

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040558**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.23

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890868

(22) Дата подачи заявки
2016.11.17

**(54) БАКТЕРИИ С ОСЛАБЛЕННОЙ ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

(31) **15195490.6**

(32) **2015.11.19**

(33) **EP**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/EP2016/078084**

(87) **WO 2017/085233 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УНИВЕРСИТЕТ БАЗЕЛЬ (CH)

(72) Изобретатель:
**Иттиг Симон, Амштуц Марлиз,
Каспер Кристоф (CH), Корнелис Гай Р.
(BE)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A2-02077249**

GENTSCHER IVAYLO ET AL.: "Use of a recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 5, № 1, 9 February 2005 (2005-02-09), p. 15, XP021004758, ISSN: 1471-2407, DOI: 10.1186/1471-2407-5-15, abstract, p. 16, left-hand column, paragraph 1; table 1, p. 18, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1, p. 18, right-hand column, last paragraph - p. 19, left-hand column, paragraph 2, p. 19, right-hand column, paragraph 3 - p. 21, right-hand column, paragraph 1

FENSTERLE J. ET AL.: "Cancer immunotherapy based on recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B", CANCER GENE THERAPY, APPLETON&LANGE, GB, vol. 15, № 2, 1 February 2008 (2008-02-01), p. 85-93, XP002473595, ISSN: 0929-1903, DOI: 10.1038/SJ.CGT.7701109, p. 85, right-hand column, paragraph 2 - p. 86, left-hand column, paragraph 2; table 1, p. 87, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 4, p. 88, right-hand column, paragraph 4 - p. 91, left-hand column, paragraph 2, p. 92, left-hand column, paragraph 2

(57) В настоящем изобретении предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта.

B1**040558****040558****B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным штаммам грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта.

Уровень техники

Основная проблема при лечении злокачественных солидных опухолей - доставка терапевтических молекул к раковым клеткам в достаточных количествах одновременно со снижением повреждения неспецифических клеток и тканей. Наиболее распространенные подходы к лечению (хирургия, химиотерапия и лучевая терапия) слишком часто не приносят успеха при лечении пациентов и характеризуются существенными побочными эффектами, например тошнотой и диареей. Таким образом, разрабатываются некоторые другие стратегии лечения, включающие ингибиторы ангиогенеза и иммунотерапевтические средства.

Для уменьшения повреждений неканцерогенных тканей большой интерес представляют подходы, обеспечивающие адресную доставку лекарственных средств. Например, используют антитела, распознающие структуры поверхности опухолевых клеток и в оптимальном случае селективно связывающиеся с опухолевыми клетками. Для совершенствования механизма действия таких антител их можно конъюгировать с терапевтическими агентами или липидными везикулами, содержащими лекарственные средства. Одна из проблем применения таких везикул заключается в надлежащем высвобождении активного реагента. Еще более сложной является доставка терапевтических белков или пептидов, особенно при нацеливании на внутриклеточные механизмы. Попытки решения проблемы доставки терапевтических белков в эукариотические клетки связаны со многими альтернативными способами, среди которых использование "пептидов, проникающих в клетки" ("cell penetrating peptides", CPP) или аналогичных технологий, а также различных методологий на основе наночастиц. Недостатком всех этих технологий является низкая эффективность и то, что груз, поглощенный клеткой путем эндоцитоза, с большой вероятностью в результате будет деградирован в лизосомах. Кроме того, конфликт между потребностью в обеспечении стабильности носителя, связанного с грузом, в организме человека и требованием к обеспечению дестабилизации и высвобождения в клетке-мишени представляет собой неотъемлемую проблему таких технологий. Показано, что при введении в область, которая располагается дистально относительно опухоли, в злокачественных солидных опухолях реплицируются различные бактерии, например *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Bifidobacteria*. В настоящее время в клинической практике используется только бацилла Кальмета-Герена (БЦЖ, происходящая от *Mycobacterium bovis*). БЦЖ вводят для лечения поверхностного рака мочевого пузыря, хотя молекулярный механизм, лежащий в основе этого, во многом остается неизвестным. Оптимальный бактериальный штамм для лечения злокачественных солидных опухолей должен специфически накапливаться и пролиферировать в области опухоли и подвергаться уничтожению в неспецифических областях. В этом смысле оптимальный бактериальный носитель для средства для адресного лечения рака должен обеспечивать значительное накопление в желательной области действия и в минимальной степени присутствовать в неспецифических областях. Разработка такого бактериального штамма для лечения злокачественных солидных опухолей, способного, например, доставлять груз, продуцированный в бактериях, к области действия внутри раковых клеток, т.е. за пределами бактерий, остается основной проблемой.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью и их применение для лечения злокачественных солидных опухолей у субъекта, причем указанные рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью позволяют выполнять транслокацию различных эффекторов III типа, а также эффекторов IV типа, вирусных белков и, что наиболее важно, функциональных эукариотических белков в клетки злокачественной солидной опухоли.

В первом аспекте в настоящем изобретении предложен рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, трансформированный вектором, содержащим в направлении от 5' к 3'

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК,

для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, в организме которого рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли,

причем указанный способ включает введение указанному субъекту указанного рекомбинантного

штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, и

при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят в количестве, достаточном для лечения указанного субъекта.

Аналогичным образом в настоящем изобретении предложен способ лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, трансформированного вектором, содержащим в направлении от 5' к 3'

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК,

причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят в количестве, достаточном для лечения указанного субъекта.

Аналогичным образом в настоящем изобретении предложено применение рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, трансформированного вектором, содержащим в направлении от 5' к 3'

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК,

для получения лекарственного средства для лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в указанной злокачественной солидной опухоли.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложен рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции, для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в указанной злокачественной солидной опухоли, причем указанный способ включает введение указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью указанному субъекту, и при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят в количестве, достаточном для лечения указанного субъекта.

Аналогичным образом в настоящем изобретении предложен способ лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в указанной злокачественной солидной опухоли, при этом указанный способ включает введение рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью указанному субъекту, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, являющегося вирулентным по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции, и при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят в количестве, достаточном для лечения указанного субъекта.

Аналогичным образом в настоящем изобретении предложено применение рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции, для получения лекарственного средства для лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая

рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, трансформированный вектором, содержащим в направлении от 5' к 3'

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК; и

фармацевтически приемлемый носитель для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, в организме которого рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли,

причем указанный способ включает введение в организм субъекта указанной фармацевтической композиции и фармацевтическую композицию вводят в количестве, достаточном для лечения субъекта.

Аналогичным образом в настоящем изобретении предложен способ лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, в организме которого рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли, включающий введение в организм субъекта фармацевтической композиции, содержащей

рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, трансформированный вектором, содержащим в направлении от 5' к 3'

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК; и

фармацевтически приемлемый носитель,

причем фармацевтическую композицию вводят в количестве, достаточном для лечения субъекта.

Аналогичным образом в настоящем изобретении предложено применение фармацевтической композиции, содержащей

рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, трансформированный вектором, содержащим в направлении от 5' к 3'

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК; и

фармацевтически приемлемый носитель для получения лекарственного средства для лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, в организме которого рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью и фармацевтически приемлемый носитель, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции, для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли, причем указанный способ включает введение указанной фармацевтической композиции в организм субъекта, и при этом указанную фармацевтическую композицию вводят в количестве, достаточном для лечения указанного субъекта.

Аналогичным образом в настоящем изобретении предложен способ лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, при этом рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту фармацевтической композиции, содержащей

рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, являющегося вирулентным по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции; и

фармацевтически приемлемый носитель,

причем указанную фармацевтическую композицию вводят в количестве, достаточном для лечения указанного субъекта.

Аналогичным образом в настоящем изобретении предложено применение фармацевтической композиции, содержащей

рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции; и

фармацевтически приемлемый носитель для получения лекарственного средства для лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта,

при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в указанной злокачественной солидной опухоли.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Исследование характеристик T3SS-доставки белка.

(А) Схематическое представление T3SS-зависимой секреции белка в окружающую среду (секреции *in vitro*) (слева) или в эукариотические клетки (справа). I: показана система секреции 3 типа, II: обозначает белки, секретируемые в окружающую среду, III: белки, транслоцированные через мембрану в цитозоль эукариотических клеток (VII), VI: показан фрагмент двух бактериальных мембран, в которые вставлен T3SS, и цитозоль бактериальной клетки под ним, IV: представляет собой гибридный белок, присоединенный к N-концевому фрагменту YopE₁₋₁₃₈ (V).

(В) Секреция *in vitro* I: *Y. enterocolitica* E40 дикого типа, II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или III: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBadSi₂, выявленные посредством вестерн-блоттинга общих бактериальных лизатов (IV) и надосадочной жидкости осажденных культур (V) с использованием антитела против YopE.

Фиг. 2. Исследование характеристик T3SS-доставки белка в эпителиальные клетки.

(А) Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против Мус клеток HeLa, инфицированных при MOI, равной 100, в течение 1 ч I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd pBad_Si2.

(В) Количественное определение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против Мус (А) содержимого клеток HeLa. Данные объединены из n=20 областей, показатели ошибки означают стандартную ошибку среднего. I: не инфицированные, II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или III: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad_Si2. По оси y указана интенсивность окрашивания антителами против Мус (условные единицы). По оси x показано время инфицирования в минутах.

(С) Количественное определение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против Мус содержимого клеток. Клетки HeLa инфицировали в течение 1 ч *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad_Si2 при MOI, указанном на оси x. Данные объединены из n=20 областей. Показатели ошибки означают стандартную ошибку среднего. На оси Y показана интенсивность окрашивания антителами против Мус (y.e.).

Фиг. 3. Модификация доставки белка на основе T3SS обеспечивает локализацию гибридного белка YopE₁₋₁₃₈ (EGFP) в ядре клетки.

Сигнал EGFP в клетках HeLa, инфицированных I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd или II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd ΔyopB, несущей плазмиды III: +YopE₁₋₁₃₈-EGFP или IV: +YopE₁₋₁₃₈-EGFP-NLS, при MOI, равной 100. Сигнал EGFP показан на иллюстрациях "а". Для сравнения локализации на иллюстрациях "b" окрашены ядра.

Фиг. 4. Модификация доставки белка на основе T3SS обеспечивает удаление придатка YopE₁₋₁₃₈.

Клетки HeLa одновременно инфицировали двумя различными штаммами *Y. enterocolitica*, что достигалось простым смешиванием двух бактериальных суспензий. Один штамм выполняет доставку протеазы TEV, присоединенной к YopE₁₋₁₃₈, в то время как другой штамм выполняет доставку требуемого белка, присоединенного к YopE₁₋₁₃₈ линкером, содержащим двойной сайт расщепления для протеазы TEV. После доставки белка в эукариотическую клетку протеаза TEV должна отщеплять придаток YopE₁₋₁₃₈ от требуемого белка.

(А) Клетки HeLa, лизированные дигитонином, не инфицированные (II) или после инфекции (MOI=100) в течение 2 ч I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и III: +pBadSi₂, IV: +YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-Flag-INK4C, V: +YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-Flag-INK4C, и дополнительно обработанные в течение ночи очищенной протеазой TEV, и VI: +YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-Flag-INK4C, и второй штамм +YopE₁₋₁₃₈-TEV, анализировали посредством вестерн-блоттинга с применением антитела против INK4C (показано на иллюстрациях "а") на предмет наличия YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-Flag-INK4C или его расщепленной формы Flag-INK4C. В качестве контроля загрузки выполняли вестерн-блоттинг антител против актина (показано на иллюстрациях "b"). В одном случае (V) лизированные клетки инкубировали в течение ночи с очищенной протеазой TEV.

(В) Количественное определение с нормировкой по актину интенсивности окрашивания антителами против INK4C (показано в (y.e.) по оси y) данных с иллюстрации (А) в масштабе полноразмерного YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-Flag-INK4C, где образец IV принят за 100%. I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и IV: +YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-Flag-INK4C, V: +YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-Flag-INK4C, и дополнительно обработанные в течение ночи очищенной протеазой TEV, и VI: +YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-Flag-INK4C, и второй штамм YopE₁₋₁₃₈-TEV. Данные объединили из n=2 независимых экспериментов. Показатели ошибки означают стандартную ошибку среднего.

(С) Клетки HeLa, лизированные дигитонином, не инфицированные (II) или после инфекции (MOI=100) в течение 2 ч I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и III: +pBadSi₂, IV: +YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расще-

пления TEV-ET1-Мус, V: +YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-ET1-Мус и дополнительно обработанные в течение ночи очищенной протеазой TEV, и VI: +YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-ET1-Мус, и второй штамм +YopE₁₋₁₃₈-TEV, анализировали посредством вестерн-блоттинга с применением антитела против Мус (показано на иллюстрациях "а") на предмет наличия YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-ET1-Мус или его расщепленной формы ET1-Мус. В качестве контроля загрузки выполняли вестерн-блоттинг антител против актина (показано на иллюстрации "б"). В одном случае (V) лизированные клетки инкубировали в течение ночи с очищенной протеазой TEV.

Фиг. 5. Доставка бактериальных эффекторных белков в эукариотические клетки.

(А) Клетки HeLa инфицировали I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущими II: pBad_Si2 или III: YopE₁₋₁₃₈-SopE при MOI, равной 100, в течение времени, указанного выше на изображениях (2, 10 или 60 мин). После фиксации в клетках окрашивали актиновый цитоскелет.

(В) Клетки HeLa оставляли не инфицированными (II) или инфицировали I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущими III: YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус, и в некоторых случаях совместно инфицировали IV: YopE₁₋₁₃₈-SptP при MOI, указанной под штаммом (MOI 50; MOI 50:MOI 50 или MOI 50:MOI 100) в течение 1 ч. После фиксации в клетках окрашивали актиновый цитоскелет (показано на иллюстрации "а"), а затем окрашивали на предмет наличия гибридного белка YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус с использованием антитела против Мус (показано на иллюстрации "б").

Фиг. 6. Доставка бактериальных эффекторных белков в эукариотические клетки.

(А) Вестерн-блоттинг фосфо-p38 ("а"), общего p38 ("б") и актина ("с") на клетках HeLa, оставленных не инфицированными (II) или инфицированными в течение 75 мин I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущими III: pBad_Si2 или IV: YopE₁₋₁₃₈-OspF при MOI, равной 100. Клетки стимулировали ФНОα в течение последних 30 после инфицирования, как указано (+ означает добавление ФНОα, - означает отсутствие обработки ФНОα).

(В) Вестерн-блоттинг фосфо-Akt T308 ("а"), и S473 ("б"), и актина ("с") на клетках HeLa, оставленных не инфицированными (II) или инфицированными в течение 22,5 или 45 мин (указано под результатами блоттинга) I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущими III: pBad_Si2, IV: YopE₁₋₁₃₈-SopE или V: YopE₁₋₁₃₈-SopB при MOI, равной 100.

(С) Уровни цАМФ (в фмоль/лунку, показаны на оси у) в клетках HeLa, оставленных не инфицированными (I) или инфицированными в течение 2,5 ч V: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd +YopE₁₋₁₃₈-BepA, VI: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-BepA_{E305-end}, VII: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-BepG_{Bid} или VIII: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad_Si2 при MOI, равной 100. В качестве положительного контроля к образцам II (1 мкг/мл), III (25 мкг/мл) или IV (50 мкг/мл) добавили холерный токсин (СТ) на 1 ч. Данные объединили из n=3 независимых экспериментов, показатели ошибки означают стандартную ошибку среднего. Статистический анализ выполнили с использованием непарного двустороннего t-критерия (ns означает незначимое изменение, ** означает значение p<0,01, *** означает значение <0,001).

Фиг. 7. Доставка tBid человека в эукариотические клетки индуцирует интенсивный апоптоз.

(А) Вестерн-блоттинг p17 расщепленной каспазы 3 ("а") и актина ("б") в клетках HeLa, оставленных не инфицированными (II) или инфицированными в течение 60 мин I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущими III: pBad_Si2, IV: YopE₁₋₁₃₈-Bid или V: YopE₁₋₁₃₈-t-Bid при MOI, равной 100. В некоторых случаях клетки обрабатывали VI: 0,5 мкМ стауроспорина или VII: 1 мкМ стауроспорина.

(В) Клетки HeLa, лизированные лигитонином и оставленные не инфицированными (II) или после инфекции в течение 1 ч I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd, несущими III: pBad_Si2, IV: YopE₁₋₁₃₈-Bid или V: YopE₁₋₁₃₈-t-Bid при MOI, равной 100, анализировали вестерн-блоттингом с использованием антитела против Bid ("а"), обеспечивающим сравнение эндогенных уровней Bid (обозначено как Z) с уровнем транслоцированного YopE₁₋₁₃₈-Bid (обозначено как X) или YopE₁₋₁₃₈-tBid (обозначено как Y). В качестве контроля загрузки выполняли вестерн-блоттинг антител против актина (показано на иллюстрации "б"). В некоторых случаях клетки обрабатывали VI: 0,5 мкМ стауроспорина или VII: 1 мкМ стауроспорина.

(С) Клетки HeLa оставляли не инфицированными (I) или инфицировали при MOI, равной 100, в течение 1 ч II: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad_Si2, III: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-Bid, IV: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-tBid. В некоторых случаях клетки обрабатывали V: 0,5 мкМ стауроспорина или VI: 1 мкМ стауроспорина. После фиксации в клетках окрашивали актиновый цитоскелет (серый цвет).

Фиг. 8. tBid-зависимый фосфопротеом.

Клетки HeLa инфицировали в течение 30 мин *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-t-Bid при MOI, равной 100, а в качестве контроля - *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad_Si2.

(А) Графическое представление фосфопротеома tBid. Белки, содержащие фосфопротеиды, регуляция которых значимым образом зависела от tBid (серый цвет) (значение q<0,01), а также известные белки, связанные с апоптозом (темно-серый цвет), представлены в сети STRING известных и прогнозируемых белок-белковых взаимодействий (высокая достоверность, балльная оценка 0,7). Представлены лишь белки с по меньшей мере одной связью в STRING.

(В) Конфокальные изображения клеток HeLa, инфицированных *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad_Si2 (I) или *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-t-Bid (II) позволили выявить индукцию апоптозного фенотипа при доставке tBid. Ядра клеток окрашивали красителем Хехста ("а"), F-актин - фаллоидином ("б"), тубулин - антителом против тубулина ("с"), а митохондрии - красителем для отслеживания митохондрий ("д"). Масштабная линейка: 40 мкм.

Фиг. 9. Описание набора инструментов для доставки на основе секреции III типа.

(А) Векторные карты плазмид для клонирования pBad_Si1 и pBad_Si2, использованных для получения гибридных конструкторов с YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и гибрид YopE₁₋₁₃₈ под управлением нативного промотора *Y. enterocolitica*. Две плазмиды различаются только наличием EGFP, индуцируемого арабинозой и присутствующего в pBad_Si1.

(В) Полилинкер непосредственно после фрагмента yopE₁₋₁₃₈ на плаزمиде pBad_Si1 и pBad_Si2.

Фиг. 10. Исследование характеристик ТЗСС-доставки белка в клетки различных линий.

Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против Мыс фибробластов Swiss 3T3 ("а"), клеток Jurkat ("б") и клеток HUVEC ("с"), оставленных не инфицированными (II) или инфицированными *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+pBad_Si2 (I) при MOI, указанной над изображениями (MOI 25, 50, 100, 200 и 400 для клеток HUVEC) в течение 1 ч.

Фиг. 11. Зависимость доставки бактериальных эффекторных белков в эукариотические клетки от ТЗСС.

Клетки HeLa, лизированные дигитонином после инфекции при MOI, равной 100, в течение времени, указанного над результатами блоттинга (0, 5, 15, 10, 60 и 120 мин) *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мыс (I) или *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мыс (II), анализировали вестерн-блоттингом с использованием антител против Мыс. Размер, соответствующий YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мыс, обозначен как "а", в то время как размер эндогенного белка с-Мыс обозначен как "б".

Фиг. 12 и 13. ТЗСС-зависимая секреция различных других белков в надосадочную жидкость культуры.

Эксперимент по секреции in vitro I: *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈, присоединенного к белку, как указано. Содержание белка в общих бактериальных лизатах ("А") и надосадочной жидкости осажденных культур ("В") анализировали вестерн-блоттингом с использованием антитела против YopE. Приведенные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 14А-14N. Штаммы *Y. enterocolitica* и *S. enterica*, использованные в данном исследовании.

Список штаммов *Y. enterocolitica* и *S. enterica*, использованных в данном исследовании, содержит информацию о фоновых штаммах, плаزمиде и белках для ТЗСС-зависимой доставки, кодируемых соответствующими плазмидами. Кроме того, приведена информация об олигонуклеотидах, использованных для конструирования соответствующей плазмиды, каркаса плазмиды и маркерах устойчивости к антибиотикам.

Фиг. 15. Доставка tBid мыши, Bid BH3 мыши и Bax BH3 мыши в клетки B16F10 индуцирует интенсивный апоптоз.

Клетки B16F10, не инфицированные (I) или после инфекции (MOI=50) в течение 2,5 ч *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: +pBadSi_2, III: +YopE₁₋₁₃₈-tBid мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica*, IV: +YopE₁₋₁₃₈-Bid BH₃ мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica* или V: +YopE₁₋₁₃₈-Bax BH₃ мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica*. После фиксации в клетках окрашивали актиновый цитоскелет и ядра (серый цвет).

Фиг. 16. Доставка tBid мыши, Bid BH3 мыши и Bax BH3 мыши в клетки D2A1 индуцирует интенсивный апоптоз.

Клетки D2A1, не инфицированные (I) или после инфекции (MOI=50) в течение 2,5 ч *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: +pBadSi_2, III: +YopE₁₋₁₃₈-tBid мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica*, IV: +YopE₁₋₁₃₈-Bid BH₃ мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica* или V: +YopE₁₋₁₃₈-Bax BH₃ мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica*. После фиксации в клетках окрашивали актиновый цитоскелет и ядра (серый цвет).

Фиг. 17. Доставка tBid мыши, Bid BH3 мыши и Bax BH3 мыши в клетки HeLa индуцирует интенсивный апоптоз.

Клетки HeLa, не инфицированные (I) или после инфекции (MOI=50) в течение 2,5 ч *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: +pBadSi_2, III: +YopE₁₋₁₃₈-tBid мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica*, IV: +YopE₁₋₁₃₈-Bid BH₃ мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica* или V: +YopE₁₋₁₃₈-Bax BH₃ мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica*. После фиксации в клетках окрашивали актиновый цитоскелет и ядра (серый цвет).

Фиг. 18. Доставка tBid мыши, Bid BH3 мыши и Bax BH3 мыши в клетки 4T1 индуцирует интенсивный апоптоз.

Клетки 4T1, не инфицированные (I) или после инфекции (MOI=50) в течение 2,5 ч *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd и II: +pBadSi_2, III: +YopE₁₋₁₃₈-tBid мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica*, IV: +YopE₁₋₁₃₈-Bid BH₃ мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica* или V: +YopE₁₋₁₃₈-Bax

ВНЗ мыши после оптимизации кодонов для *Y. enterocolitica*. После фиксации в клетках окрашивали актиновый цитоскелет и ядра (серый цвет).

Фиг. 19. Доставка tBid мыши *S. enterica*, выращенными в условиях индукции SPI-1 T3SS, в эукариотические клетки индуцирует апоптоз.

(А) Вестерн-блоттинг p17 расщепленной каспазы 3 в клетках HeLa, оставленных не инфицированными (I) или инфицированными в течение 4 ч III: *S. enterica* aroA, несущими IV: SteA₁₋₂₀-t-Bid, V: SteA_{FL}-Bid, VI: SopE₁₋₈₁-t-Bid или VII: SopE₁₋₁₀₅-t-Bid при MOI, равной 100. Для данного эксперимента все штаммы *S. enterica* aroA выращивали в условиях индукции SPI-1 T3SS. В некоторых случаях клетки обрабатывали II: 1 мкМ стауропорина. Приведенные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 20. Доставка tBid мыши *S. enterica*, выращенными в условиях индукции SPI-2 T3SS, в эукариотические клетки индуцирует апоптоз.

(А) Вестерн-блоттинг p17 расщепленной каспазы 3 в клетках HeLa, оставленных не инфицированными (I) или инфицированными в течение 4 ч III: *S. enterica* aroA, несущими IV: SteA₁₋₂₀-t-Bid, V: SteA_{FL}-Bid, VI: SopE₁₋₈₁-t-Bid или VII: SopE₁₋₁₀₅-t-Bid при MOI, равной 100. Для данного эксперимента все штаммы *S. enterica* aroA выращивали в условиях индукции SPI-2 T3SS. В некоторых случаях клетки обрабатывали II: 1 мкМ стауропорина. Приведенные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 21. *S. enterica* T3SS-зависимая секреция различных белков клеточного цикла в надосадочную жидкость культуры.

Эксперимент по секреции *in vitro* *S. enterica* aroA+SteA_{FL} (I, III, V, VII) или SopE₁₋₁₀₅ (II, IV, VI, VIII), присоединенных к белкам из следующего списка. I и II: Ink4a-MycHis; III и IV: Ink4c-MycHis; V и VI: Mad2-MycHis; VII и VIII: Cdk1-MycHis. Содержание белка в надосадочной жидкости осажденных культур ("А") и общих бактериальных лизатах ("В") анализировали вестерн-блоттингом с использованием антитела против Мус. Приведенные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 22. T3SS-зависимая секреция различных известных белков, влияющих на клеточный цикл, в надосадочную жидкость культуры.

Эксперимент по секреции *in vitro* I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT asd+pBad_Si2. II-VII: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT asd+YopE₁₋₁₃₈, присоединенных к пептидам из следующего списка: II: Ink4A₈₄₋₁₀₃; III: p107/RBL1₆₅₇₋₆₆₂; IV: p21_{141-160D149A}; V: p21_{145-160D149A}; VI: p21₁₇₋₃₃; VII: циклин D2₁₃₉₋₁₄₇. Содержание белка в надосадочной жидкости осажденных культур ("А") и общих бактериальных лизатах ("В") анализировали вестерн-блоттингом с использованием антитела против YopE. Приведенные числа обозначают молекулярную массу в кДа на соответствующей высоте.

Фиг. 23. Присоединение белка, доставляемого T3SS, к убиквитину обеспечивает удаление придатка YopE₁₋₁₃₈.

Клетки HeLa инфицировали штаммом, доставляющим требуемый белок, присоединенный к YopE₁₋₁₃₈ с непосредственно присоединенным убиквитином (YopE₁₋₁₃₈-Ubi). После доставки белка в эукариотическую клетку эндогенные убиквитин-специфические протеазы должны отщеплять придаток YopE₁₋₁₃₈-Ubi от требуемого белка. Клетки HeLa, лизированные дигитонином и не инфицированные (I) или после инфекции (MOI=100) в течение 1 ч II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT asd+YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-MycHis или III: +YopE₁₋₁₃₈-Flag-убиквитин-INK4C-MycHis анализировали вестерн-блоттингом с использованием антитела против INK4C на предмет наличия IV: YopE₁₋₁₃₈-Flag-убиквитин-INK4C-MycHis или V: YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-MycHis, расщепленной формы VI: INK4C-MycHis и VII: эндогенного INK4C.

Фиг. 24. Плазмида вирулентности *Yersinia enterocolitica* W227 - pYV.

Плазмида вирулентности *Yersinia* размером 69673 п.о. (pYV) штамма W227, изображенная в масштабе. T3SS-эффекторные белки, сайт инициации репликации и маркеры устойчивости к мышьяку (кодируемые генами arsC, B, R и H) обозначены: I: сайт инициации репликации, II: yopO, III: yopP, IV: yopQ, V: yopT, VI: sycT, VII: yopM, VIII: yopD, IX: yopB, X: sycD, XII: yopH, XIII: sycH, XIV: sycE, XV: yopE, XVI: yadA, XVII-XVXX: arsC, B, R и H.

Фиг. 25. Проверка делеции yop посредством анализа секреции *in vitro*.

Анализ секреции *in vitro* I: *Y. enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T asd, II: *Y. Enterocolitica* MRS40 д.т., III: *Y. enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T asd+p-yopE. Отметки справа обозначают высоту специфических белков Yop: IV: YopO, V: YopH, VI: YopM, VII: YopE.

Фиг. 26. Исследование с увеличением дозы у иммунокомпетентных мышей: масса мышей.

Массу мышей оценивали ежедневно после в/в инфицирования бактериями. I: время, сут, II: масса в граммах, III: *Y. enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T asd, TV: *S. enterica* ΔagoA, вводимые в/в в указанном количестве (10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ КОЕ на животное).

Фиг. 27. Исследование с увеличением дозы у иммунокомпетентных мышей: количество в крови.

Количество в крови в указанное время оценивали последовательным разведением и подсчетом полученных колониеобразующих единиц (КОЕ). I: время, сутки, II: КОЕ на мл, III: *Y. enterocolitica* ΔyopH,

О, Р, Е, М, Т асd, IV: *S. enterica* ΔaroA, вводимые в/в в указанном количестве (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 КОЕ на животное).

Фиг. 28. Исследование с увеличением дозы у иммунокомпетентных мышей: количество в печени.

Количество в печени в указанное время оценивали гомогенизированием органа, последовательным разведением и подсчетом полученных колониеобразующих единиц (КОЕ). I: время, сутки, II: КОЕ на г, III: *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т асd, IV: *S. enterica* ΔaroA, вводимые в/в в указанном количестве (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 КОЕ на животное).

Фиг. 29. Исследование с увеличением дозы у иммунокомпетентных мышей: количество в легких.

Количество в легких в указанное время оценивали гомогенизированием органа, последовательным разведением и подсчетом полученных колониеобразующих единиц (КОЕ). I: время, сутки, II: КОЕ на г, III: *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т асd, IV: *S. enterica* ΔaroA, вводимые в/в в указанном количестве (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 КОЕ на животное).

Фиг. 30. Исследование с увеличением дозы у иммунокомпетентных мышей: количество в селезенке.

Количество в селезенке в указанное время оценивали гомогенизированием органа, последовательным разведением и подсчетом полученных колониеобразующих единиц (КОЕ). I: время, сутки, II: КОЕ на г, III: *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т асd, IV: *S. enterica* ΔaroA, вводимые в/в в указанном количестве (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 КОЕ на животное).

Фиг. 31. Биораспределение *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* на модели аллотрансплантата меланомы B16F10 у мыши: балльная оценка внешнего вида.

I: время, сут, II: оценка, III: *Y. enterocolitica* MRS40 д.т., IV: *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т. Стрелками указан день в/в инфицирования 2×10^5 бактерий.

Фиг. 32. Биораспределение *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* на модели аллотрансплантата меланомы B16F10 у мыши: балльная оценка поведения.

I: время, сут, II: оценка, III: *Y. enterocolitica* MRS40 д.т., IV: *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т. Стрелками указан день в/в инфицирования 2×10^5 бактерий.

Фиг. 33. Биораспределение *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* на модели аллотрансплантата меланомы B16F10 у мыши: масса мышей.

Массу мышей оценивали ежедневно после в/в инфицирования бактериями. I: время, сут, II: масса тела в граммах, III: *Y. enterocolitica* MRS40 д.т., IV: *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т. Стрелками указан день в/в инфицирования 2×10^5 бактерий.

Фиг. 34. Биораспределение *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* на модели аллотрансплантата меланомы B16F10 у мыши: биораспределение *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т.

Количество в органах в указанное время оценивали гомогенизированием органа, последовательным разведением и подсчетом полученных колониеобразующих единиц (КОЕ). I: *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т, II: КОЕ на грамм ткани, III: день 1, IV: день 4, V: кровь, VI: селезенка, VII: печень, VIII: легкие, IX: опухоль. * Обозначает мышь без видимой опухоли.

Фиг. 35. Биораспределение *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* на модели аллотрансплантата меланомы B16F10 у мыши: биораспределение *Y. enterocolitica* MRS40 д.т.

Количество в органах в указанное время оценивали гомогенизированием органа, последовательным разведением и подсчетом полученных колониеобразующих единиц (КОЕ). I: *Y. enterocolitica* MRS40 д.т., II: КОЕ на грамм ткани, III: день 1, IV: день 4, V: кровь, VI: селезенка, VII: печень, VIII: легкие, IX: опухоль.

Фиг. 36. Биораспределение *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* на модели аллотрансплантата рака молочной железы 4T1 у мыши: биораспределение *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т.

Количество в органах на 8 день после инфекции оценивали гомогенизированием органа, последовательным разведением и подсчетом полученных колониеобразующих единиц (КОЕ). I: *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т, II: КОЕ на грамм ткани, III: кровь, IV: селезенка, V: печень, VI: легкие, VII: опухоль.

Фиг. 37. Доставка синтетических белков с усиленной проапоптозной активностью.

Доставка одиночных синтетических белков, содержащих одиночные или tandemные повторы доменов BH3, происходящих от проапоптозных белков t-Bid или Bax, приводит к индукции усиленного апоптоза в раковых клетках 4T1 и B16F10. Клетки 4T1 (I) или B16F10 (II) инфицировали *Y. enterocolitica* ΔyopH, О, Р, Е, М, Т, кодирующими на pBad-MycHisA IV: YopE₁₋₁₃₈-расширенный домен BH3 tBid, V: YopE₁₋₁₃₈-линкер-tBid BH3, VI: YopE₁₋₁₃₈-tBid BH3, VII: YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂, VIII: YopE₁₋₁₃₈-tBid BH3 - Bax BH3 или IX: YopE₁₋₁₃₈-Bax BH3 - tBid BH3. Титрование бактерий, добавляемых к клеткам (МОИ), выполняли для каждого штамма, определяли количество клеток и рассчитывали IC50 с использованием нелинейной регрессии. Указана МОИ IC50 (III).

Фиг. 38. Индукция апоптоза синтетическими проапоптозными белками, кодируемыми pYV.

Доставка одиночного или tandemного повтора домена BH3 Bid, кодируемого pYV, приводит к индукции апоптоза в раковых клетках 4T1 и B16F10. Клетки 4T1 (I) или B16F10 (II) инфицировали *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ+IV: pYV-YopE₁₋₁₃₈-BH3-Bid, или V: +pYV-YopE₁₋₁₃₈-(BH3-Bid)₂, или VI: *Y. entero-*

colitica ΔНОРЕМТ pBad-MycHisA-YopE₁₋₁₃₈-(BH3-Bid)₂ в течение 3 ч. Титрование бактерий, добавляемых к клеткам (МОГ), выполняли для каждого штамма, определяли количество клеток и рассчитывали IC50 (III) с использованием нелинейной регрессии.

Фиг. 39. Колонизация опухоли в/в введенными *Y. enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T на модели аллотрансплантата рака молочной железы 4T1.

Количество бактерий в опухолях указано в колониеобразующих единицах (КОЕ) на грамм ткани (III). Количество оценивали в опухолях на 8 (I) и 14 день (II) после инфекции. Каждая точка представляет собой отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия обозначает предел обнаружения.

Фиг. 40. Биораспределение в/в введенными *Y. enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T на модели аллотрансплантата рака молочной железы 4T1.

Количество бактерий в крови (I), селезенке (II), печени (III), легких (IV) и опухоли (V) указано в колониеобразующих единицах (КОЕ) на грамм ткани (III) или на мл крови (VI). Количество оценивали на 14 день после инфекции. Каждая точка представляет собой отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия обозначает предел обнаружения. * Обозначает мышь с крупным метастазом, обнаруженным в легком.

Фиг. 41. Задержка прогрессирования опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы 4T1.

Мышам Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы 4T1 в/в вводили I: PBS или II: 1×10^7 *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ+pYV-YopE₁₋₁₃₈-(BH3-Bid)₂ после достижения опухолью размера 150-250 мм³. День в/в введения бактерий обозначали как день 0. Объем опухоли измеряли в следующие дни (III; с 0 по 9 день после в/в инъекции бактерий) штангенциркулем. Относительный объем опухоли, нормированный по объему опухоли в 0 день, указан (IV) в мм³. Среднее значение обозначено символами, приведенные показатели ошибки обозначают стандартную ошибку среднего.

Статистическую значимость измеряли посредством двухфакторного дисперсионного анализа, * обозначает значение $p < 0,05$, ** - значение $p < 0,005$.

Фиг. 42. Прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы 4T1.

Мышам Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы 4T1 в/в вводили I: PBS или II: 1×10^7 *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ после достижения опухолью размера 150-250 мм³. День в/в введения бактерий обозначали как день 0. Объем опухоли измеряли в следующие дни (III; с 0 по 9 день после в/в инъекции бактерий) штангенциркулем. Относительный объем опухоли, нормированный по объему опухоли в 0 день, указан (IV) в мм³. Среднее значение обозначено символами, приведенные показатели ошибки обозначают стандартную ошибку среднего.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным штаммам грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта.

Для интерпретации этого описания используются следующие определения. В соответствующих случаях термины в единственном числе также включают формы множественного числа и наоборот. Следует понимать, что терминология, используемая здесь, приведена исключительно с целью описания конкретных вариантов воплощения и не предназначена для ограничения.

Термин "штамм грамотрицательной бактерии" в настоящем документе включает следующие бактерии:

Aeromonas salmonicida, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*,
Anaeromyxobacter dehalogenans, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*,
Bordetella pertussis, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter rodentium*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Edwardsiella tarda*,
Endozoicomonas elysicola, *Erwinia amylovora*, *Escherichia albertii*, *Escherichia coli*,
Lawsonia intracellularis, *Mesorhizobium loti*, *Myxococcus xanthus*, *Pantoea agglomerans*,
Photobacterium damsela, *Photobacterium luminescens*, *Photobacterium temperate*,

Pseudoalteromonas spongiae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium sp*, *Salmonella enterica* and other *Salmonella sp*, *Shigella flexneri* и другие виды *Shigella sp*, *Sodalis glossinidius*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *Vibrio campellii*, *Vibrio caribbenthicus*, *Vibrio harvey*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio tubiashii*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Предпочтительные штаммы грамотрицательных бактерий согласно настоящему изобретению включают семейства Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae. Штамм грамотрицательной бактерии согласно настоящему изобретению обычно применяют для доставки гетерологичных белков бактериальной T3SS в эукариотические клетки *in vitro* и/или *in vivo*, предпочтительно *in vivo*.

Термин "рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью" в настоящем документе относится к рекомбинантному штамму грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, трансформированному вектором. Вектор, который можно применять согласно настоящему изобретению, представляет собой, например, экспрессирующий вектор, вектор для инсерции в хромосому или плазмиду вирулентности или фрагмент ДНК или РНК для инсерции или модификации хромосомы или плазмиды вирулентности. Вирулентность такого рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии обычно ослаблена путем делеции бактериального эффекторного белка, обладающего вирулентной активностью, транспортируемого одним или более из бактериальных белков, являющихся частью механизма систем секреции. Такие эффекторные белки доставляются механизмами систем секреции в клетки-хозяева, где они могут проявлять свою вирулентную активность по отношению к различным белкам и клеточным механизмам хозяина. Известно большое количество различных эффекторных белков, транспортируемых системами секреции различных типов и обладающих широким репертуаром биохимической активности, модулирующей функции регуляторных молекул хозяина. Вирулентность рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, применяемого в настоящем изобретении, можно дополнительно ослабить за счет отсутствия сидерофора, в норме или эпизодически продуцируемого штаммом грамотрицательной бактерии, так что указанный штамм не продуцирует сидерофора, например, является дефектным по продукции сидерофора. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации в способах согласно настоящему изобретению применяют рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, характеризующийся отсутствием сидерофора, в норме или эпизодически продуцируемого штаммом грамотрицательной бактерии, так что указанный штамм не продуцирует сидерофора, например, является дефектным по продукции сидерофора; более предпочтительно в способах согласно настоящему изобретению применяют штамм *Yersinia*, в частности *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T, характеризующийся отсутствием сидерофора, в норме или эпизодически продуцируемого штаммом грамотрицательной бактерии, так что указанный штамм не продуцирует сидерофора, например, является дефектным по продукции сидерофора. Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, предпочтительно не продуцирует по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух сидерофоров, например, является дефектным по продукции по меньшей мере одного, более предпочтительно по меньшей мере двух сидерофоров; более предпочтительно рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, не продуцирует сидерофоров.

Термины "сидерофор", "сидерофор железа" или "хелатор железа", применяемые в настоящем документе на равных основаниях, относятся к соединениям с высоким сродством к железу, например небольшим соединениям с высоким сродством к железу. Сидерофоры грамотрицательных бактерий представляют собой, например, энтеробактин и дигидроксibenзоилсерин, синтезируемые *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Serratia* (но используемые всеми энтеробактериями), пиовердины, синтезируемые *Pseudomonas*, вибробактин, синтезируемый *Vibrio*, ацинетобактин и ацинетоферрин *Acinetobacter*, иерсиниябактин и аэробактин, синтезируемые *Yersinia*, орнибактин, синтезируемый *Burkholderia*, сальмохелин, синтезируемый *Salmonella*, аэробактин, синтезируемый *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* и *Yersinia*, алкалагин, синтезируемый *Bordetella*, бусикаберин, синтезируемый *Vibrio*.

Сидерофоры включают гидроксаматные, катехолатные и смешанно-лигандные сидерофоры. Некоторые сидерофоры на данный момент одобрены для применения у людей в основном с целью лечения перенасыщения железом. Предпочтительными сидерофорами являются дефероксамин (также известный как дезферриоксамин В, дезфероксамин В, DFO-B, DFOA, DFB или дезферал), дезферриоксамин Е, деферазирокс (эксиджад, дезирокс, дефриджет, дезифер) и деферипрон (феррипрокс).

Термины "штамм грамотрицательной бактерии, дефектный по продукции аминокислоты, необходимой для роста" и "ауксотрофный мутант" используются в настоящем документе на равных основаниях и относятся к штаммам грамотрицательных бактерий, неспособным расти в отсутствие по меньшей мере одной экзогенной незаменимой аминокислоты или ее предшественника. Аминокислота, по продукции

которой штамм является дефектным, представляет собой, например, аспартат, мезо-2,6-диаминопимелиновую кислоту, ароматические аминокислоты или лейцин-аргинин [1]. Такой штамм можно получить, например, посредством делеции гена аспартат-бета-полуальдегиддегидрогеназы (*Dasd*). Такой ауксотрофный мутант не может расти в отсутствие экзогенной мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты [2]. Мутация, например, делеция гена аспартат-бета-полуальдегиддегидрогеназы в настоящем документе является предпочтительной для штамма грамотрицательной бактерии, дефектного по продукции аминокислоты, необходимой для роста, согласно настоящему изобретению.

Термин "штамм грамотрицательной бактерии, дефектный по продукции белков адгезии, связывающихся с поверхностью или внеклеточным матриксом эукариотической клетки" относится к мутантным штаммам грамотрицательных бактерий, не экспрессирующим по меньшей мере один белок адгезии по сравнению с белками адгезии, экспрессируемыми соответствующим штаммом дикого типа. Белки адгезии могут включать, например, длинные полимерные молекулы адгезии, например пили/фимбрии или адгезины, не имеющие отношения к фимбриям. Адгезины фимбрий включают пили 1 типа (например, Fim-пили *E.coli* с адгезином FimH), Р-пили (например, Pap-пили с адгезином PapG *E.coli*), пили 4 типа (в частности, белок пилин, например *P. aeruginosa*) или карлин (белки Csg с адгезином CsgA *S. enterica*). Адгезины, не имеющие отношения к фимбриям, включают трехчленные аутотранспортные адгезины, например YadA *Y. enterocolitica*, BpaA (*B. pseudomallei*), Hia (*H. influenzae*), BadA (*B. henselae*), NadA (*N. meningitidis*) или UspA1 (*M. catarrhalis*), а также другие аутотранспортные адгезины, например AIDA-1 (*E.coli*), а также другие адгезины/инвазины, например InvA *Y. enterocolitica* или интимин (*E.coli*) или члены семейства Dr или семейства Afa (*E.coli*). Термины YadA и InvA в настоящем документе относятся к белкам *Y. enterocolitica*. Аутотранспортер YadA [3] связывается с различными формами коллагена, а также фибронектином, в то время как инвазин InvA [4] связывается с β -интегринами мембраны эукариотической клетки. Если штамм грамотрицательной бактерии представляет собой штамм *Y. enterocolitica*, то этот штамм предпочтительно является дефектным по InvA и/или YadA.

В настоящем документе термин "семейство Enterobacteriaceae" включает семейство грамотрицательных палочковидных факультативно анаэробных бактерий, встречающихся в почве, воде, организмах растений и животных, которые часто выступают в качестве патогенов у позвоночных. Бактерии этого семейства обладают сходной физиологией и демонстрируют консервативность функциональных элементов и генов соответствующих геномов. Являясь оксидазо-негативными, все члены этого семейства сбраживают глюкозу и большинство восстанавливают нитрат. Бактерии Enterobacteriaceae согласно настоящему изобретению могут представлять собой любые бактерии этого семейства и специфически включают бактерии следующих родов:

Escherichia, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia*, *Morganella*, *Providencia* или *Yersinia*,

но не ограничиваются ими.

В более конкретных вариантах реализации указанная бактерия принадлежит к виду

Escherichia coli, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vuneris*, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Erwinia amylovora*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus hauseri*, *Providencia alcalifaciens* или *Morganella morganii*.

В предпочтительном случае штамм грамотрицательной бактерии выбирают из группы, состоящей из родов

Yersinia, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Vibrio*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Chromobacterium*, *Sodalis*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Rhizobiae*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Bordetella* и *Desulfovibrio*,

более предпочтительно - из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*, наиболее предпочтительно - из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*.

Термин "Yersinia" в настоящем документе включает все виды *Yersinia*, в том числе *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*. Предпочтительным является *Yersinia enterocolitica*.

Термин "Salmonella" в настоящем документе включает все виды *Salmonella*, в том числе *Salmonella enterica* и *S. bongori*. Предпочтительным является *Salmonella enterica*.

Термин "промотор" в настоящем документе относится к нуклеотидной последовательности, регулирующей экспрессию единицы транскрипции. "Область промотора" является регуляторной областью, способной связывать РНК-полимеразу в клетке и инициировать транскрипцию расположенной ниже (в

3'-направлении) кодирующей последовательности. В области промотора находится сайт инициации транскрипции (в целях удобства определяемый путем картирования с использованием нуклеазы S1), а также белок-связывающие домены (консенсусные последовательности), отвечающие за связывание РНК-полимеразы, а также гипотетическая область -35 и бокс Прибнова. Термин "функционально связанный" при описании взаимосвязи между двумя областями ДНК попросту означает, что они имеют функциональное отношение друг к другу и расположены на одном и том же фрагменте нуклеиновой кислоты. Промотор функционально связан со структурным геном, если он контролирует транскрипцию этого гена и расположен на том же фрагменте нуклеиновой кислоты, что и этот ген. Обычно промотор является функциональным в указанном штамме грамотрицательной бактерии, т.е. промотор способен экспрессировать гибридный белок согласно настоящему изобретению без дополнительных генно-инженерных манипуляций или экспрессии дополнительных белков. Кроме того, функциональный промотор не должен быть антагонистичным для бактериальной T3SS в естественных условиях.

Термин "доставка" в настоящем документе относится к транспорту белка из рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью в эукариотическую клетку, включая этапы экспрессии гетерологичного белка в рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, секреции экспрессированного(ых) белка(ов) из такого рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью и транслокации белка(ов), секретированного(ых) таким рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, в цитозоль эукариотической клетки. Соответственно термины "сигнал доставки" или "сигнал секреции", которые используются в настоящем документе на равных основаниях, относятся к полипептидной последовательности, которую может распознавать система секреции и транслокации штамма грамотрицательной бактерии и которая управляет доставкой белка из штамма грамотрицательной бактерии в эукариотические клетки.

Термин "сигнал доставки бактериального эффекторного белка" в настоящем документе относится к сигналу доставки бактериального эффекторного белка, функционального в рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии, т.е. позволяющего экспрессировать гетерологичный белок в рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии для секреции из такого рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с помощью системы секреции, например системы секреции III типа, или транслокации таким рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии в цитозоль эукариотической клетки с помощью системы секреции, например системы секреции III типа. Термин "сигнал доставки бактериального эффекторного белка" в настоящем документе также включает фрагмент сигнала доставки бактериального эффекторного белка, т.е. укороченную версию сигнала доставки, например сигнал доставки, содержащий до 10, предпочтительно до 120, более предпочтительно до 50, еще более предпочтительно до 100, в частности до 140, аминокислот сигнала доставки, например природного сигнала доставки. Таким образом, нуклеотидная последовательность, например последовательность ДНК, кодирующая сигнал доставки бактериального эффекторного белка, может кодировать полноразмерный сигнал доставки или его фрагмент, причем указанный фрагмент обычно содержит до 30, предпочтительно до 60, более предпочтительно до 150, еще более предпочтительно до 300, в частности до 420, нуклеотидов.

В настоящем документе термин "секреция" белка относится к транспорту гетерологичного белка во внешнюю среду через мембрану клетки рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью. "Транслокация" белка относится к транспорту гетерологичного белка из рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью через плазматическую мембрану эукариотической клетки в цитозоль такой эукариотической клетки.

Термин "бактериальный белок, являющийся частью механизма системы секреции" в настоящем документе относится к бактериальным белкам, представляющим собой важные компоненты бактериальной системы секреции 3 типа (T3SS), системы секреции 4 типа (T4SS) и системы секреции 6 типа (T6SS), предпочтительно T3SS. Без этих белков соответствующая система секреции не может транслоцировать белки в клетки-хозяева даже в случае кодирования и продукции всех остальных компонентов системы секреции и бактериального эффекторного белка, подлежащего транслокации.

Термин "бактериальный эффекторный белок" в настоящем документе относится к бактериальным белкам, транспортируемым системами секреции, например бактериальными белками, являющимися частью механизмов систем секреции в клетки-хозяева. Такие эффекторные белки доставляются системой секреции в клетку-хозяина, где они проявляют, например, вирулентную активность по отношению к различным белкам и клеточным механизмам хозяина. Известно большое количество различных эффекторных белков, транспортируемых системами секреции различных типов и обладающих широким репертуаром биохимической активности, модулирующей функции регуляторных молекул хозяина. Системы секреции включают систему секреции 3 типа (T3SS), систему секреции 4 типа (T4SS) и систему секреции 6 типа (T6SS). Некоторые эффекторные белки (например, IpaC *Shigella flexneri*) также принадлежат к классу бактериальных белков, являющихся частью механизмов систем секреции, и позволяют выполнять транслокацию белка. Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, используемый в настоящем документе, обычно содержит бактериальные белки, представляющие собой важные компоненты бактериальной системы секреции 3 типа (T3SS), системы секреции 4 типа

(T4SS) и/или системы секреции 6 типа (T6SS), предпочтительно системы секреции 3 типа (T3SS).

Термин "эффекторный белок T6SS", или "бактериальный эффекторный белок T6SS", в настоящем документе относится к белкам, в естественных условиях вводимым системами T6S в цитозоль эукариотических клеток или бактерий, и к белкам, в естественных условиях секретируемым системами T6S, способным, например, образовывать поры для транслокации в мембране эукариот. Термин "эффекторный белок T4SS", или "бактериальный эффекторный белок T4SS", в настоящем документе относится к белкам, в естественных условиях вводимым системами T4S в цитозоль эукариотических клеток, и к белкам, в естественных условиях секретируемым системами T4S, способным, например, образовывать пору для транслокации в мембране эукариот. Термин "эффекторный белок T3SS", или "бактериальный эффекторный белок T3SS", в настоящем документе относится к белкам, в естественных условиях вводимым системами T3S в цитозоль эукариотических клеток, и к белкам, в естественных условиях секретируемым системами T3S, способным, например, образовывать пору для транслокации в мембране эукариот, в том числе порообразующим транслокаторам (например, YopB и YopD *Yersinia*), и верхушечным белкам, (например, LcrV *Yersinia*). Предпочтительно использовать белки, в естественных условиях вводимые системами T3S в цитозоль эукариотических клеток. Эти факторы вирулентности должны парализовать или перепрограммировать эукариотическую клетку с получением благоприятного эффекта для патогена. Эффекторы T3S обладают широким репертуаром биохимической активности, модулируют функцию ключевых регуляторных молекул хозяина [5, 6] и включают

AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEpto, AvrPpiBpto, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE, семейство белков GALA, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaB, IpaC, IpaH, IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB, PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopB, YopD YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA.

Термин "рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, накапливающийся в злокачественной солидной опухоли", или "рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли", в настоящем документе относится к рекомбинантному штамму грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, который реплицируется в злокачественной солидной опухоли, тем самым увеличивая количество бактерий данного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью в злокачественной солидной опухоли. Как ни странно, обнаружено, что рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью после введения в организм субъекта специфически накапливается в злокачественной солидной опухоли, т.е. специфически накапливается в органе, где присутствует злокачественная солидная опухоль, причем количество бактерий рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью в органах без злокачественных солидных опухолей является низким или не обнаруживаемым.

В случае бактерий, локализующихся вне клетки, например *Yersinia*, бактерии в основном накапливаются во внеклеточном пространстве между опухолевыми клетками. Бактерии, растущие внутри клеток, например *Salmonella*, в основном внедряются в опухолевые клетки и располагаются внутри таких клеток, хотя возможно и накопление вне клеток. Количество бактерий рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, накапливающих в злокачественной солидной опухоли, может находиться, например, в диапазоне от 10^4 до 10^9 бактерий на грамм опухолевой ткани.

Термин "злокачественная солидная опухоль", или "показание злокачественной солидной опухоли", в настоящем документе относится к патологическому скоплению ткани, обычно не содержащему кист или жидких областей. Солоидные опухоли могут быть доброкачественными (не раковыми) или злокачественными (раковыми). Злокачественные солидные опухоли лечат с помощью способов согласно настоящему изобретению. Различные виды злокачественных солидных опухолей называют по типу образующих их клеток. Примерами злокачественных солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. При лейкозах (раке крови) злокачественные солидные опухоли обычно не образуются (согласно определению национального института рака NTH). Злокачественные солидные опухоли включают патологические скопления клеток, которые могут происходить из различных видов тканей, например печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишки, кожи, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почки, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной железы, желудка, яичка, щитовидной железы или легкого, и, таким образом, включать злокачественные солидные опухоли печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишки, кожи,

молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почки, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной железы, желудка, яичка, щитовидной железы или легкого, но не ограничиваются ими. Предпочтительные злокачественные солидные опухоли, которые можно лечить способами согласно настоящему изобретению, представляют собой злокачественные солидные опухоли, происходящие из кожи, молочной железы, печени, поджелудочной железе, мочевого пузыря, предстательной железы и толстой кишки, и, таким образом, представляют собой злокачественные солидные опухоли кожи, молочной железы, печени, поджелудочной железе, мочевого пузыря, предстательной железы и толстой кишки. Столь же предпочтительные злокачественные солидные опухоли, которые можно лечить способами согласно настоящему изобретению, представляют собой злокачественные солидные опухоли, ассоциированные с раком печени, например гепатоцеллюлярную карциному.

Термин "бактериальный эффекторный белок, вирулентный по отношению к эукариотическим клеткам" в настоящем документе относится к бактериальным эффекторным белкам, транспортируемым системами секреции в клетки-хозяева, где они проявляют свою вирулентную активность по отношению к различным белкам и клеточным механизмам хозяина. Известно большое количество различных эффекторных белков, транспортируемых системами секреции различных типов и обладающих широким репертуаром биохимической активности, модулирующей функции регуляторных молекул хозяина. Системы секреции включают систему секреции 5 типа (T3SS), систему секреции 4 типа (T4SS) и систему секреции 6 типа (T6SS). Важно, что некоторые эффекторные белки, являющиеся вирулентными по отношению к эукариотическим клеткам (например, IpaC *Shigella flexneri*), также принадлежат к классу бактериальных белков, являющихся частью механизмов систем секреции. Если бактериальный эффекторный белок, вирулентный по отношению к эукариотическим клеткам, также имеет важное значение для функций механизмов секреции, такой белок исключают из этого определения. Эффекторные белки T3SS, вирулентные по отношению к эукариотическим клеткам, относятся к таким белкам, как YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT *Y. Enterocolitica*, или OspF, IpgD, IpgB1 *Shigella flexneri*, или SopE, SopB, SptP *Salmonella enterica*, или ExoS, ExoT, ExoU, ExoY *P. Aeruginosa*, или Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ *E.coli*. Эффекторные белки T4SS, вирулентные по отношению к эукариотическим клеткам, относятся к таким белкам, как

LidA, SidC, SidG, SidH, SdhA, SidJ, SdjA, SdeA, SdeA, SdeC, LepA, LepB, WipA, WipB, YlfA, YlfB, VipA, VipF, VipD, VpdA, VpdB, DrrA, LegL3, LegL5, LegL7, LegL4, LegL8, LegC5, LegG2, Ceg10, Ceg23, Ceg29 *Legionella pneumophila* или BepA, BepB, BepC, BepD, BepE, BepF, BepG *Bartonella henselae* или VirD2, VirE2, VirE3, VirF *Agrobacterium tumefaciens* или CagA *H. pylori*

или коклюшный токсин *Bordetella pertussis*. Эффекторные белки T6SS, вирулентные по отношению к эукариотическим клеткам, относятся к таким белкам, как белки VgrG *Vibrio cholerae* (например, VgrG1).

Термин "эффекторный белок T3SS, вирулентный по отношению к эукариотическим клеткам", или "бактериальный эффекторный белок T3SS, вирулентный по отношению к эукариотическим клеткам", в настоящем документе относится к белкам, в естественных условиях вводимым системами T3S в цитозоль эукариотических клеток, и к белкам, в естественных условиях секретируемым системами T3S, способным, например, образовывать пору для транслокации в мембране эукариот, которые являются факторами вирулентности по отношению к эукариотическим клеткам, т.е. к белкам, парализующим или перепрограммирующим эукариотическую клетку с получением благоприятного эффекта для патогена. Эффекторы обладают широким репертуаром биохимической активности, модулируют функцию ключевых регуляторных механизмов хозяина, например фагоцитоза и актинового цитоскелета, воспалительных сигнальных путей, апоптоза, эндоцитоза или секреторных путей [5, 6], и включают

AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEpto, AvrPpiBpto, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE, семейство белков GALA, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaH, IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB, PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA.

Гены эффекторов T3SS *Yersinia*, вирулентных по отношению к эукариотической клетке, которые можно удалить/мутировать из, например, *Y. enterocolitica*, представляют собой YopE, YopH, YopM,

YorO, YorP (также известный как YorJ) и YorT [7]. Соответствующие гены эффекторов, вирулентных по отношению к эукариотической клетке, можно удалить/мутировать из *Shigella flexneri* (например, OspF, IpgD, IpgB1), *Salmonella enterica* (например, SopE, SopB, SptP), *P. aeruginosa* (например, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) или *E.coli* (например, Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ). Нуклеотидные последовательности этих генов доступны для специалистов в данной области техники, например, в базе данных Genbank (yopH, yopO, yopE, yopP, yopM, yopT из NC_002120 GI: 10955536; эффекторный белок *S. flexneri* из AF386526.1 GI: 18462515; эффекторы *S. enterica* из NC_016810.1 GI: 378697983 или FQ312003.1 GI: 301156631; эффекторы *P. aeruginosa* из AE004091.2 GI: 110227054 или CP000438.1 GI: 115583796 и эффекторный белок *E.coli* из NC_011601.1 GI: 215485161).

Для целей настоящего изобретения гены обозначены строчными курсивными буквами в отличие от белков. Если гены (обозначенные строчными курсивными буквами) следуют после названия вида бактерии (например, *E.coli*), они относятся к мутации соответствующего гена у бактерии соответствующего вида. Например, *YorE* относится к эффекторному белку, кодируемому геном *yopE*. *Y. enterocolitica*; *yopE* относится к *Y. enterocolitica* с мутацией в гене *yopE*.

В настоящем документе термины "полипептид", "пептид", "белок", "полипептидный" и "пептидный" используются на равных основаниях для обозначения серии аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями между альфа-аминогруппой и карбоксильной группой соседних остатков. Предпочтительными являются белки, аминокислотная последовательность которых содержит по меньшей мере 10 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот.

В соответствии с настоящим изобретением "гетерологичный белок" включает природные белки или их фрагменты, а также искусственно сконструированные белки или их фрагменты. В настоящем документе термин "гетерологичный белок" относится к белку или его фрагменту, не являющемуся эффекторным белком T3SS или его N-концевым фрагментом, к которому его можно присоединить. В частности, гетерологичный белок в настоящем документе относится к белку или его фрагменту, не принадлежащим к протеому, т.е. полному естественному комплексу белков конкретного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, предложенного и применяемого в настоящем изобретении, например, не принадлежащие к протеому, т.е. полному естественному комплексу белков конкретного штамма бактерии родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*. Обычно гетерологичный белок имеет животное происхождение, в том числе человеческое происхождение. Предпочтительно гетерологичный белок является белком человека. Более предпочтительно гетерологичный белок выбирают из группы, состоящей из белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков сигнальных путей клетки, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, белков, родственных GPCR, нанотел и гибридных конструкторов нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. В особенно предпочтительном случае гетерологичный белок выбирают из группы, состоящей из белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, репортерных белков, малых ГТФаз, белков, родственных GPCR, гибридных конструкторов нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. Еще более предпочтительными являются гетерологичные белки, выбранные из группы, состоящей из белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, регуляторов клеточного цикла и белков с анкириновыми повторами. Наиболее предпочтительными являются белки, вовлеченные в апоптоз или регуляцию апоптоза, например гетерологичные белки животных, предпочтительно человека, вовлеченные в апоптоз или регуляцию апоптоза.

В некоторых вариантах реализации вектор штамма грамотрицательной бактерии согласно настоящему изобретению содержит две вторые последовательности ДНК, кодирующие идентичные или два разных гетерологичных белка, независимо друг от друга присоединенные к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК с учетом рамки считывания.

В некоторых вариантах реализации вектор штамма грамотрицательной бактерии согласно настоящему изобретению содержит три вторые последовательности ДНК, кодирующие идентичные или три разных гетерологичных белка, независимо друг от друга присоединенные к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК с учетом рамки считывания.

Молекулярная масса гетерологичного белка, экспрессируемого рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, обычно составляет от 1 до 150 кДа, предпочтительно от 1 до 120 кДа, более предпочтительно от 1 до 100 кДа, наиболее предпочтительно от 15 до 100 кДа.

В некоторых вариантах реализации вектор штамма грамотрицательной бактерии согласно настоящему изобретению содержит повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, присоединенные к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК с учетом рамки считывания.

Термин "гетерологичные белки, принадлежащие к одному и тому же функциональному классу белков" в настоящем документе относится к гетерологичным белкам, обладающим одной и той же функцией, например гетерологичным белкам, обладающим ферментативной активностью, гетерологичным белкам, действующим в одном и том же пути, например, регуляции клеточного цикла или обладающим об-

щей специфической функцией, например принадлежностью к одному и тому же классу бактериальных эффекторных белков. Функциональные классы белков представляют собой, например, белки, вовлеченные в апоптоз или регуляцию апоптоза, белки, действующие как регуляторы клеточного цикла, белки с анкириновыми повторами, белки сигнальных путей клетки, репортерные белки, факторы транскрипции, протеазы, малые ГТФазы, белки, родственные GPCR, гибридные конструкторы нанотел и нанотела, бактериальные эффекторы T3SS, бактериальные эффекторы T4SS и вирусные белки, совместно действующие в биологических процессах, обеспечивающих вирулентность по отношению к эукариотическим клеткам.

В соответствии с настоящим изобретением "домен гетерологичного белка" включает домены природных белков, а также домены искусственно сконструированных белков. В настоящем документе термин "домен гетерологичного белка" относится к домену гетерологичного белка, не являющемуся доменом эффекторного белка T3SS, или домену, не являющемуся доменом, содержащим N-концевой фрагмент такого белка, к которому его можно присоединить с получением гибридного белка. В частности, домен гетерологичного белка в настоящем документе относится к домену гетерологичного белка, не принадлежащего к протеому, т.е. полному естественному комплексу белков конкретного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии, предложенного и применяемого в настоящем изобретении, например, не принадлежащего к протеому, т.е. полному естественному комплексу белков конкретного штамма бактерии родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*. Обычно домен гетерологичного белка имеет животное происхождение, в том числе человеческое происхождение. Предпочтительно домен гетерологичного белка является доменом белка человека. Более предпочтительно домен гетерологичного белка представляет собой домен белка, выбранного из группы, состоящей из белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков сигнальных путей клетки, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, белков, родственных GPCR, нанотел и гибридных конструкторов нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. В особенно предпочтительном случае домен гетерологичного белка представляет собой домен белка, выбранного из группы, состоящей из белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, репортерных белков, малых ГТФаз, белков, родственных GPCR, гибридных конструкторов нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. Еще более предпочтительными являются домены гетерологичных белков, выбранных из группы, состоящей из белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, регуляторов клеточного цикла и белков с анкириновыми повторами. Наиболее предпочтительными являются домены белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, например белков животных, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, предпочтительно домены гетерологичных белков человека, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза.

Термин "повторяющиеся домены гетерологичного белка" в настоящем документе относится к гибриднему белку, состоящему из нескольких повторов домена гетерологичного белка, причем указанные домены могут быть непосредственно присоединены друг к другу или между доменами может быть вставлен вариабельный линкер, например линкер длиной от 1 до 30, предпочтительно от 2 до 15, более предпочтительно от 3 до 10 аминокислот. В предпочтительном случае применяют повторяющиеся идентичные домены или повторяющиеся домены с идентичностью аминокислотной последовательности более 80%, обычно более 85%, предпочтительно более 90%, еще более предпочтительно более 95%, в особенности более 96%, в особенности более 97%, в особенности более 98% и наиболее предпочтительно более 99%. Кроме того, предпочтительными являются домены с идентичностью аминокислотной последовательности, равной 100%. В предпочтительном случае два повторяющихся домена, более предпочтительно два повторяющихся идентичных домена или два повторяющихся домена с идентичностью аминокислотной последовательности более 90%, предпочтительно более 95%, наиболее предпочтительно 100% находятся в составе гибридного белка, описанного в настоящем документе. В настоящем изобретении также рассматриваются более двух, например три, четыре, пять или шесть, повторяющихся доменов.

Термин "два или более домена различных гетерологичных белков" в настоящем документе относится к гибриднему белку, состоящему из одного или нескольких повторов по меньшей мере двух доменов различных гетерологичных белков, например двух доменов гетерологичных белков с идентичностью аминокислотной последовательности, равной 80% или менее, предпочтительно 60% или менее, более предпочтительно 40% или менее, причем указанные различные домены могут быть непосредственно присоединены друг к другу или между доменами может быть вставлен вариабельный линкер, например линкер длиной от 1 до 30, предпочтительно от 2 до 15, более предпочтительно от 3 до 10 аминокислот. В предпочтительном случае два домена различных гетерологичных белков находятся в составе гибридного белка, описанного в настоящем документе. В настоящем изобретении также рассматриваются более двух, например три, четыре, пять или шесть, доменов различных гетерологичных белков.

Молекулярная масса домена гетерологичного белка, экспрессируемого рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии, обычно составляет от 1 до 50 кДа, предпочтительно от 1 до 30 кДа, более предпочтительно от 1 до 20 кДа, наиболее предпочтительно от 1 до 10 кДа.

В соответствии с настоящим изобретением "белки, вовлеченные в апоптоз или регуляцию апоптоза"

включают Bad, Bcl2, Bak, Bmt, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, Apaf1, каспазу 9, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 10, DFFA, DFFB, ROCK1, APP, CAD, ICAD, CAD, EndoG, AIF, HtrA2, Smac/Diablo, Arts, ATM, ATR, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), семейство IAP, LC8, PP2B, белки 14-3-3, PKA, PKC, PI3K, Erk1/2, p90RSK, TRAF2, TRADD, FADD, Дахх, каспазу 8, каспазу 2, RIP, RAIDD, MKK7, INK, FLIPs, FKHR, GSK3, CDK и их ингибиторы, например семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) и семейство Cip1/Waf1/Kip1-2 (p21(Cip1/Waf1), p27(Kip1), p57(Kip2)), но не ограничиваются ими. В предпочтительном случае применяют Bad, Bmt, Bcl2, Bak, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, каспазу 9, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, Smac/Diablo, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), LC8, PP2B, TRADD, Дахх, каспазу 8, каспазу 2, RIP, RAIDD, FKHR, CDK и их ингибиторы, например семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), наиболее предпочтительно Bim, Bid, укороченный Bid, FADD, каспазу 3 (и ее субъединицы), Bax, Bad, Akt, CDK и их ингибиторы, например семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) [8-10]. Дополнительные белки, вовлеченные в апоптоз или регуляцию апоптоза, включают DIVA, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bid и tBid, Egl-1, Bcl-Gs, цитохром С, беклин, CED-13, BNIP1, BNIP3, Bcl-B, Bcl-W, Ced-9, A1, NR13, Bfl-1, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 8.

Белки, вовлеченные в апоптоз или регуляцию апоптоза, выбирают из группы, состоящей из проапоптозных белков, антиапоптозных белков, ингибиторов путей, предотвращающих апоптоз, и ингибиторов сигнальных или метаболических путей, способствующих выживанию. Проапоптозные белки включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома С, FADD, семейства каспаз и CDK и их ингибиторов, например семейства INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), или выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома С, FADD и семейства каспаз. Предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспаз, CDK и их ингибиторы, например семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)). В равной степени предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспаз.

Антиапоптозные белки включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13, семейства IAP и Bfl-1. Предпочтительными являются Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13 и Bfl-1. Ингибиторы путей, предотвращающих апоптоз, включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bad, Noxa и Cdc25A. Предпочтительными являются Bad и Noxa.

Ингибиторы сигнальных и метаболических путей, способствующих выживанию, включают белки, выбранные из группы, состоящей из PTEN, ROCK, PP2A, PHLPP, JNK, p38. Предпочтительными являются PTEN, ROCK, PP2A и PHLPP.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, вовлеченные в апоптоз или регуляцию апоптоза, выбирают из группы, состоящей из белков, содержащих только домен BH3, каспаз и внутриклеточных белков сигнальных путей контроля рецепторов гибели или апоптоза. Предпочтительными являются белки, содержащие только домен BH3.

Белки, содержащие только домен BH3, включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bad, Bim, Bid и tBid, Puma, Bik/Nbk, Bod, Hrk/Dp5, BNIP1, BNIP3, Bmf, Noxa, Mcl-1, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13. Предпочтительными являются Bad, Bim, Bid и tBid, в особенности tBid.

Каспазы, выбранные из группы, состоящей из каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, включают белок. Предпочтительными являются каспаза 3, каспаза 8 и каспаза 9.

Внутриклеточные белки сигнальных путей контроля рецепторов гибели или апоптоза включают белки, выбранные из группы, состоящей из FADD, TRADD, ASC, BAP31, GULP1/CED-6, CIDEA, MFG-E8, CIDEA, RIPK1/RIP1, CRADD, RIPK3/RIP3, Crk, SHB, CrkL, DAXX, семейства 14-3-3, FLIP, DFF40 и 45, PEA-15, SODD. Предпочтительными являются FADD и TRADD.

В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательной бактерии и/или вектор согласно настоящему изобретению содержит два гетерологичных белка, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, причем один белок представляет собой проапоптозный белок, а другой белок представляет собой ингибитор пути, предотвращающего апоптоз, или один белок представляет собой проапоптозный белок, а другой белок представляет собой ингибитор сигнальных и метаболических путей, способствующих выживанию.

Проапоптозные белки согласно настоящему изобретению обычно обладают альфа-спиральной структурой, предпочтительно их структура представляет собой гидрофобную спираль, окруженную амфифильными спиральями, и обычно содержат по меньшей мере один из доменов BH1, BH2, BH3 или BH4, предпочтительно по меньшей мере один домен BH3. Проапоптозные белки согласно настоящему изобретению обычно не обладают ферментативной активностью.

Антиапоптозные белки согласно настоящему изобретению обычно обладают альфа-спиральной

структурой (предпочтительно их структура представляет собой гидрофобную спираль, окруженную амфифильными спиралями) и содержат комбинацию различных доменов BH1, BH2, BH3 и BH4, предпочтительно комбинацию различных доменов BH1, BH2, BH3 и BH4, где присутствуют домены BH1 и BH2, более предпочтительно BH4-BH3-BH1-BH2, BH1-BH2, BH4-BH1-BH2 или BH3-BH1-BH2 (от N-конца к С-концу). Кроме того, изобретение охватывает белки, содержащие по меньшей мере один домен BIR.

Ингибиторы путей, предотвращающих апоптоз, согласно настоящему изобретению обычно обладают альфа-спиральной структурой (предпочтительно их структура представляет собой гидрофобную спираль, окруженную амфифильными спиралями) и обычно содержат один домен BH3.

Каждый из доменов BH1, BH2, BH3 или BH4 обычно содержит от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот. Таким образом, в некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, вовлеченные в апоптоз или регуляцию апоптоза, выбирают из группы, состоящей из гетерологичных белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, длина которых составляет от приблизительно 5 до приблизительно 200, предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 150, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 100, наиболее предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 50, в особенности от приблизительно 5 до приблизительно 25 аминокислот.

В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательной бактерии согласно настоящему изобретению трансформируют двумя доменами гетерологичного белка, вовлеченного в апоптоз или регуляцию апоптоза, предпочтительно двумя повторяющимися, более предпочтительно двумя идентичными повторяющимися доменами белка, вовлеченного в апоптоз или регуляцию апоптоза, или двумя доменами различных белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, наиболее предпочтительно двумя идентичными повторными доменами белка, вовлеченного в апоптоз или регуляцию апоптоза. В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательной бактерии согласно настоящему изобретению трансформируют двумя доменами гетерологичных белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, причем один из них представляет собой домен проапоптозного белка, а другой - домен белка, являющегося ингибитором пути, предотвращающего апоптоз, или один из них представляет собой домен проапоптозного белка, а другой домен представляет собой домен белка, являющегося ингибитором сигнальных и метаболических путей, способствующих выживанию.

В особенности предпочтительным доменом является домен BH3 индуктора апоптоза tBid, конкретнее домен BH3, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 217, 218, 219 и 220, предпочтительно SEQ ID NO: 219 или SEQ ID NO: 220.

В равной степени предпочтительным является домен BH3 регулятора апоптоза Bax, конкретнее домен Bax, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 221, 222, 223 и 224, предпочтительно SEQ ID NO: 223 или SEQ ID NO: 224. Последовательности человека и мыши приведены в SEQ ID NO: 217-224, однако домены BH3 tBid и Bax всех других видов животных также в равной степени включены в настоящее изобретение.

В некоторых вариантах реализации повторяющиеся домены гетерологичных белков представляют собой домен BH3 индуктора апоптоза tBid, конкретнее повторяющиеся домены BH3 индуктора апоптоза tBid, содержащиеся в SEQ ID NO: 219, или SEQ ID NO: 220, или SEQ ID NO: 202, еще более предпочтительно два повторяющихся домена BH3 индуктора апоптоза tBid, наиболее предпочтительно два повторяющихся домена BH3 индуктора апоптоза tBid, содержащиеся в SEQ ID NO: 219, или SEQ ID NO: 220, или SEQ ID NO: 202, в частности два повторяющихся домена BH3 индуктора апоптоза tBid, содержащиеся в последовательности SEQ ID NO: 202. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации штамм грамотрицательной бактерии, или вектор, согласно настоящему изобретению содержит вторую последовательность ДНК, кодирующую два повторяющихся домена BH3, более предпочтительно два повторяющихся домена BH3 индуктора апоптоза tBid. Указанные два повторяющихся домена могут быть соединены линкером длиной 1-30 аминокислот, предпочтительно 2-15 аминокислот, более предпочтительно 3-10 аминокислот.

В некоторых вариантах реализации указанные два или более домена различных гетерологичных белков представляют собой домены гетерологичных белков, принадлежащих к одному и тому же функциональному классу белков, предпочтительно различные гетерологичные белки указанных двух или более доменов представляют собой различные гетерологичные белки из класса белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза. В предпочтительном варианте реализации указанные два или более домена различных гетерологичных белков представляют собой домен BH3 индуктора апоптоза tBid и домен BH3 регулятора апоптоза Bax, в частности объединенные домены BH3 в составе последовательности SEQ ID NO: 203 и 211. Указанные два домена различных гетерологичных белков могут быть соединены линкером длиной 1-30 аминокислот, предпочтительно 2-15 аминокислот, более предпочтительно 3-10 аминокислот.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки представляют собой фермент, преобразующий пролекарство. В указанных вариантах реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью экспрессирует, предпочтительно экспрессирует и секретирует, фермент, преобразующий пролекарство. Фермент, преобразующий пролекарство, в настоящем документе включает ферменты, преобразующие нетоксичные пролекарства в токсичное лекарственное вещество,

предпочтительно ферменты, выбранные из группы, состоящей из цитозиндезаминазы, фосфорилазы пуриновых нуклеозидов, тимидинкиназы, бета-галактозидазы, карбоксилэстераз, нитроредуктазы, карбоксипептидаз и бета-глюкуронидаз, более предпочтительно ферменты, выбранные из группы, состоящей из цитозиндезаминазы, фосфорилазы пуриновых нуклеозидов, тимидинкиназы и бета-галактозидазы.

Термин "сайт расщепления протеазой" в настоящем документе относится к специфическому аминокислотному мотиву в аминокислотной последовательности, например аминокислотной последовательности белка или гибридного белка, расщепляемому специфической протеазой, распознающей аминокислотный мотив. Обзор см. в [11]. Примеры сайтов расщепления протеазой представляют собой аминокислотные мотивы, расщепляемые протеазой, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы риновируса человека (HRV 3C), протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактора Ха и тромбина.

Соответствующие протеазы распознают следующие аминокислотные мотивы:

Asp-Asp-Asp-Asp-Lys: энтерокиназа (легкая цепь)/энтеропептидаза;

Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro: протеаза PreScission/протеаза риновируса человека (HRV 3C);

Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser и модифицированные мотивы на основе Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly/Ser (где X - любая аминокислота), распознаваемые протеазой TEV (вируса табачной мозаики);

Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln-Ser: протеаза TVMV;

Ile-(Glu или Asp)-Gly-Arg: протеаза фактора Ха;

Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser: тромбин.

Сайты расщепления протеазой в настоящем документе включают убиквитин. Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах реализации убиквитин используют в качестве сайта расщепления протеазой, который могут расщеплять по N-концевой области специфические протеазы процессинга убиквитина, например который эндогенно в клетке, куда происходит доставка гибридного белка, могут расщеплять по N-концевой области специфические протеазы процессинга убиквитина, называемые дезубиквитинизирующими ферментами. Убиквитин подвергается процессингу по С-концу группой эндогенных убиквитин-специфических С-концевых протеаз (дезубиквитинизирующих ферментов, DUB). Расщепление убиквитина DUB предположительно происходит по самому С-концу убиквитина (после G76).

"Индивид", "субъект" или "пациент" является позвоночным. В некоторых вариантах реализации указанное позвоночное является млекопитающим. Млекопитающие включают приматов (в том числе людей и приматов, не являющихся людьми) и грызунов (например, мышей и крыс), но не ограничиваются ими. В предпочтительных вариантах реализации субъект является человеком.

Термин "мутация" в настоящем документе является общим термином и включает изменения одной или многих пар оснований. Такие мутации могут включать замены, мутации сдвига рамки, делеции, инсерции и укорачивания.

Термин "сигнал локализации в ядре" в настоящем документе относится к аминокислотной последовательности, маркирующей белок для импорта в ядро эукариотической клетки и предпочтительно включающей вирусный сигнал локализации в ядре, например NLS, происходящий от большого Т-антигена SV40 (PPKKRKRV).

Термин "полилинкер" в настоящем документе относится к короткой последовательности ДНК, содержащей несколько сайтов рестрикции для расщепления эндонуклеазами рестрикции, например,

AclI, HindIII, SspI, MluCI, Tsp509I, PciI, AgeI, BspMI, BfuAI, SexAI, MluI, BceAI, HpyCH4IV, HpyCH4III, BaeI, BsaXI, AflIII, SpeI, BsrI, BmrI, BglII, AfeI, AluI, StuI, ScaI, ClaI, BspDI, PI-SceI, NsiI, AseI, SwaI, CspCI, MfeI, BssSI, BmgBI, PmlI, DraIII, AleI, EcoP15I, PvuII, AlwNI, BtsIMutI, TspRI, NdeI, NlaIII, CviAII, FatI, MslI, FspEI, XcmI, BstXI, PflMI, BccI, NcoI, BseYI, FauI, SmaI, XmaI, TspMI, Nt.CviPII, LpnPI, AciI, SacII, BsrBI, MspI, HpaII, ScrFI, BssKI, StyD4I, BsaJI, BslI, BtgI, NciI, AvrII, MnlI, BbvCI, Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, SbfI, Bpu10I, Bsu36I, EcoNI, HpyAV, BstNI, PspGI, StyI, BcgI, PvuI, BstUI, EagI, RsrII, BsiEI, BsiWI, BsmBI, Hpy99I, MspA1I, MspJI, SgrAI, BfaI, BspCNI, XhoI, EarI, AcuI, PstI, BpmI, DdeI, SfcI, AflII, BpuEI, SmlI, AvaI, BsoBI, MboII, BbsI, XmnI, BsmI, Nb.BsmI, EcoRI, HgaI, AatII, ZraI, Th111I PflFI, PshAI, AhdI, DrdI, Eco53kI, SacI, BseRI, PleI, Nt.BstNBI, MlyI, HinfI, EcoRV, MboI, Sau3AI, DpnII BfuCI, DpnI, BsaBI, TfiI, BsrDI, Nb.BsrDI, BbvI, BtsI, Nb.BtsI, BstAPI, SfaNI, SphI, NmeAIII, NaeI, NgoMIV, BglI, AsiSI, BtgZI, HinPII, HhaI, BssHII, NotI, Fnu4HI, Cac8I, MwoI, NheI, BmtI, SapI, BspQI, Nt.BspQI, BlpI, TseI, ApeKI, Bsp1286I, AlwI, Nt.AlwI, BamHI, FokI, BtsCI, HaeIII, PhoI, FseI, SfiI, NarI, KasI, SfoI, PluTI, AscI, EciI, BsmFI, ApaI, PspOMI, Sau96I, NlaIV, KpnI, Acc65I, BsaI, HphI, BstEII, AvaII, BanI, BaeGI, BsaHI, BanII, RsaI, CviQI, BstZ17I, BciVI, SalI, Nt.BsmAI, BsmAI, BcoDI, ApaLI, BsgI, AccI, Hpy166II, Tsp45I, HpaI, PmeI, HincII, BsiHKAI, ApoI, NspI, BsrFI, BstYI, HaeII, CviKI-1, EcoO109I, PpuMI, I-CeuI, SnaBI, I-SceI, BspHI, BspEI, MmeI, TaqI, NruI, Hpy188I, Hpy188III, XbaI, BclI, HpyCH4V, FspI, PI-PspI, MscI, BsrGI, MseI, PacI, PsiI, BstBI, DraI, PspXI, BsaWI, BsaAI, EaeI, preferably XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI.

Термин "полилинкер" в настоящем документе дополнительно относится к короткой последовательности ДНК, используемой для явлений рекомбинации, например, в стратегии клонирования Gateway или для таких способов, как сборка по Гибсону или клонирование в ТОРО-системе.

Термин "штамм дикого типа" или "штамм грамотрицательной бактерии дикого типа" в настоящем документе относится к природному варианту или природному варианту, содержащему генетические модификации, обеспечивающие применение векторов, например, делеции в генах эндонуклеаз рестрикции или устойчивости к антибиотикам. Эти штаммы содержат хромосомную ДНК, а также в некоторых случаях (например, *Y. enterocolitica*, *S. flexneri*) немодифицированную плазмиду вирулентности.

Термин "штамм *Yersinia* дикого типа" в настоящем документе относится к природному варианту (например, *Y. enterocolitica* E40) природному варианту, содержащему генетические модификации, обеспечивающие применение векторов, например, делеции в генах эндонуклеаз рестрикции или устойчивости к антибиотикам (например, *Y. enterocolitica* MRS40, производный от *Y. enterocolitica* E40 и чувствительный к ампициллину). Эти штаммы содержат хромосомную ДНК, а также немодифицированную плазмиду вирулентности (под названием pYV).

Y. enterocolitica subspecies *paleartica* относится к низкопатогенным штаммам *Y. enterocolitica*, которые отличаются от высоковирулентных штаммов подвида *enterocolitica* [12, 13]. *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* в отличие от *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* не содержит острова высокой патогенности (HPI). Этот HPI кодирует сидерофор, связывающий железо, под названием иерсиниабактин [14]. Отсутствие иерсиниабактина в *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* делает этот подвид менее патогенным и зависимым от индукции системно доступным железом для устойчивой инфекции, например, в печени или селезенке [14]. Железо может стать доступным для бактерии в организме индивида, например, за счет предварительной обработки дефероксамином - хелатором железа, используемым для лечения перенасыщения железом у пациентов [15].

Термин "содержать" в общем случае используется в смысле "включать", другими словами, допускает наличие одного или более признаков или компонентов.

Термин "приблизительно" относится к диапазону значений $\pm 10\%$ от заданного значения. Например, фраза "приблизительно 200" включает $\pm 10\%$ от 200 или от 180 до 220.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, трансформированный вектором, содержащим в направлении от 5' к 3'

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК,

для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, в организме которого рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли,

причем указанный способ включает введение в организм субъекта указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью и рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят в количестве, достаточном для лечения субъекта.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции, для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, в организме которого рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли, причем указанный способ включает введение указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью в организм субъекта и рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят в количестве, достаточном для лечения субъекта. Предпочтительным является рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является дефектным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, в организме которого рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли, причем указанный способ включает введение указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью в организм субъекта и рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят в количестве, достаточном для лечения субъекта.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции, трансформируют вектором, содержащим в направлении от 5' к 3'

промотор;

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью или рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции, трансформируют вектором, содержащим в направлении от 5' к 3'

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка или его фрагмент;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК.

Предпочтительно последовательность ДНК, кодирующая гетерологичный белок, фланкирована по 3'-концу последовательностью ДНК, гомологичной последовательности ДНК хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности на 3'-конце сигнала доставки бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Более предпочтительно эта последовательность ДНК, фланкирующая гомологичный белок по 3'-концу, гомологична последовательности ДНК и располагается в пределах 10 т.п.о. на хромосоме или эндогенной плазмиде вирулентности на 3'-конце сигнала доставки бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. В частности, эта нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок по 3'-концу, гомологична последовательности ДНК и находится в пределах того же оперона на хромосоме или эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки бактериального эффекторного белка или его фрагмент. В данном варианте реализации трансформацию обычно выполняют таким образом, что объединенные первую и вторую последовательности ДНК вставляют путем гомологичной рекомбинации в эндогенную плазмиду вирулентности или хромосому, предпочтительно в эндогенную плазмиду вирулентности рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной виру-

лентностью, и объединенные первая и вторая последовательности ДНК являются функционально связанными с промотором эндогенной плазмиды вирулентности или хромосомы, например хромосомного острова патогенности. Предпочтительно объединенные первая и вторая последовательности ДНК функционально связаны с промотором эндогенной плазмиды вирулентности. В данном варианте реализации первая последовательность ДНК содержит сигнал доставки бактериального эффекторного белка или его фрагмент, предпочтительно его фрагмент, обеспечивающий гомологичную рекомбинацию по гомологичному сайту на хромосоме или эндогенной плазмиде вирулентности, в результате которой вторую последовательность ДНК помещают с соблюдением рамки считывания на 3'-конец сигнала доставки на хромосоме или эндогенной плазмиде вирулентности, функционально связанного с эндогенным промотором.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью или рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, или дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального белка, являющегося частью механизма системы секреции, трансформируют нуклеотидной молекулой, предпочтительно нуклеотидной молекулой ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, и нуклеотидную последовательность, гомологичную или идентичную нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки бактериального эффекторного белка, или гомологичную или идентичную нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент сигнала доставки бактериального эффекторного белка, причем сигнал доставки бактериального эффекторного белка кодирует хромосома или эндогенная плаزمида вирулентности рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, гомологичная или идентичная нуклеотидной последовательности сигнала доставки бактериального эффекторного белка или ее фрагменту, расположена на 5'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок. Более предпочтительно, нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, фланкирована по 3'-концу нуклеотидной последовательностью, гомологичной последовательности ДНК хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности на 3'-конце сигнала доставки бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Еще более предпочтительно эта нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок по 3'-концу, гомологична последовательности ДНК, располагающейся в пределах 10 т.п.о. на хромосоме или эндогенной плазмиде вирулентности на 3'-конце сигнала доставки бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. В частности, эта нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок по 3'-концу, гомологична последовательности ДНК и находится в пределах того же оперона на хромосоме или эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки бактериального эффекторного белка или его фрагмент. В данном варианте реализации трансформацию обычно выполняют таким образом, что нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, вставляют в эндогенную плазмиду вирулентности или хромосому рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью на 3'-конце сигнала доставки бактериального эффекторного белка, который кодирует хромосома или эндогенная плазмида вирулентности, причем осуществляется экспрессия и секреция гетерологичного белка, присоединенного к сигналу доставки.

Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью представляет собой штамм *Yersinia*, то эндогенная плазмида вирулентности для вставки представляет собой pYV (плазмида вирулентности *Yersinia*). Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью представляет собой штамм *Salmonella*, эндогенное местоположение для вставки представляет собой один из генных кластеров под названием SpiI или SpiII (для острова патогенности *Salmonella*), в положении, где в иных случаях закодирован эффекторный белок, или в качестве альтернативы одну из плазмид вирулентности *Salmonella* (SVP).

Первую и вторую последовательности ДНК или нуклеотидные молекулы предпочтительно вставляют в эндогенную плазмиду вирулентности в нативный сайт бактериального эффекторного белка, например нативный сайт фактора вирулентности, предпочтительно, если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом *Yersinia*, в нативный сайт YopE или другого Yop (YopH, YopO, YopP, YopM, YopT), предпочтительно в нативный сайт YopE, или, если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом *Salmonella*, в нативный сайт эффекторного белка, кодируемого SpiI, SpiII или другим геном, предпочтительно в нативный сайт эффекторного белка, кодируемого SpiI или SpiII, более предпочтительно в нативный сайт SopE или SteA. Первая и вторая последовательности ДНК или нуклеотидные молекулы функционально связаны с нативным промотором бактериального эффекторного белка, присутствующим на эндогенной плазмиде вирулентности, например, если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом *Yersinia*, с нативным промотором гена из вирулона *Yersinia*, описанного ниже, более предпочтительно с нативным промотором YopE или промотором другого Yop (YopH, YopO, YopP, YopM, YopT), предпочтительно с нативным промотором YopE, или, если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является

штамом *Salmonella*, с нативным промотором острова патогенности *SpiI* или *SpiII* или эффекторного белка, кодируемого другим геном, как описано ниже, более предпочтительно с нативным промотором *SopE*, *InvB* или *SteA*.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью выбирают из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*. В одном варианте реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью выбирают из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*. Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью предпочтительно является штаммом *Yersinia*, более предпочтительно штаммом *Yersinia enterocolitica*. Наиболее предпочтительным является *Yersinia enterocolitica* E40 (0:9, биотип 2) [16] или происходящие от него штаммы, чувствительные к ампициллину, например *Y. enterocolitica* MRS40 (также известный как *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40), как описано в [17]. *Y. enterocolitica* E40 и происходящий от него *Y. enterocolitica* MRS40, описанные в [17], идентичны *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* E40 и происходящему от него *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40, описанным в [12, 14, 18]. Кроме того, рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью предпочтительно является штаммом *Salmonella*, более предпочтительно штаммом *Salmonella enterica*. Наиболее предпочтительным является *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* SL1344, описанный в коллекции культур общественного здравоохранения Англии (NCTC 13347).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом, не продуцирующим сидерофор, например, дефектным по продукции сидерофора, предпочтительно не продуцирующим сидерофоры, например, дефектным по продукции любого сидерофора. Таким штаммом является, например, *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40, описанный в [14, 17], который не продуцирует иерсиниабактин и является предпочтительным.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнал доставки бактериального эффекторного белка содержит бактериальный эффекторный белок или его N-концевой фрагмент.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнал доставки бактериального эффекторного белка представляет собой бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, содержащий бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, причем эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент может содержать сайт связывания шаперона. Бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, содержащие сайт связывания шаперона, в особенности полезны в качестве сигнала доставки в настоящем изобретении. Предпочтительный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент выбирают из группы, состоящей из

SopE, *SopE2*, *SptP*, *YopE*, *ExoS*, *SipA*, *SipB*, *SipD*, *SopA*, *SopB*, *SopD*, *IpgB1*, *IpgD*, *SipC*, *SifA*, *SseJ*, *Sse*, *SrfH*, *YopJ*, *AvrA*, *AvrBsT*, *YopT*, *YopH*, *YpkA*, *Tir*, *EspF*, *TccP2*, *IpgB2*, *OspF*, *Map*, *OspG*, *OspI*, *IpaH*, *SspH1*, *VopF*, *ExoS*, *ExoT*, *HopAB2*, *XopD*, *AvrRpt2*, *HopAO1*, *HopPtoD2*, *HopU1*, семейства белков *GALA*, *AvrBs2*, *AvrD1*, *AvrBS3*, *YopO*, *YopP*, *YopE*, *YopM*, *YopT*, *EspG*, *EspH*, *EspZ*, *IpaA*, *IpaB*, *IpaC*, *VirA*, *IcsB*, *OspC1*, *OspE2*, *IpaH9.8*, *IpaH7.8*, *AvrB*, *AvrD*, *AvrPphB*, *AvrPphC*, *AvrPphEpto*, *AvrPpiBpto*, *AvrPto*, *AvrPtoB*, *VirPphA*, *AvrRpm1*, *HopPtoE*, *HopPtoF*, *HopPtoN*, *PopB*, *PopP2*, *AvrBs3*, *XopD* и *AvrXv3*.

Более предпочтительный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент выбирают из группы, состоящей из *SopE*, *SptP*, *YopE*, *ExoS*, *SopB*, *IpgB1*, *IpgD*, *YopJ*, *YopH*, *EspF*, *OspF*, *ExoS*, *YopO*, *YopP*, *YopE*, *YopM*, *YopT*,

а наиболее предпочтительный из них эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент выбирают из группы, состоящей из *IpgB1*, *SopE*, *SopB*, *SptP*, *OspF*, *IpgD*, *YopH*, *YopO*, *YopP*, *YopE*, *YopM*, *YopT*, в особенности *YopE* или его N-концевого фрагмента.

В равной степени предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбирают из группы, состоящей из

SopE, SopE2, SptP, SteA, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SifB, SseJ, Sse, SrfH, YopJ, AvrA, AvrBsT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG, OspI, IpaH, VopF, ExoS, ExoT, HopAB2, AvrRpt2, HopAO1, HopU1, семейства белков GALLA, AvrBs2, AvrD1, YopO, YopP, YopE, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEptO, AvrPpiBptO, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD и AvrXv3.

В равной степени более предпочтительный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент выбирают из группы, состоящей из SopE, SptP, SteA, SifB, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopT, а наиболее предпочтительный из них эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент выбирают из группы, состоящей из IpgB1, SopE, SopB, SptP, SteA, SifB, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE и YopT, в особенности SopE, SteA или YopE или их N-концевого фрагмента, более предпочтительно SteA, или YopE, или их N-концевого фрагмента, наиболее предпочтительно YopE или его N-концевого фрагмента. В некоторых вариантах реализации сигнал доставки бактериального эффекторного белка T3SS, кодируемый первой последовательностью ДНК, содержит бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, причем его N-концевой фрагмент содержит по меньшей мере первые 10, предпочтительно по меньшей мере первые 20, более предпочтительно по меньшей мере первые 100 аминокислот бактериального эффекторного белка T3SS.

В некоторых вариантах реализации сигнал доставки бактериального эффекторного белка T3SS, кодируемый первой последовательностью ДНК, содержит бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, причем бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент содержит сайт связывания шаперона.

Предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты, содержащие сайт связывания шаперона, включают следующие комбинации сайта связывания шаперона и эффекторного белка T3SS или его N-концевого фрагмента: SycE-YopE, InvB-SopE, SicP-SptP, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpsS-ExoS, CesF-EspF, SycD-YopB, SycD-YopD. Более предпочтительными являются SycE-YopE, InvB-SopE, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpsS-ExoS, CesF-EspF. Наиболее предпочтительным является YopE или его N-концевой фрагмент, содержащий сайт связывания шаперона SycE, например N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE, обозначенный в настоящем документе как YopE₁₋₁₃₈ и показанный в SEQ ID NO: 2, или SopE или его N-концевой фрагмент, содержащий сайт связывания шаперона InvB, например N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий 81 или 105 N-концевых аминокислот эффекторного белка SopE, обозначенный в настоящем документе как SopE₁₋₈₁ или SopE₁₋₁₀₅ соответственно и показанный в SEQ ID NO: 142 или 143.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом *Yersinia* и сигнал доставки бактериального эффекторного белка T3SS, кодируемый первой последовательностью ДНК, содержит эффекторный белок YopE или N-концевой фрагмент, предпочтительно эффекторный белок YopE *Y. enterocolitica* или его N-концевой фрагмент. Сайт связывания SycE предпочтительно содержится в N-концевом фрагменте эффекторного белка YopE. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE может содержать 12, 16, 18, 52, 53, 80 или 138 N-концевых аминокислот [19-21]. Наиболее предпочтительным является N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE, например, описанный в публикации Forsberg and Wolf-Watz [22], обозначенный в настоящем документе как YopE₁₋₁₃₈ и показанный в SEQ ID NO: 2.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом *Salmonella* и сигнал доставки бактериального эффекторного белка T3SS, кодируемый первой последовательностью ДНК, содержит эффекторный белок SopE, или SteA, или его N-концевой фрагмент, предпочтительно эффекторный белок SopE, или SteA *Salmonella enterica*, или его N-концевой фрагмент. Сайт связывания шаперона предпочтительно содержится в N-концевом фрагменте эффекторного белка SopE. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE может содержать 81 или 105 N-концевых аминокислот. Наиболее предпочтительным является полноразмерный SteA и N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий 105 N-концевых аминокислот эффекторного белка, например, описанный в SEQ ID NO: 142 или 143.

Специалист в данной области техники знаком со способами выявления полипептидных последовательностей эффекторного белка, способных осуществлять доставку белка. Например, один из таких способов описан Sory et al. [16]. Вкратце полипептидные последовательности, например, различных фрагментов белков Yop можно присоединить с соблюдением рамки считывания к репортерному ферменту, например домену кальмодулин-активируемой аденилатциклазы (или CyA) циклолизина *Bordetella pertussis*. На доставку гибридного белка Yop-CyA в цитозоль эукариотических клеток указывает появление

циклазной активности в инфицированных эукариотических клетках, приводящее к накоплению цАМФ. Применяя такой подход, специалист в данной области техники при желании может определить минимальные требования к последовательности, т.е. минимальную длину непрерывной аминокислотной последовательности, способной выполнять доставку белка (см., например, [16]). Соответственно предпочтительные сигналы доставки согласно настоящему изобретению состоят из по меньшей мере минимальной аминокислотной последовательности эффекторного белка T3SS, способной осуществлять доставку белка.

В настоящем изобретении предложены рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью, дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, накапливается в злокачественной солидной опухоли. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью являются дефектными по продукции по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух, более предпочтительно по меньшей мере трех, еще более предпочтительно по меньшей мере четырех, в особенности по меньшей мере пяти, более предпочтительно по меньшей мере шести, наиболее предпочтительно всех бактериальных эффекторных белков, вирулентных по отношению к эукариотическим клеткам, т.е. рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью дефектны по продукции по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух, более предпочтительно по меньшей мере трех, еще более предпочтительно по меньшей мере четырех, в особенности по меньшей мере пяти, более предпочтительно по меньшей мере шести, наиболее предпочтительно всех функциональных бактериальных эффекторных белков, вирулентных по отношению к эукариотическим клеткам, так что полученный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью продуцирует меньшее количество бактериальных эффекторных белков или продуцирует бактериальные эффекторные белки в меньшей степени по сравнению с бактериальными эффекторными белками, в норме продуцируемыми штаммом грамотрицательной бактерии дикого типа без ослабления вирулентности, или так что полученный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью более не продуцирует функциональных бактериальных эффекторных белков, вирулентных по отношению к эукариотическим клеткам.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта является дефектным по продукции всех эффекторных белков, вирулентных по отношению к эукариотическим клеткам, сигнал доставки бактериального эффекторного белка представляет собой сигнал доставки бактериального эффекторного белка T3SS, а гетерологичный белок выбирают из группы, состоящей из белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза.

В соответствии с настоящим изобретением такой мутантный штамм грамотрицательной бактерии, т.е. такой рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, дефектный по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, вирулентного по отношению к эукариотическим клеткам, например такой мутантный штамм *Yersinia*, можно получить, внедрив по меньшей мере одну мутацию в по меньшей мере один ген, кодирующий эффектор. Такие гены, кодирующие эффекторы, предпочтительно включают YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopP/YopJ и YopT при условии, что это касается штамма *Yersinia*. Такие гены, кодирующие эффекторы, предпочтительно включают

AvrA, CigR, GogB, GtgA, GtgE, PipB, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SifB,
SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopB/SigD, SopA, SpiC/SsaB, SseB,
SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SopD, SopE, SopE2, SspH1, SspH2, PipB2, SifA,
SopD2, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SteC, SteA, SteB, SteD, SteE, SpvB, SpvC, SpvD,
SrfJ, SptP,

при условии, что это касается штамма *Salmonella*. В наиболее предпочтительном случае все гены, кодирующие эффекторы, удалены. Квалифицированный специалист может применять любое количество стандартных методик для получения мутаций в этих эффекторных генах T3SS. В пособии Sambrook et al. приведено общее описание таких методик. См. Sambrook et al. [23]. В соответствии с настоящим изобретением можно получить мутацию в промоторной области гена, кодирующего эффектор, устраняя экспрессию такого гена эффектора. Кроме того, можно получить мутацию в кодирующей области гена, кодирующего эффектор, устраняя каталитическую активность кодируемого эффекторного белка. "Каталитическая активность" эффекторного белка в норме относится к функции эффекторного белка, направленной против клетки-мишени, например токсичности.

Такая активность регулируется каталитическими мотивами в каталитическом домене эффекторного белка. Специалистам в данной области техники известны подходы к выявлению каталитического домена и/или каталитических мотивов эффекторного белка. См., например, [24, 25].

Соответственно одной из предпочтительных мутаций согласно настоящему изобретению является делеция всего каталитического домена. Еще одна предпочтительная мутация представляет собой мутацию сдвига рамки в гене, кодирующем эффектор, так что в белковом продукте, экспрессированном с гена со сдвигом рамки, отсутствует каталитический домен. Наиболее предпочтительной является мутация с делецией всей кодирующей области эффекторного белка. Настоящее изобретение также рассматривает другие мутации, например небольшие делеции или замены пар оснований, полученные в каталитических мотивах эффекторного белка и приводящие к деструкции каталитической активности данного эффекторного белка. Мутации, полученные в генах функциональных бактериальных эффекторных белков, можно внедрить в конкретный штамм различными способами. Один из таких способов включает клонирование мутированного гена в векторе-"самоубийце", способном внедрять мутированную последовательность в штамм посредством замены аллелей. Пример такого вектора-"самоубийцы" описан в [26].

Таким образом можно успешно внедрить мутации, полученные во множестве генов, в штамм грамотрицательной бактерии с получением полимутанта, например рекомбинантного штамма с шестью мутациями. Порядок внедрения этих мутированных последовательностей неважен. При некоторых обстоятельствах может быть желательно мутировать лишь некоторые, но не все гены эффекторов. Соответственно настоящее изобретение дополнительно рассматривает полимутантные штаммы *Yersinia*, не являющиеся штаммами *Yersinia* с шестью мутациями, например штаммы с двумя мутациями, тремя мутациями, четырьмя мутациями и пятью мутациями. Для доставки белков системы секреции и транслокации данного мутантного штамма должны быть интактными.

Предпочтительный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью согласно настоящему изобретению представляет собой штамм *Yersinia* с шестью мутациями, в котором гены, кодирующие эффекторы, мутированы таким образом, что полученный штамм *Yersinia* более не продуцирует функциональных эффекторных белков. Такой штамм *Yersinia* с шестью мутациями обозначается как Δ_{орН}, О, Р, Е, М, Т для *Y. enterocolitica*. В качестве примера такой штамм с шестью мутациями можно получить из штамма *Y. enterocolitica* MRS40 с образованием *Y. enterocolitica* MRS40 Δ_{орН}, О, Р, Е, М, Т (также в настоящем документе известного как *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* MRS40 Δ_{орН}, О, Р, Е, М, Т), который является предпочтительным. В равной степени предпочтительным является *Y. enterocolitica* MRS40 Δ_{орН}, О, Р, Е, М, Т Δ_{асд} (также в настоящем документе известный как *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* MRS40 Δ_{орН}, О, Р, Е, М, Т Δ_{асд}).

Векторы, которые можно применять согласно настоящему изобретению для трансформации штамма грамотрицательной бактерии, как известно специалистам, зависят от используемых штаммов грамотрицательных бактерий. Промотор, гетерологичный белок и сайт расщепления протеазой, описанные в настоящем документе, можно использовать в векторе рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью. Векторы, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают экспрессирующие векторы (в том числе синтетические или полученные другими способами модифицированные версии эндогенных плазмид вирулентности), векторы для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности и фрагменты ДНК для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности. Экспрессирующие векторы, которые можно использовать, например, в штаммах *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, представляют собой, например, плазмиды pUC, pBad, pACYC, pUCP20 и pET. Векторы для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности, которые можно использовать, например, в штаммах *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, представляют собой, например, pKNG101. Фрагменты ДНК для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности относятся к способам, использованным, например, в штаммах *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, например, генетической инженерии с использованием рекомбиназы Red фага лямбда. Векторы для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности или фрагменты ДНК для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности могут обеспечивать вставку первой, второй и/или третьей последовательности ДНК согласно настоящему изобретению таким образом, что первая, вторая и/или третья последовательности ДНК становятся функционально связанными с эндогенным промотором рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью. Таким образом, при использовании вектора для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности или фрагмента ДНК для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности эндогенный промотор может располагаться на эндогенной бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной ДНК) и вектор для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности или фрагмент ДНК для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности будет содержать только первую и вторую последовательности ДНК. В качестве альтернативы при использовании вектора для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности или нуклеотидной молекулы, например, последовательности ДНК для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности эндогенный промотор и сигнал доставки бактериального эффекторного белка может располагаться на эндогенной бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной ДНК) и вектор для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности или нуклеотидная молекула, например последовательность ДНК для вставки в хромосому или плазмиду вирулентности, будет содержать только нуклеотидную молекулу, например последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок. Таким образом, промотор не обязательно должен содержаться в векторе,

используемом для трансформации рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, т.е. рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью согласно настоящему изобретению можно трансформировать вектором, не содержащим промотора.

В предпочтительном варианте реализации вектор согласно настоящему изобретению содержит по направлению от 5' к 3'

первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка или его фрагмент;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК.

Предпочтительный вектор, например, предпочтительный экспрессирующий вектор для *Yersinia* выбирают из группы, состоящей из pBad_Si_1 и pBad_Si_2. pBad_Si2 сконструировали путем клонирования фрагмента SycE-YopE₁₋₁₃₈, содержащего эндогенный промотор YopE и SycE, из очищенной pYV40 в сайт KpnI/HindIII pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BglIII из pBad-MycHisA путем гидролиза, обработки фрагментом Кленова и повторного лигирования. В дальнейшем по 3'-концу YopE₁₋₁₃₈ добавили следующие сайты расщепления: XbaI-XhoI-BstBI (HindIII). pBad_Si1 идентична pBad_Si2, но кодирует EGFP, амплифицированный из pEGFP-C1 (Clontech), в сайте NcoI/BglIII под управлением промотора, индуцибельного арабинозой. В равной степени предпочтительным является применение модифицированных версий эндогенной плазмиды вирулентности *Yersinia* pYV, кодирующей гетерологичные белки в виде гибридов с сигнальной последовательностью T3SS.

Предпочтительный вектор, например предпочтительный экспрессирующий вектор для *Salmonella*, выбирают из группы, состоящей из pSi_266, pSi_267, pSi_268 и pSi_269. Плазмиды pSi_266, pSi_267, pSi_268 и pSi_269, содержащие соответствующий эндогенный промотор и фрагмент SteA₁₋₂₀ (pSi_266), полноразмерную последовательность SteA (pSi_267), фрагмент SopE₁₋₈₁ (pSi_268) или фрагмент SopE₁₋₁₀₅ (pSi_269), амплифицировали из геномной ДНК *S. enterica* SL1344 и клонировали в сайт NcoI/KpnI pBad-MycHisA (Invitrogen).

Векторы согласно настоящему изобретению могут содержать элементы других последовательностей, например 3'-последовательность терминации (включая стоп-кодон и последовательность поли-А) или ген, придающий устойчивость к лекарственному веществу, обеспечивающий отбор трансформантов, получивших данный вектор.

Векторы согласно настоящему изобретению можно трансформировать с использованием ряда известных способов в рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью. Для целей настоящего изобретения способы трансформации для внедрения вектора включают электропорацию, трансформацию, опосредованную фосфатом кальция, конъюгацию или их комбинации, но не ограничиваются ими. Например, вектор можно трансформировать в первый бактериальный штамм посредством стандартной процедуры электропорации. Затем такой вектор можно перенести из первого бактериального штамма в желательный штамм путем конъюгации; этот процесс также называют "мобилизацией". Отбор трансформантов (например, штаммов грамотрицательных бактерий, получившие вектор) можно выполнить, например, с использованием антибиотиков. Эти методики хорошо известны в данной области техники. См., например, [16].

В соответствии с настоящим изобретением, промотор вектора рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью может представлять собой нативный промотор эффекторного белка T3SS соответствующего штамма или совместимого бактериального штамма или промотор, используемый в экспрессирующих векторах, которые можно использовать, например, в штамме *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, например pUC и pBad. Таким промоторами являются промотор T7, промотор Plac или промотор Aga-bad, индуцируемый арабинозой. Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом *Yersinia*, промотор может происходить из гена вирулона *Yersinia*. "Ген вирулона *Yersinia*" относится к генам плазмиды pYV *Yersinia*, экспрессия которых контролируется как температурой, так и контактом с клеткой-мишенью. Такие гены включают гены, кодирующие элементы механизма секреции (гены Ysc), гены, кодирующие транслокаторы (YopB, YopD и LcrV), гены, кодирующие управляющие элементы (YopN, YscA и LcrG), гены, кодирующие шапероны эффекторов T3SS (SycD, SycE, SycH, SycN, SycO и SycT), и гены, кодирующие эффекторы (YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopT и YopP/YopJ), а также другие белки, кодируемые pYV, например VirF и YadA.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор T3SS. Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом *Yersinia*, промотор выбирают из YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM и YopP/YopJ. В более предпочтительном случае промотор является промотором YopE или SycE.

Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом *Salmonella*, промотор может происходить из острова патогенности SpiI, или SpiII, или эффекторного белка, кодируемого другим геном. Такие гены включают гены, кодирующие элементы меха-

низма секреции, гены, кодирующие транслокаторы, гены, кодирующие управляющие элементы, гены, кодирующие шапероны эффекторов T3SS, и гены, кодирующие эффекторы, а также другие белки, кодируемые SPI-1 или SPI-2. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор T3SS. Если рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является штаммом *Salmonella*, промотор выбирают из любого из эффекторных белков. В более предпочтительном случае промотор является промотором SopE, InvB или SteA.

В одном варианте реализации настоящего изобретения вектор, например экспрессирующий вектор, содержит последовательность ДНК, кодирующую сайт расщепления протеазой. Получение функционального и в целом действующего сайта расщепления обеспечивает отщепление сигнала доставки после транслокации. Поскольку сигнал доставки может мешать правильной локализации и/или функционированию транслоцированного белка в клетке-мишени, введение сайта расщепления протеазой между сигналом доставки и требуемым белком обеспечивает первоначальную доставку почти нативных белков в эукариотические клетки. Сайт расщепления протеазой предпочтительно представляет собой аминокислотный мотив, расщепляемый протеазой или ее каталитическим мотивом, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы риновируса человека (HRV 3C), протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактора Ха и тромбина, более предпочтительно аминокислотный мотив, расщепляемый протеазой TEV. В равной степени предпочтительный сайт расщепления протеазой представляет собой аминокислотный мотив, расщепляемый протеазой или ее каталитическим доменом, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы 3C риновируса человека, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактора Ха, протеазы процессинга убиквитина, называемой дезубиквитинизирующим ферментом, и тромбина. Наиболее предпочтительным является аминокислотный мотив, расщепляемый протеазой TEV или протеазой процессинга убиквитина.

Таким образом, в дополнительном варианте реализации настоящего изобретения гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки бактериального эффекторного белка T3SS протеазой. Предпочтительные способы расщепления представляют собой способы, в которых

а) протеазу транслоцируют в эукариотическую клетку с помощью рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, описанного в настоящем документе и экспрессирующего сигнал доставки бактериального эффекторного белка T3SS и протеазу в качестве гетерологического белка; или

б) протеаза экспрессируется конститутивно или временно в эукариотической клетке.

Обычно рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, применяемый для доставки желательного белка в эукариотическую клетку, и рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, транслоцирующий протеазу эукариотическую клетку, являются различными.

В одном варианте реализации настоящего изобретения вектор содержит дополнительную последовательность ДНК, кодирующую метящую молекулу или акцепторный сайт для метящей молекулы. Дополнительную последовательность ДНК, кодирующую метящую молекулу или акцепторный сайт для метящей молекулы, обычно присоединяют к 5'-концу или 3'-концу второй молекулы ДНК. Предпочтительную метящую молекулу или акцепторный сайт для метящей молекулы выбирают из группы, состоящей из улучшенного зеленого флуоресцентного белка (EGFP), кумарина, акцепторного сайта кумаринлигазы, резорубина, акцепторного сайта резорубинлигазы, тетрацистеинового мотива, используемого с красителем FAsH/ReAsH (Life Technologies). Наиболее предпочтительными являются резорубин и акцепторный сайт резорубинлигазы или EGFP. Применение метящей молекулы или акцепторного сайта для метящей молекулы должно приводить к присоединению метящей молекулы к требуемому гетерологичному белку, который затем должен доставляться без дополнительной очистки в эукариотическую клетку и обеспечивать отслеживание белка, например, посредством микроскопии живых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения вектор содержит дополнительную последовательность ДНК, кодирующую пептидный маркер. Дополнительную последовательность ДНК, кодирующую пептидный маркер, обычно присоединяют к 5'-концу или 3'-концу второй молекулы ДНК. Предпочтительный пептидный маркер выбирают из группы, состоящей из маркера Мус, маркера His, маркера Flag, маркера HA, маркера Strep или маркера V5 или комбинации двух или более маркеров из этих групп. Наиболее предпочтительными являются маркер Мус, маркер Flag, маркер His и комбинация маркеров Мус и His. Применение пептидного маркера должно приводить к возможности отслеживания меченого белка, например, посредством иммунофлуоресценции или вестерн-блоттинга с использованием антител против маркера. Кроме того, применение пептидного маркера обеспечивает аффинную очистку желательного белка после секреции в надосадочную жидкость культуры или после транслокации в эукариотические клетки, причем в обоих случаях используют способ очистки, подходящий для соответствующего маркера (например, металлохелатную аффинную очистку при использовании маркера His или очистку на основе антитела против Flag при использовании маркера Flag).

В одном варианте реализации настоящего изобретения вектор содержит дополнительную последо-

вательность ДНК, кодирующую сигнал локализации в ядре (NLS). Дополнительную последовательность ДНК, кодирующую сигнал локализации в ядре (NLS), обычно присоединяют к 5'-концу или 3'-концу второй молекулы ДНК, причем указанная дополнительная последовательность ДНК кодирует сигнал локализации в ядре (NLS). Предпочтительный NLS выбирают из группы, состоящей из NLS крупного Т-антигена SV40 и его производных [27], а также других вирусных NLS. Наиболее предпочтительными являются NLS крупного Т-антигена SV40 и его производные.

В одном варианте реализации настоящего изобретения вектор содержит полилинкер. Полилинкер обычно располагается на 3'-конце первой последовательности ДНК и/или на 5'-конце или 3'-конце второй последовательности ДНК. Вектор может содержать один или более одного полилинкера. Предпочтительный полилинкер выбирают из группы ферментов рестрикции, состоящей из XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI. Наиболее предпочтительными являются XbaI, XhoI, BstBI и HindIII.

Гибридный белок, экспрессируемый с первой, второй и необязательной третьей последовательностей ДНК вектора также называют "гибридным белком", т.е. гибридом сигнала доставки и гетерологичного белка. Гибридный белок также может содержать, например, сигнал доставки и два или более различных гетерологичных белка.

Настоящее изобретение рассматривает способы доставки гетерологичных белков, описанных выше в настоящем документе, в клетки злокачественной солидной опухоли. Белки можно доставлять, т.е. транслоцировать, в клетку злокачественной солидной опухоли во время введения рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью в организм субъекта, или доставлять, т.е. транслоцировать в клетку злокачественной солидной опухоли позже, например, после того как рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью области достигнет области злокачественной солидной опухоли и/или достигнет области злокачественной солидной опухоли и реплицируется, как описано выше. Время доставки можно регулировать, например, с помощью промотора, используемого для экспрессии гетерологичных белков в рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью. В первом случае экспрессией гетерологичного белка может управлять конститутивный промотор или более предпочтительно эндогенный промотор бактериального эффекторного белка. В случае отсроченной доставки белка экспрессией гетерологичного белка может управлять искусственно индуцируемый промотор, например промотор, индуцируемый арабинозой. В этом случае, после того как бактерии достигнут желательной области и накопятся там, субъекту необходимо ввести арабинозу. После этого арабиноза индуцирует экспрессию доставляемого белка бактериями.

Таким образом, в одном варианте реализации способ доставки гетерологичного белка в клетки злокачественной солидной опухоли включает:

- i) культивирование рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, описанного в настоящем документе;
- ii) контакт клетки злокачественной солидной опухоли с рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью согласно пункту i), причем гибридный белок, содержащий сигнал доставки бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, экспрессируется рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью и транслоцируется в клетку злокачественной солидной опухоли; и необязательно
- iii) расщепление гибридного белка таким образом, что гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки бактериального эффекторного белка внутри клетки злокачественной солидной опухоли.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере два гибридных белка, каждый из которых содержит сигнал доставки бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, экспрессируются рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью и транслоцируются в эукариотическую клетку с использованием способов согласно настоящему изобретению.

Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью можно культивировать таким образом, что при этом экспрессируется гибридный белок, содержащий сигнал доставки бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок в соответствии со способами, известными в данной области техники (например, FDA, Bacteriological Analytical Manual (BAM), глава 8: *Yersinia enterocolitica*). Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью предпочтительно можно культивировать в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, например, при 28°C. Для индукции экспрессии T3SS и, например, генов, зависимых от промотора YopE/SycE, бактерии можно растить при 37°C.

В одном варианте реализации клетки злокачественной солидной опухоли контактируют с двумя рекомбинантными штаммами грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью согласно пункту i), причем первый рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью экспрессирует первый гибридный белок, содержащий сигнал доставки бактериального эффекторного белка T3SS и первый гетерологичный белок, а второй рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью экспрессирует второй гибридный белок, содержащий сигнал

доставки бактериального эффекторного белка и второй гетерологичный белок, так что первый и второй гибридные белки транслоцируются в клетку злокачественной солидной опухоли. В этом варианте реализации предложена совместная инфекция, например, клетки злокачественной солидной опухоли двумя бактериальными штаммами в качестве проверенного способа доставки, например, двух различных гибридных белков в одиночные клетки для рассмотрения их функционального взаимодействия.

Кроме того, специалисты в данной области техники могут использовать ряд анализов для определения успешности доставки гибридного белка. Например, гибридный белок можно обнаружить посредством иммунофлуоресценции с использованием антител, распознающих присоединенный маркер (например, маркер Мус). Определение также может быть основано на ферментативной активности доставляемого белка, например, при анализе, описанном [16].

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью для применения в способе лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью накапливается в злокачественной солидной опухоли.

Рекомбинантные грамотрицательные бактерии с ослабленной вирулентности можно составить в виде фармацевтической композиции с подходящим фармацевтически приемлемым носителем для удобного и эффективного введения в количестве, достаточном для лечения субъекта. Единичная лекарственная форма рекомбинантной грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью или вводимой фармацевтической композиции может, например, содержать рекомбинантные грамотрицательные бактерии с ослабленной вирулентностью в количестве от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий на мл, предпочтительно от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий на мл, более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий на мл, наиболее предпочтительно приблизительно 10^8 бактерий на мл.

Под терминами "количество, достаточное для лечения субъекта" или "эффективное количество", используемыми в настоящем документе на равных основаниях, понимают количество бактерий одного или нескольких видов, достаточно большое для значительного положительного изменения состояния, подлежащего лечению, но достаточно низкое для недопущения серьезных побочных эффектов (при обоснованном соотношении пользы/риска) в рамках тщательной медицинской оценки. Эффективное количество бактерий должно зависеть от конкретной достигаемой цели, возраста и физического состояния субъекта, подвергаемого лечению, продолжительности лечения, природы одновременной терапии и конкретной использованной бактерии. Таким образом, эффективное количество бактерий должно являться минимальным количеством, обеспечивающим желательный эффект. Обычно субъекту вводят от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий, например от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий/м² поверхности тела, предпочтительно от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий, например от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий/м² поверхности тела, более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий, например от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий/м² поверхности тела, наиболее предпочтительно 10^8 бактерий, например 10^8 бактерий/м² поверхности тела.

Разовая доза рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, вводимая субъекту, например человеку для лечения злокачественной солидной опухоли, обычно составляет от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{10} бактерий, например от приблизительно 10^4 бактерий/м² поверхности тела до приблизительно 10^{10} бактерий/м² поверхности тела, предпочтительно от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий, например от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий/м² поверхности тела, более предпочтительно от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий, например от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий/м² поверхности тела, еще более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий, например от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий/м² поверхности тела, наиболее предпочтительно 10^8 бактерий, например 10^8 бактерий/м², поверхности тела из расчета общего количества рекомбинантных грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью.

Примеры веществ, способных служить фармацевтическими носителями, представляют собой углеводы, например лактозу, глюкозу и сахарозу; крахмал, например кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, например натрий-карбоксиметилцеллюлозу этилцеллюлозу и ацетаты целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; стеариновую кислоту; стеарат магния; сульфат кальция; карбонат кальция; растительные масла, например арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и какао-масло; полиолы, например пропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; агар; альгиновые кислоты; апирогенную воду; изотонический физиологический раствор; экстракты клюквы и фосфатный буферный раствор; сухое обезжиренное молоко; а также другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах, например витамин С, эстрогены и эхинацею. В композициях также могут присутствовать увлажнители и скользящие вещества, например лаурилсульфат натрия, а также красители, ароматизаторы, скользящие вещества, вспомогательные вещества, агенты для таблетирования, стабилизаторы,

ры, антиоксиданты и консерванты.

Способы введения рекомбинантных грамотрицательных бактерий с ослабленной вирулентностью субъекту можно выбрать из группы, состоящей из внутривенного, внутриопухолевого, внутрибрюшинного и перорального введения. Хотя настоящее изобретение не должно ограничиваться каким-либо конкретным способом введения, предпочтительным является внутривенное или внутриопухолевое введение бактерий или фармацевтических композиций.

В зависимости от пути введения может потребоваться покрыть активные ингредиенты, содержащие бактерии, материалом для защиты указанных организмов от действия ферментов, кислот и других природных условий, которые могут инактивировать указанные организмы. С целью введения бактерий иным способом, чем парентеральное введение, их следует покрыть материалом для предотвращения инактивации или вводить вместе с ним. Например, бактерии можно вводить совместно с ингибиторами ферментов или в липосомах. Ингибиторы ферментов включают ингибитор трипсина поджелудочной железы, диизопропилфторфосфат (DFP) и трасилол. Липосомы включают эмульсии "вода в масле в воде" P40, а также обычные липосомы и липосомы специфической конструкции, транспортирующие бактерии, например *Lactobacillus*, или продукты их жизнедеятельности к мишени внутри организма субъекта-хозяина. Одну бактерию можно вводить по отдельности или в сочетании со второй, отличающейся от нее бактерией. Можно совместно использовать любое количество различных бактерий. Под термином "в сочетании с" понимают "вместе", практически одновременно или последовательно. Композиции также можно вводить в виде таблетки, пилюли или капсулы, например лиофилизированной капсулы, содержащей бактерии или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, или в виде замороженного раствора бактерий или фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, содержащих ДМСО или глицерин. Еще одна предпочтительная форма применения включает получение лиофилизированной капсулы бактерий или фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению. Еще одна предпочтительная форма применения включает получение термически высушенной капсулы бактерий или фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению.

Рекомбинантные грамотрицательные бактерии с ослабленной вирулентностью или вводимую фармацевтическую композицию можно вводить посредством инъекции. Формы, подходящие для применения посредством инъекций, включают стерильные водные растворы (при растворимости агента в воде) или дисперсии и стерильные порошки для изготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсий для немедленного приема. Во всех случаях лекарственная форма должна быть стерильной и текучей до такой степени, чтобы легко обеспечить выход из шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытий, например лецитина, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например углеводы или хлорид натрия. Длительное поглощение композиций, вводимых путем инъекции, можно обеспечить за счет использования в составе композиций агентов, замедляющих поглощение, например, моностеарата алюминия и желатина.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят субъекту совместно с сидерофором. Эти сидерофоры являются предпочтительными. Сидерофоры, которые можно использовать для совместного введения, представляют собой сидерофоры, включающие гидроксаматные, катехолатные и смешанно-лигандные сидерофоры. Предпочтительными сидерофорами являются дефероксамин (также известный как дезферриоксамин В, дезфероксамин В, DFO-B, DFOA, DFB или дезферал), дезферриоксамин Е, деферазирокс (эксиджад, дезирокс, дефриджет, дезифер) и деферипрон (феррипрокс), более предпочтительным дефероксамин. Дефероксамин представляет собой бактериальный сидерофор, продуцируемой актинобактерией *Streptomyces pilosus* и доступный для приобретения, например, в Novartis Pharma Schweiz AG (Швейцария).

Совместное введение с сидерофором можно выполнять до, одновременно или после введения рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью. Сидерофор предпочтительно вводят до введения рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, более предпочтительно, по меньшей мере за 1 ч, предпочтительно по меньшей мере за 6 ч, более предпочтительно по меньшей мере за 12 ч, в особенности по меньшей мере за 24 ч до введения рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью субъекту. В конкретном варианте реализации субъекта предварительно обрабатывают десфероксамином за 24 ч до инфекции рекомбинантным штаммом грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью с целью обеспечения роста бактерий. Обычно сидерофор совместно вводят в однократной дозе от приблизительно $0,5 \times 10^{-5}$ моль до приблизительно 1×10^{-3} моль, более предпочтительно от приблизительно 1×10^{-5} моль до приблизительно 1×10^{-4} моль, предпочтительно от приблизительно $3,5 \times 10^{-5}$ моль до приблизительно $1,1 \times 10^{-4}$ моль на кг массы тела. Обычно десфероксамин совместно вводят в однократной дозе от прибли-

зительно 20 мг до приблизительно 60 мг, предпочтительно от приблизительно 20 мг до приблизительно 60 мг/кг массы тела.

Режимы введения рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе, как известно специалисту, должны зависеть от конкретной достигаемой цели, возраста и физического состояния субъекта, подвергаемого лечению, продолжительности лечения, природы одновременной терапии и конкретной использованной бактерии. Рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью обычно вводят субъекту согласно режиму введения (схеме введения/приема), состоящему из однократной дозы каждые 2-20 дней, предпочтительно каждые 6-10 дней, более предпочтительно каждые 7-9 дней, предпочтительно в соответствии с режимом введения, состоящим из однократной дозы каждые 2-8 недель, предпочтительно каждые 2-6 недель, более предпочтительно каждые 3-4 недели. Период введения обычно составляет от приблизительно 20 до приблизительно 60 суток, предпочтительно приблизительно 30-40 суток. В качестве альтернативы период введения обычно составляет от приблизительно 8 до приблизительно 32 недель, предпочтительно от приблизительно 8 до приблизительно 24 недель, более предпочтительно от приблизительно 12 до приблизительно 16 недель.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения предложен набор для лечения злокачественных солидных опухолей, предпочтительно у людей. Такие наборы в общем случае должны содержать рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью или фармацевтическую композицию, описанные в настоящем документе, и инструкции по применению набора. В некоторых вариантах реализации наборы включают держатель, упаковку или контейнер, разделенный на отсеки для одного или более контейнеров, например флаконов, пробирок и т.п., причем каждый из контейнеров содержит один или более из отдельных элементов, используемых в способе, описанном в настоящем документе. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и тест-пробирки. В других вариантах реализации контейнер изготовлен из различных материалов, например, стекла или пластмассы.

Примеры

Пример 1.

А. Материалы и способы.

Бактериальные штаммы и условия роста. Штаммы, использованные в данном исследовании, перечислены на фиг. 14А-14N. *E.coli* Top 10, используемую для очистки и клонирования плазмид, и *E.coli* Sm10 λ pir, используемую для конъюгации, а также *E.coli* BW19610 [28], используемую для размножения pKNG101, выращивали в рабочем порядке на чашках с LB-агаром и в LB-бульоне при 37°C. Ампициллин использовали в концентрации 200 мкг/мл (*Yersinia*) или 100 мкг/мл (*E.coli*) для отбора по экспрессирующим векторам. Стрептомицин использовали в концентрации 100 мкг/мл для отбора по векторам-самоубийцам. *Y. enterocolitica* MRS40 (O:9, биотип 2) [17], происходящий от E40 без устойчивости к ампициллину, [16] и штаммы, происходящие от него, в рабочем порядке выращивали на среде с сердечно-мозговым экстрактом (BHI; Difco) при 37°C. Для всех штаммов *Y. enterocolitica* добавляли налидиксовую кислоту (35 мкг/мл), а для всех штаммов *Y. enterocolitica* дополнительно добавляли 100 мкг/мл мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты (mDAP, Sigma Aldrich). *S. enterica* SL1344 в рабочем порядке выращивали на чашках с LB-агаром и в LB-бульоне при 37°C. Ампициллин использовали в концентрации 100 мкг/мл для отбора по экспрессирующим векторам в *S. enterica*.

Генетические манипуляции с *Y. enterocolitica*.

Описаны генетические манипуляции с *Y. enterocolitica* [29, 30]. Вкратце конструировали мутаторы для модификации или делеции генов в плазидах pYV или на хромосоме посредством ПЦР с перекрыванием 2 фрагментов с использованием очищенной плазмиды pYV40 или геномной ДНК в качестве матрицы, что приводило к образованию фланкирующих последовательностей размером 200-250 п.о. с обеих сторон делетированной или модифицированной части соответствующего гена. Полученные фрагменты клонировали в pKNG101 [26] в *E.coli* BW19610 [28]. После подтверждения последовательностей плазмиды трансформировали в *E.coli* Sm10 λ pir, откуда плазмиды мобилизовали в соответствующий штамм *Y. enterocolitica*. Мутантов, несущих встроенный вектор, размножали в течение нескольких поколений без селекционного давления. Затем добавляли сахарозу для отбора клонов, потерявших вектор. Наконец, мутантов выявляли посредством ПЦР колоний. Специфические мутаторы (pSi_408, pSi_419) перечислены в табл. 3.

Конструирование плазмид.

Плазмиду pBad_Si2 или pBad_Si1 (фиг. 9) использовали для клонирования гибридных белков со 138 N-концевыми аминокислотами YopE (SEQ ID NO: 2). pBad_Si2 сконструировали путем клонирования фрагмента SycE-YopE₁₋₁₃₈, содержащего эндогенный промотор YopE и SycE, из очищенной pYV40 в сайт KpnI/HindIII pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включали удаление фрагмента NcoI/BglII из pBad-MycHisA путем гидролиза, обработки фрагментом Кленова и повторного лигирования. Двухнаправленный терминатор транскрипции (BBa_B1006; фонд iGEM) клонировали в сайт KpnI и обрабатывали фрагментом Кленова (pBad_Si2) или в сайт BglII (pBad_Si1). В дальнейшем по 3'-концу

YopE₁₋₁₃₈ добавили следующие сайты расщепления: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII) (фиг. 9B). pBad_Si1 была идентична pBad_Si2, но кодировала EGFP, амплифицированный из pEGFP-C1(Clontech), в сайте NcoI/BglIII под управлением промотора, индуцируемого арабинозой. Плазмиды pSi_266, pSi_267, pSi_268 и pSi_269, содержащие соответствующий эндогенный промотор и фрагмент SteA₁₋₂₀ (pSi_266), полную последовательность SteA (pSi_267), фрагмент SopE₁₋₈₁ (pSi_268) или фрагмент SopE₁₋₁₀₅ (pSi_269), амплифицировали из геномной ДНК *S. enterica* SL1344 и клонировали в сайт NcoI/KpnI pBad-MycHisA (Invitrogen).

Полноразмерные гены или их фрагменты амплифицировали с использованием специфических праймеров, перечисленных ниже в табл. 1, и клонировали в виде гибридов с YopE₁₋₁₃₈ в плазмиду pBad_Si2 или в случае z-BIM (SEQ ID NO: 21) в pBad_Si1 (см. табл. 2 ниже). Для гибридов с SteA или SopE синтетические ДНК-конструкты расщепляли KpnI/HindII и клонировали в pSi_266, pSi_267, pSi_268 или pSi_269 соответственно. В случае генов видов бактерий в качестве матрицы использовали очищенную геномную ДНК (*S. flexneri* M90T, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium SL1344, *Bartonella henselae* ATCC 49882). Для генов человека использовали универсальную библиотеку кДНК (Clontech), если не указано иное (фиг. 14A-14N), гены данио амплифицировали из библиотеки кДНК (любезно подаренной М. Affolter). Лигированные фрагменты клонировали в *E. coli* Top10. Секвенированные плазмиды внедряли путем электропорации в желательный штамм *Y. enterocolitica* или *S. enterica* в условиях стандартной электропорации для *E. coli*.

Таблица 1

№ праймера	Si_последовательность
285:	CATACCATGGGAGTGAGCAAGGGCGAG
286:	GGAAGATCTtACTTGTACAGCTCGTCCAT
287:	CGGGGTACCTCAACTAAATGACCGTGGTG
288:	GTTAAAGCTTtctgaatctagactcgagCGTGGCGAACTGGTC
292:	CAGTctcgagCAAATTCTAAACAAAATACTTCCAC
293:	cagtTTCGAATTAATTTGTATTGCTTTGACGG
296:	CAGTctcgagACTAACATAACACTATCCACCCAG
297:	GTTAAAGCTTTCAGGAGGCATTCTGAAG
299:	CAGTctcgagCAGGCCATCAAGTGTGTG
300:	cagtTTCGAATCATTTTCTCTTCTCTTCTTCA
301:	CAGTctcgagGCTGCCATCCGGAA
302:	cagtTTCGAATCACAAGACAAGGCACCC
306:	GTTAAAGCTTGGAGGCATTCTGAAGatacttatt
307:	CAGTctcgagCAAATACAGAGCTTCTATCACTCAG
308:	GTTAAAGCTTTCAGATGTGATTAATGAAGAAATG
317:	cagtTTCGAACCCATAAAAAAGCCCTGTC
318:	GTTAAAGCTTCTACTCTATCATCAAACGATAAAATGg

324: CAGTctcgagTTCACCTCAAGAAACGCAAA
 339: cagtTTCGAATTTTCTCTTCTCTTCTTCACg
 341: cgtaTCTAGAAAAATGATGAAAATGGAGACTG
 342: GTTAAAGCTTtaGCTGGAGACGGTGAC
 346: CAGTctcgagTTCCAGATCCCAGAGTTTG
 347: GTTAAAGCTTTCACTGGGAGGGGG
 351: CAGTctcgagctcgagTTATCTACTCATAGAACTACTTTTGCAG
 352: cgcGGATCCcagtgctctgcggcatta
 353: CATTTATTCCTCCTAGTTAGTCAcagcaactgctgctctttc
 354: gaaaggagcagcagttgctgTGAATACTAGGAGGAATAAATG
 355: cgattcacggattgctttctCATTATTCCTCCAGGTACTA
 356: TAGTACCTGGAGGGAATAATGagaagcaatccgtaatcg
 357: cgtaTCTAGAcggctttaagtgcgacattc
 364: cgtaTCTAGACTAAAGTATGAGGAGAGAAAATTGAA
 365: GTTAAAGCTTTCAGCTTGCCGTCGT
 367: CGTAtctagaGACCCGTTCTGGTGC
 369: cgtaTCTAGAcccccaagaagaagc
 373: GTTAAAGCTTGCTGGAGACGGTGACC
 386: CGTAtctagaTCAGGACGCTTCGGAGGTAG
 387: CGTAtctagaATGGACTGTGAGGTCAACAA
 389: CGTAtctagaGGCAACCGCAGCA
 391: GTTAAAGCTTTCAGTCCATCCCATTCTg
 403: CGTAtctagatctggaatatccctggaca
 406: GTTAAAGCTTgtctgtctcaatgccacagt
 410: CAGTctcgagATGTCCGGGGTGGTg
 413: cagtTTCGAATCACTGCAGCATGATGTC
 417: CAGTctcgagAGTGGTGTTGATGATGACATG
 420: cagtTTCGAATTAGTGATAAAAATAGAGTTCTTTTGTGAG
 423: CAGTctcgagATGCACATAACTAATTTGGGATT
 424: cagtTTCGAATTATACAAATGACGAATACCCTTT
 425: GTTAAAGCTTttacacctgctgttcttctggcgGCTGGAGACGGTGAC
 428: CGTAtctagaATGGACTTCAACAGGAACCTT
 429: CGTAtctagaGGACATAGTCCACCAGCG

430: GTTAAAGCTTTCAGTTGGATCCGAAAAAC
 433: CGTAtctagaGAATTAAAAAAACACTCATCCCA
 434: CGTAtctagaCCAAAGGCAAAAGCAAAAA
 435: GTTAAAGCTTTTAGCTAGCCATGGCAAGC
 436: CGTAtctagaATGCCCCGCCCC
 437: GTTAAAGCTTCTACCCACCGTACTCGTCAAT
 438: CGTAtctagaATGTCTGACACGTCCAGAGAG
 439: GTTAAAGCTTTCATCTTCTTCGCAGGAAAAAG
 445: cgcGGATCCttatgggtctcacagcaaaa
 446: CATTTATTCTCCTAGTTAGTCAaggcaacagccaatcaagag
 447: ctcttgattggtgttgccctTGACTAACTAGGAGGAATAAATG
 448: ttgattgcagtgcacatggtgCATTATTCCTCCAGGTACTA
 449: TAGTACCTGGAGGGAATAATGccatgtcactgcaatcaa
 450: cgtaTCTAGAtagccgcagatgttggtatg
 451: CGTAtctagaGATCAAGTCCAAGTGGTGG
 463: CAGTctcgaggaaagctgtttaaggggc
 464: cagfTTCGAAttagcgacggcgacg
 476: GTTAAAGCTTtACTTGTACAGCTCGTCCAT
 477: CGTAtctagaGTGAGCAAGGGCGAG
 478: CAGTctcgagATGGAAGATTATACCAAAATAGAGAAA
 479: GTTAAAGCTTCTACATCTTCTTAATCTGATTGTCCa
 482: CGTAtctagaATGGCGCTGCAGCt
 483: GTTAAAGCTTTCAGTCATTGACAGGAATTTTg
 486: CGTAtctagaATGGAGCCGGCGGCG
 487: GTTAAAGCTTTCAATCGGGGATGTCTg
 492: CGTAtctagaATGCGCGAGGAGAACAAGGG
 493: GTTAAAGCTTTCAGTCCCCTGTGGCTGTGc
 494: CGTAtctagaATGGCCGAGCCTTG
 495: GTTAAAGCTTtaTTGAAGATTTGTGGCTCC
 504: CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTATG
 CCCCCCCCC
 505: GTTAAAGCTTCCCACCGTACTCGTCAATtc

508:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTATG
 GCCGAGCCTTG
 509: GTTAAAGCTTTTGAAGATTTGTGGCTCCc
 511:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGTG
 AGCAAGGGCGAG
 512:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTCCG
 CCGAAAAAAAACGTAAAGTTGTGAGCAAGGGCGAG
 513:GTTAAAGCTTtAAACTTTACGTTTTTTTTTCGGCGGCTTGTACAGCTCGTCCAT
 515:CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAT
 TATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG
 558: CGTATCTAGAATGACCAGTTTTGAAGATGC
 559:GTTAAAGCTTTCATGACTCATTTTCATCCAT
 561:CGTATCTAGAATGAGTCTCTTAAACTGTGAGAACAG
 562:GTTAAAGCTTCTACACCCCCGCATCA
 580: catgccatggATTTATGGTCATAGATATGACCTC
 585: CAGTctcgagATGCAGATCTTCGTCAAGAC
 586: GTTAAAGCTTgctagcttcgaaACCACCACGTAGACGTAAGAC
 588: cagtTTCGAAGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG
 612: CGGGGTACCcatgagtagcttatttcctgataaag
 613: CGGGGTACCataattgtccaaatagttatgtagc
 614: catgccatggCGGCAAGGCTCCTC
 615: cgggggtaccTTTATTGTCAACACTGCCCC
 616: cgggggtaccTGCGGGGTCTTTACTCG
 677:TTACTATTCTGAAGAAATTATTCATAATATTGCCC GCCATCTGGCCCCAAATTGG
 TGATGAAATGGATCATTAAAGCTTGGAGTA
 678:TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTTCATCACCAATTTGGGCCAGATGGCGGGCA
 ATATTATGAATAATTTCTTCGAATAGTAA
 682:TTACTACTCGAGAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCGCCGCATTGGTGATGAAC
 TGGATAGCTAAGCTTGGAGTA
 683:TACTCCAAGCTTAGCTATCCAGTTCATCACCAATGCGGCGCAGACATTCGCTC
 AGTTTTTTCTCGAGTAGTAA
 725: TTACTATTCTGAAGAAATTATTCATAATATTGCC
 726: TACTCCAAGCTTACGGTTGAATATTATGATCCATTTTCATCACCAATTTGG
 727: TTACTATTCTGAAGCCGGTGGTGCCGAAGAAATTATTCATAATATTGCC
 728: TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTTCATCA
 733:TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCCC
 734:TACTCCTTCGAAGGCACCATGATCCATTTTCATCACCAATTTGG
 735:TACTCCTTCGAATTAATGATCCATTTTCATCACCAATTTG
 736:TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCG
 737: TACTCCTTCGAAGGCACCGCTATCCAGTTCATCACCAATG
 738:TACTCCTTCGAATTAGCTATCCAGTTCATCACCAATG

Таблица 2

Клонированные гибридные белки

Белок для доставки с помощью T3SS	Seq. ID. No. белка	Каркас плазмиды	Название полученной плазмиды	Праймер ы. Si_Nr.:	Seq. ID No. праймера
YopE1-138-MycHis	3	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138)	44/45 и 46/47
YopE1-138-MycHis	3	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-YopE1-138)	46/47
YopE1-138-IpgB1	4	pBad_Si_2	pSi_16	292/293	48/49
YopE1-138-SopE	5	pBad_Si_2	pSi_20	296/297	50/51
YopE1-138-Rac1 Q61L	26	pBad_Si_2	pSi_22	299/300	52/53
YopE1-138-RhoA Q61E	27	pBad_Si_2	pSi_24	301/302	54/55
YopE1-138-SopE-MycHis	135	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	50/56
YopE1-138-SopB	6	pBad_Si_2	pSi_30	307/308	57/58
YopE1-138-FADD	28	pBad_Si_2	pSi_37	367/386	76/79
YopE1-138-OspF	7	pBad_Si_2	pSi_38	317/318	59/60
YopE1-138-BepG 715-end	136	pBad_Si_2	pSi_43	324/351	61/67
YopE1-138-Rac1 Q61L-MycHis	137	pBad_Si_2	pSi_51	299/339	52/62
YopE1-138-Slmb1-VhH4	32	pBad_Si_2	pSi_53	341/342	63/64
YopE1-138-Bad	29	pBad_Si_2	pSi_57	346/347	65/66

YopE1-138-SptP	8	pBad_Si_2	pSi_64	364/365	74/75
YopE1-138-NLS-Slmb1-VhH4	33	pBad_Si_2	pSi_70	369/342	77/64
YopE1-138-Bid	24	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	80/82
YopE1-138-t-Bid	25	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	81/82
YopE1-138-каспаза 3 p17	22	pBad_Si_2	pSi_97	403/406	83/84
YopE1-138-GPCR GNA12	30	pBad_Si_2	pSi_103	410/413	85/86
YopE1-138-каспаза 3 p10/12	23	pBad_Si_2	pSi_106	417/420	87/88
YopE1-138-lpgD	9	pBad_Si_2	pSi_111	423/424	89/90
YopE1-138-Slmb1-VhH4-NLS	34	pBad_Si_2	pSi_112	341/425	63/91
YopE1-138-z-Bid	19	pBad_Si_2	pSi_116	428/430	92/94
YopE1-138-z-t-Bid	20	pBad_Si_2	pSi_117	429/430	93/94
YopE1-138-BepA E305-end	11	pBad_Si_2	pSi_118	433/435	95/97
YopE1-138-BepA	10	pBad_Si_2	pSi_119	434/435	96/97
YopE1-138-ET1	36	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	98/99
YopE1-138-z-BIM	21	pBad_Si_1	pSi_121	438/439	100/101
YopE1-138-VhH4 нанотело, распознающее EGFP	31	pBad_Si_2	pSi_124	451/373	108/78
YopE1-138-протеаза TEV S219V	42	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	109/110
YopE1-138-EGFP	37	pBad_Si_2	pSi_140	477/476	112/111
YopE1-138-Cdk1	14	pBad_Si_2	pSi_143	478/479	113/114
YopE1-138-Mad2	15	pBad_Si_2	pSi_145	482/483	115/116
YopE1-138-Ink4A	16	pBad_Si_2	pSi_147	486/487	117/118
YopE1-138-Ink4B	17	pBad_Si_2	pSi_150	492/493	119/120
YopE1-138-Ink4C	18	pBad_Si_2	pSi_151	494/495	121/122
YopE1-138-TIFA	13	pBad_Si_2	pSi_153	558/559	131/132
YopE1-138-2x сайт TEV - ET1	41	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	123/124
YopE1-138-2x сайт TEV - EGFP - NLS	39	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	127/129
YopE1-138-2x сайт TEV - NLS - EGFP	38	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	128/111
YopE1-138-2x сайт TEV - INK4C	40	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	125/126
YopE1-138-2x сайт TEV - Flag - INK4C	43	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	130/126
YopE1-138-Traf6 мыши	12	pBad_Si_2	pSi_166	561/562	133/134

YopE1-138-фрагмент ВНЗ tBid мышь после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	138	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	148/149
YopE1-138-фрагмент ВНЗ ВАХ мышь после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	139	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	150/151
SteA1-20	140	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pSi_266	580/612	152/153
SteA	141	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pSi_267	580/613	152/154
SopE1-81	142	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pSi_268	614/615	155/156
SopE1-105	143	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pSi_269	614/616	155/157
SteA1-20-tBid мышь после оптимизации кодонов для S. enterica	144	pSi_266	pSi_270	синтетиче ский конструкт	/
SteA-tBid мышь после оптимизации кодонов для S. enterica	145	pSi_267	pSi_271	синтетиче ский конструкт	/
SopE1-81-tBid мышь после оптимизации кодонов для S. enterica	146	pSi_268	pSi_272	синтетиче ский конструкт	/
SopE1-105-tBid мышь после оптимизации кодонов для S. enterica	147	pSi_269	pSi_273	синтетиче ский конструкт	/
YopE1-138-Ink4A 84-103 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	158	pBad_Si_2	pSi_362	745/746	172/173

YopE1-138-p107/RBL1 657-662 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica (AAA02489.1)	159	pBad_Si_2	pSi_363	747/748	174/175
YopE1-138-p21 141-160 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica (AAH13967.1)	160	pBad_Si_2	pSi_364	749/750	176/177
YopE1-138-p21 145-160 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica (AAH13967.1)	161	pBad_Si_2	pSi_366	753/754	178/179
YopE1-138-p21 17-33 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica (AAH13967.1)	162	pBad_Si_2	pSi_367	755/756	180/181
YopE1-138-циклин D2 139-147 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica (CAA48493.1)	163	pBad_Si_2	pSi_368	757/758	182/183
SteA-Ink4a-MycHis	164	pSi_267	pSi_333	703/704	184/185
SopE1-105-Ink4a-MycHis	165	pSi_269	pSi_334	703/704	184/185
SteA-Ink4c-MycHis	166	pSi_267	pSi_335	PCR1: 705/706; ПЦР2: 707/708; ПЦР с перекрыв анием: 705/708	186/187, 188/189
SopE1-105-Ink4c-MycHis	167	pSi_269	pSi_336	PCR1: 705/706; ПЦР2: 707/708; ПЦР с перекрыв	186/187, 188/189

				анием: 705/708	
SteA-Mad2-MycHis	168	pSi_267	pSi_337	709/710	190/191
SopE1-105-Mad2-MycHis	169	pSi_269	pSi_338	709/710	190/191
SteA-Cdk1-MycHis	170	pSi_267	pSi_339	711/712	192/193
SopE1-105-Cdk1-MycHis	171	pSi_269	pSi_340	711/712	192/193
YopE1-138-tBid мышь после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	194	pBad_Si_2	pSi_315	синтетиче- ский конструкт	/
YopE1-138- убиквитин	195	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	197/198
YopE1-138- убиквитин-Flag- INK4C-MycHis	196	pSi_236	pSi_237_II	588/509	199/126
YopE1-138- (фрагмент ВНЗ tBid мышь после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica), готовый для вставки дополнительных доменов	200	pBad_Si_2	pSi_357	733/735	204/205
YopE1-138- (фрагмент ВНЗ ВАХ мышь после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica), готовый для вставки дополнительных доменов	201	pBad_Si_2	pSi_358	736/738	206/207
YopE1-138- (фрагмент ВНЗ tBid мышь после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica) ₂	202	pSi_357	pSi_371	733/734	204/208
YopE1-(138- фрагмент ВНЗ tBid мышь после оптимизации	203	pSi_358	pSi_373	733/734	204/208

кодонов для Y. enterocolitica - фрагмент ВНЗ Вах мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica					
YopE ₁₋₁₃₈ -увеличенный фрагмент ВНЗ tBid мыши после оптимизации кодонов	209	pBad_Si_2	pSi_353	725/726	212/213
YopE ₁₋₁₃₈ -10 АК-линкер - фрагмент ВНЗ tBid мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	210	pBad_Si_2	pSi_354	727/728	214/215
YopE ₁ -(138-фрагмент ВНЗ Вах мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica - фрагмент ВНЗ tBid мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	211	pSi_357	pSi_374	736/737	206/216

Таблица 3

Мутаторы для генетической модификации

Конструкт мутатора	Для вставки в:	Каркас плазмиды	Название полученной плазмиды	Праймеры, Si_Nr.:	Праймеры, Seq.Id No.	использованные с исходным штаммом
YopE ₁₋₁₃₈ -tBID ВНЗ	pYV	pKNG101	pSi_408	Синтетический ген	/	/
YopE ₁₋₁₃₈ -(tBID ВНЗ) ₂	pYV	pKNG101	pSi_419	Синтетический ген	/	Штамм мутирован pSi_408

Секреция Yop.

Индукцию регулона Yop выполняли путем сдвига температуры культивирования на 37°C в ВНИ-Ох (условия, допускающие секрецию) [31]. Добавляли источник углерода (глюкозу, 4 мг/мл).

Фракции общих клеток и надосадочную жидкость разделяли центрифугированием при 20800 g в течение 10 мин при температуре 4°C. Клеточный осадок принимали за фракцию общих клеток. Белки в надосадочной жидкости осаждали 10% мас./об. трихлоруксусной кислотой в течение 1 ч при 4°C. После центрифугирования (20800 g в течение 15 мин) и удаления надосадочной жидкости полученный осадок промывали в ледяном ацетоне в течение ночи. Образцы повторно центрифугировали, надосадочную жидкость выбрасывали, а осадок высушивали на воздухе и ресуспендировали в загрузочном красителе 1x ДСН.

Секретируемые белки анализировали электрофорезом в ДСН-ПААГ; в каждом случае белки, секретируемые 3×10⁸ бактерий, загружали на дорожку. Обнаружение специфических секретируемых белков иммуноблоттингом выполняли с использованием 12,5% ДСН-ПААГ. Для обнаружения белка в общих клетках 2×10⁸ бактерий загружали на дорожку, если не указано иное, разделяли белки в 12,5% ДСН-ПААГ, а затем выполняли обнаружение иммуноблоттингом.

Иммуноблоттинг выполняли с использованием моноклональных антител крысы против YopE (MPA193-13A9; 1:1000 [32]). Антисыворотку предварительно дважды абсорбировали против *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd для снижения фонового окрашивания. Обнаружение выполняли с использованием вторичных антител против антител крысы, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:5000; Southern biotech) до развития окрашивания с хемилюминесцентным субстратом ECL (LumiGlo, KPM).

Культуры клеток и инфекции.

HeLa Cc12, фибробласты swiss 3T3, 4T1, B16F10 и D2A1 культивировали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM) с добавлением 10% FCS и 2 mM L-глутамина (cDMEM). HUVEC выделяли и культивировали, как описано в [33]. Клетки Jurkat и 4T1 культивировали в RPMI1640 с добавлением 10% FCS и 2 mM L-глутамина. *Y. enterocolitica* выращивали в ВНИ с добавками в течение ночи при КТ, разбавляли свежей ВНИ до ОП₆₀₀, равной 0,2, и выращивали в течение 2 ч при КТ, а затем меняли температуру до 37°C с использованием качалки с водяной баней на следующие 30 мин или 1 ч в случае доставки EGFP. Наконец, бактерии собирали центрифугированием (6000 gcf, 30 с) и однократно промывали DMEM с добавкой 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамина. *S. enterica* выращивали в LB с добавками в течение ночи при 37°C, разбавляли 1:40 свежей средой LB и выращивали в течение 2,5 ч при 37°C (условия индукции SpiI T3SS) или ночную культуру дополнительно инкубировали при 37°C (условия индукции SpiII T3SS). Наконец, бактерии собирали центрифугированием (6000 gcf, 30 с) и однократно промывали DMEM с добавкой 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамина. Клетки, посеянные в 96-луночные (для иммунофлуоресцентного анализа) или 6-луночные (для вестерн-блоттинга) планшеты, инфицировали при указанных MOI в DMEM с добавкой 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамина. После добавления бактерий планшеты центрифугировали в течение 1 мин при 1750 об/мин и помещали на 37°C на указанное время. Бактерии вне клеток уничтожали гентамицином (100 мг/мл), если указано. В случае иммунофлуоресцентного анализа анализ инфекции останавливали добавлением 4% ПФА для фиксации. Для вестерн-блоттинга клетки дважды промывали ледяным PBS и добавляли буфер Phospho-safe (Novagen) для лизиса клеток. После инкубирования на льду клетки центрифугировали (16000 gcf, 25 мин, 4°C). Надосадочную жидкость собирали и анализировали на предмет содержания общего белка посредством анализа BCA по Брэдфорду (Pierce) перед электрофорезом в ДСН-ПААГ и вестерн-блоттингом с использованием антител против Phospho-Akt (Ser473 и T308 производства Cell Signaling), антитела против актина (Millipore), антитела против Bid (Cell Signaling), антитела против Myc (Santa Cruz), антитела против p38 (Cell Signaling), антитела против фосфо-p38 (Thr180/Tyr182; Cell Signaling), антитела против p17 каспазы 3 (Cell Signaling) и антитела против Ink4C (Cell Signaling).

Вестерн-блоттинг белков, транспонированных T3SS из инфицированных клеток.

Клетки HeLa в 6-луночных планшетах инфицировали при MOI, равной 100, как описано выше. В случае совместной инфекции штаммом *Y. enterocolitica*, транслоцирующим протеазу TEV, задавали ОП₆₀₀ для штаммов и смешивали две бактериальные суспензии в пробирке в соотношении 1:1 (если не указано иное) перед добавлением к клеткам. В конце инфекции клетки дважды промывали ледяным PBS и собирали путем соскребания в небольшой объем ледяного PBS. После центрифугирования (16000 gcf, 5 мин, 4°C) осадок растворяли в 0,002% дигитонине с добавлением смеси ингибиторов протеаз (Roche complete, Roche). Растворенные осадки инкубировали на льду в течение 5 мин, а затем центрифугировали (16000 gcf, 25 мин, 4°C). Надосадочную жидкость собирали и анализировали на предмет содержания общего белка посредством анализа BCA по Брэдфорду (Pierce) перед электрофорезом в ДСН-ПААГ и вестерн-блоттингом с использованием антител против Myc (Santa Cruz, 9E11) или против Ink4C (Cell Signaling).

Иммунофлуоресцентный анализ.

Клетки, высеванные на 96-луночные планшеты (Corning), инфицировали, как описано выше, и после фиксации 4% ПФА трижды промывали PBS. Затем клетки блокировали 5% сывороткой козы в PBS 0,3% Triton X-100 в течение 1 ч при КТ. Первичное антитело (против Myc, Santa Cruz, 1:100) разбавляли PBS с 1% БСА и 0,3% Triton X-100 и инкубировали клетки в течение ночи при 4°C. Клетки четырежды промывали PBS, а затем добавляли вторичное антитело (AF 488 против антител мыши, Life Technologies, 1:250), разбавленное PBS с 1% БСА и 0,3% Triton X-100. При необходимости включали краситель Hoechst для ДНК (Life Technologies, 1:2500) и/или актина (Dy647-фаллоидин, DyeOmics). В некоторых случаях использовали только краситель для ДНК и/или актина непосредственно после смывания ПФА. Клетки инкубировали в течение 1 ч при КТ, трижды промывали PBS и анализировали посредством автоматизированного анализа изображений, как описано ниже.

Автоматизированная микроскопия и анализ изображений.

Изображения автоматически получали на ImageXpress Micro (Molecular devices, Саннивейл, США). Количественное определение интенсивности окрашивания антителами против Myc выполняли с использованием MetaXpress (Molecular devices, Саннивейл, США). Области с клетками, исключая области ядер и области, содержащие бактерии, выбирали вручную (круги на изображении размером 40 пикселей) и регистрировали среднюю интенсивность.

Стимуляция ФНОα и вестерн-блоттинг фосфо-p38.

Клетки HeLa, высеянные в 6-луночные планшеты, инфицировали при MOI, равной 100, как описано выше. Через 30 мин после инфицирования добавляли гентамицин, а через 45 мин после инфицирования - ФНО α (10 нг/мл). Через 1 ч 15 мин после инфицирования клетки дважды промывали ледяным PBS и добавляли буфер Phospho-safe (Novagen) для лизиса клеток. После инкубирования на льду клетки центрифугировали (16000 rcf, 25 мин, 4°C). Надосадочную жидкость собирали и анализировали на предмет содержания общего белка посредством анализа BCA по Брэдфорду (Pierce) перед электрофорезом в ДСН-ПААГ и вестерн-блоттингом с использованием антител против фосфо-p38, антител против общего p38 (Cell Signaling) и антитела против актина (Millipore).

Определение уровня цАМФ в инфицированных клетках HeLa.

Клетки HeLa, высеянные в 96-луночные планшеты, инфицировали, как описано выше. За 30 мин до инфекции cDMEM заменяли на DMEM с добавлением 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин и 100 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX, Sigma Aldrich). Через 60 мин после инфицирования добавляли гентамицин и клетки дополнительно инкубировали при 37°C в течение еще 90 мин. Определение цАМФ выполняли с использованием конкурентного твердофазного ИФА в соответствии с инструкциями производителя (Amersham, cAMP Biotrak, RPN225). В качестве положительного контроля к клеткам в DMEM с добавлением 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин и 100 мкМ IBMX на 1 ч добавляли указанное количество холерного токсина (C8052, Sigma Aldrich).

Подготовка образцов для фосфопротеомного анализа.

Для каждого условий выращивали два 6-луночных планшета клеток HeLa CCL-2 до конfluence. Клетки инфицировали в течение 30 мин, как описано выше. В указанные моменты времени планшеты помещали на лед и дважды промывали ледяным PBS. Затем выполняли сбор образцов в раствор мочевины [8 M мочевины (AppliChem), 0,1 M бикарбоната аммония (Sigma), 0,1% RapiGest (Waters), 1x PhosSTOP (Roche)]. Образцы встряхивали на вортексе в течение короткого промежутка времени, обрабатывали ультразвуком при 4°C (Hielscher), встряхивали в течение 5 мин на термомиксере (Eppendorf) и центрифугировали в течение 20 мин при 4°C и 16000 g. Надосадочную жидкость собирали и хранили при температуре -80°C для дальнейшей обработки. Для изменения концентрации белка использовали набор для анализа белка BCA Protein Assay (Pierce).

Обогащение фосфопептидов.

Дисульфидные связи восстанавливали трис(2-карбоксиэтил)фосфином в конечной концентрации 10 mM при 37°C в течение 1 ч. Свободные тиолы алкилировали 20 mM иодацетамидом (Sigma) при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. Избыток иодацетамида инактивировали N-ацетилцистеином в конечной концентрации 25 mM в течение 10 мин при комнатной температуре. Эндopeптидазу Lys-C (Wako) добавляли из расчета конечного соотношения фермент/белок 1:200 (мас./мас.) и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Раствор последовательно разбавляли 0,1 M бикарбоната аммония (Sigma) до конечной концентрации менее 2 M мочевины и гидролизировали в течение ночи при 37°C модифицированным трипсином для секвенирования (Promega) при соотношении белок/фермент 50:1. Пептиды обессоливали на картридже C18 Sep-Pak (Waters) и высушивали в вакууме. Фосфопептиды выделяли из 2 мг общей массы пептидов с использованием TiO₂, как описано ранее [34]. Вкратце высушенные пептиды растворяли в растворе 80% ацетонитрила (ACN) - 2,5% трифторуксусной кислоты (ТФУК), насыщенном фталевой кислотой. Пептиды добавляли к такому же количеству уравновешенного TiCh (размер гранул 5 мкм, GL Sciences) в блокированную центрифужную колонку Mobicol (MoBiTec), инкубированную в течение 30 мин при вращении вокруг короткой оси. Колонку дважды промывали насыщенным раствором фталевой кислоты, дважды - 80% ACN и 0,1% ТФУК и, наконец, дважды 0,1% ТФУК. Пептиды элюировали 0,3 M раствором NH₄OH. pH элюатов доводили до величин менее 2,5 5% раствором ТФУК и 2 M HCl. Фосфопептиды повторно обессоливали на микроцентрифужных картриджах C18 (Harvard Apparatus).

Анализ ЖХ-МС/МС.

Хроматографическое разделение пептидов выполняли с использованием системы EASY nano-LC (Thermo Fisher Scientific), оснащенной нагреваемой колонкой для ОФ-ВЭЖХ (75 мкм×45 см), заполненную в лаборатории 1,9-мкм смолкой C18 (Reprosil-AQ Pur, Dr. Maisch). Аликвоты по 1 мкг образца общих фосфопептидов анализировали на цикл ЖХ-МС/МС с использованием линейного градиента от 98% растворителя А (0,15% муравьиная кислота) и 2% растворителя В (98% ацетонитрил, 2% воды, 0,15% муравьиной кислоты) до 30% растворителя В в течение 120 мин при скорости потока 200 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ выполняли на двухпоточном масс-спектрометре LTQ-Orbitrap, оснащенном нанораспылителем ионов (производства Thermo Fisher Scientific). После каждого сканирования MS1 (регистрируемого на Orbitrap) следовала диссоциация, индуцированная столкновениями (CID, регистрируемая на LTQ) 20 наиболее распространенных ионов-предшественников с динамическим исключением в течение 30 с. Для анализа фосфопептидов 10 наиболее распространенных ионов-предшественников подвергали CID с включенной многоэтапной активацией. Общее время цикла составляло приблизительно 2 с. Для MS1 10⁶ ионов накапливали в ячейке Orbitrap в течение максимального времени 300 мс и сканировали с разрешением 60000 FWHM (при 400 m/z). Сканирование MS2 регистрировали в режиме нормально-

го сканирования с целевыми настройками 10^4 ионов и временем накопления 25 мс. Ионы с одинарным зарядом и ионы с неприсвоенным состоянием заряженности исключали из активации событий MS2. Нормированная заданная энергия столкновения составляла 32%, для каждого спектра регистрировали одну микросканограмму.

Количественное определение без метки и поиск по базе данных.

Полученные необработанные файлы импортировали в программный инструмент Progenesis (Nonlinear Dynamics, версия 4.0) для количественного определения без метки с использованием параметров по умолчанию. Спектры MS2 экспортировали непосредственно из Progenesis в формате mgf и подвергали поиску по алгоритму MASCOT (Matrix Science, версия 2.4) с использованием макетной базы данных [35], содержащей обычные и обращенные последовательности прогнозируемых записей SwissProt для Homo sapiens (www.ebi.ac.uk, дата выпуска 16.05.2012) и распространенных загрязнителей (в общей сложности 41250 последовательностей), полученной с использованием инструмента SequenceReverser из программного обеспечения MaxQuant (версии 1.0.13.13). Для выявления белков, происходящих от *Y. enterocolitica*, образцы, не обогащенные фосфопептидами, подвергали поиску с использованием вышеупомянутой базы данных, включающей прогнозируемые записи SwissProt для *Y. enterocolitica* (www.ebi.ac.uk, дата выпуска 15.08.2013). Допустимая погрешность для иона-предшественника была задана на уровне 10 м.д., а допустимая погрешность для фрагмента иона - 0,6 Да. Были заданы следующие критерии поиска: требовалась полная специфичность, характерная для трипсина (расщепление после остатков лизина или аргинина, если за ними не находится пролин), допускался пропуск 2 расщеплений, карбамидометилирование (C) было задано в качестве фиксированной модификации, а фосфорилирование (S, T, Y) или окисление (M) - в качестве переменной модификации для образцов, обогащенных или не обогащенных с помощью TiO_2 соответственно. Наконец, результаты поиска в базе данных экспортировали в виде xml-файла и повторно импортировали в программное обеспечение Progenesis для оценки характеристики MS1. Для количественного определения фосфопептидов экспортировали csv-файл, содержащий относительное количество пиков всех обнаруженных компонентов, а для необогащенных образцов создавали csv-файл, содержащий результаты измерений для всех белков на основании суммарной интенсивности компонентов всех выявленных пептидов для данного белка. Важно отметить, что программное обеспечение Progenesis был настроен на группировку сходных наборов пептидов друг с другом и что только неконфликтующие пептиды со специфическими последовательностями одиночных белков в базе данных использовались для количественного определения белков. Затем оба файла обрабатывали с использованием сценария SafeQuant v1.0 R собственной разработки (неопубликованные данные, доступны на сайте <https://github.com/eahrne/SafeQuant/>). Вкратце программное обеспечение было настроено на уровень идентификации при частоте ложноположительных результатов 1% (на основании количества соответствий в макетной базе данных белковых последовательностей) и нормировало выявленное относительное количество пиков MS1 (хроматограмма выделенных ионов, XIC) по всем образцам, т.е. сумму XIC всех уверенно выявленных пептидных компонентов выравнивали для всех циклов ЖХ-МС. Затем всем фосфопептидам/белкам с количественной оценкой присваивали значения относительного содержания в каждый момент времени на основании медианной XIC в данный момент времени. Статистическую значимость каждого соотношения определяло его значение q (скорректированные значения p частоты ложноположительных результатов), полученное путем расчета значений p для модифицированного t-критерия [36] и внесения поправки на множественные проверки [37]. Алгоритм MASCOT автоматически присваивал положение фосфорилированных остатков (балльный показатель >10). Аннотированные спектры с необработанными файлами MS и использованными параметрами поиска депонированы в ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) через партнерский архив PRIDE [38].

Выравнивание последовательностей выполняли с помощью веб-инструмента выравнивания множественных последовательностей EMBL-EBI на основе ClustalW2 по адресу <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Исследование с увеличением дозы.

Все эксперименты на животных были одобрены (лицензия 1908; Kantonales Veterinäramt Basel-Stadt) и выполнены в соответствии с местными руководствами (Tierschutz-Verordnung, Basel-Stadt) и законом Швейцарии о защите животных (Tierschutz-Gesetz). 6-Недельных мышей C57B1/6 и BALB/c заказали в Janvier Labs. После одной недели акклиматизации мышей инфицировали *Y. enterocolitica* MRS40 ДНОРЕМТ или *S. typhimurium* ΔagoA путем инъекции в хвостовую вену. На протяжении эксперимента у мышей оценивали поведение и внешний вид, а также измеряли температуру поверхности и массу тела. Инокулят, введенный мышам в/в, подтверждали путем посева разведений. В соответствующие дни после инфекции мышей умерщвляли путем вдыхания CO_2 . Немедленно после этого выполняли отбор образца крови из сердца путем аспирации. Извлекали печень, селезенку, легкие и опухоль и определяли их массу. Органы и опухоль гомогенизировали. КОЕ в каждом образце определяли нанесением последовательных разведений на чашки с LB-агаром, содержащим налидиксовую кислоту (35 мкг/мл).

Биораспределение в аллотрансплантатах модельных опухолей B16-F10 и 4T1 у мышей.

Все эксперименты на животных были одобрены (лицензия 1908; Kantonales Veterinäramt Basel-Stadt) и выполнены в соответствии с местными руководствами (Tierschutz-Verordnung, Basel-Stadt) и за-

коном Швейцарии о защите животных (Tierschutz-Gesetz). 6-Недельных мышей C57B1/6 и BALB/c заказали в Janvier Labs. По меньшей мере через неделю акклиматизации мышей анестезировали изофлураном и подкожно вводили 100 мкл клеток B16-F10 или 4T1 (1×10^5 - 1×10^6 клеток) в бок C57B1/6 и BALB/c соответственно. На протяжении эксперимента у мышей оценивали поведение и внешний вид, а также измеряли температуру поверхности и массу тела.

После развития опухолей мышам вводили раствор 8 мг/мл десферала (10 мл/кг) посредством в/б инъекции. На следующий день мышей инфицировали *Y. enterocolitica* MRS40 или *Y. enterocolitica* MRS40 ΔНОРЕМТ (2×10^5 , 1×10^6 или 1×10^7 бактерий) путем инъекции в хвостовую вену. Инокулят, введенный мышам в/в, подтверждали путем посева разведений. В некоторых экспериментах прогрессирование опухоли отслеживали путем ежедневных измерений длины и ширины опухоли цифровым штангенциркулем. Объем опухоли определяли как $0,523 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$. В соответствующие дни после инфекции мышей умерщвляли путем вдыхания CO₂. Немедленно после этого выполняли отбор образца крови из сердца путем аспирации. Извлекали печень, селезенку, легкие и опухоль и определяли их массу. Органы и опухоль гомогенизировали. КОЕ в каждом образце определяли нанесением последовательных разведений на чашки с LB-агаром, содержащим налидиксовую кислоту (35 мкг/мл).

В. Результаты.

Система доставки белков на основе секреции 3 типа гибридных белков YopE.

Хотя самый N-конец эффектора T3SS *Y. enterocolitica* YopE (SEQ ID NO: 1) содержит сигнал секреции, важный для гетерологичного белка транслоказы [19], шаперон-связывающий сайт (CBS) для его шаперона (SycE) отсутствует [39]. Авторы выбрали 138 N-концевых аминокислот YopE (SEQ ID NO: 2) для присоединения к доставляемым белкам, поскольку было показано, что это дает наилучшие результаты для транслокации других гетерологичных субстратов T3S [21]. Поскольку эти 138 N-концевых аминокислот YopE содержат CBS, авторы в дальнейшем решили совместно экспрессировать SycE. Фрагмент SycE-YopE₁₋₁₃₈, клонированный из очищенной плазмиды вирулентности pYV40 *Y. enterocolitica*, содержит эндогенный промотор YopE и его шаперона SycE (фиг. 9). Поэтому SycE и любые гибридные белки YopE₁₋₁₃₈ индуцировались при переходе к высокой температуре - с роста при КТ на 37°C. Время культивирования при 37°C влияло на количество гибридного белка в бактерии. На 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ добавили полилинкер (MCS) (фиг. 9B), а за ним маркеры Мус и 6xHis и стоп-кодон.

Фоновый штамм тщательно выбирали. Во-первых, для ограничения транслокации эндогенных эффекторов, авторы использовали штамм *Y. enterocolitica* с делецией всех известных эффекторов - YopH, O, P, E, M и T (обозначаемый как ΔНОРЕМТ) [40]. Кроме того, авторы по мере необходимости использовали ауксотрофного мутанта, который не может расти в отсутствие экзогенной мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты [41]. Этот штамм характеризовался делецией гена аспартат-бета-полуальдегиддегидрогеназы (Δasd); швейцарское агентство безопасности относило его к 1 уровню биобезопасности (поправка к A010088/2). Кроме того, авторы выполнили делецию белков адгезии YadA и/или InvA для расширения выбора фоновых штаммов. Хотя использование штаммов yadA или yadA/invA снижало индукцию фоновых сигнальных путей [42], оно также влияло на количество доставляемого белка [43].

Исследование характеристик доставки гибридного белка YopE в эукариотические клетки.

В анализе секреции *in vitro* (см. фиг. 1A) искусственно индуцировали секрецию белка в окружающую жидкость. После осаждения белка с помощью ТСА для определения секретированного количества белка использовали вестерн-блоттинг с антителом против YopE. Хотя штамм дикого типа секретировал полноразмерный YopE, штаммы ΔНОРЕМТ asd не делали этого. В присутствии YopE₁₋₁₃₈-Мус-His (далее называемого YopE₁₋₁₃₈-Мус; SEQ ID NO: 3) визуально обнаруживалась небольшая полоска YopE (фиг. 1B). Следовательно, фрагмент YopE₁₋₁₃₈ хорошо секретировался в условиях, описанных в настоящем документе. Для анализа однородности транслокации белка в эукариотические клетки авторы инфицировали клетки HeLa штаммом, кодирующим YopE₁₋₁₃₈-Мус, и выполнили окрашивание маркера Мус с помощью IF (фиг. 2A и 2B). Хотя вначале окрашивались только бактерии, через 30 мин после инъекции стали видны очертания клеток, которые становились более резкими по мере увеличения времени инфекции (фиг. 2B). Эта тенденция хорошо отражалась в интенсивности окрашивания маркера Мус в клетках HeLa (фиг. 2A и 2B). YopE₁₋₁₃₈-Мус мог обнаруживаться в любых областях клеток (фиг. 2A), кроме ядер [44]. Примечательно, что этот подход позволял достигать сопоставимым образом большинства, но не всех клеток. Поскольку известно, что *Y. enterocolitica* инфицирует клетки различных видов [45], авторы отслеживали доставку YopE₁₋₁₃₈-Мус в клетки различных линий. Одинаково однородное IF окрашивание антителами против Мус наблюдали в инфицированных фибробластах мыши, клетках Jurkat и HUVEC (фиг. 11). Более того, увеличение или уменьшение МОИ позволяло модулировать количество доставляемого белка (фиг. 2C), хотя большинство клеток все равно подвергались воздействию. Использование низкого количества бактерий приводило не к небольшому количеству клеток при большом количестве доставляемого белка, а к тому, что большинство клеток содержало небольшие количества доставляемого белка (фиг. 2C).

Перенаправление доставляемых с помощью T3SS белков в ядра.

Поскольку YopE сам по себе располагается в цитоплазме (фиг. 2А), он представляет особый интерес для проверки того, препятствует ли фрагмент YopE₁₋₁₃₈ локализации ядерных гибридных белков. Поэтому авторы добавили NLS SV40 к С-концу (и N-концу, получив аналогичные результаты) YopE₁₋₁₃₈-EGFP (SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 38 соответственно). В то время как YopE₁₋₁₃₈-EGFP (SEQ ID NO: 37) приводил к слабому окрашиванию цитоплазмы, YopE₁₋₁₃₈-EGFP-NLS позволял получить сильный сигнал EGFP в ядрах инфицированных клеток HeLa (фиг. 3). Это показывает, что фрагмент YopE₁₋₁₃₈ совместим с использованием NLS. Хотя mCherry уже используется в возбудителях заболеваний растений [46], он представляет собой пример успешной доставки GFP-подобного белка бактериями, патогенными для человека или животных и кодирующими T3SS. Это подтверждает высокую перспективность SycE и YopE₁₋₁₃₈-зависимой стратегии для доставки многих приоритетных белков.

Удаление придатка YopE₁₋₁₃₈ после транслокации гибридного белка в эукариотическую клетку.

Хотя фрагмент YopE₁₋₁₃₈ очень выгоден для бактериальной доставки, он может препятствовать функционированию и/или локализации гибридных белков. Поэтому его удаление после доставки белка было бы оптимальным. Поэтому авторы внедрили два сайта расщепления TEV (ENLYFQS) [47-49] между YopE₁₋₁₃₈ и его партнером по гибриду (регулятором транскрипции ET1-Мус (SEQ ID NO: 36 и 41) [50] и INK4C человека (SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 43)). Для сохранения преимуществ представленного способа авторы дополнительно присоединили протеазу TEV (вариант S219V; [51]) к YopE₁₋₁₃₈ (SEQ ID NO: 42) в другом штамме *Y. enterocolitica*. Клетки HeLa одновременно инфицировали обоими штаммами. Для анализа только транслоцированной фракции белков инфицированные клетки HeLa лизировали через 2 ч после инфекции (фиг. 4) дигитонином, который, как известно, не лизирует бактерии ([52]; контроль см. на фиг. 11). Вестерн-блоттинг выявил присутствие YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-ET1-Мус или YopE₁₋₁₃₈-2х сайт расщепления TEV-Flag-INK4C-Мус только при инфицировании клеток соответствующим штаммом (фиг. 4А и 4С). После гидролиза этого клеточного лизата очищенной протеазой TEV в течение ночи наблюдали сдвиг полосы (фиг. 4А и 4С). Эта полоса соответствовала ET1-Мус (фиг. 4С) или Flag-INK4C (фиг. 4А) с N-концевыми остатками сайта расщепления TEV, вероятнее всего, лишь одним остатком серина. При совместной инфекции клеток штаммом, выполняющим доставку протеазы TEV, становились видны аналогичные отщепленные фрагменты ET1-Мус или Flag-INK4C, что указывало на функциональность протеазы TEV, доставляемой посредством T3SS, и что одиночные клетки инфицировались обоими бактериальными штаммами (фиг. 4А и 4С). Хотя расщепление не являлось полным, большая часть транслоцированного белка расщеплялась уже через 2 ч после инфекции, и даже гидролиз очищенной протеазой TEV в течение ночи не позволял получить лучшие показатели расщепления (фиг. 4В). Согласно сообщениям расщепление, зависимое от протеазы TEV, может требовать оптимизации в зависимости от гибридного белка [53, 54]. Таким образом, удаление придатка YopE₁₋₁₃₈ после транслокации, зависимое от протеазы TEV, впервые обеспечивает доставку почти нативного гетерологичного белка посредством белка T3SS при изменении аминокислотного состава всего на одну N-концевую аминокислоту.

Альтернативный подход к отщеплению фрагмента YopE, зависящему от протеазы TEV, заключается во внедрении убиквитина в требуемый гибридный белок. Фактически, убиквитин подвергается процессингу по С-концу группой эндогенных убиквитин-специфических С-концевых протеаз (дезубиквитирующих ферментов, DUB). Поскольку предполагается, что отщепление происходит по самому С-концу убиквитина (после G76), требуемый белок не должен содержать дополнительных аминокислотных последовательностей. Данный способ тестировали на гибридном белке YopE₁₋₁₃₈-убиквитин-Flag-INK4C-МусHis. В контрольных клетках, инфицированных бактериями, экспрессирующими YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-МусHis, обнаруживали полосу, соответствующую YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-МусHis, что указывало на эффективную транслокацию гибридного белка (фиг. 23). При инфекции клеток в течение 1 ч бактериями, экспрессирующими YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-МусHis, становилась видна дополнительная полоса, соответствующая размеру Flag-INK4C-МусHis, что указывало на отщепление этой части гибридного белка. Этот результат показывал, что внедрение убиквитина в гибридный белок обеспечивает отщепление фрагмента YopE₁₋₁₃₈ без необходимости использования экзогенной протеазы.

Транслокация бактериальных эффекторов III и IV типа.

SopE *Salmonella enterica* представляет собой хорошо изученный фактор замены гуаниновых нуклеотидов (GEF), взаимодействующий с Cdc42, стимулируя ремоделирование актинового цитоскелета [55]. В то время как транслокация YopE₁₋₁₃₈-Мус в клетки HeLa не дала эффекта, транслоцированный YopE₁₋₁₃₈-SopE (SEQ ID NO: 5 и 135) вызывал сильные изменения в актиновой сети (фиг. 5А). Аналогичные результаты были получены для еще одного эффекторного белка GEF - IpgB1 *Shigella flexneri* (SEQ ID NO: 4). Примечательно, что первые изменения актинового цитоскелета наблюдались уже через 2 мин после инфицирования (фиг. 5А). Поэтому можно сделать вывод, что доставка белка, зависящая от T3SS, происходит немедленно после инициации инфицирования центрифугированием. Для подтверждения строгой зависимости транспорта от T3SS выполнили делецию одного из белков T3SS, образующих пору для транслокации в мембране эукариотической клетки (YopB, см. [56]) (фиг. 11).

Во время инфекции *Salmonella* после транслокации SopE происходила транслокация SptP, который

действует как белок, активирующий ГТФазу (GAP), для Cdc42 [57]. В то время как транслокация только YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус (SEQ ID NO: 135) запускала интенсивную реаранжировку F-актина, совместная инфекция бактериями, экспрессирующими YopE₁₋₁₃₈-SptP (SEQ ID NO: 8) устраняла этот эффект в зависимости от дозы (фиг. 5B). Окрашивание антителом против Мус показало, что это ингибирование не было вызвано снижением уровня транслокации YopE₁₋₁₃₈-SopE-Мус (фиг. 5B). Совместно эти результаты показывали, что совместная инфекция клеток двумя бактериальными штаммами является надежным способом доставки двух различных эффекторов в одиночные клетки для рассмотрения их функционального взаимодействия. Эффектор OspF III типа *S. flexneri* действует как фосфотреонинлиаза, дефосфорилирующая MAP-киназы p38 и ERK [58]. Для проверки функциональности транслоцированного YopE₁₋₁₃₈-OspF (SEQ ID NO: 7) авторы выполнили мониторинг фосфорилирования p38 после стимуляции с помощью ФНО α . В неинфицированных клетках или клетках, инфицированных бактериями, экспрессирующими YopE₁₋₁₃₈-Мус, ФНО α индуцировал фосфорилирование p38. В отличие от этого после транслокации YopE₁₋₁₃₈-OspF ФНО α -индуцированное фосфорилирование прекращалось, демонстрируя, что доставленный OspF является активным по отношению к p38 (фиг. 6A).

При инфекции *Salmonella* эффектор III типа SopB защищает эпителиальные клетки от апоптоза путем непрерывной активации Akt [59]. В то время как транслокация YopE₁₋₁₃₈-Мус или YopE₁₋₁₃₈-SopE не влияет на Akt, транслокация YopE₁₋₁₃₈-SopB (SEQ ID NO: 6) индуцирует выраженное фосфорилирование Akt по T308 и S473, что соответствует его активной форме (фиг. 6B). Аналогичные результаты были получены для гомолога SopB из *S. flexneri* (IpgD, SEQ ID NO: 9). Совместно полученные результаты показывают, что система доставки на основе YopE₁₋₁₃₈ функционирует для всех эффекторов T3S, протестированных на данный момент, и позволяет исследовать белки, вовлеченные в контроль некоторых клеточных функций, включая цитоскелет, воспаление и выживание клеток.

Ряд бактерий, в том числе *Agrobacterium tumefaciens*, *Legionella pneumophila* и *Bartonella henselae*, используют секрецию IV типа для введения эффекторов в клетки. Авторы протестировали, можно ли транслоцировать эффектор VerA IV типа из *B. henselae* в клетки HeLa с использованием разработанного инструмента. Выполнили клонирование полноразмерного VerA (SEQ ID NO: 10) и VerA_{E305-end} (SEQ ID NO: 11), содержащего С-концевой домен Bid, и инфицировали клетки соответствующим штаммом. Поскольку показано, что VerA индуцирует продукцию циклического АМФ (цАМФ) [60], в клетках HeLa после инфекции измеряли уровень цАМФ. В то время как транслокация домена Bid эффектора VerG *B. henselae* (SEQ ID NO: 136) не могла индуцировать цАМФ, полноразмерный VerA и VerA_{E305-end} запускали продукцию цАМФ в ожидаемом количестве [60] (фиг. 6C). Эти результаты показывают, что эффекторы IV типа можно эффективно доставлять в клетки-мишени хозяина с помощью системы доставки на основе YopE₁₋₁₃₈ и они являются функциональными.

Транслокация белков эукариот в эпителиальные клетки.

Для демонстрации возможности транслокации белков человека посредством секреции III типа авторы присоединили индукторы апоптоза человека для их доставки посредством *Y. enterocolitica* к YopE₁₋₁₃₈ или для доставки посредством *S. enterica* к SteA₁₋₂₀, SteA, SopE₁₋₈₁ или SopE₁₋₁₀₅. Затем авторы выполнили мониторинг транслокации агониста гибели клеток, взаимодействующего с доменом BH3 человека (Bid, SEQ ID NO: 24) и являющегося проапоптозным членом семейства белка Bcl-2. Он представляет собой медиатор повреждения митохондрий, индуцируемого каспазой-8 (CASP8). CASP8 расщепляет Bid, и укороченный Bid (tBid, SEQ ID NO: 25) транслоцируется в митохондрии, где запускает высвобождение цитохрома с. Это приводит к активации каспазы 3 (CASP3) по внутреннему пути, во время которого она расщепляется на субъединицы массой 17 и 12 кДа [61]. В то время как инфекция *Y. enterocolitica*, экспрессирующей YopE₁₋₁₃₈-Мус или YopE₁₋₁₃₈-Bid, в течение 1 ч не приводила к индукции апоптоза, транслокация tBid человека запускала гибель клеток в большей степени, чем хорошо изученный индуктор апоптоза стауроспорин (фиг. 7A и 7C). Как и ожидалось, транслокация lBid приводила к продукции субъединицы p17 CASP3 даже в больших количествах по сравнению со стауроспорином (фиг. 7A). Для сравнения количества транслоцированного белка с эндогенным Bid клетки HeLa лизировали дигитонином и анализировали вестерн-блоттингом с антителом против Bid (фиг. 7B). YopE₁₋₁₃₈-tBid, доставляемый посредством T3SS, практически достигал эндогенного Bid в клетках HeLa, хотя доставляемый YopE₁₋₁₃₈-Bid присутствовал даже в больших количествах (в 2,5 раза) (фиг. 7B). Глубокое картирование протеома и транскриптома клеток HeLa позволило оценить 4,4-кратный уровень 10⁵ копий Bid на одну клетку [62]. Таким образом, можно сделать вывод, что T3SS-зависимая доставка белка человека позволяет достичь уровня 10⁵-10⁶ молекул белка на клетку. Эти цифры соответствуют количеству копий нанотел на клетку, транслоцированных посредством T3SS *E. coli* [63]. При условии приведения коэффициента для МОИ и продолжительности инфекции к значению 10, а коэффициента для момента добавления антибиотика и времени культивирования при 37°C до инфекции к значению 3,2 можно регулировать количество копий доставленного белка/клетку от нескольких 1000 копий/клетку до нескольких 10⁶ копий/клетку. Совместно эти результаты показывают, что транслоцированный tBid являлся функциональным и его доставка осуществлялась на значимом уровне. Это подтвердило эффективность инструмента транслокации для изучения роли белка в регуляции апоптоза - центральном аспекте биологии клетки.

Авторы дополнительно присоединили tBid мыши (кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica*; SEQ ID NO: 194) или домены BH3 tBid мыши или Вах мыши (кодон-оптимизированные для *Y. enterocolitica*; SEQ ID NO: 138 и 139) к YopE₁₋₁₃₈ для доставки посредством *Y. enterocolitica*. В то время как инфекция *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd в течение 2,5 ч не позволяла доставить белок или YopE₁₋₁₃₈-Мус не был способен индуцировать апоптоз, транслокация tBid мыши (кодон-оптимизированного для *Y. enterocolitica*; SEQ ID NO: 194) запускал гибель клеток B16F10 (фиг. 15), D2A1 (фиг. 16), HeLa (фиг. 17) и 4T1 (фиг. 18). Обнаружено, что транслокация домена BH3 Bid мыши, кодон-оптимизированного для *Y. enterocolitica* (SEQ ID NO: 138), или Вах мыши, кодон-оптимизированного для *Y. enterocolitica* (SEQ ID NO: 139), также индуцировала интенсивную гибель клеток B16F10 (фиг. 15), D2A1 (фиг. 16), HeLa (фиг. 17) и 4T1 (фиг. 18). Дополнительные версии содержали тандемный повтор домена BH3 Bid мыши, кодон-оптимизированного для *Y. enterocolitica*, присоединенный к YopE₁₋₁₃₈ (SEQ ID NO: 202), или присоединение домена BH3 Bid мыши, кодон-оптимизированного для *Y. enterocolitica*, к домену BH3 Вах мыши, кодон-оптимизированному для *Y. enterocolitica*, присоединенному к YopE₁₋₁₃₈ (SEQ ID NO: 203).

В то время как инфекция бактериями *S. enterica* agoA в течение 4 ч не могла индуцировать апоптоз, транслокация tBid мыши запускала апоптоз, поскольку транслокация tBid мыши приводила к продукции субъединицы p17 CASP3 (фиг. 19 и 20). Степень индукции апоптоза для гибридных белков SopE была выше, чем при использовании условий индукции SpiI T3SS (фиг. 19), что указывает на транспорт SopE исключительно посредством SpiI T3SS. tBid мыши, присоединенный к SteA₁₋₂₀, не был способен индуцировать апоптоз, вероятнее всего, из-за того, что сигнал секреции в пределах 20 N-концевых аминокислот SteA недостаточен для доставки гибридного белка (фиг. 19 и 20). tBid мыши, присоединенный к полноразмерному SteA, приводил к индукции апоптоза в клетках HeLa (фиг. 19 и 20) в условиях индукции как SpiI, так и SpiII T3SS, что указывает на возможность транспорта SteA обоими T3SS. Следует отметить, что даже в условиях индукции SpiII T3SS ожидается частичное наличие активности SpiI T3SS, наблюдаемое по активности гибридных белков SopE в условиях индукции SpiII T3SS (фиг. 20).

Кроме функционально разработанных в настоящем изобретении транслоцируемых эукариотических белков, описанный в настоящем документе инструмент позволяет секретировать несколько других эукариотических белков. Сюда входит доставка посредством *Y. enterocolitica* (фиг. 12, 13 и 22) белков регуляции клеточного цикла (Mad2 (SEQ ID NO: 15), CDK1 (SEQ ID NO: 14), INK4A (SEQ ID NO: 16), INK4B (SEQ ID NO: 17) и INK4C (SEQ ID NO: 18)), а также их фрагментов (INK4A 84-103 (SEQ ID NO: 158), p107 657-662 (SEQ ID NO: 159), p21 141-160 (SEQ ID NO: 160), p21 145-160 (SEQ ID NO: 161), p21 17-33 (SEQ ID NO: 162) и циклина D2 139-147 (SEQ ID NO: 163)), белков, связанных с апоптозом (Bad (SEQ ID NO: 29), FADD (SEQ ID NO: 28) и p17 (SEQ ID NO: 22) и p12 каспазы 3 (SEQ ID NO: 23), Bid (SEQ ID NO: 19) и t-Bid (SEQ ID NO: 20)) данио, а также их фрагментов (tBid BH3 (SEQ ID NO: 138), Вах BH3 (SEQ ID NO: 139)), сигнальных белков (TRAF6 мыши (SEQ ID NO: 12), TIFA (SEQ ID NO: 13)), субъединицы G GPCRα (GNA12, наиболее короткой изоформы, (SEQ ID NO: 30)), нанотела (vhhGFP4, (SEQ ID NO: 31)) и гибридных конструкторов нанотел для адресного разложения белков (Slmb-vhhGFP4; (SEQ ID NO: 32, 33, 34) [64]) (фиг. 12 и 13), а также малых ГТФаз (Rac1 Q61E (SEQ ID NO: 26 и 137) и RhoA Q63L (SEQ ID NO: 27) и домена, гомологичного плекстрину, из Akt человека (SEQ ID NO: 35)). Кроме функционально разработанных белков, связанных с апоптозом (tBid мыши, SEQ ID NO: 144-147), сюда дополнительно входит доставка посредством *S. enterica* (фиг. 21) белков регуляции клеточного цикла (Mad2 (SEQ ID NO: 168-169), CDK1 (SEQ ID NO: 170-171), INK4A (SEQ ID NO: 164-165) и INK4C (SEQ ID NO: 166-167)). Хотя эти белки не были функционально подтверждены, возможность T3SS-зависимой секреции различных эукариотических белков в комбинации с возможным удалением придатка YopE открывает новые перспективы с точки зрения широкой применимости T3SS в биологии клетки и его терапевтического применения, особенно для лечения злокачественных солидных опухолей.

Фосфопротеомика выявила глобальный вклад транспонированных белков на фосфорилирование белков.

Фосфорилирование представляет собой широко распространенную посттрансляционную модификацию, способную активировать или инактивировать биологические процессы, и поэтому является подходящей мишенью для изучения сигнальных явлений [65]. Несмотря на это в настоящее время отсутствует анализ фосфорилирования при апоптозе на уровне системы. Для анализа влияния tBid человека, доставляемого в клетки HeLa, авторы использовали безметочный фосфопротеомный подход на основе ЖХ-МС/МС. В трех независимых экспериментах клетки оставляли без обработки, инфицировали ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-Мус или ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-tBid в течение 30 мин. Клетки лизировали с последующим ферментативным гидролизом, обогащением фосфопептидов и количественным определением и идентификацией отдельных фосфопептидов. Авторы сравнили клетки, инфицированные ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-Мус, с клетками, инфицированными ΔНОРЕМТ asd+YopE₁₋₁₃₈-tBid, что позволило выявить 363 tBid-зависимых явлений фосфорилирования. При доставке tBid продемонстрировано усиление фосфорилирования 286 фосфопептидов, в то время как 77 фосфопептидов фосфорилировались в меньшей степени, что соответствовало 243 различным белкам, составлявшим фосфопротеом tBid. Для создания сети белок-белковых взаимодействий фосфопротеома tBid использовали базу данных STRING [66]

(фиг. 8А). Кроме того, в эту сеть были добавлены 27 белков, заведомо имеющих отношение к митохондриальному апоптозу, которые образовали центральный кластер. Примечательно, что лишь несколько белков из фосфопротеома tBid были связаны с этим центральным кластером, что указывает на большое количество белков, подвергавшихся изменениям фосфорилирования, которые до сих пор не были напрямую связаны с белками апоптоза. Для исследования биологических функций, охватываемых фосфопротеомом tBid, авторы выполнили анализ геной онтологии с использованием функционального инструмента аннотирования "База данных для аннотирования, визуализации и комплексного исследования (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [67, 68]. Выявленные биологические функции показывают, что tBid влиял на различные клеточные процессы. Многие белки, вовлеченные в реаранжировку хроматина и регуляцию транскрипции, подвергались изменениям фосфорилирования (т.е. CBX3, CBX5, TRIM28, HDAC1). Например, HDAC1 представляет собой гистондеацетилазу, участвующую в регуляции транскрипции. Показано, что HDAC1 может модулировать транскрипционную активность NF- κ B-белка, также участвующего в апоптозе. Авторы дополнительно выявили кластер белков, вовлеченных в процессинг РНК, который, как было показано ранее, играет важную роль в регуляции апоптоза [69]. Например, HNRPK опосредует реакцию p53/TP53 на повреждение ДНК и необходим для индукции апоптоза [70]. Кроме того, он влиял на фосфорилирование белков, вовлеченных в трансляцию белка. Несколько эукариотических факторов инициации (т.е. EIF4E2, EIF4B, EIF3A, EIF4G2) подвергались изменениям фосфорилирования, что согласуется с наблюдениями снижения общего синтеза белка в клетках при апоптозе. Примечательно, что фосфорилирование многих белков вовлечено в ремоделирование цитоскелета (например, доставка tBid влияла на PXN, MAP1B9). Это соответствует наблюдению сильного изменения морфологии клеток при доставке tBid (фиг. 8В). Сжатие клеток и потеря контакта проявлялись по наблюдению фосфорилирования белков, связанных с адгезией, например, ZO₂ и паксиллина. Аналогичным образом сжатие ядер сопровождалось фосфорилированием белков ядерной пластинки, например ламина А/С и ламина В1. В совокупности доставка tBid индуцировала быструю апоптотическую реакцию, на что также указывает нарушение целостности митохондрий (фиг. 8В). Авторы показали, что апоптоз, индуцированный tBid, влиял на сотни событий фосфорилирования, участвующих в разнообразных клеточных процессах. Хотя к апоптозу имеют отношение многие из выявленных белков, известно, что лишь немногие из них фосфорилируются при индукции апоптоза. Таким образом, фосфопротеомный подход обеспечивает полезный ресурс для дальнейших исследований апоптоза.

Транслокация эукариотических гетерологичных гибридных белков, состоящих из повторяющихся идентичных или вариабельных доменов белков, в эпителиальные клетки.

Для демонстрации возможности транслокации гетерологичных гибридных белков, состоящих из повторяющихся идентичных или вариабельных доменов белков, посредством секреции III типа авторы присоединили индукторы апоптоза мыши для доставки посредством *Y. enterocolitica* к YopE₁₋₁₃₈. В качестве контроля авторы присоединили tBid мыши (кодон-оптимизированный для *Y. enterocolitica*; SEQ ID NO: 194) или домены BH3 tBid мыши или Bax мыши (кодон-оптимизированные для *Y. enterocolitica*; SEQ ID NO: 200 и 201) к YopE₁₋₁₃₈ для доставки посредством *Y. enterocolitica*. Гетерологичный гибридный белок в одном случае состоял из домена BH3 tBid мыши, присоединенного к аналогичному домену, что приводило к получению YopE₁₋₁₃₈-(tBid-BH3)₂ (SEQ ID NO: 202). Во втором случае гетерологичный гибридный белок состоял из домена BH3 tBid мыши, присоединенного к домену BH3 Bax мыши, что приводило к получению YopE₁₋₁₃₈-(tBid-BH3)-(Bax-BH3) (SEQ ID NO: 203). В случае tBid мыши и Bax мыши кодоны оптимизировали для *Y. enterocolitica*.

В то время как инфекция *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ asd в течение 4 ч, обеспечивавшая доставку YopE₁₋₁₃₈-Мус, не позволяла индуцировать апоптоз, транслокация домена BH3 tBid мыши (кодон-оптимизированного для *Y. Enterocolitica*; SEQ ID NO: 194) запускала гибель клеток B16F10 и 4T1 при четком эффекте, зависящем от дозы при увеличении множественности инфицирования (MOI). Примечательно, что доставляемые YopE₁₋₁₃₈-(tBid-BH3)-(Bax-BH3) или YopE₁₋₁₃₈-(tBid-BH3)₂ были более активны, чем YopE₁₋₁₃₈-(tBid-BH3) при сниженной MOI. Это указывает, что при доставке повторяющихся идентичных доменов или комбинации различных доменов белка возможно увеличение влияния на желательный клеточный путь, например, апоптоз.

Ослабление вирулентности посредством делеции/мутации бактериальных эффекторных белков, обладающих вирулентностью по отношению к эукариотическим клеткам.

В случае *Y. enterocolitica* вирулентность снижали посредством делеции шести эндогенных эффекторных белков, называемых "внешними белками Yersinia" (Yop), конкретно YopH, O, P, E, M, T (MRS40 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]) [40]. Эти Yop кодирует "плазмида вирулентности Yersinia" (pYV), плазмида размером приблизительно 70 т.п.о., кодирующая полную систему секреции 3 типа (T3SS), а также другие факторы вирулентности (фиг. 24). YopH, O, P, E, M и T представляют собой шесть эффекторных белков, доставляемых в клетки-хозяева бактериальной системой секреции третьего типа с целью модуляции и угнетения иммунной системы. Каждый Yop обладает специфической биохимической активностью в клетке-хозяине. YopT отщепляет С-концевой остаток цистеина ГТФаз Rho и таким образом удаляет изопренильную группу, присоединяющую ГТФазы к мембра-

не. Эта инактивация Rho из-за неправильной локализации позволяет избежать фагоцитоза иммунными клетками, например макрофагами и нейтрофилами [71]. В том же пути YopE действует как белок, активирующий ГТФазу (GAP), для ГТФаз Rho, инактивируя их. Это приводит к снижению фагоцитоза и ингибированию высвобождения ИЛ-1 бета иммунными клетками [71]. Кроме того, YopO действует в качестве ингибитора диссоциации гуанидиновых нуклеотидов (GDI), инактивируя ГТФазы Rho. YopO дополнительно содержит домен серин/треониновой киназы, действующий еще неясным способом на актиновый цитоскелет [71]. YopN является тирозинфосфатазой, действующей на белки фокального контакта, например фокальную киназу адгезии (Fak), паксиллин и другие, тем самым предотвращая фагоцитоз макрофагами и нейтрофилами [71]. Обнаружено, что YopP, называемый YopJ в *Y. pseudotuberculosis* или *Y. pestis*, инактивирует путь MAPK/NFκB в иммунных клетках, предотвращая высвобождение ФНОα и ИЛ-8 из иммунных клеток, стимулируемых присутствием бактерий. Кроме того, обнаружено, что YopP индуцирует апоптоз в иммунных клетках, что может быть связано с влиянием на путь MAPK, который в активированном состоянии защищает клетки от апоптоза [71]. Роль YopM еще не полностью ясна, однако обнаружено, что он ассоциирован с рибосомной киназой S6 1 (RSK1) и киназой 2, подобной протеинкиназе C (PRK2). Представляется, что YopM может стимулировать RSK1 и тем самым влиять на мишени, расположенные на дальнейших этапах путей, например ход клеточного цикла [71]. Удаление одного или нескольких Yops сильно влияет на механизм защиты бактерий от иммунной системы [72]. Мутации в соответствующих генах yop подтверждали ПЦР соответствующей области и анализом секреции *in vitro* (фиг. 25). Анализ секреции *in vitro* электрофорезом в ДСН-ПААГ и окрашиванием Кумасси синим подтвердило отсутствие полноразмерных YopH, O, M и YopE.

Кроме того, сконструировали штамм *Y. enterocolitica* с делециями в гене *asd* (аспартат-полуальдегиддегидрогеназы). Мутации в *asd* приводили к полной потере способности к росту без добавления мезо-диаминопимелиновой кислоты. Это позволило получить системы поддержания плазмид без антибиотиков, основанные на присутствии *asd* в соответствующей плазмиде. Аналогичным образом можно использовать другие ауксотрофные мутанты.

Исследование с увеличением дозы на здоровых мышах.

В целях оценки общей токсичности выполнили исследование с увеличением дозы на здоровых иммунокомпетентных мышах (C57BL/6). В этих экспериментах *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T Δasd (дефектный по репликации вследствие Δasd и дополнительно характеризующийся ослабленной вирулентностью вследствие ΔyopH, O, P, E, M, T) сравнивали с *S. typhimurium* ΔagoA (характеризующийся ослабленным ростом вследствие ΔagoA, как в других публикациях [73-75]). Острую токсичность после инфицирования оценивали на основе набора или потери массы тела у мышей после в/в инъекции бактерий. Кроме того, определяли количество бактерий в различных органах путем гомогенизации органов, последовательного разбавления и посева на чашки. Поскольку острую токсичность оценили, а рост бактерий не представлял большого интереса, предобработку дефероксамином не выполняли. Для каждого штамма протестировали четыре различных значения бактериальной нагрузки (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 КОЕ на животное). *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T Δasd не приводил к снижению массы тела при двух пониженных дозах (10^5 , 10^6 КОЕ) (фиг. 26). При дозе 10^7 бактерий масса тела снижалась приблизительно на 6% в первые 24 ч, а затем стабилизировалась и продолжала расти. Обнаружено, что при более высокой дозе масса тела снижалась на 7,5% через 48 ч после инфекции (фиг. 26). Поскольку *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T Δasd не мог поддерживать инфекцию, тем более в отсутствие предобработки десфероксамином, ожидалось быстрое снижение количества бактерий, что и было обнаружено (фиг. 27-30). Тем не менее выраженной острой токсичности вследствие, например, эндотоксинового шока не наблюдали даже при максимальной введенной дозе *Y. enterocolitica*. Эта картина отличается от компетентного по росту и инфицированию *S. typhimurium* ΔagoA, который многократно использовался в исследованиях на мышах другими исследователями [73-75], а также двойных мутантов по *agoA* и *agoD*, использовавшихся даже в клинических исследованиях (NCT01099631). Оценка внешнего вида и поведения вынудила авторов умертвить всех мышей, инфицированных максимальной дозой *S. typhimurium* ΔagoA в 1 день после инфицирования и на 4 день для дозы 10^7 КОЕ. При трех максимальных дозах наблюдали прогрессирующее снижение массы тела (фиг. 26), в то время как при минимальных дозах наблюдали индукцию лишь постоянной легкой потери веса (фиг. 26). Даже при минимальной протестированной дозе *S. typhimurium* ΔagoA присутствовал в печени, селезенке и легких вплоть до 8 дня после инфицирования (фиг. 27-30). Это могло отражать неоптимальное биораспределение *S. typhimurium* ΔagoA, наблюдавшееся другими исследователями [76].

В экспериментах по острой токсичности с повышением дозы, выполненных на иммунокомпетентных мышах, *Y. enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T Δasd безопасно переносился вплоть до 10^8 бактерий на мышь при в/в введении. Такую дозу можно использовать и в клинических исследованиях на людях [77] с учетом различий в массе тела мыши и человека в несколько тысяч раз. Поскольку известно, что мыши воспринимают граммотрицательные бактерии так же, как и люди (через TLR4), и реагируют аналогичным образом на тот же раздражитель липид A [78], возникновение начальной токсичности вследствие септического шока, вызываемой липидом A у пациентов-людей, является маловероятным при бактериальной

нагрузке, использовавшейся до сих пор в клинических исследованиях [77]. Кроме того, для объяснения различий, наблюдаемых в клинических тестах с *S. enterica* VNP20009 [79], предлагается принимать во внимание отсутствие у него нормального иммуностимулирующего липида А. Таким образом, снижение начальной бактериальной нагрузки, вводимой пациентам, могло бы быть более благоприятным при поддержании структуры липида А дикого типа в целях достижения оптимальной колонизации опухоли, где можно получить более высокую нагрузку за счет репликации бактерий.

В области организма, где присутствуют бактерии, должен запускаться иммунный ответ против бактерий. При накоплении и росте бактерий в области солидных опухолей [76, 80-82] должен происходить запуск иммунной системы в области опухоли после начального распространения бактерий. Несмотря на необходимость избегать септического шока и острой токсичности у пациентов за счет снижения начальной бактериальной нагрузки и/или снижения эндотоксичности бактерий путем модификаций липида А, стимуляция иммунной системы в области опухоли крайне желательна, поскольку она способствует удалению раковой ткани (иммунотерапия, иммуносенсибилизация). Текущее поисковое клиническое исследование II фазы (EudraCT № 2005-005775-15) с применением *S. enterica* основано на этом иммунотерапевтическом эффекте и естественной токсичности бактерий [83]. Иммуносенсибилизация является одним из ключевых механизмов действия генетически неоснащенных штаммов *Salmonella* в опухолях; например, *Salmonella choleraesuis* накапливается в опухолях и индуцирует инфильтрацию нейтрофилами и противоопухолевый иммунный ответ [84]. Кроме того, показано, что активация иммунной системы в области опухоли не предотвращает многократное применение бактерий в онкотерапии [85].

Таким образом, иммунный ответ, запускаемый бактериальными противораковыми средствами, следует разделить на нежелательную острую фазу, которую следует ослаблять, и желательную активацию на более поздних стадиях, способствующую уничтожению опухоли. Такого эффекта можно достичь введением высоких доз бактерий, характеризующихся низкой эндотоксичностью, или введением пониженных доз бактерий, характеризующихся нормальной эндотоксичностью, что увеличивает способность к колонизации и репликации в солидных опухолях [79].

Исследования биораспределения на модели меланомы у мыши.

С целью подтверждения эффективности грамотрицательных бактерий с мутацией(ями) в ключевых факторах вирулентности, например эффекторах T3SS, в качестве опухолеспецифических носителей выполнили исследования аллотрансплантатов опухолей у мышей с использованием хорошо изученной модели меланомы B16F10 ([86], ATCC № CRL-6475). После достижения п/к опухолями определенного размера (приблизительно 100-200 мм³) мышей в/в инфицировали 2×10^5 КОЕ *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40 или *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T. В целях обеспечения роста бактерий мышей предварительно обрабатывали десфероксамином за 24 ч до инфекции. Мыши, инфицированные штаммом *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40 дикого типа, демонстрировали повышенную балльную оценку внешнего вида и поведения (фиг. 31, 32) и значительную потерю веса в течение первых 48 ч после инфицирования (фиг. 33), что вынудило авторов умертвить всех мышей в этой группе на 2 день после инфицирования. В противоположность этому мыши, инфицированные штаммом *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T с ослабленной вирулентностью, не демонстрировали значительной потери веса и нормальные балльные оценки внешнего вида и поведения (фиг. 31-33) даже на 4 день после инфицирования. У мышей, инфицированных штаммом дикого типа (*Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40), живые бактерии обнаруживались во всех проверенных органах, а также в крови (фиг. 35). Хотя бактерии дикого типа обнаруживались в злокачественной солидной опухоли, в равной степени или более высокие их количества были обнаружены в других органах, причем максимальное количество - в селезенке (фиг. 35). Инфицирование мышей *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T резко отличалось от вышеописанной картины тем, что живые бактерии в 1 день после инфицирования обнаруживались главным образом в злокачественной солидной опухоли, а в селезенке, печени и легких обнаруживалось небольшое количество бактерий. Примечательно, что на 4 день после инфицирования количество бактерий в злокачественной солидной опухоли увеличивалось на несколько порядков (достигая более чем 10^8 КОЕ/г опухолевой ткани), в то время как во всех других органах количество бактерий падало ниже предела обнаружения (фиг. 34). Таким образом, штамм *Y. enterocolitica* subsp. *paleartica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T накапливался на 4 день после инфицирования в соотношении приблизительно (как минимум) миллион к одному в области злокачественной солидной опухоли по сравнению с селезенкой или печенью (при расчете соотношения по сравнению с пределом обнаружения).

Эти результаты подтверждают эффективность данной стратегии ослабления вирулентности посредством мутирования ключевых факторов вирулентности с получением бактериального носителя, специфичного по отношению к злокачественной солидной опухоли.

Исследования биораспределения на модели рака молочной железы у мыши.

С целью подтверждения эффективности грамотрицательных бактерий с мутацией(ями) в ключевых факторах вирулентности, например эффекторах T3SS, в качестве опухолеспецифических носителей, выполнили исследования аллотрансплантатов опухолей у мышей с использованием хорошо изученной мо-

дели рака молочной железы 4T1 (ATCC № CRL-2539). После достижения п/к опухолями определенного размера (приблизительно 100-200 мм³) мышей в/в инфицировали 2×10^5 КОЕ *Y. enterocolitica* subsp. *paleoarctica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T. В целях обеспечения роста бактерий мышей предварительно обрабатывали десфероксамином за 24 ч до инфекции. Мыши, инфицированные штаммом *Y. Enterocolitica* subsp. *paleoarctica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T с ослабленной вирулентностью, не демонстрировали значительной потери веса и нормальные балльные оценки внешнего вида и поведения даже на 8 день после инфицирования. У этих мышей, инфицированных *Y. enterocolitica* subsp. *paleoarctica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T, живые бактерии на 8 день после инфицирования обнаруживались исключительно в злокачественной солидной опухоли (фиг. 36). Таким образом, штамм *Y. enterocolitica* subsp. *paleoarctica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T накапливался на 8 день после инфицирования в соотношении приблизительно (как минимум) несколько десятков тысяч к одному в области злокачественной солидной опухоли по сравнению с селезенкой или печенью (при расчете соотношения по сравнению с пределом обнаружения).

Эти результаты подтверждают эффективность данной стратегии ослабления вирулентности посредством мутирования ключевых факторов вирулентности с получением бактериального носителя, специфичного по отношению к злокачественной солидной опухоли.

Получение бактерий с усиленной проапоптозной активностью.

В вышеупомянутых экспериментах было продемонстрировано, что доставка проапоптозных белков (например, t-Bid (SEQ ID NO: 25) или BIM (SEQ ID NO: 21)) на основе T3SS эффективно индуцировала гибель клеток мыши и человека, в том числе раковых клеток, и что этот эффект можно усилить при использовании t-Bid мыши после оптимизации кодонов для использования в бактериях (SEQ ID NO: 138). Усиленное уничтожение клеток, по всей вероятности, отражает повышенную продукцию и последующую доставку белка посредством T3SS вследствие использования оптимальных кодонов.

В целях оптимизации доставки проапоптозных белков штаммы трансформировали различными проапоптозными белками, полученными в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

Штаммы, трансформированные различными проапоптозными белками

Название штамма	Фоновый штамм	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название полученной плазмиды	Праймеры. Si_Nr.:	Устойчивость
YopE1-138- (увеличенный фрагмент ВНЗ tBid мыши после оптимизации кодонов для <i>Y. enterocolitica</i>)	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	YopE1-138-увеличенный (на 4 АК) фрагмент ВНЗ tBid мыши после оптимизации кодонов для <i>Y. enterocolitica</i>	pBad_Si_2	pSi_353		Nal Amp
YopE1-138-10 АК линкер- (фрагмент ВНЗ tBid мыши после оптимизации кодонов для <i>Y. enterocolitica</i>)	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	YopE1-138-10 АК-линкер - ВНЗ tBid мыши после оптимизации кодонов для <i>Y. enterocolitica</i>	pBad_Si_2	pSi_354	727/728	Nal Amp

YopE1-(138-фрагмент BH3 Вах мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica - tBid мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica		YopE1-138-BH3 Вах мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica - BH3 tBid мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pSi_357			
	Y. enterocolitica	Y. enterocolitica		pSi_374	736/737	Nal Amp

Укорачивание доставляемых белков до ключевых доменов, необходимых для передачи сигнала (например, домена BH3 t-Bid (SEQ ID NO: 138 или 200)), может повысить эффективность уничтожения клеток (фиг. 37). Безотносительно к теоретическим представлениям это увеличение эффективности, вероятно, связано с увеличением продукции и последующей доставки белка посредством T3SS вследствие меньших размеров доставляемого белка. Внедрение линкера между фрагментом YopE и доменом BH3 tBid (SEQ ID NO: 210) снижало эффективность, как и увеличение домена BH3 на 4 дополнительных аминокислоты (SEQ ID NO: 209) (фиг. 37).

Кроме того, были получены синтетические варианты доставляемых белков с повторами таких ключевых доменов (например, домена BH3 t-Bid (SEQ ID NO: 202)) или комбинациями указанных ключевых доменов (например, домена BH3 t-Bid и домена BH3 Вах (SEQ ID NO: 203 и 211)). Как ни странно, обнаружилось, что tandemные повторы одинаковых или различных доменов BH3 приводили к усилению индукции апоптоза в клетках раковых линий (в том числе клетках 4T1 и B16F10; фиг. 37). Обнаружено, что IC50 (половинная максимальная ингибирующая концентрация), которая относится к количеству бактерий на эукариотическую клетку (МОГ), необходимому для уничтожения 50% таких клеток, снижалась при доставке tandemных повторов домена tBid BH3 по сравнению с одиночным доменом tBid BH3 (фиг. 37). Этот результат был неожиданным, поскольку при присоединении второго домена BH3 t-Bid размер белка увеличивался. Из-за этого следует ожидать снижения уровней экспрессии и доставки YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ (SEQ ID NO: 202) по сравнению с YopE₁₋₁₃₈-tBid BH3 (SEQ ID NO: 138 или 200), которые могут достигать максимального эквивалентного уровня. Для усиления активности по уничтожению клеток объединенные домены BH3 tBid могут одновременно и согласованно действовать после доставки посредством T3SS в эукариотические клетки. Если бы только один домен BH3 tBid в конструкторе YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ являлся функциональным, в лучшем случае можно было бы ожидать такой же эффективности, как при YopE₁₋₁₃₈-tBid BH3. Для повышения генетической стабильности YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ (SEQ ID NO: 202) для исследований *in vivo* авторы клонировали YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ (SEQ ID NO: 202) путем гомологичной рекомбинации плазмиды вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE под управлением нативного промотора YopE (и использованием мутаторных плазмид pSI_408 и pSI_419). Такие мутаторы содержат последовательность ДНК, кодирующую желательный белок, фланкированную последовательностями по 200-250 п.о. с обеих сторон и соответствующую сайту соответствующего гена, в котором должно происходить встраивание. Эти плазмиды трансформировали в *E. coli* Sm10 λ pir, откуда плазмиды мобилизовали в соответствующий штамм *Y. enterocolitica*. Мутантов, несущих встроенный вектор, размножали в течение нескольких поколений без селекционного давления. Затем добавляли сахарозу для отбора клонов, потерявших вектор. Наконец, мутантов выявляли посредством ПЦР колоний. Эндогенные белки, транспортируемые T3SS (называемые "внешними белками Yersinia", Yops), кодирует данная плаزمиды *Y. enterocolitica* размером 70 т.п.о., называемая плазмидой вирулентности Yersinia (pYV), которая также кодирует аппарат T3SS.

Штаммы Yersinia, кодирующие YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3) (SEQ ID NO: 138 or 200) или YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ (SEQ ID NO: 202) на плазмиде вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE под управлением нативного промотора YopE, оценивали на предмет способности индуцировать апоптоз в раковых клетках (в том числе клетках 4T1 и B16F10; фиг. 38). Обнаружено, что IC50 (половинная максимальная ингибирующая концентрация), которая относится к количеству бактерий на эукариотическую клетку (МОИ), необходимому для уничтожения 50% таких клеток, снижалась при доставке tandemных повторов домена tBid BH3 по сравнению с одиночным доменом tBid BH3, когда кодирующие последовательности обоих белков находились на плазмиде вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE под управлением

нативного промотора YopE (фиг. 38). Это согласуется с результатами доставки этих белков, располагающихся на экспрессирующей плазмиде (фиг. 37). Этот результат также был неожиданным, поскольку при присоединении второго домена BH3 t-Bid размер белка увеличивался. Из-за этого следует ожидать снижения уровней экспрессии и доставки YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ (SEQ ID NO: 202) по сравнению с YopE₁₋₁₃₈-tBid BH3 (SEQ ID NO: 138 или 200), которые могут достигать максимального эквивалентного уровня. Для усиления активности по уничтожению клеток объединенные домены BH3 tBid могут одновременно и согласованно действовать после доставки посредством T3SS в эукариотические клетки. Если бы только один домен BH3 tBid в конструкторе YopE₁₋₁₃₈-(tBro BH3)₂ являлся функциональным, в лучшем случае можно было бы ожидать такой же эффективности, как при YopE₁₋₁₃₈-tBid BH3. Кроме того, штаммы Yersinia, кодирующие YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3) (SEQ ID NO: 202) на плазмиде вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE под управлением нативного промотора YopE, сравнивали на предмет способности индуцировать апоптоз в раковых клетках с доставкой YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂, полученного с экспрессирующей плазмиды (на основе pBad-MycHisA). В соответствии с повышенным количеством копий pBad-MycHisA (20-25 копий) по сравнению с pYV (согласно сообщениям, 1-6 копий), доставка YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ (SEQ ID NO: 202) на основе pBad-MycHisA приводила к незначительному снижению значения IC50 для клеток 4T1 и B16F10 (фиг. 38).

Проверка опухолеспецифического роста *in vivo* вплоть до 14 дня после введения бактерий.

Эксперимент по колонизации опухоли генетически модифицированными *Y. enterocolitica* повторили на синтетической модели аллотрансплантата у мышей (модели рака молочной железы 4T1) с отслеживанием бактериальной колонизации в течение двух недель. В этот раз мышам инфицировали 1×10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ) *Y. enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T. Несмотря на получение аналогичных модели B16F10 результатов в первые дни после инфицирования в дальнейшем авторы смогли показать, что колонизация опухоли устойчиво наблюдалась на 8 день и до 14 дня после инфицирования (фиг. 39). Кроме того, колонизация оставалась высокоспецифичной; лишь крайне небольшое количество бактерий обнаруживалось во всех других проверенных органах (фиг. 40). Эти результаты показали, что штамм *Y. enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T способен к устойчивой колонизации опухоли и может предотвращать свое уничтожение иммунной системой.

Эффективность *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT по отношению к задержке прогрессирования опухоли.

Для оценки влияния YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ (SEQ ID NO: 202) при доставке в опухолевые клетки *in vivo* авторы выполнили исследования на мышах Balb/C дикого типа с п/к аллотрансплантатами клеток рака молочной железы 4T1. Целью авторов являлась оценка штамма *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ (SEQ ID NO: 202) на плазмиде вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE под управлением нативного промотора YopE. Мышей в/в инфицировали PBS или 1×10^7 *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT+pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ после достижения опухолью размера 150-250 мм³. День в/в введения бактерий обозначали как день 0. Объем опухоли измеряли в следующие дни (с 0 по 9 день после в/в инъекции бактерий) штангенциркулем. Объем опухоли нормировали по объему опухоли в 0 день для компенсации исходной гетерогенности размера опухоли. Лечение с использованием *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBid BH3)₂ продемонстрировало влияние на прогрессирование роста опухоли, причем отмечено статистически значимое уменьшение опухоли на 8, 9 и 10 день после введения бактерий (фиг. 41). Важно отметить, что *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT сам по себе не влиял на прогрессирование опухоли в модели рака 4T1 у мышей (фиг. 42). Эти результаты подтверждают возможность применения таких бактерий и их T3SS для влияния на прогрессирование опухоли.

Библиография

- 1 Hoffman, R. M. Tumor-seeking Salmonella amino acid auxotrophs. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 917-923, doi:10.1016/j.copbio.2011.03.009 (2011).
- 2 Hoang, T. T., Williams, S., Schweizer, H. P. & Lam, J. S. Molecular genetic analysis of the region containing the essential *Pseudomonas aeruginosa* *asd* gene encoding aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase. *Microbiology* **143** (Pt 3), 899-907 (1997).
- 3 Skurnik, M. & Wolf-Watz, H. Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**, 517-529 (1989).
- 4 Isberg, R. R., Voorhis, D. L. & Falkow, S. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**, 769-778 (1987).
- 5 Cornelis, G. R. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811-825, doi:nrmicro1526 [pii]10.1038/nrmicro1526 (2006).
- 6 Mota, L. J. & Cornelis, G. R. The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* **37**, 234-249, doi:R673752030212825 [pii]10.1080/07853890510037329 (2005).
- 7 Trosky, J. E., Liverman, A. D. & Orth, K. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* **10**, 557-565, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x (2008).
- 8 Brenner, D. & Mak, T. W. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 871-877, doi:S0955-0674(09)00160-4 [pii]10.1016/j.ceb.2009.09.004 (2009).
- 9 Chalah, A. & Khosravi-Far, R. The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol* **615**, 25-45, doi:10.1007/978-1-4020-6554-5_3 (2008).
- 10 Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742-758, doi:S0092-8674(11)01283-9 [pii]10.1016/j.cell.2011.10.033 (2011).
- 11 Waugh, D. S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* **80**, 283-293, doi:S1046-5928(11)00203-8 [pii]10.1016/j.pep.2011.08.005 (2011).
- 12 Howard, S. L. et al. Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J Bacteriol* **188**, 3645-3653, doi:10.1128/JB.188.10.3645-3653.2006 (2006).
- 13 Thomson, N. R. et al. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet* **2**, e206, doi:10.1371/journal.pgen.0020206 (2006).
- 14 Pelludat, C., Hogardt, M. & Heesemann, J. Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun* **70**, 1832-1841 (2002).
- 15 Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P. & Cornelis, G. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* **57**, 2534-2541 (1989).
- 16 Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* **14**, 583-594 (1994).
- 17 Sarker, M. R., Neyt, C., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* **180**, 1207-1214 (1998).
- 18 Neubauer, H., Aleksic, S., Hensel, A., Finke, E. J. & Meyer, H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol* **290**, 61-64, doi:10.1016/S1438-4221(00)80107-1 (2000).

- 19 Feldman, M. F., Muller, S., Wuest, E. & Cornelis, G. R. *SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the Yersinia enterocolitica type III Ysc system. Mol Microbiol* **46**, 1183-1197, doi:3241 [pii] (2002).
- 20 Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. A synonymous mutation in *Yersinia enterocolitica* yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *J Bacteriol* **187**, 707-715, doi:10.1128/JB.187.2.707-715.2005 (2005).
- 21 Wolke, S., Ackermann, N. & Heesemann, J. The *Yersinia enterocolitica* type 3 secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins. *Cell Microbiol* **13**, 1339-1357, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01623.x (2011).
- 22 Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Genetic analysis of the yopE region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression. *J Bacteriol* **172**, 1547-1555 (1990).
- 23 Sambrook, J. (ed David W. Russell) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. , 2001).
- 24 Alto, N. M. & Dixon, J. E. Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of bacterial type III effector proteins. *Methods Enzymol* **439**, 131-143, doi:S0076-6879(07)00410-7 [pii]10.1016/S0076-6879(07)00410-7 (2008).
- 25 Alto, N. M. et al. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* **124**, 133-145, doi:S0092-8674(05)01229-8 [pii]10.1016/j.cell.2005.10.031 (2006).
- 26 Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**, 137-141, doi:0378-1119(91)90599-7 [pii] (1991).
- 27 Yoneda, Y. et al. A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently. *Exp Cell Res* **201**, 313-320 (1992).
- 28 Metcalf, W. W., Jiang, W. & Wanner, B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. *Gene* **138**, 1-7 (1994).
- 29 Diepold, A. et al. Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *Embo J* **29**, 1928-1940, doi:emboj201084 [pii]10.1038/emboj.2010.84 (2010).
- 30 Iriarte, M., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The rpoS gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect Immun* **63**, 1840-1847 (1995).
- 31 Cornelis, G., Vanootegeem, J. C. & Sluiter, C. Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* **2**, 367-379, doi:0882-4010(87)90078-7 [pii] (1987).
- 32 Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* **70**, 4165-4176 (2002).
- 33 Dehio, C., Meyer, M., Berger, J., Schwarz, H. & Lanz, C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci* **110 (Pt 18)**, 2141-2154 (1997).
- 34 Bensimon, A. et al. ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage. *Sci Signal* **3**, rs3, doi:10.1126/scisignal.20010343/151/rs3 [pii] (2010).
- 35 Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.

- Electrophoresis* **20**, 3551-3567, doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2 [pii]10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2 (1999).
- 36 Smyth, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3, doi:10.2202/1544-6115.1027 (2004).
 - 37 Ting, L. et al. Normalization and statistical analysis of quantitative proteomics data generated by metabolic labeling. *Mol Cell Proteomics* **8**, 2227-2242, doi:10.1074/mcp.M800462-MCP200M800462-MCP200 [pii] (2009).
 - 38 Vizcaino, J. A. et al. The PRoteomics IDentifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013. *Nucleic Acids Res* **41**, D1063-1069, doi:10.1093/nar/gks1262gks1262 [pii] (2013).
 - 39 Boyd, A. P., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* **182**, 4811-4821 (2000).
 - 40 Iriarte, M. & Cornelis, G. R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**, 915-929 (1998).
 - 41 Kudryashev, M. et al. In situ structural analysis of the *Yersinia enterocolitica* injectisome. *Elife* **2**, e00792, doi:10.7554/eLife.0079200792 [pii] (2013).
 - 42 Schulte, R. et al. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* **14**, 1471-1484 (2000).
 - 43 Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C. & Cornelis, G. R. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**, 1278, doi:10.1126/science.1107679 [pii]10.1126/science.1107679 (2005).
 - 44 Isaksson, E. L. et al. The membrane localization domain is required for intracellular localization and autoregulation of YopE in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **77**, 4740-4749, doi:10.1128/IAI.00333-09 [pii]10.1128/IAI.00333-09 (2009).
 - 45 Denecker, G. et al. Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun* **70**, 3510-3520 (2002).
 - 46 Sharma, S. et al. Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells. *Plant J* **74**, 701-712, doi:10.1111/tpj.12148 (2013).
 - 47 Carrington, J. C. & Dougherty, W. G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3391-3395 (1988).
 - 48 Kapust, R. B., Tozser, J., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 949-955, doi:10.1016/S0006-291X(02)00574-0S0006-291X(02)00574-0 [pii] (2002).
 - 49 Liang, H., Gao, H., Maynard, C. A. & Powell, W. A. Expression of a self-processing, pathogen resistance-enhancing gene construct in *Arabidopsis*. *Biotechnol Lett* **27**, 435-442, doi:10.1007/s10529-005-1884-9 (2005).
 - 50 Weber, W. et al. Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol* **20**, 901-907, doi:10.1038/nbt731nbt731 [pii] (2002).
 - 51 Kapust, R. B. et al. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng* **14**, 993-1000 (2001).
 - 52 Lee, V. T., Anderson, D. M. & Schneewind, O. Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and

- eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol* **28**, 593-601 (1998).
- 53 Gray, D. C., Mahrus, S. & Wells, J. A. Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease. *Cell* **142**, 637-646, doi:S0092-8674(10)00783-X [pii]10.1016/j.cell.2010.07.014 (2010).
 - 54 Henrichs, T. et al. Target-directed proteolysis at the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4246-4251, doi:102/12/4246 [pii]10.1073/pnas.0408520102 (2005).
 - 55 Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R. & Galan, J. E. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**, 815-826, doi:S0092-8674(00)81442-7 [pii] (1998).
 - 56 Hakansson, S. et al. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *Embo J* **15**, 5812-5823 (1996).
 - 57 Stebbins, C. E. & Galan, J. E. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* **412**, 701-705, doi:10.1038/3508900035089000 [pii] (2001).
 - 58 Li, H. et al. The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* **315**, 1000-1003, doi:315/5814/1000 [pii]10.1126/science.1138960 (2007).
 - 59 Norris, F. A., Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E. & Majerus, P. W. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14057-14059 (1998).
 - 60 Pullainen, A. T. et al. Bacterial effector binds host cell adenyl cyclase to potentiate Galphas-dependent cAMP production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 9581-9586, doi:1117651109 [pii]10.1073/pnas.1117651109 (2012).
 - 61 Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501, doi:S0092-8674(00)81590-1 [pii] (1998).
 - 62 Nagaraj, N. et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* **7**, 548, doi:msb201181 [pii]10.1038/msb.2011.81 (2011).
 - 63 Blanco-Toribio, A., Muyldermans, S., Frankel, G. & Fernandez, L. A. Direct injection of functional single-domain antibodies from *E. coli* into human cells. *PLoS One* **5**, e15227, doi:10.1371/journal.pone.0015227 (2010).
 - 64 Caussinus, E., Kanca, O. & Affolter, M. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 117-121, doi:nsmb.2180 [pii]10.1038/nsmb.2180 (2011).
 - 65 Schmutz, C. et al. Systems-Level Overview of Host Protein Phosphorylation During *Shigella flexneri* Infection Revealed by Phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics* **12**, 2952-2968, doi:M113.029918 [pii]10.1074/mcp.M113.029918 (2013).
 - 66 Szklarczyk, D. et al. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* **39**, D561-568, doi:gkq973 [pii]10.1093/nar/gkq973 (2011).
 - 67 Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**, 1-13, doi:gkn923 [pii]10.1093/nar/gkn923 (2009).
 - 68 Huang da, W. et al. DAVID gene ID conversion tool. *Bioinformatics* **2**, 428-430 (2008).
 - 69 Schwerk, C. & Schulze-Osthoff, K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **19**, 1-13, doi:S1097-2765(05)01375-4 [pii]10.1016/j.molcel.2005.05.026 (2005).

- 70 Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A. & Kosik, K. S. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* **68**, 8164-8172, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1305 (2008).
- 71 Aepfelbacher, M., Trasak, C. & Ruckdeschel, K. Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb Haemost* **98**, 521-529 (2007).
- 72 Trulzsch, K., Sporleder, T., Igwe, E. I., Russmann, H. & Heesemann, J. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* **72**, 5227-5234, doi:10.1128/IAI.72.9.5227-5234.2004 (2004).
- 73 Cao, H. D. et al. Attenuated *Salmonella typhimurium* carrying TRAIL and VP3 genes inhibits the growth of gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Tumori* **96**, 296-303 (2010).
- 74 Massa, P. E., Panizza, A., Monegal, A., de Marco, A. & Rescigno, M. *Salmonella* engineered to express CD20-targeting antibodies and a drug-converting enzyme can eradicate human lymphomas. *Blood* **122**, 705-714, doi:10.1182/blood-2012-12-474098 (2013).
- 75 Yoon, W. S., Chae, Y. S., Hong, J. & Park, Y. K. Antitumor therapeutic effects of a genetically engineered *Salmonella typhimurium* harboring TNF- α in mice. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 1807-1819, doi:10.1007/s00253-010-3006-4 (2011).
- 76 Forbes, N. S., Munn, L. L., Fukumura, D. & Jain, R. K. Sparse initial entrapment of systemically injected *Salmonella typhimurium* leads to heterogeneous accumulation within tumors. *Cancer Res* **63**, 5188-5193 (2003).
- 77 Toso, J. F. et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **20**, 142-152 (2002).
- 78 Miller, S. I., Ernst, R. K. & Bader, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 36-46, doi:nrmicro1068 [pii]10.1038/nrmicro1068 (2005).
- 79 Zhang, M., Swofford, C. A. & Forbes, N. S. Lipid A controls the robustness of intratumoral accumulation of attenuated *Salmonella* in mice. *Int J Cancer* **135**, 647-657, doi:10.1002/ijc.28700 (2014).
- 80 Clairmont, C. et al. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium*. *J Infect Dis* **181**, 1996-2002, doi:10.1086/315497 (2000).
- 81 Lee, C. H., Wu, C. L. & Shiau, A. L. Endostatin gene therapy delivered by *Salmonella choleraesuis* in murine tumor models. *J Gene Med* **6**, 1382-1393, doi:10.1002/jgm.626 (2004).
- 82 Zheng, L. M. et al. Tumor amplified protein expression therapy: *Salmonella* as a tumor-selective protein delivery vector. *Oncol Res* **12**, 127-135 (2000).
- 83 Forbes, N. S. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **10**, 785-794, doi:nrc2934 [pii]10.1038/nrc2934 (2010).
- 84 Lee, C. H., Wu, C. L. & Shiau, A. L. *Salmonella choleraesuis* as an anticancer agent in a syngeneic model of orthotopic hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **122**, 930-935, doi:10.1002/ijc.23047 (2008).
- 85 Thamm, D. H. et al. Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting *Salmonella typhimurium* to dogs with spontaneous neoplasia: phase I evaluation. *Clin Cancer Res* **11**, 4827-4834, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2510 (2005).
- 86 Fidler, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* **35**, 218-224 (1975).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью, трансформированного вектором, который содержит в направлении от 5' к 3' промотор;
первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;
вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК,
для лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта,
при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью способен накапливаться в указанной злокачественной солидной опухоли,
причем указанное применение включает введение указанному субъекту указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью совместно с сидерофором, и
при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью представляет собой штамм *Yersinia enterocolitica* Δ урН, О, Р, Е, М, Т, дефектный по продукции по меньшей мере одного сидерофора, и указанный штамм вводят в количестве, достаточном для лечения указанного субъекта.
2. Применение по п.1, отличающееся тем, что в указанном рекомбинантном штамме грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью все эффектор-кодирующие гены, кодирующие бактериальные эффекторные белки, вирулентные по отношению к эукариотическим клеткам, мутированы та-

ким образом, что полученный штамм *Yersinia* более не продуцирует функциональных бактериальных эффекторных белков, вирулентных по отношению к эукариотическим клеткам.

3. Применение по п.2, отличающееся тем, что указанный сигнал доставки бактериального эффекторного белка представляет собой сигнал доставки бактериального эффекторного белка T3SS, причем указанный сигнал доставки бактериального эффекторного белка T3SS содержит 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE *Y. enterocolitica*.

4. Применение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что указанный гетерологичный белок выбран из группы, состоящей из белков, вовлеченных в апоптоз или регуляцию апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков сигнальных путей клетки, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, белков, родственных GPCR, нанотел и гибридных конструкторов нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков.

5. Применение рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью для лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта,

причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью способен накапливаться в указанной злокачественной солидной опухоли,

при этом указанное применение включает введение указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью совместно с сидерофором указанному субъекту, и

при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью представляет собой штамм *Yersinia enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T, дефектный по продукции по меньшей мере одного сидерофора, и указанный штамм вводят в количестве, достаточном для лечения указанного субъекта.

6. Применение по п.5, отличающееся тем, что указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью является дефектным по продукции всех эффекторных белков, вирулентных по отношению к эукариотическим клеткам, и указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью экспрессирует фермент, конвертирующий пролекарство.

7. Применение по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что указанному субъекту вводят от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью.

8. Применение по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью вводят указанному субъекту в соответствии с режимом дозирования, состоящим из однократной дозы каждые 2-20 дней в течение периода продолжительностью приблизительно 20-60 дней.

9. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что количество бактерий указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью в органах, в которых отсутствует злокачественная солидная опухоль, находится ниже предела обнаружения через по меньшей мере 4 дня после последнего введения указанного рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью указанному субъекту.

10. Применение по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью приготовлен в форме фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

11. Способ лечения злокачественной солидной опухоли у субъекта,

причем указанный способ включает введение указанному субъекту рекомбинантного штамма грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью совместно с сидерофором,

при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью способен накапливаться в указанной злокачественной солидной опухоли, и

при этом указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью представляет собой штамм *Yersinia enterocolitica* ΔyopH, O, P, E, M, T, дефектный по продукции по меньшей мере одного сидерофора, и указанный штамм вводят совместно с сидерофором в количестве, достаточном для лечения указанного субъекта.

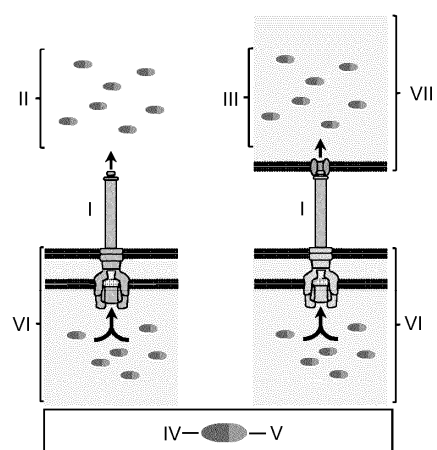
12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный штамм грамотрицательной бактерии с ослабленной вирулентностью трансформирован вектором, который содержит в направлении от 5' к 3'

промотор;

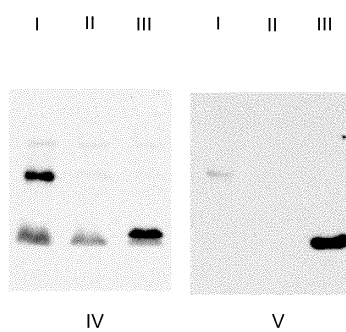
первую последовательность ДНК, кодирующую сигнал доставки бактериального эффекторного белка, функционально связанный с указанным промотором;

вторую последовательность ДНК, кодирующую гетерологичный белок, присоединенный с соблюдением рамки считывания к 3'-концу указанной первой последовательности ДНК.

A

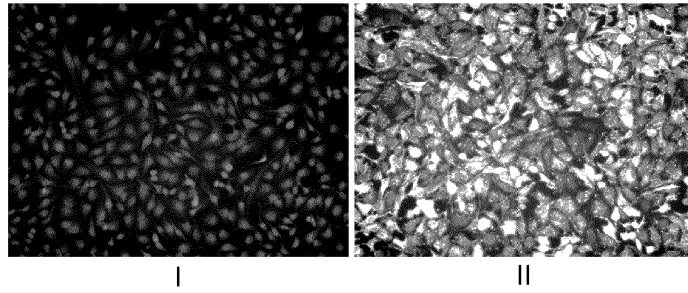


B

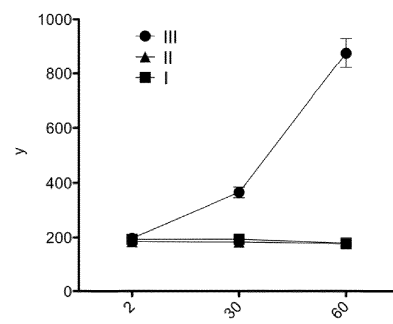


Фиг. 1

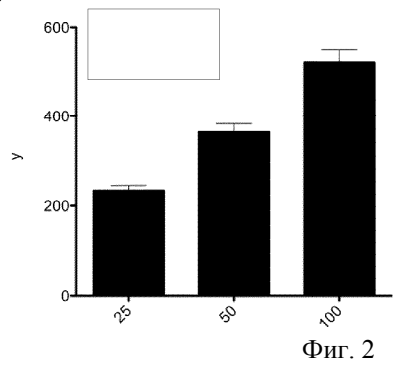
A

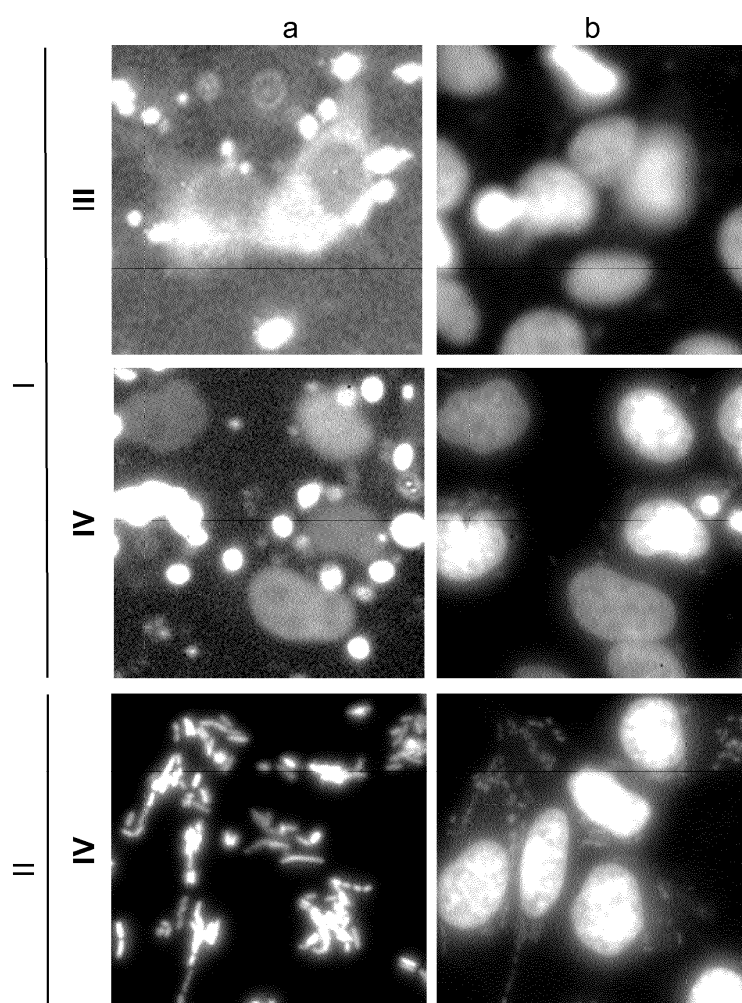


B

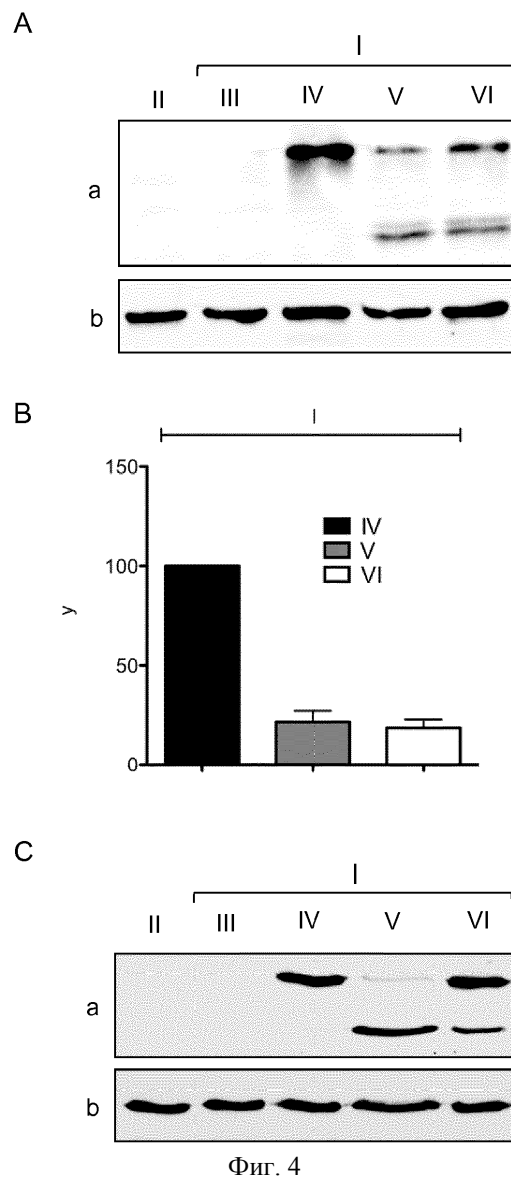


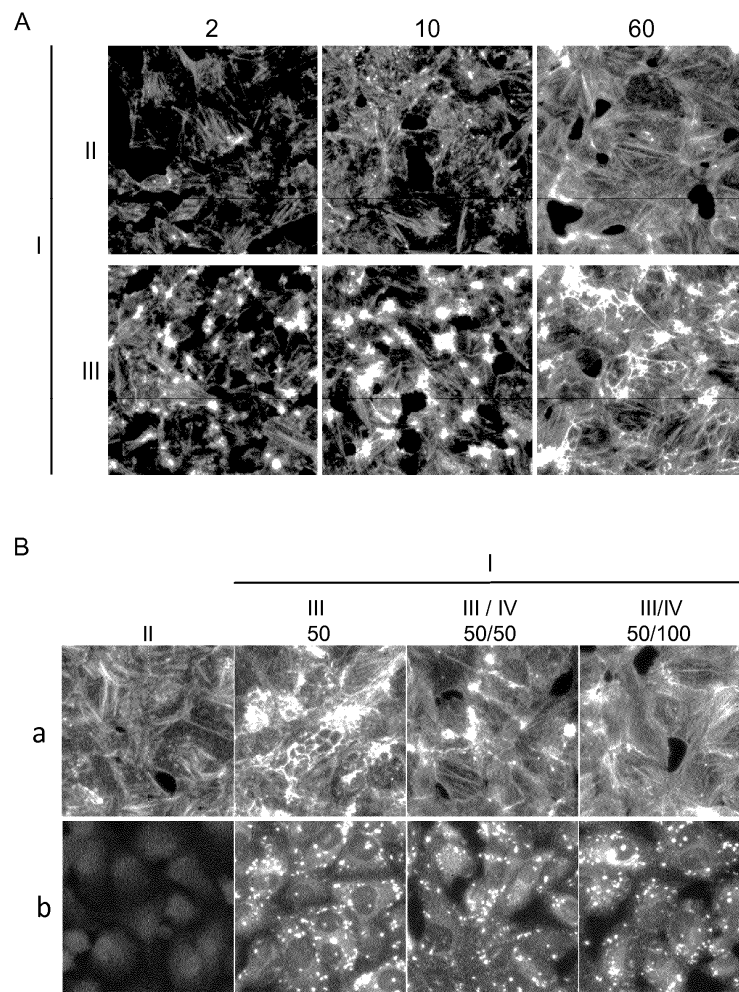
C



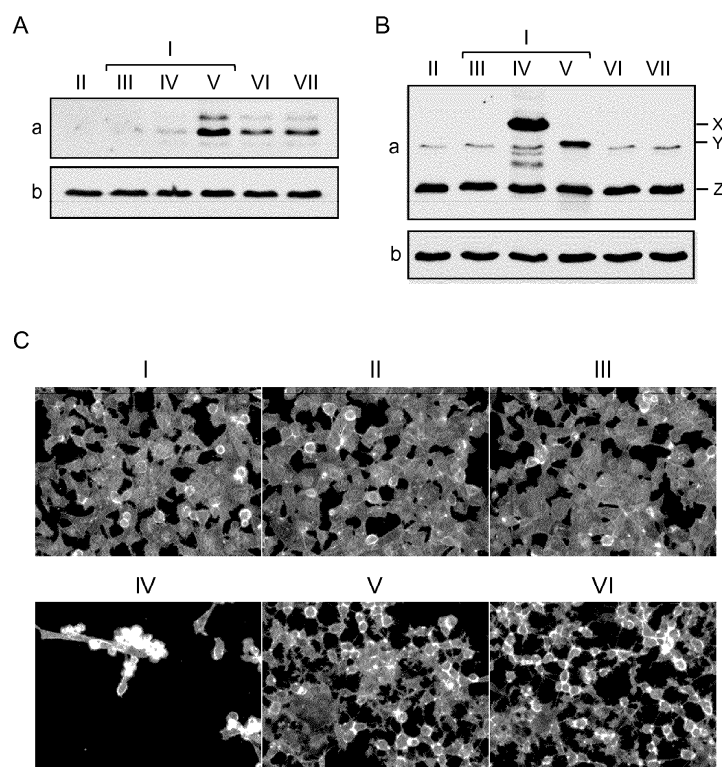
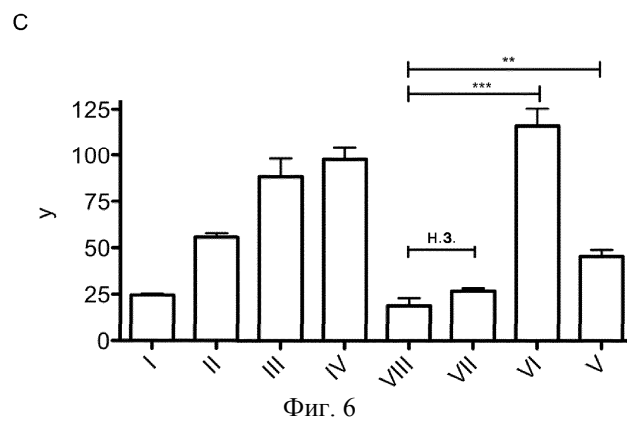
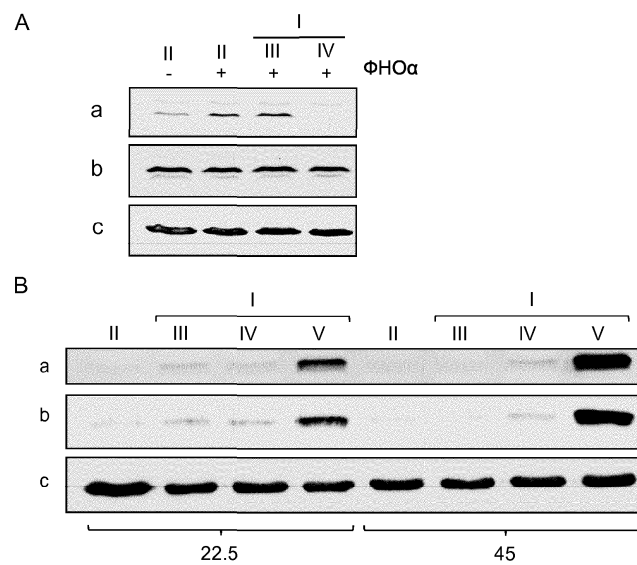


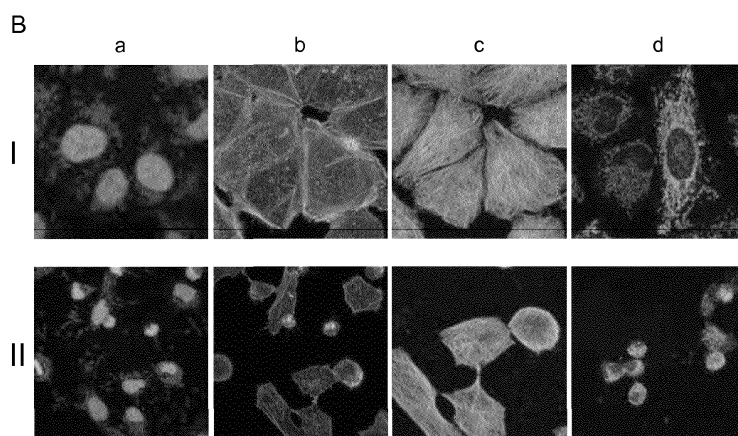
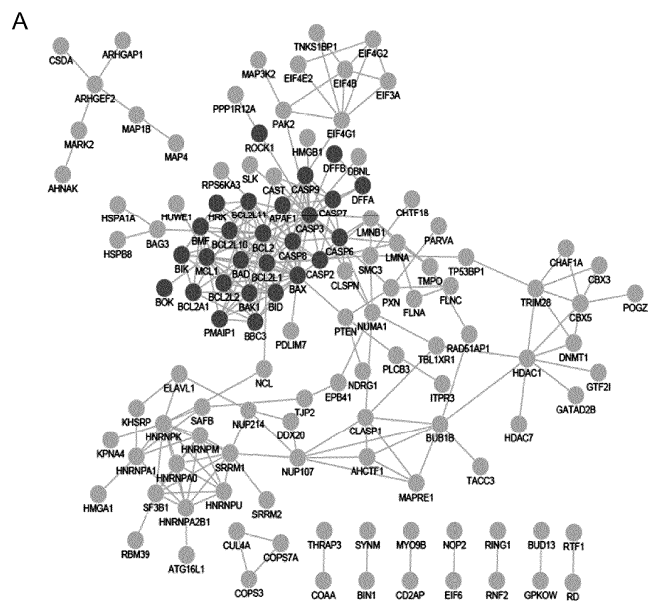
Фиг. 3



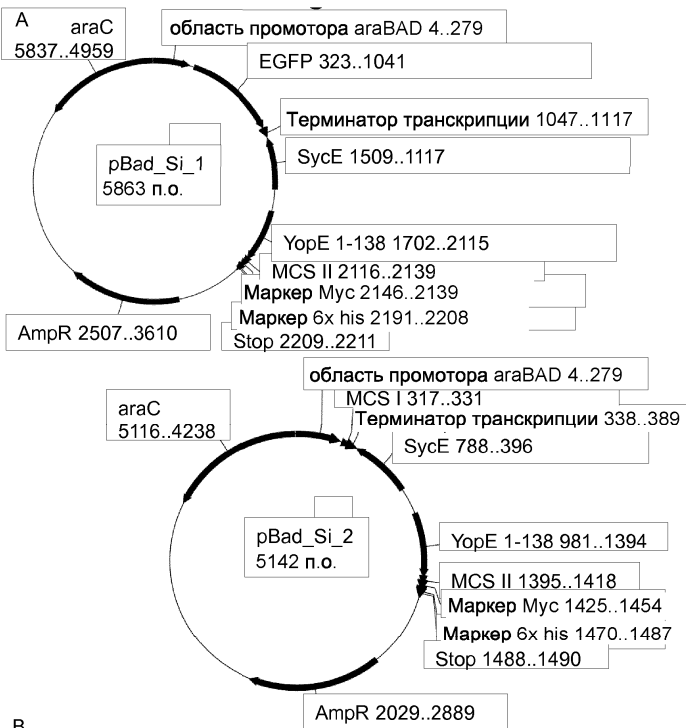


Фиг. 5





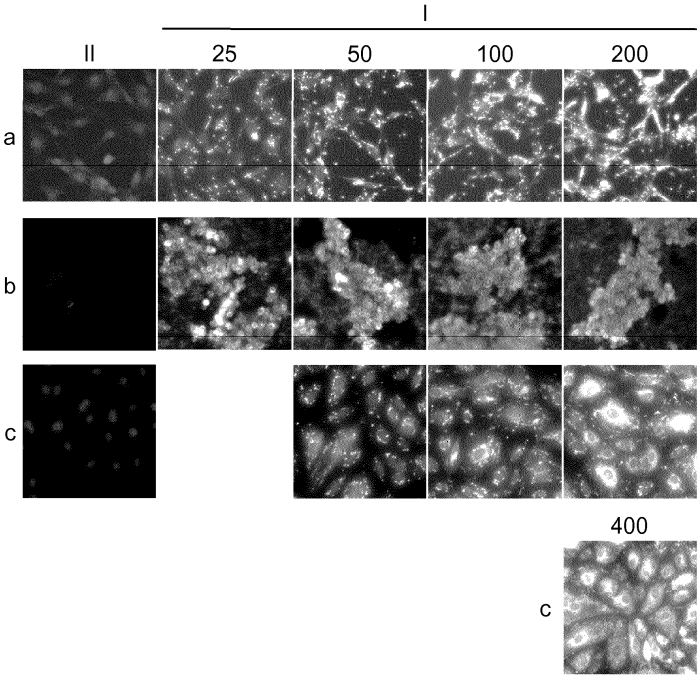
ФИГ. 8



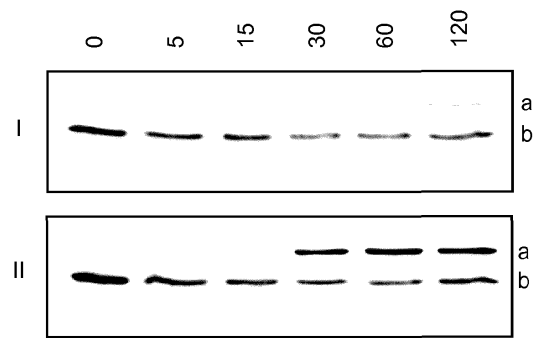
B

YopE1-138 XhoI XbaI BstBI
GTTCCGCCACG CTCGAGTCTA GATTTCGAA
HindIII эпитоп мус
AAGCTTGGGC CCGAACAAAA ACTCATCTCA
GAAGAGGATCTGAATAGCGC CGTCGACCAT
маркер 6x His ***
CATCATCATC ATCATTGAGT TTAACGGTC
TCCAGCTTGG CTGTTTTGG C

Фиг. 9

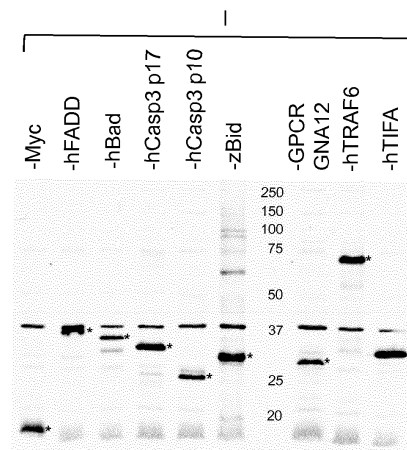


Фиг. 10

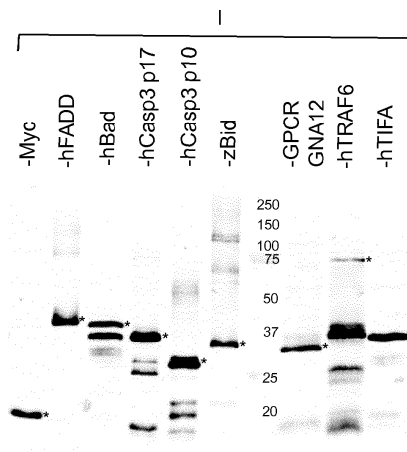


Фиг. 11

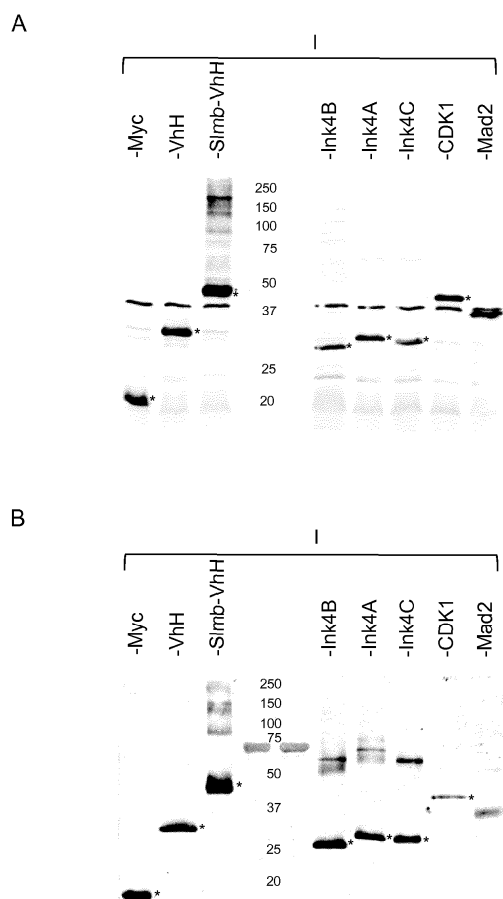
A



B



Фиг. 12



Фиг. 13

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔHOPEMT	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Iriarte and Cornelis, 1998
ΔHOPEMT asd yopB	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T ΔyopB	MRS40 pIML421 [yopBΔ89-217, yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal Kan	
ΔHOPEMT asd	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	MRS40 asdΔ292-610 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Kudryashev et al., 2013
ΔHOPEMT asd inv	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔinvA	MRS40 asdΔ292-610 invAΔ352-2225::aphA-3 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				445/446, 447/448, 449/450	Nal Kan	
ΔHOPEMT asd inv yadA	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔinvA ΔyadA	MRS40 asdΔ292-610 invAΔ587-836 (совместное внедрение вектора) yadAΔ89-354::apnA3pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				352/353, 354/355, 356/357	Nal Kan Tet	

Фиг. 14А

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pBad_Si1	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	EGFP (индуцируемый арабинозой), фрагмент SycE-YopE1-138-MycHis		pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138)	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pBad_Si2	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	фрагмент SycE-YopE1-138-MycHis	YopE1-138-MycHis	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-YopE1-138)	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_16	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-lpgB1	pBad_Si_2	pSi_16	292/293	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_20	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-SopE	pBad_Si_2	pSi_20	296/297	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_22	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Rac1 Q61L	pBad_Si_2	pSi_22	299/300	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_24	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-RhoA Q61E	pBad_Si_2	pSi_24	301/302	Nal Amp	

Фиг. 14B

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔНОРЕМТ T asd pSi_28	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-SopE-MycHis	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T yopB asd pSi_28	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔyopB Δasd		YopE1-138-SopE-MycHis	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T asd pSi_30	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-SopB	pBad_Si_2	pSi_30	307/308	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T asd pSi_37	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-FADD	pBad_Si_2	pSi_37	367/386	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T asd pSi_38	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-OspF	pBad_Si_2	pSi_38	317/318	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ T asd pSi_43	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-BepG 715-end	pBad_Si_2	pSi_43	324/351	Nal Amp	

Фиг. 14C

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_51	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Rac1 Q61L-MycHis	pBad_Si_2	pSi_51	299/339	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ yopB asd pSi_51	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔyopB Δasd		YopE1-138-Rac1 Q61L-MycHis	pBad_Si_2	pSi_51	299/339	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_53	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Slmb1-VhH4	pBad_Si_2	pSi_53	341/342	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_57	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Bad	pBad_Si_2	pSi_57	346/347	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_64	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-SptP	pBad_Si_2	pSi_64	364/365	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_70	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-NLS-Slmb1-VhH4	pBad_Si_2	pSi_70	369/342	Nal Amp	

Фиг. 14D

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔHOPEMT asd pSi_85	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Bid	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_87	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-t-Bid	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_97	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-каспаза 3 p17	pBad_Si_2	pSi_97	403/406	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_103	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-GPCR GNA12	pBad_Si_2	pSi_103	410/413	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_106	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-каспаза 3 p10/12	pBad_Si_2	pSi_106	417/420	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_111	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-lpgD	pBad_Si_2	pSi_111	423/424	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_112	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Slmb1-VhH4-NLS	pBad_Si_2	pSi_112	341/425	Nal Amp	

Фиг. 14E

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔHOPEMT asd pSi_116	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-z-Bid	pBad_Si_2	pSi_116	428/430	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_117	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-z-t-Bid	pBad_Si_2	pSi_117	429/430	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_118	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-BerA E305-end	pBad_Si_2	pSi_118	433/435	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_119	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-BerA	pBad_Si_2	pSi_119	434/435	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_120	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-ET1	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_121	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-z-BIM	pbad_Si_1	pSi_121	438/439	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_124	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-VhH4 нанотело, распознающее EGFP	pBad_Si_2	pSi_124	451/373	Nal Amp	

Фиг. 14F

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔHOPEMT asd pSi_132	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-протеаза TEV S219V	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_140	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-EGFP	pBad_Si_2	pSi_140	477/476	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_143	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Cdk1	pBad_Si_2	pSi_143	478/479	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_145	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Mad2	pBad_Si_2	pSi_145	482/483	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_147	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ink4A	pBad_Si_2	pSi_147	486/487	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_150	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ink4B	pBad_Si_2	pSi_150	492/493	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_151	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ink4C	pBad_Si_2	pSi_151	494/495	Nal Amp	

Фиг. 14G

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔHOPEMT asd pSi_153	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-TIFA	pBad_Si_2	pSi_153	558/559	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_156	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV – ET1	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_159	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV - EGFP - NLS	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_160	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV - NLS - EGFP	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_161	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV – INK4C	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_164	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV - Flag - INK4C	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_166	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Traf6 мыши	pBad_Si_2	pSi_166	561/562	Nal Amp	

Фиг. 14H

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔHOPEMT asd pSi_318	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-фрагмент ВНЗ tBid мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_322	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-фрагмент ВНЗ BAX мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	Nal Amp	
S. enterica SL1344 ΔaroA	S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium SL1344 ΔaroA							Hoiseth and Stocker, 1981
S. enterica ΔaroA pSi_266	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA1-20	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_266	580/612	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_267	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_267	580/613	Amp	

Фиг. 14I

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
S. enterica ΔaroA pSi_268	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-80	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_268	614/615	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_269	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_269	614/616	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_270	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA1-20-tBid мыши после оптимизации кодонов для S. enterica	pSi_266	pSi_270	synthetic construct	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_271	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-tBid мыши после оптимиз. кодонов для S. enterica	pSi_267	pSi_271	synthetic construct	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_272	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA1-80-tBid мыши после оптимизации кодонов для S. enterica	pSi_268	pSi_272	synthetic construct	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_273	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA1-104-tBid мыши после оптимизации кодонов для S. enterica	pSi_269	pSi_273	synthetic construct	Amp	

Фиг. 14J

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔHOPEMT asd pSi_362	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ink4A 84-103 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_362	745/746	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_363	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Cdk2/ингибиторный пептид циклина I после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_363	747/748	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_364	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-пептид 10 p21 (DtoA) после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_364	749/750	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_366	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-ядро пептидов 10 и 11 p21 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_366	753/754	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_367	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-пептид 17-33 p21 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_367	755/756	Nal Amp	

Фиг. 14K

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔHOPEMT asd pSi_368	YopE1-138-pep5 G1/S циклин D2 после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica		YopE1-138-Y. enterocolitica codon optimized pep5 of G1/S cyclin D2	pBad_Si_2	pSi_368	757/758	Nal Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_333	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Ink4a-MycHis	pSi_267	pSi_333	703/704	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_334	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Ink4a-MycHis	pSi_269	pSi_334	703/704	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_335	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Ink4c-MycHis	pSi_267	pSi_335	705/706; 707/708; 705/708	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_336	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Ink4c-MycHis	pSi_269	pSi_336	705/706; 707/708; 705/708	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_337	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Mad2-MycHis	pSi_267	pSi_337	709/710	Amp	

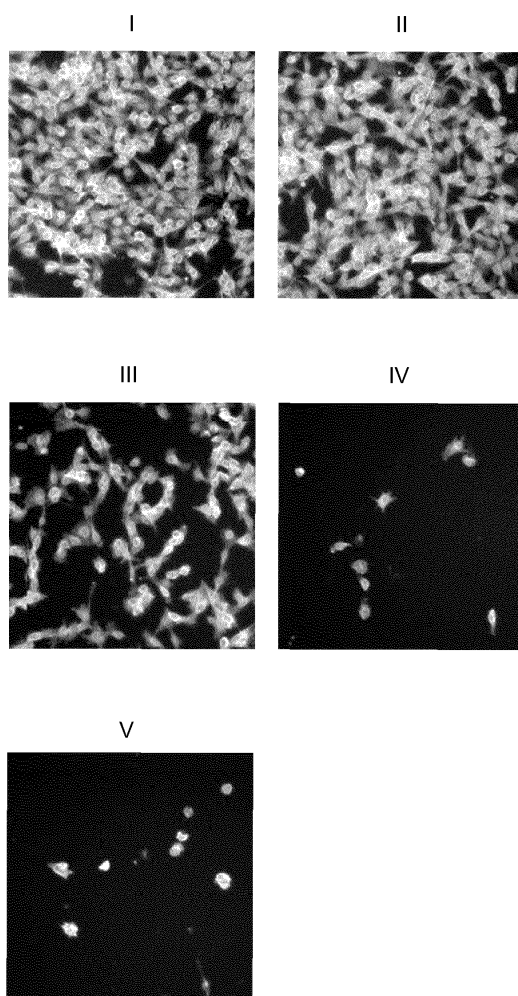
Фиг. 14L

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
S. enterica ΔaroA pSi_338	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Mad2-MycHis	pSi_269	pSi_338	709/710	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_339	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Cdk1-MycHis	pSi_267	pSi_339	711/712	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_340	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Cdk1-MycHis	pSi_269	pSi_340	711/712	Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_315	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-tBid мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_315	synthetic construct	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_236	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-убиквитин	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_237_II	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-убиквитин-Flag-INK4C-MycHis	pSi_236	pSi_237_II	588/509	Nal Amp	

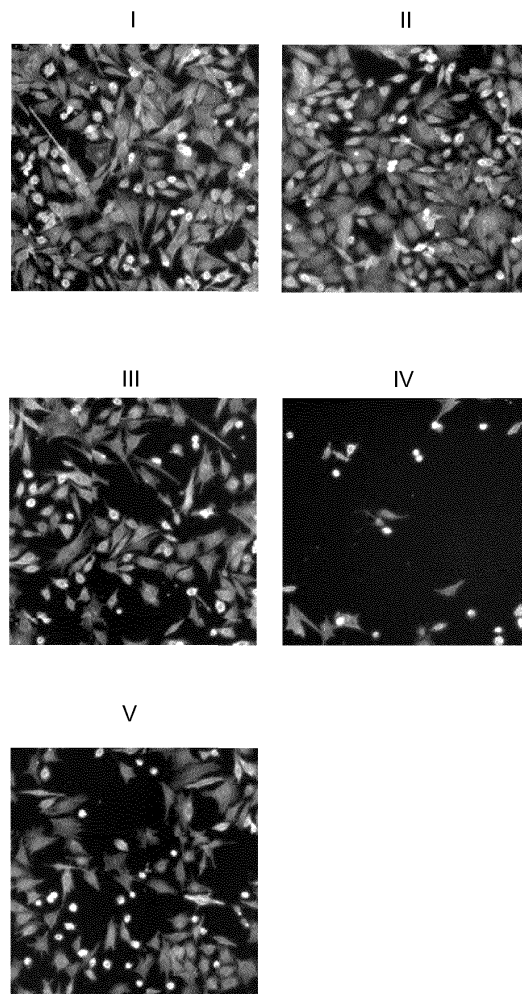
Фиг. 14M

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/важные характеристики	Белок для доставки с помощью T3SS	Каркас плазмиды	Название получен. плазмиды	Праймеры Si_Nr.:	Устойчивость	Ссылка
ΔНОРЕМТ asd pSi_357	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-BN3 tBid мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBadSi_2	pSi_357	733/735	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_358	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-BN3 Вах мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_358	736/738	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_371	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-(BN3 tBid мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica)2	pSi_357	pSi_371	733/734	Nal Amp	
ΔНОРЕМТ asd pSi_373	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-(BN3 tBid мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica)-(BN3 Вах мыши после оптимизации кодонов для Y. enterocolitica)	pSi_358	pSI_373	733/734	Nal Amp	

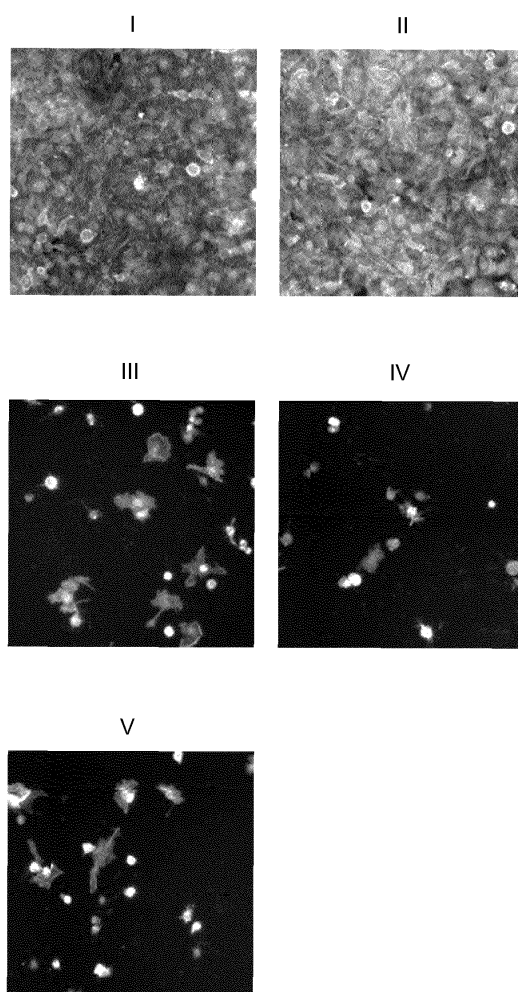
Фиг. 14N



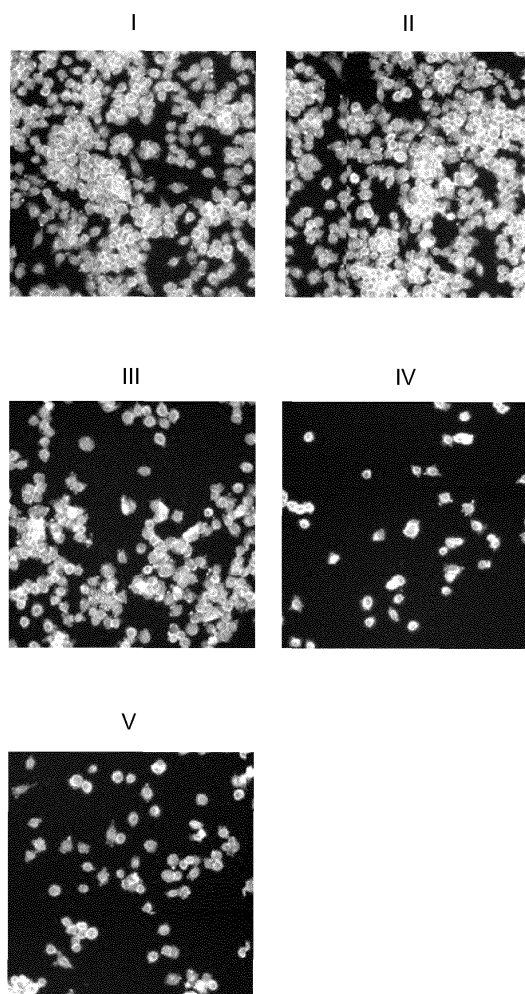
Фиг. 15



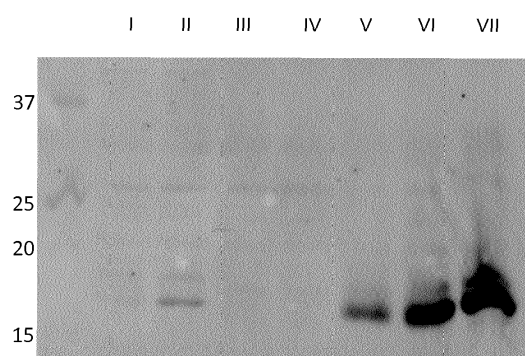
Фиг. 16



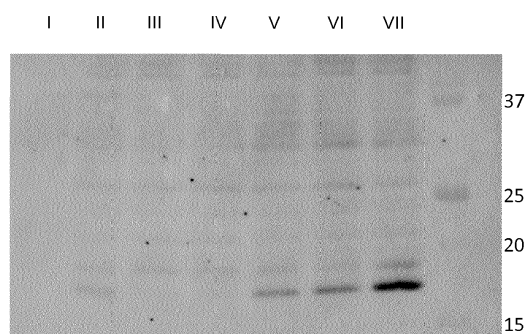
Фиг. 17



Фиг. 18

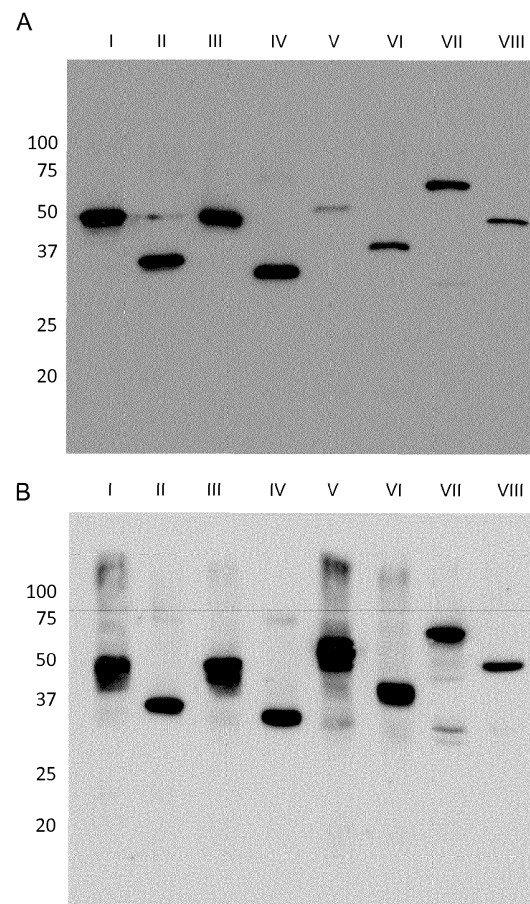


Фиг. 19

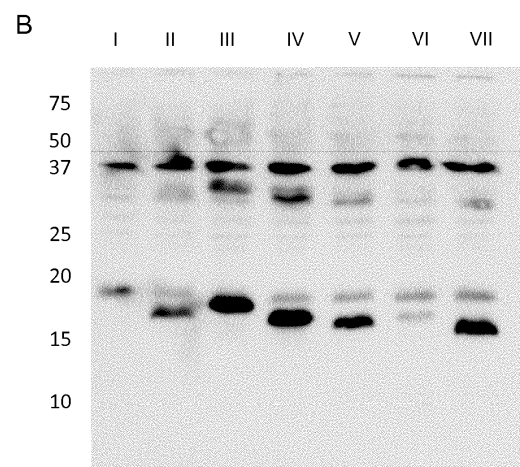
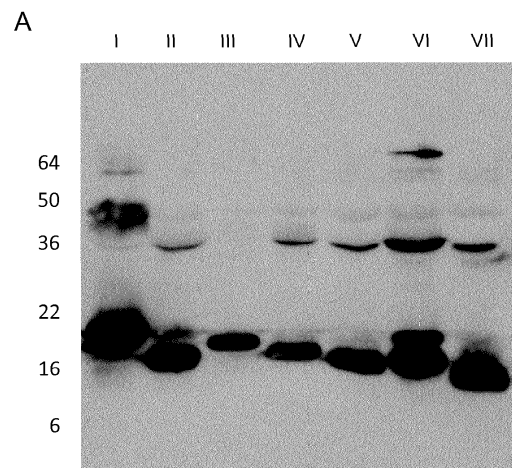


Фиг. 20

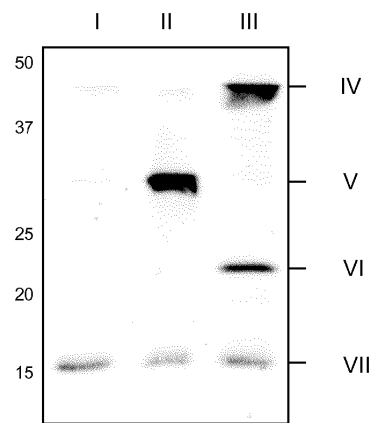
040558



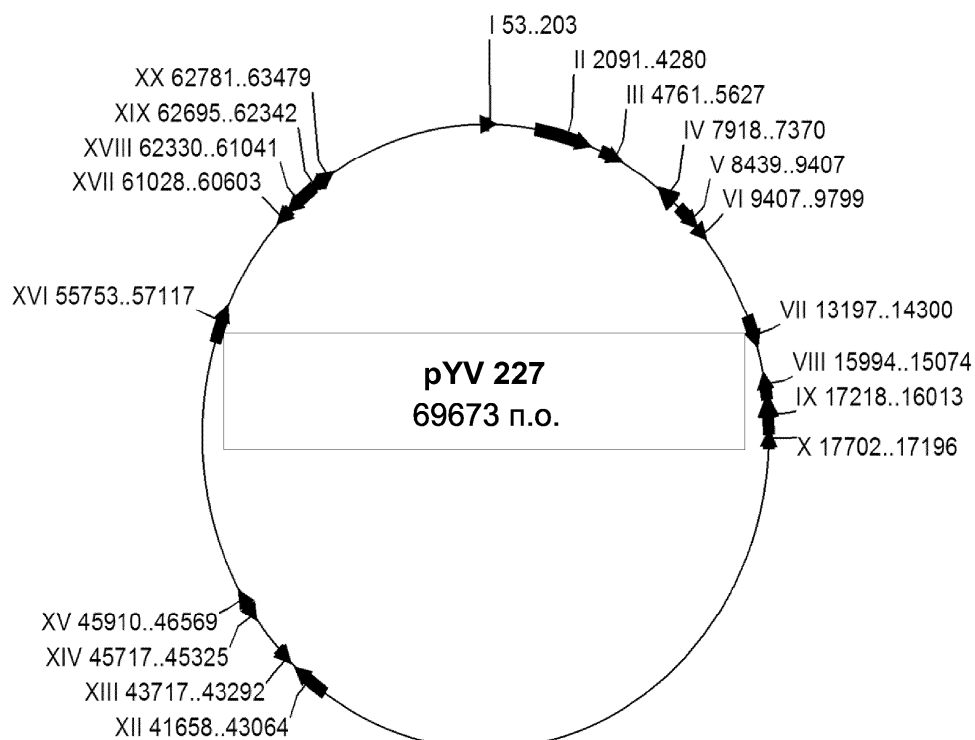
Фиг. 21



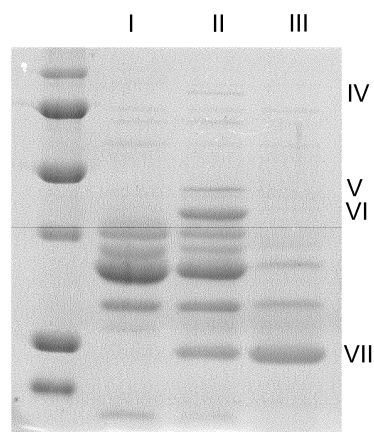
Фиг. 22



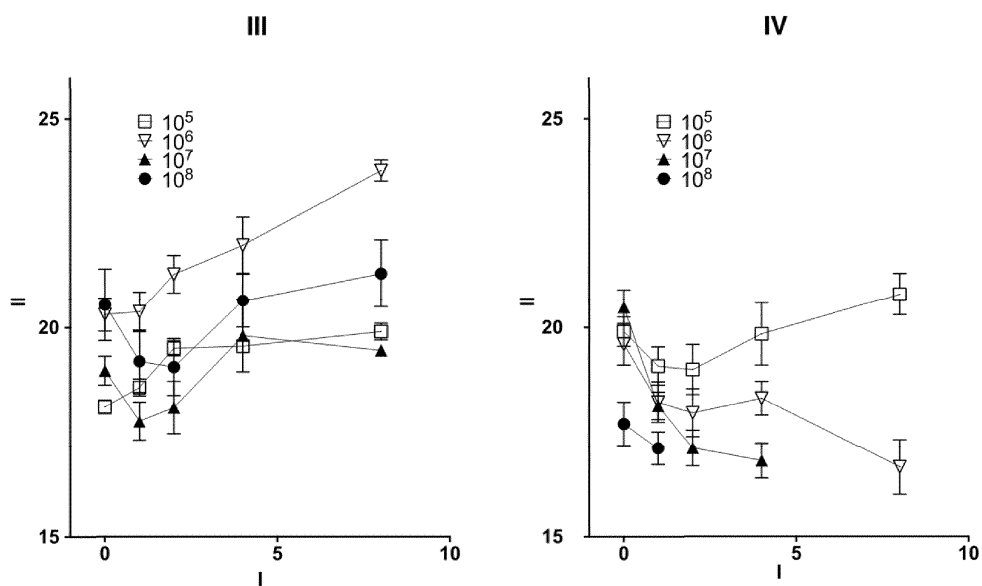
Фиг. 23



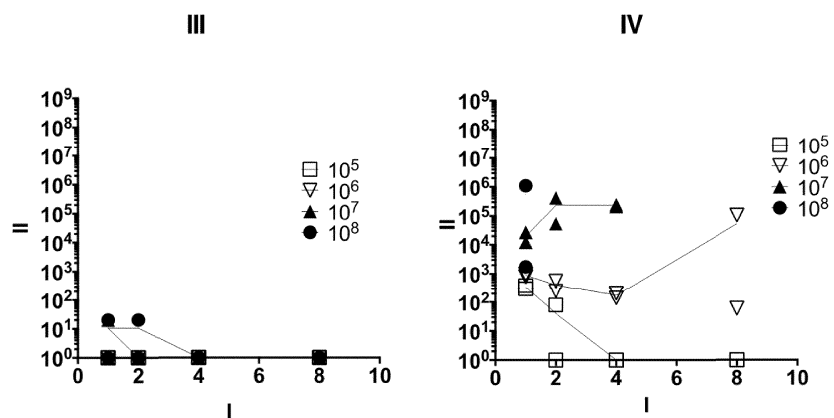
Фиг. 24



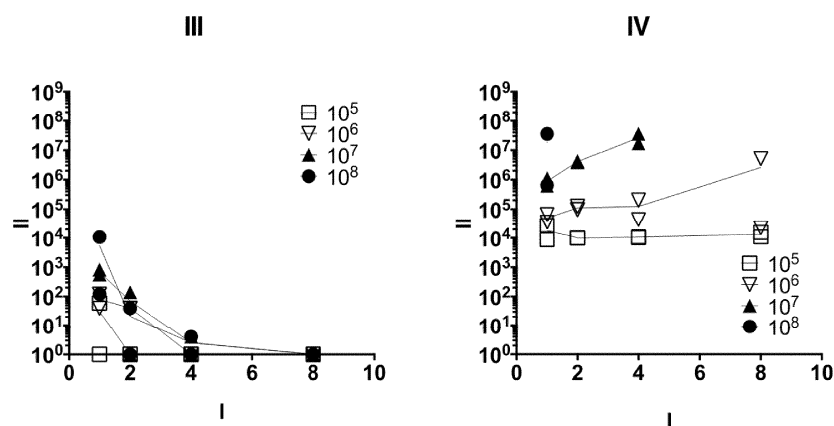
Фиг. 25



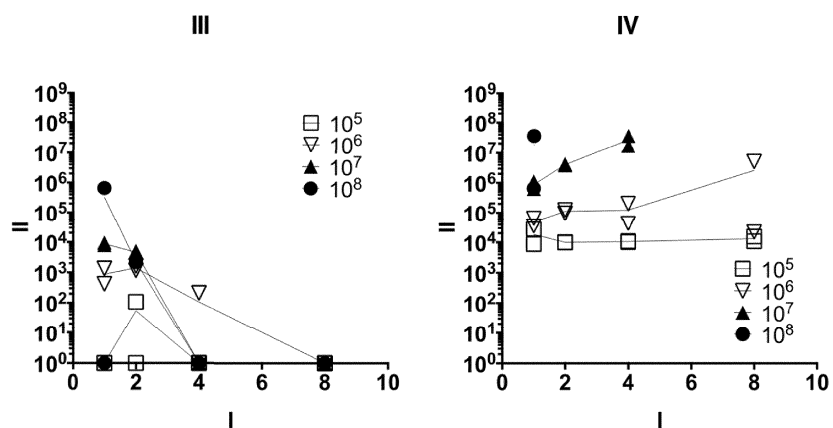
Фиг. 26



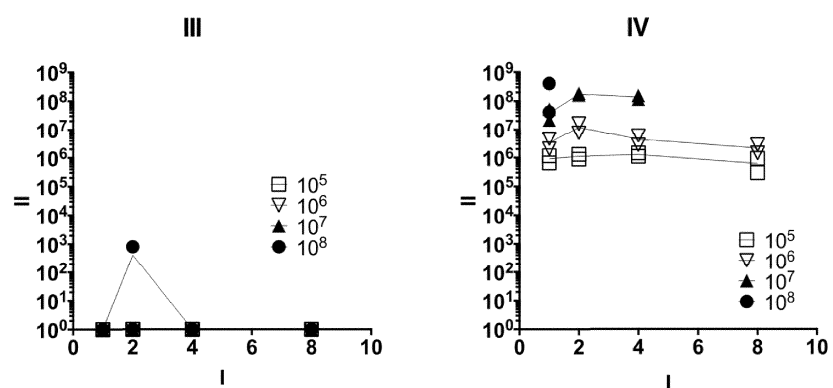
Фиг. 27



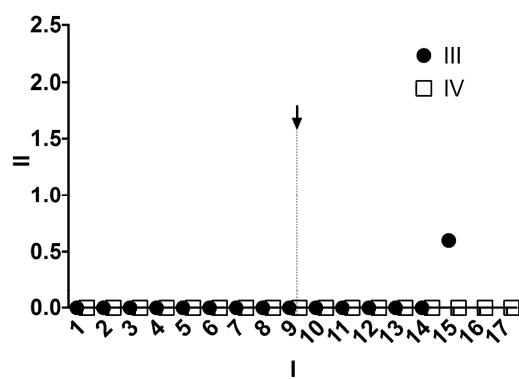
Фиг. 28



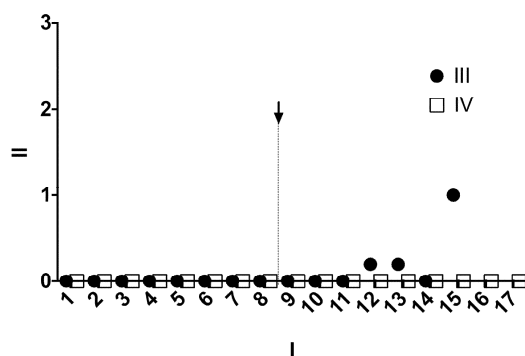
Фиг. 29



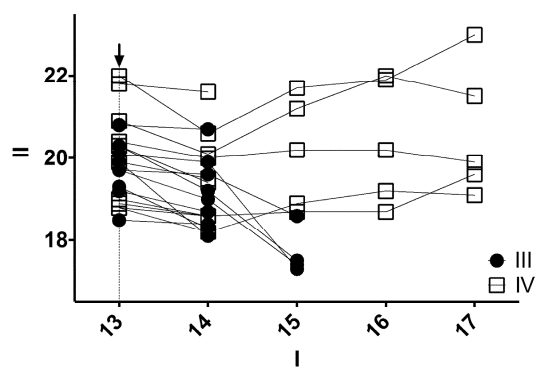
Фиг. 30



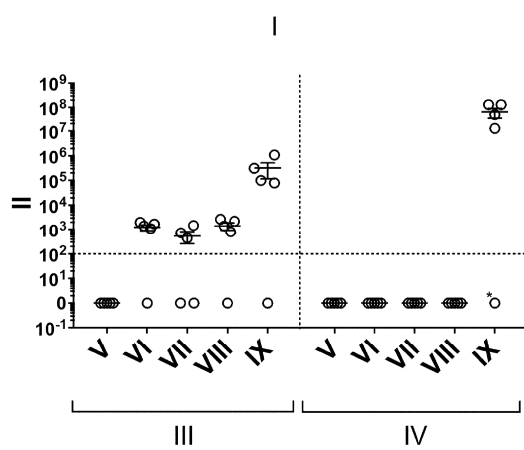
Фиг. 31



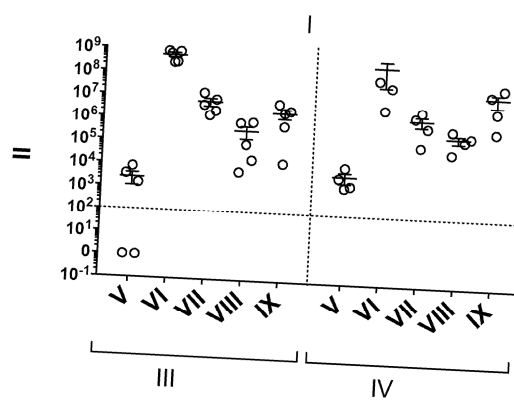
Фиг. 32



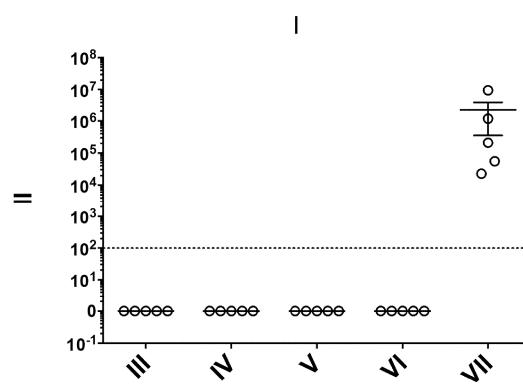
Фиг. 33



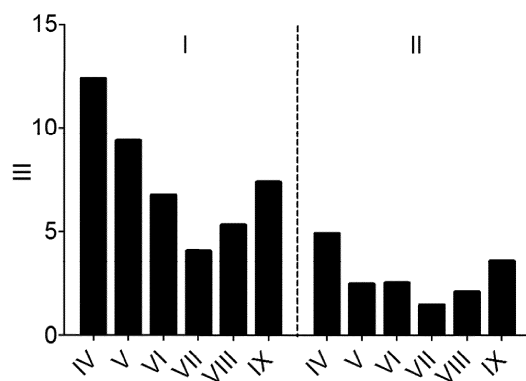
Фиг. 34



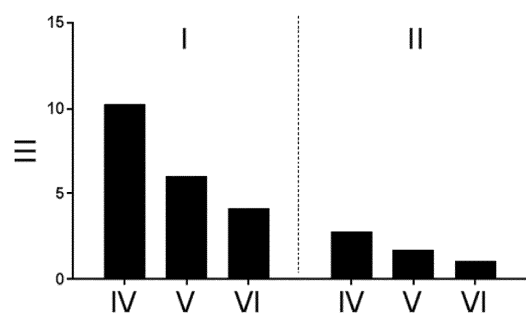
Фиг. 35



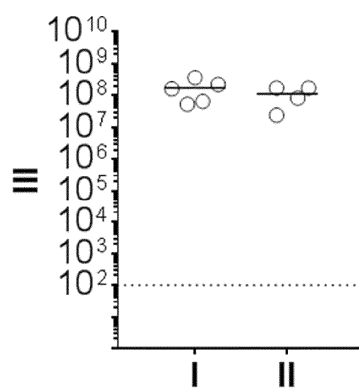
Фиг. 36



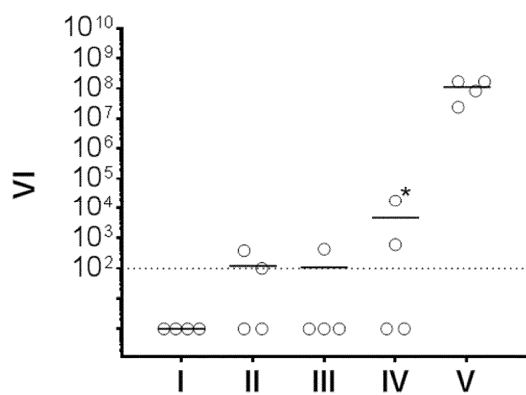
Фиг. 37



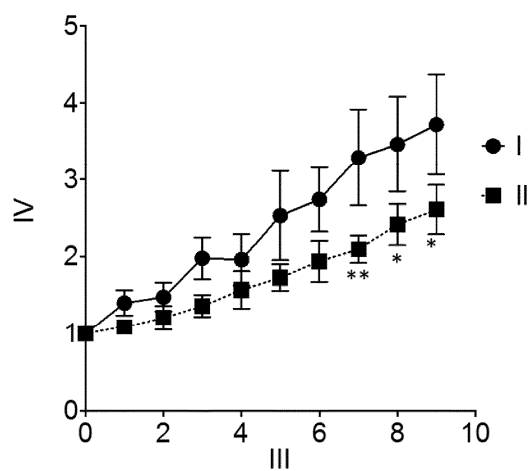
Фиг. 38



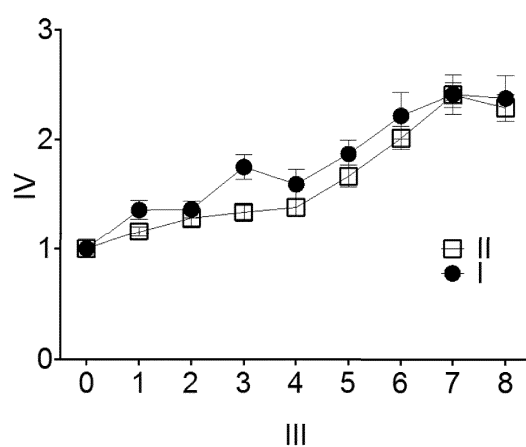
Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42

