

Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistemi za biološka zdravila

Genetically modified lactic acid bacteria as delivery systems for biopharmaceuticals

Aleš Berlec, Borut Štrukelj

Povzetek: Mlečnokislinske bakterije so že stoletja sestavni del človeške prehrane, zato je njihova varnost splošno priznana. Poleg tega so se v novejšem času visoko razvile tehnike, ki omogočajo rekombinantno izražanje proteinov tudi v mlečnokislinskih bakterijah. Zaradi teh razlogov imajo velik potencial kot poceni in učinkoviti dostavni sistemi za dostavo rekombinantnih proteinov na telesne sluznice, predvsem v prebavnem traktu. V razvoju in študijah na živalih so sistemi za dostavo antigenov (cepiv), dostavo proteinov s fiziološko funkcijo in dostavo DNA z namenom cepljenja. Dostava interleukina IL-10 pri kronični vnetni črevesni bolezni se je izkazala za najbolj obetavno in je bila uspešno testirana v 1. fazi klinične študije na ljudeh. Pred splošno uporabo bo potrebno odgovoriti na vprašanja o varnosti vnosa genskega materiala, ker gre za gensko spremenjene organizme, ki ne uživajo podpore javnosti.

Ključne besede: mlečnokislinske bakterije, *Lactococcus lactis*, rekombinantno izražanje, dostavni sistem, cepivo, IL-10, gensko spremenjeni organizmi.

Abstract: Lactic acid bacteria have been a part of human diet for centuries and their safety is therefore generally recognised. Apart from that, the techniques that enable recombinant protein expression in lactic acid bacteria have recently developed. This is why lactic acid bacteria could serve as a cheap and efficient delivery system for recombinant protein delivery to body mucosa, especially in gastrointestinal tract. Systems for antigen (vaccine) delivery, delivery of proteins with physiological function and for DNA delivery are under development and in animal testing. The delivery of interleukin IL-10 in inflammatory bowel disease is the most promising and was successfully tested in phase I human clinical trial. Before the widespread use, questions regarding safety of genetic material introduction will have to be answered, since these are genetically modified organisms, which are not well accepted by the general public.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, recombinant expression, delivery system, vaccine, IL-10, genetically modified organisms.

1 Mlečnokislinske bakterije in rekombinantno izražanje proteinov

Mlečnokislinske bakterije v fermentiranih mlečnih, rastlinskih in mesnih izdelkih že stoletja predstavljajo normalno sestavino človeške prehrane in so poleg kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) industrijsko najpomembnejši mikroorganizmi (1). Zaradi dolgotrajne dokumentirane varne uporabe imajo status GRAS (»splošno priznani kot varni«). Poleg tega številna poročila potrjujejo njihovo dobrodejno delovanje v prebavnem traktu, zato se pogosto dodajajo hrani kot probiotiki. Med mlečnokislinske bakterije uvrščamo rodove *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* in *Streptococcus* ter nekoliko bolj obrobne *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* in *Weisella* (2). Po

fizioloških značilnostih lahko mednje uvrstimo tudi rod *Bifidobacterium*, ki je sicer genetsko nesoroden. V naravi jih pogosto najdemo na razpadajočih rastlinah ali v prebavilih živali.

Mlečnokislinske bakterije spadajo v skupino gram pozitivnih bakterij. So anaerobni ali mikroaerofilni koki ali bacili in ne tvorijo spor. Ker zasedajo isto ekološko nišo, so razvile nekatere skupne metabolne in fiziološke značilnosti. Pomembna značilnost, po kateri so dobile ime je, da kot končni produkt fermentacije ogljikovih hidratov tvorijo mlečno kislino. Glede na končni produkt metabolizma jih razdelimo v dve skupini. Homofermentativne mlečnokislinske bakterije tvorijo mlečno kislino kot edini ali glavni produkt metabolizma glukoze. Heterofermentativne tvorijo enako množino mlečne kisline, ogljikovega dioksida in etanola. Med fermentacijo pH gojišča zaradi tvorbe mlečne kisline pada. Mlečnokislinske bakterije so relativno odporne

na rast v gojišču s kislim pH. Pri večini vrst se rast ustavi pri pH 4,5. Imajo tudi podobno temperaturno toleranco in ne preživijo pri temperaturi višji od 45 °C. So avksotrofne za številne aminokisljine, ki jih morajo zato pridobiti iz okolja. Mlečnokislinske bakterije pogosto proizvajajo antibakterijske peptide bakteriocine, ki predstavljajo prednost pred ostalimi mikroorganizmi, saj so bakterije proizvajalke nanje imune, hkrati pa so toksični za kompetitivne bakterije. Skupna značilnost je tudi, da imajo v nukleotidnem zaporedju genomov nizek delež gvaninov in citozinov (GC), za razliko od nekaterih gram negativnih bakterij (*E. coli*), kar je pomembno pri heterolognem izražanju genov.

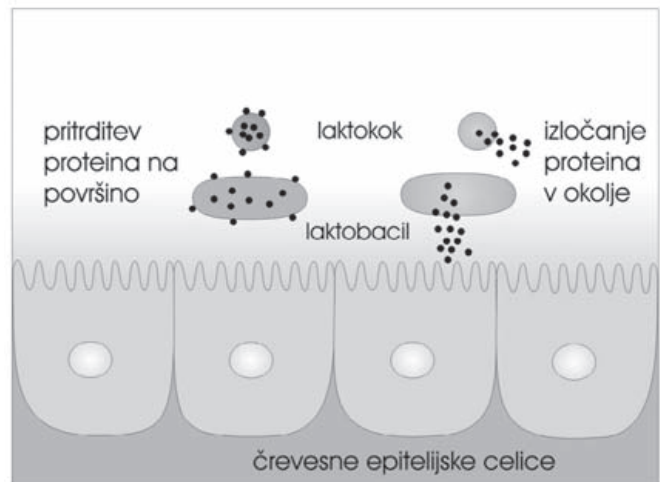
Lactococcus lactis je splošno priznan kot modelna mlečnokislinska bakterija. Zanj obstajajo dobro razvita orodja za gensko manipulacijo (3). V laboratoriju se najpogosteje uporabljata seva *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 in *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, ki imata tudi določen genom (4, 5). *L. lactis* je tudi industrijsko pomemben mikroorganizem, zlasti je pomemben v sirarstvu.

Za rekombinantno izražanje proteinov v mlečnokislinskih bakterijah se uporabljajo različni sistemi. Heterologni geni se nahajajo bodisi na plazmidih bodisi so vstavljeni v bakterijski kromosom in so pod nadzorom konstitutivnih ali inducibilnih promotorjev. Konstitutivni promotorji zagotavljajo enakomerno izražanje daljši čas, a običajno v manjših količinah. Pri inducibilnih promotorjih lahko izražanje nadzorujemo in je običajno močnejše. Izražanje lahko sprožimo z ogljikovimi hidrati, fagno infekcijo, bakteriocini, toplotno ali pH- spremembo (1). Najpogosteje uporabljan in najbolj proučen sistem je z nizinom nadzorovan ekspresijski sistem NICE (6), kjer se izražanje inducira z dodatkom bakteriocina nizina. Razviti so tudi sistemi, ki omogočajo usmerjanje proteinov v bakterijah (ciljanje). Za izločanje proteinov v gojišče se tako najpogosteje uporablja zaporedje Usp45, za pritrđitev proteinov na površino bakterij (celično steno) pa C-terminalno zaporedje avtolizina AcmA (1).

2 Dostava biološko aktivnih makromolekul

Zaradi varnega statusa in zaupanja, ki ga uživajo mlečnokislinske bakterije, predstavljajo privlačen vektor za dostavo bioloških makromolekul v organizem. Cilji njihovega delovanja so sluznice, najpogosteje v prebavnem traktu, kot je shematsko prikazano na sliki 1. Delujejo lokalno, lahko pa povzročijo tudi sistemske učinke. Način aplikacije je ponavadi peroralni ali nazalni, možen pa je tudi vaginalni. Laktokoki in laktobacili preživijo prehod skozi prebavni trakt, nekateri laktobacili pa so ga sposobni tudi kolonizirati. Sposobnost preživetja v prebavnem traktu je pomemben dejavnik, saj peroralna aplikacija proteina ni mogoča predvsem zaradi razgradnje v kislem želodčnem okolju. Dodatna prednost dostave s pomočjo bakterij je, da nista potrebni draga izolacija in čiščenje proteinov. Sistemi dostave biološko aktivnih makromolekul se zaenkrat večinoma testirajo na živalskih modelih, kjer se dosegajo spodbudni rezultati. Znan je en primer klinične študije na ljudeh, ki bo opisan v nadaljevanju.

Dostavo biološko aktivnih makromolekul lahko po načinu uporabe razdelimo na dostavo cepiv (antigenov), dostavo proteinov s fiziološko vlogo in dostavo DNA.



Slika 1: Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije v prebavnem traktu lahko izločajo heterologe proteine ali pa jih predstavljajo na površini.

Figure 1: Genetically modified lactic acid bacteria can secrete heterologous proteins or present them on the surface in the intestinal tract.

2.1 Dostava cepiv

Peroralna dostava cepiv (antigenov) je zaželen zaradi prijetnejšega načina aplikacije v primerjavi s parenteralnim. Poleg tega bi peroralna dostava poceni cepiv pomenila veliko prednost zlasti v manj razvitih deželah. Mlečnokislinske bakterije predstavljajo ugoden vektor za dostavo cepiv, ker (7):

- imajo status GRAS,
- lahko delujejo kot adjuvans,
- so sposobne adhezije na mukozo,
- imajo nizko intrinzično imunogenost.

Zaradi velikosti se proteinske molekule načeloma ne absorbirajo in ne prehajajo v krvni obtok. Vendar pa črevesno limfoidno tkivo, ki je del mukoznega imunskega sistema, omogoča prehod preko specializiranih M celic na Peyerjevih ploščah in predstavitev antigenov bazalno ležečim imunskim celicam. To posledično sproži izločanje IgA, glavnega razreda protiteles iz epitelijskega luma prebavnega trakta in s tem lokalni imunski odziv (8). Hkrati lahko takšen vnos antigenov sproži tudi sistemski imunski odziv in pojav IgG v krvi.

Različne vrste antigenov, ki so bili predstavljeni s pomočjo mlečnokislinskih bakterij, so predstavljeni v preglednici 1.

Cepiva so usmerjena proti bakterijskim in virusnim patogenom, pa tudi praživalim (*Plasmodium falciparum*). Največ študij je bilo opravljenih na fragmentu C tetanus toksina (10), ki zaradi močne imunogenosti služi tudi kot modelni antigen. Večina študij je bila opravljenih na miših. Običajno so opazili zvečan lokalni imunski odziv in izločanje IgA, pa tudi zvečan sistemski imunski odziv. Kar nekaj študij je uspelo dokazati klinično uspešnost cepljenja, saj se po izpostavitvi patogenu bolezen ni razvila npr. v primeru cepiva proti človeškemu papilomavirusu, ki povzroča raka materničnega vratu (19) ali v primeru cepiva proti enterotoksigeni *E. coli* (7). Učinkovitost

Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistemi za biološka zdravila

Preglednica 1: Primeri uporabe mlečnokislinskih bakterij pri dostavi antigenov.

Table 1: Example of usage of lactic acid bacteria in antigen delivery.

PATOGEN	DOSTAVLJENI ANTIGEN	MLEČNOKISLINSKA BAKTERIJA	REF.
Bakterije			
<i>Streptococcus mutans</i> (karies)	Površinski protein PAc	<i>L. lactis</i>	(9)
<i>Clostridium tetani</i> (tetanus)	Fragment C tetanus toksina	<i>L. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i>	(10), (11)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kapsularni polisaharid tipa 3, PsaA, PspA	<i>L. lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. helveticus</i>	(12)
<i>Helicobacter pylori</i>	UreB, Cag12	<i>L. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i>	(13)
<i>Brucella abortus</i>	L7/L12 ribosomalni protein, GroEL protein topotnega šoka	<i>L. lactis</i>	(14)
<i>Streptococcus pyogenes</i> (faringealna infekcija)	Območje C-ponovitve M proteina	<i>L. lactis</i>	(15)
<i>Proteus mirabilis</i>	MrpA fimbrijski protein	<i>L. lactis</i>	(16)
enterotoksigena <i>Escherichia coli</i>	Toplotno stabilni enterotoksin in toplotno labilni enterotoksin B	<i>Lb. reuteri</i>	(17)
streptokoki (širokospektralno)	GBS pilus (iz skupine B streptokokov)	<i>L. lactis</i>	(18)
Virusi			
človeški papilomavirus tip 16 (rak materničnega vratu)	Protein E7, protein L1	<i>L. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i>	(19), (20)
HIV	Ovojni protein	<i>L. lactis</i>	(21)
SARS-koronavirus	Nukleokapsidni protein, peplomerni protein - segmenta SA and SB	<i>L. lactis</i> , <i>Lb. casei</i>	(22)
Rotavirus	VP7 protein iz zunanjšega plašča	<i>L. lactis</i>	(23)
Koronavirus (prenosni gastroenteritis)	Peplomerni glikoprotein S	<i>Lb. casei</i>	(24)
Praživali			
<i>Plasmodium falciparum</i> (malarija)	Fuzijski protein GLURP-MSP3, MSP1, MSA2	<i>L. lactis</i>	(25)

Preglednica 2: Primeri uporabe mlečnokislinskih bakterij pri dostavi proteinov s fiziološko vlogo.

Table 2: Example of usage of lactic acid bacteria in delivery of proteins with physiological function.

OBOLENJE / MOTNJA	DOSTAVLJENI PROTEIN	MLEČNOKISLINSKA BAKTERIJA	REF.
Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB)	IL-10	<i>L. lactis</i>	(27), (28)
Ulcerozni kolitis	mTFF (triperesni (trefoil) faktor)	<i>L. lactis</i>	(29)
Ulcerozni kolitis	LcrV iz <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> – stimulacija izločanja IL-10	<i>L. lactis</i>	(30)
Ulcerozni kolitis	MnSOD iz <i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lb. gasseri</i>	(31)
HIV	Cianovirin iz <i>Nostoc elipsosporum</i>	<i>L. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. jensenii</i>	(32)
Modulacija alergijskega imunskega odziva	Bet v 1 antigen iz brezovega peloda	<i>L. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i>	(33)
Modulacija alergijskega imunskega odziva	Anti-idiotipski scFv ali IgE mimotop	<i>Lb. johnsonii</i>	(34)
Karies	scFv proti <i>S. mutans</i> (antigen I/II)	<i>Lb. zeae</i>	(35)
Pomanjkanje lipaze pri pankreasni insuficienci	Lipaza iz <i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>L. lactis</i>	(36)

predstavitve antigena so v nekaj primerih povečali s hkratno dostavo interleukinov (IL-2, IL-6) (26). Mlečnokislinske bakterije, ki predstavljajo antigene, naj ne bi kolonizirale prebavnega trakta, saj bi to lahko vodilo k toleranci do antigena. *L. lactis* je zato najugodnejši in najpogostejši kandidat za peroralno cepivo, čeprav so se laktobacili nekajkrat izkazali za učinkovitejše (11). Klinične študije na ljudeh še niso bile opravljene.

2.2 Dostava proteinov s fiziološko vlogo

Poleg dostave antigenov je mlečnokislinske bakterije moč uporabiti tudi kot vektor za dostavo proteinov, ki delujejo lokalno v prebavnem traktu. Na ta način dostavljeni proteini so predstavljeni v preglednici 2.

Iz preglednice 2 je razvidno, da je najpogostejša tarča dostave proteinov v prebavni trakt kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB), kamor uvrščamo ulcerozni kolitis in Crohnovo bolezen. Dokazano je, da interleukin IL-10 igra pomembno vlogo pri regulaciji vnetnih kaskad in da njegovo pomanjkanje vodi v razvoj kolitisa. Dostava IL-10 lahko omili simptome in predstavlja najuspešnejši primer dostave proteinov z mlečnokislinskimi bakterijami. Uspešno so jo testirali na mišjem modelu kolitisa (27). Sledil je razvoj seva *L. lactis* z okvarjeno timidilat sintazo, ki je zato odvisen od zunanjih virov timidina ali timina, kar preprečuje preživetje gensko spremenjenega seva v naravi (37). To je omogočilo uporabo v 1. fazi klinične študije na 10 ljudeh za zdravljenje Crohnove bolezni (28). Študija je bila uspešna z minimalnimi stranskimi učinki in z olajšanjem simptomov bolezni. Podobne učinke so na živalskih študijah dosegli z uporabo triperesnih faktorjev (29) in dostavo proteina LcrV (30) iz *Y. pseudotuberculosis*, ki stimulira izločanje IL-10. Drugačen pristop predstavlja intestinalno izločanje superoksidne dismutaze (MnSOD), ki nastopa kot lovilec reaktivnih kisikovih spojin, ki prispevajo k vnetnemu delovanju (31).

Mlečnokislinske bakterije bi se lahko uporabljale za dostavo prebavnih encimov pri določenih anomalijah npr. pankreasni insuficienci. Tako je bil razvit sistem za dostavo lipaze (36).

Na podoben način, kot je bilo v prejšnjem poglavju opisano za dostavo antigenov z namenom spodbujanja imunskega odziva, bi se mlečnokislinske bakterije lahko uporabljale tudi za modulacijo imunskega odziva. Tako so s senzitizacijo zmanjšali imunski odziv na antigen iz brezovega peloda (33). Drugačen pristop predstavlja dostava fragmenta variabilne regije protitelesa (scFv) proti IgE, ki so odgovorni za pretiran imunski odziv, ali IgE mimotopov, ki stimulirajo tvorbo IgG proti IgE (34). Tudi fragmenti variabilne regije protitelesa scFv, usmerjeni proti *S. mutans*, so bili dostavljeni s pomočjo

mlečnokislinskih bakterij in uporabljeni za oralno zdravljenje kariesa (35).

Poleg uporabe v prebavnem traktu, je mlečnokislinske bakterije mogoče uporabiti tudi na drugih sluznicah, npr. vaginalni. Razvit je sistem izražanja močnega protivirusnega proteina cianovirina v mlečnokislinskih bakterijah, ki kolonizirajo vagino, kar predstavlja način za zmanjšanje možnosti okužbe s HIV predvsem na ogroženih, manj razvitih območjih.

2.3 Dostava DNA

Dostava DNA z namenom cepljenja (DNA cepivo) je najnovejši način uporabe mlečnokislinskih bakterij in zato zaenkrat najmanj razvit. Dostavljena DNA izkoristi celične mehanizme za prepis v protein, ki potem služi kot antigen. Prednost DNA cepiva je zmožnost aktivacije celične imunosti in ne samo humoralne, kar posledično omogoča tudi zdravljenje kroničnih bolezni in zahtevnih virusnih infekcij, težava pa je uspešen vnos DNA v celice. Z mlečnokislinskimi bakterijami so uspeli dokazati vnos DNA v sesalske celice s pomočjo proteina internalina (38, 39), ki poveča prepustnost celic za *L. lactis*. Dosegli so tudi aktivacijo imunskega odziva pri miših po vnosu gena Vp1 virusa slinavke in parkljevke (40). Primeri so prikazani v preglednici 3.

3 Prednosti in slabosti

Mlečnokislinske bakterije so že stoletja sestavni del človeške prehrane, zato njihova varnost ni vprašljiva. Možnost sistemske okužbe z mlečnokislinskimi bakterijami obstaja le pri močno imunokomprimiranih posameznikih. Dostava rekombinantnih proteinov na sluznice oz. predvsem v prebavni trakt s pomočjo mlečnokislinskih bakterij pomeni relativno poceni način dostave biološko aktivnih makromolekul v organizem, saj odpade potreba po nadaljnji izolaciji in čiščenju. To je pomembno predvsem v manj razvitih deželah, kjer je cena glavna ovira za npr. množično cepljenje. Prednost mlečnokislinskih bakterij pri dostavi cepiv je tudi, da posnemajo pot vnosa številnih patogenov v organizem in imajo lahko intrinzične lastnosti adjuvansa. Vnos fiziološko aktivnih proteinov v npr. prebavni trakt pomeni prednost predvsem pri lokalnih obolenjih, saj pri sistemski aplikaciji proteinov le majhen del dospe do želenega mesta delovanja, povečana pa je tudi možnost stranskih učinkov.

Med slabosti lahko uvrstimo težave z natančnim odmerjanjem, v primeru da prihaja do izražanja proteina na mestu delovanja (in ne že pred vnosom v organizem) in pa nejasne posledice ob morebitni kolonizaciji prebavnega trakta. Glavna šibka točka uporabe mlečnokislinskih bakterij pa je v tem, da gre za gensko spremenjene orga-

Preglednica 3: Primeri uporabe mlečnokislinskih bakterij pri dostavi DNA.

Table 3: : Example of usage of lactic acid bacteria in DNA delivery.

CILJ TERAPIJE	DOSTAVLJENI GEN	MLEČNOKISL. BAKTERIJA	REF.
Vnos gena proti modelnemu proteinu	<i>gfp</i> (zeleni fluorescentni protein)	<i>L. lactis</i>	(38)
Vnos gena proti modelnemu proteinu	<i>blg</i> (beta-laktoglobulin)	<i>L. lactis</i>	(39)
Cepivo proti virusu slinavke in parkljevke (FMDV)	<i>vp1</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	(40)

nizme, ki so v javnosti deležni izrazito odklonilnega odnosa. Pred dejansko uporabo bi bilo zato potrebno odgovoriti na številna vprašanja, povezana s sproščanjem rekombinantnih organizmov v okolje (41, 42). Prvi sklop vprašanj je povezan s samim rekombinantnim sevom in možnostjo njegovega preživetja v naravi. To je v veliki meri moč odpraviti z uporabo metabolnih mutant, ki onemogočajo preživetje brez določenih hranil, kar je bilo že uspešno prikazano na primeru seva *L. lactis* z odstranjenim genom za timidilat sintazo (37). Drugi sklop vprašanj je povezan z vnesenim proteinom in njegovo potencialno alergenoštvom in toksičnostjo. Tretji sklop vprašanj pa se nanaša na sam genski material. Potrebno je preprečiti horizontalen prenos genskega materiala v ostale, komenzalne bakterije. To je zlasti pomembno pri uporabi plazmidov, pri čemer je potrebno uporabljati replikacijske elemente, ki so omejeni na gostitelja. Popolnoma se je potrebno izogniti antibiotičnim označevalcem. Potrebno je tudi izključiti vključevanje DNA v genom gostitelja in morebitno onkogeno delovanje.

Mlečnokislinske bakterije imajo velik potencial kot vektorji za dostavo biološko aktivnih makromolekul. Pred uporabo bo potrebno razrešiti odnos do gensko spremenjenih organizmov, katerim javno mnenje ni naklonjeno in zaradi katerega je tudi odnos industrije zadržan. Res pa je, da je uporaba gensko spremenjenih organizmov v terapevtske namene sprejemljivejša od npr. uporabe v prehrani. Tveganje, ki smo ga namreč pripravljeno sprejeti, je povezano s koristjo, ki jo dobimo. Ta pa je večja v primeru resne ali težko ozdravljive bolezni.

4 Literatura

1. de Vos WM. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 289-295.
2. Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 1997; 36: 1-29.
3. van Hylckama Vlieg JE, Rademaker JL, Bachmann H et al. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17: 183-190.
4. Bolotin A, Wincker P, Mauger S et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 2001; 11: 731-753.
5. Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* 2007; 189: 3256-3270.
6. Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68: 705-717.
7. Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M et al. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 41: 155-167.
8. Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A et al. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2003; 2: 102-111.
9. Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I et al. Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun* 1990; 58: 2929-2934.
10. Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM et al. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 653-657.
11. Grangette C, Muller-Alouf H, Geoffroy M et al. Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine* 2002; 20: 3304-3309.
12. Oliveira ML, Areas AP, Campos IB et al. Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in *Streptococcus pneumoniae* colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A. *Microbes Infect* 2006; 8: 1016-1024.
13. Lee MH, Roussel Y, Wilks M et al. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine* 2001; 19: 3927-3935.
14. Pontes DS, Dorella FA, Ribeiro LA et al. Induction of partial protection in mice after oral administration of *Lactococcus lactis* producing *Brucella abortus* L7/L12 antigen. *J Drug Target* 2003; 11: 489-493.
15. Mannam P, Jones KF, Geller BL. Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 2004; 72: 3444-3450.
16. Scavone P, Miyoshi A, Rial A et al. Intranasal immunisation with recombinant *Lactococcus lactis* displaying either anchored or secreted forms of *Proteus mirabilis* MrpA fimbrial protein confers specific immune response and induces a significant reduction of kidney bacterial colonisation in mice. *Microbes Infect* 2007; 9: 821-828.
17. Wu CM, Chung TC. Mice protected by oral immunization with *Lactobacillus reuteri* secreting fusion protein of *Escherichia coli* enterotoxin subunit protein. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 354-365.
18. Buccato S, Maione D, Rinaudo CD et al. Use of *Lactococcus lactis* expressing pili from group B *Streptococcus* as a broad-coverage vaccine against streptococcal disease. *J Infect Dis* 2006; 194: 331-340.
19. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F et al. A novel mucosal vaccine based on live *Lactococci* expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* 2005; 175: 7297-7302.
20. Poo H, Pyo HM, Lee TY et al. Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on *Lactobacillus casei* induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice. *Int J Cancer* 2006; 119: 1702-1709.
21. Xin KQ, Hoshino Y, Toda Y et al. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Blood* 2003; 102: 223-228.
22. Lee JS, Poo H, Han DP et al. Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice. *J Virol* 2006; 80: 4079-4087.

23. Perez CA, Eichwald C, Burrone O et al. Rotavirus vp7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice. *J Appl Microbiol* 2005; 99: 1158-1164.
24. Ho PS, Kwang J, Lee YK. Intra-gastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. *Vaccine* 2005; 23: 1335-1342.
25. Ramasamy R, Yasawardena S, Zomer A et al. Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunisations. *Vaccine* 2006; 24: 3900-3908.
26. Steidler L, Robinson K, Chamberlain L et al. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* 1998; 66: 3183-3189.
27. Steidler L, Hans W, Schotte L et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 1352-1355.
28. Braat H, Rottiers P, Hommes DW et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 754-759.
29. Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J et al. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* 2004; 127: 502-513.
30. Foligne B, Desseix R, Marceau M et al. Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology* 2007; 133: 862-874.
31. Carroll IM, Andrus JM, Bruno-Barcena JM et al. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G729-738.
32. Liu X, Lagenaur LA, Simpson DA et al. Engineered vaginal *lactobacillus* strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3250-3259.
33. Daniel C, Repa A, Wild C et al. Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. *Allergy* 2006; 61: 812-819.
34. Scheppler L, Vogel M, Marti P et al. Intra-nasal immunisation using recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a new strategy to prevent allergic disease. *Vaccine* 2005; 23: 1126-1134.
35. Kruger C, Hultberg A, van Dollenweerd C et al. Passive immunization by *lactobacilli* expressing single-chain antibodies against *Streptococcus mutans*. *Mol Biotechnol* 2005; 31: 221-231.
36. Drouault S, Juste C, Marteau P et al. Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 3166-3168.
37. Steidler L, Neiryneck S, Huyghebaert N et al. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 785-789.
38. Guimaraes VD, Gabriel JE, Lefevre F et al. Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes Infect* 2005; 7: 836-844.
39. Guimaraes VD, Innocentin S, Lefevre F et al. Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 7091-7097.
40. Li YG, Tian FL, Gao FS et al. Immune responses generated by *Lactobacillus* as a carrier in DNA immunization against foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 2007; 25: 902-911.
41. Detmer A, Glenting J. Live bacterial vaccines--a review and identification of potential hazards. *Microb Cell Fact* 2006; 5: 23.
42. Renault P. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. *Biochimie* 2002; 84: 1073-1087.