



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3559022 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/195 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/24 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.09.20
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.06.30
(86)	European Application Nr.	17837961.6
(86)	European Filing Date	2017.12.20
(87)	The European Application's Publication Date	2019.10.30
(30)	Priority	2016.12.20, EP, 16205439
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
	Designated Extension States:	BA ; ME
	Designating Validation States:	MA ; MD
(73)	Proprietor	Universität Basel, Petersgraben 35, 4001 Basel, Sveits
(72)	Inventor	ITTIG, Simon, Zehntenfreistrasse 32, 4103 Bottmingen, Sveits AMSTUTZ, Marlise, Wittlingerstrasse 140, 4058 Basel, Sveits KASPER, Christoph, Ruttigerweg 4, 4600 Olten, Sveits
(74)	Agent or Attorney	PLOUGMANN VINGTOFT, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Title	VIRULENCE ATTENUATED BACTERIA BASED PROTEIN DELIVERY
(56)	References Cited:	WO-A1-2015/177197 WO-A2-02/26819 WO-A2-99/45098 WO-A2-2007/044406

Elisabet Frithz-lindsten ET AL: "Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*", *Molecular Microbiology*, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 1155-1165, XP055690048, Oxford BSL DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00994.x Retrieved from the Internet: URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1046/j.1365-2958.1998.00994.x>

ROSQVIST R ET AL: "FUNCTIONAL CONSERVATION OF THE SECRETION AND TRANSLOCATION MACHINERY FOR VIRULENCE PROTEINS OF *YERSINIAE*, *SALMONELLAE* AND *SHIGELLAE*", *THE EMBO JOURNAL*, EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION, vol. 14, no. 17, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 4187-4195, XP002070536, ISSN: 0261-4189

KATJA BÖHME ET AL: "Concerted Actions of a Thermo-labile Regulator and a Unique Intergenic RNA Thermosensor Control *Yersinia* Virulence", *PLOS PATHOGENS*, vol. 8, no. 2, 16 February 2012 (2012-02-16), page e1002518, XP055365892, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002518 cited in the application

XIAN-YANG LI ET AL: "Tumor suppressor activity of RIG-I", *MOLECULAR & CELLULAR ONCOLOGY*, vol. 1, no. 4, 8 December 2014 (2014-12-08), page e968016, XP055366048, DOI: 10.4161/23723548.2014.968016 cited in the application

DE N ET AL: "Determinants for the Activation and Autoinhibition of the Diguanylate Cyclase Response Regulator WspR", *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 393, no. 3, 30 October 2009 (2009-10-30), pages 619-633, XP026676221, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2009.08.030 [retrieved on 2009-08-18] cited in the application

LETICIA CORRALES ET AL: "Direct activation of STING in the tumor microenvironment with synthetic cyclic dinucleotide derivatives leads to potent and systemic tumor-specific immunity", *JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER*, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 2, no. Suppl 3, 6 November 2014 (2014-11-06), page O10, XP021202342, ISSN: 2051-1426, DOI: 10.1186/2051-1426-2-S3-O10 cited in the application

ANDERSON ET AL: "Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machine of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals", *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 96, no. 22, 26 October 1999 (1999-10-26), pages 12839-12843, XP002968580, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.96.22.12839

H. RUSSMANN ET AL: "Protection Against Murine Listeriosis by Oral Vaccination with Recombinant *Salmonella* Expressing Hybrid *Yersinia* Type III Proteins", *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, vol. 167, no. 1, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 357-365, XP055362697, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.167.1.357

JIAXI WU ET AL: "Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids", *ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY*, vol. 32, no. 1, 21 March 2014 (2014-03-21), pages 461-488, XP055366371, US ISSN: 0732-0582, DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120156 cited in the application

M. CHAMEKH ET AL: "Delivery of Biologically Active Anti-Inflammatory Cytokines IL-10 and IL-1ra In Vivo by the *Shigella* Type III Secretion Apparatus", *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, vol. 180, no. 6, 15 March 2008 (2008-03-15), pages 4292-4298, XP055468047, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4292

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme valgt fra gruppen som består av slektene *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* og *Pseudomonas*, som omfatter et nukleotidmolekyl som omfatter en nukleotidsekvens som koder et heterologt protein fusjonert inn i rammen til 3'-enden på en nukleotidsekvens som koder et leveringssignal fra et bakterielt effektorprotein, der leveringssignalet fra et bakterielt effektorprotein er et bakterielt T3SS-effektorprotein av den gramnegative bakteriestammen som omfatter et bakterielt T3SS-effektorprotein eller et N-terminalt fragment av dette som omfatter et chaperon-bindingssted, der nukleotidsekvensen som koder leveringssignalet fra et bakterielt effektorprotein, er funksjonelt forbundet med en promotor, og der det heterologe proteinet er et protein som er involvert i induksjon eller regulering av en type I IFN-respons valgt fra gruppen som består av familien med RIG-I-like reseptorer (RLR), andre CARD-domeneholdige proteiner som er involvert i antiviral signalisering og type I IFN-induksjon, og syklisk dinukleotid-genererende enzymer så som sykklaser for syklisk di-AMP, syklisk di-GMP og syklisk di-GAMP valgt fra gruppen som består av WspR, DncV, DisA og DisA-like, CdaA, CdaS og cGAS, som fører til stimulering av STING.

2. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge krav 1, der proteinet som er involvert i induksjon eller regulering av en type I IFN-respons, er valgt fra gruppen som består av RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA og DisA-like, CdaA og cGAS eller et fragment av dette.

3. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge et hvilket som helst av kravene 1–2, der den rekombinante virulensattenuerte gramnegative bakteriestammen ytterligere omfatter sletting av et kromosomalt gen som koder for et endogent protein som er essensielt for vekst, og et endogent virulensplasmid som omfatter en nukleotidsekvens som omfatter et gen som koder for det endogene proteinet som er essensielt for vekst, funksjonelt forbundet med en promotor.

4. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge krav 3, der den rekombinante virulensattenuerte gramnegative bakteriestammen oppviser en mangel

når det gjelder å produsere minst ett bakterielt effektorprotein.

5. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge krav 3 eller 4, der genet som koder for et endogent protein som er essensielt for vekst, er valgt blant et gen som koder for et enzym som er essensielt for aminosyreproduksjon, et gen som koder for et enzym som er involvert i peptidoglykan-biosyntese, et gen som koder for et enzym som er involvert i LPS-biosyntese, et gen som koder for et enzym som er involvert i nukleotidsyntese, og et gen som koder for en translasjonsinitierende faktor.

6. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge et hvilket som helst av kravene 3–5, der genet som koder for et endogent enzym som er essensielt for vekst, er et gen som koder for et enzym som er essensielt for aminosyreproduksjon, der enzymet som er essensielt for aminosyreproduksjon, er aspartat-beta-semialdehyd-dehydrogenase (asd).

7. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, der den rekombinante virulensattenuerte gramnegative bakteriestammen er en *Yersinia*-stamme.

8. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge hvilket som helst et av kravene 3–7, der genet som koder for et endogent enzym som er essensielt for vekst, og som befinner seg på det endogene virulensplasmidet, omfatter sin endogene promotor og sin endogene transkripsjonsterminator.

9. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge krav 8, der genet som koder for det endogene enzymet som er essensielt for vekst, sin endogene promotor og sin endogene transkripsjonsterminator, befinner seg 122 bp oppstrøms starten på orf155 (SycO) på det endogene virulensplasmidet.

10. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, der den rekombinante virulensattenuerte gramnegative bakteriestammen ytterligere omfatter en modulasjon innenfor et RNA-termometerområde oppstrøms et gen som koder for et endogent DNA-bindende

protein av typen AraC, valgt fra gruppen som består av VirF, LcrF, YbtA, Rns, MxiE, AraC, XylS, ExsA, PerA, MmsR, RhaS, TcpN, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD, MarA, CafR, FapR og InvF.

11. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge krav 10, der modulasjonen innenfor et RNA-termometerområde oppstrøms et gen som koder for et endogent DNA-bindende protein av typen AraC, omfatter sletting som fjerner en RNA-hårnålsstruktur eller deler av denne oppstrøms genet som koder for et endogent DNA-bindende protein av typen AraC.

12. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge et av kravene 10–11, der det DNA-bindende proteinet av typen AraC er VirF.

13. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge et hvilket som helst av kravene 1–12, der den rekombinante virulensattenuerte gramnegative bakteriestammen er *Yersinia enterocolitica*.

14. Rekombinant virulensattenuert gramnegativ bakteriestamme ifølge et hvilket som helst av kravene 1–13, til bruk i en framgangsmåte for å behandle kreft hos et individ, der framgangsmåten omfatter å administrere den rekombinante virulensattenuerte gramnegative bakteriestammen til individet, der den rekombinante virulensattenuerte gramnegative bakteriestammen administreres i en mengde som er tilstrekkelig til å behandle individet.