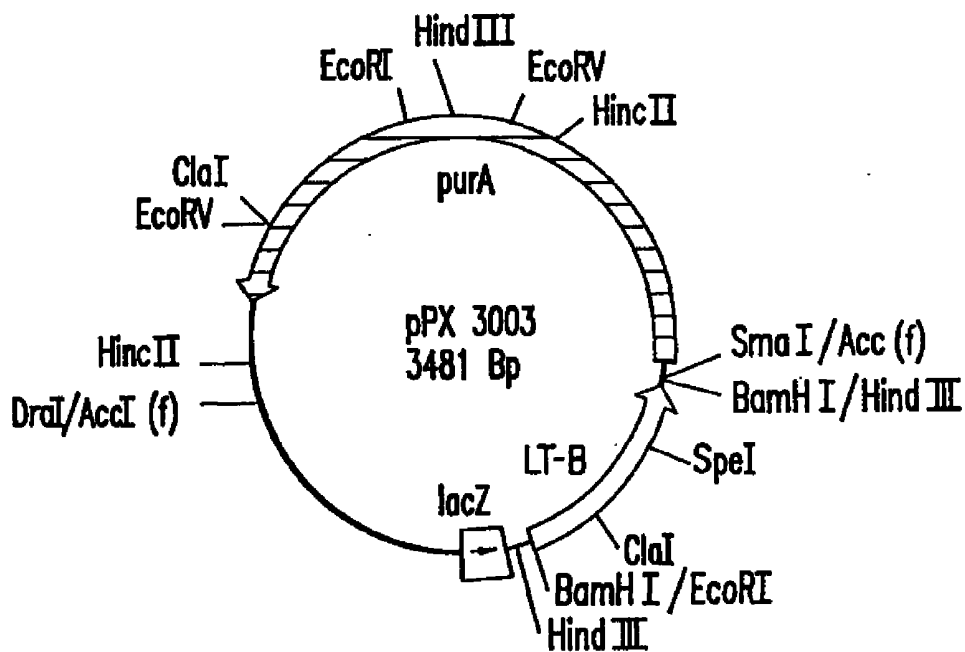


FIG.3

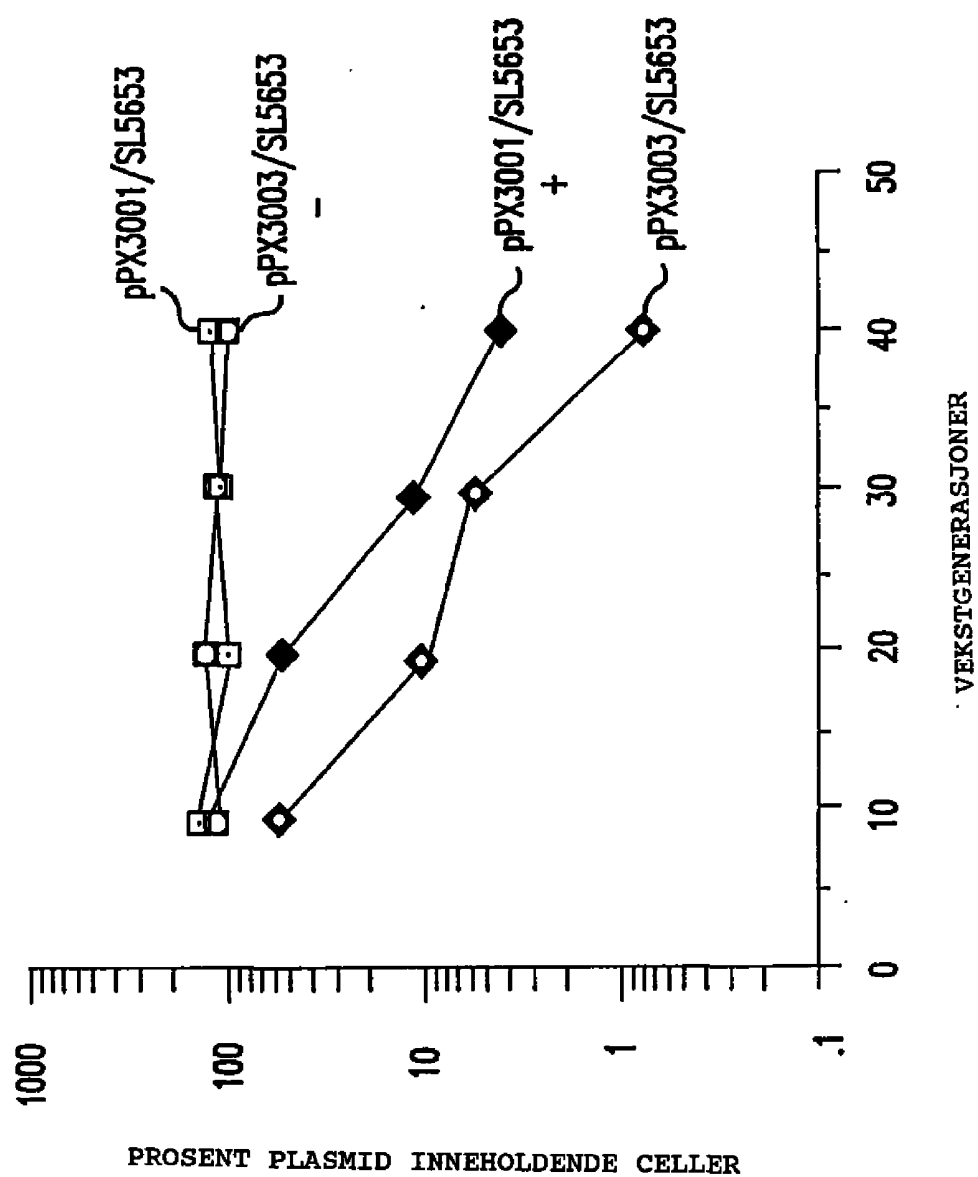


FIG. 4

SL5653/Ppx3003 VEDLIKEHOLDSSTUDIE

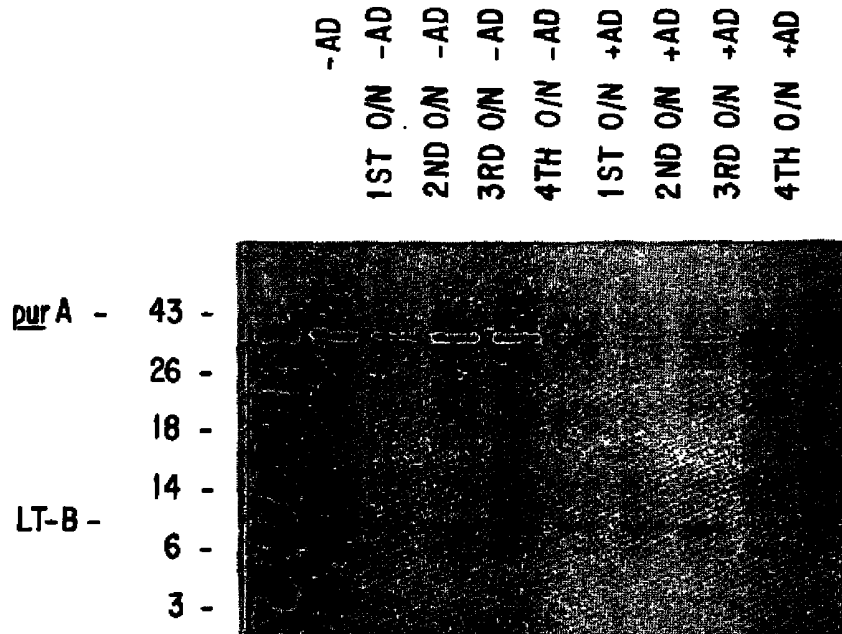


FIG. 4A

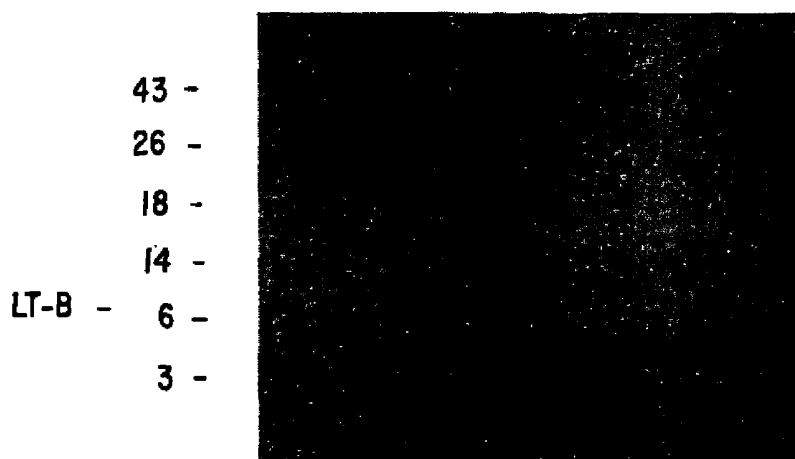


FIG. 4B

FIG.5

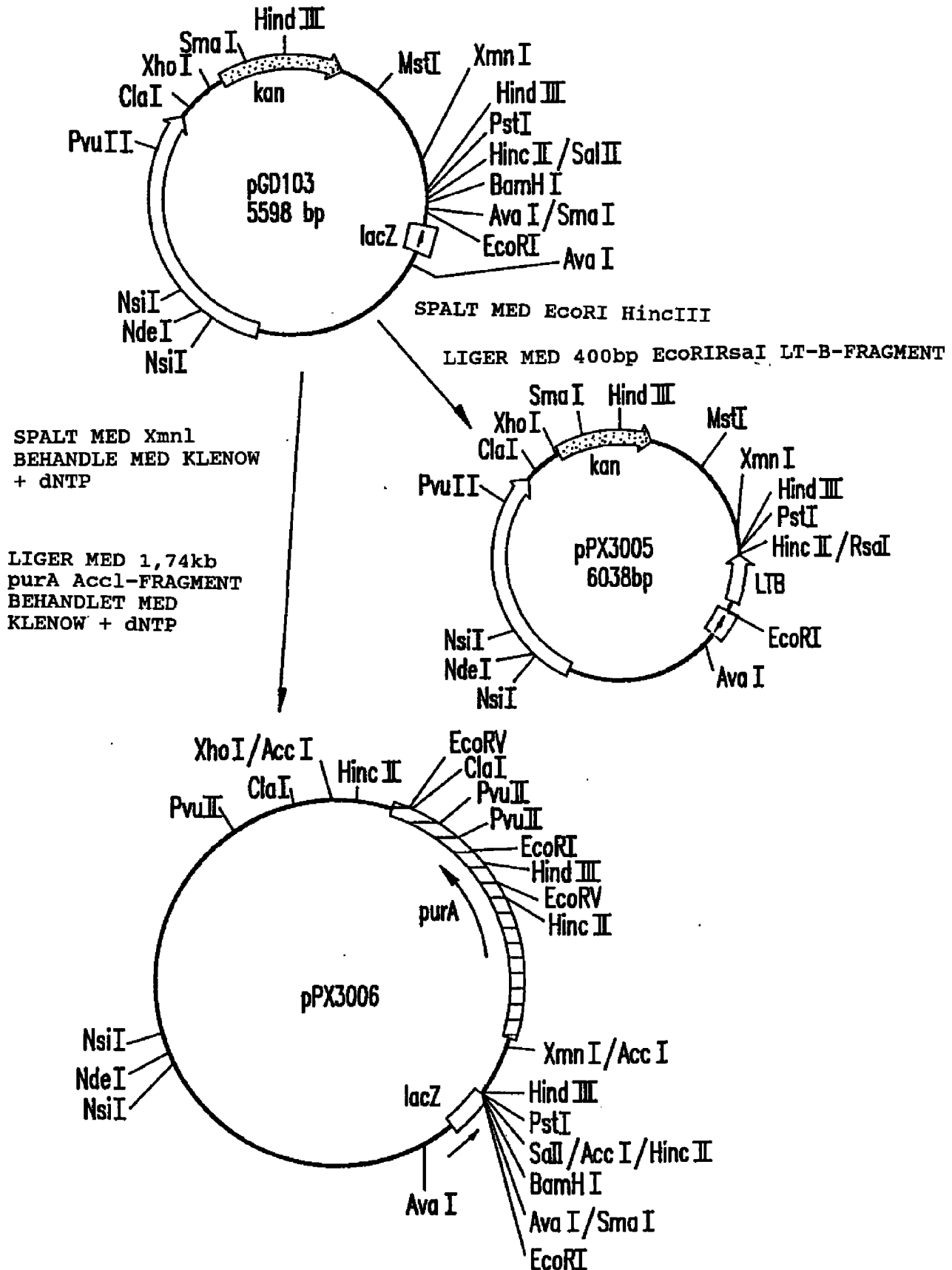


FIG. 6A

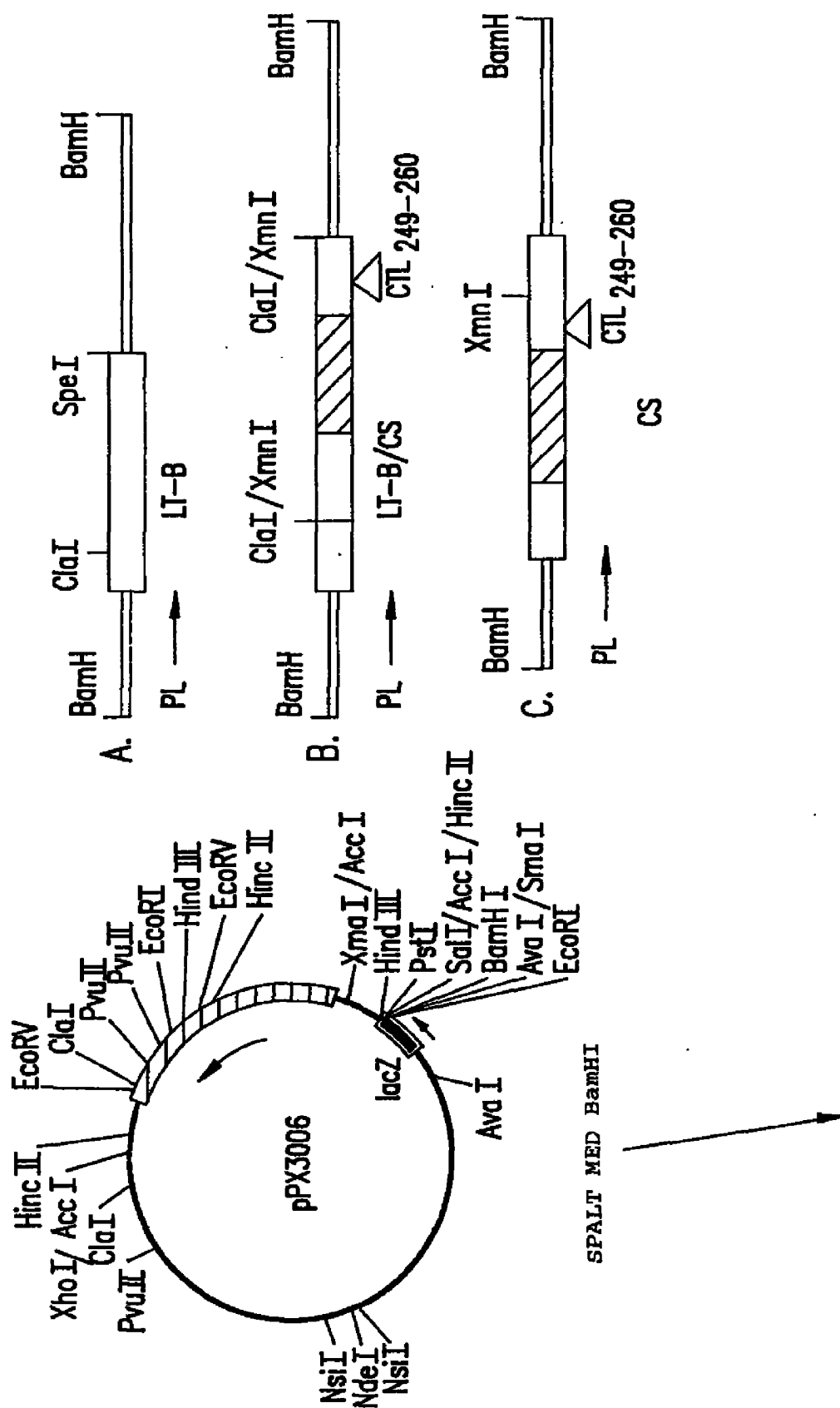
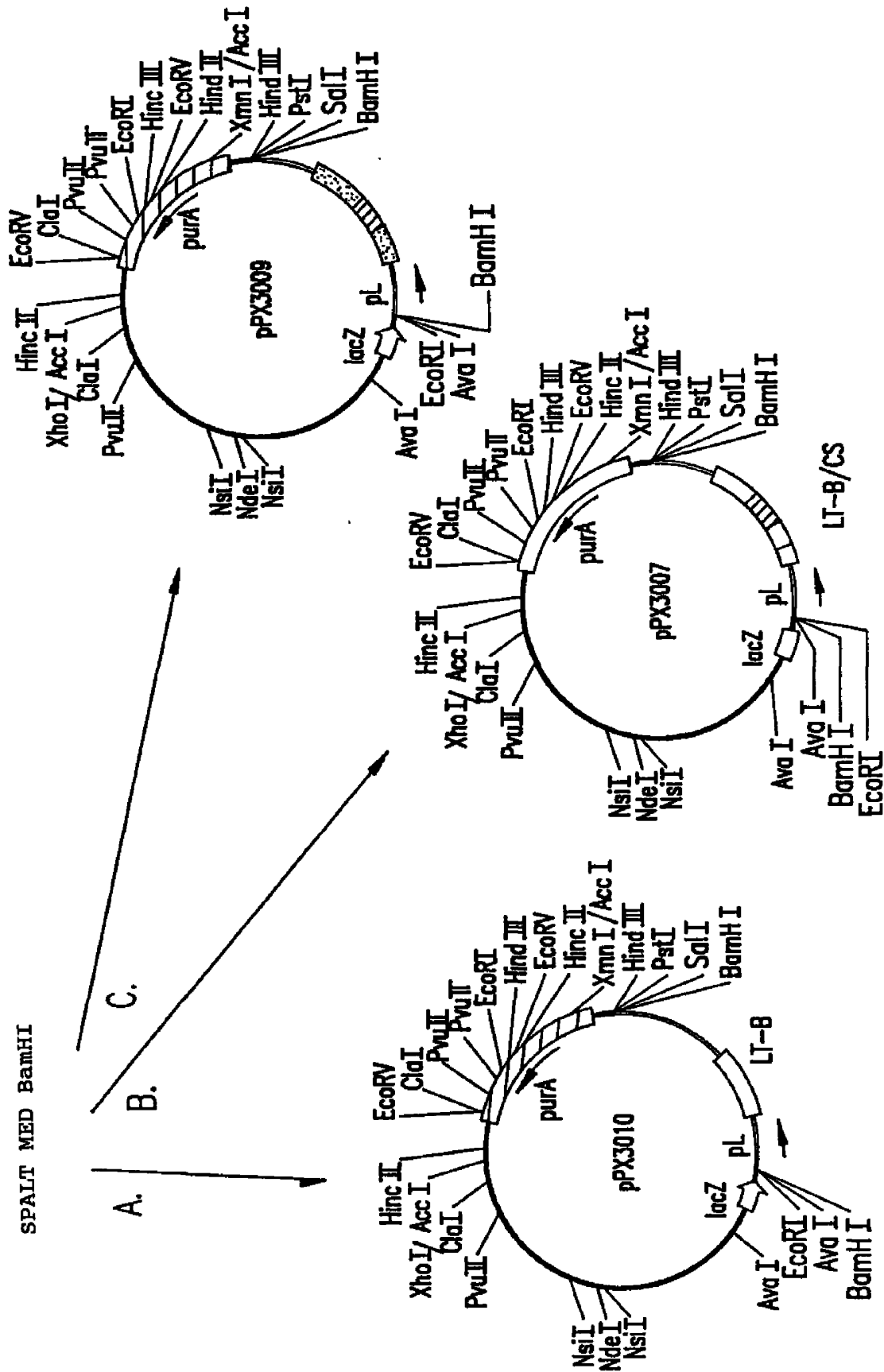
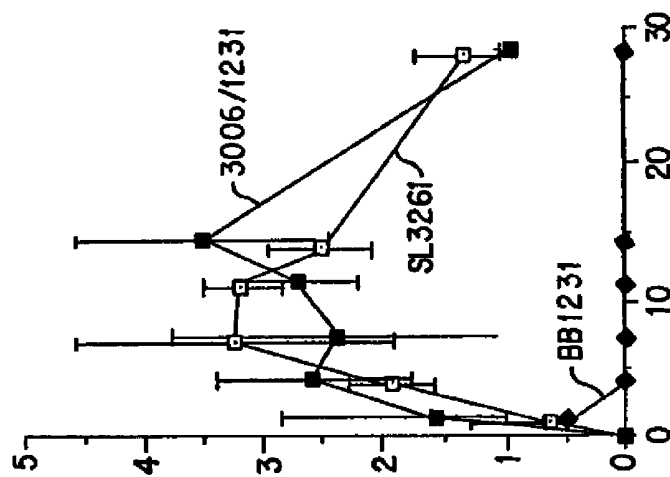
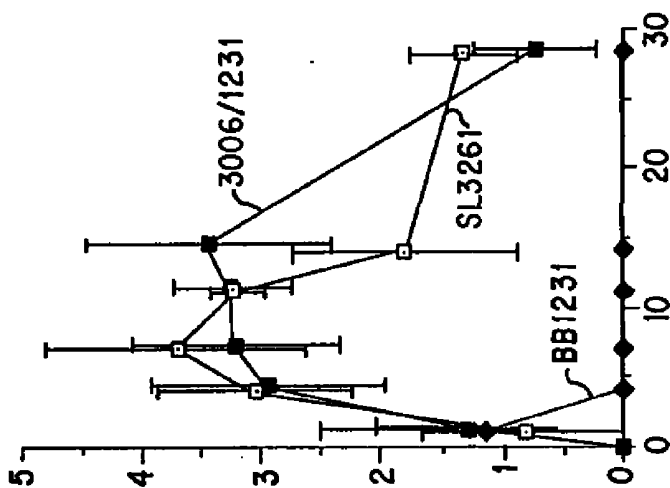


FIG.6B

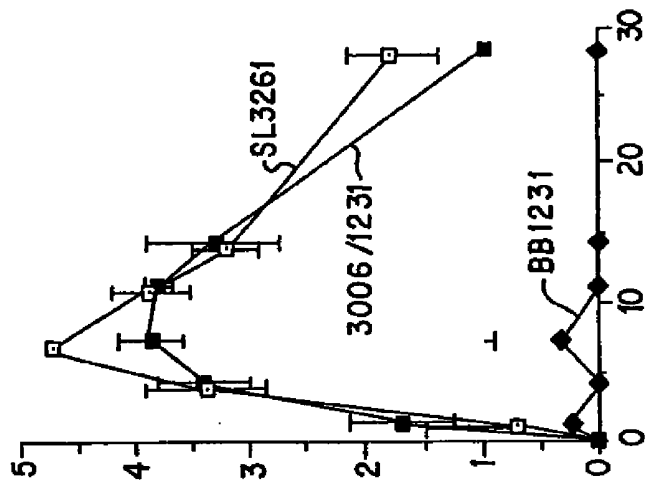




DAG ETTER ORAL IMMUNISING



DAG ETTER ORAL IMMUNISING



DAG ETTER ORAL IMMUNISING

FIG. 7

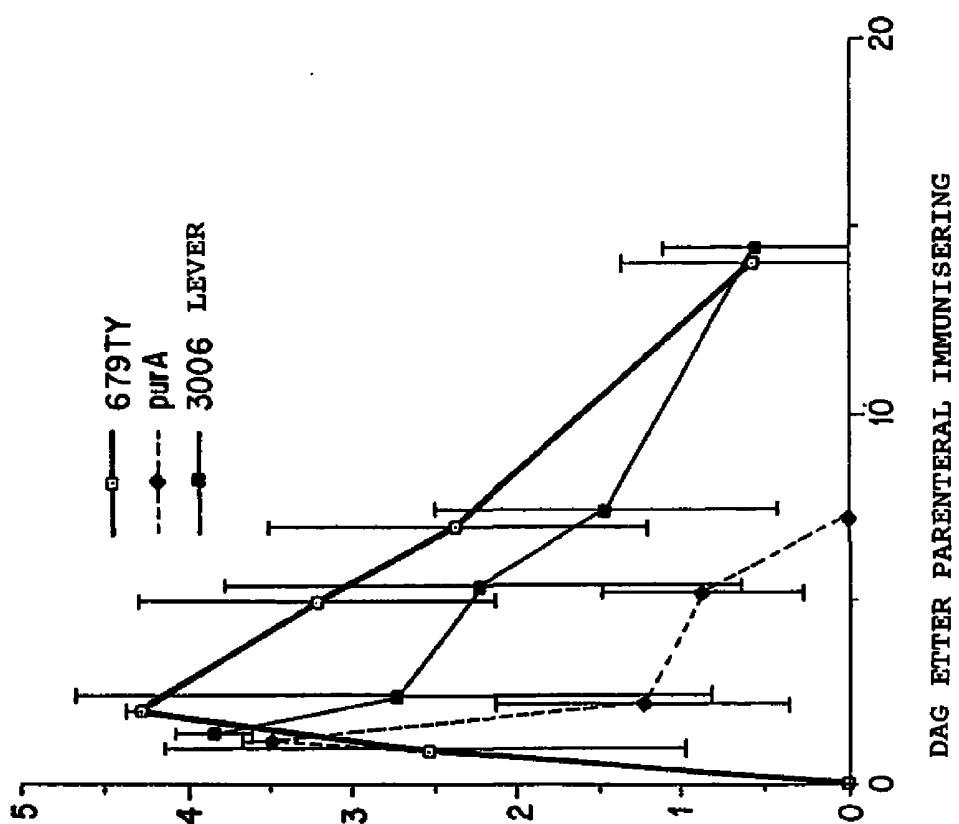


FIG.8A

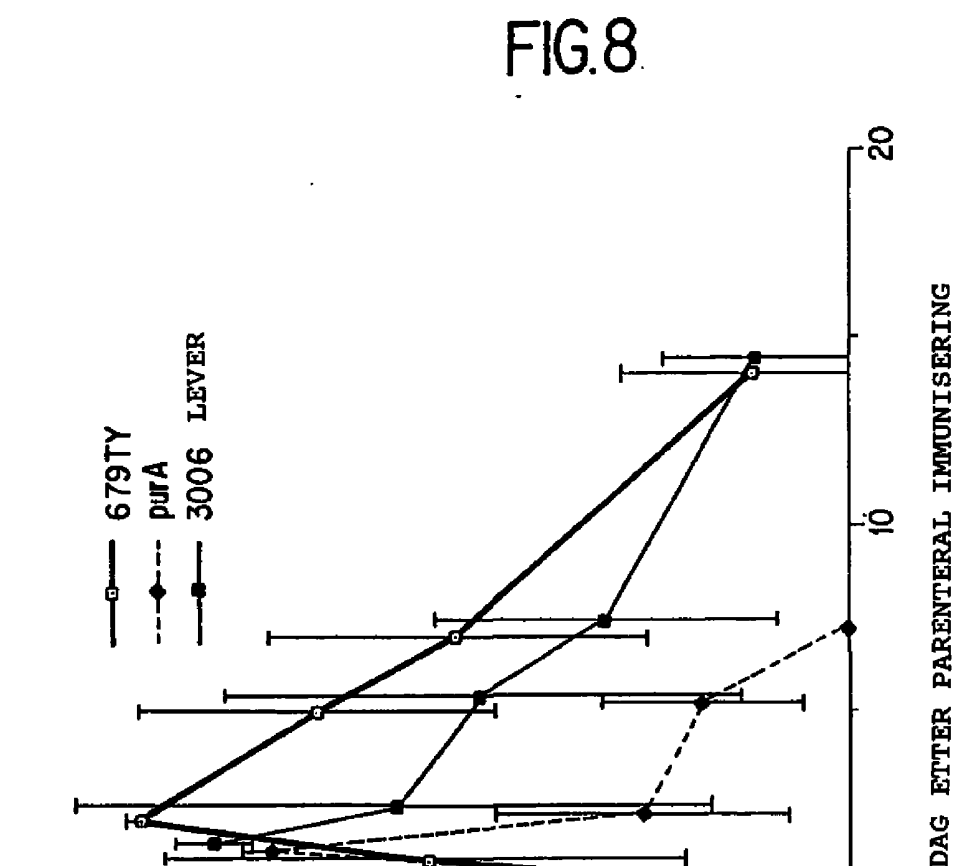


FIG.8B