

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202100009** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.26

(22) Дата подачи заявки
2019.07.11

(51) Int. Cl. *C12N 1/36* (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) СОЗДАННЫЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PCT/US2018/041713; 16/033,187;
62/789,983; 62/828,990

(32) 2018.07.11; 2018.07.11; 2019.01.08;
2019.04.03

(33) US

(86) PCT/US2019/041489

(87) WO 2020/014543 2020.01.16

(71) Заявитель:
ЭКТИМ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Тсанос Кристофер Д., Гликман Лаура
Хикс, Скобли Джустин, Ианнелло
Александр Чарльз Майкл (US)**

(74) Представитель:
Стояченко И.Л. (RU)

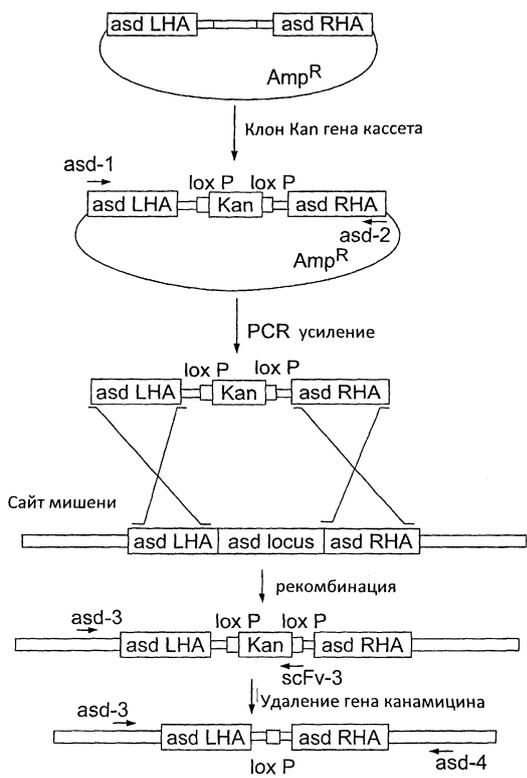
(57) Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые имеют усиленную колонизацию опухолей, микроокружения опухоли и/или резидентных иммунных клеток и повышенную противоопухолевую активность. Иммуностимулирующие бактерии модифицируют путем делеции генов, кодирующих флагеллы, или модификации генов, так что функциональные флагеллы не продуцируются, и/или модифицируются делецией *ragP* или модификацией *ragP* с получением неактивного продукта *ragP*. В результате иммуностимулирующие бактерии представляют собой флагеллин⁻ и/или *ragP*⁻. Иммуностимулирующие бактерии могут иметь дополнительные геномные модификации, так что бактерии аукомотрфны по аденозину или пурины. Бактерии могут быть одним или более из *asd*⁻, *purI*⁻ и *msbB*⁻. Иммуностимулирующие бактерии, такие как виды *Salmonella*, модифицируют для кодирования иммуностимулирующих белков, которые придают противоопухолевую активность в микроокружении опухоли, и/или модифицируют так, чтобы бактерии предпочтительно инфицировали иммунные клетки в микроокружении опухоли или в находящихся в опухоли иммунных клетках и/или индуцируют меньшую гибель клеток в иммунных клетках, чем в других клетках. Также предложены способы ингибирования роста или уменьшения объема солидной опухоли путем введения иммуностимулирующих бактерий.

A1

202100009

202100009

A1



СОЗДАНИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Связанные заявки

Приоритет заявлен в международной заявке No PCT/US2018/041713, поданной 11 июля 2018, и опубликованной как WO 2019/014398 17 января 2019, и в одновременно рассматриваемой заявке на патент США с регистрационным номером 16/033,187, поданной 11 июля 2018, и опубликованной как патентная публикация США № 2019/0017050 A1 от 17 января 2019, в каждой из которых является заявителем Actym Therapeutics, Inc., изобретатели Christopher D Thanos, Laura Nix Glickman, и Justin Skoble, каждая под названием "СОЗДАНИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ".

Приоритет также заявлен в предварительной заявке на патент США № 62/789,983, поданной 08 января 2019, заявитель Actym Therapeutics, Inc., изобретатели Christopher D Thanos, Laura Nix Glickman, Justin Skoble и Alexandre Charles Michel Iannello, названной "Созданные иммуностимулирующие бактериальные штаммы и их применение"

Приоритет также заявлен в предварительной заявке США № 62/828,990, поданной 03 апреля 2019 на имя заявителя Actym Therapeutics, Inc., авторы изобретения Christopher D Thanos, Laura Nix Glickman, Justin Skoble и Alexandre Charles Michel Iannello, под названием "Штаммы Salmonella typhimurium, созданные для колонизации опухолей и микроокружения опухолей".

Имуностимулирующие бактерии, представленные в каждой из этих заявок, могут быть модифицированы, как описано в настоящей заявке, и такие бактерии включены в настоящее описание в качестве ссылки. Где позволено, предмет каждой из этих заявок включен в настоящее описание посредством ссылки.

Введение путем ссылки списка последовательностей, предоставленного электронным способом

Содержание электронной версии списка последовательностей, поданной здесь, целиком включено в настоящую заявку посредством ссылки. Электронный файл был создан в 10 июля 2019, имел размер 457 килобайт и был назван I704SEQP.txt

Уровень техники

Область иммунотерапии рака связана с большими успехами, о чем свидетельствует клиническая успешность при использовании анти-CTLA4, анти-PD -1 И анти-PD-L1-иммунных контрольных антител (см. например, BuchbinderEtAl. (2015) J Clin. Invest. 125: 3377-3383; Hodi et al. (2010) N Engl. J Med. 363 (8): 7L 1-723; и Chen et al. (2015) J. Clin. Invest. 125: 3384-3391). Опухоли развивались в значительной степени иммуносупрессивной среде. Они инициируют множественные механизмы для предотвращения иммунного наблюдения, перепрограммируют противоопухолевые иммунные клетки для подавления иммунитета и непрерывно изменяют устойчивость к самой последней терапии рака (см. например, Mahoneyetal. (2015) Nat. Rev. DrugDiscov. 14 (8): 561 -584). Создание иммунотерапий, которые преодолевают иммунный ответ в то же время ограничивая аутоиммунно-связанные токсические эффекты современной иммунотерапии, является проблемой в области иммуноонкологии. Следовательно, необходимы дополнительные и новые способы иммунотерапии и другие способы лечения.

Сущность изобретения

Предложены бактерии, модифицированные таким образом, чтобы они были иммуностимулирующими для противораковой терапии. Иммуностимулирующие бактерии в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают многогранный подход к противоопухолевой терапии. Бактерии обеспечивают платформу, в которой имеются многочисленные пути для индуцирования противоопухолевой иммуностимулирующей активности. Как предусмотрено здесь, бактерии, такие как *Salmonella*, тонко настроены так, чтобы они обладали сильной противоопухолевой активностью за счет увеличения их способности накапливаться в или целевых опухолях, опухолерезидентных иммунных клетках и/или микроокружении опухоли (ТМЕ). Это достигается с помощью модификаций, которые, например, изменяют тип клеток, которые они могут инфицировать (тропизм), их токсичность, их способность выходить из иммунной системы, такой как комплемент, и/или среды, в которых они могут реплицироваться.

Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать, например, продукты, которые усиливают или вызывают иммунный ответ, и терапевтические продукты.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, благодаря их улучшенной колонизации опухолей, микроокружения опухоли и/или опухолерезидентных иммунных клеток и их устойчивости к комплементу и другим антибактериальным иммунным ответам, можно вводить системно.

Геномы предлагаемых здесь бактерий модифицируют для увеличения накопления в опухолях и в опухолерезидентных иммунных клетках, а также в микроокружении опухоли. Это осуществляется путем удаления или блокирования генов, ответственных за инфекцию или инвазию неопухолевых клеток, таких как эпителиальные клетки, и/или снижение цитопатогенности бактерий, в частности, к иммунным клеткам и опухолерезидентным иммунным клеткам.

Бактерии по своей природе стимулируют иммунную систему; бактериальная инфекция индуцирует иммунные и воспалительные пути и ответы, некоторые из которых желательны для противоопухолевой обработки, а другие являются нежелательными. Модификация бактерий путем делеции или модификации генов и продуктов, которые приводят к нежелательным воспалительным реакциям, и добавление или модифицирование генов и продуктов, которые индуцируют желаемые иммуностимулирующие противоопухолевые ответы, улучшает противоопухолевую активность бактерий.

Бактерии накапливаются в опухолевых клетках и тканях и реплицируются в них, могут лизировать клетки. Бактерии мигрируют из мест введения и могут накапливаться в других опухолях и опухолевых клетках для обеспечения эффекта абсцессного эффекта.

Представленные здесь бактерии модифицируют таким образом, чтобы они предпочтительно инфицировали и накапливались в опухолерезидентных иммунных клетках, опухолях и микроокружении опухоли.

Здесь все эти свойства бактерий используются для производства иммуностимулирующих бактерий с множеством противоопухолевых активностей и свойствами, которые могут действовать индивидуально и синергически.

Предложены композиции, их применение и способы, которые модулируют иммунные ответы для лечения заболеваний, включая лечение рака. Композиции содержат иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь. Также предложены способы лечения и применения бактерий для лечения. Субъекты для лечения включают в себя человека и другие приматы, домашних животных, таких как собаки и кошки, и других животных, таких как лошади.

Предлагаются фармацевтические композиции, содержащие иммуностимулирующие бактерии, и способы их применения для лечения заболеваний и нарушений, в частности пролиферативных нарушений, таких как опухоли, включая солидные опухоли и гематологические злокачественные заболевания.

Также предложены способы ингибирования роста или уменьшения объема твердой опухоли путем введения иммуностимулирующих бактерий или фармацевтических композиций или использования композиций для лечения. Например, предлагаются способы введения или использования композиции, которая содержит, для одной дозы, эффективное количество ослабленных видов *Salmonella* для субъекта, такого как человек, имеющего солидный рак опухоли. Понятно, что все модификации генома бактерий, такие как противоопухолевые терапевтические средства и другие модификации бактериального генома и описанных плазмид, можно комбинировать в любой желаемой комбинации.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые обеспечивают повышенную колонизацию в опухолях, микроокружении опухоли и/или резидентных иммунных клетках, и повышенную противоопухолевую активность. Иммуностимулирующие бактерии модифицируют путем делеции генов, кодирующих флагеллы, или модификации генов, так что не продуцируются функциональные флагеллы, и/или делеция *ragP* или модификация *ragP* для получения неактивного продукта *ragP*. В результате иммуностимулирующими бактериями являются флагеллин (*fliC/fljB*) и/или *ragP*. Альтернативно или дополнительно, иммуностимулирующими бактериями могут быть *ragP/msbB*.

Иммуностимулирующие бактерии могут представлять собой флагеллинодефицитные, например, полученные путем делеции или разрушения гена (*s*), кодирующего флагеллы. Например, предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат делеции в генах, кодирующих одну или обе субъединицы флагеллина *fliC*. Иммуностимулирующие бактерии также могут иметь делецию или модификацию в гене, кодирующем эндонуклеазу I (*endA*), посредством чего активность *endA* ингибируется или устраняется.

Иммуностимулирующие бактерии могут иметь дополнительные геномные модификации, такие что бактерии представляют собой ауксотрофины аденозина или пурина. Бактерии могут представлять собой один или более из *asdt*, *purl* и *msbB*. Иммуностимулирующие бактерии, такие как виды *Salmonella*, модифицируют для кодирования иммуностимулирующих белков, которые придают противоопухолевую активность в микроокружении опухоли и/или модифицируют таким образом, что бактерии предпочтительно инфицируют иммунные клетки в микроокружении опухоли или в находящихся в опухоли иммунных клетках, и/или приводят к меньшей гибели иммунных клетках, чем других клеток. Также предложены способы ингибирования роста или уменьшения объема твердой опухоли путем введения иммуностимулирующих бактерий.

Предложены способы повышения колонизации опухоли иммуностимулирующими бактериями, такими как *Salmonella*, путем модификации генома иммуностимулирующей бактерии в виде флагеллина (*fliC/fljB*) и/или *ragP*

Бактерии также содержат плазмиды, которые кодируют терапевтические продукты, такие как противораковые агенты, белки, которые повышают иммунный ответ субъекта, и ингибиторную РНК (РНКi). Например, плазмиды могут кодировать иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, которые повышают антираковую реакцию у субъекта. Бактерии содержат плазмиды, которые кодируют противораковые терапевтические средства, такие как РНК, включая микроРНК, shРНК и siRNA, и антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые предназначены для подавления, ингибирования, нарушения или иного выведения из действия генов и других мишеней, которые играют роль в иммуносупрессивных эффектах. Бактерии также могут кодировать опухолевые антигены и опухолевые неоантигены на плаزمидах, чтобы стимулировать иммунный ответ против опухолей. Кодированные белки экспрессируются под контролем промоторов, распознаваемых эукариотическими (млекопитающие и животные), или вирусными, промоторами.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, такой как противораковое терапевтическое средство; геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что она предпочтительно инфицирует расположенные в опухоли резидентные иммунные клетки и/или так, что она вызывает меньшую гибель расположенных в опухоли иммунных клеток.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиду, кодирующую продукт, как правило, терапевтический продукт, такой как противораковый терапевтический продукт, под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован, посредством чего бактерией является флагеллин (*fliC/fljR*) и/или *ragP*, и при этом бактерии дикого типа имеют флагеллы. Бактерии могут представлять собой один или оба флагеллина (*fliC/fljR*) и *ragR*. Эти иммуностимулирующие бактерии демонстрируют повышенную колонизацию опухолей, микроокружения опухоли и/или находящихся в опухоли иммунных клеток и обладают повышенной противоопухолевой активностью.

Среди этих иммуностимулирующих бактерий имеются такие, которые представляют собой флагеллин (*fliC/ fliB*), и в результате чего терапевтический продукт является

противораковым продуктом. В некоторых вариантах осуществления бактерии представляют собой флагеллин (fliC/fljB), и продукт представляет собой противораковый терапевтический белок или нуклеиновую кислоту.

Среди этих иммуностимулирующих бактерий имеются такие, в которых терапевтический продукт представляет собой полипептид-антагонист TGF-бета, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что он индуцирует меньшую гибель находящихся в опухоли иммунных клеток (снижает пироптоз), в результате чего иммуностимулирующая бактерия накапливается в опухолях или в микроокружении опухоли или в находящихся в опухолях иммунных клетках, чтобы тем самым доставить полипептид TGF-бета-антагониста в микроокружение опухоли. Антагонист TGF-бета может быть выбран из антитела против TGF-бета, антитела против TGF-бета-рецептора и растворимого полипептида-антагониста TGF-бета. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид-антагонист TGF-beta, может включать нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную последовательность для секреции кодированного полипептида, так что она высвобождается в опухолевые клетки, находящиеся в опухоли иммунные клетки и/или микроокружение опухоли.

В других вариантах осуществления любой из предлагаемых здесь иммуностимулирующих бактерий плазида кодирует иммуностимулирующий белок, который придает, усиливает или вносит вклад в противоопухолевую иммунную реакцию в микроокружении опухоли.

Примерами иммуностимулирующих белков, которые придают или вносят вклад в противоопухолевый иммунитет в микроокружении опухоли, является/являются одним или более из: IL -2, IL -7, IL -12p70 (IL -12p40 + IL -12p35) IL -15, IL -36 гамма, IL -2, который имеет ослабленное связывание с IL -2Ra, IL -15/IL-15R альфа-цепочечный комплекс, IL -18, IL -21, IL -23, IL -36 гамма, IL -2, модифицированный таким образом, что он не связывается с IL -2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые вовлечены в или которые действуют на или усиливают рекруттинг/устойчивость т-клеток, CD40, лиганд CD40 (CD40L), CD28, OX40, лиганд OX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB лиганд (4-1BBL), члены семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антагонисты полипептида TGF-бета и члены суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

В других вариантах осуществления предлагаемых в настоящем изобретении иммуностимулирующих бактерий терапевтический продукт представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Примерами таких антител являются Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), Fv, стабилизированный дисульфидом Fv (dsFv), нанотело, фрагмент ди-антитела или одноцепочечное антитело. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть приспособленными к человеку или человеческими. Примером антитела или его антигенсвязывающего фрагмента является антагонист PD -1, PD-L1, CTLA -4, VEGF, VEGFR2 или IL -6.

Иммуностимулирующие бактерии, описанные здесь, включая описанные выше, могут содержать плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора; геном иммуностимулирующей бактерии может быть модифицирован, посредством чего бактерия представляет собой *ragP/ msbB*, и может представлять собой флагеллин (*fliC/fljB*).

Примерами иммуностимулирующих бактерий являются бактерии, которые содержат плазмиду, кодирующую иммуностимулирующий белок, где: иммуностимулирующий белок, будучи экспрессированным в субъекте млекопитающего, придает или способствует иммунитету в микроокружении опухоли; иммуностимулирующий белок кодируется в плазмиде в бактериях под контролем эукариотического промотора; и геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки. В других вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии содержат последовательность нуклеотидов, кодирующих иммуностимулирующий белок, где иммуностимулирующий белок, будучи экспрессированным в млекопитающем, придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли; иммуностимулирующий белок кодируется в плазмиде в бактериях под контролем эукариотического промотора; и геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что он индуцирует меньшую гибель находящихся в опухоли иммунных клеток.

Примеры иммуностимулирующих белков включают цитокины и хемокины и другие иммуностимулирующие белки, такие как, например, один или более из: IL -2, IL -7, IL -12p70 (IL -12p40 + IL -12 p35), IL -15, IL-36гамма, IL -2, который обладает ослабленным связыванием с IL -2 α , IL -15/IL -15R- альфа-цепочечным комплексом, IL -18, IL -21, IL -23, IL -36гамма, IL -2, модифицированный таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые вовлечены в действие или усиливают

рекрутмент/устойчивость Т-клеток, CD40, CD40-лиганда, CD28, OX40, OX40 лиганда, 4-1BB, 4-1BB лиганда, члены семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антагонисты полипептида TGF-бета и члены суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

Эти иммуностимулирующие бактерии могут включать модификацию (ии) геномов иммуностимулирующих бактерий таким образом, что бактерии проявляют один или оба из, эффектов: предпочтительное инфицирование находящихся в опухоли иммунных клеток, и индуцирование меньшей гибели находящихся в опухоли иммунных клеток. Иммуностимулирующие бактерии также могут включать мутацию в геноме, которая снижает токсичность или инфекционность неиммунных клеток.

Модификации бактериального генома включают в себя *pagP*, или *pagP*, и флагеллин (*fliC/fliB*). В других вариантах осуществления иммуностимулирующими бактериями является одна или более из *purI* (*purM*), *msbB*⁻, *purD*⁻, флагеллин (*fliC/fliB*⁻), *pagP*⁻, *adrA*⁻, *CsgD*⁻, *QseC*⁻, и *hilA*⁻, такие как флагеллин (*fliC/fliB*⁻)/*pagP*⁻/*msbB*⁻/*purI*, или флагеллин (*fliC/fliB*⁻)/*pagP*⁻/*msbB*⁻/*purI*/*hilA*⁻. В других вариантах осуществления иммуностимулирующими бактериями являются *hilA* и/или флагеллин (*fliC/fliB*), или *pagP*, или *pagP*/*msbB*, или иммуностимулирующими бактериями являются *hilA* или иммуностимулирующими бактериями являются флагеллин (*fliC/fliB*) и *pagP*.

Модификации генома, среди прочих свойств, могут повышать нацеливание или колонизацию микроокружения опухоли и/или находящихся в опухоли иммунных клеток и/или сделать бактерии, по существу, или полностью устойчивыми к инактивации комплементом. Эти свойства улучшают применение бактерий в качестве терапевтических средств и обеспечивают системное введение.

В предлагаемых здесь иммуностимулирующих бактериях нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический продукт, функционально связана для экспрессии с нуклеиновой кислотой, кодирующей секреторный сигнал, посредством чего при экспрессии в хозяине иммуностимулирующий белок секретируется. Терапевтический продукт может представлять собой белок, такой как иммуностимулирующий белок, или нуклеиновую кислоту, такую как кассета CRISPR или RNAi.

Во всех вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии могут быть ауксотрофными для аденозина, или для аденозина и аденина. Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, могут включать модификации в геноме, при этом бактерия предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или

геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он индуцирует меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках (снижает пироптоз), в результате чего иммуностимулирующие бактерии накапливаются в опухолях или в микроокружении опухоли или в находящихся в опухоли иммунных клетках, и тем самым доставляют кодируемый терапевтический продукт.

В иммуностимулирующих бактериях плазида кодирует терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора так, что он экспрессируется в эукариотическом хозяине, таком как человек или другое млекопитающее. Терапевтический продукт обычно представляет собой противораковое терапевтическое средство, такое как противораковый терапевтический белок, который стимулирует иммунную систему хозяина. Другие терапевтические продукты включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты и нуклеиновые кислоты, такие как RNAi. Эти продукты могут быть сконструированы таким образом, чтобы ингибировать, подавлять или нарушать мишень, такую как иммунная контрольная точка и другие такие мишени, которые нарушают способность иммунной системы субъекта распознавать опухолевые клетки.

Немодифицированные иммуностимулирующие бактерии могут представлять собой штамм дикого типа или ослабленный штамм. Модификации генома, представленные и описанные здесь, ослабляют бактерии вне микроокружения опухоли или опухолей; модификации, среди прочих свойств, изменяют инфекционность бактерий. Примерами бактерий, которые могут быть модифицированы, как описано здесь, являются *Salmonella*, такие как штамм *Salmonellatyphimurium*. Примерами штаммов *Salmonellatyphimurium* являются ослабленные штаммы и штаммы дикого типа, такие как, например, штаммы *Salmonellatyphimurium*, происходящие из штаммов, обозначенных как AST -100, VNP20009, YS1646 (ATCC # 202165), RE88, SL7207, x8429, x8431, x8468 или штамм дикого типа с номером доступа ATCC 14028.

Как обсуждалось выше, предложены иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиду, кодирующую продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован, посредством чего бактерия представляет собой *pagP/msbB*. Делеция *msbB* изменяет ацильный состав липида в а домене липополисахарида (LPS), основной компонент наружных мембран грамотрицательных бактерий, так что бактерии в основном продуцируют пентаацилированный LPS вместо более токсичного и провоспалительного гексаацилированного LPS. В *Styphimurium* дикого типа экспрессия *pagP* приводит к гептаацилированным липидам А, в то время как в мутанте *msbB* индукция *pagP* приводит к

получению гекса-ацилированного LPS. Таким образом, мутант *ragP/msbB* продуцирует только пента-ацилированный LPS, что приводит к более низкой индукции провоспалительных цитокинов и повышенной переносимости, это обеспечивает более высокую дозировку у человека. Более высокие дозы приводят к повышенной колонизации опухолей, находящихся в опухоли иммунных клеток и микроокружения опухоли. Вследствие возникающего изменения в бактериальных мембранах и структуре иммунный ответ хозяина, такой как активность комплемента, изменяется так, что бактерии не удаляются при системном введении. Например, здесь показано, что мутантные штаммы *ragP/msbB* обладают повышенной устойчивостью к инактивации комплемента и повышенной стабильностью в сыворотке человека. Эти бактерии также могут представлять собой флагеллин (*fliC/fljB*), который дополнительно повышает переносимость, устойчивость к инактивации комплемента. Бактерии также могут содержать другие модификации, как описано здесь, включая модификации, которые изменяют клетки, которые они могут инфицировать, приводя к накоплению в микроокружении опухоли, опухолях и находящихся в опухоли иммунных клетках. Следовательно, иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, могут вводиться системно и проявлять высокий уровень роста опухоли, микроокружения опухоли и/или колонизации находящихся в опухоли иммунных клеток. Иммуностимулирующими бактериями могут быть *purI* (*purM*) и один или более из *asd*, *msbB* и один или оба флагеллина (*fliC/fljB*) и *ragP*.

Иммуностимулирующие бактерии могут быть такими, что в силу разрушения или делеции всех или части эндогенного гена, кодирующего аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*), эндогенный *asd* не экспрессируется. Эти иммуностимулирующие бактерии могут быть модифицированы для кодирования аспартат-полуальдегиддегидрогеназы (*asd*) на плазмиде под контролем бактериального промотора, так что бактерии могут продуцироваться *in vitro*.

Иммуностимулирующие бактерии могут быть сделаны ауксотрофными для конкретных питательных веществ, которые богаты или которые накапливаются в микроокружении опухоли, таких как аденозин и аденин. Кроме того, они могут быть модифицированы так, чтобы они были ауксотрофными для таких питательных веществ для уменьшения или исключения их способности реплицироваться. Инактивированные/делетированные гены бактериального генома могут быть дополнены путем снабжения их плазмидой под контролем промоторов, распознаваемых хозяином.

Продукты, кодируемые на плаزمидах для экспрессии в эукариотической клетке, такой как человек, хозяин, находятся под контролем эукариотических регуляторных последовательностей, включая эукариотические промоторы, такие как промоторы, распознаваемые РНК-полимеразой II или III. Они включают промоторы РНК-полимеразы II млекопитающих. Также могут быть использованы вирусные промоторы. Примеры вирусных промоторов включают, но не ограничиваясь ими, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор вируса Эпштейна-Барра (EBV), промотор вируса герпеса и промотор аденовируса. Другие промоторы РНК-полимеразы II включают, но не ограничиваясь ими, промотор фактора удлинения -1 (EF1), промотор Ubc (лентивирус), промотор PGK (3-фосфоглицераткиназы) и синтетический промотор, такой как промотор CAGG (или CAG). Синтетический CAG-промотор содержит энхансер (C) цитомегаловируса (CMV); промотор, первый экзон и первый интрон гена бета-актина цыпленка (A); и акцептор сплайсинга гена бета-глобина кролика (G). Могут быть использованы другие сильные регулируемые или конститутивные промоторы. Регуляторные последовательности также включают терминаторы, энхансеры и секреторные и другие транспортные сигналы.

Плазмиды, включенные в иммуностимулирующие бактерии, могут присутствовать в небольшом количестве копий или в среднем количестве копий, таком как выбор источника репликации, который приводит к получению числа копий от среднего до низкого, такого как начало репликации с низким копированием. Здесь показано, что противоопухолевая активность и другие свойства бактерий улучшаются, когда плаزمид присутствует в количестве от низкого до среднего, где среднее число копий составляет менее чем 150 или менее чем приблизительно 150 и более чем 20 или приблизительно 20, или от 20 до 25 и 150 копий, и низкое число копий составляет менее чем 25 или менее чем 20 или менее чем приблизительно 25 или менее чем приблизительно 20 копий.

Эти иммуностимулирующие бактерии могут быть модифицированы таким образом, что бактерии предпочтительно инфицируют не находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующих бактерий может быть модифицирован таким образом, что они индуцируют меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках (снижают пироптоз), в результате чего иммуностимулирующие бактерии накапливаются в опухолях или в микроокружении опухоли или в находящихся в опухоли иммунных клетках.

Как обсуждалось выше, геном иммуностимулирующих бактерий также модифицирован так, что бактерии предпочтительно инфицируют иммунные клетки, такие как

ненаходящиеся в опухоли иммунные клетки, такие как миелоидные клетки, такие как клетки, которые являются CD45 +, и/или геном модифицирован так, чтобы бактерии индуцировали меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках (уменьшенном пироптозе), чем немодифицированные бактерии. В результате, иммуностимулирующие бактерии накапливаются или накапливаются в большей степени, чем таковые без модификаций, в опухолях или в микроокружении опухоли или в находящихся в опухоли иммунных клетках, чтобы тем самым доставлять терапевтический продукт или продукты, кодируемые на плазмиде. Бактерии могут представлять собой один или несколько из: флагеллина (*fliC/fljB*), *ragP_imsbB* и могут включать другие такие модификации, как описано в настоящей заявке. Бактерии могут быть ауксотрофными в отношении аденозина и/или *purI* (*purM*) и/или *asd*.

Имуностимулирующие бактерии, представленные здесь, могут включать модификацию бактериального генома, при этом бактерии индуцируют меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках; и/или модификацию бактериального генома, в результате чего бактерии накапливаются более эффективно в опухолях, микроокружении опухоли или в находящихся в опухоли иммунных клетках, таких как клетки CD45+ , миелоидные клетки.

Например, иммуностимулирующие бактерии могут включать делеции или модификации одного или более генов или оперонов, вовлеченных в SPI-1 инвазию (и/или SPI -2), посредством этого иммуностимулирующие бактерии не внедряются или инфицируют эпителиальные клетки. Примерами генов, которые могут быть делетированы или инактивированы, являются один или более из *avrA*, *hilA*, *hilD*, *invA*, *invB*, *invC*, *invE*, *invF*, *invG*, *invH*, *invI*, *invJ*, *iacP*, *iagB*, *spaO*, *spaP*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*, *orgA*, *orgB*, *orgC*, *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *sicA*, *sicP*, *sipA*, *sipB*, *sipC*, *sipD*, *sirC*, *sopB*, *sopD*, *sopE*, *sopE2*, *sprB*, and *sptP*. Исключение способности инфицировать эпителиальные клетки также может быть достигнуто методами инженерии, чтобы иммуностимулирующие бактерии содержали выключение или делеции генов, кодирующих белки, вовлеченные в SPI-1-независимую инвазию, такую как один или несколько генов, выбранных из *rck*, *ragN*, *hlyE*, *pefI*, *srgD*, *srgA*, *srgB* и *srgC*. Подобным образом, иммуностимулирующие бактерии могут включать делеции в генах и/или оперонах в SPI -2, например, для того, чтобы сконструировать бактерии для выхода из *Salmonella*-содержащей вакуоли (SCV). Эти гены включают, например, *sifA*, *sseJsseL*, *sopD2*, *pigB2*, *sseF*, *sseG*, *spvB* и *steA*.

Имуностимулирующие бактерии, предложенные здесь, также могут содержать последовательности нуклеотидов, кодирующих иммуностимулирующие белки, которые

при экспрессии в млекопитающее, создают или вносят вклад в иммунитет в микроокружение опухоли; иммуностимулирующие белки кодируются в плазмиде бактерии под контролем эукариотического промотера. В качестве примеров промотера можно указать, но не ограничиваясь этим, фактор-1 (EF1) альфа промотер, или UbСпромотер, или PGKпромотер, orCAGGилиCAGпромотеры.

Кроме того, геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что она преимущественно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки. Это достигается выключением или делецией бактериальных генов, которые играют роль в инвазии или неэффективности бактерии и/или в приведении клетки к гибели. Бактерии модифицированы так, что они преимущественно инфицируют находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или приводят к гибели меньшего числа находящихся в опухоли иммунных клеток, чем других клеток, которые бактерия может инфицировать, в сравнении с немодифицированными бактериями.

Имуностимулирующие бактерии могут также кодировать терапевтический продукт, такой как ингибиторная ДНК (ДНКi), иммуностимулирующие белки такие как цитокины, хемокины и ко-стимулирующие молекулы, другие белки, которые увеличивают иммунный ответ субъекта, и другие противораковые агенты, которые при экспрессии в млекопитающее, вызывают или вносят вклад в противораковую активность или иммунитет. Терапевтические продукты кодируются в плазмиде бактерии под контролем эукариотического промотера. Геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что он приводит к меньшей гибели находящихся в опухоли иммунных клеток. Плазида в основном присутствует в малом или среднем количестве копий.

Также предложены иммуностимулирующие бактерии, которые кодируют иммуностимулирующий белок на плазмиде в бактериях под контролем эукариотического промотера, который, будучи экспрессированным у млекопитающего, придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли. Иммуностимулирующие бактерии могут быть модифицированы так, чтобы они имели пониженную патогенность, в результате чего инфицирование эпителиальных и/или других неиммунных клеток уменьшается относительно бактерий без модификации. Они включают модификацию системы секреции типа 3 (T3SS) или системы секреции типа 4 (T4SS), такую как модификация SPI-1 Salmonella, как описано и приведено в качестве примера здесь. Кроме того, бактерии могут быть модифицированы для достижения меньшей гибели клеток, например, путем делеции или разрушения нуклеиновой кислоты,

кодирующей липид А пальмитоилтрансферазу (*pagP*), что снижает вирулентность бактерий.

Геном иммуностимулирующих бактерий, предложенных здесь, может быть модифицирован для увеличения или стимулирования инфицирования иммунных клеток, в частности, иммунных клеток в микроокружении опухоли, таких как фагоцитарные клетки. Это включает понижение инфекции неиммунных клеток, таких как эпителиальные клетки, или увеличение инфекции иммунных клеток. Бактерии также могут быть модифицированы для снижения пироптоза в иммунных клетках. Многочисленные модификации бактериального генома могут привести к увеличению инфекции иммунных клеток и уменьшения пироптоза или к обоим эффектам. Иммуностимулирующие бактерии, предложенные здесь, включают такие модификации, например делеции и/или нарушения генов, вовлеченных в путь SPI-1 T3SS, такие как нарушение или делеция *hilA*, и/или нарушение/делеция генов, кодирующих флагеллин, стержневой белок (*PrgJ*), игольчатый белок (*PrgI*) и *QseC*

Иммуностимулирующими бактериями могут быть один или более из *purI* (*purM*), *msbB*, *purD*, флагеллин (*fliC/fliB*), *pagP*, *adrA*, *CsgD*, *QseC*, и *hilA*, и в особенности флагеллин (*fliC/fliB*) и/или *pagP*, и/или *msbB/pagP*. Например,

иммуностимулирующие бактерии могут включать мутации в геноме, такие как делеции или нарушения гена, которые снижают токсичность или инфекционность неиммунных клеток в хозяине. Например, иммуностимулирующими бактериями могут быть *pagP*. В качестве другого примера иммуностимулирующими бактериями могут быть *hilA* и/или флагеллин (*fliC/fliB*), а также может быть *pagP*. Так, например, иммуностимулирующие бактерии могут кодировать иммуностимулирующий белок, такой как цитокин, и бактерии могут быть модифицированы таким образом, что они аккумулируют и экспрессируют цитокин в микроокружении опухоли (ТМЕ), тем самым доставляя иммунотерапевтический противоопухолевый продукт в среду, в которой он обладает полезной активностью, и избегая вредных или токсических побочных эффектов от экспрессии в других клетках/средах. Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок может быть оперативно связана для экспрессии с нуклеиновой кислотой, кодирующей секреторный сигнал, посредством чего при экспрессии в хозяине иммуностимулирующий белок секретируется в микроокружение опухоли.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, включают любой из штаммов и бактерий, описанных в одновременно рассматриваемой заявке На Патент США № 16/033,187, или опубликованной международной заявке PCT/US2018/041713 (опубликованной как WO 2019/014398), дополнительно модифицированными для экспрессии иммуностимулирующего белка и/или для преимущественного инфицирования и/или для того, чтобы быть менее токсичными в иммунных клетках в микроокружении опухоли или в находящихся в опухоли иммунных клетках, как описано и приведено в примерах в настоящей заявке.

Иммуностимулирующие бактерии могут представлять собой аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (asd), такую что в силу разрушения или делеции всего или части эндогенного гена, кодирующего аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (asd), эндогенный asd не экспрессируется. Иммуностимулирующие бактерии могут быть модифицированы для кодирования аспартат-полуальдегиддегидрогеназы (asd) на плазмиде под контролем бактериального промотора для выращивания бактерий *in vitro*, так что бактерии будут иметь ограниченную репликацию *in vivo*.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, могут кодировать в плазмиде иммуностимулирующий белок в качестве терапевтического продукта.

Иммуностимулирующий белок может быть цитокином, таким как хемокин, или ко-стимулирующей молекулой. Примерами иммуностимулирующих белков являются IL -2, IL -7, IL -12 p70 (IL -12 p40 + IL -12 p35), IL -15, IL -15/IL -15R альфа-цепочечный комплекс, IL -36 гамма, IL -18, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые вовлечены в или которые воздействуют или усиливают рекрутмент/устойчивость Т-клеток, CD40, лиганд CD40 (CD40L), OX40, лиганд OX40, (OX40L), 4-1 BB, 4-1 BB лиганд (4-1 BBL), члены семейства B7-CD28, и члены суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли (TNFR).

Иммуностимулирующие бактерии могут включать последовательность нуклеотидов, кодирующих ингибиторную РНК (РНКi), которая ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию иммунной контрольной точки. РНКi может быть закодирована на плазмиде в бактериях. Нуклеотиды, кодирующие иммуностимулирующий белок, например RNAi, могут быть на плазмиде, присутствующей в количестве от низкого до среднего.

Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать терапевтические продукты, такие как РНКi или кассета CRISPR, которая ингибирует, подавляет или нарушает

экспрессию иммунной контрольной точки или другой мишени, ингибирование, супрессия или разрушение увеличивает антиопухолевый иммунный ответ у субъекта; РНКi или кассета CRISPR кодируется в плазмиде в бактериях. Другие терапевтические продукты включают, например, антитела, которые связываются с иммунными контрольными точками для ингибирования их активности.

РНКi включает Все формы двуцепочечной РНК, которая может Быть использована для подавления экспрессии целевых нуклеиновых кислот. РНКi включает shРНК, siРНК и микроРНК (миРНК). Любые из этих форм могут быть взаимозаменяемы в вариантах осуществления, описанных и описанных в настоящей заявке. Обычно РНКi кодируется в плазмиде в бактериях. Эти плазмиды могут включать другие гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют интересующие продукты, которые модулируют или вносят активность или продукты в бактерию, или другие такие продукты, которые могут модулировать иммунную систему субъекта, подлежащего лечению бактериями. Бактериальные гены также могут быть добавлены, удалены или разрушены. Эти гены могут кодировать продукты для роста и размножения бактерий или продуктов, которые также модулируют иммунный ответ хозяина на бактерии.

Иммностимулирующие бактерии, представленные здесь, также могут быть аукоотрофными для аденозина, или для аденозина и аденина.

Виды бактерий для модификации, несущие плазмиды, включают, но не ограничиваются ими, например, штаммы *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *E coli* и *Bifidobacterium*. Например, виды включают *ShigellaSonnei*, *ShigellaFlexneri*, *ShigellaDysenteriae*, *Listeriamonocytogenes*, *Salmonellatyphi*, *SalmonellaTyphimurium*, *Salmonellagallinarum* И *Salmonellaenteritidis*

Виды включают, например, штаммы *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Bifidobacteriae*, *Rickettsia*, *Vibrio*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Cholera*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bacillus*, and *Erysipelothrix*, или их ослабленный штамм или модифицированный штамм из любого из предшествующих списков бактериальных штаммов.

Другие подходящие виды бактерий включают *Rickettsia*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Franciesella*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Vibrio*, *Bacillus*, and *Erysipelothrix*. For example, *Rickettsia Rickettsiae*, *Rickettsia prowazekii*,

Rickettsia tsutsugamuchi, *Rickettsia mooseri*, *Rickettsia sibirica*, *Bordetella bronchiseptica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Francisella tularensis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Citrobacter freundii*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus sordani*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium intracellulare*, *Legionella pneumophila*, *Rhodococcus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter mustelae*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Yersinia enterocolitica*, *Rochalimaea quintana*, и *Agrobacterium tumefaciens*.

Примерами *Salmonella* являются, в частности, штаммы *Salmonella typhimurium*. *Salmonella* могут быть видами дикого типа или ослабленными видами. Примерами некоторых ослабленных видов являются штаммы, обозначенные как YS1646 (ATCC # 202165) или VNP20009. Другие штаммы включают в себя, RE88, SL7207, x8429, x8431 и x8468.

Примеры видов дикого типа или неослабленных видов включают, например, штамм дикого типа, депонированный в ATCC 14028, или штамм, имеющий все идентифицирующие характеристики ATCC 14028. Модификации здесь ослабляют любой штамм путем ограничения клеток, которые бактерии могут инфицировать или в которых они могут реплицироваться.

Эти штаммы могут быть дополнительно модифицированы для того, чтобы кодировать иммуностимулирующие белки и/или иммуномодулирующие белки. Например, иммуностимулирующие бактерии могут кодировать иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, которые повышают иммунный ответ в микроокружении опухоли. Иммуностимулирующие бактерии также могут быть модифицированы для преимущественного инфицирования иммунных клеток в микроокружении опухоли или для инфицирования находящихся в опухоли иммунных клеток и/или для обеспечения меньшей гибели иммунных клеток, как описано в настоящей заявке. Их последовательности и характеристики представлены в подробном описании, примерах и листинге последовательностей. Иммуностимулирующие бактерии могут быть получены из ослабленных штаммов бактерий, или они становятся ослабленными благодаря модификациям, описанным здесь, таким как делеция *asd*, посредством чего репликация ограничена *in vivo*.

Следует понимать, что примеры, в которых бактериальные гены модифицированы и упоминались здесь, упоминаются в отношении их обозначения (названия) в видах *Salmonella*, которые являются примерами бактерий, из которых могут быть получены

иммуностимулирующие бактерии. Специалист в данной области знает, что другие виды имеют соответствующие белки, но их обозначение или название может отличаться от названия в *Salmonella*. Общее описание здесь, однако, может быть применено и к другим видам бактерий. Например, как показано здесь, делеция или инактивация флагеллина (*fljC/fljB*) в *Salmonella* и/или *ragP* приводит к повышенной колонизации опухолей. Аналогичные гены, кодирующие *flagella*, или аналогичные функции для инфекции, могут быть модифицированы в других бактериальных видах для достижения повышенной колонизации опухоли. Аналогичным образом, инактивация/делеция бактериальных продуктов, таких как продукты *ragP* и/или *msbB*, как описано здесь, может снижать активацию комплемента и/или другие воспалительные ответы, тем самым увеличивая нацеливание на опухоли, резидентные иммунные клетки и микроокружение опухоли. Соответствующие гены в других видах, которые вовлечены в активацию комплемента или другого воспалительного пути, могут быть удалены, как описано здесь для *Salmonella*.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, кодируют ингибиторы различных генов, которые снижают противоопухолевый иммунный ответ, и/или экспрессируют гены и/или продукты генов, которые вносят вклад в противоопухолевый иммунный ответ и/или продукты, которые стимулируют иммунную систему, такие как иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, и, таким образом, являются иммуностимулирующими.

Ауксотрофия аденозина является иммуностимулирующей. Другими терапевтическими продуктами, которые могут быть кодированы на плазмидах, являются нуклеиновые кислоты, такие как ингибирующая РНК (РНКi), такая как ShРНК или микроРНК или siРНК, направленная на разрыв или ингибирование экспрессии *TREX1*, *PD-L1*, *VISTA* (ген, кодирующий V-Домен Ig-супрессор т-клеточной активации), *TGF-бета* и *CTNNB1* (ген, который кодирует *beta*-катенин), среди прочих, их комбинации и их комбинации с любыми РНКi, которые ингибируют, подавляют или нарушают экспрессию других иммуносупрессивных генов, экспрессия которых активируется или усиливается опухолями или микроокружением опухоли (ТМЕ).

Экспрессия этих РНК использует два независимых иммуностимулирующих пути и приводит к усилению колонизации опухоли в одном процессе терапии. Влияние этой комбинации усиливаются описанными здесь штаммами, которые являются ауксотрофными по отношению к аденозину, что обеспечивает преимущественное накопление или рекрутмент в иммуносупрессорных микроокружениях опухолей, богатых аденозином. Снижение уровня аденозина в таких ТМЕ дополнительно усиливает

иммуностимулирующие эффекты. Такие комбинации признаков в любом из известных бактериальных штаммов или которые могут быть сконструированы для терапевтического введения, обеспечивают сходные иммуностимулирующие эффекты.

Среди мишеней TGF-бета, имеются три изоформы: 1, 2 и 3, при этом отмечаем, в частности изоформу 1, а не изоформы 2 и 3. Токсичность связана с ингибированием изоформ 2 и 3. Например, токсичность сердечного клапана связана с ингибированием изоформы 2. Изоформа 1 присутствует в большинстве случаев рака (см. например базу данных TCGA). Предпочтительно ингибировать только изоформу 1. Для этой цели можно выгодно использовать РНКi, поскольку она может быть сконструирована таким образом, чтобы очень специфически распознавать мишень. Для TGF-бета специфическое ингибирование изоформы 1 может быть осуществлено путем применения последовательности, уникальной для изоформы 1, которая не присутствует в изоформах 2 или 3, или путем выбора последовательности для целевых изоформ 1 и 3, а не 2. Также предложены иммуностимулирующие бактерии, в которых плазида кодирует shРНК или микроРНК, которая специфически ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию изоформы 1 TGF-бета, но не изоформы 2 TGF-бета или изоформы TGF-бета 3; или плазида кодирует shРНК или микроРНК, которая специфически ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию изоформ TGF-бета 1 и 3, но не изоформы 2

Опосредованное РНК-или shРНК- разрушение гена PD-L1 иммуностимулирующими бактериями, предусмотренными здесь, также улучшает колонизацию опухолей, TME и/или находящихся в опухоли иммунных клеток. Показано, что выведение PD-L1 усиливает инфекцию *S typhimurium*. Например, наблюдали, по меньшей мере, в 10 раз более высокое бактериальное заражение у мышей с выведением PD-L1, чем у мышей дикого типа, что говорит о том, что PD-L1 является защитой против инфекции *S typhimurium* (См. например, Leeelal. (2010) *Immunol.* 185: 2442-2449)

Сконструированные (созданные) иммуностимулирующие бактерии, такие как иммуностимулирующие бактерии *S.typhimurium*, представленные здесь, позволяют множество синергических воздействий для индукции иммунной реактивации холодных опухолей для стимулирования специфичных к опухолевым антигенам иммунных ответов, в то же время ингибируя пути иммунной контрольной точки, в которых опухоль использует для подавления и предотвращения длительного противоопухолевого иммунитета. В варианты осуществления включены аденозинауксотрофия и усиленное разрушение сосудов. Это улучшение нацеливания на опухоли через аденозинауксотрофию и усиленное разрушение сосудов повышает эффективность, в то же

время локализуя воспаление для ограничения системного воздействия цитокинов и аутоиммунной токсичности, наблюдаемых при других методах иммунотерапии.

Гетерологичные терапевтические белки и другие продукты, такие как иммуностимулирующие белки, антитела и РНК, экспрессируются на плаزمиде под контролем промоторов, которые распознаются механизмом транскрипции эукариотических клеток-хозяина, таким как РНК-полимераза II (RNAP II) и промоторы РНК-полимеразы III (RNAP III). Промоторы RNAP III обычно экспрессируются конститутивно в эукариотическом хозяине; промоторы RNAP II могут регулироваться. Терапевтические продукты кодируются на плазмиде, стабильно экспрессируемых бактериями. Примерами таких бактерий являются штаммы *Salmonella*, обычно ослабленные штаммы, либо ослабленные путем пассажа, либо другими способами, либо благодаря модификациям, описанным здесь, такие как аденозинауксотрофия. Примерами штаммов *Salmonella* являются модифицированные штаммы *S typhimurium*, которые имеют дефектный ген *asd*. Эти бактерии могут быть модифицированы так, чтобы они включали в себя функциональный ген *asd* на введенной плазмиде; это поддерживает выбор плазмиды, так что не требуется система поддержки/селекции плазмиды на основе антибиотика. Дефектные штаммы *asd*, которые не содержат функциональный ген *asd* на плазмиде, являются автолитическими в хозяине.

Могут быть выбраны промоторы для окружающей среды опухолевой клетки, такой как промотор, экспрессированный в микроокружении опухоли (ТМЕ), промотор, экспрессированный в гипоксических условиях, или промотор, экспрессированный в условиях, когда значение pH меньше 7.

Плазмиды могут присутствовать во многих копиях или меньше. Это можно регулировать путем выбора элементов, таких как иницирующие репликации. Плазмиды с низким, средним и высоким числом копий и элементами, иницирующими репликацию, хорошо известны специалистам в данной области и могут быть выбраны. В вариантах осуществления иммуностимулирующих бактерий в данном описании плаزمида может присутствовать в количестве от низкого до среднего, например около 150 или 150 и меньше копий, до небольшого числа копий, которое составляет менее чем около 25 или около 20 или 25 копий. Примерами инициации репликации являются те, которые получены из pBR322, p15A, pSC101, pMB1, colE1, colE2, pPS10, R6K, R1, RK2 и pUC

Плазмиды могут включать РНКi, так что РНК ингибирует, подавляет или нарушает экспрессию иммунной контрольной точки или другой мишени и, кроме того, их продукты.

Эти плазмиды также могут включать последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих белок листериолизин O (LLO), не имеющий сигнальной последовательности (cytoLLO), CpG, последовательность, направленную на мишень ДНК (DTS), элемент, связывающий ген-Ретиноевой кислоты (RIIG-I). Иммуностимулирующая бактерия, которая содержит нуклеиновую кислоту, может включать CpG, распознаваемый рецептором 9 (TLR9). CpG может быть кодирован на плазмиде. CpG может быть включен или является частью бактериального гена, который кодируется на плазмиде. Например, ген, который содержит CpG, может быть *asd*, кодированным на плазмиде.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, могут включать один или несколько CpG, селективируемый маркер гена *asd* для поддержания плазмиды и последовательность, направленную на ДНК.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, могут кодировать две или более различных молекул РНК, которые ингибируют, подавляют или нарушают экспрессию иммунной контрольной точки и/или молекулы РНК, которая кодирует ингибитор метаболита, который является иммуносупрессорным.

Предложенные здесь иммуностимулирующие бактерии могут представлять собой аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*), которая позволяет расти в среде с добавлением диаминопимелиновой кислоты (DAP), но ограничивает репликацию *in vivo* при введении субъектам для лечения. Такие бактерии будут самоограничительными, что может быть полезным для лечения. Бактерия может быть *ascd* посредством разрушения или удаления всей или части эндогенного гена, кодирующего аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*), посредством чего эндогенный *asd* не экспрессируется. В других вариантах осуществления ген, кодирующий аспартат-полуальдегиддегидрогеназу, может быть включен в плазмиду для экспрессии *in vivo*.

Любая из предлагаемых здесь иммуностимулирующих бактерий может включать нуклеиновую кислоту, в основном, на плазмиде, которая включает звено CpG или часть с CpG, где звено CpG распознается рецептором 9 (TLR9). Нуклеиновые кислоты, кодирующие звенья или части с CpG, являются предпочтительными в прокариотах, и, таким образом, звено CpG может быть включено в или может быть частью бактериального гена, который кодируется на плазмиде. Например, бактериальный ген *asd* содержит иммуностимулирующие CpG.

Предложенные здесь иммуностимулирующие бактерии могут быть ауксотрофными для аденозина, или аденозина, и аденина. Любая из бактерий здесь может быть аутоτροφической для аденозина, которая преимущественно может повышать противоопухолевую активность, поскольку аденозин накапливается во многих опухолях и является иммуносупрессивным.

Имуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем описании, могут представлять собой флагеллиндефицитные бактерии, причем бактерия дикого типа содержит флагеллу. В них флагеллин является дефицитным из-за разрушения или удаления всей или части гена или генов, которые кодируют флагеллу. Например, представлены иммуностимулирующие бактерии, которые имеют делеции в генах, кодирующих одну или обе субъединицы флагеллина *fljC* и *fljB*, в результате чего бактерии являются флагеллиндефицитными.

Имуностимулирующие бактерии, представленные здесь, могут включать нуклеиновую кислоту, кодирующую *cytO*LLO, который представляет собой белок листериолизин O (LLO), не содержащий сигнальную последовательность периплазматической секреции, так что он накапливается в цитоплазме. Эта мутация преимущественно комбинируется с бактериями *asd*. LLO представляет собой гемолизин, зависимый от холестерина, из *Listeria monocytogenes*, который опосредует фагосомальную утечку бактерий. Когда автолитический штамм вводят в хозяина с опухолью, такого как человек, бактерии поглощаются фагоцитарными иммунными клетками и поступают в вакуоль. В этой среде отсутствие DAP предотвращает бактериальную репликацию и приводит к автолизу бактерий в вакуоле. Затем лизис высвобождает плазмиду, и накопленный LLO образует поры в содержащей холестерин вакуольной мембране и обеспечивает доставку плазмиды в цитозоль клетки хозяина.

Имуностимулирующие бактерии могут включать последовательность направляющую последовательность ДНК (DTS), такую как SV40-DTS, кодированную на плазмиде.

Имуностимулирующие бактерии могут иметь делецию или модификацию в гене, кодирующем эндонуклеазу -1 (*endA*), в результате чего активность *endA* ингибируется или устраняется. Примерами таких иммуностимулирующих бактерий являются иммуностимулирующие бактерии, которые содержат один или несколько звеньев *CrG*, селективируемый маркер гена *asd* для поддержания плазмиды и последовательность направляющей ДНК.

Иммуностимулирующие бактерии могут содержать нуклеиновые кислоты на плазмиде, кодирующей две или более различных молекул РНК, которые ингибируют, подавляют или нарушают экспрессию иммунной контрольной точки или молекулу РНК, которая кодирует ингибитор метаболита, который является иммуносупрессорным или находится в иммуносупрессивном пути.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие РНКi, такие как shРНК или miРНК или siРНК, могут включать терминатор транскрипции, следующий за кодирующей РНК нуклеиновой кислотой. Во всех вариантах осуществления РНК, кодированная на плазмиде в иммуностимулирующих бактериях, может представлять собой короткие РНК (shРНК) или микроРНК (miРНК).

Иммуностимулирующие бактерии могут дополнительно кодировать терапевтический продукт, такой как РНКi, который ингибирует, подавляет, разрушает или останавливает экспрессию иммунных контрольных точек и других мишеней, при этом ингибирование, супрессия, разрушение или молчание является иммуностимулирующим, или антитело или другой связывающий белок, который ингибирует экспрессию этих мишеней. Эти мишени включают, но не ограничиваются ими, одну или несколько из экзонуклеаз 1 (TREX1), PD-1, PD-L1 (B7-H1), VEGF, TGF-бета изоформа 1, бета-катенин, CTLA-4, PD-L2, PD-2, IDO1, IDO2, SIRP α , CD47, VISTA (B7-H5), LIGHT, HVEM, CD28, LAG3, TIM3, TIGIT, галектин-9, CEACAM1, CD155, CD112, CD226, CD244 (2B4), B7-H2, B7-H3, ICOS, GITR, B7-H4, B7-H6, CD27, CD40, CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD137 (4-1BB), CD200, CD272 (BTLA), CD160, CD39, CD73, A2a рецептор, A2b рецептор, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B, HLA-G, ILT-2/4, OX40, OX-40L, KIR, TIM1, TIM4, STAT3, стабиллин-1 (CLEVER-1), DназаIIandRназаH2.

Например, любая из иммуностимулирующих бактерий может содержать РНК, которая ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию одной или комбинации TREX1, PD-L1, VISTA, TGF-бета, таких как TGF-бета изоформа 1 или изоформы 1 и 3, бета-катенин, SIRP-альфа, VEGF, рнказа H2, днказа II И CLEVER-1/Стабиллин-1. Кластер дифференцирования 47 (CD47), также известный как интегрин-ассоциированный белок (IAP), является трансмембранным рецептором, принадлежащим к семейству иммуноглобулинов белков. CD47 повсеместно экспрессируется на клетках и служит маркером для самораспознавания, предотвращая фагоцитоз. CD47 опосредует свои эффекты посредством взаимодействий с несколькими другими белками, включая тромбоспондин (TSP) и регуляторный белок-альфа (SIRP α). Взаимодействие Между

SIRPана фагоцитарной клетке и CD47 на клетках-мишенях способствует обеспечению того, что клетки-мишени не становятся инфицированными фагоцитарными клетками. Некоторые злокачественные заболевания представляют собой опосредованный CD47 механизм иммунной системы клетки путем повышения экспрессии CD47 на поверхности раковой клетки, избегая, таким образом, повреждения иммунной системой. Нацеливание на CD47-экспрессирующие клетки у субъекта приводит к токсичности. Кодирование CD47-ингибирующих молекул, таких как антитело или фрагмент антитела, такого как нанотело (см. например, Sockolskyetal. (2016) ProcNatlAcadSci USA 113: e2646-e2654) на плаزمиде иммуностимулирующих бактерий, представленных здесь, приводит к экспрессии продукта анти-CD47 в микроокружении опухоли или опухоли. Фрагменты антител против CD47 были кодированы в бактериях, таких как *e coli*, которые вводят внутрь опухоли (см. например, Chowdhuryetal.(2019) NatureMedicine 25: 1057-1063). Бактерии здесь имеют улучшенное нацеливание и колонизацию микроокружения опухоли, опухолей и/или находящихся в опухоли иммунных клеток и, таким образом, могут более эффективно доставлять антитело против CD47 или фрагмент антитела. Предложенные здесь иммуностимулирующие бактерии могут вводиться систематически для колонизации в опухоли или микроокружении опухоли.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, где плаزمид содержит последовательность нуклеотидов, которые кодируют терапевтический продукт, который ингибирует иммунную контрольную точку или другую иммуносупрессорную мишень. Мишени включают, но не ограничиваясь ими, TREX1, PD-L1, VISTA, TGF-бета-изоформу 1, бета-катенин, SIRP-альфа, VEGF, PDKказуH2, ДНКазу II, CLEVER-L/Стабилин-1 и CD47. Другие мишени, которые должны быть ингибированы, подавлены или разрушены, выбраны из любого из CTLA-4, PD-L2, PD-1, PD-2, IDO1, IDO2, LIGHT, HVEM, CD28, LAG3, TIM3, TIGIT, Galectin-9, CEACAM1, CD155, CD112, CD226, CD244 (2B4), B7-H2, B7-H3, ICOS, GITR, B7-H4, B7-H6, CD27, CD40, CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD137 (4-1BB), CD200, CD272 (BTLA), CD160, CD39, CD73, A2a рецептор, A2b рецептор, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B, HLA-G, ILT-2/4, OX40, OX-40L, KIR, TIM1, TIM4, andSTAT3.

Их примерами являются человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 31), бета-катенин человека (SEQ ID NO: 32), SIRPчеловека (SEQ ID NO: 33), TREX1 человека (SEQ ID NO: 34), VISTA человека (SEQ ID NO: 35), изоформа 1 TGF-бета человека (SEQ ID NO: 193) И VEGF человека (SEQ ID NO: 194). PDK может нацеливаться на или содержать последовательность нуклеиновых кислот с иммунными контрольными точками,

представленных в любой из SEQ ID NO: 1-30, 36-40 и 195-217. Плазмиды в любой из иммуностимулирующих бактерий также могут кодировать последовательность нуклеотидов, которая является агонистом индуцируемого ретиноевой кислотой гена I (RIG-I) или связывающего RIG-I-элемента.

Имуностимулирующие бактерии могут включать одну или более из делеций в генах, например, бактериями могут быть один или более из *purI* (*purM*), *msbB*, *purD*, флагеллин (*fliC*/*fliB*), *pagP*, *adrA*, *CsgD* and *hilA*. Иммуностимулирующими бактериями могут быть *msbB*. Например, иммуностимулирующие бактерии могут содержать делецию *purI*, делецию *msbB*, делецию *asd*, делецию *adrA* и, возможно, делецию *Csqd*. Примерами делеций/модификаций бактериальных генов являются любые из следующих:

одна или несколько мутаций в гене, изменяющем биосинтез липополисахарида, выбрана из одного или нескольких из *rfaL*, *rfaG*, *rfaH*, *rfaD*, *rfaP*, *rFb*, *rfa*, *msbB*, *htrB*, *firA*, *pagL*, *pagP*, *lpxR*, *arnT*, *eptA*, and *lpxT*; и/или

одна или несколько мутаций, которые вносят суицидный ген и выбрана из одного или нескольких *sacB*, *nuk*, *hok*, *gef*, *kil* или *phlA*; и/или

одна или более из мутации, которая вводит бактериальный лизисный ген и выбрана из одного или обоих из *hly* и *cly*, и/или

мутация в одном или более вирулентных факторах, выбрана из *IsyA*, *pag*, *prg*, *iscA*, *virG*, *plc* и *act*, и/или

одна или несколько мутаций в гене, который модифицирует стрессовый ответ, выбрана из *гесA*, *htrA*, *htpR*, *hsp* и *groEL*; и/или

мутация в *min*, которая нарушает клеточный цикл; и/или

одна или несколько мутаций в генах, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, выбранные из *суа*, *срр*, *phoP*/*phoQ* и *ompR*.

Имуностимулирующая бактерия может представлять собой штамм *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Bifidobacteriae*, *Rickettsia*, *Vibrio*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Cholera*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bacillus*, or *Erysipelothrix*, или их ослабленный штамм или модифицированный штамм из любого из предшествующих списков бактериальных штаммов.

Примерами иммуностимулирующих бактерий являются те, в которых плазмида содержит одну или более из последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белок листериолизин О (LLO), в котором отсутствует сигнальная последовательность (cytoLLO), звено CpG, последовательность, направленная на мишень ДНК (DTS), и индуцируемый ретиноевой кислотой связывающий элемент гена-I (RIIG-I).

Другие примеры иммуностимулирующих бактерий включают те, которые являются ауксотрофными для аденозина и содержат: делецию в гене (ax), кодирующем flagella; делецию в endA; плазмиду, которая кодирует CytoLLO; последовательность локализации ядер; и систему комплементации плазмидной asd; и кодируют РНК, которая ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию иммунной контрольной точки или другой мишени, ингибирование, супрессия или разрушение которой повышает противоопухолевый иммунный ответ у субъекта.

Такие иммуностимулирующие бактерии включают штаммы *Salmonella*, такие как штамм *Salmonella typhimurium* дикого типа, такой как штамм, депонированный под регистрационным номером ATCC 14028, или штамм, имеющий все идентифицирующие характеристики штамма, депонированного под номером доступа ATCC 14028. Другие штаммы включают, например, ослабленный штамм *Salmonella typhimurium*, выбранный из штаммов, обозначенных как AST -100, VNP20009 или штаммы YS1646 (ATCC # 202165), RE88, SL7207, x8429, x8431 и x8468.

Имуностимулирующие бактерии могут содержать одну или более из делеций *purI*, делецию *msbB*, делецию *asd* и делецию *adrA* в дополнение к модификациям, которые увеличивают накопление в опухолевых клетках, ТМЕ и/или находящимся в опухоли иммунным клеткам, и/или модификациям, которые снижают гибель иммунных клеток, и могут кодировать иммуностимулирующий белок или другой терапевтический продукт, как описано в настоящей заявке. Иммуностимулирующие бактерии также могут включать:

одну или несколько мутаций в гене, изменяющем биосинтез липополисахарида, выбранного из одного или более *rfaL*, *rfaG*, *rfaH*, *rfaD*, *rfaP*, *rFb*, *rfa*, *msbB*, *htrB*, *firA*, *pagL*, *pagP*, *lpxR*, *arnT*, *eptA*, and *lpxT*; и/или

одну или более мутаций, которые вводят суицидный ген и выбраны из одного или более *sacB*, *nuk*, *hok*, *gef*, *kil* and *phlA*; и/или

одну или более мутаций, которые вводят ген бактериального лизиса и выбраны из одного или более *hly* and *cly*; и/или

мутацию одного или более факторов вирулентности, выбранных из *IsyA*, *pag*, *prg*, *iscA*, *virG*, *plcandact*; и/или

одну или более мутаций гена или генов, которые модифицируют ответ на стресс, выбраны из *recA*, *htrA*, *htpR*, *hspandgroEL*; и/или

мутацию в *min*, которая прерывает клеточный цикл, и/или

одну или более мутаций, которые прерывают или инактивируют регуляторные функции, выбраны из *суа*, *срр*, *phoP/phoQ* и *ompR*.

Штаммы могут включать один или более из *msbB*⁻, *asd*⁻, *hila*⁻ и/или флагеллин⁻ (*fliC*/*fliB*⁻), и/или *pagP*⁻. В частности, штаммы могут представлять собой флагеллин⁻ (*fliC*/*fliB*⁻), *msbB*⁻, *purI/M*, и могут быть *asd*⁻ and/or *Hila*⁻. Бактерии могут быть аукоотропными для аденозина или аденозина и аденина. Терапевтический продукт, такой как РНКi и/или иммуностимулирующий белок и/или антитело или его фрагмент, выделяются под контролем промотора, распознаваемого хозяином, такого промотор РНКРi или промотор РНКi как описано здесь. Иммуностимулирующие бактерии могут представлять собой штамм *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Bifidobacteriae*, *Rickettsia*, *Vibrio*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Cholera*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bacillus*, или *и/или Erysipelothrix*, или их ослабленные штаммы или модифицированные штаммы из любого из предшествующих списков бактериальных штаммов. Обычно штамм является ослабленным в хозяине. Штаммы *Salmonella* такие как *S. typhimurium*, являются примерами бактерий. Примеры штаммов включают штаммы *Salmonella typhimurium* выведены из штаммов обозначенных как AST100, VNP20009, или штаммов YS1646 (ATCC #202165), RE88, SL7207, χ 8429, χ 8431, χ 8468, и штамма дикого типа ATCC #14028.

Предложены композиции, содержащие иммуностимулирующие бактерии. Такие композиции содержат бактерии и фармацевтически приемлемые добавки или носители. Иммуностимулирующие бактерии включают любые описанные здесь или во включенных патентах/заявках или известные специалистам.

Бактерии кодируют терапевтический продукт, обычно противораковый продукт, такой как ингибитор иммунной контрольной точки или иммуностимулирующий белок, который увеличивает противоопухолевую активность в микроокружении опухоли или в опухоли, такой как цитокин, хемокин или костимуляторная молекула. Геномы бактерий можно модифицировать так, чтобы они имели повышенную инфекционность иммунных клеток и

/ или пониженную инфекционность иммунных клеток и / или пониженную способность индуцировать гибель иммунных клеток. Следовательно, бактерии модифицируются, как описано в данном документе, для накопления в опухолях, или в микроокружении опухоли, или в находящихся в опухоли иммунных клетках, и / или для доставки иммуностимулирующих белков и других терапевтических продуктов, что способствует противоопухолевой активности. Иммуностимулирующие бактерии могут дополнительно содержать плазмиду, кодирующую терапевтический противораковый продукт, такой как РНКi, такой как miРНК или shРНК, или кассету CRISPR, которая нацелена на иммунную контрольную точку или иным образом усиливает противоопухолевую активность бактерий.

Разовая доза является терапевтически эффективной для лечения заболевания или нарушения, при котором иммунная стимуляция влияет на лечение. Примером такой стимуляции является иммунный ответ, который включает, но не ограничиваясь этим, один или оба из специфического иммунного ответа и неспецифического иммунного ответа, как специфического, так и неспецифического иммунного ответа, врожденного ответа, первичного иммунного ответа, адаптивный иммунитет, вторичный иммунный ответ, иммунный ответ в памяти, активацию иммунных клеток, пролиферация иммунных клеток, дифференциацию иммунных клеток и экспрессию цитокинов.

Предлагаются фармацевтические композиции, содержащие любые иммуностимулирующие бактерии, как их использование для лечения рака, так и способы лечения рака. Способы и применения включают лечение субъекта, страдающего раком, включающее введение иммуностимулирующей бактерии или фармацевтической композиции субъекту, такому как человек. Предложен способ лечения субъекта, у которого есть рак, включающий введение иммуностимулирующей бактерии.

Способы и применения включают комбинированную терапию, при которой применяют второй противораковый агент или лечение. Второй противораковый агент – это химиотерапевтический агент, который приводит к цитозольной ДНК, или лучевой терапии, или ингибитору антииммунных контрольных точек, например, анти-PD-1, или анти-PD-L1, или анти-CTLA4-антителам, или CAR-T-клеткам или другим терапевтическим клеткам, такие как стволовые клетки, TIL-клетки и модифицированные клетки для лечения рака. Комбинированная терапия также может включать анти-VEGF или анти-VEGFR, или анти-VEGFR2-антитела, или их фрагменты, или анти-IL6-антитело или его фрагмент, или терапию онколитическим вирусом, или противораковую вакцину.

Введение может осуществляться любым подходящим путем, например парентеральным, и может включать дополнительные агенты, которые могут облегчить или усилить доставку. Введение может быть пероральным или ректальным, или в виде аэрозоля в легкие, или может быть внутриопухолевым, внутривенным, внутримышечным или подкожным.

Рак включает солидные опухоли и гематологические злокачественные новообразования, такие как, помимо прочего, лимфома, лейкемия, рак желудка и рак груди, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичников, простату, мозга, поджелудочная железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.

Иммуностимулирующие бактерии могут быть включены в композиции для введения, такие как суспензии. Их можно сушить и хранить в виде порошков. Также предусмотрены комбинации иммуностимулирующих бактерий с другими противораковыми средствами.

Предлагаются комбинированные методы лечения рака и злокачественных новообразований. Иммуностимулирующие бактерии можно вводить до или одновременно с другими видами лечения рака, включая радиотерапию, химиотерапию, особенно генотоксическую химиотерапию, которая приводит к цитозольной ДНК, и иммунотерапию, такую как антитела к ингибиторам контрольных точек, включая антитела против -PD-1, анти- PD-L1 антитела и антитела против CTLA4 и другие подобные иммунотерапевтические средства. Другие методы лечения рака также включают антитела против VEGF, против VEGFR, против VEGFR2 или против IL6 или их фрагменты, противораковые вакцины и онколитические вирусы.

Введение может осуществляться любым подходящим путем, включая системный, местный или такой как парентеральный, включая, например, пероральный или ректальный, или с помощью аэрозоля в легкие, или внутриопухолевый, внутривенный, внутримышечный или подкожный.

Также предложены способы увеличения колонизации опухолей, находящихся в опухоли иммунных клеток и / или в микроокружении опухоли, иммуностимулирующими бактериями. Способы включают, например, модификацию генома бактерии для визуализации бактериального флагеллина (fliC/fljB) и / или ragP. В данном документе показано, что такая модификация (и) значительно усиливает колонизацию иммунных

клеток в опухоли / микроокружении опухоли и находящихся в опухоли иммунных клеток.

Термины и выражения, которые используются, используются как термины описания, а не ограничения, и нет никакого намерения в использовании таких терминов и выражения, чтобы исключить любые эквиваленты показанных и описанных функций или их частей, но следует понимать, что возможны различные модификации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 схематически показан процесс, используемый для удаления гена *asd* из штамма YS1646. Ген *asd* из штамма *S. typhimurium* YS1646 был удален с использованием системы рекомбинации Red на основе лямбда, как описано у Даценко и Ваннера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645 (2000)).

На Фигуре 2 показаны уровни колонизации опухолей в инъецированных и дистальных опухолях после ИТ-введения AST-104. мышам BALB / c (возраст 6-8 недель), имплантировали двойные подкожные опухоли CT26 (2×10^5 клеток) на правом и левом боках ($n = 10$ на группу). Мышам с образовавшимися опухолями ИТ инъецировали в правый бок 5×10^6 CFU штамма YS1646, содержащего плазмиду shRNA TREX1 (AST-104). Через 35 дней после имплантации опухоли (через 12 дней после последней дозы AST-104) трех мышей умерщвляли, и инъецированные и дистальные опухоли гомогенизировали (GentleMACs™, MiltenyiBiotec) и высевали на чашки LB для подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм опухолевой ткани. На рисунке показано среднее значение CFU на грамм ткани \pm стандартное отклонение.

На фигуре 3 показано, что плазида, скремблированная с помощью CpG, обладает иммуностимулирующими противоопухолевыми свойствами. Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 ($2/10^5$ клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с установленными опухолями внутривенно вводили $5/10^6$ CFU штамма YS1646 (AST-100) или штамма YS1646, содержащего скремблированную контрольную плазмиду shPHK (AST-103) или контроль PBS, в дни, указанные стрелками. . Измерения опухолей выполняли с помощью электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывали по модифицированной формуле эллипсоида $1/2$ (длина \times ширина²). Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал $> 20\%$ веса тела или становился некротическим, в соответствии с правилами IACUC. TGI рассчитывают как 1- (средний объем исследуемой

опухоли / средний объем контрольной опухоли) $\times 100$. На рисунке показан средний рост опухоли в каждой группе, \pm SEM. ** $p < 0,01$, t-критерий Стьюдента.

На фигуре 4 схематически изображен процесс, используемый для удаления гена *fliC*. Ген *fliC* был удален из хромосомы штамма *S. typhimurium* AST-101 (штамм с делецией *asd* YS 1646) с использованием системы рекомбинации Redна основе лямбда, как описано у Даценко и Ваннера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640 -6645 (2000)).

На фигуре 5 показано, что штамм с делецией флагеллина нормально растет в LB. На рисунке изображен рост штаммов AST-108 ASD (pATI-shTREX1) и AST-112 ASD / FLG (pATI-shTREX1) при 37 ° C в бульоне LB, измеренный по OD₆₀₀ с использованием считывающего устройства для 96 -луночных планшетов Spectramax. (молекулярные устройства).

На фигуре 6 показано, что нокаут флагеллина улучшает противоопухолевую эффективность. Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 (2×10^5 клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с установленными опухолями внутривенно вводили 5×10^6 CFU штамма с нокаутом *asd* / *fliB* / *fliC*, содержащего плазмиду pATI shTREX1 (AST-113), или штамма с нокаутом *asd*, содержащего плазмиду pATI shTREX1 (AST-110), или контроль PBS в дни, указанные стрелками. Измерения опухолей выполняли с помощью электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывали по модифицированной формуле эллипсоида $l / 2$ (длина \times ширина 2). Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал $> 20\%$ веса тела или становился некротическим, в соответствии с правилами IACUC. TGI рассчитывали как 1 - (средний объем исследуемой опухоли / средний объем контрольной опухоли) $\times 100$. На фигуре показан средний рост опухоли в каждой группе, \pm SEM. * $p < 0,05$, критерий Стьюдента.

На фигуре 7 показано, что нокаут флагеллина показывает повышенное значение IFN-гамма. Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 (2×10^5 клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с установленными опухолями внутривенно вводили 5×10^6 CFU штамма с нокаутом *asd* / *fliB* / *fliC*, содержащего плазмиду pATI shTREX1 (AST-113), или штамма с нокаутом *asd*, содержащего плазмиду pATI shTREX1 (AST-110), или PBS контроль. У мышей брали кровь через 6 часов после введения первой дозы и системные цитокины сыворотки крови тестировали с помощью устройства Luminex 200 (Luminex Corporation) и набора

цитометрических шариков для мышей (набор шариков BD, FACS Fortessa, программное обеспечение FCAP, все BD Biosciences). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, критерий Стьюдента.

На фигуре 8 показано, что флагеллин не требуется для колонизации опухоли. Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 (2×10^5 клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с установленными опухолями внутривенно вводили 5×10^6 CFU штамма с нокаутом *asd/fljB/fliC*, содержащего плазмиду рАТI shTREX1 (AST-113), или штамма с нокаутом *asd*, содержащего плазмиду рАТI shTREX1 (AST-110), или контроль PBS. Через 35 дней (D35) после имплантации опухоли (12 дней после последней дозы терапии сальмонеллы), по три мыши на группу умерщвляли, опухоли гомогенизировали (GentleMACs™, MiltenyiBiotec) и высевали на планшеты LB для подсчета количества колониеобразующих единиц на грамм опухолевой ткани. На рисунке показаны средние значения колониеобразующих единиц CFU(KOE) на грамм ткани, \pm стандартное отклонение.

На фигуре 9 показано, что штамм, экспрессирующий *cytoLLO*, нормально растет *invitro*. На фигуре показан рост штаммов AST-110 (YS1646 с делецией *asd*, содержащих (рАТI-shTREX1)) и AST-115 (YS1646 с делецией *asd* и нокаутом кассеты экспрессии *cytoLLO*, содержащей (рАТI-shTREX1)) при 37 °C в бульоне LB, как измерено OD₆₀₀ с использованием 96-луночного планшет-ридера Spectramax (Moleculardevices).

На фигуре 10 показано, что AST-115 (нокаут по ASD + штамм CytoLLO Knock-in, несущий плазмиду shTREX1) демонстрирует сильную однократную эффективность на модели опухоли CT26 у мышей. Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 (2×10^5 клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с сформировавшимися опухолями внутривенно вводили 5×10^6 КОЕ AST-115 (YS1646 с делецией *asd* и нокаутом кассеты экспрессии *cytoLLO* в локусе *asd*, содержащем (рАТI-shTREX1)) или контролем PBS в дни, указанные стрелками. Измерения опухолей выполняли с помощью электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывали по модифицированной формуле эллипсоида $1/2$ (длина \times ширина²). Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал > 20% веса тела или становился некротическим, в соответствии с правилами IACUC. TGI рассчитывали как 1- (средний объем исследуемой опухоли / средний объем контрольной опухоли) \times 100. На фигуре показан средний рост опухоли в каждой группе, \pm SEM. ** $p < 0,01$, критерий Стьюдента.

На фигуре 11 показано, что штамму YS1646 для роста требуется аденозин в микроокружении опухоли. Показан рост штаммов YS1646 (*purI / msbR*) и родительского штамма ATCC 14028 дикого типа при 37° C в бульоне LB, измеренный по OD₆₀₀ с использованием считывающего устройства для 96-луночных планшетов Spectramax (Moleculardevices).

На фигуре 12 показано, что сконструированные штаммы ASD, FLG и CytoLLO требуют для роста высокого содержания аденозина. Рост штаммов AST- 117 (YS1646 *Δasd*, содержащий низкокопийную плазмиду shTREX-1), AST-118 (YS1646 *Δasd/ ΔfliC /ΔfliB*, содержащий низкокопийную плазмиду shTREX-1) и AST- 119 (YS1646*Δasd*: LLO, содержащие низкокопийную плазмиду shTREX-1) при 37 ° C в бульоне LB, измеренные по OD₆₀₀ с использованием 96-луночного планшет-ридера Spectramax (Moleculardevices).

На фигуре 13 показано, что штамм с низкокопийной причиной репликации *asd*-кодирующей плазмидой имеет лучшую кинетику роста, чем штамм с высококопийной причиной репликации *asd*-кодирующей плазмиды. Рост штаммов YS1646, AST-1 17 (YS1646 *Δasd*, содержащий низкокопийную плазмиду shTREX-1 с функциональным геном *asd*), AST-104 (YS1646, содержащий низкокопийную плазмиду pEQshTREX-1 без гена *asd*) и AST -110 (YS1646 *Δasd*, содержащая плазмиду pATI-shTREX-1 с высокой копией с функциональным геном *asd*) при 37 ° C в бульоне LB, как измерено OD₆₀₀ с использованием считывающего устройства для 96-луночных планшетов Spectramax (Moleculardevices).

На фигуре 14 показано, что штамм с низкокопийной плазмидой *asd* больше подходит для опухолевых клеток мыши, чем штамм с высококопийной плазмидой *asd*. Внутриклеточный рост штаммов AST- 117 (YS1646 *asd*, содержащий низкокопийную плазмиду shTREX-1 с функциональным геном *asd*) и AST-1 10 (YS1646 *Δasd*, содержащий высококопийную плазмиду pATI-shTREX-1 с функциональным геном *asd*) показаны на клетках меланомы мыши B16F.10 и клетках карциномы толстой кишки мыши CT26. 5×10^5 клеток в 24-луночной чашке инфицировали штаммами *S. typhimurium* при MOI 5. Через 30 минут заражения среду заменяли средой, содержащей гентамицин, для уничтожения внеклеточных бактерий. В указанные моменты времени монослои клеток лизировали осмотическим шоком, лизаты клеток разбавляли и высевали на агар LB для подсчета CFU.

На фигуре 15 показано, что *invivo* системы комплементации гена *asd* приводят к удержанию плазмид в опухолях, инфицированных *S. typhimurium*. Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 (2×10^5 клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с установленными опухолями внутривенно инъецировали 5×10^6 КОЕ штамма, нокаутированного по *asd*, содержащего плазмиду рATI shTREX1 (AST-110) или YS1646, содержащего плазмиду рEQ shTREX-1 без гена *asd* (AST-104). Через 35 дней после имплантации опухоли (через 12 дней после последней дозы терапии сальмонеллы), по три мыши в группе были умерщвлены, опухоли гомогенизированы с использованием гомогенизатора GentleMACs™ (MiltenyiBiotec) и помещены на чашки с агаром LB или чашки с агаром LBc 50 мкг / мл канамицина. На фигуре показан процент КОЕ, устойчивых к канамицину, в гомогенатах опухолевой ткани, \pm стандартное отклонение.

На фигуре 16 показано, что терапевтическая эффективность штамма, содержащего плазмиду с системой комплементации гена *asd* и shTREX1 (AST-110), улучшается. Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 (2×10^5 клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с установленными опухолями внутривенно инъецировали 5×10^6 КОЕ штамма с нокаутом *asd*, содержащего плазмиду рATI-shTREX1 (AST-110), или штамма с нокаутом *asd*, содержащего плазмиду рATI (AST-109), или штамма YS1646, содержащего плазмиду рEQ-shTREX-1 без гена *asd* (AST-104) или контроль PBS в дни, указанные стрелками. Измерения опухолей выполняли с помощью электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывали по модифицированной формуле эллипсоида $l / 2$ (длина \times ширина²). Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал $> 20\%$ веса тела или становился некротическим, в соответствии с правилами IACUC. TGI рассчитывали как $1 - (\text{средний объем исследуемой опухоли} / \text{средний объем контрольной опухоли}) \times 100$. На фигуре показан средний рост опухоли в каждой группе, \pm стандартное отклонение.

На Фигуре 17 показано, что штамм, содержащий низкокопийную плазмиду shTREX1 (AST-117), обладает лучшими противоопухолевыми свойствами по сравнению со штаммом, содержащим высококопийную плазмиду (AST-110). Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 (2×10^5 клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с установленными опухолями внутривенно вводили 5×10^6 КОЕ штамма с нокаутом *asd*, содержащего плазмиду рATI-shTREX1 с высоким числом копий начала репликации (AST-110), или штамм с нокаутом *asd*, содержащий плазмиду рATI-shTREX1 с низким числом копий начала репликации (AST-117) или PBS-

контроль в дни, указанные стрелками. Измерения опухолей выполняли с помощью электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывали по модифицированной формуле эллипсоида $l/2$ (длина \times ширина²). Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал 20% веса тела или становился некротическим, в соответствии с правилами IACUC. TGI рассчитывали как $1 - (\text{средний объем исследуемой опухоли} / \text{средний объем контрольной опухоли}) \times 100$. На фигуре показан средний рост опухоли в каждой группе, \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$, критерий Стьюдента.

На фиг.18А и 18В показано, что низкокопийный плазмидный штамм AST-117 лучше колонизирует опухоли и имеет более высокое соотношение колонизации опухолью и селезенкой, чем высококопийный плазмидный штамм AST-110. Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 (2×10^5 клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с установленными опухолями внутривенно вводили 5×10^6 КОЕ штамма с нокаутом *asd*, содержащего плазмиду pATI-shTREX1 с точкой начала репликации с высоким числом копий (AST-110), или штамм с нокаутом *asd*, содержащий плазмиду pATI-shTREX1 с точкой начала репликации с низким числом копий (AST-117). Через 35 дней после имплантации опухоли (через 12 дней после последней дозы терапии сальмонелл), 3 мыши на группу были умерщвлены, опухоли гомогенизированы с использованием гомогенизатора GentleMACs™ (MiltenyiBiotec) и помещены на планшеты LB для подсчета количества КОЕ. на грамм опухолевой ткани. На фиг.18А показано среднее значение КОЕ на грамм опухолевой ткани, \pm стандартное отклонение. На фиг.18В показано соотношение колонизации опухолью и селезенкой.

На фигуре 19 показано, что автолитический штамм (AST-120) не может расти в отсутствие DAP. На фигуре изображен рост штамма $\Delta\text{asd}:\text{cytoLLO}$, содержащего плазмиду pEQU6-shTREX1, которая не содержит ген *asd* (AST-120), с течением времени в одном бульоне LB или в бульоне LB с добавлением 50 мкг / мл DAP, как измерено OD₆₀₀ с использованием 96-луночного планшета Spectramax (Moleculardevices).

На Фигуре 20 представлена противоопухолевая активность автолитического штамма (AST-120). Мышам BALB / c (возраст 6-8 недель) имплантировали единственную подкожную опухоль на боках CT26 (2×10^5 клеток) ($n = 9$ на группу). Мышам с сформировавшимися опухолями внутривенно вводили 5×10^6 КОЕ штамма $\Delta\text{asd}:\text{cytoLLO}$, содержащего плазмиду pEQU6-shTREX1, которая не содержит гена *asd* (AST-120) или контроля PBS, в дни, указанные стрелками. Измерения опухолей выполняли с помощью электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем

опухоли рассчитывали по модифицированной формуле эллипсоида $1/2$ (длина \times ширина²). Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал $> 20\%$ веса тела или становился некротическим, в соответствии с правилами IACUC. TGI рассчитывали как $1 - (\text{средний объем исследуемой опухоли} / \text{средний объем контрольной опухоли}) \times 100$. На фигуре показан средний рост опухоли в каждой группе, \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$, критерий Стьюдента.

На фигуре 21 изображены белки, которые действуют ниже HilA в пути SPI-1.

На фигуре 22 изображены SPI-1 T3SS и функциональная классификация белков, кодируемых SPI-1 (адаптировано из Kimbrough and Miller (2002) *Microbes Infect.* 4 (1): 75-82).

На рис. 23 показано влияние SPI-1 T3SS на макрофаги. Флагеллин обнаруживается с помощью NAIP5 / 6, а белки палочек и игл обнаруживаются с помощью NAIP1 / 2, что приводит к активации воспаления NLRC4 и каспазы-1, что приводит к высвобождению IL-1 β и IL-18 и пироптозу.

На фигуре 24 показано опосредованное T3SS-1 проникновение бактерии в эпителиальную клетку и SCV.

На фигуре 25 показано распознавание бактериального флагеллина TLR5 и LPS TLR4, а также роль флагеллина, LPS, HilA, PrgI и PrgJ в инфицировании клеток-хозяев, высвобождении цитокинов, активации инфламмосом и пироптозе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

ОБЗОР

A. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

B. ОБЗОР ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ

C. ИММУНОТЕРАПЕВТИКА ОТ РАКА

1. Иммунотерапия 2. Адоптивная иммунотерапия

3. Противораковые вакцины и онколитические вирусы.

D. ИММУНОТЕРАПИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА

1. Бактериальная терапия
2. Сравнение иммунных ответов на бактерии и вирусы.
3. Сальмонеллезная терапия
 - a. Опухолево-тропные бактерии.
 - б. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium
 - в. Бактериальное ослабление
 - i. msbB мутанты
 - ii. purI мутанты
 - iii. Комбинации ослабляющих мутаций
 - iv. VNP20009 и другие штаммы *S. typhimurium* ослабленного и дикого типа
 - v. *S. Typhimurium*, разработанный для доставки макромолекул
4. Улучшение иммуностимулирующих бактерий для увеличения терапевтического индекса
 - a. Удаление гена *asd*
 - б. Аденозиновая ауксотрофия
 - с. Штаммы с дефицитом флагеллина
 - d. *Salmonella*, созданная для того, чтобы избежать сальмонеллезной вакуоли (SCV)
 - e. Делеции в генах сальмонелл, необходимые для образования биопленок
 - f. Делеции в генах биосинтетического пути ЛПС
 - g. Делеции генов SPI-1 и SPI-2

h. Мутации эндонуклеазы (endA) для увеличения доставки плазмиды

i. Ингибирование RIG-I

j. Ингибирование ДНКазы II

к. Ингибирование РНКазы H2

l. Ингибирование Стабилин-1 / CLEVER-1

1. Stabilin-1/CLEVER-1 Inhibition

5. Иммуностимулирующие белки

6. Модификации, которые увеличивают поглощение грамотрицательных бактерий, таких как сальмонелла, иммунными клетками и уменьшают гибель иммунных клеток.

7. Условия бактериальной культуры.

E. БАКТЕРИАЛЬНОЕ ОСЛАБЛЕНИЕ И КОЛОНИЗАЦИЯ

1. Делеция флагеллина (fliC/fljB)

2. Делеция генов в пути биосинтеза ЛПС.

3. Колонизация

F. ПОСТРОЕНИЕ ПРИМЕРНОГО КОДИРОВАНИЯ ПЛАЗМИДАМИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

1. Иммуностимулирующие белки

2. Антитела и фрагменты антител.

3. Интерферирующие РНК (РНКi)

a. shRNA

б. МикроРНК

4. Начало репликации и количество копий плазмиды.

5. CpG-звенья и CpG-острова.
6. Поддержание плазмиды / компоненты выбора
7. Промоторы РНК-полимеразы.
8. Последовательности мишени ДНК.
9. CRISPR

G. НАПРАВЛЕННЫЕ НА ОПУХОЛИ ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫЕ БАКТЕРИИ СОДЕРЖАТ РНК ПРОТИВ ИММУННЫХ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ, ЧТОБЫ СТИМУЛИРОВАТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУНИТЕТ

H. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ПРОДУКЦИЯ, СОСТАВЫ И ФОРМУЛЯЦИИ

1. Производство

- а. Производство банков клеток
- б. Производство лекарственных веществ
- в. Производство лекарственных препаратов

2. Композиции

3. Составы

- а. Жидкости, инъекции, эмульсии
- б. Высушенные термостабильные составы

4. Композиции для других способов введения.

5. Дозировки и способ применения.

6. Упаковка и изделия производства

I. МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

1. Опухоли

2. Введение

3. Мониторинг

Ж. ПРИМЕРЫ

А. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит изобретение (я). Все патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки и публикации, последовательности GenBank, базы данных, веб-сайты и другие опубликованные материалы, упоминаемые во всем раскрытии настоящего документа, если не указано иное, включены в качестве ссылки во всей своей полноте. В случае наличия множества определений терминов в этом разделе преобладают определения из этого раздела. Если делается ссылка на URL-адрес или другой такой идентификатор или адрес, подразумевается, что такие идентификаторы могут изменяться, и конкретная информация в Интернете может приходить и уходить, но эквивалентную информацию можно найти, выполнив поиск в Интернете.

В контексте настоящего описания терапевтические бактерии представляют собой бактерии, которые влияют на терапию, такую как противораковую или противоопухолевую терапию, при введении субъекту, такому как человек.

В данном контексте иммуностимулирующие бактерии представляют собой терапевтические бактерии, которые при введении субъекту накапливаются в иммунопривилегированных тканях и клетках, такие как опухоли, и продукты репликации и / или экспрессии, которые являются иммуностимулирующими или которые приводят к иммуностимуляции. Например, иммуностимулирующие бактерии ослабляются в организме хозяина благодаря пониженной токсичности или патогенности и / или благодаря кодируемым продуктам, которые снижают токсичность или патогенность, поскольку иммуностимулирующие бактерии не могут реплицироваться и / или экспрессировать продукты (или имеют пониженную репликацию / экспрессию продуктов), за исключением, прежде всего, в иммунопривилегированной среде. Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, модифицированы для кодирования продукта или продуктов или проявляют черту или свойство, которые делают их иммуностимулирующими. Такие продукты, свойства и характеристики включают, но не ограничиваются ими, например, по меньшей мере, одно из следующего: иммуностимулирующий белок, такой как цитокин, хемокин или

костимулирующая молекула; РНКi, такие как siРНК (shРНК и микроРНК) или CRISPR, которая нацелена, разрушает или ингибирует ген иммунной контрольной точки, такой как TREX1 и / или PD-L1; или ингибитор иммунной контрольной точки, такой как антитело против иммунной контрольной точки. Иммуностимулирующие бактерии также могут включать модификацию, которая делает бактерию ауксотрофной в отношении метаболита, который является иммунодепрессивным или находится в иммуносупрессивном пути, например аденозин.

В данном контексте обозначения штамма VNP20009 (см., Например, публикацию международной заявки РСТ WO 99/13053, также патент США № 6863894) и YS1646 и 41.2.9 используются взаимозаменяемо, и каждый из них относится к штамму, депонированному в Американской коллекции типовых культур (АТСС) под номером доступа 202165. VNP20009 представляет собой модифицированный ослабленный штамм *Salmonellatyphimurium*, который содержит делеции в *msbB* и *purl*, и был получен из штамма дикого типа АТСС № 14028.

В данном документе используются обозначения YS1456 и 8.7 взаимозаменяемо, и каждый относится к штамму, депонированному в Американской коллекции типовых культур и которому присвоен регистрационный номер 202164 (см. патент США № 6863894).

В контексте настоящего описания начало репликации представляет собой последовательность ДНК, в которой репликация инициируется на хромосоме, плазмиде или вирусе. Для небольшой ДНК, включая бактериальные плазмиды и небольшие вирусы, достаточно одного начала.

Начало репликации определяет количество копий вектора, которое зависит от выбранного начала репликации. Например, если вектор экспрессии получен из плазмиды pBR322 с низким числом копий, оно составляет примерно 25-50 копий на клетку, а если они получены из плазмиды pUC с высоким числом копий, то оно может составлять 150-200 копий на клетку.

В данном контексте среднее число копий плазмиды в клетках составляет около 150 или меньше 150, низкое количество копий составляет 15-30, например 20 или меньше 20. Число копий от низкого до среднего составляет менее 150. Высокое количество копий количество больше 150 копий на клетку.

В данном контексте звено CpG представляет собой набор оснований, которые включают неметилированный центральный CpG («р» относится к фосфодиэфирной связи между последовательными нуклеотидами С и G), окруженный по крайней мере одним основанием, фланкирующим (со стороны 3' и 5') центральной CpG. Олигодезоксинуклеотид CpG представляет собой олигодезоксинуклеотид, который имеет длину по меньшей мере около десяти нуклеотидов и включает неметилированный CpG. По крайней мере, С 5' CG 3' неметилирован.

В данном контексте связывающая последовательность RIG-I относится непосредственно к 5'-трифосфатной (5'ppp) структуре или к той, которая синтезируется РНК pol III из последовательности поли (dA-dT), которая в силу взаимодействия с RIG-I может активировать тип IINF через путь RIG-I. РНК включает по меньшей мере четыре А-рибонуклеотида (AAAA); он может содержать 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более. Связывающая последовательность RIG-I вводится в плазмиду бактерии для транскрипции в полиА.

В данном контексте иммуностимулирующий белок представляет собой белок, который обеспечивает, стимулирует, усиливает или повышает иммунные ответы, особенно в микроокружении опухоли, таком как опухоли и / или находящиеся в опухоли иммунные клетки. Иммуностимулирующие белки включают, но не ограничиваются ими, цитокины, хемокины, костимулирующие молекулы и другие иммунорегулирующие белки и продукты. Таким образом, как здесь используется, «иммуностимулирующий белок» представляет собой белок, который обеспечивает, проявляет или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли. Примером таких белков являются цитокины, хемокины и костимуляторные молекулы, такие как, но не ограничиваясь ими, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), комплекс альфа-цепи IL-15 / IL-15R, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, молекулы, участвующие в потенциальном привлечении / персистенции Т-клеток, CD40, лиганд CD40 (CD40L), лиганд OX40, лиганд OX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), члены семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антагонисты полипептида TGF-бета и члены надсемейства TNFR.

Используемый здесь термин «цитокины» представляет собой широкую и свободную категорию небольших белков (5-20 кДа), которые важны для передачи сигналов в клетке. Цитокины включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухоли. Цитокины - это сигнальные молекулы, которые помогают

клеткам общаться в иммунных ответах и стимулируют движение клеток к участкам воспаления, инфекции и травмы.

Используемый здесь термин «хемокины» относится к хемоаттрактантным (хемотаксическим) цитокинам, которые связываются с рецепторами хемокинов и включают белки, выделенные из природных источников, а также белки, полученные синтетическим путем, рекомбинантными методами или химическим синтезом. Примеры хемокинов включают, но не ограничиваются им IL-8, IL-10, GCP-2, GRO- α , GRO- β , GRP- γ , ENA-78, PBP, СТАРІІІ, NAP-2, LAPF-4, MIG (CXCL9), CXCL10, CXCL11, PF4, IP-10, SDF-1 α , SDF-1 β , SDF-2, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), MIP-1 γ , MIP-2, MIP-2 α , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, MIP-5, MDC, HCC-1, ALP, лунгкин, Tim-1, эотаксин-1, эотаксин-2, I-309, SCYA17, TRAC, RANTES (CCL5), DC-CK-1, лимфотактин, ALP, лунгкин и фракталкин и другие, известные специалистам в данной области. Хемокины участвуют в миграции иммунных клеток к участкам воспаления.

В данном контексте бактерия, которая модифицирована так, что она «вызывает меньшую гибель находящихся в опухоли иммунных клеток» или «вызывает меньшую гибель иммунных клеток» означает, что она менее токсична, чем бактерия без модификации, или что она имеет пониженную вирулентность по сравнению с бактерией без модификации. Примерами являются такие модификации, которые уменьшают или нарушают пироптоз и которые изменяют профили липополисахаридов в бактерии. Эти модификации включают одно или более исключение или удаление генов флагеллина, *ragP* или один или более компонентов на пути SPI-1 таких как *hilA*, стержневой белок, игловой белок и QseC.

В данном контексте бактерия, которая «модифицирована так, что она преимущественно заражает находящиеся в опухоли иммунные клетки» или «модифицирована так, что она предпочтительно заражает иммунные клетки», имеет модификацию своего генома, которая снижает ее способность инфицировать клетки, отличные от иммунных. Примерами таких модификаций являются модификации, которые нарушают систему секреции типа 3 или систему секреции типа 4 или другие гены или системы, которые влияют на способность бактерии вторгаться в неиммунную клетку. Например, нарушение / удаление компонента SPI-1, который необходим для инфицирования клеток, таких как эпителиальные клетки, но не влияет на инфицирование иммунных клеток, таких как фагоцитарные клетки, сальмонеллой.

В данном контексте «модификация» относится к модификации последовательности аминокислот полипептида или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты и включает делеции, вставки и замены аминокислот или нуклеотидов, соответственно. Способы модификации полипептида являются обычными для специалистов в данной области, например, с использованием методик рекомбинантной ДНК.

В данном контексте модификация бактериального генома или плазмиды или гена включает делеции, замены и вставки нуклеиновой кислоты.

В данном контексте РНК-интерференция (РНКи) представляет собой биологический процесс, в котором молекулы РНК ингибируют экспрессию или трансляцию гена путем нейтрализации целевых молекул мРНК для ингибирования трансляции и, следовательно, экспрессии целевого гена.

В контексте настоящего описания молекулы РНК, которые действуют через РНКi, называются ингибирующими в силу того, что они подавляют экспрессию целевого гена. Подавление экспрессии означает, что экспрессия целевого гена снижается, подавляется или ингибируется.

В контексте настоящего описания говорят, что подавление гена с помощью РНКi ингибирует, подавляет, нарушает или подавляет экспрессию целевого гена. Ген-мишень содержит последовательности нуклеотидов, которые соответствуют последовательностям в ингибирующей РНК, посредством чего ингибирующая РНК подавляет экспрессию мРНК.

В данном контексте ингибирование, подавление, нарушение или подавление целевого гена относится к процессам, которые изменяют экспрессию, например трансляцию, целевого гена, в результате чего активность или экспрессия продукта, кодируемого целевым геном, снижается. Восстановление включает в себя полный или частичный нокаут, что касается иммуностимулирующей бактерии, представленной в настоящем документе, и ее введения, при проведении лечения.

В данном контексте малые интерферирующие РНК (siРНК) представляют собой небольшие фрагменты двухцепочечной (ds) РНК, обычно длиной около 21 нуклеотида, с 3'-выступами (2 нуклеотида) на каждом конце, которые можно использовать для «вмешательства» в трансляцию белков путем связывания и стимулирования деградации

информационной РНК (мРНК) в определенных последовательностях. При этом siRNA предотвращают продукцию специфических белков на основе нуклеотидных последовательностей их соответствующих мРНК. Процесс называется РНКинтерференция (РНКi), также называемая сайленсингом siРНК или нокаутом siРНК.

В данном контексте РНК с короткой шпилькой или РНК с небольшой шпилькой (shРНК) представляет собой молекулу искусственной РНК с плотным поворотом шпильки, которую можно использовать для подавления экспрессии гена-мишени посредством интерференции РНК (РНКi). Экспрессия shRNA в клетках обычно осуществляется путем доставки плазмид или с помощью вирусных или бактериальных векторов.

В данном контексте микроокружение опухоли (ТМЕ) представляет собой клеточную среду, в которой существует опухоль, включая окружающие кровеносные сосуды, иммунные клетки, фибробласты, воспалительные клетки костного мозга, лимфоциты, сигнальные молекулы и внеклеточный матрикс (ECM). Существующие состояния включают, но не ограничиваются ими, повышенную васкуляризацию, гипоксию, низкий pH, повышенную концентрацию лактата, повышенную концентрацию пирувата, повышенное давление интерстициальной жидкости и измененные метаболиты или метаболизм, такие как более высокие уровни аденозина, указывающие на опухоль.

В данном контексте интерфероны человека I типа (IFN) представляют собой подгруппу белков интерферона, которые регулируют активность иммунной системы. Все IFN типа I связываются со специфическим рецепторным комплексом клеточной поверхности, таким как рецептор IFN- α . Интерфероны типа I включают, среди прочего, IFN-альфа и IFN-бета. Белки IFN-бета продуцируются фибробластами и обладают противовирусной активностью, которая в основном участвует в врожденном иммунном ответе. Два типа IFN-бета- это PTNG-бета1 (IFNB1) и IRN-бета3 (IFNB3).

В данном контексте упоминание о том, что нуклеиновая кислота или кодируемая РНК нацелена на ген, означает, что она ингибирует, подавляет или подавляет экспрессию гена с помощью любого механизма. Как правило, такая нуклеиновая кислота включает по меньшей мере часть, комплементарную целевому гену, причем этой части достаточно для образования гибрида с комплементарной частью.

Используемый здесь термин «делеция», когда относится к последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида, относится к делеции одного или нескольких

нуклеотидов или аминокислот по сравнению с последовательностью, такой как целевой полинуклеотид или полипептид, или последовательность нативного или дикого типа.

В контексте настоящего описания термин «вставка», относящийся к последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислоты, описывает включение одного или нескольких дополнительных нуклеотидов или аминокислот в целевую, природную, дикого типа или другую родственную последовательность. Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит одну или несколько вставок по сравнению с последовательностью дикого типа, содержит один или несколько дополнительных нуклеотидов в пределах линейной длины последовательности.

Используемый здесь термин «добавления» к последовательностям нуклеиновой кислоты и аминокислот описывает добавление нуклеотидов или аминокислот к любому концу по сравнению с другой последовательностью.

В данном контексте «замена» или «замена» относится к замене одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот в нативной, целевой, дикого типа или другой последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида на альтернативный нуклеотид или аминокислоту без изменения длины (как описано в количестве остатков) молекулы. Таким образом, одна или несколько замен в молекуле не изменяют количество аминокислотных остатков или нуклеотидов в молекуле. Аминокислотные замены по сравнению с конкретным полипептидом могут быть выражены числом аминокислотных остатков по длине полипептидной последовательности.

Используемый здесь термин «в положении, соответствующем» или указание на то, что положения нуклеотидов или аминокислот «соответствуют» положениям нуклеотидов или аминокислот в раскрытой последовательности, например, указанной в Перечне последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот. идентифицируют после сравнения с раскрытой последовательностью, чтобы максимизировать идентичность с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. Путем выравнивания последовательностей специалист в данной области может идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве ориентиров. Как правило, для идентификации соответствующих положений последовательности аминокислот выравнивают так, чтобы получить соответствия наивысшего порядка (см., например, *Computational*

Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carrillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073).

В данном контексте выравнивание (сравнение) последовательности относится к использованию гомологии для выравнивания двух или более последовательностей нуклеотидов или аминокислот. Обычно выравниваются две или более последовательностей, которые связаны идентичностью на 50% или более. Выровненный набор последовательностей относится к 2 или более последовательностям, которые выровнены в соответствующих положениях и могут включать выравнивающие последовательности, полученные из РНК, таких как EST и другие сДНК, выровненные с последовательностью геномной ДНК. Связанные или варианты полипептиды или молекулы нуклеиновой кислоты могут быть выровнены любым способом, известным специалистам в данной области. Такие методы обычно максимизируют совпадения и включают в себя методы, такие как использование ручного выравнивания и использование многочисленных доступных программ выравнивания (например, BLASTP) и других, известных специалистам в данной области. Путем выравнивания (сравнения) последовательностей полипептидов или нуклеиновых кислот, специалист в данной области может идентифицировать аналогичные части или положения, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве ориентиров. Кроме того, специалист в данной области также может использовать консервативные аминокислотные или нуклеотидные остатки в качестве ориентиров для поиска соответствующих аминокислотных или нуклеотидных остатков между человеческими и нечеловеческими последовательностями и среди них.

В данном контексте «свойство» полипептида, такого как антитело, относится к любому свойству, проявляемому полипептидом, включая, помимо прочего, специфичность связывания, структурную конфигурацию или конформацию, стабильность белка, устойчивость к протеолизу, конформационную стабильность, термостойкость и толерантность к условиям pH. Изменения свойств могут изменить «активность» полипептида. Например, изменение специфичности связывания полипептида антитела может изменять способность связываться с антигеном и / или различные активности связывания, такие как аффинность или авидность, или активности полипептида *in vivo*.

Используемый здесь термин «активность» или «функциональная активность» полипептида, такого как антитело, относится к любой активности, проявляемой полипептидом. Такие действия можно определить эмпирически. Примеры активности включают, но не ограничиваются этим, способность взаимодействовать с биомолекулой, например, посредством связывания антигена, связывания ДНК, связывания лиганда или димеризации, или ферментативной активности, например, киназной активности или протеолитической активности. Для антитела (включая фрагменты антител) активности включают, но не ограничиваются, способность специфически связывать конкретный антиген, аффинность связывания антигена (например, высокая или низкая аффинность), авидность связывания антигена (например, высокая или низкая авидность), скоростные, отрицательные, эффекторные функции, такие как способность способствовать нейтрализации или удалению антигена, нейтрализации вируса, и активности *in vivo*, такие как способность предотвращать инфекцию или вторжение патогена, или способствовать удалению, или проникать в конкретную ткань, жидкость или клетку в организме. Активность можно оценить *in vitro* или *in vivo* с использованием признанных анализов, таких как ELISA, проточная цитометрия, поверхностный плазмонный резонанс или эквивалентные анализы для измерения скорости или снижения скорости, иммуногистохимия и иммунофлуоресцентная гистология и микроскопия, клеточные анализы, проточная цитометрия и анализы связывания (например, анализы пэннинга).

Используемые здесь термины «связывать», «связываться» или их грамматические вариации относятся к участию молекулы в любом притягивающем взаимодействии с другой молекулой, приводящем к стабильной ассоциации, в которой две молекулы находятся непосредственной близости друг от друга. Связывание включает, но не ограничивается ими, нековалентные связи, ковалентные связи (такие как обратимые и необратимые ковалентные связи) и включает взаимодействия между молекулами, такими как, помимо прочего, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды и небольшие молекулы, такие как химические соединения, включая лекарства.

Используемый здесь термин «антитело» относится к иммуноглобулинам и фрагментам иммуноглобулина, природным или частично или полностью синтетическим, таким как полученный рекомбинантно, включая любой его фрагмент, содержащий по меньшей мере часть вариабельной области тяжелой цепи и легкой области молекулы иммуноглобулина, которая является достаточной для образования антигенсвязывающего сайта и, при сборке, для специфического связывания антигена. Следовательно, антитело включает любой белок, имеющий связывающий домен, который гомологичен по существу гомологичен

антигенсвязывающему домену иммуноглобулина (сайт объединения антител). Например, антитело относится к антителу, которое содержит две тяжелые цепи (которые могут быть обозначены H и H') и две легкие цепи (которые могут быть обозначены L и L'), где каждая тяжелая цепь может быть полноразмерной тяжелой цепью иммуноглобулина или ее частью, достаточной для образования антигенсвязывающего сайта (например, тяжелые цепи включают, но не ограничиваются ими, цепи VH, цепи VH-CH1 и VH-CH1-CH2-CH3 цепи), и каждая легкая цепь может быть полноразмерной легкой цепью или ее частью, достаточной для образования антигенсвязывающего сайта (например, легкие цепи включают, но не ограничиваются ими, цепи VL и цепи VL-CL). Каждая тяжелая цепь (H и H') соединяется с одной легкой цепью (L и L' соответственно). Обычно антитела минимально включают всю или по крайней мере часть вариабельной тяжелой (VH) цепи и / или вариабельной легкой (VL) цепи. Антитело также может включать всю или часть константной области.

Для целей настоящего описания термин «антитело» включает полноразмерные антитела и их части, включая фрагменты антител, такие как фрагменты антител против EGFR. Фрагменты антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты F(ab')₂ фрагменты нанотел (например, фрагменты антител), дисульфидно-связанные Fvs (csFv), Fd-фрагменты, Fd'-фрагменты, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные Fab (scFab), диатела, антиидиотипические (анти-id) антитела или антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. Антитела также включают синтетические антитела, рекомбинантно полученные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие антитела, нечеловеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и внутритела. Предоставленные здесь антитела включают членов любого класса иммуноглобулинов (например, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY), любого подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса (например, IgG2a и IgG2b). Антитела для терапии человека обычно представляют собой антитела человека или гуманизированные.

Используемый здесь термин «фрагмент (ы) антитела» относится к (i) моновалентным и моноспецифическим производным антител, которые содержат вариабельные тяжелые и / или легкие цепи или функциональные фрагменты антител и лишены Fc-части; и (ii) BiTE (тандемный scFv), DART, диатела и одноцепочечные диатела (scDB). Таким образом, фрагмент антитела включает: Fab, Fab', scFab, scFv, фрагмент Fv, нанотело (см., Например, антитела, полученные из *Camelus bactrianus*, *Calceolus dromaderius* или

Lamaraccos) (см., например, патент США № 5,759,808 и Stijlemans et al. (2004) J. Biol. Chem. 279: 1256-1261), VHH, dAb, минимальная единица распознавания, одноцепочечное диатело (scDb), BiTE и DART. Указанные фрагменты антител имеют молекулярную массу менее 60 кДа.

Используемый здесь термин «нуклеиновая кислота» относится, по меньшей мере, к двум связанным нуклеотидам или производным нуклеотидов, включая дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК), соединенные вместе, обычно фосфодиэфирными связями. В термин «нуклеиновая кислота» также включены аналоги нуклеиновых кислот, такие как пептидная нуклеиновая кислота (ПНК), фосфоротиоатная ДНК и другие подобные аналоги и производные или их комбинации. Нуклеиновые кислоты также включают производные ДНК и РНК, содержащие, например, аналог нуклеотида или «остовную» связь иную чем фосфодиэфирная связь, например, фосфотриэфирная связь, фосфорамидатная связь, фосфоротиоатная связь, тиоэфирная связь или пептидная связь (пептидная нуклеиновая кислота). Термин также включает в качестве эквивалентов производные, варианты и аналоги либо РНК, либо ДНК, полученных из аналогов нуклеотидов, одноцепочечных (смысловых или антисмысловых) и двухцепочечных нуклеиновых кислот. Дезоксирибонуклеотиды включают дезоксиаденозин, дезоксицитидин, дезоксигуанозин и дезокситимидин. Для РНК основанием урацила является уридин.

В данном контексте выделенная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. «Изолированная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула сДНК, может быть практически свободной от другого клеточного материала или культуральной среды при получении рекомбинантными методами или практически не содержать химических предшественников или других химикатов при химическом синтезе. Иллюстративные изолированные молекулы нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе, включают изолированные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело или предоставленные антигенсвязывающие фрагменты.

Используемый здесь термин «функционально связанный» со ссылкой на последовательности, области, элементы или домены нуклеиновой кислоты означает, что области нуклеиновой кислоты функционально связаны друг с другом. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая лидерный пептид, может быть функционально связана

с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, посредством чего нуклеиновые кислоты могут быть транскрибированы и транслированы для экспрессии функционального слитого белка, при этом лидерный пептид влияет на секрецию слитого полипептида. В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая первый полипептид (например, лидерный пептид), функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, и нуклеиновые кислоты транскрибируются как один транскрипт мРНК, но трансляция транскрипта мРНК может привести к одному из двух экспрессируемых полипептидов. Например, стоп-кодон может быть расположен между нуклеиновой кислотой, кодирующей первый полипептид, и нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, так что при введении в частичную супрессорную клетку полученный одиночный транскрипт мРНК может транслироваться с образованием либо слитого белка содержащего первый и второй полипептиды, или могут быть транслированы для получения только первого полипептида. В другом примере промотор может быть функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, посредством чего промотор регулирует или опосредует транскрипцию нуклеиновой кислоты.

Используемый здесь термин «синтетический» в отношении, например, синтетической молекулы нуклеиновой кислоты, синтетического гена или синтетического пептида, относится к молекуле нуклеиновой кислоты или молекуле полипептида, которые получают рекомбинантными методами и / или методами химического синтеза. .

В данном контексте остатки встречающихся в природе α -аминокислот представляют собой остатки тех 20 α -аминокислот, встречающихся в природе, которые включены в белок путем специфического распознавания заряженной молекулы тРНК ее родственным кодоном мРНК у человека.

Используемый здесь термин «полипептид» относится к двум или более аминокислотам, соединенным ковалентно. Термины «полипептид» и «белок» используются здесь взаимозаменяемо.

Используемый здесь термин «пептид» относится к полипептиду, который имеет длину от 2 до примерно или 40 аминокислот.

Используемый здесь термин «аминокислота» означает органическое соединение, содержащее аминогруппу и группу карбоновой кислоты. Полипептид содержит две или более аминокислот. Для целей настоящего описания аминокислоты, содержащиеся в

предоставленных антителах, включают двадцать встречающихся в природе аминокислот (см. Таблицу ниже), неприродные аминокислоты и аналоги аминокислот (например, аминокислоты, в которых α -углерод имеет боковую цепь). В данном контексте аминокислоты, которые встречаются в различных аминокислотных последовательностях полипептидов, представленных в данном документе, идентифицируются в соответствии с их хорошо известными трехбуквенными или однобуквенными сокращениями (см. Таблицу ниже). Нуклеотиды, которые встречаются в различных молекулах и фрагментах нуклеиновых кислот, обозначаются стандартными однобуквенными обозначениями, обычно используемыми в данной области.

Используемый здесь термин «аминокислотный остаток» относится к аминокислоте, образованной в результате химического переваривания (гидролиза) полипептида по его пептидным связям. Описанные здесь аминокислотные остатки обычно находятся в L-изомерной форме. Остатки в изомерной форме «D» могут быть заменены на любой остаток L-аминокислоты при условии, что желаемое функциональное свойство сохраняется за полипептидом. NH_2 относится к свободной аминогруппе, присутствующей на amino-конце полипептида. COOH относится к свободной карбоксильной группе, присутствующей на карбоксильном конце полипептида. В соответствии со стандартной номенклатурой полипептидов, описанной в *J Biol. Chem.*, 243: 3557-59 (1968) и принятый в 37 CFR §§ 1.821 - 1.822, сокращения для аминокислотных остатков показаны в следующей таблице:

Таблица соответствия

СИМВОЛ		АМИНОКИСЛОТА
1 буква	3 буквы	
Y	Tyr	Тирозин
G	Gly	Глицин
F	Phe	Фенилаланин
M	Met	Метионин
A	Ala	Аланин
S	Ser	Серин
I	Ile	Изолейцин
L	Leu	Лейцин
T	Thr	Треонин
V	Val	Валин

СИМВОЛ		
P	Pro	Пролин
K	Lys	Лизин
H	His	Гистидин
Q	Gln	Глутамин
E	Glu	Глутамовая кислота
Z	Glx	Глутамовая кислота и/или глутамин
W	Trp	Триптофан
R	Arg	Аргинин
D	Asp	Аспаргиновая кислота
N	Asn	Аспаргин
B	Asx	Аспаргиновая кислота и/или аспаргин
C	Cys	Цистеин
X	Xaa	Неизвестные или другие

Все последовательности аминокислотных остатков, представленные здесь формулой, имеют ориентацию слева направо в обычном направлении amino-конца к карбоксильному концу. Выражение "аминокислотный остаток" определяется как включающее в себя аминокислоты, перечисленные в приведенной выше Таблице Соответствия, модифицированные, неприродные и необычные аминокислоты. Пунктирная линия в начале или конце аминокислотной последовательности остатка указывает на пептидную связь с другой последовательностью одного или нескольких аминокислотных остатков или с аминоконцевой группой, такой как NH₂, или с карбоксиконцевой группой, такой как COOH.

В пептиде или белке подходящие консервативные замены аминокислот известны специалистам в данной области и обычно могут быть сделаны без изменения биологической активности получаемой молекулы. Специалисты в данной области техники признают, что обычно единичные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида существенно не изменяют биологическую активность (см. например, Watson et Al. Molecular Biology of The Gene, 4 Th Edition, 1987, the Benjamin/Cummings Pub. Co, p 224).

Такие замены могут быть выполнены в соответствии с примерными заменами, приведенными в следующей таблице:

Примеры консервативных аминокислотных замен

Первоначальный остаток	Пример консервативной замены
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Другие замены также допустимы и могут быть определены эмпирически или в соответствии с другими известными консервативными или неконсервативными заменами.

Используемый здесь термин «встречающиеся в природе аминокислоты» относится к 20 L-аминокислотам, которые встречаются в полипептидах.

Используемый здесь термин «неприродная аминокислота» относится к органическому соединению, которое имеет структуру, аналогичную природной аминокислоте, но

структурно модифицировано для имитации структуры и реакционной способности природной аминокислоты. Таким образом, неприродные аминокислоты включают, например, аминокислоты или аналоги аминокислот, отличные от 20 встречающихся в природе аминокислот, и включают, но не ограничиваются ими, D-стереоизомеры аминокислот. Примеры неприродных аминокислот известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, 2-аминоадипиновую кислоту (Aad), 3-аминоадипиновую кислоту (bAad), P-аланин / p-аминопропионовую кислоту. кислота (Bala), 2-аминомасляная кислота (Abu), 4-аминомасляная кислота / пиперидиновая кислота (4Abu), 6-аминокапроновая кислота (Acp), 2-аминогептановая кислота (Ahe), 2-аминоизомаляная кислота (Aib),(Apm), 2,4-диаминомасляная кислота (Dbu), десмозин (Des), 2,2'-диаминопимелиновая кислота (Dpm), 2,3-диаминопропионовая кислота (Dpr), N-этилглицин (EtGly), N-этиласпарагин (EtAsn), гидроксизин (Hyl), алло-гидроксизин (Ahyl), 3-гидроксипролин (3 Hup), 4-гидроксипролин (4Hup), изодесмозин (Ide), алло-изолейцин (Aile), N-метилглицин, саркозин (MeGlycine), N-Метилизолейцин (Melle), 6-N-Метиллизин (MeLys), N-Метилвалин (MeVal), Норвалин (Nva), Норлейцин (Nle) и Орнитин (Orn).

В данном контексте конструкция ДНК представляет собой одно- или двухцепочечную, линейную или кольцевую молекулу ДНК, которая содержит сегменты ДНК, объединенные и сопоставленные таким образом, который не встречается в природе. Конструкции ДНК существуют в результате действий человека и включают клоны и другие копии молекул.

В данном контексте сегмент ДНК представляет собой часть более крупной молекулы ДНК, имеющей определенные атрибуты. Например, сегмент ДНК, кодирующий указанный полипептид, представляет собой часть более длинной молекулы ДНК, такой как плазида или фрагмент плазмиды, который при считывании в направлении с 5 'на 3' кодирует последовательность аминокислот указанного полипептида.

Используемый здесь термин полинуклеотид означает одноцепочечный или двухцепочечный полимер дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидных оснований, читаемых от 5 'до 3' конца. Полинуклеотиды включают РНК и ДНК и могут быть выделены из природных источников, синтезированы *in vitro* или получены из комбинации природных и синтетических молекул. Длина полинуклеотидной молекулы в данном документе дана в единицах нуклеотидов (сокращенно «nt») или пар оснований (сокращенно «bp»). Термин «нуклеотиды» используется для одно- и двухцепочечных

молекул, если это позволяет контекст. Когда этот термин применяется к двухцепочечным молекулам, он используется для обозначения общей длины и будет пониматься как эквивалентный термину пары оснований. Специалистам в данной области будет понятно, что две нити двухцепочечного полинуклеотида могут немного отличаться по длине и что их концы могут быть расположены в шахматном порядке; таким образом, все нуклеотиды в двухцепочечной полинуклеотидной молекуле не могут быть спарены. Такие неспаренные концы, как правило, не превышают в длину 20 нуклеотидов.

В данном контексте получение рекомбинантными методами означает использование хорошо известных методов молекулярной биологии для экспрессии белков, кодируемых клонированной ДНК.

В данном контексте «гетерологичная нуклеиновая кислота» означает нуклеиновую кислоту, которая кодирует продукты (т.е. РНК и / или белки), которые обычно не продуцируются *in vivo* клеткой, в которой она экспрессируется, или нуклеиновая кислота, которая находится в локусе, в котором она обычно не встречается или опосредует или кодирует медиаторы, которые изменяют экспрессию эндогенной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, путем воздействия на транскрипцию, трансляцию или другие регулируемые биохимические процессы. Гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, также называется чужеродной нуклеиновой кислотой. Любая нуклеиновая кислота, такая как ДНК, которую специалист в данной области распознает или считает гетерологичной или чужеродной по отношению к клетке, в которой она экспрессируется, в данном документе охвачена понятием гетерологичной нуклеиновой кислоты; Гетерологичная нуклеиновая кислота включает экзогенно добавленную нуклеиновую кислоту, которая также экспрессируется эндогенно.

Примеры гетерологичной нуклеиновой кислоты в данном документе включают, но не ограничиваются этим, нуклеиновую кислоту, которая кодирует РНК_i, или иммуностимулирующий белок, такой как цитокин, который обеспечивает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли, или который кодирует антитело, фрагмент антитела или другой терапевтический продукт или терапевтический белок. В иммуностимулирующих бактериях гетерологичная нуклеиновая кислота обычно кодируется на введенной плазмиде, но она может быть введена в геном бактерии, например, промотор, который изменяет экспрессию бактериального продукта. Гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, включает нуклеиновую кислоту, которая может некоторым образом опосредовать экспрессию ДНК, кодирующей

терапевтический продукт, или она может кодировать продукт, такой как пептид или РНК, который каким-либо образом опосредует, напрямую или косвенно, экспрессию терапевтического продукта.

Используемый здесь термин клеточная терапия включает доставку клеток субъекту для лечения заболевания или состояния. Клетки, которые могут быть аллогенными или аутологичными, модифицируются *ex vivo*, например, путем инфицирования клеток иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе, так что они доставляют или экспрессируют продукты при введении субъекту.

В данном контексте генетическая терапия включает перенос гетерологичной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, в определенные клетки, такие как клетки-мишени, млекопитающего, в частности человека, с расстройством или состоянием, для которого требуется такая терапия. Нуклеиновая кислота, такая как ДНК, вводится в выбранные клетки-мишени таким образом, чтобы экспрессировалась гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, и производились терапевтические продукты, кодируемые ею. Генетическая терапия также может использоваться для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей генный продукт, который заменяет дефектный ген или дополняет генный продукт, продуцируемый млекопитающим или клеткой, в которую он введен. Введенная нуклеиновая кислота может кодировать терапевтическое соединение, такое как фактор роста или его ингибитор, или фактор некроза опухоли или его ингибитор, такой как его рецептор, который обычно не продуцируется у млекопитающего-хозяина или не продуцируется в терапевтически эффективных количествах или в терапевтически полезное время. Гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, кодирующая терапевтический продукт, может быть модифицирована перед введением в клетки пораженного хозяина, чтобы усилить или иным образом изменить продукт или его экспрессию. Генетическая терапия может также включать доставку ингибитора, репрессора или другого модулятора экспрессии гена.

Используемый здесь термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полипептиды продуцируются транскрипцией и трансляцией полинуклеотидов. Уровень экспрессии полипептида можно оценить с помощью любого метода, известного в данной области, включая, например, способы определения количества полипептида, продуцируемого клеткой-хозяином. Такие методы могут включать, но не ограничиваются ими, количественное определение полипептида в клеточном лизате с помощью ELISA,

окрашивание кумасси синим после гель-электрофореза, анализ белка Лоури и анализ белка Брэдфорда.

В данном контексте «клетка-хозяин» представляет собой клетку, которая используется для приема, поддержания, воспроизведения и / или амплификации вектора. Клетка-хозяин также может использоваться для экспрессии полипептида, кодируемого вектором. Нуклеиновая кислота, содержащаяся в векторе, реплицируется при делении клетки-хозяина, тем самым амплифицируя нуклеиновые кислоты.

В данном контексте «вектор» представляет собой реплицируемую нуклеиновую кислоту, из которой один или несколько гетерологичных белков могут быть экспрессированы, когда вектор трансформируется в подходящую клетку-хозяин. Ссылка на вектор включает те векторы, в которые может быть введена нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид или его фрагмент, обычно путем рестрикции и лигирования. Ссылка на вектор также включает те векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, такой как модифицированное антитело против EGFR. Вектор используется для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в клетку-хозяин для амплификации нуклеиновой кислоты или для экспрессии / отображения полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. Векторы обычно остаются эписомальными, но могут быть сконструированы таким образом, чтобы осуществлять интеграцию гена или его части в хромосому генома. Также рассматриваются векторы, которые представляют собой искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы дрожжей и искусственные хромосомы млекопитающих. Выбор и использование таких носителей хорошо известны специалистам в данной области. Вектор также включает «вирусные векторы» или «виральные векторы». Виральные векторы - это сконструированные вирусы, которые оперативно связаны с экзогенными генами для переноса (в качестве транспортных средств или переносчиков) экзогенных генов в клетки.

Используемый здесь термин «вектор экспрессии» включает векторы, способные экспрессировать ДНК, которая оперативно связана с регуляторными последовательностями, такими как промоторные области, которые способны влиять на экспрессию таких фрагментов ДНК. Такие дополнительные сегменты могут включать промоторные и терминаторные последовательности и могут включать один или несколько источников репликации, один или несколько селективируемых маркеров, энхансер, сигнал полиаденилирования и т.п. Векторы экспрессии обычно происходят из плазмидной или вирусной ДНК или могут содержать элементы обоих. Таким образом, вектор экспрессии

относится к конструкции рекомбинантной ДНК или РНК, такой как плаزمид, фаг, рекомбинантный вирус или другой вектор, который при введении в соответствующую клетку-хозяин приводит к экспрессии клонированной ДНК. Подходящие векторы экспрессии хорошо известны специалистам.

Используемый здесь термин «первичная последовательность» относится к последовательности аминокислотных остатков в полипептиде или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты.

Используемый здесь термин «идентичность последовательности» относится к количеству идентичных или подобных аминокислот или нуклеотидных оснований при сравнении тестируемого и эталонного полипептида или полинуклеотида. Идентичность последовательностей может быть определена путем сравнения последовательностей нуклеиновых кислот или последовательностей белка для идентификации областей сходства или идентичности. Для целей настоящего описания идентичность последовательностей обычно определяется сравнением для идентификации идентичных остатков. Сравнение может быть локальным или глобальным. Между сравниваемыми последовательностями можно определить совпадения, несоответствия и пробелы. Пробелы представляют собой нулевые аминокислоты или нуклеотиды, вставленные между остатками сравниваемых последовательностей, так что идентичные или похожие символы выровнены. Как правило, могут быть внутренние и конечные зазоры. При использовании учетов пропусков идентичность последовательности может быть определена без учета конечных пропусков. В качестве альтернативы идентичность последовательности может быть определена без учета пробелов, поскольку количество идентичных положений / длина всей сравненной последовательности $\times 100$.

Используемый здесь термин «глобальное сравнение» означает сравнение, при котором две последовательности сравниваются от начала до конца, сравнивая каждую букву в каждой последовательности только один раз. Сравнение производится независимо от того, есть ли сходство или идентичность между последовательностями. Например, 50% идентичности последовательностей на основе «глобального сравнения» означает, что при сравнении полных последовательностей двух сравниваемых последовательностей, каждая из которых имеет длину 100 нуклеотидов, 50% остатков являются одинаковыми. Понятно, что глобальное сравнение также может использоваться для определения идентичности последовательностей, даже если длина сравненных последовательностей не одинакова. Различия в концах последовательностей будут приниматься во внимание при

определении идентичности последовательностей, если не выбрано «отсутствие учета концевых зазоров». В общем, глобальное сравнение используется для последовательностей, которые имеют значительное сходство по большей части своей длины. Примеры алгоритмов для выполнения глобального сравнения включают алгоритм Нидлмана-Вунша (Needlemanetal. (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443). Примерные программы для выполнения глобального сравнения общедоступны и включают Инструмент глобального сравнения последовательностей, доступный на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (ncbi.nlm.nih.gov/), а также программу, доступную по адресу: deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

В данном контексте «локальное сравнение» означает сравнение, при котором сравнивают две последовательности, но при этом учитывают только те части последовательностей, которые имеют сходство или идентичность.

Следовательно, локальное сравнение определяет, присутствуют ли подсегменты одной последовательности в другой последовательности. Если сходства нет, сравнение не происходит. Алгоритмы локального сравнения включают BLAST или алгоритм Смита-Уотермана (*Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)). Например, 50%-ная идентичность последовательностей на основе «локального сравнения» означает, что при сравнении полной последовательности двух сравниваемых последовательностей любой длины область сходства или идентичности длиной 100 нуклеотидов имеет 50% остатков, которые являются такими же в области сходства или идентичности.

Для целей настоящего описания идентичность последовательности может быть определена с помощью стандартных программ алгоритмов сравнения, используемых с учетом пропусков по умолчанию, установленными каждым поставщиком. Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать: (1) унарную матрицу сравнения (содержащую значение 1 для тождеств и 0 для неидентичностей) и взвешенную матрицу сравнения Грибсков и др. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745, как описано Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) значение 3,0 за каждый пропуск и дополнительно 0,10 за каждый символ в каждом пропуске; и (3) отсутствие учета пропусков на концах. Имеют ли какие-либо две молекулы нуклеиновой кислоты нуклеотидные последовательности или какие-либо два полипептида имеют аминокислотные последовательности, которые идентичны по крайней мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, можно определить на основе использования

известных компьютерных алгоритмов (см., например, wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software, содержащий ссылки на десятки известных и общедоступных баз данных и программ сравнения). Как правило, для целей настоящего документа идентичность последовательностей определяется с использованием компьютерных алгоритмов на основе глобального сравнения, таких как инструмент глобального сравнения последовательностей Needleman-Wunsch, доступный от NCBI / BLAST(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome); LAlign (Уильям Пирсон, реализующий алгоритм Хуанга и Миллера (Adv. Appl. Math. (1991) 12: 337-357)); и программа от XiaoquiHuang доступна nadeepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html. Как правило, полноразмерная последовательность каждого из сравниваемых полипептидов или нуклеотидов сравнивается по всей длине каждой последовательности при глобальном сравнении. Локальное сравнение также можно использовать, когда сравниваемые последовательности по существу имеют одинаковую длину.

Таким образом, используемый здесь термин «идентичность» представляет собой сравнение или сопоставление между тестируемым и эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В одном неограничивающем примере выражение «по меньшей мере на 90% идентично» относится к проценту идентичностей от 90 до 100% относительно эталонного полипептида или полинуклеотида. Идентичность на уровне 90% или более указывает на тот факт, что, если предположить, что в качестве примера сравниваются тестируемый и эталонный полипептид или полинуклеотид длиной 100 аминокислот или нуклеотидов, не более 10% (т.е. 10 из 100) аминокислот или нуклеотидов в тестируемом полипептиде или полинуклеотиде отличаются от таковых в эталонном полипептиде. Аналогичные сравнения можно провести между тестируемыми и контрольными полинуклеотидами. Такие различия могут быть представлены как точечные мутации, случайным образом распределенные по всей длине аминокислотной последовательности, или они могут быть сгруппированы в одном или нескольких местах различной длины вплоть до максимально допустимой, например, разницы по аминокислотам 10/100 (приблизительно 90 % идентичности). Различия также могут быть связаны с делециями или усечением аминокислотных остатков. Различия определяются как замены, вставки или делеции нуклеиновых кислот или аминокислот. В зависимости от длины сравниваемых последовательностей на уровне гомологии или идентичности выше примерно 85-90% результат может быть независимым от программы и набора

параметров; такие высокие уровни идентичности можно легко оценить, часто без использования программного обеспечения.

Используемый здесь термин «заболевание или нарушение» относится к патологическому состоянию в организме, возникающему в результате причины или состояния, включая, помимо прочего, инфекции, приобретенные состояния, генетические состояния и характеризующееся идентифицируемыми симптомами.

Используемый здесь термин «лечение» субъекта с заболеванием или состоянием означает, что симптомы субъекта частично или полностью облегчаются или остаются неизменными после лечения.

В данном контексте «лечение» относится к любым эффектам, которые облегчают симптомы заболевания или расстройства. Лечение включает профилактику, терапию и / или лечение.

Лечение также включает любое фармацевтическое применение любой иммуностимулирующей бактерии или композиции, представленной в данном документе.

Используемый здесь термин «профилактика» относится к предотвращению потенциального заболевания и / или предотвращению ухудшения симптомов или прогрессирования заболевания.

Используемый здесь термин «предотвращение» или профилактика и их грамматически эквивалентные формы относятся к методам, в которых снижается риск или вероятность развития заболевания или состояния.

Используемый здесь термин «фармацевтически эффективный агент» включает любой терапевтический агент или биоактивные агенты, включая, но не ограничиваясь, например, анестетики, сосудосуживающие агенты, диспергирующие агенты и обычные терапевтические лекарства, включая низкомолекулярные лекарства и терапевтические белки.

Используемый здесь термин «терапевтический эффект» означает эффект, возникающий в результате лечения субъекта, который изменяет, обычно улучшает или облегчает симптомы заболевания или состояния или который излечивает заболевание или состояние.

Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащего соединение, которое, по крайней мере, достаточно для получения терапевтического эффекта после введения субъекту. Следовательно, это количество, необходимое для предотвращения, лечения, облегчения, купирования или частичного купирования симптома заболевания или расстройства.

Используемый здесь термин «терапевтическая эффективность» относится к способности агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, оказывать терапевтический эффект у субъекта, которому вводили агент, соединение, материал или композицию, содержащую соединение.

В контексте настоящего описания «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная доза» относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащих соединение, которое при введении субъекту будет оказывать намеченный профилактический эффект, например, предотвращение или отсрочка возникновения или повторного появления заболевания или симптомов, снижение вероятности возникновения или повторного возникновения заболевания или симптомов или снижение частоты вирусной инфекции. Полный профилактический эффект не обязательно наступает при введении одной дозы, а может проявляться только после введения серии доз. Таким образом, профилактически эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений.

Используемый в данном документе термин «улучшение симптомов конкретного заболевания или расстройства с помощью лечения, такого как введение фармацевтической композиции или другого терапевтического средства», относится к любому уменьшению, постоянному или временному, длительному или временному, симптомов, которые могут быть приписываемые или связанные с введением композиции или терапевтического средства.

Используемый здесь термин «противораковый агент» относится к любому агенту, который является деструктивным или токсичным для злокачественных клеток и тканей. Например, противораковые агенты включают агенты, которые убивают раковые клетки или иным образом подавляют или ухудшают рост опухолей или раковых

клеток. Типичные противораковые агенты представляют собой химиотерапевтические агенты.

Используемый здесь термин «терапевтическая активность» относится к активности терапевтического полипептида *in vivo*. Обычно терапевтическая активность - это активность, связанная с лечением заболевания или состояния.

В контексте настоящего описания термин «субъект» относится к животному, включая млекопитающее, такое как человек.

В контексте настоящего описания термин "пациент" относится к человеку.

В контексте настоящего описания термин «животное» включает любое животное, такое как, но не ограничиваясь ими, приматы, включая людей, горилл и обезьян; грызуны, такие как мыши и крысы; птица, такая как куры; жвачные животные, такие как козы, коровы, олени, овцы; свиньи и другие животные. Животные, не относящиеся к человеку, исключают человека как рассматриваемого животного. Предлагаемые здесь полипептиды происходят из любого источника, животного, растительного, прокариотического и грибкового. Большинство полипептидов животного происхождения, включая происхождение от млекопитающих.

Используемый здесь термин «композиция» относится к любой смеси. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водный, неводный или любая их комбинация.

Используемый здесь термин «комбинация» относится к любой ассоциации между двумя или более элементами. Комбинация может быть двумя или более отдельными предметами, например двумя композициями или двумя коллекциями, их смесью, например единой смесью двух или более предметов, или любой их вариацией. Элементы комбинации обычно функционально связаны или связаны.

В данном контексте комбинированная терапия относится к введению двух или более различных терапевтических средств. Различные терапевтические средства или терапевтические агенты могут быть предоставлены и введены отдельно, последовательно, периодически или могут быть предоставлены в одной композиции.

В данном контексте набор представляет собой упакованную комбинацию, которая может включать другие элементы, такие как дополнительные реагенты и инструкции по

использованию комбинации или их элементов, для цели, включая, но не ограничиваясь, активацию, введение, диагностику и оценку биологической активности или свойств.

Используемый здесь термин «стандартная доза» относится к физически дискретным единицам, подходящим для людей и животных и упакованным индивидуально, как известно в данной области.

Используемый здесь термин «состав для однократной дозы» относится к составу для прямого введения.

Используемый здесь термин «состав с множеством доз» относится к составу, который содержит несколько доз терапевтического агента и который можно вводить напрямую для получения нескольких разовых доз терапевтического агента. Дозы можно вводить в течение минут, часов, недель, дней или месяцев. Составы с несколькими дозами позволяют регулировать дозу, объединять дозы и / или разделять дозы. Поскольку со временем используются составы с несколькими дозами, они обычно содержат один или несколько консервантов для предотвращения роста микробов.

Используемый здесь термин «промышленное изделие» означает продукт, который производится и продается. Используемый в данной заявке термин предназначен для охвата любой из представленных здесь композиций, содержащихся в упаковочных изделиях.

Используемый здесь термин «жидкость» относится к любой композиции, которая может течь. Таким образом, жидкости включают композиции, которые находятся в форме полутвердых веществ, паст, растворов, водных смесей, гелей, лосьонов, кремов и других подобных композиций.

В данном контексте выделенный или очищенный полипептид или белок (например, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) или его биологически активная часть (например, выделенный антигенсвязывающий фрагмент) практически не содержат клеточного материала или других загрязняющих веществ, белков из клетки или ткани, из которых получен белок, или практически не содержат химических предшественников или других химикатов при химическом синтезе. Можно определить, что препараты практически не содержат примесей, легко определяемых стандартными методами анализа, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и

высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), используемые специалистами в данной области для оценки такой чистоты, или достаточно чистые, чтобы дальнейшая очистка не изменяла заметно физические и химические свойства, такие как ферментативная и биологическая активность вещества. Способы очистки соединений для получения по существу химически чистых соединений известны специалистам в данной области. Однако по существу химически чистое соединение может быть смесью стереоизомеров. В таких случаях дальнейшая очистка может повысить удельную активность соединения. Используемый здесь термин «клеточный экстракт» или «лизат» относится к препарату или фракции, которые получены из лизированной или разрушенной клетки.

Используемый здесь термин «контроль» относится к образцу, который по существу идентичен тестируемому образцу, за исключением того, что он не обрабатывается с использованием тестового параметра, или, если это образец плазмы, он может быть получен от нормального добровольца, не затронутого условием интереса. Контроль также может быть внутренним контролем.

Используемые здесь формы единственного числа включают в себя множественное число, если контекст явно не диктует иное. Так, например, ссылка на полипептид, содержащий «домен иммуноглобулина», включает полипептиды с одним или несколькими доменами иммуноглобулина.

Используемый здесь термин «или» используется для обозначения «и / или», если явно не указано, что относится только к альтернативам или альтернативы являются взаимоисключающими.

Используемые здесь диапазоны и количества могут быть выражены как «около» определенного значения или диапазона. Примерно также включает точную сумму. Следовательно, «около 5 аминокислот» означает «около 5 аминокислот», а также «5 аминокислот».

Используемые здесь термины «может» или «возможно» означают, что описываемое далее событие или обстоятельство происходит или не происходит, и что описание включает случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда это не происходит. Например, вариантная часть означает, что часть является вариантной или невариантной.

Используемые здесь сокращения для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, если не указано иное, соответствуют их общепринятому использованию, признанным сокращениям или Комиссии IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре (см. *Biochem.* (1972) 11 (9): 1726-1732).

Для ясности раскрытия, а не в качестве ограничения, подробное описание разделено на следующие подразделы.

Б. ОБЗОР ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Предложены модифицированные бактерии, называемые здесь иммуностимулирующими бактериями, которые накапливаются и/или реплицируются в (т.е. колонизирует) опухоли, находящиеся в опухолииммунные клетки и/или микроокружение опухоли (ТМЕ); и/или индуцируют меньшую гибель клеток в клетках-резидентных иммунных клетках; и/или кодируют терапевтические продукты, такие как противоопухолевые агенты, иммуностимулирующие белки и ингибиторные РНК (RNAi), такие как shRNA и микроРНК (miРНК), которые нацелены на гены, которые ингибируют, подавляют или прекращают опухолевый эффект. Штаммы бактерий для модификации являются любыми пригодными для терапевтического применения. Модифицированные иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем описании, являются, которые используются для лечения рака и в способах лечения рака. Бактерии модифицируют для таких применений и способов.

Предложенные здесь иммуностимулирующие бактерии модифицируют путем делеции или модификации бактериальных генов для ослабления их воспалительных ответов, повышения их переносимости, повышения их устойчивости к комплементу, повышения их инфекционности, накопления или колонизации опухолей, находящихся в опухоли иммунных клеток и/или ТМЕ, снижения их индукции гибели иммунных клеток (например, уменьшения пироптоза) и для усиления противоопухолевых иммунных ответов у хозяев, обработанных бактериями. Модификации также могут быть в генах, кодируемых плазмидой в бактериях. Например, бактерии могут быть ауксотрофными для аденозина, или аденозина и аденина, и плазмиды, кодирующие терапевтические продукты, такие как иммуностимулирующие белки, антитела или РНК, которые ингибируют гены иммунной контрольной точки в хозяине, включены в бактерии.

Ослабление воспалительных ответов на бактерии может быть осуществлено путем делеции гена *msbB*, который снижает TNF-альфа в хозяине, и/или выбивание генов флагеллина и/или делецию/мутацию *ragP*. Бактерии модифицируют так, чтобы стимулировать противоопухолевую активность хозяина, например, путем добавления плазмид, кодирующих иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, или РНКi, которые нацелены на иммунные контрольные точки хозяина, и путем добавления нуклеиновой кислоты со звеньями CpGs/CpG.

Бактериальные штаммы могут быть аттенуированными штаммами или штаммами, которые аттенуированы стандартными методами или которые, в силу представленных здесь модификаций, ослаблены, так как их способность к колонизации ограничена в первую очередь иммунопривилегированными тканями и органами, особенно иммунными и опухолевыми клетками. в том числе солидные опухоли. Бактерии включают, но не ограничиваются ими, например, штаммы *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *E. coli*, and *Bifidobacteriae*. Например, они включают *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, and *Salmonella enteritidis*. Другие подходящие бактерии включают *Rickettsia*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Vibrio*, *Bacillus*, and *Erysipelothrix*. Например, *Rickettsia Rickettsiae*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugamuchi*, *Rickettsia mooseri*, *Rickettsia sibirica*, *Bordetella bronchiseptica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Francisella tularensis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Citrobacter freundii*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus sordani*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium intracellulare*, *Legionella pneumophila*, *Rhodococcus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter mustelae*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Yersinia enterocolitica*, *Rochalimaea quintana*, и *Agrobacterium tumefaciens*.

Бактерии накапливаются за счет одного или нескольких свойств, включая диффузию, миграцию и хемотаксис в иммунопривилегированные ткани или органы или среды, среды, которые обеспечивают питательные вещества или другие молекулы, для которых они являются ауксотрофными, и / или среды, содержащие реплицирующиеся клетки, которые обеспечивают среду, подходящую для проникновения и размножения бактерий. Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, и виды, которые влияют на такую терапию, включают виды *Salmonella*, *Listeria* и *E. coli*.

Бактерии содержат плазмиды, которые кодируют терапевтический белок, такой как иммуностимулирующий белок, или ингибитор иммунных контрольных точек, или другой иммуностимулирующий или блокирующий иммуносупрессию продукт. Продукты включают антитела, такие как фрагменты антител, и нанотела, РНКi, такие как одна или несколько РНК-конструкций с короткой шпилькой (sh), микроРНК или другие формы РНКi, экспрессия которых ингибирует, нарушает или подавляет экспрессию генов-мишеней. или иным образом увеличивает иммунные ответы или снижает иммуносупрессию. Терапевтические продукты экспрессируются под контролем эукариотического промотора, такого как промотор РНК-полимеразы (RNAP) II или III. Обычно промоторы RNAPIII (также обозначаемые как POLIII) являются конститутивными, и RNAP II (также обозначаемый также POLII) может регулироваться. В некоторых примерах shРНК нацелены на ген TREX1, для ингибирования его экспрессии.

В некоторых вариантах реализации плазмиды могут кодировать множество терапевтических продуктов, включая иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, и молекулы РНКi, такие как shРНК, и антитела, включая нанотела, которые ингибируют два или более генов иммунных контрольных точек, таких как TREX1, PD -L1, VISTA, SIRPa, CTNNB1, TGF-бета, CD47 и / или VEGF и любые другие, известные специалистам в данной области. Когда кодируется множество терапевтических продуктов, экспрессия каждого обычно находится под контролем другого промотора.

Среди представленных здесь бактерий есть бактерии, модифицированные так, что они являются ауксотрофными по аденозину. Этого можно достичь путем модификации или удаления генов, участвующих в синтезе, метаболизме или транспорте пуринов. Например, нарушение гена *tsx* у видов *Salmonella*, таких как *Salmonellatyphi*, приводит к ауксотрофии аденозина. Аденозин является иммунодепрессивным и накапливается в опухолях до высоких концентраций; ауксотрофия по аденозину улучшает противоопухолевую активность бактерий, поскольку бактерии избирательно реплицируются в тканях, богатых аденозином.

Также представлены бактерии, модифицированные таким образом, что они имеют дефектный ген *asd*. Эти бактерии для использования *in vivo* модифицированы, чтобы включать в себя несущие функциональный ген *asd* на введенной плазмиде; это поддерживает отбор для плазмид, так что не требуется основанная на антибиотике система поддержания / отбора плазмид. Также предусмотрено использование штаммов с дефектом *asd*, которые не содержат функционального гена *asd* на плазмиде и, таким

образом, сконструированы таким образом, чтобы быть автолитическими в организме хозяина.

Также представлены бактерии, которые модифицированы так, что они не способны производить жгутики. Это может быть достигнуто путем модификации бактерий путем удаления генов, кодирующих субъединицы флагеллина. Модифицированные бактерии, лишённые флагеллина, менее воспалительные, поэтому лучше переносятся и вызывают более сильный противоопухолевый ответ.

Также представлены бактерии, которые модифицированы для выработки листериолизина O (LLO), который улучшает доставку плазмиды в фагоцитарные клетки.

Также предоставлены бактерии, модифицированные для несения низкокопийной CpG-содержащей плазмиды. Плазида также может включать другие модификации и может кодировать терапевтические продукты, такие как иммуностимулирующие белки, антитела и их фрагменты, а также РНКi.

Бактерии также можно модифицировать для роста таким образом, чтобы бактерии, если они относятся к виду сальмонелл, экспрессировали меньше токсичных генов SPI-1 (участок патогенности сальмонелл). У *Salmonella* гены, ответственные за вирулентность, инвазию, выживаемость и распространение вне кишечника, расположены на участках патогенности сальмонелл (SPI).

Бактерии включают плазмиды, кодирующие РНКi, такие как shРНК или микроРНК, которые ингибируют контрольные точки, такие как только PD-L1 или TREX1, или TREX1 одна или несколько вторых контрольных точек иммунитета. Бактерии могут быть дополнительно модифицированы для получения других желаемых признаков, в том числе для отбора поддерживающих плазмид, особенно для отбора без антибиотиков, для приготовления штаммов. Иммуностимулирующие бактерии могут кодировать терапевтические полипептиды, включая противоопухолевые терапевтические полипептиды и агенты.

Примерами иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, являются виды *Salmonella*. Примерами бактерий для модификации, как описано в данном документе, являются сконструированные штаммы *Salmonellatyphimurium*, такие как штамм YS1646 (ATCC, каталог №202165; также обозначаемый как VNP20009, см. публикацию международной заявки PCT WO 99/13053), который сконструирован с

плазмидами, чтобы дополнить нокаут гена *asd* и поддержание плазмиды без антибиотиков.

В данном документе представлены модифицированные иммуностимулирующие бактериальные штаммы, которые являются ауксотрофными по аденозину, а также фармацевтические композиции, содержащие такие штаммы, составленные для введения субъекту, такому как человек, для использования в способах лечения опухолей и рака.

Также предоставлены способы или применения иммуностимулирующих бактерий или фармацевтических композиций, содержащих бактерии, где лечение включает комбинированную терапию, в которой вводят второй противораковый агент или лечение, управляемый. Второй противораковый агент или лечение можно вводить до, одновременно с иммуностимулирующими бактериями или фармацевтической композицией или периодически с ними, и включает иммунотерапию, такую как антитело или фрагмент антитела; онколитическую вирусную терапию; лучевую терапию; химиотерапию. Иммунотерапия может включать, например, введение анти-PD-1, или анти-PD-L1, или анти-CTLA4, или анти-IL6, или анти-VEGF, или анти-VEGFR, или анти-VEGFR2 антитела, или их фрагменты. Комбинированная терапия также может включать хирургическое вмешательство.

Сконструированные иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, содержат множество синергетических механизмов для индукции иммунной реактивации холодных опухолей и для стимулирования опухолевых антиген-специфических иммунных ответов, в то же время ингибируя пути иммунных контрольных точек, которые опухоль использует для подрыва и уклонения от устойчивого противоопухолевого иммунитета. Улучшенное нацеливание на опухоль за счет ауксотрофии аденозина и усиление разрушения сосудов повысили эффективность, а локализацию воспаления ограничили системное воздействие цитокинов и аутоиммунная токсичность, наблюдаемая при использовании других методов иммунотерапии. Примером бактерий, модифицированных таким образом, являются штаммы *S. typhimurium*, включая такие модификации штамма YS1646, в частности штаммы *asc*.

Например, как предусмотрено в данном документе, иммуностимулирующие бактерии обеспечивают опосредованное shRNA нарушение гена PD-L1. На мышах было показано, что нарушение гена PD-L1 может улучшить колонизацию опухоли. Было показано, например, что инфекция *S. typhimurium* у мышей с нокаутом PD-L1 приводит к

увеличению бактериальной нагрузки в 10 раз, чем у мышей дикого типа (см. Lee et al. (2010) *Immunol.* 185: 2442 -2449). Следовательно, PD-L1 защищает от инфекции *S. typhimurium*. В настоящем документе предложены иммуностимулирующие бактерии, такие как *S. typhimurium*, несущие плазмиды, способные к нокауту гена с опосредованным РНКi нокаутом TREX1, PD-L1 или PD-L1 и TREX1. Такие бактерии обеспечивают противоопухолевые эффекты благодаря комбинации двух независимых путей, которые приводят к усиленным и устойчивым противоопухолевым иммунным ответам в рамках одной терапии.

С. ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА

Иммуносупрессивная среда, обнаруженная в микроокружении опухоли (ТМЕ), является движущей силой инициации и прогрессирования опухоли. Рак возникает после того, как иммунная система не может контролировать и сдерживать опухоли. Множественные опухолеспецифические механизмы создают опухолевую среду, в которой иммунная система вынуждена терпеть опухоли и их клетки вместо того, чтобы устранять их. Цель иммунотерапии рака - спасти естественную способность иммунной системы устранять опухоли. Острое воспаление, связанное с микробной инфекцией, веками наблюдалось со спонтанным устранением опухолей.

1. Иммунотерапия

Некоторыми клиническими иммунотерапевтическими методами лечения рака пытались нарушить баланс подавления иммунитета в сторону противоопухолевого иммунитета. Стратегии стимулирования иммунитета путем прямого введения цитокинов, таких как IL-2 и IFN- α , показали умеренный клинический ответ у меньшинства пациентов, вызывая при этом серьезные системные токсические эффекты, связанные с воспалением (Sharma et al. (2011) *Nat. Rev. Cancer* 11 : 805-812). Иммунная система выработала несколько сдержек и противовесов для ограничения аутоиммунитета, таких как повышающая регуляция белка запрограммированной смерти 1 (PD-1) на Т-клетках и его связывание с его родственным лигандом, лигандом запрограммированной смерти 1 (PD-L1), который экспрессируется как на представляющих антиген клетках (APC), так и на опухолевых клетках. Связывание PD-L1 с PD-1 нарушает сигнальные пути CD8⁺ Т-клеток, нарушая пролиферацию и эффекторную функцию CD8⁺ Т-клеток и индуцируя толерантность к Т-клеткам. PD-1 и PD-L1 являются двумя примерами многочисленных ингибирующих «иммунных контрольных точек», которые функционируют путем подавления иммунных

ответов. Другие ингибирующие иммунные контрольные точки включают цитотоксический связанный с Т-лимфоцитами белок 4 (CTLA-4), сигнальный регуляторный белок альфа (SIRPальфа), супрессор активации Т-клеток V-домена (VISTA), лиганд запрограммированной смерти 2 (PD-L2), индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO) 1 и 2, ген активации лимфоцитов 3 (LAG3), галектин-9, Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и HIM (TIGIT), Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-домен содержащий -3 (TIM-3, также известный как клеточный рецептор 2 вируса гепатита А (HAVCR2)), медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), CD39, CD73, B7-H3 (также известный как CD276), B7-H4, CD47, CD48, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD155, CD160, CD244 (2B4), ослабитель В- и Т-лимфоцитов (BTLA или CD272) и молекулы адгезии клеток, связанные с карциноэмбриональным антигеном (CEACAM1 или CD66a).

Антитела, предназначенные для блокирования иммунных контрольных точек, такие как анти-PD-1 (например, пембролизумаб, ниволумаб) и анти-PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб), имеют устойчивый успех в предотвращении анергии Т-клеток и нарушения иммунной толерантности. Лишь небольшая часть пролеченных пациентов демонстрирует пользу в лечении, и пациенты, у которых часто наблюдаются аутоиммунные токсикологические заболевания (см., Например, Ribas (2015) N Engl J Med 373: 1490-1492; Topalian et al. (2012) N Engl J Med 365 (5): 3443-3447). Это еще одно доказательство необходимости лечения, представленного в данном документе, более эффективного и менее токсичного.

В другой стратегии блокады контрольных точек ингибируют индукцию CTLA-4 на Т-клетках, которые связываются и ингибируют костимуляторные рецепторы на APC, такие как CD80 или CD86, конкурируя с дифференцировкой костимулирующего кластера 28 (CD28), который связывает те же рецепторы, но с меньшим сродством. Это блокирует стимулирующий сигнал от CD28, в то время как ингибирующий сигнал от CTLA-4 передается, предотвращая активацию Т-клеток (см. Phan et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 8372-8377). Анти-CTLA-4 терапия (например, ипилимумаб) имеет клинический успех и стойкость у некоторых пациентов, демонстрируя при этом еще большую частоту серьезных иммунных побочных эффектов (см., Например, Hodi et al. (2010) N. Engl. J. Med. 363: 711-723; Шадендорф и др. !. (2015) J. Clin. Oncol. 33: 1889-1894). Также было показано, что опухоли развивают резистентность к антителам против иммунных контрольных точек, что подчеркивает потребность в более длительных противоопухолевых методах лечения и предложено здесь.

2. Адоптивная иммунотерапия

Стремясь реактивировать холодную опухоль, чтобы сделать ее более иммуногенной, класс иммунотерапии, известный как адоптивная клеточная терапия (АКТ), включает в себя множество стратегий для использования иммунных клеток и их перепрограммирования для обеспечения противоопухолевой активности (Hinrichsetal. (2011) *Immunol. Rev.*240: 40-51). При терапии на основе дендритных клеток вводятся генно-инженерные дендритные клетки (ДК) с более иммуностимулирующими свойствами. Эти методы лечения не были успешными, потому что они не смогли сломить иммунную толерантность к раку (см., например, Rosenbergetal. (2004) *Nat. Med.* 12: 1279). Метод с использованием цельных облученных опухолевых клеток, содержащих эндогенные опухолевые антигены и колониестимулирующий фактор гранулоцитарных макрофагов (GM-CSF), для стимуляции рекрутирования DC, известный как GVAX, также потерпел неудачу в клинике из-за отсутствия способности нарушать толерантность к опухоли (Copieretal. al. (2010)*Curr. Opin. Mol. Ther.* 12:647-653). Отдельная терапия на основе аутологичных клеток, Sipuleucel-T (Provenge), была одобрена FDA в 2010 году для лечения резистентного к кастрации рака простаты. Она использует APC, полученные от пациента и повторно вооруженные для экспрессии антигена кислой фосфатазы простаты (PAP), чтобы стимулировать ответ Т-клеток, а затем повторно вводятся после лимфабляции. К сожалению, его более широкое распространение было ограничено низкими наблюдаемыми показателями объективного ответа и высокой стоимостью, а его использование ограничено только ранними стадиями рака простаты (Anassietal. (2011) *P T.* 36 (4): 197-202). Точно так же терапия аутологичными Т-клетками (АТС) собирает собственные Т-клетки пациента и реактивирует их *ex vivo*, чтобы преодолеть толерантность к опухоли, а затем повторно вводит их пациенту после лимфабляции. АТС имели ограниченный клинический успех, и только при меланоме,

Терапия с использованием химерных антигенных рецепторов Т-клеток (CAR-T) представляет собой Т-клетки, полученные от пациентов, которые были реконструированы для экспрессии слитого белка между Т-клеточным рецептором и варибельным внеклеточным доменом Ig антитела. Это наделяет их антиген-распознающими свойствами антител с цитолитическими свойствами активированных Т-клеток (Sadelain (2015) *Clin. Invest.* 125: 3392-4000). Успех был ограничен В-клеточными и гемопоэтическими злокачественными новообразованиями (Джексон и др. (2016) *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 73: 370-383). Опухоли также могут мутировать, чтобы избежать распознавания антигеном-мишенью, включая CD 19 (Ruellaetal.,(2016) *ComputStructBiotechnolJ.* 14: 357-362) и

EGFRvIII (O'Rourke et al. (2017) *SciTranslMed*. Jul 19; 9: 399). Кроме того, несмотря на то, что терапия CAR-T одобрена и одобрена в контексте гематологических злокачественных новообразований, она сталкивается со значительными препятствиями на пути к выполнимости лечения солидных опухолей: преодоление иммуносупрессивного характера микросреды солидной опухоли. Потребуется ряд дополнительных модификаций существующих методов лечения CAR-T, чтобы потенциально обеспечить возможность лечения солидных опухолей (Kakarla et al. (2014) *Cancer J. Mar-Apr*; 20 (2): 151–155). Когда безопасность CAR-T значительно повысится, а их эффективность распространится на солидные опухоли, возможность и стоимость этих трудоемких методов лечения будут по-прежнему ограничивать их более широкое применение.

3. Противораковые вакцины и онколитические вирусы.

Холодные опухоли лишены инфильтрации Т-лимфоцитами и дендритными клетками (ДК) и не являются воспаленными Т-клетками (Sharma et al. (2017) *Cell* 9; 168 (4): 707-723). Стремясь реактивировать холодную опухоль, чтобы она стала более иммуногенной, другой класс иммунотерапевтических средств использует микроорганизмы, которые могут накапливаться в опухолях либо естественным путем, либо в результате инженерии. К ним относятся вирусы, разработанные для стимулирования иммунной системы к экспрессии опухолевых антигенов, тем самым активируя и перепрограммируя иммунную систему для отторжения опухоли. Вакцины против рака на основе вирусов в значительной степени потерпели неудачу клинически по ряду факторов, включая ранее существовавший или приобретенный иммунитет к самому вирусному вектору, а также недостаточную иммуногенность к экспрессируемым опухолевым антигенам (Larocca et al. (2011) *Cancer J.* 17 (5): 359-371). Отсутствие надлежащей адьювантной активации APC также препятствовало другим невирусным векторным противораковым вакцинам, таким как ДНК-вакцины. Онколитические вирусы, напротив, стремятся к репликации преимущественно в делящихся опухолевых клетках, а не в здоровой ткани, после чего последующий лизис опухолевых клеток приводит к гибели иммуногенных опухолевых клеток и дальнейшему распространению вируса.

Онколитический вирус Talimogenlaherparepvec (T-VEC), который использует модифицированный вирус простого герпеса в сочетании с DC-рекрутирующим цитокином GM-CSF, одобрен FDA для лечения метастатической меланомы (Bastini et al. (2016) *Biomedicines* 4 (3): 21). Демонстрируя клиническую пользу у некоторых пациентов с меланомой и с меньшим количеством иммунных токсичностей по сравнению с другими

иммунотерапевтическими способами, внутриопухолевый путь введения и условия были ограниченными, равно как и отсутствие эффективности в дистальных опухолях и более широким применением для других типов опухолей. Другие вакцины на основе онколитического вируса (OV), такие как вакцины с использованием парамиксовируса, реовируса и пикомавируса, среди прочего, столкнулись с аналогичными ограничениями в индукции системного противоопухолевого иммунитета (Chiocca et al. (2014) *Cancer Immunol. Res.* 2 (4): 295-300). Системное введение онколитических вирусов представляет собой уникальную задачу. При введении вирус быстро разбавляется, что требует высоких титров, что может привести к гепатотоксичности. Кроме того, если существует ранее существовавший иммунитет, вирус быстро нейтрализуется в крови, а приобретенный иммунитет ограничивает повторное дозирование (Maroun et al. (2017) *Future Virol.* 12 (4): 193-213).

Из ограничений вакцинных векторов на вирусной основе и онколитических вирусов наибольшими ограничениями может быть сам вирус. Вирусные антигены имеют поразительно более высокое сродство к человеческим Т-клеточным рецепторам (TCR) по сравнению с опухолевыми антигенами (Aleksic et al. (2012) *Eur J Immunol.* 42 (12): 3174-3179). Опухолевые антигены, представленные вместе с антигенами вирусных векторов посредством МНС-1 на поверхности даже высокоактивированных АРС, не будут конкурировать за связывание с TCR, что приведет к очень слабому антиген-специфическому противоопухолевому иммунитету. Иммуностимулирующий вектор, нацеленный на опухоль, как предусмотрено в настоящем документе, который сам по себе не обеспечивает эпитопы Т-клеток с высокой аффинностью, может обойти эти ограничения.

ДБактериальная иммунотерапия рака

1. Бактериальная терапия

Признание того, что бактерии обладают противоопухолевой активностью, восходит к 1800-м годам, когда несколько врачей наблюдали регресс опухолей у пациентов, инфицированных *Streptococcus pyogenes*. Уильям Коли начал первое исследование с использованием бактерий для лечения рака на конечной стадии и разработал вакцину, состоящую из *S. pyogenes* и *Serratia marcescens*, которая успешно использовалась для

лечения различных видов рака, включая саркомы, карциномы, лимфомы и меланомы. С тех пор ряд бактерий, включая виды *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Bifidobacterium*, *Listeria*, такие как *L. monocytogenes* и виды *Escherichia*, были изучены в качестве источников противораковых вакцин (см., например, публикацию международной заявки PCT WO 1999/013053; публикация международной заявки PCT WO 2001/025399; Bermudes et al. (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5: 194–199; Patyar et al. (2010) *Journal of Biomedical Science* 17:21; Pawelek et al. (2003) *Lancet Oncol.* 4: 548-556).

Бактерии могут инфицировать клетки животных и человека, а некоторые обладают врожденной способностью доставлять ДНК в цитозоль клеток, и они являются векторами-кандидатами для генной терапии. Бактерии также подходят для терапии, поскольку их можно вводить перорально, они легко размножаются *in vitro* и *in vivo*, и их можно хранить и транспортировать в лиофилизированном состоянии. Бактериальной генетикой легко манипулировать, и полные геномы многих штаммов полностью охарактеризованы (Felgner et al. (2016) *mbio* 7 (5): e01220-16). В результате бактерии использовались для доставки и экспрессии широкого спектра генов, включая те, которые кодируют цитокины, ингибиторы ангиогенеза, токсины и ферменты, превращающие пролекарства. *Salmonella*, например, использовалась для экспрессии иммуностимулирующих молекул как IL-18 (*Cancer Gene Ther.* 15(12):787-794), LIGHT (Loeffler et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(31):12879-12883), and Fas ligand (Loeffler et al. (2008) *J. Natl. Cancer Inst.* 100:1113-1116) в опухолях. Бактериальные векторы также дешевле и проще в производстве, чем вирусные векторы, а доставка бактерий предпочтительнее доставки вирусов, поскольку при необходимости их можно быстро устранить с помощью антибиотиков, что делает их более безопасной альтернативой.

Однако для использования штаммы сами по себе не должны быть патогенными или не патогенными после модификации для использования в качестве терапевтического средства. Например, при лечении рака терапевтические бактериальные штаммы должны быть ослаблены или сделаны достаточно нетоксичными, чтобы не вызывать системного заболевания и / или септического шока, но все же поддерживать некоторый уровень инфекционности для эффективной колонизации опухолей. Описаны генетически модифицированные бактерии, которые должны использоваться в качестве противоопухолевых агентов, чтобы вызвать прямое опухолевидное действие и / или доставить опухолевидные молекулы (Clairmont et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181: 1996-2002; Bermudes, D. и др. (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5: 194-199; Zhao, M. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 755-760; Zhao, M. и др. (2006) *Cancer Res.* 66: 7647-

7652). Среди них - биоинженерные штаммы *Typhimurium Salmonella enterica* (*S. typhimurium*). Эти бактерии накапливаются в опухолях в > 1000 раз больше, чем в нормальных тканях, и гомогенно диспергируются в опухолевых тканях (Pawelek, J. et al. (1997) *Cancer Res.* 57: 4537-4544; Low, KB et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17: 37-41). Репликация позволяет бактериям продуцировать и доставлять различные противораковые терапевтические агенты в высоких концентрациях непосредственно в опухоль, сводя к минимуму токсичность для нормальных тканей.

Эти ослабленные бактерии безопасны для мышей, свиней и обезьян при внутривенном введении (Zhao, M. et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 755-760; Zhao, M. et al. (2006) *Cancer Res* 66 : 7647-7652; Tjuvajev J. et al. (2001) *J. Control Release* 74: 313-315; Zheng, L. et al. (2000) *Oncol. Res.* 12: 127-135), и некоторые живые ослабленные *Salmonella*. В клинических испытаниях на людях было показано, что штаммы хорошо переносятся после перорального приема (Chatfield, S. et al. (1992) *Biotechnology* 10: 888-892; DiPetrillo, MD et al. (1999) *Vaccine* 18: 449-459; Hohmann, EL et al. (1996) *J. Infect. Dis.* 173: 1408-1414; Sirard, JC et al. (1999) *Immunol. Откр.* 171: 5-26). Оперон *S. typhimurium phoP / phoQ* представляет собой типичную бактериальную двухкомпонентную регуляторную систему, состоящую из ассоциированной с мембраной сенсорной киназы (*PhoQ*) и цитоплазматического регулятора транскрипции (*PhoP*: Miller, SI et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5054-5058; Groisman, EA et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7077-7081). *PhoP / phoQ* необходим для вирулентности, и его делеция приводит к плохой выживаемости этой бактерии в макрофагах и заметному ослаблению у мышей и людей (Miller, SI et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5054-5058; Groisman, EA et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7077-7081; Galan, JE и Curtiss, R. III. (1989) *Microb Pathog* 6: 433-443; Филдс, П.И. и др. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 189-193). Штаммы с делецией *PhoP / phoQ* применялись в качестве эффективных носителей для доставки вакцин (Galan, JE и Curtiss, R. III. (1989) *Microb Pathog* 6: 433-443; Филдс, П.И. и др. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 189-193; Angelakopoulos, H. and Hohmann, EL (2000) *Infect Immun* 68: 213-241). Атенуированные сальмонеллы использовались для направленной доставки опухолевидных белков (Bermudes, D. et al. (2002) *Curr Opin Drug Discov Devel* 5: 194-199; Тюваев Дж. И др. (2001) *J Control Release* 74: 313-315).

Лечение рака на основе бактерий продемонстрировало ограниченную клиническую эффективность. Различные виды бактерий, в том числе *Clostridium novyi* (Dangetal. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (26): 15155-15160; патентные публикации США No.2017/0020931, 2015/0147315; Патенты США № 7 344 710; 3936354), *Mycobacterium bovis*

(публикации патентов США № 2015/0224151, 2015/0071873), *Bifidobacterium bifidum* (Kimura et al. (1980) *Cancer Res.* 40: 2061-2068), *Lactobacillus casei* (Yasutake et al. (1984) *Med Microbiol Immunol.* 173 (3): 113-125), *Listeria monocytogenes* (Le et al. (2012) *Clin. Cancer Res.* 18 (3): 858-868; Starks et al. др. (2004) *J. Immunol.* 173: 420-427; публикация патента США № 2006/0051380) и *Escherichia coli* (патент США № 9320787) были изучены как возможные агенты для противоопухолевой терапии.

Штамм *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), например, одобрен для лечения рака мочевого пузыря у людей и более эффективен, чем внутрипузырная химиотерапия, часто используется в качестве лечения первой линии (Gardlik et al. (2011) *Gene Therapy* 18: 425-431). Другой подход использует *Listeria monocytogenes*, живую аттенуированную внутриклеточную бактерию, способную индуцировать мощный прайминг Т-клеток к экспрессируемым опухолевым антигенам у мышей (Le et al. (2012) *Clin. Cancer Res.* 18 (3): 858-868). В клинических испытаниях вакцины на основе листерии, включающей опухолевый антиген мезотелин, вместе с вакциной GVAX на основе аллогенного рака поджелудочной железы в подходе первичной вакцинации, средняя выживаемость у пациентов с распространенным раком поджелудочной железы составила 6,1 месяца по сравнению со средней выживаемостью 3,9 месяца для пациентов, получавших только вакцину GVAX (Le et al. (2015) *J. Clin. Oncol.* 33 (12): 1325-1333). Эти результаты не были воспроизведены в более крупном исследовании фазы 2b, что, возможно, указывает на трудности в попытках вызвать иммунитет к низкоаффинному аутоантигену, такому как мезотелин.

Бактериальные штаммы можно модифицировать, как описано и проиллюстрировано здесь, для экспрессии ингибирующей РНК (РНКi), такой как shРНК и микроРНК, которые ингибируют или разрушают TREX1 и / или PD-L1 и, возможно, один или несколько дополнительных генов иммунных контрольных точек. Штаммы могут быть ослаблены стандартными методами и / или путем делеции или модификации генов, а также путем изменения или введения генов, которые делают бактерии способными расти *in vivo*, прежде всего в иммунопривилегированных средах, таких как ТМЕ, в опухолевых клетках и солидных опухолях. Штаммы для модификации, как описано здесь, могут быть выбраны, например, из числа *Shigella*, *Listeria*, *E. coli*, *Bifidobacteriae* и *Salmonella*. Например, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* и *Salmonella enteritidis*. Другие подходящие бактерии включают *Rickettsia*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*,

Mycobacterium, Mycoplasma, Legionella, Rhodococcus, Pseudomonas, Helicobacter, Vibrio, Bacillus, and Erysipelothrix. Например, *Rickettsia Rickettsiae, Rickettsia prowazecki, Rickettsia tsutsugamuchi, Rickettsia mooseri, Rickettsia sibirica, Bordetella bronchiseptica, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Aeromonas eucrenophila, Aeromonas salmonicida, Francisellatularensis, Corynebacterium pseudotuberculosis, Citrobacter freundii, Chlamydia pneumoniae, Haemophilussorunnus, Brucella abortus, Mycobacterium intracellulare, Legionella pneumophila, Rhodococcusequi, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter mustelae, Vibrio cholerae, Bacillus subtilis, Erysipelothrixrhusiopathiae, Yersinia enterocolitica, Rochalimaeaquintana, и Agrobacterium tumerfacium.* Любые известные терапевтические, включая иммуностимулирующие, бактерии можно модифицировать, как описано здесь.

2. Сравнение иммунных ответов на бактерии и вирусы.

Бактерии, как и вирусы, обладают тем преимуществом, что они иммуностимулирующее. Известно, что бактерии и вирусы содержат консервативные структуры, известные как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), которые воспринимаются рецепторами распознавания паттернов (PRR) клетки-хозяина. Распознавание PAMP с помощью PRR запускает сигнальные каскады нижестоящих, которые приводят к индукции цитокинов и хемокинов и иницированию иммунных ответов, которые приводят к удалению патогенов (IwasakiandMedzhitov (2010) Science 327 (5963): 291-295). Способ, которым врожденная иммунная система задействована с помощью PAMP, и то, какой тип инфекционного агента, определяет соответствующий адаптивный иммунный ответ для борьбы с вторгающимся патогеном.

Класс PRR, известный как TollLikeReceptors (TLR), распознает PAMP, происходящие из бактериального и вирусного происхождения, и располагающиеся в различных компартментах внутри клетки. TLR связывают ряд лигандов, включая липополисахарид (TLR4), липопротеины (TLR2), флагеллин (TLR5), метилированные мотивы CpG в ДНК (TLR9), двухцепочечную РНК (TLR3) и одноцепочечную РНК (TLR7 и TLR8). (Akiraetal. (2001) Nat. Immunol. 2 (8): 675-680; KawaiandAkira (2005) Curr. Opin.Immunol. 17 (4): 338-344). Например, наблюдение за *S. Typhimurium* в значительной степени опосредуется через TLR2, TLR4 и TLR5 (Arpaiaetal. (2011) Cell 144 (5): 675-688). Эти TLR передают сигнал через адаптерные молекулы MyD88 и TRIF, опосредуя индукцию NF-kB-зависимых провоспалительных цитокинов, таких как TNF-a, IL-6 и IFN-g (Pandeyetal. (2015) ColdSpringHarbPerSpectBiol 7 (1): a016246).

Другая категория PRR - это семейство pod-подобных рецепторов (NLR). Эти рецепторы находятся в цитозоле клеток-хозяев и распознают внутриклеточные PAMPs. Например, было показано, что флагеллин *S. typhimurium* активирует путь воспаления NLRC4 / NAIP5, что приводит к расщеплению каспазы-1 и индукции провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18, что приводит к пироптотической гибели инфицированных макрофагов (Finketal. (2007) CellMicrobiol. 9 (11): 2562-2570).

В то время как участие TLR2, TLR4, TLR5 и воспаления индуцирует провоспалительные цитокины, которые опосредуют бактериальный клиренс, они активируют сигнальный каскад, управляемый преимущественно NF- κ B, который приводит к рекрутированию и активации нейтрофилов, макрофагов и CD4⁺ Т-клеток, но не DC и CD8⁺ Т-клеток, которые необходимы для противоопухолевого иммунитета (Luietal. (2017) SignalTransductTargetTher. 2: 17023). Чтобы активировать опосредованный CD8⁺ Т-клетками противоопухолевый иммунитет, IRF3 / IRF7-зависимая передача сигналов интерферона I типа имеет решающее значение для активации DC и перекрестной презентации опухолевых антигенов, способствующих CD8⁺ праймированию Т-клеток (Diamondetal. (2011) ./ Exp. Med. 208 (10): 1989-2003; Fuertesetal. (2011) ./ Exp. Med. 208 (10): 2005-2016). Интерфероны типа I (IFN- α , IFN- β) представляют собой сигнатурные цитокины, индуцируемые двумя различными TLR-зависимыми и TLR-независимыми сигнальными путями. TLR-зависимый путь индукции IFN- β происходит после эндоцитоза патогенов, посредством чего TLR3, 7, 8 и 9 обнаруживают полученные от патогенов элементы ДНК и РНК внутри эндосом. TLR 7 и 8 распознают вирусные нуклеозиды и нуклеотиды, и их синтетические агонисты, такие как резиквимод и имиквимод, прошли клиническую проверку (Chietal. (2017) FrontiersinPharmacology 8: 304). Синтетическая дцРНК, такая как полиинозиновая: полицитидиловая кислота (поли (I: C)) и поли ICLC, аналог, в состав которого входит поли L-лизин для сопротивления перевариванию РНКазой, является агонистом путей TLR3 и MDA5 и мощным индуктором IFN- β (Caskeyetal. (2011) J. Exp. Med. 208 (12): 2357-66). Обнаружение TLR9 эндосомных звеньев CpG, присутствующих в вирусной и бактериальной ДНК, также может индуцировать IFN- β через IRF3. Кроме того, было показано, что TLR4 индуцирует IFN- β через MyD88-независимую активацию TRIF IRF3 (Owen et al. (2016) mBio.l. 1 e0205 1-15). Впоследствии было показано, что активация ДК TLR4 не зависела от IFN типа I, поэтому способность TLR4 активировать DC через IFN типа I, вероятно, не имеет биологического значения (Huetal. (2015) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112:45). 112: 45). Кроме

того, не было показано, что передача сигналов TLR4 напрямую рекрутирует или активирует CD8⁺ Т-клетки.

Один из TLR-независимых путей IFN типа I опосредуется узнаванием хозяином одноцепочечной (ss) и двухцепочечной (ds) РНК в цитозоле. Они воспринимаются РНК-геликазами, включая ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-1), ген 5, связанный с дифференцировкой меланомы (MDA-5), и стимулятор 1 промотора IFN-бета (IPS-1; также известный как митохондриальный антивирусный сигнальный белок или MAVS), опосредованное адаптерным белком, фосфорилирование фактора транскрипции IRF-3, приводящее к индукции IFN-бета (IretonandGale (2011) *Viruses* 3 (6): 906-919). Синтетические связывающие RIG-I элементы также были непреднамеренно обнаружены в обычных лентивирусных векторах shRNA в виде динуклеотидной последовательности AA в сайте начала транскрипции промотора U6. Его последующая делеция в плазмиде предотвращала затрудняющую активацию нецелевого IFN типа I (Pebemardetal. (2004) *Differentiation* 72: 103-111).

Второй тип TLR-независимого пути индукции интерферона I типа опосредуется стимулятором генов интерферона (STING), цитозольным ER-резидентным адаптерным белком, который теперь распознается как центральный медиатор для определения цитозольной dsДНК от инфекционных патогенов или аберрантного повреждения клетки-хозяина. (Barber (2011) *Immunol. Rev* 243 (1): 99-108). Передача сигналов STING активирует ось TANK-связывающей киназы (TBK1) / IRF3 и ось передачи сигналов NF-κB, что приводит к индукции IFN-бета и других провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые сильно активируют врожденный и адаптивный иммунитет (Burdetteetal. 2011) *Nature* 478 (7370): 515-518). Для восприятия цитозольной dsДНК через STING требуется циклическая GMP-AMP-синтаза (cGAS), нуклеотидилтрансфераза клетки-хозяина, которая напрямую связывает dsДНК и в ответ синтезирует вторичный мессенджер циклического динуклеотида (CDN), циклический GMP-AMP (cGAMP), который связывает и активирует STING (Sunetal. (2013) *Science* 339 (6112): 786-791; Wuetal. (2013) *Science* 339 (6121): 826-830). CDN, полученные из бактерий, таких как c-di-AMP, продуцируемые внутриклеточными *Listeria monocytogenes*, также могут напрямую связывать мышиный STING, но только 3 из 5 аллелей STING человека. В отличие от CDN, продуцируемых бактериями, в которых два пуриновых нуклеозида соединены фосфатным мостиком с 3'-3' связями, межнуклеотидный фосфатный мостик в cGAMP, синтезируемый cGAS млекопитающих соединен неканонической 2'-3'-связью. Эти 2'-3'-молекулы связываются со STING с аффинностью в 300 раз лучше, чем бактериальные 3'-

3' CDN, и, таким образом, являются более мощными физиологическими лигандами человеческого STING (см., например, Civrietal. (2013) Nature 498 (7454): 332-337; Diner et al. (2013) Cell Rep. 3 (5): 1355-1361; Gao et al. (2013) Sci. Signal 6 (269): pll; Ablasseretal. (2013)) Nature 503 (7477): 530-534).

Путь передачи сигналов cGAS / STING у людей, возможно, эволюционировал с течением времени, чтобы реагировать преимущественно на вирусные патогены, а не на бактериальные патогены, и это может объяснить, почему бактериальные вакцины, содержащие антигены опухоли хозяина, были созданы для плохих векторов примирования CD8⁺ Т-клеток у людей. TLR-независимая активация CD8⁺ Т-клеток с помощью STING-зависимой передачи сигналов IFN типа I от обычных DC является основным механизмом, с помощью которого выявляются вирусы, при этом TLR-зависимая продукция IFN типа I плазматическими DC действует только тогда, когда STING-путь был вирусно -инактивированным (Hervas-Stubbsetal. (2014) J Immunol. 193: 1151-1161). Кроме того, для бактерий, таких как *S. typhimurium*, хотя они способны индуцировать IFN- β через TLR4, CD8⁺Т-клетки не индуцируются и не требуются для очистки или защитного иммунитета (Leeetal. (2012) ImmunolLett. 148 (2): 138-143). Отсутствие физиологически релевантных эпитопов CD8⁺ Т для многих штаммов бактерий, включая *S. typhimurium*, препятствует как разработке бактериальной вакцины, так и защитному иммунитету от последующих инфекций, даже от тех же генетических штаммов (Loetal. (1999) J. Immunol. 162: 5398-5406). Таким образом, иммунотерапия рака на основе бактерий биологически ограничена в своей способности индуцировать IFN типа I для рекрутирования и активации CD8⁺Т-клетки, что необходимо для обеспечения перекрестной презентации опухолевого антигена и устойчивого противоопухолевого иммунитета. Следовательно, разработка бактериальной иммунотерапии, представленной здесь, для индукции вирусоподобной TLR-независимой передачи сигналов IFN типа I, а не TLR-зависимой бактериальной иммунной передачи сигналов, будет предпочтительно индуцировать опосредованный CD8⁺ Т-клетками противоопухолевый иммунитет.

STING активирует врожденный иммунитет в ответ на обнаружение нуклеиновых кислот в цитозоле. Передача сигналов далее активируется посредством связывания CDN, которые синтезируются бактериями или ферментом хозяина cGAS в ответ на связывание с цитозольной dsДНК. Бактериальные CDN и CDN, продуцируемые хозяином, имеют различные структуры фосфатного мостика, что различает их способность активировать STING. IFN- β является характерным цитокином активированного STING, и для эффективного противоопухолевого иммунитета, опосредованного CD8⁺ Т-клетками ,

требуется индуцируемый вирусами IFN типа I, а не индуцированный бактериями IFN. Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, включают те, которые являются агонистами STING.

3. Сальмонеллезная терапия

Сальмонелла является примером рода бактерий, который может использоваться в качестве противоракового средства. Приведенная здесь в качестве примера сальмонелла представляет собой ослабленный вид или вид, который благодаря модификациям для использования в качестве терапевтического средства против рака имеет пониженную токсичность.

а. Опухолетропные бактерии

Ряд видов бактерий продемонстрировали преимущественную репликацию в солидных опухолях при инъекции из дистального участка. К ним относятся, помимо прочего, виды *Salmonella*, *Bifodobacterium*, *Clostridium* и *Escherichia*. Считается, что естественные свойства бактерий по нахождению в опухоли в сочетании с врожденным иммунным ответом хозяина на бактериальную инфекцию опосредуют противоопухолевый ответ. Было показано, что этот тропизм опухолевой ткани уменьшает размер опухолей в различной степени. Одним из факторов, влияющих на опухолевый тропизм этих видов бактерий, является их способность к репликации в бескислородной или гипоксической среде. Ряд этих естественно опухолево-тропных бактерий был дополнительно сконструирован для повышения эффективности противоопухолевого ответа (обзор в Zuetal. (2014) *Crit Rev Microbiol*.40 (3): 225-235; и Felgner et al.(2017) *Microbial Biotechnology* 10(5):1074–1078).

б. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Salmonella enterica Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*)

является примером бактерий для использования в противоопухолевой терапии. Подход к использованию бактерий для стимулирования иммунитета хозяина к раку был сделан через использование грамотрицательных анаэробных *S. typhimurium*, которые предпочтительно накапливаются в гипоксических и некротических клетках тела, включая микроокружение опухоли. *S. typhimurium* накапливается в таких средах (Babanetal. (2010) *Bioengineered Bugs* 1(6):385-294). *S. typhimurium* может расти как в аэробных так и в анаэробных условиях, поэтому может колонизовать небольшие опухоли, которые менее гипоксические и большие опухоли, которые более гипоксические.

S typhimurium представляет собой грамотрицательный патоген, который передается через фекально-пероральный путь. Он вызывает локализованные желудочно-кишечные инфекции, но также входит в кровоток и лимфатическую систему после перорального приема, инфицируя системные ткани, такие как печень, селезенка и легкие. Системное введение *S typhimurium* дикого типа сверхстимулирует индукцию TNF-альфа, приводящую к каскаду цитокина и септическому шоку, которые, если остались необработанными, могут быть фатальными. В результате, патогенные бактериальные штаммы, такие как *S Typhimurium*, должны быть ослаблены для предотвращения системной инфекции, без полного подавления их способности эффективно засеять опухолевые ткани. Ослабление часто достигается путем мутации клеточной структуры, которая может вызывать иммунный ответ, такой как бактериальная наружная мембрана, или ограничивая его способность реплицироваться в отсутствие дополнительных питательных веществ.

S typhimurium представляет собой внутриклеточный патоген, который быстро поглощается миелоидными клетками, такими как макрофаги, или он может индуцировать свое собственное поглощение в нефагоцитных клетках, таких как эпителиальные клетки. Находясь внутри клеток, он может реплицироваться в сальмонелле, содержащей вакуоль (SCV), и может также выходить в цитозоль некоторых эпителиальных клеток. Идентифицированы многие из молекулярных детерминант патогенности *S typhimurium*, и гены сгруппированы в патогенные островки *Salmonella* (SPIs). Двумя наиболее хорошо охарактеризованными островками патогенности являются SPI -1, ответственный за опосредование бактериальной инвазии нефагоцитарных клеток, и SPI -2, который необходим для репликации в SCV (AgborandMcCormick (2011) CellMicrobiol13 (12): 1858-1869). Оба этих участка патогенности кодируют макромолекулярные структуры, называемые системами секреции типа три (T3SS), которые могут переносить эффекторные белки через мембрану хозяина (GalanandWolf-Watz (2006) Nature 444: 567-573).

с. Бактериальное ослабление

Терапевтические бактерии для введения для качества лечения рака должны быть ослаблены. Различные способы ослабления бактериальных патогенов известны в данной области техники. Широко используются ауксотрофные мутации, например бактерии, неспособные к синтезированию существенного питательного вещества, и делеций/мутаций в генах, таких как *aro*, *pur*, *gua*, *thy*, *nad* и *asd* (публикация патента США № 2012/0009153). Питательные вещества, продуцируемые путями биосинтеза,

вовлекающими эти гены, часто недоступны в клетках-хозяевах, и, по существу, выживание бактерий является перспективным. Например, ослабление *Salmonella* и других видов может быть достигнуто путем делеции гена *aroA*, который является частью пути шикимата, соединения гликолиза с биосинтезом ароматических аминокислот (Felgner et al. (2016) *MBio* 7 (5): e01220-16). Таким образом, делеция *aroA* приводит к бактериальной ауксотрофии для ароматических аминокислот и последующему ослаблению (патентные публикации США № № 2003/0170276, 2003/0175297, 2012/0009153, 2016/0369282; международные публикации WO 2015/032165 и WO 2016/025582). Подобным образом, другие ферменты, вовлеченные в путь биосинтеза ароматических аминокислот, включая *aroC* и *aroD*, были удалены для достижения ослабления (патентная публикация США № 2016/0369282; международная публикация WO 2016/025582). Например, штамм *Styphimurium* SL7207 является ауксотрофным для ароматических аминокислот {мутант *aroA*}; штаммы *Aland* Al-Ra ауксотрофны для лейцина-аргинина. VNP20009 представляет собой пуриновый ауксотроф (*purJ* мутант). Как показано здесь, он также является ауксотрофным для иммунодепрессивного нуклеозидного аденозина.

Мутации, которые ослабляют бактерии, также включают в себя, но не ограничиваются ими, мутации в генах, которые изменяют биосинтез липополисахарида, такие как *rfaL*, *rfaG*, *rfaH*, *rfaD*, *rfaP*, *rFb*, *rfa*, *msbB*, *htrB*, *erA*, *pagL*, *pagP*, *IpxR*, *arnT*, *eptA* и *IpxT*; мутации, которые вводят суицидный ген, такой как *sacB*, *nuk*, *hok*, *gef*, *kil* или *phlA*; мутации, которые вводят бактериальный лизирующий ген, такие как *hly* и *cly*, мутации в вирулентных факторах, таких как *IsyA*, *Pag*, *prg*, *iscA*, *virG*, *pic* и *act*; мутации, которые изменяют стрессовый ответ, такие как *гесA*, *htrA*, *hlpR*, *hsp* и *groEL*; мутации, которые нарушают клеточный цикл, такие как *min*; и мутации, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, такие как *суа*, *срр*, *phoP/phoQ* и *ompR* (патентные публикации США № 2012/0009153, 2003/0170276, 2007/0298012; патент США № 6190657, WO 2015/032165, Broadway et al. (2014) *J Biotechnology* 192: 177-178; Frahm et al. (2015) *mBio* 6 (2): E00254-15; Kong et al. (2011) *Infection and Immunity* 79 (12): 5027-5038; Kong et al. (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (47): 19414-19419). В идеале, генетические ослабления содержат делеции генов, а не точечные мутации, для предотвращения спонтанных компенсаторных мутаций, которые могут привести к реверсии до вирулентного фенотипа.

i. Мутанты *msbB*

Фермент биосинтеза липида Амиристоилтрансферазы, кодируемый геном *msbB* в *Styphimurium*, катализирует добавление концевой миристилгруппы в домен липида

Алипополисахарида (LPS) (Lowetal. (1999) Nat. Biotechnol. 17 (1): 37-41). Делеция *msbB*, таким образом, изменяет ацильную композицию липида а в домене LPS, основной компонент наружных мембран грамотрицательных бактерий. Эта модификация значительно снижает способность LPS индуцировать септический шок, ослабляя бактериальный штамм и снижая потенциально вредное продуцирование TNF α , снижая таким образом системную токсичность. Мутанты *S.typhimuriummsbB* сохраняют способность к преимущественному колонизированию опухолей по сравнению с другими тканями у мышей и сохраняют противоопухолевую активность, увеличивая таким образом терапевтический индекс основанных на сальмонелле иммунотерапевтических средств (патентные публикации США № 2003/0170276, 2003/0109026, 2004/0229338, 2005/0225088, 2007/0298012).

Например, делеция *msbB* в штамме *S TyphimuriumVNP20009* приводит к продуцированию преимущественно пентаацилированного LPS, который менее токсичен, чем нативный гексаацилированный LPS, и обеспечивает системную доставку без индукции токсического шока (Leeetal. (2000) InternationalJournalofToxicology 19: 19-25). Другие мутации LPS могут быть введены в бактериальные штаммы, представленные здесь, включая штаммы *Salmonella*, которые значительно снижают вирулентность и тем самым обеспечивают более низкую токсичность и позволяют вводить более высокие дозы.

ii. Мутанты *purI*

Используют иммуностимулирующие бактерии, которые можно ослаблять, делая их ауксотрофными по одному или нескольким основным питательным веществам, таким как пурины (например, аденин), нуклеозиды (например, аденозин) или аминокислоты (например, аргинин и лейцин). В частности, в вариантах осуществления предлагаемых в настоящем изобретении иммуностимулирующих бактерий, таких как *S typhimurium*, бактерии являются ауксотрофными для аденозина, который предпочтительно накапливается в микроокружении опухоли. Следовательно, штаммы иммуностимулирующих бактерий, описанные здесь, ослабляются, поскольку они требуют аденозина для роста, и они предпочтительно колонизируют ТМЕ, которые, как обсуждается ниже, имеют избыток аденозина.

Фосфорибозиламиноимидазолсинтетаза, фермент, кодируемый геном *purI* (синонимом гена *purM*), участвует в пути биосинтеза пуринов. Разрушение гена *purI*, таким образом, делает бактерии ауксотрофными в отношении пуринов. В дополнение к ослаблению, мутанты *purI* обогащаются в опухолевой среде и имеют значительную

противоопухолевую активность (Pawelek et al. 1997) *Cancer Research* 57: 4537-4544). Ранее было описано, что эта колонизация обусловлена высокой концентрацией пуринов, присутствующих в интерстициальной жидкости опухолей, в результате их быстрого клеточного обмена. Так как бактерии *purI* не способны синтезировать пурины, они требуют внешнего источника аденина, и полагают, что это приведет к их ограниченному росту в микросреде, обогащенной пурином (Rosenberg et al. (2002) *J Immunotherapy* 25 (3): 218-225). Хотя первоначально сообщалось, что штамм VNP20009 содержит делецию гена *purI* (Low et al. (2003) *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 90, *Suicide gene Therapy*: 47-59), последующий анализ всего генома VNP20009 показал, что ген *purI* не был удален, а разрушен с помощью хромосомной инверсии (Broadway et al. (2014) *Journal of Biotechnology* 192: 177-178). Весь ген содержится в двух частях хромосомы VNP20009, которая фланкирована введенными последовательностями (одна из которых имеет активную транспозазу).

Здесь показано, что мутанты *purI* штамма *S typhimurium* являются ауксотрофными по отношению к нуклеозидному аденозину, который является высоко обогащенным в микроокружении опухоли. Следовательно, при использовании VNP20009 нет необходимости вводить какую-либо дополнительную модификацию для достижения ауксотрофии аденозина. Для других штаммов и бактерий ген *purI* может быть разрушен, так как он находился в VNP20009, или он может содержать делецию всей или части гена *purI* для предотвращения реверсии гена дикого типа.

iii. Комбинации ослабляющих мутаций

Бактерия с множественным генетическим ослаблением посредством делеций генов на несопоставимых областях хромосомы желательна для бактериальной иммунотерапии, потому что ослабление может быть увеличено, в то же время уменьшая возможность реверсии к вирулентному фенотипу путем получения генов путем гомологичной рекомбинации с генетическим материалом дикого типа. Восстановление вирулентности путем гомологичной рекомбинации потребует наличия двух отдельных рекомбинационных событий в одном и том же организме. В идеале комбинации ослабляющих мутаций, выбранных для использования в иммунотерапевтическом средстве увеличивает переносимость без снижения активности, увеличивая тем самым терапевтический индекс. Например, разрушение генов *msbB* и *purI* в штамме *S typhimurium* VNP20009 было использовано для нацеливания на опухоль и подавления роста и вызывает низкую токсичность на животных моделях (Clairmont et al. (2000) *J Infect. Dis.* 181: 1996-2002; Bermudes et al. (2000) *Cancer Gene Therapy: Past Achievements and*

Future Challenges, под редакцией Habib Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 57-59; Lee et al. (2000) *International Journal of Toxicology* 19: 19-25; Rosenberg et al. (2002) *J Immunotherapy* 25 (3): 21825-225; Broadway et al. (2014) *J Biotechnology* 192: 177-178; Loeffler et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (31): 12879-12883; Luo et al. (2002) *Oncology Research* 12: 501-508). Когда VNP20009 (*msbB/purT*) вводили мышам, несущим сингенные или ксенотрансплантатные опухоли человека, бактерии накапливались предпочтительно во внеклеточных компонентах опухолей при соотношениях, превышающих 300-1000 до 1, снижали индукцию TNF α и демонстрировали регрессию опухоли и пролонгированное выживание по сравнению с контрольными мышами (Clairmont et al. (2000) *J Infect. Dis.* 181: 1996-2002). Результаты, полученные при клинических исследованиях фазы I у человека, показали, однако, что, в то время как VNP20009 был относительно безопасным и хорошо переносимым, плохая аккумуляция наблюдалась в опухолях меланомы человека, и была продемонстрирована очень небольшая активность (Toso et al. (2002) *J Clin. Oncol.* 20 (1): 142-152). Более высокие дозы, которые необходимы для проявления любой противоопухолевой активности, невозможны из-за токсичности.

Таким образом, необходимы дальнейшие усовершенствования. Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, направлены на эту проблему.

iv. VNP20009 и другие ослабленные штаммы *S typhimurium* дикого типа

Исходный штамм может представлять собой неослабленный штамм дикого типа, такой как штамм, имеющий все идентифицирующие характеристики ATCC 14028. Он также может быть модифицирован так, чтобы он был ауксотрофным для аденозина. Штамм может быть представлен для флагеллина (*fliC/fljR*) и для одного или более из *msbB*, *purI/M* и *ragP*. Штаммы также могут представлять *asd*. Модифицированные штаммы кодируют терапевтический продукт на плазмиде, обычно присутствующей в количестве от низкого до среднего, под контролем промотора, распознаваемого хозяином млекопитающего, такого как РНК-полимераза II или III. Также могут быть включены дополнительные регуляторные последовательности для контроля экспрессии в микроокружении опухоли и переноса в клетки.

Примером терапевтической бактерии, которая может быть модифицирована, как описано здесь, является штамм, обозначенный как VNP20009 (ATCC # 202165, YS1646), который получают из штамма ATCC номер 14028 Штамм, обозначенный VNP20009 (ATCC # 202165, YS1646), является клиническим кандидатом и по меньшей мере 50000-кратно

ослаблен для безопасности путем делеции генов *msbB* и *purl* (Clairmont et al. (2000) *J Infect. Dis.* 181: 1996-2002; Low et al. (2003) *Methods In Molecular Medicine*, Vol. 90, *Suicide Gene Therapy* al -59; Lee et al. (2000) *International Journal of Toxicology* 19: 19-25).

Также рассматриваются аналогичные штаммы *Salmonella*, которые также ослаблены. Как описано выше, делеция *msbB* изменяет состав липида а в домен липополисахарида, основной компонент грамтрицательной бактериальной внешней среды мембраны (Lowe et al (1999) *Nat. Biotechnol.* 17 (1): 37-41). Это предотвращает септический шок, вызванный липополисахаридом, ослабляя бактериальный штамм и снижая системную токсичность, в то же время уменьшая потенциально вредное продуцирование TNF α (Dinarello, C.A. (1997) *Chest* 112(6 Suppl):321S-329S; Low et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17(1):37-41). Делеция гена *purl* делает бактерии аукоотрофными для пуринов, которая дополнительно ослабляет бактерии и обогащает ее в микроокружении опухоли (Pawelek et al. 1997) *Cancer Res* 57: 4537-4544; Broadway et al. (2014) *J Biotechnology* 192: 177-178).

Накопление VNP20009 в опухолях приводит к сочетанию факторов, включая врожденную инвазивность родительского штамма, номер доступа ATCC 14028, его способность реплицироваться в гипоксических средах, и его требование к высоким концентрациям пуринов, которые присутствуют в интерстициальной жидкости опухолей. Здесь показано, что VNP20009 также является аукоотрофным для нуклеозидного аденозина, который может накапливаться в патологически высоком уровне в микроокружении опухоли и вносить вклад в иммуносупрессорную микроокружение опухоли (Petervaueli Amulf Mayer, Oxygen Transport to Tissue XXXVII, *Advances in Experimental Medicine And Biology* 876 chapter 22, pp. 177-183).

VNP20009 вводили мышам, несущим сингенные или ксенотрансплантатные опухоли человека, бактерии накапливались преимущественно во внеклеточных компонентах опухолей при соотношениях, превышающих 300-1000 до 1, и продемонстрировали ингибирование роста опухоли, а также пролонгированное выживание по сравнению с контрольными мышами (Clairmont et al. (2000) *J Infect. Dis.* 181: 1996-2002). Результаты клинического испытания фазы I показали, что в то время как VNP20009 был относительно безопасным и хорошо переносимым, плохая аккумуляция наблюдалась в опухолях меланомы человека, и была продемонстрирована очень небольшая активность (Toso et al. (2002) *J Clin. Oncol.* 20 (1): 142-152). Более высокие дозы, которые необходимы для воздействия на любую противоопухолевую активность, невозможны из-за токсичности, которая коррелируется с высокими уровнями провоспалительных

цитокинов. Модификации, представленные здесь, включая делецию флагеллина (*fliC/fliB*) и возможные модификации *ragP* и/или *hilA*, значительно повышают накопление иммуностимулирующих бактерий в опухолях, в микроокружении опухоли и/или в находящихся в опухоли иммунных клетках, таких как миелоидные клетки. Другие модификации, которые повышают нацеливание на иммунные клетки и устраняют инфекцию других клеток, таких как эпителиальные клетки, увеличивают накопление бактерий в опухолях и в микроокружении опухоли. Дополнительные модификации для бактерий дикого типа, ауксотрофных для аденозина, дополнительно увеличивают накопление в микроокружении опухоли.

Другие штаммы *S typhimurium* могут быть использованы для направленной к опухоли доставки терапевтических белков и терапии, таких как, например, ауксотрофлейцин-аргинин А -1 (Zhao et al. (2005) *Nature*; Nau et al. (2012) *Scientific Reports* 2: 436; Патент США № 822194; Публикация патента США № 2014/0178341) и его производное AR-1 (Yu et al. (2012) *Scientific Reports* 2: 436; Kawaguchi et al. (2017) *Oncotarget* 8 (12): 19065-19073; Zhao et al. (2006) *Cancer Res* 66 (15): 7647-7652; Zhao et al. (2012) *Cell Cycle* 11 (1): 187-193; Tome et al. (2013) *Anticancer Research* 33: 97-102; Murakami et al. (2017) *Oncotarget* 8 (5): 8035-8042; Liu et al. (2016) *Oncotarget* 7 (16): 22873-22882; Binder et al. (2013) *Cancer Immunol Res* 1 (2): 123-133); мутантный штамм *S typhimurium* SL7207 (Guo et al. (2011) *Gene Therapy* 18: 95-105; патентная публикация США 2012/0009153, 2016/0369282 и 2016/0184456) и его анаэробное производное YB1 (WO 2015/032165; Yu et al. (2012) *Scientific Reports* 2: 436; Lechner et al. (2009) *PLoS ONE* 4 (8): e6692; Yu et al. (2012) *Scientific Reports* 2: 436); (2010) *Biology: Target & Therapy* 4: 61-73) и *rhoP/phoQ* штамм *S typhimurium* LH430 (WO 2008/091375).

Штамм VNP20009 не смог показать клиническую пользу в исследовании, включающем пациентов с развитой меланомой, но лечение было безопасно проведено для других раковых больных. Была установлена максимальная переносимая доза (MTD). Следовательно, этот штамм, а также другие аналогичные генно-инженерные бактериальные штаммы, может быть использован в качестве исходного материала для нацеливания на опухоль, в качестве терапевтических средств доставки. Представленные здесь модификации обеспечивают стратегию повышения эффективности путем повышения противоопухолевой эффективности и/или безопасности и переносимости терапевтического агента.

v. *S typhimurium*, сконструированный для доставки макромолекул.

S typhimurium также был модифицирован для доставки связанного с опухолью антигена (ТАА) сурвивина (SVN) к APC для создания первичного адаптивного иммунитета (патентная публикация США № 2014/0186401; XuEtAl. (2014) *CancerRes.* 74 (21): 6260-6270). SVN представляет собой ингибитор белка апоптоза (IAP), который продлевает выживание клеток и обеспечивает контроль клеточного цикла, и избыточно экспрессируется во всех твердых опухолях и плохо экспрессируется в нормальных тканях. В этой технологии используются *SalmonellaPathogenecityIsland 2* (SPI -2) и его система секреции типа III (T3SS) для доставки ТАА в цитозоль APC, которые затем активируются для индукции ТАА-специфичных CD8⁺ Т-Клеток и создания противоопухолевого иммунитета (Xuetal. (2014) *CancerRes.* 74 (21): 6260-6270). Подобно ТАА-вакцинам на основе *Listeria* этот подход показал перспективность на мышинных моделях, но все еще не демонстрирует эффективного связывания т-клеток, специфичных для опухолевых антигенов, у человека.

В дополнение к доставке генов *S typhimurium* также использовали для доставки небольших мешающих РНК (siРНК) и коротких шпилечных РНК (shРНК) для терапии рака. Например, ослабленные *S Typhimurium* были модифицированы для экспрессии некоторых shРНК, таких как те, которые нацелены на STAT3 и IDO1 (PCT/US2007/074272 И патент США №. 9453227). VNP20009, трансформированный плазмидой shРНК против иммунодепрессивного генаиндоламиндеоксигеназы (IDO), успешно подавлял экспрессию IDO в мышинной модели меланомы, что приводило к гибели опухолевых клеток и значительной инфильтрации опухоли нейтрофилами (Blacheetal. (2012) *CancerRes.* 72 (24): 6447-6456). Объединение этого вектора со введениемгиалуронидазы, такой как РЕГирированный растворимый РН20 (PEGРН20; фермент, который истощает внеклеточный гиалуронан), показывает положительные результаты при лечении опухолей аденокарциномы поджелудочной железы (Manueletal. (2015) *CancerImmunol. Res.* 3 (9): 1096-1107; публикация патента США № 2016/0184456). В другом исследовании было обнаружено, что штамм *S typhimurium*, ослабленный делецией *rhoP/rhoQ* и экспрессирующий сигнальный преобразователь и активатор транскрипции 3 (STAT3)-специфичной shRNA, как былообнаружено, ингибирует рост опухоли и снижает число метастатических органов, продляя жизни мышей C57BL6 (ZhangEtal. (2007) *CancerRes* 67 (12): 5859-5864). В другом примере штамм *S typhimurium* SL7207 использовали для доставки к мишениShРНК CTNNB1, гена, который кодирует бета-катенин (Guoetal. (2011) *Genetherapy* 18: 95-105; публикация патента США № 2009/0123426, 2016/0369282), в то время как штамм VN20009 *S.typhimurium* был использован для доставки shРНК,

нацеленной на STAT3 (ManueletAl. (2011) CancerRes 71 (12): 4183-4191; публикации патентов США № 2009/0208534, 2014/0186401, 2016/0184456; WO 2008/091375; WO2012/149364).siРНК, нацеленные на гены Atg5 и Beclin1, доставлялись в опухолевые клетки с использованием штаммов *Styphimurium*A1-R и VNP20009 (Liuetal. (2016) Oncotarget 7 (16): 22873-22882). Улучшение таких штаммов необходимо для того, чтобы они более эффективно колонизировали опухоли, ТМЕ и/или находящиеся в опухоли иммунные клетки, а также стимулировали иммунный ответ и имели другие полезные свойства, такие как иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь. Модификации различных бактерий описаны в международной публикации РСТ WO 2019/014398 и в заявке на патент США 2019/0017050. Бактерии, описанные в каждой из этих публикаций, также описанные здесь, могут быть модифицированы, как описано здесь, для дополнительного улучшения иммуностимулирующих и нацеливающих на опухоль свойств.

Бактерии могут быть модифицированы, как описано здесь, для уменьшения воспалительных эффектов и, таким образом, являются менее токсичными. В результате, например, могут быть введены более высокие дозы. Любой из этих штаммов *Salmonella*, а также другие виды бактерий, известные специалистам в данной области и/или перечисленные выше и здесь, могут быть модифицированы, как описано здесь, например, путем введения ауксотрофии аденозина а плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, такой как иммуностимулирующий белок и/или РНК, такие как miРНК или shРНК, или антитело или его фрагмент, для ингибирования иммунной контрольной точки и других модификаций, как описано в настоящей заявке. Примерами являются виды *S typhimurium*, описанные в настоящей заявке.

Бактериальные штаммы, представленные здесь, сконструированы для доставки терапевтических молекул. Указанные штаммы дают иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, которые способствуют противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли. Штаммы также могут включать геномные модификации, которые снижают пироптоз фагоцитарных клеток, тем самым обеспечивая более устойчивый иммунный ответ, и/или снижают или устраняют способность инфицировать/внедрять эпителиальные клетки, но сохраняют способность инфицировать/внедрять фагоцитарные клетки, так что они накапливаются более эффективно в опухолях и в находящих в опухоли иммунных клетках. Бактериальные штаммы также могут быть модифицированы для кодирования терапевтических продуктов, включая, например, РНК-мишени, направленные и ингибирующие иммунные контрольные точки, а также в другие такие мишени.

4. Улучшение иммуностимулирующих бактерий для увеличения терапевтического индекса

В данном описании представлены улучшения иммуностимулирующих бактерий, которые снижают токсичность и улучшают противоопухолевую активность. Примерами таких усовершенствований являются следующие. Они описаны в отношении *Salmonella*, в частности *S. Typhimurium*. Понятно, что квалифицированный специалист может осуществить аналогичные улучшения в других видах бактерий и других штаммах *Salmonella*.

а. делеция гена *asd*

Ген *asd* в бактериях кодирует аспартат-полуальдегиддегидрогеназу. *asd*-мутанты *S. typhimurium* имеют обязательное требование к диаминопимелиновой кислоте (DAP), которая необходима для синтеза клеточных стенок и будет подвергаться лизису в среде, лишенной DAP. Эта ауксотрофия DAP может быть использована для отбора плазмид и поддержания стабильности плазмиды *in vivo* без применения антибиотиков, когда ген *asd* комплементируется *in trans* на плазмиде. Системы отбора плазмидной ДНК, не основанные на антибиотиках, являются предпочтительными и позволяют 1) использовать вводимые антибиотики в качестве механизма быстрого клиренса в случае неблагоприятных симптомов и 2) использовать для лишенного антибиотика крупномасштабного производства, где такое применение обычно избегается. Система комплементации гена *asd* обеспечивает такой выбор (Galan Elal. (1990) *Gene* 28: 29-35). Ожидается, что применение системы комплементации гена *asd* для поддержания плазмид в микросреде опухоли увеличивает активность *S. Typhimurium*, сконструированных для доставки плазмид, кодирующих гены или интерферирующие РНК.

Альтернативное применение мутанта *asd* *S. typhimurium* заключается в использовании ауксотрофии DAP для получения автолитического (или суицидного) штамма для доставки макромолекул в инфицированные клетки без способности устойчиво колонизировать опухоли хозяина. Делеция гена *asd* делает бактерии ауксотрофными для DAP при выращивании *in vitro* или *in vivo*. Пример, описанный здесь, обеспечивает делеционный штамм *asd*, который является ауксотрофным для DAP и содержит плазмиду, пригодную для доставки РНК, такой как shРНК или miРНК, которая не содержит *asd*-комплементирующего гена, приводя к штамму, который является дефектным для репликации *in vivo*. Этот штамм размножается *in vitro* в присутствии DAP и растет нормально, а затем вводится в качестве иммунотерапевтического средства хозяину

млекопитающему, где DAP не присутствует. Суицидный штамм способен внедряться в хозяина, но не способен реплицироваться из-за отсутствия DAP в тканях млекопитающих, автоматически лизируя и доставляя его цитозольное содержимое (например, плазмиды или белки).

В приведенных здесь примерах ген, штамма VNP20009 с удаленным геном *asd*, был дополнительно модифицирован для экспрессии белка LLO, не имеющего эндогенной последовательности сигнала периплазматической секреции, вызывая его накопление в цитоплазме *Salmonella.LLO* представляет собой гемолизин, зависимый от холестерина, из *Listeria monocytogenes*, который опосредует фагосомальную утечку бактерий. Когда автолитический штамм вводят в содержащих опухоли мышей, бактерии поглощаются фагоцитарными иммунными клетками и поступают в сальмонеллу, содержащую вакуоль (SCV). В этой среде отсутствие DAP будет предотвращать репликацию бактерий и приводить к автолизу бактерий в SCV. Затем лизис суицидного штамма позволит освободить плазмиду и накопленный LLO, которые будут образовывать поры в мембране SVC, содержащей холестерин, и обеспечивать доставку плазмиды в цитозоль клетки-хозяина

в. Ауксотрофия аденозина

Метаболиты, происходящие из триптофана и АТФ/аденозиновых путей, являются основными возбудителями при образовании иммуносупрессорной среды внутри опухоли. Аденозин, который существует в свободной форме внутри и вне клеток, является эффектором иммунной функции. Аденозин снижает активацию Т-клеток, индуцированную активацией NF- κ B, и ингибирует IL -2, IL -4 и IFN-g. Аденозин снижает цитотоксичность Т-клеток, увеличивает т-клеточную анергию и увеличивает дифференцировку Т-клеток с помощью Т-Клеток Foxp3 + или Lag -3 + (T-Reg). На NK-клетках аденозин снижает продукцию IFN-гамма и подавляет цитотоксичность NK-клеток. Аденозин блокирует адгезию и трансудацию нейтрофилов, снижает фагоцитоз и ослабляет уровни супероксида и оксида азота. Аденозин также снижает экспрессию TNF-альфа, IL -12 и MIP -1 альфа на макрофагах, ослабляет экспрессию MHC класса II и увеличивает уровни IL -10 и IL -6. Иммуномодуляция происходит после попадания аденозина во внеклеточное пространство опухоли и активации рецепторов аденозина (ADR) на поверхности мишеней – иммунных клеток, раковых клеток или эндотелиальных клеток. Высокие уровни аденозина в микроокружении опухоли приводят к местной иммуносупрессии, которая ограничивает способность иммунной системы уничтожать раковые клетки.

Внеклеточный аденозин получают путем последовательной активности связанных с мембраной эктоферментов, CD39 И CD73, которые экспрессируются на стромальных клетках опухоли, вместе с продуцированием аденозина путем фосфогидролиза АТФ или АДФ, продуцируемого из мертвых или погибающих клеток. CD39 преобразует внеклеточный АТФ (или АДФ) в 5'AMP, который превращается в аденозин через 5'AMP. Экспрессия CD39 и CD73 на эндотелиальных клетках увеличивается при гипоксических условиях микроокружения опухоли, увеличивая, таким образом, уровни аденозина. Гипоксия опухоли может быть результатом неадекватного кровоснабжения и неорганизованной сосудистой сети опухоли, ухудшая доставку кислорода (CarrollandAshcroft (2005) Expert. Rev. Mol.Med., 7 (6): 1-16). Гипоксия, которая происходит в микроокружении опухоли, также ингибирует аденилаткиназу (АК), которая превращает аденозин в АМФ, приводя к очень высоким концентрациям внеклеточного аденозина. Внеклеточная концентрация аденозина в микроокружении с пониженным содержанием кислорода была измерена при 10-100 мкМ, которая была в 100-1000 раз выше, чем обычная концентрация внеклеточного аденозина приблизительно 0,1 мкМ (Vaueletal. (2016) Adv Exp Med Biol. 876: 177-183; Antonioli et Al. (2013) Nat. Rev. Can. 13: 842-857). Поскольку гипоксические области в опухолях дистальны от микрососудов, локальная концентрация аденозина в некоторых областях опухоли может быть выше, чем у других.

Для прямого действия для ингибирования иммунной системы аденозин также может контролировать рост и распространение раковых клеток путем воздействия на пролиферацию раковых клеток, апоптоз и ангиогенез. Например, аденозин может способствовать ангиогенезу, главным образом, путем стимуляции рецепторов А24 И А28. Стимуляция рецепторов на эндотелиальных клетках может регулировать экспрессию межклеточной адгезии 1 (ICAM -1) И Е-селекцию на эндотелиальных клетках, поддерживать целостность сосудов и стимулировать рост сосудов (AntonioliEtal. (2013) Nat. Rev. Can. 13: 842-857). Активация одного или нескольких А24, А28 Или А3 на различных клетках аденозином может стимулировать продуцирование проангиогенных факторов, таких как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), интерлейкин -8 (IL -8) или ангиопоэтин 2 (Antoniolietal. (2013) Nat. Rev. Can. 13: 842-857).

Аденозин также может напрямую регулировать пролиферацию опухолевых клеток, апоптоз и метастазирование посредством взаимодействия с рецепторами раковых

клеток. Например, исследования показали, что активация рецепторов A_1 и A_{2A} способствует развитию опухолевых клеток в некоторых клеточных линиях рака молочной железы, и активация рецепторов A_{2B} обладают способствующими росту рака свойствами в клетках карциномы толстой кишки (Antoniolietal. (2013) Nat. Rev. Can. 13: 842-857). Аденозин также может запускать апоптоз раковых клеток, и различные исследования коррелировали эту активность с активацией внешнего пути апоптоза через A_3 или внутреннего пути апоптоза через A_{2A} и A_{2B} (Antoniolietal. (2013)). Аденозин может способствовать миграции и метастазированию опухолевых клеток за счет увеличения подвижности клеток, адгезии к внеклеточному матриксу и экспрессии белков прикрепления клеток и рецепторов, способствующих движению и подвижности клеток.

Внеклеточное высвобождение аденозинтрифосфата (АТФ) происходит из стимулированных иммунных клеток и поврежденных, умирающих или подвергшихся стрессу клеток. Инфламмосома, содержащая пириновый домен 3 (NLRP3) семейства NLR, когда стимулируется этим внеклеточным высвобождением АТФ, активирует каспазу-1 и приводит к секреции цитокинов IL-1 β и IL-18, которые, в свою очередь, активируют врожденные и адаптивные иммунные ответы (StaggandSmyth (2010) Oncogen 29: 5346-5358). АТФ катаболизируется в аденозин ферментами CD39 и CD73. Активированный аденозин действует как высокоиммуносупрессивный метаболит посредством механизма отрицательной обратной связи и оказывает плеiotропный эффект против нескольких типов иммунных клеток в гипоксическом микроокружении опухоли (StaggandSmyth (2010) Oncogene 29: 5346-5358). Аденозиновые рецепторы A_{2A} и A_{2B} экспрессируются на различных иммунных клетках и стимулируются аденозином, способствуя cAMP-опосредованным изменениям передачи сигналов, что приводит к иммуносупрессивным фенотипам Т-клеток, В-клеток, НК-клеток, дендритных клеток, тучных клеток, макрофагов, нейтрофилов и НКТ-клеток. В результате этого уровни аденозина могут накапливаться более чем в сто раз по сравнению с их нормальной концентрацией в патологических тканях, таких как солидные опухоли, которые, как было показано, дополнительно экспрессируют экто-нуклеотидазы, такие как CD73. Было также показано, что аденозин способствует ангиогенезу и развитию опухоли. Таким образом, сконструированная бактерия, которая является ауксотрофной по аденозину, будет демонстрировать усиленное нацеливание на опухоль и колонизацию.

Иммуностимулирующие бактерии, такие как *Salmonellatyphi*, можно сделать ауксотрофными по аденозину путем делеции гена *tsx* (Bucareyetal. (2005) InfectionandImmunity 73 (10): 6210-6219) или путем делеции *purD* (Husseiny (2005)

Инфекция и иммунитет 73 (3): 1598–1605). У грамотрицательных бактерий *Xanthomonas oryzae* было показано, что нокаут гена *purD* является ауксотрофным по аденозину (Parkelal. (2007) FEMS Microbiol Lett 276: 55-59). Как проиллюстрировано здесь, штамм *S. typhimurium* VNP20009 является ауксотрофным по аденозину из-за делеции *purI*, следовательно, дальнейшая модификация для придания ему ауксотрофности по аденозину не требуется. Следовательно, варианты осуществления иммуностимулирующих бактериальных штаммов, как предусмотрено в настоящем документе, являются ауксотрофными по аденозину. Такие ауксотрофные бактерии выборочно реплицируются в микроокружении опухоли, увеличивая накопление и репликацию введенных бактерий в опухолях и снижая уровень аденозина в опухолях и вокруг них, тем самым уменьшая или устраняя иммуносупрессию, вызванную накоплением аденозина. Примером таких бактерий, представленных в настоящем документе, является модифицированный штамм *S. typhimurium*, содержащий мутации *purI* / *msbB* для обеспечения ауксотрофии аденозина.

с. Штаммы с дефицитом флагеллина

Флагеллы представляют собой органеллы на поверхности бактерий, которые состоят из длинных волокон, прикрепленных к ротору, который может вращаться по часовой стрелке или против часовой стрелки, обеспечивая средство передвижения. Флагеллы у *S. typhimurium* важны для хемотаксиса и для установления инфекции пероральным путем из-за способности опосредовать подвижность слизистого слоя в желудочно-кишечном тракте. Хотя было продемонстрировано, что флагеллы необходимы для хемотаксиса и колонизации опухолевых цилиндров *in vitro* (Kasinskas and Forbes (2007) Cancer Res. 67 (7): 320-1 3209), подвижность также важна для проникновения опухоли (Toley and Forbes (2012) Integr Biol (Camb). 4 (2): 165-176), флагеллы не требуются для колонизации опухоли у животных при внутривенном введении бактерий (Stritzker и др. (2010) International Journal of Medical Microbiology 300: 449-456). Каждая нить флагеллы состоит из десятков тысяч субъединиц флагеллина. Хромосома *S. typhimurium* содержит два гена, *fliC* и *fljB*, которые кодируют антигенно различные мономеры флагеллина. Мутанты, дефектные как по *fliC*, так и по *fljB*, неподвижны и авирулентны при пероральном введении инфекции, но сохраняют вирулентность при парентеральном введении.

Флагеллин является главной провоспалительной детерминантой сальмонелл (Zengetal. (2003) J Immunol 171: 3668-3674) и непосредственно распознается TLR5 на поверхности клеток и NLCR4 в цитозоле (Lightfield et al. (2008) Nat. Immunol. 9 (10): 1171-

1178). Оба пути приводят к провоспалительным ответам, приводящим к секреции цитокинов, включая IL-1β, IL-18, TNF-α и IL-6. Были предприняты попытки сделать иммунотерапию рака на основе сальмонеллы более эффективной за счет усиления провоспалительного ответа на флагеллин путем инженерии бактерий, секретирующих флагеллин В *Vibriovulnificus*, который вызывает более сильное воспаление, чем флагеллин, кодируемый *fliC* и *fljB* (Zhengetal. 2017) *Sci. Transl. Med*, 9 (376): eaak9537).

Здесь представлены сконструированные бактерии *Salmonella*, *S. typhimurium*, в которых отсутствуют обе субъединицы флагеллина *fliC*, так и *fljB*, что снижает провоспалительную передачу сигналов. Например, как показано в данном документе, штамм *Salmonella*, лишенный *msbB*, что приводит к снижению индукции TNF-α, комбинируется с нокаутами *fliC* и *fljB*. Это приводит к появлению штамма *Salmonella*, который имеет комбинированное снижение индукции TNF-α и снижение узнавания TLR5. Эти модификации могут быть объединены с *msbR*, *fliC* и *fljBj* и трансформированы иммуностимулирующей плазмидой, которая может содержать CpG, и терапевтической молекулой, такой как антитело или молекула (ы) РНК, нацеленной на иммунную контрольную точку, такую как TREX1, PD-L1, VISTA, SIRP-α, TGF-β, β-катенин, CD47, VEGF и их комбинации. Возникающие в результате бактерии имеют сниженный противовоспалительный ответ, но сохраняют противоопухолевую активность.

Например, как предусмотрено здесь, двойной мутант *fliC* и *fljB* был сконструирован в штамме *S. typhimurium* VNP20009 с делецией *asd*. VNP20009, вирулентность которого ослаблена за счет разрушения *purl/purM*, также был сконструирован таким образом, чтобы содержать делецию *msbB*, которая приводит к продукции субъединицы липида А, которая является менее токсикогенной, чем липид А дикого типа. Это приводит к снижению продукции TNF-α в модели на мышах после внутривенного введения по сравнению со штаммами с липидом А дикого типа. Полученный штамм является примером штаммов, которые ослаблены в отношении бактериального воспаления путем модификации липида А для снижения передачи сигналов TLR2/4 и делеции субъединиц флагеллина для снижения распознавания и индукции инфламмосом TLR5.. Удаление субъединиц флагеллина в сочетании с модификацией LPS позволяет добиться большей переносимости у хозяина.

d. Сальмонелла, содержащая вакуоль (SCV)

Сальмонеллы, такие как *S. typhimurium*, являются внутриклеточными патогенами, которые реплицируются в основном в связанной с мембраной отсеке, и называются сальмонеллой, содержащей вакуоль (SCV). Было показано, что в некоторых линиях эпителиальных клеток и с низкой частотой *S. typhimurium* переходит в цитозоль, где может реплицироваться. Такая сальмонелла будет более эффективно доставлять макромолекулы, такие как плазмиды, поскольку липидный бислой SCV является потенциальным барьером. В данном документе представлены *Salmonella* и методы, которые увеличивают частоту утечки SCV. Это достигается удалением генов, необходимых для образования филаментов, индуцированных сальмонеллой (SIF). Эти мутанты имеют повышенную частоту ускользания SCV и могут реплицироваться в цитозоле. Например, была продемонстрирована усиленная доставка плазмиды с использованием мутанта *sifA.S. typhimurium*. Ген *sifA* кодирует SPI-2, секретлируемый T3SS-2 эффекторным белком, который имитирует или активирует семейство RhoA GTP хозяина (Ohlson et al. (2008) *Cell Host & Microbe* 4: 434-446). Другие гены, кодирующие секретлируемые эффекторы, участвующие в образовании SIF, могут быть мишенью. К ним относятся, например, *sseJ*, *sseL*, *sopD2*, *pipB2*, *sseF*, *sseG*, *spvB* и *steA*. Усиление ускользания *S. typhimurium* путем предотвращения образования SIF высвобождает живые бактерии в цитозоль, где они могут размножаться.

Другой метод увеличения выхода *S. typhimurium* из SCV и увеличения доставки макромолекул, таких как плазмиды, - это экспрессия гетерологичного гемолизина, которая приводит к образованию пор или разрыву SCV-мембраны. Одним из таких гемолизинов является белок *Listeriolysin O (LLO)* из *Listeria monocytogenes*, который кодируется геном *hlyA*. LLO представляет собой холестерин-зависимый порообразующий цитолизин, который секретруется *L. monocytogenes* и в первую очередь отвечает за выход из фагосом и проникновение в цитозоль клеток-хозяев. Секретция LLO из *S. typhimurium* может привести к утечке бактерий и репликации в цитозоле. Для предотвращения выхода интактного *S. typhimurium* из SCV и репликации в цитозоле нуклеотиды, кодирующие сигнальную последовательность, могут быть удалены из гена. Таким образом, *typhimurium* и LLO высвобождаются только тогда, когда бактерии подвергаются лизису. Как предусмотрено здесь, VNP20009, сконструированный для экспрессии *cytoLLO* для усиления доставки плазмид для экспрессии мешающих РНК к мишеням, таким как TREX1, может повышать терапевтическую эффективность иммуностимулирующих бактерий.

е. Делеции генов сальмонелл, необходимых для образования биопленки

Бактерии и грибы способны образовывать многоклеточные структуры, называемые биопленками. Бактериальные биопленки заключены в смесь секретируемых и ассоциированных с клеточной стенкой полисахаридов, гликопротеинов и гликолипидов, а также внеклеточной ДНК, вместе известных как внеклеточные полимерные вещества. Эти внеклеточные полимерные вещества защищают бактерии от множественных поражений, таких как чистящие средства, антибиотики и антимикробные пептиды. Бактериальные биопленки способствуют заселению поверхностей и являются причиной значительного инфицирования протезных материалов, таких как инъекционные отверстия и катетеры. Биопленки также могут образовываться в тканях во время инфекции, что приводит к увеличению продолжительности сохранения и выделения бактерий и ограничивает эффективность лечения антибиотиками.

Образование биопленок *S. typhimurium* регулируется CsgD. CsgD активирует оперон *csgBAC*, что приводит к увеличению продукции ограниченных фимбриальных субъединиц CsgA и CsgB (Zakikhani et al. (2010) *Molecular Microbiology* 77 (3): 77-1-786). CsgA распознается TLR2 как PAMP и индуцирует продукцию IL-8 из макрофагов человека (Tukel et al. (2005) *Molecular Microbiology* 58 (1): 289-304). Кроме того, CsgD косвенно увеличивает выработку целлюлозы за счет активации гена *adrA*, который кодирует дигуанилатциклазу. Низкомолекулярный циклический ди-гуанозинмонофосфат (c-di-GMP), вырабатываемый *AdrA*, является повсеместным вторичным мессенджером, обнаруживаемым почти у всех видов бактерий. *AdrA*-опосредованное увеличение c-di-GMP усиливает экспрессию гена целлюлозосинтетазы *bcsA*, что, в свою очередь, увеличивает выработку целлюлозы за счет стимуляции оперонов *bcsABZC* и *bcsEFG*. Снижение способности иммуностимулирующих бактерий, таких как *S. typhimurium*, образовывать биопленки, может быть достигнуто путем делеции генов, участвующих в образовании биопленок, таких как, например, *csgD*, *csgA*, *csgB*, *adrA*, *bcsA*, *bcsB*, *bcsZ*, *bcsE*, *bcsF*, *bcsG*, *dsbA* или *dsbB* (Anwarel et al. (2014) *PlosOne* 9 (8): e106095).

S. typhimurium может образовывать биопленки в солидных опухолях в качестве защиты от фагоцитоза иммунными клетками хозяина. Мутанты сальмонеллы, которые не могут образовывать биопленки, быстрее поглощаются фагоцитарными клетками хозяина и выводятся из инфицированных опухолей (Crullet et al. (2011) *Cellular Microbiology* 13 (8): 1223-1233). Это увеличение внутриклеточной локализации в фагоцитарных клетках может снизить устойчивость внеклеточных бактерий и повысить эффективность доставки плазмиды и нокдауна гена за счет РНК-интерференции, как описано

здесь. Иммуностимулирующие бактерии, созданные для уменьшения образования биопленок, увеличивают скорость выведения изопухоли / ткани и, следовательно, увеличивают переносимость терапии и предотвращают колонизацию у пациентов, тем самым увеличивая терапевтическую эффективность этих штаммов. Миметики аденозина могут ингибировать образование биопленок *S. typhimurium*, что указывает на то, что высокая концентрация аденозина в микроокружении опухоли может способствовать образованию ассоциированной с опухолью биопленки (Koopmanetal. (2015) *AntimicrobAgentsChemother* 59:76-84). Как предусмотрено в настоящем документе, живые аттенуированные штаммы бактерий, такие как *S. typhimurium*, которые предусматривают разрушение *purI* (и, следовательно, колонизируют опухоли, богатые аденозином), а также предотвращены от образования биопленок путем удаления одного или нескольких генов, необходимых для биопленки. образования, сконструированы для доставки плазмид, кодирующих мешающую РНК, чтобы стимулировать устойчивый противоопухолевый иммунный ответ.

Ген *adrA* кодирует дигуанилатциклазу, которая продуцирует *c-di-GMP*, который необходим для образования биопленки *S. typhimurium*. *c-di-GMP* связывается с цитозольным белком хозяина *STING* и является его агонистом. Как описано выше, агонисты *STING* используются в качестве противораковых препаратов, адъювантов вакцин и бактерий, созданных для секреции циклических динуклеотидов для использования в иммунотерапии (Libanova 2012, Synlogic 2018 AACR poster). Иммуностимулирующие бактерии, у которых снижается продукция *c-di-GMP* за счет делеции *adrA*, противоречат здравому смыслу, но бактериальные мутанты, такие как мутанты *S. typhimurium*, которые не могут образовывать биопленки (включая мутант *adrA*), продемонстрировали сниженный терапевтический потенциал в модели опухолей мышей (Crulletal. (2011) *CellularMicrobiology* 13 (8): 1223-1233).

Как описано в данном документе, бактериальные штаммы, такие как штаммы *S. typhimurium*, которые сконструированы как ауксотрофные по аденозину, и их способность индуцировать провоспалительные цитокины снижена за счет модификации ЛПС и / или делеции флагеллина, и / или делеции генов, необходимых для образования биопленок, и дополнительно модифицированных для доставки мешающих РНК, способствуют устойчивым противоопухолевым иммунным ответам.

f. Делеции в генах биосинтетического пути ЛПС

ЛПС грамотрицательных бактерий является основным компонентом внешнего листка бактериальной мембраны. Он состоит из трех основных частей: липида А, неповторяющегося основного олигосахарида и О-антигена (или О-полисахарида). О-антиген является самой внешней частью ЛПС и служит защитным слоем против бактериальной проницаемости, однако сахарный состав О-антигена широко варьируется между штаммами. Липид А и основной олигосахарид различаются в меньшей степени и более обычно консервативны в пределах штаммов одного и того же вида. Липид А - это часть ЛПС, которая обладает активностью эндотоксина. Обычно это дисахарид, содержащий множество жирных кислот. Эти гидрофобные цепи жирных кислот закрепляют ЛПС в бактериальной мембране, а остальная часть ЛПС выступает с поверхности клетки. Домен липида А ответственен за большую часть токсичности грамотрицательных бактерий. Как правило, LPS в крови распознается как значимая молекулярная структура, ассоциированная с патогенами (PAMP), и вызывает выраженную провоспалительную реакцию. ЛПС является лигандом для мембраносвязанного рецепторного комплекса, включающего CD14, MD2 и TLR4. TLR4 - это трансмембранный белок, который может передавать сигналы через пути MyD88 и TRIF, чтобы стимулировать путь NFκB и приводить к продукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF-альфа и IL-1бета, результатом чего может быть эндотоксический шок, который может быть фатальным. LPS в цитозоле клеток млекопитающих может напрямую связываться с доменами CARD каспаз 4, 5 и 11, что приводит к аутоактивации и пироптозной гибели клеток (Hagaretal. (2015) CellResearch 25: 149-150).

Состав липида А и токсичность вариантов липида А хорошо документированы. Например, монофосфорилированный липид А гораздо менее воспалительный, чем липид А с несколькими фосфатными группами. Количество и длина ацильных цепей на липиде А также могут иметь сильное влияние на степень токсичности. Канонический липид А из *E. coli* имеет шесть ацильных цепей, и это гексаацилирование сильно токсично. Липид А *S. typhimurium* подобен липиду *E. coli*; это дисахарид глюкозамина, который несет четыре первичные и две вторичные гидроксиацильные цепи (RaetzandWhitfield (2002) AnnuRevBiochem. 71: 635-700).

Как описано выше, мутанты *msbB S. typhimurium* не могут подвергаться терминальному миристоиллированию своего LPS и продуцировать преимущественно пентаацилированный LPS, который значительно менее токсичен, чем гексаацилированный липид А. Модификация липида А пальмитатом катализируется пальмитойлтрансферазой (PagP). Транскрипция гена *pagP* находится под контролем системы PhoP / PhoQ, которая

активируется низкой концентрацией магния, например, внутри SCV. Таким образом, ацильное содержание *S.typhimurium* изменчиво, и у бактерий дикого типа он может быть гекса- или пентаацилированным. Способность *S. typhimurium* пальмитировать свой липид А повышает устойчивость к антимикробным пептидам, которые секретируются в фаголизомы.

В *S. typhimurium* дикого типа экспрессия *ragP* приводит к образованию липида А, который является гепта-ацилированным. В мутанте *msbB* (в котором терминальная ацильная цепь липида А не может быть добавлена) индукция *ragP* приводит к гексаацилированному LPS (Kongetal. (2011) *InfectionandImmunity* 79 (12): 5027-5038). Было показано, что гексаацилированный ЛПС является наиболее провоспалительным. В то время как другие группы пытались использовать этот провоспалительный сигнал, например, путем делеции *ragP*, чтобы позволить продуцировать только гексаацилированный ЛПС (Felgneretal. (2016) *GutMicrobes* 7 (2): 171-177; Felgner etal. (2018) *Oncoimmunology* 7 (2): e1382791), это может привести к плохой переносимости из-за TNF-альфа-опосредованной провоспалительной природы LPS и парадоксально менее адаптивного иммунитета (Kocijancicetal. (2017) *Oncotarget* 8 (30): 49988-50001).

ЛПС является мощным агонистом TLR-4, который индуцирует TNF-альфа и IL-6. Ограничивающая дозу токсичность в клиническом исследовании VNP20009 (Tosoetal. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20 (1): 142-152) при $1E9$ КОЕ / м² опосредована цитокинами (лихорадочная гипотензия), при уровнях TNF-а > 100000 пг / мл и уровнях IL-6 > 10000 пг / мл в сыворотке через 2 часа. Несмотря на делецию *msbB* в VNP20009 и его пониженную пирогенность, LPS все еще может быть токсичным в высоких дозах, возможно, из-за присутствия гексаацилированного LPS. Таким образом, штамм *ragP* / *msbB* лучше переносится при более высоких дозах, поскольку он не может продуцировать гексаацилированный ЛПС, и позволяет вводить дозу для людей при $1E9$ КОЕ / м² или выше. Более высокая дозировка может привести к усилению колонизации опухоли, повышая терапевтическую эффективность иммуностимулирующих бактерий.

В настоящем документе представлены живые аттенуированные штаммы *Salmonella*, такие как примерный штамм *S. typhimurium*, который может продуцировать только пентаацилированный LPS, который содержит делецию гена *msbB* (который предотвращает терминальное миристоилирование липида А, как описано выше), и которые дополнительно модифицируются путем делеции *ragP* (предотвращая пальмитоилирование). Штамм, модифицированный для производства пента-

ацилированного LPS, обеспечивает более низкие уровни провоспалительных цитокинов, повышенную чувствительность к антимикробным пептидам, улучшенную переносимость и повышенный противоопухолевый иммунитет при дальнейшей модификации для экспрессии мешающих РНК против иммунных контрольных точек, таких как TREX1.

g. Делеции генов SPI-1 и SPI-2

Как описано выше, патогенез в определенных бактериальных штаммах, включая штаммы *Salmonella* такие как *S. typhimurium*, включает кластер генов, относящихся к патогенности *Salmonella* (SPI; см. FIG. 22). Опероны и гены и их функции показаны на Фиг. 22. Гены SPI включают, но не ограничиваясь этим:

avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invI, invJ, iacP, iagB, spaO, spaP, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgI, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA, sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB, isptP. Удаление одного или более этих генов уменьшает или исключает способность бактерий инфицировать эпителиальные клетки, но не влияет на их способность инфицировать фагоцитарные, включая фагоцитарные иммунные клетки.

Сальмонелла проникает в нефагоцитарные эпителиальные клетки кишечника с помощью системы секреции 3-го типа (T3SS), кодируемой островком патогенности сальмонелл 1, который образует игольчатую структуру, которая вводит эффекторные белки непосредственно в цитозоль клеток-хозяев. Эти эффекторные белки приводят к перестройке цитоскелета эукариотических клеток для облегчения инвазии кишечного эпителия, а также индуцируют провоспалительные цитокины. Локус SPI-1 включает 39 генов, которые кодируют компоненты этой системы инвазии (см. Фиг. 22, воспроизведенный из Kimbrough and Miller (2002) *Microbes Infect.* 4 (1): 75-82).

SPI-1 кодирует систему секреции 3-го типа (T3SS), которая отвечает за транслокацию эффекторных белков в цитозоль клеток-хозяев, что может вызывать перестройки актина, приводящие к поглощению сальмонеллы. SPI-1 T3SS необходим для прохождения через эпителиальный слой кишечника, но он незаменим при инфекции, когда бактерии вводятся парентерально. Инъекция некоторых белков и самого комплекса иглы также может вызывать активацию инфламмасом и пироптоз фагоцитарных клеток. Эта провоспалительная гибель клеток может ограничивать иницирование устойчивого адаптивного иммунного ответа, напрямую индуцируя гибель антигенпрезентирующих клеток (APC), а также изменяя цитокиновую среду для предотвращения образования Т-клеток памяти. Гены SPI-1 включают ряд оперонов, в том

числе: *sitABCD*, *sprB*, *avrA*, *hilC*, *orgABC*, *prgKJIH*, *hilD*, *hilA*, *iagB*, *sptP*, *sicC*, *iacP*, *sipADCB*, *sicA*, *spaOPQRS*, *invFGEABCIJ*, *uinvH*.

T3SS представляют собой комплексы, которые играют большую роль в инфекционности грамотрицательных бактерий, путем инъекции эффекторов бактериальных белков непосредственно в клетки-хозяева АТФ-зависимым образом. Комплексы T3SS проникают через внутреннюю и внешнюю бактериальные мембраны и создают поры в мембранах эукариотических клеток при контакте с клеткой-хозяином. Они состоят из устройства экспорта, комплекса иглы и транслокона на кончике иглы (фиг. 22). Комплекс иглы включает белок иглы PrgI, базальное тельце, которое закрепляет комплекс в бактериальных мембранах и состоит из белков PrgH, PrgK и InvG, а также других белков, включая InvH, PrgJ (белок стержня) и InvJ. Транслокон, образующий поры в клетке-хозяине, представляет собой комплекс белков SipB, SipC и SipD. Аппарат вывоза, который обеспечивает транслокацию эффекторных белков, состоит из белков SpaP, SpaQ, SpaR, SpaS, InvA, InvC и OrgB. Платформа цитоплазматической сортировки, которая устанавливает определенный порядок секреции белков, состоит из белков SpaO, OrgA и OrgB (Manonetal. (2012), *Salmonella*, 17, AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339–364).

Эффекторы, перемещаемые в клетку-хозяина с помощью T3SS-1, включают Sip A, SipC, SopB, SopD, SopE, SopE2 и SptP, которые необходимы для инвазии клеток. Например, мутанты *S. typhimurium sipA* демонстрируют снижение инвазии на 60-80%, делеция *sipC* приводит к уменьшению инвазии на 95%, а делеция *sopB* приводит к снижению инвазии на 50% (Manonetal. (2012), *Salmonella*, 17, AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364). Другие эффекторы включают AvtA, который контролирует воспаление, вызванное сальмонеллой. Шапероны, которые связывают секретируемые белки и поддерживают их в конформации, способной к секреции, включают SicA, InvB и SicP. Регуляторы транскрипции включают HilA, HilD, InvF, SirC и SprB. Неклассифицированные белки T3SS SPI-1, которые выполняют различные функции в секреции типа III, включают OrgC, InvE, InvI, IacP и IagB (см. фиг. 22, адаптированный из Kimbroughetal. (2002) *MicrobesInfect.* 4 (1): 75). -82).

Таким образом, инактивация SPI-1-зависимой инвазии посредством инактивации или нокаута одного или нескольких генов, участвующих в пути SPI-1, устраняет способность бактерий инфицировать эпителиальные клетки. Эти гены включают, но не ограничиваются, одним из:

avrA, *hilA*, *hilD*, *invA*, *invB*, *invC*, *invE*, *invF*, *invG*, *invH*, *invI*, *invJ*, *iacP*, *iagB*, *spaO*, *spaP*,

spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgI, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA, sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB, usptP.

Было показано, что мутанты сальмонеллы, лишенные T3SS-1, вторгаются в многочисленные клеточные линии / типы посредством независимого от T3SS-1 механизма инвазии с участием нескольких белков, включая инвазины Rck, PagN и HlyE. Оперон *rck* содержит 6 открытых рамок: *pefI*, *srgD*, *srgA*, *srgB*, *rck* и *srgC*. *pefI* кодирует транскрипционный регулятор оперона *pef*, который участвует в биосинтезе фимбрий Pef. Эти фимбрии участвуют в образовании биопленок, адгезии к тонкой кишке мышей и накоплении жидкости у детенышей мыши. SrgA окисляет дисульфидную связь PefA, основной структурной субъединицы Pef-фимбрий. *srgD* кодирует предполагаемый регулятор транскрипции; SrgD вместе с PefI работают, чтобы индуцировать синергетическую негативную регуляцию экспрессии жгутиковых генов. *srgB* кодирует предполагаемый белок внешней мембраны, а *srgC* кодирует предполагаемый регулятор транскрипции (Manonet al. (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364).

Rck представляет собой белок внешней мембраны 17kDa, кодируемый большой плазмидой вирулентности *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*, который вызывает адгезию и инвазию эпителиальных клеток и придает высокий уровень устойчивости к нейтрализации комплементом, предотвращая мембранную атаку. У мутанта *rck* наблюдается уменьшение инвазии эпителиальных клеток в 2-3 раза по сравнению со штаммом дикого типа, в то время как сверхэкспрессия Rck приводит к усилению инвазии. Rck индуцирует вход в клетки посредством рецептор-опосредованного процесса, способствуя локальному ремоделированию актина и слабым и плотно прилегающим мембранным расширениям. Таким образом, сальмонелла может проникать в клетки с помощью двух различных механизмов: триггерного механизма, опосредованного комплексом T3SS-1, и механизма, индуцированного Rck (Manonet al. (2012), Salmonella, глава 17, ред. AnnousandGurtler, Rijeka, стр. 339-364).

Инвазин PagN - это белок внешней мембраны, который, как было показано, также играет роль в инвазии сальмонелл. Экспрессия *pagN* регулируется *phoP*. Специфические стимулы, например, закисленная среда фагосом макрофагов или низкий уровень Mg^{2+} концентрации, воспринимаются PhoQ, который затем активирует PhoP для регулирования определенных генов. Было показано, что делеция *pagN* в *S. typhimurium* приводит к 3-кратному снижению инвазии энтероцитов без изменения клеточной

адгезии. Хотя механизм входа, опосредованный *PagN*, не до конца понятен, было показано, что полимеризация актина необходима для инвазии. Исследования показали, что *PagN* необходим для выживания сальмонелл у мышей BALB/c, и что мутант *pagN* менее конкурентоспособен в колонизации селезенки мышей, чем родительский штамм. Поскольку *pagN* активируется с помощью *PhoP*, он в основном экспрессируется внутриклеточно, где островок SPI-1, кодирующий T3SS-1, подавляется. Таким образом, возможно, что бактерии, покидающие эпителиальные клетки или макрофаги, имеют оптимальный уровень экспрессии *PagN*, но имеют низкую экспрессию T3SS-1. *hlyE* имеет более чем 90% идентичность последовательности с гемолизином *HlyE* (*ClyA*) *E. coli*. Белок *HlyE* элизирует эпителиальные клетки при экспорте из бактериальных клеток посредством высвобождения везикул внешней мембраны и участвует в инвазии эпителиальных клеток. *HlyE* также участвует в установлении системной инфекции *Salmonella* (Manonetal. (2012), *Salmonella*, Chapter 17, AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364).

Устранение способности инфицировать эпителиальные клетки также может быть достигнуто путем создания иммуностимулирующих бактерий, описанных здесь, чтобы они содержали нокауты или делеции генов, кодирующих белки, участвующие в SPI-1-независимой инвазии, таких как один или несколько генов *rck*, *pagN*, *hlyE*, *pefI*, *srgD*, *srgA*, *srgB* и *srgC*.

Как описано в данном документе, предоставлены иммуностимулирующие бактерии, модифицированные таким образом, что они не заражают эпителиальные клетки, но сохраняют способность инфицировать фагоцитарные клетки, включая находящиеся в опухоли иммунные клетки, тем самым эффективно направляя иммуностимулирующие бактерии в микроокружение опухоли. Это достигается удалением или отключением любого из белков в SPI-1, включая, помимо прочего, удаление еще одного из: *avrA*, *hilA*, *hilD*, *invA*, *invB*, *invC*, *invE*, *invF*, *invG*, *invH*, *invI*, *invJ*, *iacP*, *iagB*, *spaO*, *spaP*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*, *orgA*, *orgB*, *orgC*, *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *sicA*, *sicP*, *sipA*, *sipB*, *sipC*, *sipD*, *sirC*, *sopB*, *sopD*, *sopE*, *sopE2*, *sprB*, *andsptP*, *aswellasoneormoreofrck*, *pagN*, *hlyE*, *pefI*, *srgD*, *srgA*, *srgB*, *rck* *usrgC*.

Имуностимулирующие бактерии, которые не инфицируют эпителиальные клетки, могут быть дополнительно модифицированы, как описано здесь, для кодирования продуктов, стимулирующих иммунную систему, включая, например, цитокины. Бактерии обычно имеют делецию *asd*, что делает их неспособными к репликации в организме млекопитающего-хозяина.

Например, предоставлены штаммы *S. typhimurium*, модифицированные делецией одного или нескольких генов SPI-1, а также модифицированные одной или несколькими делециями *purl*, делециями *msbB* и *asd*, а также путем доставки плазмид, кодирующих белки, которые стимулируют иммунную систему, например гены, кодирующие иммуностимулирующие цитокины. Например, бактерии с делециями регуляторного гена (например, *hilA* или *invF*), необходимого для экспрессии системы секреции типа 3, связанной с SPI-1 (T3SS-1), структурного гена T3SS-1 (например, *invG* или *prgH*) и / или эффекторный ген T3SS-1 (например, *sipA* или *avrA*). Как обсуждалось выше, эта система секреции отвечает за введение эффекторных белков в цитозоль нефагоцитарных клеток-хозяев, таких как эпителиальные клетки, которые вызывают поглощение бактерий; делеция одного или нескольких из этих генов устраняет инфекцию / инвазию эпителиальных клеток. Удаление одного или нескольких генов, таких как *hilA*, обеспечивает иммуностимулирующие бактерии, которые можно вводить внутривенно или внутриопухолево, что приводит к инфицированию фагоцитарных клеток, для захвата которых не требуется SPI-1 T3SS, а также продлевает их продолжительность жизни фагоцитарных клеток. Мутация *hilA* также снижает количество провоспалительных цитокинов, повышая переносимость терапии, а также качество адаптивного иммунного ответа. а также продлевает продолжительность жизни этих фагоцитарных клеток. Мутация *hilA* также снижает количество провоспалительных цитокинов, повышая переносимость терапии, а также качество адаптивного иммунного ответа.

У сальмонелл также есть остров патогенности сальмонелл 2 (SPI-2), кодирующий другой T3SS, который активируется после проникновения бактерии в клетку-хозяина и препятствует созреванию фагосом, что приводит к образованию специализированной вакуоли, содержащей сальмонеллу (SCV). , где сальмонелла находится во время внутриклеточного выживания и репликации. SPI-2 T3SS эффекторы включают *SseB*, *SseC*, *SseD* и *SpiC*, которые отвечают за сборку оболочки F-актина вокруг внутриклеточных бактерий; эта актиновая оболочка способствует слиянию SCV с актинсодержащими или управляемыми актином пузырьками и предотвращает их слияние с неблагоприятными компартментами. *SifA* отвечает за образование индуцированных сальмонеллами филаментов (SIF), которые представляют собой каналы, соединяющие отдельные SCV в инфицированной клетке. *sifA* необходим для поддержания целостности SCV, а мутанты *sifA* высвобождаются в цитозоль клеток-хозяев. *SseF* и *SseG* являются компонентами SPI-2 T3SS, которые участвуют в процессах позиционирования SCV и клеточного переноса, которые направляют материалы, необходимые для выживания и репликации бактерий в SCV. *SseF* и *SseG* также участвуют в образовании SIF. Другие эффекторы T3SS SPI-2

включают PipB2, SopD2 и SseJ, которые участвуют в образовании SIF и SCV и поддержании целостности вакуолей; SpvC, SseL и SspH1, которые участвуют в передаче сигналов иммунной системы хозяина; и SteC, SspH2, SrfH / SseI и SpvB, которые участвуют в формировании сети F-актина SCV, в миграции инфицированных фагоцитов, в ингибировании полимеризации актина и в разборке Р-телец в инфицированных клетках (Coburn и другие. (2007) *ClinicalMicrobiologyReviews* 20 (4): 535-549; FigueiraandHolden (2012) *Microbiology* 158:1147-1161).

Иммуностимулирующие бактерии, описанные здесь, могут включать делеции или модификации в любом из генов SPI-2 T3SS, которые влияют на формирование или целостность SCV и связанных структур, таких как SIF. Эти мутанты имеют повышенную частоту освобождения SCV и могут реплицироваться в цитозоле. Например, иммуностимулирующие бактерии, такие как виды *Salmonella*, сконструированные для выхода из SCV, более эффективны при доставке макромолекул, таких как плазмиды, поскольку липидный бислой SCV является потенциальным барьером. Это достигается путем делеции или мутации генов, необходимых для образования филаментов, индуцированных сальмонеллами (SIF), включая, например, *sifA*, *sseJ*, *sseL*, *sopD2*, *pipB2*, *sseF*, *sseG*, *spvB* и *steA*.

Иммуностимулирующие бактерии, которые могут освобождать SCV, могут быть дополнительно модифицированы, как описано здесь, для кодирования продуктов, стимулирующих иммунную систему, включая, например, цитокины. Бактерии обычно имеют делецию *asd*, что делает их неспособными к репликации в организме млекопитающего-хозяина.

h. Мутации эндонуклеазы (*endA*) для увеличения доставки плазмид

Ген *endA* (например, SEQ ID NO: 250) кодирует эндонуклеазу (например, SEQ ID NO: 251), которая опосредует деградацию двухцепочечной ДНК в периплазме грамотрицательных бактерий. Наиболее распространенными штаммами лабораторных *E. coli* являются *endA* - поскольку мутация в конце гена *A* позволяет получать более высокие выходы плазмидной ДНК. Чтобы облегчить доставку интактной плазмидной ДНК, ген *endA* сконструированных иммуностимулирующих бактерий удален или мутирован для предотвращения его эндонуклеазной активности. Примером таких мутаций является аминокислотная замена E208K (Durfee, et al. (2008) *J Bacteriol.* 190 (7): 2597-2606) или соответствующая мутация в интересующем виде. *endA*, включая E208, находится среди

видов бактерий, включая *Salmonella*. Таким образом, мутация E208K может быть использована для устранения эндонуклеазной активности у других видов, включая виды *Salmonella*. Специалисты в данной области могут ввести другие мутации или делеции для устранения активности *endA*. Что увеличит эффективность доставки интактной плазмидной ДНК, тем самым увеличивая экспрессию РНК, таких как shРНК и / или miРНК, нацеленных на любую, две или более иммунных контрольных точек, кодируемых в плазмиде, тем самым увеличивая опосредованный РНК нокаун генов контрольных точек и повышение противоопухолевой эффективности

i. Ингибирование RIG-I

Один из TLR-независимых путей IFN типа I опосредуется узнаванием хозяином одноцепочечной (ss) и двухцепочечной (ds) РНК в цитозоле. Они воспринимаются РНК-геликазами, включая ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), ген 5, связанный с дифференцировкой меланомы (MDA-5), и через адаптерный белок промотора IFN-бета-стимулятор 1 (IPS-1), фосфорилирование фактора транскрипции IRF-3, приводящее к индукции IFN типа I (IretonandGale (2011) *Viruses* 3 (6): 906-919). RIG-I распознает dsРНК и ssРНК, несущие 5'-трифосфаты. Этот фрагмент может напрямую связываться с RIG-I или быть синтезирован из матрицы поли (dA-dT) с помощью поли ДНК-зависимой РНК-полимеразы III (Pol III) (Chiu, YH et al. (2009) *Cell* 138 (3): 576-91). Матрица поли (dA-dT), содержащая две динуклеотидные последовательности AA, встречается в сайте начала транскрипции промотора U6 в общем векторе клонирования лентивирусной shРНК. Его последующая делеция в плазмиде предотвращает активацию IFN типа I (Pebernard et al. (2004) *Differentiation*. 72: 103-111). Связывающая последовательность RIG-I может быть включена в плазмиды, представленные в данном документе; включение может увеличить иммуностимуляцию, которая увеличивает противоопухолевую активность иммуностимулирующих бактерий.

j. Ингибирование ДНКазы II

Другой нуклеазой, ответственной за деградацию чужеродной и собственной ДНК, является ДНКазы II, эндонуклеаза, которая находится в эндосомном компартменте и разрушает ДНК после апоптоза. Недостаток ДНКазы II (ДНКазы 2 альфа у мышей) приводит к накоплению эндосомальной ДНК, которая переходит в цитозоль и активирует передачу сигналов cGAS / STING (Lan YY et al. (2014) *Cell Rep.* 9 (1): 180-192). Подобно TREX1, дефицит ДНКазы II у людей проявляется аутоиммунными интерферопатиями

типа I. При раке умирающие опухолевые клетки, захваченные находящимися в опухоли макрофагами, предотвращают активацию cGAS / STING и потенциальный аутоиммунитет через расщепление ДНКазой II ДНК в эндосомном компартменте (Ahnetal. (2018) CancerCell 33: 862-873). Следовательно, варианты иммуностимулирующих бактериальных штаммов, как предусмотрено в настоящем документе, кодируют РНК, такие как shРНК или miРНК, которые ингибируют, подавляют или разрушают экспрессию ДНКазыII в микроокружении опухоли, тем самым предотвращая накопление эндцитозированной апоптотической раковой ДНК в цитозоле, где она может действовать как агонист cGAS/STING.

к. Ингибирование РНКазы H2

В то время как TREX1 и ДНКаза II действуют для устранения aberrантного накопления ДНК, РНКаза H2 действует аналогично, устраняя патогенное накопление гибридов РНК: ДНК в цитозоле. Подобно TREX1, дефицит РНКазы H2 также вносит вклад в аутоиммунный фенотип синдрома Айкарди-Гутьереса (Rabe, В. (2013) JMolMed. 91: 1235-1240). В частности, было показано, что потеря РНКазы H2 и последующее накопление гибридов РНК: ДНК или встроенных в геном рибонуклеотидных субстратов активируют передачу сигналов cGAS / STING. (MacKenzieetal. (2016) EMBO J. Apr.15; 35 (8): 831-44). Следовательно, варианты осуществления иммуностимулирующих бактериальных штаммов, как предусмотрено в настоящем документе, кодируют РНК, такие как shРНК или miРНК, которые ингибируют, подавляют или нарушают экспрессию РНКазы H2, тем самым ингибируя РНКазу H2, что приводит к получению РНК, происходящей из опухоли: гибриды ДНК и их производные. , которые активируют передачу сигналов cGAS / STING и противоопухолевый иммунитет.

l. Ингибирование Стабилин-1 / CLEVER-1

Другой молекулой, экспрессирующейся в основном на моноцитах и участвующей в регуляции иммунитета, является стабилин-1 (название гена STAB1, также известен как CLEVER-1, FEEL-1). Стабилин-1 представляет собой трансмембранный белок типа I, который активируется на эндотелиальных клетках и макрофагах после воспаления и, в частности, на макрофагах, связанных с опухолью (Kzhyshkowskaetal. (2006) J. Cell. Mol. Med.10 (3): 635-649). При воспалительной активации стабиллин-1 действует как поглотитель и способствует заживлению ран и очищению организма от апоптоза, а также может предотвратить повреждение тканей, такое как фиброз печени (Rantakarietal. (2016)

PNAS 113 (33): 9298-9303). Повышающая регуляция стабиллина-1 напрямую ингибирует антиген-специфические Т-клеточные ответы, и было показано, что нокдаун siРНК в моноцитах усиливает их провоспалительную функцию (Palani, S. и др. (2016) *J Immunol.* 196: 115-123). Следовательно, варианты реализации иммуностимулирующих бактериальных штаммов, как предусмотрено в настоящем документе, кодируют РНК, такие как shРНК или miРНК, которые ингибируют, подавляют или нарушают экспрессию Стабиллин-1 / CLEVER-1 в микроокружении опухоли, тем самым усиливая провоспалительные функции находящихся в опухоли макрофагов.

5. Иммуностимулирующие белки

Указанные здесь иммуностимулирующие бактерии могут быть модифицированы для кодирования иммуностимулирующего белка, который стимулирует, индуцирует или усиливает противоопухолевый ответ. Иммуностимулирующий белок может быть закодирован на плазмиде в бактерии под контролем эукариотического промотора, такого как промотор, распознаваемый РНК-полимеразой II, для экспрессии в эукариотическом субъекте, в частности субъекте, которому иммуностимулирующая бактерия должна вводиться, например, человека. Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок, может включать, помимо эукариотического промотора, другие регуляторные сигналы для экспрессии или транспортировки в клетках, например, для секреции или экспрессии на поверхности клетки.

Иммуностимулирующие белки - это белки, которые в подходящей среде, такой как микроокружение опухоли (ТМЕ), могут стимулировать, участвовать или усиливать противоопухолевый ответ субъекта, которому вводят иммуностимулирующую бактерию. Иммуностимулирующие белки включают, но не ограничиваются ими, цитокины, хемокины и костимуляторные молекулы. К ним относятся цитокины, такие как, но не ограничиваясь ими, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, and IL-18; хемокины, такие как, но не ограничиваясь ими, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11; и / или костимуляторные молекулы, такие как, но не ограничиваясь ими, CD40, CD40L, OX40, OX40L, 4-1BB, 4-1BBL, члены суперсемейства TNF / TNFR и члены семейства B7-CD28. Другие иммуностимулирующие белки, которые используются для лечения опухолей или которые могут стимулировать, усиливать или иным образом увеличивать или вызывать противоопухолевый ответ, известные специалистам в данной области, для кодирования иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе.

Геном иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, также можно модифицировать для увеличения или стимулирования инфицирования иммунных клеток, в частности иммунных клеток в микроокружении опухоли, таких как фагоцитарные клетки. Бактерии также можно модифицировать для уменьшения пироптоза иммунных клеток. К иммуностимулирующим бактериям относятся бактерии, которые, например, имеют модификации, которые нарушают / ингибируют путь SPI-1, такие как нарушение или делеция *hilA* и / или нарушение / удаление генов флагеллина, белка палочки, белка иглы и / или белка *ragP*, как подробно описано и проиллюстрировано в другом месте настоящего документа.

Имуностимулирующие бактерии, кодирующие цитокины и хемокины

В некоторых вариантах реализации указанные здесь иммуностимулирующие бактерии сконструированы для экспрессии цитокинов для стимуляции иммунной системы, включая, помимо прочего, IL-2, IL-7, IL-12 (IL-12p70 (IL12p40 + IL-12p35)), IL-15 (и комплекс альфа-цепи IL-15TL-15R) и IL-18. Цитокины стимулируют иммунные эффекторные клетки и стромальные клетки в месте опухоли и усиливают распознавание опухолевых клеток цитотоксическими клетками. В некоторых вариантах реализации иммуностимулирующие бактерии могут быть сконструированы для экспрессии хемокинов, таких как, например, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11.

IL-2

Интерлейкин-2 (IL-2), который был первым цитокином, одобренным для лечения рака, участвует в активации иммунной системы несколькими способами, включая активацию и стимулирование роста CTL, генерацию лимфокин-активированных клеток-киллеров (LAK), стимулирование роста и пролиферации Treg-клеток, стимуляцию TIL и стимулирование пролиферации Т-клеток, В-клеток и NK-клеток и дифференциацию. Рекомбинантный IL-2 (rIL-2) одобрен FDA для лечения метастатической почечно-клеточной карциномы (ПКР) и метастатической меланомы (Sheikhietal. (2016) Iran J Immunol. 13 (3): 148-166).

IL-7

IL-7, который является членом суперсемейства IL-2, участвует в выживании, пролиферации и гомеостазе Т-клеток. Было показано, что мутации в рецепторе IL-7

приводят к потере Т-клеток и развитию тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), что подчеркивает критическую роль, которую IL-7 играет в развитии Т-клеток. IL-7 представляет собой гомеостатический цитокин, который обеспечивает непрерывные сигналы для находящихся в состоянии покоя Т-клеток и Т-клеток памяти, и который накапливается в условиях лимфопении, что приводит к увеличению как пролиферации Т-клеток, так и разнообразия репертуара Т-клеток. По сравнению с IL-2, IL-7 является селективным в отношении увеличения CD8⁺ Т-клеток по сравнению с CD4⁺ FOXP3⁺ регуляторными Т-клетками. Было показано, что рекомбинантный IL-7 усиливает антиген-специфические Т-клеточные ответы после вакцинации и адоптивной клеточной терапии у мышей. IL-7 также может играть роль в ускорении восстановления Т-клеток после химиотерапии трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Клинические испытания ранней фазы на пациентах с поздними стадиями злокачественных новообразований показали, что рекомбинантный IL-7 хорошо переносится и имеет ограниченную токсичность в биологически активных дозах (т. е. при которых количество циркулирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток увеличились в 3-4 раза) (Lee, S. and Margolin, K. (2011) *Cancers* 3: 3856-3893). Было показано, что IL-7 обладает противоопухолевым действием в опухолях, таких как глиомы, меланомы, лимфомы, лейкемия, рак простаты и глиобластома, а введение IL-7 *in vivo* на мышинных моделях приводило к снижению роста раковых клеток. Было также показано, что IL-7 усиливает противоопухолевые эффекты IFN-гамма в опухолях глиомы крысы и индуцирует продукцию IL-1 альфа, IL-1 бета и TNF-альфа моноцитами, что приводит к ингибированию роста меланомы. Кроме того, введение рекомбинантного IL-7 после лечения детских сарком привело к стимулированию восстановления иммунной системы (Lin et al. (2017) *Anticancer Research* 37: 963-968).

IL-12 (IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35))

Биоактивный IL-12 (IL-12p70), который способствует клеточно-опосредованному иммунитету, представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц p35 и p40, тогда как мономеры и гомодимеры IL-12p40 действуют как антагонисты IL-12. IL-12, который секретируется антигенпрезентирующими клетками, способствует секреции IFN-g из NK- и Т-клеток, ингибирует ангиогенез опухоли, приводит к активации и пролиферации NK-клеток, CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток, усиливает дифференцировку CD4⁺ Th0-клеток в Th1-клетки и способствует антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) против опухолевых клеток. Было показано, что IL-12 проявляет противоопухолевые эффекты на мышинных моделях меланомы, карциномы толстой

кишки, карциномы молочной железы и саркомы (Kalinski et al. (2001) Blood 97: 3466-3469; Sheikhi et al. (2016) Iran J Immunol. 13. (3): 148-166; Lee S., Margolin, K. (2011) Cancers 3: 3856-3893).

IL-15 and IL-15:IL-15R α

IL-15 структурно подобен IL-2, и хотя как IL-2, так и IL-15 обеспечивают транную стимуляцию пролиферации и активации T-клеток, IL-15 блокирует индуцированный IL-2 апоптоз, который является процессом, который приводит к устранению стимулированных T-клеток и индукции толерантности к T-клеткам, ограничению ответов T-клеток памяти и потенциально ограничивает терапевтическую эффективность одного ИЛ-2. IL-15 также поддерживает сохранение CD8⁺ T-клеток памяти для поддержания длительного противоопухолевого иммунитета и продемонстрировал значительную противоопухолевую активность на доклинических моделях мышей посредством прямой активации эффекторных T-клеток CD8⁺ антиген-независимым образом. В дополнение к CD8⁺ T-клеткам, IL-15, отвечают за развитие, пролиферацию и активацию эффекторных естественных киллеров (NK) клеток (Lee, S. и Margolin, K. (2011) Cancers 3: 3856-3893; Han et al. (2011) Cytokine, 56 (3): 804-810).

Альфа-рецепторы IL-15 и IL-15 (IL-15R α) координированно экспрессируются антигенпрезентирующими клетками, такими как моноциты и дендритные клетки, а IL-15 представлен в транс-форме с помощью IL-15R α в рецепторный комплекс IL-15R β гамма, экспрессируемый на поверхности CD8⁺ T-клеток и NK-клеток. Было показано, что растворимые комплексы IL-15: IL-15R α модулируют иммунные ответы через комплекс IL-15R β гамма, а биологическая активность IL-15 увеличивается в 50 раз при введении его в виде предварительно сформированного комплекса IL-15 и растворимого IL-15R α , который имеет увеличенный период полужизни по сравнению с одним IL-15. Это значительное увеличение терапевтической эффективности IL-15 путем предварительной ассоциации с IL-15R α было продемонстрировано на моделях опухолей мышей (Han et al. (2011) Cytokine 56 (3): 804-810).

IL-18

IL-18 индуцирует секрецию IFN-гамма NK- и CD8⁺ T-клетками, повышая их токсичность. IL-18 также активирует макрофаги и стимулирует развитие T-хелперных CD4⁺ T-клеток Th1. IL-18 показал многообещающую противоопухолевую активность на нескольких доклинических моделях мышей. Например, введение рекомбинантного IL-18

(rIL-18) привело к регрессии меланомы или саркомы у сингенных мышей за счет активации CD4⁺ Т-клеток и / или ответов, вызванных НК-клеток. Другие исследования показали, что противоопухолевые эффекты IL-18 опосредованы IFN-гамма и включают антиангиогенные механизмы. Комбинация IL-18 с другими цитокинами, такими как IL-12, или с костимулирующими молекулами, такими как CD80, усиливает опосредованные IL-18 противоопухолевые эффекты. Фаза I клинических испытаний у пациентов с развитыми солидными опухолями и лимфомами показала, что введение IL-18 было безопасным и приводило к иммуномодулирующей активности и увеличению уровней IFN-гамма и GM-CSF в сыворотке крови у пациентов и умеренным клиническим ответам. Клинические испытания показали, что IL-18 можно комбинировать с другими противораковыми терапевтическими агентами, такими как моноклональные антитела, цитотоксические препараты или вакцины (Fabbietal. (2015) J. Leukoc. Biol. 97: 665-675; Lee, S. andMargolin, K. (2011) Cancers, 3: 3856-3893).

Было обнаружено, что аттенуированный штамм *Salmonellatyphimurium*, сконструированный для экспрессии IL-18, подавлял рост опухолей или легочных метастаз у сингенных мышей без каких-либо токсических эффектов после системного введения. Обработка этой сконструированной бактерией индуцировала накопление Т-клеток, НК-клеток и гранулоцитов в опухолях и приводила к внутриопухолевой продукции цитокинов (Fabbietal. (2015) J. Leukoc. Biol. 97: 665-675).

Хемокины

Хемокины- это семейство небольших цитокинов, которые опосредуют миграцию лейкоцитов в области повреждения или воспаления и участвуют в опосредовании иммунных и воспалительных реакций. Хемокины подразделяются на четыре подсемейства в зависимости от положения остатков цистеина в их последовательностях, а именно лиганды XC-, CC-, CXC- и CX3C-хемокинов или XCL, CCL, CXCL и CX3CL. Хемокиновыелиганды связываются со своими родственными рецепторами и регулируют циркуляцию, возвращение и удержание иммунных клеток, причем каждая пара хемокиновыйлиганд-рецептор избирательно регулирует определенный тип иммунных клеток. Различные хемокины привлекают разные популяции лейкоцитов и образуют градиент концентрации *in vivo*, при этом привлеченные иммунные клетки перемещаются по градиенту в сторону более высокой концентрации хемокина (Argyle D. andKitamura, T. (2018) Front. Immunol. 9: 2629; Dubinettetal. (2010) Cancer J. 16 (4): 325-335). Хемокины могут улучшить противоопухолевый иммунный ответ за счет увеличения

проникновения иммунных клеток в опухоль и облегчения движения антигенпрезентирующих клеток (АРС) к лимфатическим узлам, дренирующим опухоль, что активирует Т-клетки и В-клетки (Lechneretal. (2011) *Immunotherapy* 3 (11): 1317-1340). Иммуностимулирующие бактерии здесь могут быть сконструированы для кодирования хемокинов, включая, но не ограничиваясь ими, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11.

CCL3, CCL4, CCL5

CCL3, CCL4 и CCL5 обладают высокой степенью гомологии и связываются с CCR5 (CCL3, CCL4 и CCL5) и CCR1 (CCL3 и CCL5) на нескольких типах клеток, включая незрелые DC и Т-клетки, как у людей, так и у мышей. Было показано, что терапевтические Т-клетки индуцируют хемотаксис клеток врожденного иммунитета к участкам опухоли за счет специфичной для опухоли секреции CCL3, CCL4 и CCL5 (Dubinettetal. (2010) *CancerJ.* 16 (4): 325-335).

Индукция ответа Т-хелперов типа 1 (Th1) высвобождает CCL3. Проведенные *In vivo* и *in vitro* исследования мышей показали, что CCL3 является хемотаксическим как для нейтрофилов, так и для моноцитов; в частности, CCL3 может опосредовать мобилизацию миелоидных клеток-предшественников (МРС) из костного мозга, и имеет нормативные и стимулирующие эффекты. Клетки карциномы яичников человека, трансфицированные CCL3, показали повышенную инфильтрацию Т-клеток и макрофагов внутри опухоли, что привело к улучшению противоопухолевой реакции, и было показано, что CCL3-опосредованный хемотаксис нейтрофилов подавлял рост опухоли. DC трансфицированные с опухолевым антигеном связанным с человеческой меланомой (MAGE)-1, показывают превосходные противоопухолевые эффекты, в том числе увеличение пролиферации лимфоцитов, цитолитической способности, выживание, и снижение роста опухоли в мышинной модели меланомы. Совместное использование CCL3 с антигенной платформой для MAGE-1 также используется в лечении рака желудка.

CCL3 использовался в качестве адьюванта для лечения рака. Введение активного варианта CCL3, ЕС1301, после радиочастотной абляции в гепатоцеллюлярной карциноме мыши увеличивало опухолеспецифические ответы, и было дополнительно показано, что этот механизм зависит от экспрессии CCR1. CCL3 также оказался успешным в качестве адьюванта при системных раковых заболеваниях, при этом мыши, вакцинированные CCL3 и IL-2 или гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором

(GM-CSF) на модели лейкемии / лимфомы, показали повышенную выживаемость (Schalleretal. 2017) Эксперт Rev. Clin. Immunol.13 (11): 1049-1060).

CCL3 и CCL4 играют роль в направлении инфильтрации CD8⁺ Т-лимфоцитов в участки первичной опухоли при меланоме и раке толстой кишки. Опухолевая продукция CCL4 приводит к накоплению CD103⁺ DC; подавление CCL4 посредством WNT / р-катенин-зависимого пути предотвращало инфильтрацию CD103⁺ DC в опухоли меланомы (Sprangeretal. (2015) Nature 523 (7559): 231-235). Было также показано, что CCL3 усиливает инфильтрацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в первичный участок опухоли на мышинной модели рака толстой кишки (Allenetal. (2017) Oncoimmunology 7 (3): e1393598).

Связывание CCL3 или CCL5 с их рецепторами (CCR1 и CCR5, соответственно) перемещает незрелые DC, моноциты, а также эффекторные Т-клетки и клетки памяти из кровотока в места воспаления или инфекции. Например, экспрессия CCL5 в колоректальных опухолях способствует хемоаттракции и выживанию Т-лимфоцитов. CCL3 и CCL5 использовались по отдельности или в составе комбинированной терапии для индукции регрессии опухоли и иммунитета в нескольких доклинических моделях. Например, исследования показали, что подкожная инъекция клеток яичника китайского хомячка, генетически модифицированных для экспрессии CCL3, приводит к ингибированию опухоли и нейтрофильной инфильтрации. В другом исследовании рекомбинантная экспрессия онколитического аденовируса CCL5 (Ad-RANTES-E1A) привела к регрессии первичной опухоли и блокировке метастазирования на мышинной модели карциномы молочной железы (Lechneretal. (2011) Immunotherapy 3 (11):1317-1340).

В трансляционном исследовании колоректального рака CCL5 индуцировал «паттерн противовирусного ответа» в макрофагах. В результате опосредованной CXCR3 миграции лимфоцитов на инвазивном крае метастазов в печени при колоректальном раке образуется CCL5. Блокада CCR5, рецептора CCL5, приводит к гибели опухоли под действием макрофагов, продуцирующих IFN и активные формы кислорода. В то время как макрофаги присутствуют в микроокружении опухоли, ингибирование CCR5 вызывает фенотипический сдвиг от фенотипа M2 к фенотипу M1. Блокада CCR5 также приводит к клиническим ответам у пациентов с колоректальным раком (Halamaetal. (2016) CancerCell 29 (4): 587-601).

CCL3, CCL4 и CCL5 можно использовать для лечения состояний, включая лимфатические опухоли, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак легких, меланому, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак шейки матки или рак печени (публикация патента США № US 2015/0232880; публикация международной заявки WO 2015/059303, WO2017/043815, WO 2017/156349 и WO 2018/191654).

CXCL9, CXCL10, CXCL11

CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10) и CXCL11 (ITAC) индуцируются продуцированием IFN-гамма. Эти хемокины связывают CXCR3, предпочтительно экспрессируемый на активированных Т-клетках, и действуют как ангиостатически, так и при привлечении и активации лейкоцитов. Прогноз при колоректальном раке сильно коррелирует с инфильтрирующими опухоль Т-клетками, особенно с эффекторными Т-клетками Th1 и CD8⁺; высокая внутриопухолевая экспрессия CXCL9, CXCL10 и CXCL11 указывает на хороший прогноз. Например, в выборке из 163 пациентов с раком толстой кишки, пациенты с высокими уровнями CXCL9 или CXCL11 показали повышенную послеоперационную выживаемость, а пациенты с высокой экспрессией CXCL9 имели значительно большее количество CD3⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-хелперов, клетки и цитотоксические Т-клетки CD8⁺. При метастазах в печени пациентов с колоректальным раком уровни CXCL9 и CXCL10 были увеличены на инвазивном крае и коррелировали с плотностью эффекторных Т-клеток. Стимуляция миграции лимфоцитов за счет действия CXCL9 и CXCL10 на CXCR3 приводит к продукции CCL5 на инвазивной границе (Halama et al. (2016) Cancer Cell 29 (4): 587-601; Kistner et al. (2017) Oncotarget 8 (52): 89998-90012).

In vivo CXCL9 функционирует как хемоаттрактант для инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, активированных лимфоцитов периферической крови, естественных киллеров (NK) и лимфоцитов Th1. CXCL9 также важен для опосредованного Т-клетками подавления кожных опухолей. Например, было показано, что в сочетании с системным IL-2 CXCL9 ингибирует рост опухоли за счет повышенной внутриопухолевой инфильтрации мононуклеарных клеток CXCR3⁺. В мышинной модели карциномы толстой кишки комбинация слитого белка huKS1 / 4-IL-2 с генной терапией CXCL9 обеспечивала превосходный противоопухолевый эффект и увеличивала продолжительность жизни за счет хемоаттракции и активации CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов (Dubinett et al. др. (2010) Cancer J 16 (4): 325-335; Ruelmann et al. (2001) Cancer Res. 61 (23): 8498-8503).

CXCL10, продуцируемый активированными моноцитами, фибробластами, эндотелиальными клетками и кератиноцитами, обладает хемотаксическим действием для активированных Т-клеток и может действовать как ингибитор ангиогенеза *in vivo*. Было показано, что экспрессия CXCL10 в колоректальных опухолях способствует химиоаттракции цитотоксических Т-лимфоцитов и увеличению выживаемости. Было показано, что введение иммуностимулирующих цитокинов, таких как IL-12, усиливает противоопухолевые эффекты, вызываемые CXCL10. Вакцина DC, примированная лизатом опухолевых клеток и трансфицированная CXCL10, имела повышенную иммунологическую защиту и эффективность у мышей; животные показали устойчивость к заражению опухолью, замедление роста опухоли и более длительное время выживания. Исследования *in vivo* и *in vitro* на мышцах с использованием слитого белка CXCL10-муцин-GPI привели к опухолям с более высокими уровнями рекрутированных NK-клеток по сравнению с опухолями, не обработанными слитым белком. Интерфероны (которые могут продуцироваться плазматическими дендритными клетками; эти клетки связаны с первичными меланомными поражениями и могут быть рекрутированы в опухолевый сайт с помощью CCL20) могут действовать на подмножества DC опухоли, например, CD103⁺ DC, которые, как было показано, продуцируют CXCL9 / 10 на модели меланомы мыши и были связаны с CXCL9 / 10 при заболевании человека. CXCL10 также показал более высокую экспрессию в образцах метастатической меланомы человека по сравнению с образцами первичной меланомы.

С терапевтической точки зрения адъювантная терапия меланомы IFN- α активирует продукцию CXCL10, тогда как химиотерапевтический агент цисплатин индуцирует CXCL9 и CXCL10 (Dubinett et al. (2010) *Cancer J* 16 (4): 325-335; Kuo et al. (2018) *Front. Med (Lausanne)* 5: 271; Li et al. (2007) *Scand. J. Immunol.* 65 (1): 8-13; Muenchmeier et al. (2013) *PLoS One* 8 (8): e72749).

Экспрессия CXCL10 / 11 и CXCR3 была установлена в кератиноцитах человека, происходящих из базальноклеточных карцином (BCC). CXCL11 также способен стимулировать экспрессию иммуносупрессивной индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) в базально-клеточной карциноме человека, а также усиливать пролиферацию кератиноцитов, что может снизить противоопухолевую активность любых инфильтрирующих эффекторных Т-клеток CXCR3⁺ (Kuo et al. (2018) *Front. Med. (Lausanne)* 5: 271).

CXCL9, CXCL10 и CXCL11 могут кодироваться онколитическими вирусами для лечения рака (публикация патента США № US 2015/0232880; международная публикация WO 2015/059303). Псевдотипированные онколитические вирусы или генно-инженерные бактерии, кодирующие ген CXCL10, также могут быть использованы для лечения рака (номера международных публикаций WO 2018/006005 и WO 2018/129404).

Костимулирующие молекулы

Костимулирующие молекулы усиливают иммунный ответ против опухолевых клеток, а костимулирующие пути ингибируются опухолевыми клетками, что способствует онкогенезу. Иммуностимулирующие бактерии здесь могут быть сконструированы для экспрессии костимулирующих молекул, таких как, например, CD40, CD40L, 4-1BB, 4-1BBL, OX40 (CD 134), OX40L (CD252), других членов суперсемейства TNFR (например, CD27, GITR, CD30, рецептор Fas, TRAIL-R, TNF-R, HVEM, RANK), B7 и CD28. Иммуностимулирующие бактерии также могут быть сконструированы для экспрессии агонистических антител против костимулирующих молекул для усиления противоопухолевого иммунного ответа.

Надсемейство рецепторов TNF

Суперсемейка лигандов TNF (TNFSF) и их рецепторы (TNFRSF) участвуют в пролиферации, дифференциации, активации и выживании опухолевых и иммунных клеток-эффекторов. Члены этой семьи включают CD30, Fas-L, TRAIL-R и TNF-R, которые вызывают апоптоз, и CD27, OX40L, CD40L, GITR-L и 4-1BBL, которые регулируют иммунную реакцию В и Т-клеток. Другие члены включают посредник вируса герпеса (HVEM) и CD27. Экспрессия TNFSF и TNFRSF иммуностимулирующими бактериями приведенными здесь, может повысить противоопухолей иммунный ответ. Было показано, например, что экспрессия 4-1BBL в мышинных опухолях повышает иммуногенность, а внутриопухолевая инъекция дендритных клеток (DC) с повышенной экспрессией OX40L может привести к отторжению опухоли в мышинных моделях.

Исследования также показали, что инъекция аденовируса, экспрессирующего рекомбинантный GITR, в клетки меланомы B16 способствует инфильтрации Т-клеток и уменьшает объем опухоли. Стимулирующие антитела против таких молекул, как 4-1BB, OX40 и GITR, также могут кодироваться иммуностимулирующими бактериями для стимуляции иммунной системы. Например, было показано, что агонистическимonoклональные антитела против 4-1BB усиливают противоопухолевые

ответы CTL, а агонистические антитела против OX40 увеличивают противоопухолевую активность в моделях трансплантируемых опухолей. Кроме того, было показано, что агонистические антитела против GITR усиливают противоопухолевые ответы иммунитета (Lechner et al. (2011) *Immunotherapy* 3 (11): 1317-1340; Peggs et al. (2009) *Clinical and Experimental Immunology* 157: 9-19).

CD40 и CD40L

CD40, который является членом суперсемейства рецепторов TNF, экспрессируется APC и В-клетками, тогда как его лиганд, CD40L (CD154), экспрессируется активированными Т-клетками. Взаимодействие между CD40 и CD40L стимулирует В-клетки производить цитокины, что приводит к активации Т-клеток и гибели опухолевых клеток. Исследования показали, что противоопухолевые иммунные ответы нарушаются при снижении экспрессии CD40L на Т-клетках или CD40 на дендритных клетках. CD40 экспрессируется на поверхности нескольких В-клеточных опухолей, таких как фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфобластный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз, и его взаимодействие с CD40L, как было показано, увеличивает экспрессию B7.1 / CD80, B7.2 / CD86 и HLA класса II в опухолевых клетках CD40⁺, а также усиливает их антигенпредставляющие способности. Трансгенная экспрессия CD40L на мышинной модели множественной миеломы приводила к индукции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, местных и системных противоопухолевых иммунных ответов и снижению роста опухоли. Агонистические антитела против CD40 также индуцировали противоопухолевые Т-клеточные ответы (Marin-Acevedo et al. (2018) *Journal of Hematology & Oncology* 11: 39; Dotti et al. (2002) *Blood* 100 (1): 200-207; Murugaiyan et al. (2007) *J. Immunol.* 178: 2047-2055).

4-1BB и 4-1BBL

4-1BB (CD137) представляет собой индуцибельный костимуляторный рецептор, который экспрессируется Т-клетками, NK-клетками и APC, включая DC, В-клетки и моноциты, который связывает свой лиганд, 4-1BBL, чтобы запускать пролиферацию и активацию иммунных клеток. 4-1BB приводит к более длительным и более широким ответам активированных Т-клеток. Было показано, что агонисты анти-4-1BB и слитые белки 4-1BBL увеличивают иммуноопосредованную противоопухолевую активность, например, против опухолей саркомы и мастоцитомы, опосредованную CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками и опухолеспецифической активностью CTL (Lechner et al. др. (2011) *Immunotherapy* 3(11):1317-1340; Marin-Acevedo et al. (2018) *Journal of Hematology & Oncology* 11:39).

OX40 и OX40L

OX40 (CD 134) является членом суперсемейства рецепторов TNF, который экспрессируется на активированных эффекторных Т-клетках, в то время как его лиганд, OX40L, экспрессируется на APC, включая DC, В-клетки и макрофаги, после активации агонистами TLR и передачи сигналов CD40-CD40L. Передача сигналов OX40-OX40L приводит к активации, усилению, пролиферации и выживанию Т-клеток, а также к модуляции функции NK-клеток и ингибированию супрессивной активности Treg. Передача сигналов через OX40 также приводит к секреции цитокинов (IL-2, IL-4, IL-5 и IFN-гамма), усиливая ответы клеток Th1 и Th2. Распознавание опухолевых антигенов с помощью TIL приводит к увеличению экспрессии OX40 с помощью TIL, что коррелирует с улучшенным прогнозом.⁺ Исследования показали, что обработка антителами к агонисту анти-OX40 или белками слияния Fc-OX40L приводит к усиленным противоопухолевым Т-клеточным ответам и повышенной выживаемости на мышиных моделях меланомы, саркомы, рака толстой кишки и рака груди, в то время как Fc-OX40L, включенный в вакцины против опухолевых клеток, защищал мышей от последующего заражения клетками карциномы груди (Lechner *et al.* (2011) *Immunotherapy* 3(11):1317-1340; Marin-Acevedo *et al.* (2018) *Journal of Hematology & Oncology* 11:39).

Семейство B7-CD28

CD28 представляет собой костимулирующую молекулу, экспрессируемую на поверхности Т-клеток, которая действует как рецептор для B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), которые являются костимулирующими молекулами, экспрессируемыми на антигенпрезентирующих клетках. Передача сигнала CD28-B7 необходима для активации и выживания Т-клеток, а также для предотвращения анергии Т-клеток и приводит к выработке интерлейкинов, таких как IL-6.

Для оптимального праймирования Т-клеток необходимы два сигнала: (1) распознавание Т-клеточным рецептором (TCR) антигенов, представленных MHC, и (2) костимуляторные сигналы, возникающие в результате лигирования CD28 Т-клеток с B7-1 (CD80) или B7-2 (CD86) экспрессированных на APC. После активации Т-клеток индуцируются рецепторы CTLA-4, которые затем вытесняют CD28 для связывания с лигандами B7-1 и B7-2. Презентация антигена опухолевыми клетками плохая из-за отсутствия экспрессии костимулирующих молекул, таких как B7-1 / CD80 и B7-2 / CD86, что приводит к неспособности активировать рецепторный комплекс Т-клеток. В результате активация этих молекул на поверхности опухолевых клеток может повысить

их иммуногенность. Иммуноterapia солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований была успешно индуцирована B7, например, посредством экспрессии B7 опухолевыми клетками или слитых белков растворимого B7-иммуноглобулина. Опосредованная вирусами экспрессия B7 в опухоли в сочетании с другими костимулирующими лигандами, такими как ICAM-3 и LFA-3, была успешной в доклинических и клинических испытаниях для лечения хронического лимфолейкоза и метастатической меланомы. Кроме того, растворимые слитые белки B7 продемонстрировали многообещающие результаты в иммунотерапии солидных опухолей в качестве иммунотерапевтических препаратов с одним агентом (Lechner et al. (2011) *Immunotherapy* 3 (11): 1317-1340; Dotti et al. (2002) *Blood* 100 (1): 200-207).

6. Модификации, которые увеличивают поглощение грамотрицательных бактерий, таких как сальмонелла, иммунными клетками и уменьшают гибель иммунных клеток.

Геном иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, можно модифицировать для увеличения или стимулирования инфицирования иммунных клеток, в частности иммунных клеток в микроокружении опухоли, таких как фагоцитарные клетки. Это включает уменьшение инфицирования неиммунных клеток, таких как эпителиальные клетки, или увеличение инфицирования иммунных клеток. Бактерии также можно модифицировать для уменьшения пироптоза иммунных клеток. Многочисленные модификации бактериального генома могут привести к увеличению инфицирования иммунных клеток и снижению пироптоза. Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, включают такие модификации, например делеции и / или нарушения генов, участвующих в пути SPI-1 T3SS, такие как нарушение или делеция *hilA* и / или нарушение / удаление генов, кодирующих флагеллин, палочковидный белок. и игольчатый белок.

Инвазивный фенотип грамотрицательных бактерий, таких как сальмонелла, может быть результатом активности генов, закодированных в путях, которые способствуют инвазии клеток-хозяев. Связанный с инвазией остров патогенности *Salmonella* -1 (SPI-1) *Salmonella* является образцовым. SPI-1 включает систему секреции типа 3 (T3SS), которая отвечает за транслокацию эффекторных белков в цитозоль клеток-хозяев. Эти белки могут вызывать перестройки актина, которые приводят к поглощению сальмонелл. Эффекторы T3SS опосредуют захват *S. typhimurium* нефагоцитарными клетками-хозяевами, такими как эпителиальные клетки. Было показано, что SPI-1 T3SS необходим для прохождения

через эпителиальный слой кишечника, но он незаменим при инфекции при введении бактерий парентерально, например мутанты SPI-1 имеют дефекты инвазии эпителиальных клеток, что резко снижает вирулентность полости рта, но обычно поглощаются фагоцитарными клетками, такими как макрофаги (Kong et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109 (47): 19414-19419). Иммуностимулирующие штаммы *A. typhimurium*, представленные в настоящем документе, могут быть сконструированы с мутациями в генах SPI-1 T3SS, предотвращающими их захват эпителиальными клетками и направляя их на иммунные клетки, такие как макрофаги, усиливая противоопухолевый иммунный ответ.

Эффекторы T3SS также активируют инфламмасому NLRC4 в макрофагах, активируя каспазу-1 и приводя к гибели клеток через пироптоз. Пироптоз - это сильно воспалительная форма запрограммированной клетки, которая чаще всего возникает после заражения внутриклеточными патогенами и играет роль в антимикробной реакции. Эта провоспалительная гибель клеток может ограничивать иницирование устойчивого адаптивного иммунного ответа, напрямую индуцируя гибель антигенпрезентирующих клеток (APC), а также изменяя цитокиновую среду для предотвращения образования T-клеток памяти. SPI-1 вызывает пироптоз путем инъекции флагеллина, белков игл и палочек (PrgI / J), в то время как внеклеточный флагеллин стимулирует передачу сигналов TLR5. Таким образом, разработка иммуностимулирующих бактерий, содержащих мутации в генах, участвующих в пироптозе, может усиливать противоопухолевый иммунный эффект за счет уменьшения гибели клеток в иммунных клетках, таких как макрофаги.

Макрофаговый пироптоз

Инфламмосома макрофага NLRC4, играющая роль во врожденном иммунитете и антимикробном ответе, представляет собой большой мультибелковый комплекс, который распознает цитозольные патогены и обеспечивает автокаталитическую активацию каспазы-1.

Активация каспазы-1 вызывает созревание и высвобождение провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-18, а также запускает пироптоз, быструю воспалительную форму гибели макрофагальных клеток. Заражение некоторыми грамотрицательными бактериями, кодирующими системы секреции 3 или 4 типа, такими как *Salmonella typhimurium* и *Pseudomonas aeruginosa*, запускает активацию инфламмосомы NLRC4 при распознавании

бактериальных лигандов, таких как белок иглы, белок палочки и флагеллин, после транслокации в хозяина через клеточный цитозоль системой секреции острова патогенности Stm-1 типа III (SPI-1 T3SS). Пироптоз не ограничивается макрофагами; зависимость от каспазы 1 гибель дендритных клеток наблюдалась после заражения сальмонеллой (Lietal. (2016) *Scientific Reports* 6: 37447; Chen et al. (2014) *Cell Reports* 8: 570-582; (ФинкиКуксон (2007) *Cellular Microbiology* 9 (II): 2562-2570)). Как показано здесь, нокаут генов в геноме сальмонелл, участвующих в индукции пироптоза, усиливает противоопухолевый иммунный ответ. Это предотвращает потерю иммунных клеток, включая макрофаги, вследствие бактериального инфекционного заболевания. Например, гены, кодирующие *hilA*, белок палочек (*PrgJ*), белок иглы (*PrgI*), флагеллин и / или *QseC*, могут быть нокаутированы / разрушены в иммуностимулирующих бактериях, представленных здесь.

hilA

Связанный с инвазией остров патогенности сальмонелл -1 (SPI-1), включая систему секреции типа 3 (T3SS), отвечает за транслокацию эффекторных белков в цитозоль клеток-хозяев, вызывая перестройки актина, которые приводят к поглощению сальмонелл. *hilA* является активатором транскрипции для генов SPI-1, и его экспрессия регулируется сигналами окружающей среды, такими как, например, кислород, осмолярность, pH и фаза роста. Субоптимальные условия подавляют экспрессию *hilA*, тем самым подавляя инвазивный фенотип бактерии (Kongelal. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (47): 19414-19419). Эффекторы T3SS опосредуют захват *S. typhimurium* нефагоцитарными клетками-хозяевами, такими как эпителиальные клетки. SPI-1 T3SS необходим для прохождения через эпителиальный слой кишечника, но без инфекции, например, при парентеральном введении бактерий. Мутанты SPI-1 имеют дефекты инвазии эпителиальных клеток, что снижает вирулентность полости рта, но обычно поглощаются фагоцитарными клетками, такими как макрофаги. Предлагаемые здесь иммуностимулирующие бактерии включают бактерии с делецией или нарушением гена *hilA* и / или других генов в пути T3SS. Когда эти бактерии вводятся, например, внутривенно или внутри опухоли, инфекция сосредотачивается на фагоцитарных клетках, таких как макрофаги и дендритные клетки, для поглощения которых не требуется SPI-1 T3SS. Это увеличивает профиль безопасности иммуностимулирующих бактерий, представленных здесь. Он предотвращает инвазию нецелевых клеток и предотвращает фекально-оральную передачу.

В дополнение к снижению поглощения сальмонелл фагоцитируемыми клетками, такими как эпителиальные клетки, делеция или нарушение *hilA* и / или других генов в этом пути также продлевает продолжительность жизни фагоцитируемых клеток, предотвращая пироптоз в макрофагах, таким образом, вызывая меньшую гибель клеток в макрофагах человека по сравнению с бактериями, не содержащими делеции в *hilA*. Например, штаммы *Salmonella* с дефицитом *HilA* предотвращают пироптоз, предотвращая активацию инфламмосом, но сохраняют передачу сигналов TLR5. Делеция / разрушение *HilA* также позволяет пролонгировать секрецию цитокинов, таких как те, которые кодируются иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе, и переносить макрофаги в опухоли, тем самым повышая эффективность иммуностимулирующих бактерий. Например, по сравнению с *S. typhimurium*, содержащим интактный *hilA*, такой как VNP20009, мутанты с делецией *hilA*, приведенные в качестве примера, дополнительно снижают количество провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, также повышая переносимость терапии и качество адаптивного иммунного ответа.

Флагеллин

Бактерии, такие как сальмонелла, флагеллин, в дополнение к SPI-1 T3SS, необходимы для запуска пироптоза в макрофагах и могут быть обнаружены инфламмосомой макрофага NLRC4. Флагеллин, который является основным компонентом, распознается TLR5. *Salmonella* кодирует два гена флагеллина, *fliC* и *fliB*; устранение субъединиц флагеллина снижает пироптоз в макрофагах. Например, *S. typhimurium* с делециями в *fliC* и *fliB* приводил к значительному снижению секреции IL-1β по сравнению со штаммом дикого типа, в то время как клеточное поглощение и внутриклеточная репликация бактерии оставались неизменными. Это показывает, что флагеллин играет важную роль в активации инфламмосом. Кроме того, *S. typhimurium*, сконструированные для конститутивной экспрессии *FliC*, вызывают пироптоз макрофагов (Lietal. (2016) *Scientific Reports* 6: 37447; Fink and Cookson (2007) *Cellular Microbiology* 9 (11): 2562-2570; Winter et al. (2015) *Заражение. Иммуно.* 83 (4): 1546-1555). Геном иммуностимулирующих бактерий, описанных здесь, может быть изменен для удаления или мутации генов флагеллина *fliC* и *fliB* в *S. typhimurium*, что приведет к уменьшению гибели клеток резидентных иммунных клеток опухоли, таких как макрофаги, и усилению противоопухолевого иммунного ответа иммуностимулирующих бактерий.

Стержневой белок (PrgJ)

NLRC4 также обнаруживает афлагеллированный *S. typhimurium*. Было обнаружено, что независимый от флагеллина ответ обусловлен обнаружением PrgJ, который представляет собой палочковидный (стержневой) белок SPI-1 T3SS в *S. typhimurium*. Доставка очищенного белка PrgJ в цитозоль макрофага привела к быстрой NLRC4-зависимой активации каспазы-1, а также к секреции IL-1бета, аналогично эффектам, вызываемым флагеллином (Miao et al. (2010) PNAS 107 (7): 3076-3080). Таким образом, мутация или нокаут гена, кодирующего PrgJ в *S. typhimurium*, может снизить пироптоз макрофагов, который усиливает противоопухолевый иммунный эффект иммуностимулирующих бактерий, путем сохранения иммунных клеток, которые могут быть убиты бактериями.

Игольчатый белок (PrgI)

PrgI, который является игольчатым белком SPI-1 T3SS в *S. typhimurium*, также распознается и активирует NLRC4. Доставка *S. typhimurium* PrgI в цитозоль человеческих первичных макрофагов, происходящих из моноцитов, привела к секреции IL-1бета и последующей гибели клеток, в то время как было показано, что мутант *Salmonella*, который экспрессирует PrgI, но не флагеллин, активирует инфламмасому в первичных макрофагах, происходящих из моноцитов. в более поздние моменты времени, чем штаммы, экспрессирующие флагеллин (Kortmann et al. (2015) J. Immunol. 195: 815-819). Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, могут быть модифицированы для мутации или удаления гена, кодирующего игольчатый белок в *S. typhimurium*, предотвращая пироптоз иммунных клеток и усиливая противоопухолевый иммунный эффект.

QseC

QseC - это высококонсервативная мембранная гистидиновая сенсорная киназа, которая обнаруживается во многих грамотрицательных бактериях, реагирует на окружающую среду и регулирует экспрессию нескольких факторов вирулентности, включая ген *flhDC*, который кодирует главный регулятор биосинтеза флагеллина у *S. typhimurium*; ген *sopB*, который кодирует белок, который играет роль в инвазии нефагоцитарных клеток, раннем созревании и регуляции транспорта вакуоли, содержащей сальмонеллы (SCV), и ингибировании слияния SCV-лизосомы; и ген *sifA*, который необходим для поддержания SCV и целостности мембраны. Было показано, что селективное ингибирование QseC с помощью LED209 подавляет вирулентность бактерий без подавления роста *S.*

S. typhimurium, путем ингибирования QseC-опосредованной активации экспрессии связанных с вирулентностью генов (например, *flhDC*, *sifA* и *sopB*), и частично защищает мышей от смерти после заражения *S. typhimurium* или *Francisellatularensis*. Было обнаружено, что блокада QseC ингибирует активацию каспазы-1, высвобождение IL-1β и вызванный *S. typhimurium* пироптоз макрофагов путем ингибирования избыточной активации инфламмасом в инфицированных макрофагах. Ингибирование QseC также подавляло экспрессию и подвижность флагеллиновых генов и подавляло способность к инвазии и репликации *S. typhimurium* в эпителиальных клетках (Lietal. (2016) *ScientificReports* 6: 37447). Таким образом, модификация иммуностимулирующих бактерий в данном документе для мутации или нокаута гена, кодирующего QseC, может усилить противоопухолевый иммунный ответ путем фокусирования *S. typhimurium* на неэпителиальных клетках и снижения гибели иммунных клеток, например, путем предотвращения пироптоза в макрофагах.

7. Условия бактериального культивирования.

Условия культивирования бактерий могут влиять на экспрессию генов. Было подтверждено, что *S. typhimurium* может индуцировать быструю каспазозависимую гибель макрофагов, но не эпителиальных клеток, в течение 30-60 минут после инфицирования по механизму, включающему SPI-1 и связанный с ним T3SS -1 (Lundberget. Al (1999) *JournalofBacteriology* 181 (11): 3433-3437). Известно, что эта гибель клеток опосредована активацией воспаления, которое впоследствии активирует каспазу-1, что способствует созреванию и высвобождению IL -1β и IL -18 и инициирует новую форму гибели клеток, называемую пироптозом (BrozAndMonack (2011) *ImmunolRev.* 243 (1): 174-190). Эта пироптотическая активность может быть индуцирована с использованием бактерий логарифмической фазы, в то время как бактерии стационарной фазы не индуцируют эту быструю гибель клеток в макрофагах. Гены SPI-1 индуцируются во время роста логарифмической фазы. Таким образом, путем сбора *S. typhimurium* для терапевтического использования в стационарной фазе можно предотвратить быстрый пироптоз макрофагов. Макрофаги являются важными медиаторами врожденной иммунной системы и они способны секретировать цитокины, которые являются критическими для установления соответствующих противоопухолевых ответов. Кроме того, ограничение провоспалительных цитокинов, таких как секреция IL -1β и IL -18, будет улучшать переносимость терапии *S typhimurium*. Как представлено в настоящем описании, иммуностимулирующие *S. salmonellatyphimurium*, собранные в стационарной фазе, будут использоваться для индукции противоопухолевых ответов.

Е. Ослабление бактерий и колонизация

1. Делеция флагеллина (fliC/fljB)

Предложены иммуностимулирующие бактерии, такие как *S typhimurium*, сконструированные таким образом, что они лишены как субъединиц флагеллина fliC, так и fljB, для уменьшения провоспалительной сигнализации. Например, как показано здесь, штамм *Salmonella*, лишенный msbB, который приводит к сниженной индукции TNF-альфа, комбинируется с нокаутами fliC и fljB. Полученный штамм *Salmonella* имеет комбинированное снижение индукции TNF-альфа и снижение TLR5-узнавания. Эти модификации, msbB, fliC и fljB могут быть объединены с бактериальной плазмидой, например содержащей CPG, а также экспрессионной кассетой сДНК для обеспечения экспрессии терапевтического белка под контролем эукариотического промотора, такого как, например, иммуностимулирующий белок, такой как цитокин или хемокин, такой как IL -2, и/или также ингибиторные молекулы, такие как антитела, включая фрагменты антител, такие как наночастицы, и/или молекулы РНК, нацеливающие иммунную контрольную точку, такие как TREX1, PD-L1, VISTA, SIRP-альфа, TGF-бета, бета-катенин, CD47, VEGF и их комбинации. Полученные бактерии обладают сниженной провоспалительной сигнализацией и устойчивой противоопухолевой активностью.

Например, как показано в настоящем описании, двойной мутант fliC и fljB был сконструирован в штамме *S Typhimurium* VNP20009 с делецией *asd* или в *Salmonella typhimurium* дикого типа, таком как имеющим все идентифицирующие характеристики штамма, депонированного под регистрационным номером ATCC 14028. VNP20009, который является производным ATCC 14028, был ослаблен для вирулентности посредством разрушения *purI/purM* и был сконструирован таким образом, чтобы он содержал делецию *msbB*, которая приводит к продуцированию субъединицы липида а LPS, которая является менее токсигенной, чем липид дикого типа А. Это приводит к снижению продуцирования TNF-альфа у мышинной модели после внутривенного введения, по сравнению с штаммами с липидом дикого типа А.

Двойной мутант fliC и fljB сконструировали на штамме дикого типа *S typhimurium*, а также сконструировали таким образом, чтобы он содержал делеции *asd*, *purI/purM* и *msbB*. Бактерией является, например, *ragP*. Полученные штаммы являются примерами

штаммов, которые ослаблены для бактериального воспаления путем модификации липида А для уменьшения передачи сигнала TLR2/4, и делецией субъединиц флагеллина для уменьшения распознавания TLR5 и индукции воспаления. Делеция субъединиц флагеллина в сочетании с модификацией LPS обеспечивает большую переносимость хозяина и направляет иммуностимулирующую реакцию в сторону продуцирования иммуностимулирующих белков. Доставка РНК модифицированными бактериями против целевых мишеней в ТМЕ вызывает противоопухолевую реакцию и способствует адаптивному иммунному ответу на опухоль.

2. Делеция генов в пути биосинтеза LPS

LPS грамотрицательных бактерий является основным компонентом внешнего листка бактериальной мембраны. Он состоит из трех основных частей: липида А, неповторяющийся олигосахарид и антиген О (или полисахарид О). Антиген является наиболее удаленной частью LPS и служит в качестве защитного слоя против бактериальной проницаемости, однако сахарный состав О-антигена широко варьируется между штаммами. Липид А и олигосахарид варьируются меньше, и обычно консервативны в штаммах того же вида. Липид А представляет собой часть LPS, которая имеет активность эндотоксина. Обычно он представляет собой дисахарид, содержащий несколько жирных кислот. Эти гидрофобные цепи жирных кислот удерживают LPS в бактериальной мембране, а остальная часть LPS выступает из клеточной поверхности. Домен липида А ответственен за большую часть токсичности грамотрицательных бактерий. Как правило, LPS в крови распознается как значительная ассоциированная с патогеном молекулярная структура (PMP) и индуцирует глубокий провоспалительный ответ. LPS представляет собой лиганд для комплекса мембраносвязанного рецептора, содержащего CD14, MD2 и TLR4. TLR4 представляет собой трансмембранный белок, который может сигнализировать через линии MyD88 и TRIF для стимуляции пути NFκB и приводить к продуцированию провоспалительных цитокинов, таких как TNF-альфа и IL-1β, результатом которых может быть эндотоксический шок, который может быть фатальным. LPS в цитозоле клеток млекопитающих может связываться непосредственно с доменами CARD каспаз 4, 5 и 11, приводя к аутоактивации и гибели пироптотических клеток (Hagaretal. (2015) CellResearch 25: 149-150). Состав липида А и токсигенность вариантов липида А хорошо известны. Например, монофосфорилированный липид А является гораздо менее воспалительным, чем липид А с несколькими фосфатными группами. Число и длина ацильных цепей на липидах А также могут оказывать значительное влияние на степень токсичности. Канонический липид А из *E. coli* имеет

шесть ацильных цепей, и это гексаацилирование потенциально токсично. Липид А *S typhimurium* подобен таковому *E coli*; он представляет собой глюкозаминный дисахарид, который несет четыре первичных и две вторичные гидроксацильные цепи (Raetz and Whitfield (2002, *Annu Rev Biochem* 71 : 635-700). Как описано выше, мутанты *msbB S typhimurium* не могут подвергаться терминальному миристолированию его LPS и продуцировать преимущественно пентаацилированный липид А, который является значительно менее токсичным, чем гексаацилированный липид А. Модификация липида А пальмитатом катализируется пальмитоилтрансферазой (PagP). Транскрипция гена *pagP* находится под контролем системы PhoP/PhoQ, которая активируется низкими концентрациями магния, например, внутри SCV. Таким образом, содержание ацильных групп *S typhimurium* является переменным, и с бактериями дикого типа он может быть гекса-или пента-ацилированным. Способность *S typhimurium* модифицироваться пальмитатом липида А увеличивает устойчивость к антимикробным пептидам, которые секретируются в фаголизосомы.

В *S typhimurium* дикого типа экспрессия *pagP* приводит к образованию липида А, который является гепта-ацилированным. В мутанте *msbB* (в который конечная ацильная цепь липида А не может быть добавлена), индукция *pagP* приводит к получению гексаацилированного LPS (Konget Al. (2011) *Infection and Immunity* 79 (12): 5027-5038). Было показано, что гексаацилированный LPS является наиболее провоспалительным. В то время как другие группы стремятся использовать этот провоспалительный сигнал, например, путем делеции *pagP*, чтобы дать возможность получить только гексаацилированный LPS (Felgner Etal. (2016) *Gut Microbiomics* 7 (2): 171-177; Felgner et al (2018) *Onc Immunology* 7 (2): e1382791), это может привести к плохой переносимости, обусловленной TNF-альфа-опосредованной провоспалительной природой LPS и парадоксально менее адаптивным иммунитетом (Kooijancic et al. (2017) *Oncotarget* 8 (30): 49988-50001). В качестве примера здесь представлен живой ослабленный штамм *S Typhimurium*, который может продуцировать только пентаацилированный LPS, который содержит делецию гена *msbB* (которая предотвращает выход миристолирования липида А, как описано выше), и дополнительно модифицируется делецией *pagP* (предотвращение пальмитоилирования). Штамм, модифицированный для получения пентаацилированного LPS, будет обеспечивать более низкие уровни провоспалительных цитокинов, улучшенную стабильность в крови и устойчивость к фиксации комплемента, повышенную чувствительность к антимикробным пептидам, повышенную переносимость и повышенный противоопухолевый иммунитет при дальнейшей модификации для

экспрессии гетерологичных иммуностимулирующих белков и/или интерферирующих РНК против иммунных контрольных точек.

В соответствии с настоящим изобретением мутант *ragP* был также сконструирован на основе штамма с делециями *asd*, *msbB*, *purI/purM* и *fliC/fljB* из *S typhimurium* VNP20009 или *S typhimurium* дикого типа. Полученные штаммы являются примерами штаммов, которые ослаблены для бактериального воспаления путем модификации липида А для уменьшения передачи сигналов TLR2/4 и делеции субъединиц флагеллина для снижения экспрессии TLR5 И индукции воспаления и удаления *ragP* с получением пентаацилированного LPS. Делеция флагеллиновых субъединиц в сочетании с модификацией LPC обеспечивает более высокую переносимость хозяина и более высокую стабильность в крови и устойчивость к фиксации комплемента, обеспечивая улучшенную миграцию к участку опухоли, для того чтобы направить иммуностимулирующий ответ на продуцирование любого генного продукта, таких как иммуностимулирующие белки и/или доставка РНК-интерференции против целевых мишеней в ТМЕ для индукции противоопухолевого ответа и стимулирования адаптивного иммунного ответа на опухоль.

3. Колонизация.

VNP20009 является ослабленным *S. typhimurium* основе микробной терапии рака, которая была разработана для лечения рака. VNP20009 ослабляется за счет удаления генов *msbB* и *purI* (*purM*). Удаление *purI* делает микроб ауксотропным для пуринов или аденозина. Удаление гена *msbB* уменьшило токсичность, связанную с липополисахаридом (LPS), предотвратив добавление терминальной миристильной группы в липидный домен А (Kahn et al., (1998) *Mol. Microbiol.* 29:571-579). Существует разница между мышью и людьми в способности VNP20009 колонизировать опухоли. Системное администрирование VNP20009 привело к колонизации опухолей мышей; в то время как системное администрирование VNP20009 у пациентов привело к очень малой колонизации. Было показано, что у мышей, VNP20009 показал высокую степень колонизации опухоли после системного введения (Clairmont et al., (2000) *J Infect Dis.* 181 : 1996-2002; и Bermudez et al. (2001) *Biotechnol Genet Eng Rev.* 75 :219-33). В фазе 1 исследований у продвинутых пациентов с меланомой, однако, очень мало VNP20009 был обнаружен в опухолях человека после 30-минутного внутривенного вливания (см. Тосо и др., (2002) *J Clin. Oncol.* 20: 142-52). Пациенты, которые вступили в последующее исследование оценки, четыре часа вливания VNP20009, также продемонстрировали отсутствие обнаруживаемых VNP20009 после биопсии опухоли (Heimann et al. (2003) *Immunother.* 26: 179-180). После внутриопухолевого введения была обнаружена

колонизация производной VNP20009 (Nemunaitis et al. (2003) CancerGeneTher. 70:737-44). Прямое внутриопухолевое введение VNP20009 в опухоли человека привело к колонизации опухоли, что указывает на то, что опухоли человека могут быть колонизированы на высоком уровне, и что разница в колонизации опухоли между мышами и людьми происходит только после системного введения.

It is shown herein (see, e.g., Example 25) that VNP20009 is inactivated by human complement, which leads to low tumor colonization. Strains that provide improved resistance to complement are provided. These strains contain modifications in the bacterial genome and also can carry a plasmid, typically in low or medium copy number, to encode genes to provide for replication (*asd* under the control of a eukaryotic promoter), and nucleic acid(s) encoding a therapeutic product(s), such as, but not limited to, RNAi, immunostimulatory protein, such as cytokines, and other such therapeutic genes, as described elsewhere herein. The table below summarizes the bacterial genotypes/modifications, their functional effects, and the effects/benefits

Здесь показано (см. например, Пример 25), что VNP20009 инактивирован комплементом человека, что приводит к низкой колонизации опухоли. Штаммы, которые обеспечивают улучшенную устойчивость к комплементу, приведены здесь. Эти штаммы содержат модификации в бактериальном геноме, а также могут нести плазмиду, обычно с низким или средним числом копий, для кодирования генов для обеспечения репликации (*asd* под контролем эукариотического промотора), и нуклеиновую кислоту (ы), кодирующую терапевтический продукт (ы), такой как, но не ограничиваясь ими, РНКi, иммуностимулирующий белок, такой как цитокины, и такие терапевтические гены, как описано в настоящем описании. Таблица, приведенная ниже, суммирует бактериальные генотипы/модификации, их функциональные эффекты и эффекты/преимущества.

Генотип/Модификация	Функциональный эффект	Эффект/Преимущество
<i>ΔpurI</i>	ауксотрофия пурин/аденозин	Ограниченная репликация в тканях, отвечающих за здоровье
<i>ΔmsbB</i>	LPS модификация поверхности	Уменьшенное узнавание TLR4 Пониженный профиль цитокина Улучшенная безопасность
<i>ΔFLG</i>	Нокаут флагеллы	Удаляет основные воспалительные и иммуносупрессивные элементы

Генотип/Модификация	Функциональный эффект	Эффект/Преимущество
		Уменьшает узнавание TLR5 Пониженный профиль цитокина Улучшенная безопасность
$\Delta ragP$	LPS модификация поверхности	Удаляет основные воспалительные и иммуносупрессивные элементы Уменьшает узнавание TLR4 Пониженный профиль IL-6 e Улучшенная безопасность
<i>Dasd</i> (в геноме)	Поддержание плазмиды	Улучшенная доставка плазмид Поддержание плазмид
плазмида	Выделение генных продуктов под контролем распознаваемого хозяином промотера	Эукариотический промотер ограничивает экспрессию в клетки, содержащие плазмиды Большое время экспрессии в TME (<i>i.e.</i> , <i>asd</i> кодированный на плазмиде под контролем промотера, узнаваемого хозяином) Экспрессия терапевтического продукта(ов)

Штаммы, представленные здесь, представляют собой ΔFLG и/или $\Delta ragP$. Кроме того, штаммы представляют собой один или более Из $\Delta purI$ ($\Delta purM$), $\Delta msbB$ и Δasd (в бактериальном геноме). Плазмида модифицирована для кодирования продуктов под контролем промоторов, распознаваемых хозяином (например, эукариотических промоторов, таких как промоторы РНК-полимеразы II, включая промоторы из эукариот и вирусов животных). Эти плазмиды могут кодировать *asd*, чтобы обеспечить репликацию *in vivo*, а также нуклеиновые кислоты с другими полезными функциями и генными продуктами, как описано в настоящем описании.

Иммуностимулирующие бактерии получают из соответствующих бактериальных штаммов. Бактериальные штаммы могут быть ослабленными штаммами или штаммами,

которые ослаблены стандартными методами, или что благодаря модификациям, представленным в настоящем описании, ослаблены тем, что их способность к колонизации ограничена, главным образом, иммунными тканями и органами, в частности, иммунными и опухолевыми клетками, включая солидные опухоли. Бактерии включают, но не ограничиваются ими, например, штаммы *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *E coli* и *Bifidobacterium*. Например, виды включают *ShigellaSonnei*, *ShigellaFlexneri*, *ShigellaUnifiteriae*, *Listeriamonocytogenes*, *Salmonellatyphi*, *Salmonellatyphimurium*, *Salmonellagallinarum* и *Salmonellaenteritidis*. Другие подходящие виды бактерий включают *Rickettsia*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Vibrio*, *Bacillus*, and *Erysipelothrix*. Например, *Rickettsia Rickettsiae*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugamuchi*, *Rickettsia mooseri*, *Rickettsia sibirica*, *Bordetella bronchiseptica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Francisellatularensis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Citrobacter freundii*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilussornnus*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium intracellulare*, *Legionella pneumophila*, *Rhodococcusequi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter mustelae*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Erysipelothrixrhusiopathiae*, *Yersinia enterocolitica*, *Rochalimaeaquintana*, и *Agrobacterium tumerfacium*.

Примерами иммуностимулирующих бактерий, предлагаемых в настоящем изобретении, являются виды *Salmonella*. Примерами бактерий для модификации, как описано здесь, являются штаммы *Salmonella* дикого типа, такие как штамм, который имеет все идентифицирующие характеристики штамма, депонированного в АТСС под регистрационным номером 14028. Сконструированные штаммы *Salmonellatyphimurium*, такие как штамм YS1646 (АТСС # 202165; также называемый VNP20009, см. международную публикацию WO99 /13053), которая сконструирована с плазмидами для дополнения нокаута гена *asd* и сохранения свободной от антибиотика плазмиды. Затем штаммы модифицируют для удаления генов флагеллина и/или для удаления *ragP*. Штаммы также являются ауксотрофными для пуринов, в частности аденозина, и являются *asd* и *msbB*. Ген *asd* может быть обеспечен на плазмиде для репликации в эукариотическом хозяине. Эти делеции и плазмиды описаны далее в настоящем описании. Любая нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтические продукты и иммуностимулирующие белки, и продукты, описанные в настоящем описании и/или известные специалистам в данной области, могут быть включены в плазмиду. Плазмида

обычно присутствует в количестве от низкого до среднего, как описано в настоящем описании. Терапевтические продукты включают иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ в микросреде опухоли и другие описанные здесь продукты.

F ПРИМЕРЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПЛАЗМИД, КОДИРУЮЩИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

Имуностимулирующие бактерии, представленные здесь, являются модифицированными. Они включают модификации бактериального генома и бактериальной экспрессии и инвазии клеток-хозяев, как обсуждается ниже, например, для улучшения или увеличения нацеливания или накопления в опухолях, опухолях-резидентных иммунных клетках и микроокружения опухоли, а также включают в себя плазмиды, которые кодируют продукты, которые экспрессируются в бактериях, включая бактериальный промотор, или в хозяине, включая подходящий эукариотический промотор и другие регуляторные области, как это необходимо. Здесь показано, что иммуностимулирующие бактерии, которые представляют собой флагеллин (*fliC/fljB*) и/или *ragP*, и возможно *hiIA*, проявляют повышенную колонизацию опухоли, и, таким образом, могут преодолеть предыдущие проблемы, с которыми сталкиваются VNP20009, которые не смогли адекватно колонизировать опухоли у человека. Клиническая активность VNP20009 была отменена частично из-за плохой способности колонизировать опухоли человека (Nemunaitis et al. (2003) *Cancer Gene Ther.* 10 (10): 737-744; Toso et al. (2002) *J Clin. Oncol.* 20 (1): 142-152; Heimann et al. (2003) *J Immunother.* 26 (2): 179-180)

Для введения плазмид бактерии трансформируют стандартными методами, такими как электропорация, с очищенными плазмидами ДНК, сконструированными с помощью стандартных методов и методов молекулярной биологии (синтез ДНК, амплификация ПЦР, расщепление рестрикционным ферментом ДНК и лигирование совместимых концевых фрагментов с лигазой). Как обсуждалось выше, плазмиды кодируют один или более терапевтических продуктов, включая белки, такие как антитела и их фрагменты, и иммуностимулирующие белки, такие как интерлейкины, под контролем промоторов, распознаваемых хозяином. Кодированные иммуностимулирующие белки стимулируют иммунную систему, в частности, в микроокружении опухоли. Антитела, включая фрагменты антител и одноцепочечные антитела, могут ингибировать иммунные контрольные точки.

Плазмида может кодировать, например, терапевтический продукт или терапевтический белок, который представляет собой один или несколько GM-CSF, IL -2, IL -7, IL -12 p70 (IL -12 p40 + IL -12 p35) IL -15, IL -15/IL -15 R-альфа-цепочечный комплекс, IL -2, который имеет ослабленное связывание с IL -2 Ra, IL -18, IL -36 гамма, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые вовлечены в действие или усиливают рекрутмент/устойчивость т-клеток, CD40, CD40-лиганд, OX40, OX40-лиганд, 4-1BB, 4-1BB-лиганд, члены семейства B7-CD28, антагонист полипептида TGF-бета, антагонист CD47, интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма или члены суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

Бактерии могут кодировать другие продукты на плаزمиде, такие как одна или несколько коротких (sh) РНК-конструкций или других ингибиторных РНК-конструкций, экспрессия которых ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию генов-мишеней.

Терапевтические продукты, такие как иммуностимулирующие белки, антитела и РНК, такие как РНК-или микроРНК-конструкции, экспрессируются под контролем эукариотического промотора, такого как промотор РНК-полимеразы (RNAP) II или III. Как правило, промоторы RNAPIII (также называемые POLIII) являются конститутивными, и RNAPII (также обозначаемый как POLII) может регулироваться. В некоторых примерах shРНК нацеливают на ген TREX1, ингибируя его экспрессию. В некоторых вариантах осуществления плазмиды кодируют множество терапевтических продуктов. Когда кодируется множество продуктов, таких как РНКi, экспрессия каждого может быть под контролем различных промоторов, или продукты могут кодироваться полицистронно.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтические продукты/белки, могут находиться под контролем эукариотического промотора, который представляет собой промотор РНК-полимеразы II или промотор РНК-полимеразы III. Промотор РНК-полимеразы II может представлять собой вирусный промотор или промотор РНК-полимеразы II млекопитающего. Вирусный промотор может быть выбран из хорошо известных вирусных промоторов. Примерами являются промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор вируса Эпштейна-Барра (EBV), промотор вируса герпеса и промотор аденовируса.

Терапевтический продукт может находиться под контролем промотора эукариотической РНК-полимеразы II (RNAP II). Многие такие промоторы хорошо известны. Примером таких промоторов является промотор RNAPII, выбранный из, например, фактора удлинения -1 (EF1) промотор гена убикитинаС (UBC), промотор фосфоглицераткиназы 1 (PGK), промотор CAG (который состоит из: (с) промотора

раннего усилителя цитомегаловируса (CMV), промотора, первого экзона и первого интрона гена бета-актина цыпленка и (G) акцептора сплайсинга гена бета-глобина кролика), промотора EIF4a1 (эукариотического фактора инициации 4A), промотора CBA (куриного бета-актина), промотора MND, промотора GAPDH и промотора CD68. MND представляет собой синтетический промотор, который содержит область U3 модифицированного LTR MoMuLVс усилителем вируса миелопролиферативной саркомы (усилитель вируса MND, полученный из вируса мышинного лейкоза) (усилитель вируса миелопролиферативной саркомы, отрицательная контрольная область удалена); см. например, Li et al. (2010) *J Neurosci. Methods* vol 189: 56-64).

В соответствии с настоящим изобретением бактериальные штаммы, такие как штаммы *Salmonella*, включая *S typhimurium*, модифицированы или идентифицированы как ауксотрофные в отношении аденозина в микроокружении опухоли, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что он предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки и/или так, что он индуцирует меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках, и бактерии модифицируют для переноса плазмид, кодирующих терапевтический продукт, такой как иммуностимулирующий белок, антитело или фрагмент антитела, такое как противоопухолевое антитело или его фрагмент, или антитело против контрольной точки, и другие продукты, такие как РНКi.

1. Иммуностимулирующие белки

Как обсуждается ниже, и в другом месте, представлены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат последовательности нуклеотидов, которые кодируют продукты генов, такие как иммуностимулирующие белки, для придания, повышения или усиления иммунных ответов в микроокружении опухоли. Эти иммуностимулирующие бактерии модифицируют таким образом, чтобы они предпочтительно инфицировали опухоли, включая находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующих бактерий модифицируют так, чтобы они индуцировали меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках, в результате чего иммуностимулирующие бактерии накапливаются в опухолевых клетках для доставки иммуностимулирующих белков к клеткам-мишеням для стимуляции иммунного ответа против опухоли. Иммуностимулирующие бактерии могут дополнительно кодировать опухолевый антиген для усиления реакции против конкретной опухоли. Любые иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь и описанные выше и ниже, могут быть модифицированы для кодирования иммуностимулирующего белка. Обычно

иммуностимулирующий белок находится под контролем промотора РНК-полимеразы II (RNAPNAII), а также кодируется в плазмиде для секреции при экспрессии в микроокружение опухоли. Любой из описанных здесь бактерий для модификации, такой как любой из штаммов *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Bifidobacteriae*, *Rickettsia*, *Vibrio*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Cholera*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bacillus*, и *Erysipelothrix*, или их ослабленный штамм, или их модифицированный штамм кодируют иммуностимулирующий белок, так что он экспрессируется в инфицированных клетках субъекта. Иммуностимулирующие бактерии включают в себя бактерии, которые модифицированы, как описано здесь, для колонизации, накопления в или для преимущественного инфицирования опухолей, находящихся в опухоли иммунных клеток и/или ТМЕ.

Как обсуждалось в разделе D5 и в другом месте, иммуностимулирующие бактерии могут кодировать иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, включая хемокины, которые усиливают или стимулируют или индуцируют противоопухолевый иммунный ответ, в частности, при экспрессии в опухолях, в микроокружении опухоли и/или в находящихся в опухоли иммунных клетках.

Иммуностимулирующие бактерии описанные здесь могут быть модифицированы для кодирования иммуностимулирующего белка, который способствует или индуцирует или усиливает противоопухолевую реакцию. Иммуностимулирующий белок может быть кодирован в плазмиде в бактериях под контролем эукариотического промотора, такого как промотор, распознаваемый РНК-полимеразой II, для экспрессии в эукариотическом субъекте, в частности субъекте, для которого должна быть введена иммуностимулирующая бактерия, такой как человек. Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок, может включать в дополнение к эукариотическому промотору другие регуляторные сигналы для экспрессии или переноса в клетки, такие как для секреции или экспрессии на поверхности клетки.

Иммуностимулирующие белки представляют собой такие белки, которые в подходящей среде, такие как микроокружение опухоли (ТМЕ), могут промотировать или принимать участие в или усиливать противоопухолевую реакцию у субъекта, которому вводят иммуностимулирующую бактерию. Иммуностимулирующие белки включают, но не ограничиваются ими, цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы. Они включают цитокины, такие как, но не ограничиваясь ими, IL -2, IL -7, IL -12, IL -15 и IL -18; хемокины, такие как, но не ограничиваясь ими, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10

И CXCL11; и/или костимулирующие молекулы, такие как, но не ограничиваясь ими, CD40, CD40L, OX40, OX40L, 4-1BB, 4-1BBL, GM-CSF, члены суперсемейства TNF/TNFR и члены семейства B7-CD28. Другие такие иммуностимулирующие белки, которые используются для лечения опухолей или которые могут способствовать, усиливать или иным образом увеличивать или вызывать противоопухолевый ответ, известные специалистам в данной области, предполагаются для кодирования в предлагаемых здесь иммуностимулирующих бактериях.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии сконструированы для экспрессии цитокинов для стимуляции иммунной системы, включая, но не ограничиваясь ими, IL -2, IL -7, IL -12 (IL -12 p70 (IL2p40 + IL -12 p35)), IL -15 (и комплекс IL -15: рецептор альфа-цепи IL -15R) И IL -18. Цитокины стимулируют иммунные эффекторныe клетки и стромальные клетки в месте опухоли и усиливают распознавание опухолевых клеток цитотоксическими клетками. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии могут быть сконструированы для экспрессии хемокинов, таких как, например, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 И CXCL11. Эти модификации и бактерии, кодирующие их, обсуждаются выше и приведены ниже.

2. Антитела и фрагменты антител

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат последовательности нуклеотидов, которые кодируют продукты генов, такие как антитела и фрагменты антител, для придания, повышения или усиления противоопухолевых иммунных ответов. Они включают антитела и фрагменты антител, которые нацелены на иммунные контрольные точки, такие как CTLA -4, PD -1, PD -11, CD47, или опухолевые антигены-мишени и неоантигены опухоли, включая те, которые идентифицированы из опухоли субъекта, подлежащего лечению, среди прочих, и, например,, анти-IL-6-антитела, которые модулируют, в частности, ингибируют иммунное подавление. Антитела или их фрагменты, такие как scFv и другие одноцепочечные антитела, такие как камелиды и нанотела, могут быть кодированы на плазмиде в бактериях под контролем эукариотических регуляторных последовательностей и сигналов, включая эукариотический промотор, такой как промотор, распознаваемый РНК-полимеразой II, для экспрессии в эукариотическом субъекте в частности, у субъекта, для которого должна быть введена иммуностимулирующая бактерия, такой как человек. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитела и фрагменты антител, может включать в дополнение к

эукариотическому промотору другие регуляторные сигналы для экспрессии и/или переноса в клетках, такие как для секреции или экспрессии на поверхности клетки.

Эти иммуностимулирующие бактерии представляют собой те, которые представлены здесь, геномы которых модифицированы для преимущественного инфицирования опухолей, включая находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или для уничтожения инфекции клеток, которые не являются клетками-мишенями, и/или такие, что они индуцируют меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках, в результате чего иммуностимулирующие бактерии накапливаются в опухолевых клетках для доставки антител или фрагментов антител к клеткам-мишеням для стимуляции иммунного ответа против опухоли. Иммуностимулирующие бактерии также или альтернативно могут кодировать опухолевый антиген или неоантиген для усиления реакции против конкретной опухоли. Любые иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь и описанные выше и ниже, могут быть модифицированы для кодирования антитела или его фрагмента. Обычно антитело или его фрагмент находится под контролем промотора РНК-полимеразы II (RNAPII), а также кодируется в плазмиде для секреции при экспрессии в микроокружение опухоли. Рассматриваются любые из описанных здесь бактерий для модификации, такие как любой из штаммов *Salmonella*, *Shigella*, *E Coli*, *bifidobacterium Bioriae*, *Rickettsia*, *Vibrio*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Franceella*, *Cholera*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bacillus* и *Erysipelothrix*, или их ослабленный штамм или модифицированный штамм, кодирующий антитело или его фрагмент, так что он экспрессируется в инфицированных клетках субъекта. Иммуностимулирующие бактерии включают в себя бактерии, которые модифицированы, как описано здесь, для колонизации, накопления в или для преимущественного инфицирования опухолей, опухолевых клеток и/или микроокружения опухоли.

Терапевтические антитела и их фрагменты хорошо известны. Например, существует множество антител анти-CTLA4, анти-PD-1 и анти-PD-11 и их антигенсвязывающих фрагментов, таких как Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), Fv, стабилизированные дисульфидом Fv (dsFv), нанотела и камлиды, и фрагменты ди-антител, одноцепочечные антитела и гуманизированные и человеческие антитела, которые известны. Например, известны антитела, которые связываются с PD-1 или PD-11 и ингибируют PD-1-ингибирующую активность, и которые были использованы в противоопухолевой иммунотерапии. Примеры анти-PD-1 антител включают в себя, но не

ограничиваются ими, любые из тех, которые описаны в Патентах США 7, 94.3743, 8.008.449 и 8735553; публикациях США № 2005/0180969 и 2007 /0166281; и международной публикации WO 2008/156712.

Анти-PD-L1 антитела включают, но не ограничиваются ими, любые из тех, которые описаны в публикациях США № 2013/0034559 и 2013/0045202; патентах США № 7943743, 8217149, 8, 679,767 и 8779108; и международной публикации WO 2010/077634 и WO 2013/019906. Было описано несколько антител, которые связываются с и ингибируют активность CTLA -4, и используются в противоопухолевой иммунотерапии. Антитела против CTLA4 включают, но не ограничиваются ими, любые из тех, которые описаны в патентах США № 6682736 и 6984720; публ. 2002/0086014 and 2009/0074787; в европейском патенте N 1262193 и в международной заявке WO 2000/037504. Антитела против CTLA4 включают MDX -010 или 10D1 и тремелимаб (также называемый CP -675206). Эти антитела против CTLA4 вовлечены в многочисленные клинические испытания для лечения злокачественных опухолей. Иптомамаб одобрен FDA для лечения меланомы и находится в клинических испытаниях на другие злокачественные опухоли, такие как рак простаты, рак легких и почечный клеточный рак (RCC). Тремелимаб был исследован в клинических испытаниях для лечения колоректального рака (CRC), рака желудка, меланомы и немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). Примеры ингибиторов контрольной точки включают, но не ограничиваются ими, агенты против CTLA4, агенты против PD -1, агенты против PD-L1 И другие, примеры которых являются следующими:

Примеры белков и ингибиторов иммунной контрольной точки			
Мишень	Функция мишени	Антитело/Белок слияния	Синонимы и кодовые наименования
CTLA4	Рецептор ингибитора	Лпилимумаб Тремелимаб	(MDX-CTLA-4; BMS-734016; MDX-010) (Тицилимумаб; CP-675,206)
PD-1	Рецептор ингибитора	МК-3475 АМР-224 Ниволумаб Пидилизумаб	(Пембролизумаб; Ламбролизумаб; SCH 900475) (анти-PD-1 белок слияния АМР-224) (BMS-936558; MDX-1106; ONO-4538)

Примеры белков и ингибиторов иммунной контрольной точки			
Мишень	Функция мишени	Антитело/Белок слияния	Синонимы и кодовые наименования
			(CT-011)
PD-L1	Лиганд для PD-1	MDX-1105 BMS-936559 MED14736 MPDL33280A	(RG7446)

Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, могут быть сконструированы для экспрессии любого их антитела/антигенсвязывающего фрагмента, включая, но не ограничиваясь ими, антитела против контрольной точки (антагонисты/ингибиторы контрольной точки), описанные здесь, и известные специалистам в данной области.

3. Интерферирующие РНК (РНКi)

Плазмиды в иммуностимулирующих бактериальных штаммах здесь кодируют нуклеиновые кислоты РНКi, направленные на иммунные контрольные точки и другие представляющие интерес мишени, как описано выше. РНКi включают в себя shРНК, siРНК и микроРНК. Интерференция РНК (РНКi) позволяет осуществлять селективное по последовательности подавление экспрессии генов в эукариотических клетках с использованием небольших интерферирующих РНК (siРНК), которые являются короткими, синтетическими, молекулами dsРНК с последовательностью, гомологичной целевому гену. Технология РНКi обеспечивает мощный инструмент для истощения связанных с заболеванием транскриптов.

a.shРНК

siРНК, которые обычно имеют длину около 19-29 оснований, функционируют путем разрушения специфических последовательностей mРНК хозяина, предотвращая трансляцию в их соответствующие белковые продукты, эффективно подавляя экспрессию гена-мишени. Короткие шпильчатые РНК (shРНК), содержащие плотную петлю шпильки, широко используются в РНКi. shRNA содержат две комплементарные РНК-последовательности, каждая из которых имеет длину 19-29 бит/с, связанную с петлевым спейсером из 4-15 нуклеотидов. Последовательность РНК, которая комплементарна последовательности гена-мишени (и, таким образом, идентична

последовательности mРНК), известна как "смысловая" цепь, в то время как цепь, которая комплементарна mРНК (и идентична последовательности-мишени), известна как "антисмысловая" или "направляющая" цепь. Транскрипты shРНК обрабатывают ферментом РНКазы III, известным как Dicer, в siРНК-дуплексы. Затем продукт загружают в РНК-индуцируемый комплекс (RISC) с белками Argonaute (Ago) и другими РНК-связывающими белками. Затем RISC локализует антисмысловую или "направляющую" цепь в комплементарную последовательность mРНК, которая затем расщепляется Ago (патент США 9624494). Использование shРНК является предпочтительным по сравнению с siRNA, поскольку оно является более дешевым эффективным, высокие внутриклеточные концентрации siRNA ассоциируются с внемишенными эффектами, и поскольку концентрация siRNA становится разбавленной при делении клеток. Использование shРНК, с другой стороны, приводит к стабильному, продолжительному нокдауну гена, без необходимости в многочисленных циклах трансфекции (Moore et al. (2010) *Methods Mol. Bio.* 629: 141-158).

Мишени, представляющие интерес для РНКi, такие как microРНК и siRNA/shРНК-опосредованные, включают, но не ограничиваются ими, гены развития, такие как цитокины и их рецепторы, ингибиторы циклинкиназы, нейромедиаторы и их рецепторы, факторы роста/дифференцировки и их рецепторы; онкогены, такие как BCL2, ERBB, ERBB, JUN, KRAS, MYB, MYC, гены супрессоров опухоли, такие как BRCA1, BRCA2, MCC, p53; и ферменты, такие как АСС-синтазы и оксидазы, АТФазы, алкогольдегидрогеназы, амилазы, каталазы, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы, киназы, лактазы и липазы (Патенты США NN 732417, 8829254, 38383599, 8426675, 9624494; публикация США № 2012/0009153). Особый интерес представляют мишени с иммунными контрольными точками, такие как PD-1, PD-2, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, IDO1 и 2, CTNНВ1 (бета-катенин), SIRPальфа, VISTA, RNaseH2, DNaseII, CLEVER-1/стабилин-1, LIGHT, HVEM, LAG3, TIM3, TIGIT, Galectin-9, KIR, GITR, TIM1, TIM4, CEACAM1, CD27, CD47, CD40, CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD112, CD137(4-1BB), CD155, CD160, CD200, CD226, CD244(2B4), CD272(BTLA), B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, ICOS, A2aR, A2bR, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B, HLA-G, ILT-2/4, OX40 и OX-40L. Другие мишени включают MDR1, Аргиназу 1, iNOs, IL-10, TGF-β, pGE2, STAT3, VEGF, VEGFR, KSP, HER2, Ras, EZH2, NIPP1, PP1, TAK1 and PLK1 (Публикации США 2008/091375, 2009/0208534, 2014/0186401, 2016/0184456, 2016/0369282; международные заявки WO 2012/149364, WO 2015/002969, WO 2015/032165, WO 2016/025582).

Экспрессированные РНК_i, такие как shРНК, опосредуют долгоживущий, стабильный нокдаун их целевых транскриптов до тех пор, пока тРНК не транскрибируются. Промоторы РНК Pol II и III используются для возбуждения экспрессии конструкций shРНК в зависимости от типа требуемой экспрессии. В соответствии с их нормальными клеточными ролями в продуцировании эндогенных малых РНК, промоторы Pol III (такие как U6 или H1) приводят к высокому уровню конститутивной экспрессии shРНК, а их точки инициации транскрипции и сигналы терминации (4-6 тимидинов) хорошо определены. shРНК, активируемые промотором Pol II, могут быть экспрессированы тканеспецифично и транскрибированы как более длинные предшественники, которые имитируют pre-miРНК и имеют сигналы cap и polyA, которые должны быть обработаны. Такие искусственные мРНК/shRNA эффективно встраиваются в RISC, способствуя более мощному ингибированию экспрессии гена-мишени; это обеспечивает более низкие уровни экспрессии shРНК и может предотвращать насыщение компонентов в пути RNAi. Дополнительное преимущество промоторов Pol II заключается в том, что один транскрипт может одновременно экспрессировать несколько miРНК и имитировать shRNA. Эта стратегия мультиплексирования может использоваться для одновременной экспрессии в две или более терапевтических мишеней или для нацеливания нескольких сайтов в один генный продукт (см. например публикацию США 2009/0208534).

в. МикроРНК

МикроРНК (miРНК) являются короткими, некодирующими однонитевыми молекулами РНК, которые имеют 20-24 или примерно нуклеотидов в длину. Встречающиеся в природе miРНК вовлечены в посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов; miРНК не кодируют гены. Было показано, что miРНК регулируют пролиферацию и выживание клеток, а также клеточную дифференцировку. miRNAs ингибируют трансляцию или промотируют деградацию РНК путем связывания с мРНК-мишенями, которые имеют комплементарность последовательности. Они влияют на стабильность и трансляцию мРНК; miРНК ингибируют трансляцию и/или стимулируют деградацию РНК путем связывания с мРНК-мишенями, которые имеют комплементарные последовательности. miРНК, которые встречаются в эукариотах, транскрибируются РНК Pol II в блокированные и полиаденилированные первичные транскрипты, известные как предшественники miРНК, или pre-miРНК. Эти pri-miРНК расщепляются ферментом Drosha рибонуклеазой III и его кофактором Pasha/DGCR8 на предшественники длиной ~

70 нуклеотидов, известные как предшественники miРНК, или pre-miРНК, которые затем транспортируются из ядра в цитоплазму и расщепляются с помощью Dicer-рибонуклеазы III в miРНК: miРНК-дуплекс, с продуктами смысловой и антисмысловой цепей, которые имеют длину приблизительно 22 нуклеотидов. Готовая miРНК встраивается в индуцируемый РНК комплекс (RISC), который распознает и связывает мРНК-мишени, обычно в 3'-нетранслируемом участке (UTR), посредством несовершенного спаривания оснований с мРНК, что приводит к ингибированию трансляции, или дестабилизации/деградации мРНК-мишени (см. например, Auyeung Et al. (2013) *Cell* 152 (4): 844-85).

Как описано здесь, регуляция экспрессии гена посредством интерференции РНК (РНКi) часто использует короткие РНК (shРНК) для ингибирования, нарушения или иной помехи экспрессии генов-мишеней. Несмотря на то, что в некоторых случаях shРНК могут быть плохими субстратами для малых факторов биогенеза РНК, они могут быть переработаны в гетерогенную смесь малых РНК, и их исходные транскрипты могут накапливаться в клетках, приводя к индукции независимых от последовательности неспецифических эффектов и ведет к токсичности *in vivo*. Для использования в настоящем изобретении рассматриваются miРНК. miРНК-подобные каркасы или искусственные miРНК (amiРНК) можно использовать для уменьшения неспецифических независимых от последовательности эффектов (Watanabe et al. (2016) *RNA Biology* 13 (1): 25-33; Fellmann et al. (2013) *Cell Reports* 5: 1704-1713). В дополнение к улучшенным профилям безопасности amiРНК более легко транскрибируются Pol II, чем shРНК, обеспечивая регулируемую и специфичную для клеток экспрессию. Искусственная miРНК (amiРНК), по сравнению с shРНК, может эффективно, и в некоторых случаях, более эффективно экспрессировать экспрессию гена молчания без образования больших количеств ингибиторных РНК (McBride et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (15): 5868-5873). Было определено, что этот эффект обусловлен более эффективной обработкой siРНК из предшественников pre-miРНК, чем из транскриптов shРНК (Boden et al. (2004) *Nucl. Acid Res* 32 (3): 1154-1158).

Было показано, что miРНК регулируют несколько клеточных процессов, включая пролиферацию клеток и выживание, внутриклеточную сигнализацию, клеточный метаболизм и клеточную дифференциацию. В 1993 году первая miРНК была идентифицирована в *C. elegans* (Lee et al. (1993) *Cell* 75:843-854), а позже были выявлены miРНК млекопитающих (Pasquinelli et al. (2000) *Nature* 408(6808):86-89). Было выявлено более 17 000 miРНК в 142 видах, при этом у людей было выявлено более 1900 miРНК,

многие из которых были связаны с различными заболеваниями, включая рак (например, miR-15 и miR-16 в B-CLL, miR-125b, miR-145, miR-21, miR-155 и miR-210 при раке молочной железы, miR-155 и let-7a при раке легких, miR-145 при раке желудка, miR-29b при раке печени); вирусные инфекции (например, miR-122 и miR-155 при инфекции HCV, miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 и miR-382 при ВИЧ-1 инфекции, miR-21 и miR-223 при заражении гриппом); заболеваний, связанных с иммунитетом (например, miR-145, miR-34a, miR-155 и miR-326 при рассеянном склерозе, miR-146a при системном эритематозе волчанки, miR-144, miR-146a, miR-150, miR-182, miR-103 и miR-107 при диабете II типа, miR-200a, miR-200b, miR-429, miR-122, miR-451 и miR-27 при безалкогольных жировых заболеваниях печени, miR-29c, miR-34a, miR-155 и miR-200b при безалкогольных стеатогепатитах); и нейродегенеративных заболеваний (например, miR-30b, miR-30c, miR-26a, miR-133b, miR-184* и let-7 при болезни Паркинсона, miR-29b-1, miR-29a и miR-9 при болезни Альцгеймера) (Li и Kowdley (2012) *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10:246-253).

Исследования показали, что специфические эндогенные miRNK регулируются позитивно или негативно в некоторых видах рака. Например, miR-140 негативно регулируется в немелкоклеточном раке легкого (NSCLC), и его сверхэкспрессия, как было установлено, подавляет PDL1 (Xie et al. (2018) *Cell Physiol. Biochem.* 46: 654-663); miR-197 регулируется в отношении химиотерапии, резистентной к химиотерапии на основе платины, что приводит к сопротивлению химическому воздействию, к метастазированию (Fujita et al (2015) *Mol. & Cells* 23 (4): 717-727); и было обнаружено, что несколько miRNK регулируются в раковых клетках для обеспечения экспрессии PD-L1, включая miR -200, miR -34 a и miR-138 (Ye et al. (2017) *J Biol Chem* 292 (50): 20683-20693). Несколько miRNK также активируются, например, miR -21, miR-17 и miR -221 в раке легкого (Xie et al. (2018) *Cell Physiol. Biochem.* 46: 654-663).

microRNK-103 (miR-103) идентифицировали как наиболее позитивно регулируемый microRNK в эндотелиальных клетках в результате генотоксического стресса и повреждения ДНК после облучения. Было обнаружено, что miR-103 привел к негативной регуляции генов TREX 1, TREX2 И FANCF, и снижение экспрессии TREX1 было идентифицировано как основной механизм, посредством которого miR-103 опосредует гибель клеток и подавляет ангиогенез (Wilson et al. (2016) *Nature Communications* 7: 13597). Поскольку потеря TREX1 приводит к накоплению комплексов dsДНК и dsДНК, дефектному спариванию ДНК и выделению цитокинов, экспрессия miR-103 значительно позитивно регулирует провоспалительные хемокины IP-

10, RANTES, MIG И цитокины IL -15, IL -12 и IFN-гамма, и эта позитивная регуляция происходит вследствие опосредованного miR-103 снижения уровней TREX1. Исследования также показали значительное увеличение костимуляторных рецепторов CD40 и CD160 и снижение количеств PD-L1 + макрофагов и нейтрофилов в опухолях 4T1. Таким образом, регуляция miR-103 TREX1 является сильным модулятором иммунного ТМЕ. Другие miРНК, мишенью которых являются TREX1, включают в себя miR-107 (Патент США 9242000), miR -27 a и miR148b (Патент США 8580757). miРНК-103 можно использовать в плаزمидах для ингибирования TREX1.

Искусственными miРНК (amiРНК) можно доставлять в клетки и использовать для достижения молчания генов-мишеней путем создания siРНК на основе микроРНК или shРНК-вектора (shРНКmir). miR -30 а часто используют у млекопитающих, и приблизительно 200-300 оснований первичного транскрипта miРНК включают в вектор, причем miРНК-помещают в центр фрагмента, а природную последовательность заменяют последовательностью, кодирующей siRNA/shРНК. Могут быть использованы вирусные промоторы, такие как промоторы CMV, MSCV и TLR; клеточные промоторы, такие как EIF -1a; индуцируемые химерные промоторы, такие как tet-CMV; и тканеспецифические промоторы (Changetal. (2013) ColdSpringHarbProtocDoi: 10:1101/pdb.prot075853). Другие miРНК, которые можно использовать, включают mir-16-2 (Watanabeetal.(2016) *RNA Biology* 13(1):25-33), miR-155 (Chung et al. (2006) *Nuc Acids Res* 34:e53), miR17-92 (Liu et al. (2008) *Nuc. Acids Res.* 36(9):2811-2824), miR-15a, miR-16, miR-19b, miR-20, miR-23a, miR-27b, miR-29a, miR-30b, miR-30c, miR-104, miR-132s, miR-181, miR-191, miR-223 (ПатентСША 8,426,675), и Let-7 miРНК (WO 2009/006450; WO 2015/032165).

shРНКmir ограничены низкой эффективностью предсказанных вычислениями последовательностей shРНК, в частности, при экспрессии в условиях низкого количества копий или единичной копии. Было разработано третье поколение искусственных miРНК, таких как miR-E (на основе miR -30a) и miR -3G (на основе miR-16-2), и было обнаружено, что они проявляют более сильное подавление экспрессии генов как в экспрессирующих векторах Pol II -, так и Pol III по сравнению с shРНКmir благодаря усиленному процессингу и накоплению точно определенных направляющих РНК. miR-E, который был разработан с помощью обнаружения консервативного звена CNNC, которое усиливает процессинг miРНК внутри 3'-фланкирующих последовательностей, отличается от эндогенного miR -30 а в трех аспектах: ножка miR-E не имеет выпуклости и имеет предполагаемую направляющую на противоположной цепи; две консервативные пары оснований, фланкирующие петлю, мутируют от CU/GG до UA/UA; и сайты рестрикции

XhoI/EcoRI вводят в фланкирующие области для клонирования shРНК (Fellmann et al. (2013) CellReports 5: 1704-1713). Было установлено, что miR-E является более сильным, чем miR -30 а, но симметричная обработка как 3р, так и 5р частей miR -30 а не благоприятствует доставке направляющей нити, которая не является оптимальной. Кроме того, клонирование в miR-E с использованием олигонуклеотидов, более длинных, чем 100 нт, является дорогостоящим и отнимающим много времени (Watanabe et al. (2016) RNA Biology 13 (1): 25-33).

amiРНК, обозначаемая miR-16-2 (см. например, Watanabe et al. (2016) RNA Biology 13 (1): 25-33, см. фиг.1), представляет собой альтернативу третьего поколения (3G) amiРНК; она экспрессируется в нескольких тканях, является естественно асимметричной (зрелая цепь получается исключительно из 5р или 3р части), и ее створовые и петлевые сегменты являются небольшими и жесткими, упрощая векторное клонирование. miR -3G получают клонированием фрагмента 175bp, содержащего нативный стержень и петлю miR-16-2, и фланкирующих 35 bps на каждой стороне стебля, в вектор. miR -3G включает дополнительную модификацию miR-16-2 путем введения сайтов клонирования, таких как MluI и EcoRI, в 5- и 3р-фланкирующие последовательности, соответственно, и полностью спаривание оснований направляющего (антисмыслового) и пассажирского (смыслового) стержня, за исключением ошибочного спаривания в положении 1 относительно направляющей цепи. Сайты рестрикции позволяют генерировать новые нацеливающие конструкции через 88-мерные дуплексированные ДНК-олигонуклеотиды, не ставя под угрозу предсказанную вторичную структуру ДНК miR-16-2 и фланкирующих элементов. Кроме того, одно из двух звеньев CNNC и GHG (небольшие усилители процессинга РНК) модифицируются в 3р-фланкирующей последовательности miR-16-2. siРНК, нацеленные на ген (ы), затем обмениваются с первыми 21 нуклеотидами зрелых 5р-направляющих и 3р-пассажирских последовательностей. Исследования показали, что miR-E и miR -3G были одинаково сильными. miR -3G обеспечивает привлекательную систему РНКi из-за меньшего размера его экспрессионной кассеты (-175 nts против-375 для miR-E), и упрощенный и экономически эффективный одностадийный способ клонирования для его получения. Как и в случае shРНК, бактерии могут быть использованы в качестве векторов для доставки *in vivo* microРНК. Например, было показано, что ослабленный *S Typhimurium* может использоваться в качестве вектора для оральной доставки плазмид, экспрессирующих miРНК против CCL22 у мышей, своспалением. Негативная регуляция экспрессии гена CCL22 этим способом была успешной как *in vitro*, так и *in vivo* на мышинных моделях атопического дерматита (Yoon et al (2012) DNA And Cell Biology 31 (3):

289-296). Для целей настоящего изобретения miРНК 16-2 может быть использована для получения miРНК, которые должны быть использованы вместо shРНК. Последовательности для shРНК могут быть использованы для конструирования miРНК.

Кодирование РНКi ДНК для нарушения и/или ингибирования и/или нацеливания на любой из выбранных генов-мишеней, таких как любой иммунная контрольная точка, описанный в настоящем или известный для специалиста, вставляется в microРНК, например, в microРНК, показанную в SE-ID NO:249, и ниже. Любая подходящая microРНК, известная специалисту, может быть использована; как правило, они основаны на естественной microРНК и модифицируются для экспрессии РНК.

Примеры основаны на miR-16-2 (SEQIDNO:248). Последовательность модифицированной microРНК выглядит так:

5'-

CCGGATCAACGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCGTATCCGTCNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGTGAAATATATATTAACNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNNNNTACGGTAACGCGGAATTCGCAACSTATTTTATCAATTTTTTGCGTGAC-3'
 (SEQIDNO:249), где N представляют комплементарные, как правило, 18-26, такие как 19-24, 19-22, 19-20, базовая пара длинных смысловых и антисмысловых нуклеотидных последовательностей, которые нацелены на ген, чтобы выключить его, и вставляются до и после петли microРНК. РНК, такие как ARI-205 (SECID NO:214) и ARI-206 (SE-ID NO:215) являются образцами конструкций, основанными на microРНК на основе SE ID NO:249, которые кодируют пары гомологичных последовательностей оснований 21 и 22 соответственно. ARI-207 (SEQ ID NO:216) и ARI-208 (SEQ ID NO 217) являются образцами конструкций, основанными на microРНК основе SEQ ID NO:249, которые кодируют 19 базовых парных гомологичных последовательностей. Другим примером является конструкция, обозначенная ARI-201, которая является microРНК ARI-205, в котором N заменяются на последовательности нуклеотидов мыши PD-L1.

Специалист легко может построить microРНК для включения в плазмиды, как описано и указано в примерах здесь с использованием miR-16-2.

4. Начало репликации и число копии плазмиды

Плазмиды представляют собой автономно реплицирующиеся внехромосомные двухцепочечные молекулы ДНК, которые сохраняются в бактериях с помощью сайта инициации репликации. Число копий влияет на

стабильность плазмиды. Высокое число копий обычно приводит к большей стабильности плазмиды, когда случайное разделение происходит при делении клеток. Большое число плазмид обычно снижает скорость роста, что, возможно, позволяет клеткам с несколькими плазмидами доминировать в культуре, поскольку они растут быстрее. Начало репликации также определяет совместимость плазмиды: ее способность реплицироваться в сочетании с другой плазмидой в той же бактериальной клетке. Плазмиды, которые используют одну и ту же репликационную систему, не могут сосуществовать в одной и той же бактериальной клетке. Говорят, что они принадлежат к одной и той же группе совместимости. Введение нового начала в виде второй плазмиды из одной и той же группы совместимости имитирует результат репликации резидентной плазмиды. Таким образом, предотвращается любая дальнейшая репликация до тех пор, пока две плазмиды не будут разделены на различные клетки для создания правильного числа копий перед репликацией.

Начало репликации	Число копий	SEQ ID NO.
pMB1	15-20	254
p15A	10-12	255
pSC101	~5	256
pBR322	15-20	243
ColE1	15-20	257
pPS10	15-20	258
RK2	~5	259
R6K (альфа начало)	15-20	260
R6K (бета начало)	15-20	261
R6K (гамма начало)	15-20	262
P1 (oriR)	Low	263
R1	Low	264
pWSK	Low	265
ColE2	10-15	266
pUC (pMB1)	500-700	267
F1	300-500	268

Многочисленные бактериальные источники (начала) репликации известны специалистам в данной области техники. Начало может быть выбрано таким образом, чтобы получить

желаемое число копий. Начало репликации содержит последовательности, которые распознаются в качестве сайтов инициации репликации плазмиды посредством ДНК-зависимых ДНК-полимераз (Solareta. (1998) *MicrobiologyAndMolecularBiologyReviews* 62 (2): 434-464). Различные начала репликации обеспечивают изменение уровней числа копий плазмиды в каждой клетке и могут находиться в пределах от 1 до сотен копий на клетку. Обычно используемые бактериальные плазмидные начала репликации включают в себя, но не ограничиваются ими, производные, происходящие из pMB1, которые имеют очень высокие числа копий, ColE1, p15A, psc101, pBR322 и другие, которые имеют низкие числа копий. Такие начала хорошо известны специалистам в данной области техники. Начало pUC19 приводит к числу копий 500-700 копий на клетку. Начало pBR322 имеет известное число копий 15. Эти начала отличаются только одной парой оснований. Число копий для ColE1 равно 15-20, и производные, такие как pBluescript, имеют числа копий в пределах 300-500. Начало p15A, которое находится в pACYC184, например, приводит к числу копий приблизительно 10. pSC101 имеет номер копий приблизительно 5. Другие векторы с низким числом копий, из которых могут быть получены начала, включают, например, pWSK29, pWKS30, pWKS129 и pWKS130 (см. Wang et al. (1991) *Gene* 100: 195-199). Среднее число копий составляет менее 150, или менее 100. Низкое число копий составляет менее 20, 25 или 30. Специалисты в данной области техники могут идентифицировать плазмиды с низким или высоким числом копий. Плаزمида с высоким числом копий должна давать 3-5 мкг ДНК на 1 мл культуры LB; плазмида с низким числом копий будет давать от 0,2 до 1 мкг ДНК на мл культуры LB.

Последовательности бактериальных плазмид, включая идентификацию и последовательность начала репликации, хорошо известны (см. например snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/).

Плазмиды с высоким числом копий выбираются для гетерологичной экспрессии белков *in vitro*, поскольку доза гена увеличивается по отношению к хромосомным генам и более высоким удельным выходам белка, а для терапевтических бактерий к более высоким терапевтическим дозам кодированных терапевтических средств. Однако здесь показано, однако, что для доставки плазмид, кодирующих РНК-интерференцию (RNAi), таких как *S typhimurium*, как описано здесь, будет очевидно, что плазмиды с высоким числом копий будут идеально подходящей, терапевтически, более низкое число копий является более эффективным.

Требование к бактериям поддерживать плазмиды с высоким числом копий может представлять собой проблему, если экспрессированная молекула является токсичной для

организма. Метаболические требования для поддержания этих плазмид могут происходить из стоимостирепликативной пригодности *in vivo*. Оптимальное число копий плазмиды для доставки интерферирующих РНК может зависеть от механизма ослабления штамма, созданного для доставки плазмиды. Если это необходимо, специалист в свете данного описания может выбрать подходящее число копий для конкретного иммуностимулирующего вида и штамма бактерий. Здесь показано, что низкое число копий может быть полезным.

5. Звенья CpG и островки CpG

Неметилированные цитидин-фосфат-гуанозиновые (CpG) звенья преобладают в бактериальной, но не геномной ДНК. Патогенная ДНК и синтетические олигодезоксинуклеотиды (ODN), содержащие звенья CpG, активируют механизмы защиты хозяина, приводящие к врожденным и приобретенным иммунным ответам. Неметилированные звенья CpG содержат центральный неметилированный динуклеотид CG плюс фланкирующие области. У человека были идентифицированы четыре различных класса CpG ODN на основании различий в структуре и природы иммунного ответа, которые они индуцируют. К-типа ODN (также называемые В-типом) содержат от 1 до 5 звеньев CpG обычно на фосфоротиоатной основной цепи. D-типа ODN (также обозначаемые как А-тип) имеют смешанные фосфодизэфирные/фосфоротиоатные остовы и имеют однозвено CpG, фланкированные палиндродными последовательностями, которые позволяют получить структуру с петельками, а также поли-G-звенья на 3'- и 5'- концах. С-типа ODN имеют фосфоротиоатный остов и содержат множественные звенья CpG, которые могут образовывать структуры или димеры. CpGp-класса ODN имеют фосфоротиоатный каркас и содержат несколько звеньев CpG (Scheiermann and Klinman (2014) *Vaccine* 32 (48): 6377-6389). Для целей настоящего изобретения CpG кодируются в плазмидной ДНК; они могут быть введены в виде звеньев или в гене.

Toll-подобные рецепторы (TLR) являются ключевыми рецепторами для определения связанных с патогенами молекулярных структур (PAMP) и активации врожденного иммунитета против патогенов (Akira et al. (2001) *Nat. Immunol.* 2 (8): 675-680). TLR9 распознает гипометилированные звенья CpG в ДНК прокариот, которые не встречаются в природе в ДНК млекопитающих (McKelvey et al. (2011) *J Autoimmunity* 36: 76-86). Распознавание звеньев CpG при фагоцитозе патогенов в эндосомах в подмножествах иммунных клеток индуцирует активацию I-интерферона независимого от IRF7 типа I и активирует врожденный и адаптивный иммунитет.

Иммуностимулирующие бактерии, такие как виды *Salmonella*, такие как штаммы *S. Typhimurium*, несущие плазмиды, содержащие CpG-островки, представлены в настоящем описании. Эти бактерии могут активировать TLR9 и индуцируют опосредованный IFN врожденный и адаптивный иммунитет. Как показано в данном описании, бактериальные плазмиды, которые содержат гипметилированные островки CpG, могут вызывать врожденные и адаптивные противоопухолевые иммунные ответы, которые в комбинации с РНК, кодированными в плазмиде, такие как РНК, мишенью которых являются иммунные контрольные точки, такие как shРНК или miRNA, мишенью которых является TREX1, и, следовательно, например, активация пути, опосредованная TREX1, может иметь синергическую или повышенную противоопухолевую активность. Например, ген *asd* (SEQ ID NO: 48) кодирует высокую частоту гипометилированных островков CpG. Звенья CpG могут быть включены в комбинации с любыми из РНК, описанными или очевидными из описания здесь в иммуностимулирующих бактериях, и, таким образом, усиливают или улучшают противоопухолевые иммунные ответы у пациента.

Иммуностимулирующие CpG могут быть включены в плазмиды, включая нуклеиновую кислоту, обычно из бактериального гена, который кодирует генный продукт, а также путем добавления нуклеиновой кислоты, которая кодирует звенья CpG. Описанные здесь плазмиды могут включать звенья CpG. Типичные звенья CpG известны (см. например, патенты США 8232259, 8426375 и 8241844). Они включают, например, синтетические иммуностимулирующие олигонуклеотиды, от 10 до 100, 10 и 20, 10 и 30, 10 и 40, 10 и 50, 10 и 75, основные пары оснований, имеющие общую формулу: (CpG) $_n$, где n представляет собой число повторов.

Обычно используют, по меньшей мере, один или два повтора; не-CG основания могут быть внедрены. Специалисты в данной области хорошо знакомы с общим использованием звеньев CpG для индукции иммунного ответа путем модулирования TLR, в частности TLR9.

6. Компоненты поддержания/селекции плазмиды

Поддержание плазмид в лабораторных условиях обычно обеспечивается включением гена устойчивости к антибиотику на плазмиду и применения антибиотиков в ростовой среде. Как описано выше, применение делеционного мутанта *asd*, дополненного функциональным геном *asd* на плазмиде, позволяет осуществлять отбор плазмиды *in vitro* без применения антибиотиков и позволяет поддерживать плазмиду *in vivo*. Система комплементации гена *asd* обеспечивает такой выбор/поддержание (Galanetal(1990) Gene

28: 29-35). Применение системы комплементации гена *asd* для поддержания плазмид в микроокружении опухоли увеличивает активность *S typhimurium* и других иммуностимулирующих бактериальных штаммов, сконструированных для доставки плазмид, кодирующих терапевтические продукты, такие как иммуностимулирующие белки, антитела, фрагменты антител или интерферирующие РНК.

7. Промоторы РНК-Полимеразы

Плазмиды, представленные здесь, предназначены для кодирования интерферирующих РНК, нацеленных на иммунные контрольные точки и другие мишени, как описано выше. Кассета экспрессии РНК содержит промотор для транскрипции в клетках человека, таких как промотор H1 или промотор U6, или промотор CMV. U6 и H1 представляют собой промоторы РНК-Полимеразы III (RNAP III), которые предназначены для получения и обработки небольших РНК. Промотор CMV распознается РНК-полимеразой II и более подходит для экспрессии длинных РНК-Участков, чем RNAP III. Промотор предшествует мешающей РНК, такой как shРНК, siРНК или miРНК, как описано выше.

В эукариотических клетках ДНК транскрибируется тремя типами РНК-полимераз; РНК Pol I, II и III. РНК Pol I транскрибирует только рибосомные РНК (rРНК) гены, РНК Pol II транскрибирует ДНК в mРНК и небольшие ядерные РНК (snRNA), а РНК Pol III транскрибирует ДНК в рибосомную 5S rРНК (тип I), передающую РНК (tРНК) (тип II) и другие малые РНК, такие как U6 snРНК (тип III). shРНК, как правило, транскрибируются *in vivo* под контролем промоторов Pol III РНК-Pol III эукариотического типа, таких как промотор U6 человека, который транскрибирует ncРНК-компонент РНК U6, и промотор H1 человека, который транскрибирует РНК-компонент РНК рнказыР. U6 и H1, являются более подходящими, чем другие промоторы Pol III Или Pol II, поскольку они структурно просты, с хорошо определенным сайтом инициации транскрипции, и естественным образом активируют транскрипцию малых РНК. U6 и H1 промоторы не несут последовательности, необходимые для транскрипции от сайта инициации транскрипции (Makinenetal. (2006) J GeneMed. 8: 433-441). Таким образом, они являются наиболее прямыми промоторами для использования в экспрессии shРНК.

Применение других промоторов, таких как промоторы тРНК типа II pol III, в то же время успешно экспрессируя shRNA, приводит к получению более длинных транскриптов dsРНК, которые могут индуцировать ответ на интерферон. Промоторы РНК pol II, такие как промотор цитомегаловируса человека (CMV) также можно использовать (патенты США № 8202846 и 8383599), но более часто используют для экспрессии длинных молекул РНК. Исследования показали, что добавление усилителя промотора CMV с промотором U6 может увеличить его активность, увеличить синтез shРНК и улучшить неактивность гена (XiaEtAl. (2003) *Nucleic Acids Res* 3 L (17): e100; Nie et al. (2010) *Genomics Proteomics Bioinformatics* 8 (3): 170-179). Промоторов РНК pol II обычно избегают в транскрипции shРНК из-за образования цитоплазматической ДНК, что приводит к провоспалительному ответу на интерферон. В этом случае опосредованный цитоплазматической ДНК ответ на интерферон у *S typhimurium*-инфицированных опухолевых клеток имеет противоопухолевое действие, особенно в контексте ингибирования TREX1, как описано здесь. Прокариотические промоторы, включая промоторы T7, pBAD и перТ, могут быть использованы, когда происходит транскрипция в бактериальной клетке (GuoetAl. (2011) *Genetherapy* 18: 95-105; публикация США № 2012/0009153, 2016/0369282, международные публикации заявок WO 2015/032165, WO 2016/025582).

Промоторы РНК pol III обычно используют для конститутивной экспрессии shРНК. Для индуцибельной экспрессии используют промоторы РНК pol II. Примеры включают промотор pBAD, который является индуцируемым L-Арабинозой; индуцируемые тетрациклином промоторы, такие как TRE-tight, IPT, TRE-CMV, Tet-ON и Tet-OFF; ретровирусный LTR; IPTG-индуцируемые промоторы, такие как LacI, Lac-O-зависимые промоторы; промоторы LoxP-Stop-LoxP (патент США n. 8426675, публикация WO 2016/025582); и перТ, который представляет собой индуцируемый гипоксией промотор. (Yu et al. (2012) *Scientific Reports* 2: 436). Эти промоторы хорошо известны. Примерами таких промоторов являются U6 человека (SEQ ID NO: 73) и H1 человека (SEQ ID NO: 74).

SEQ ID NO.	Наименование	Последовательность
73	человеческий U6 РНК pol III промотор	aaggctcgggcaggaagagggcc 721 tatttcccatgattccttcatttgcataacgatacaaggctgtagagagataatta 781

SEQ ID NO.	Наименование	Последовательность
		gaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaat 841 aatttcttgggtagttgcagtttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgctta 901 ccgtaacttgaaagtatttcgatttcttgctttatatacttgaggaaaggacgaaact 961 ag
74	Человеческий H1 РНКроIIIIпромотер	atattgcatgctgctatg 721 tgttctgggaaatcaccataaacgtgaaatgtctttggattgggaatctataagttct 781 gtatgagaccactccctagg

Тканеспецифичные промоторы включают промотор TRP2 для клеток меланомы и меланоцитов; промотор MMTV или промотор WAP для клеток рака молочной железы и молочной железы, промотор villain или промотор FABP для клеток кишечника, промотор RIP для бета-клеток поджелудочной железы, промотор кератина для кератиноцитов, промотор Probasin для эпителия простаты, Промотор Nestin или промотор GFAP для клеток/раковых клеток CNS, промотор тирозингидроксилазы S100 или промотор нейронитей для нейронов, промотор секреторного белка clagad для рака легких и промотор альфа миозина для клеток сердца (патент США 8426675).

8. Последовательности, направленные на ДНК

Последовательности для ДНК-мишени (DTS), такие как SV40-DTS, опосредуют транслокацию последовательностей ДНК через пористый комплекс. Сообщалось, что механизм этого транспорта зависит от связывания ДНК-связывающих белков, которые содержат последовательности ядерной локализации. Было продемонстрировано включение DTS-метки на плазмиду для увеличения переноса ядер и экспрессии (Dean, DA et al. (1999) ExpCellRes 253 (2): 713-722), и это использовали для увеличения экспрессии гена из плазмид, доставляемых *S typhimurium* (Kongetal. (2012) ProcNatlAcadSci USA 109 (47): 19414-19419).

Терминаторы транскрипции Rho-независимого или класса I, такие как терминатор T1 транскрипции гена *glnV* *E. coli*, содержат последовательности ДНК, которые образуют вторичные структуры, которые вызывают диссоциацию комплекса удлинения транскрипции.

Терминаторы транскрипции должны быть включены в плазмиду для предотвращения экспрессии интерферирующих РНК с помощью транскрипционного механизма *S. typhimurium*. Это гарантирует, что экспрессия кодируемой интерферирующей РНК, такой как shРНК, microРНК и siRNA, ограничена транскрипционным механизмом хозяина-хозяина.

Плазмиды, используемые для трансформации *Salmonella*, таких как *S. typhimurium*, в качестве раковой терапии, описанной здесь, содержат все или некоторые из следующих признаков: 1) *CrG*-остров, 2) бактериальный сайт инициации репликации, 3) селективируемый маркер гена *asd* для поддержания плазмиды, 4) один или более человеческих интерферирующих каскадов экспрессии РНК, 5) направляющая последовательность ДНК и 6) терминаторы транскрипции.

9. CRISPR

Иммуностимулирующая бактерия, кодирующая каскад CRISPR, может быть использована для инфицирования человеческих иммунных, миелоидных или гемопоэтических клеток для того, чтобы сайт-специфически отключить интересующий целевой ген. Используемый штамм может быть *asd* и может содержать плазмиду, в которой отсутствует комплементарная каскад *asd* и содержит каскад *kan*. Для выращивания штамма *in vitro* в жидкой среде добавляют DAP, чтобы дополнить генетический дефицит *asd*. После инфицирования клеток человека штамм не может более реплицироваться, и плазида, кодирующая CRISPR, доставляется. Штамм также может представлять собой *hilA* или не содержать одну или более частей SPI-1, или не содержать флагеллина, или характеризоваться любой их комбинацией, что снижает или предотвращает пироптоз (опосредованную воспалением гибель клеток) фагоцитных клеток.

G. Нацеливающие на опухоль иммуностимулирующие бактерии, содержащие РНКi против примеров генов иммунной мишени для стимуляции противоопухолевого иммунитета

РНКi против любой иммунной мишени может быть кодирован в плаزمиде. Они включают, но не ограничиваются ими, любые, описанные в данном описании, и любые известные специалистам в данной области техники. Последующее обсуждение охватывает примерные целевые объекты. Плазмиды могут содержать любую РНК против таких мишеней, включая, но не ограничиваясь ими, shРНК, siRNA и microРНК.

1. TREX1

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения иммуностимулирующие бактерии кодируют ингибиторную РНК, такую как shРНК, которая ингибирует или нарушает или подавляет экспрессию TREX1. Ферментативный продукт, кодируемый TREX1, расположенный выше по отношению к cGAS, является медиатором пути интерферона типа I. TREX1 кодирует основную 3'- ДНК-экзонуклеазу в клетках млекопитающих (также называемую ДНКазой III). Белки TREX1 человека каталитически эффективны в качестве бактериальных экзонуклеаз (MazurAndPerrino (2001) J Biol. Chem 276: 17022-17029). В настоящем описании также рассматриваются иммуностимулирующие бактерии, которые ингибируют экспрессию TREX1 посредством процессов, отличных от РНК-сайленсинга.

Для иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем описании, таких как те, которые экспрессируют shРНК против TREX1, потеря активности TREX1 и последующая активация связанного с cGAS/STING разрушением сосудов усиливает колонизацию опухоли *Styphimurium*. Ген TREX1 кодирует белок, который имеет длину 314 аминокислот (Mazur et al. (2001) J.Biol.Chem 276: 17022-17029), существует в виде гомодимера и лишен эндонуклеазной активности. TREX1 находится среди нескольких белков, вовлеченных в репарацию ДНК, которая повреждается экзогенным генотоксическим воздействием, включая УФ-облучение и поражающие ДНК соединения. TREX1 может функционировать как экзонуклеаза редактирования для ДНК Polбета путем вырезания неспаренных нуклеотидов с 3'- конца (Mazur et al. (2001) J Biol. Chem 276: 17022-17029). ssДНК разрушается в 3-4 раза более эффективно, чем dsДНК (Lindahletal.

(2009) *Biochem. Soc. Trans* 37 (Pt 3), 535-538). Мутации в остатках D18 И D200, часто связанные с аутоиммунными заболеваниями, блокируют фермент TREX1 от разрушения dsДНК и снижают его способность разрушать ssDNA. Фермент TREX1 трансформируется из эндоплазматического ретикулума в ядро после повреждения ДНК, свидетельствуя о его вовлечении в репликацию поврежденной ДНК. Активация промотора и положительная регуляция TREX1 наблюдались в результате воздействия UVC в мышинных фибробластах, и мышинные клетки TREX1 демонстрировали гиперчувствительность к УФ-свету (Tomicic et al. (2013) *Bioch. Biophys. Acta* 7533: 1832-1843).

Мутации, приводящие к потере TREX1, были идентифицированы у пациентов с наследственным редким заболеванием, синдромом Aicardi-Goutieres (AGS), который имеет фенотипическое перекрытие с аутоиммунным заболеванием системной красной волчанки (SLE) (Aicardi and Goutieres, (2000) *Neuropediatrics* 31 (3): 113). Мутации в TREX1 также связаны с васкулопатией сетчатки с церебральной лейкодистрофией. Опосредованные TREX1 аутоиммунные заболевания связаны с неспособностью клеток предотвращать аутоиммунитет посредством распада ssДНК и dsДНК, которые накапливаются в цитоплазме. Мыши без TREX1 страдают от воспалительного миокардита, что приводит к нарушению кровообращения, вызванному продуцированием хронического цитокина (Morita et al. (2004) *Mol Cell Biol* 24 (15): 6719-6727; Yang et al. (2007) *Cell* 131 (5): 873-886; Tomicic et al. (2013) *Bioch. Biophys Acta* 1833 (8): 1832-1843). Следовательно, дефицит TREX1 индуцирует врожденный иммунитет после цитоплазматического накопления ДНК, что приводит к воспалительной реакции (Wang et al. (2009) *DNA Repair (Amst)* 8: 1179-1189). Было обнаружено, что источником ДНК, которая накапливается в цитозоле клеток, дефицитных по TREX1, является часть, полученная из эндогенных ретрозлементов, которые удаляются из поврежденного ядра, поскольку известно, что Trex1 метаболизирует обратно-транскрибируемую (RT) ДНК (Stetson et al. (2008) *Cell* 134 (4): 587-598). При ВИЧ-инфекции RT-ДНК накапливается в цитозоле инфицированных Т-клеток и макрофагов и обычно запускает активацию антивирусного иммунитета. TREX1 расщепляет эту вирусную ДНК и допускает иммунный выход ВИЧ (Yang et al. (2010) *Nat. Immunol.* 11 (11): 1005-1013). Таким образом, TREX1 действует как негативный регулятор STING и может использоваться для выявления обнаружения несколькими ретровирусами, такими как вирус лейкемии мышей (MLV), вирус иммунодефицита обезьян (SIV) и многих других (Hasan et al. (2014) *Front. Microbiol.* 5: 193).

Подобным образом, как и STING, TREX1 экспрессируется в большинстве типов клеток млекопитающих, с ключевыми продуцентами цитокинов в не имеющих TREX1 мышцах, происходящих из макрофагов и дендритных клеток (AhnetAl. (2014) *J Immunol.* 193 (9): 4634-4642). Данные показывают, что TREX1 ответственен за распад self-ДНК, которая может вытекать из поврежденного ядра в цитозоль, где она в противном случае может связывать и активировать cGAS и привести к аутоиммунитету (Barber (2015) *Nat. Rev. Immunol.* 15 (12): 760-770). В поддержку этого не содержащие TREX1 мыши и клетки с дефицитом TREX1, которые также не имеют cGAS, полностью защищены от активации интерферона типа I и летального аутоиммунитета (AblasseretAl. (2014) *J Immunol.* 192 (12): 5993-5997; Grayetal. (2015) *J Immunol.* 195 (5): 1939-1943). В отрицательной петле обратной связи интерферон типа I и Ifn γ типа II также могут индуцировать TREX1, и TREX1, таким образом, служит для ограничения aberrантной аутоиммунной активации (Tomicicetal. (2013) *Bioch. Biophys. Acta* 7533: 1832-1843).

Было обнаружено, что лимфоциты, происходящие от пациента с синдромом Ацарди-Гутитерала, содержащие мутированный TREX1, ингибируют ангиогенез и рост нейробластомных клеток, причем этот эффект усиливается присутствием IFN-альфа (Pullieroetal. (2012) *OncologyReports* 27: 1689-1694). Было показано, что применение microРНК-103 ингибирует экспрессию TREX1, нарушающую репарацию и ангиогенез ДНК, в результате снижается рост опухоли *in vivo* (см. публикацию США №2014 /0127284, ChereshEtal.).

TREX1 является отрицательным регулятором активации макрофагов и провоспалительной функцией. Было обнаружено, что макрофаги без TREX1 демонстрируют повышенное продуцирование TNF- α и IFN- α , более высокие уровни CD86 и повышенное предоставление антигена Т-клеткам, а также пониженный клиренс апоптотических т-клеток (Pereira-Lopesetal. (2013) *J Immunol.* 797: 6128-6135). Неспособность адекватно переваривать апоптотическую ДНК в макрофагах без TREX1 генерирует большие количества aberrантной цитозольной ДНК, которая связывается с cGAS и активирует путь синтеза STING для получения более высоких уровней интерферона типа I (Ahnetal. (2014) *J Immunol.* 793: 4634-4642). Не все типы клеток чувствительны к иммуностимулирующим эффектам выключения TREX1, однако. В исследовании отдельных типов клеток было обнаружено, что дендритные клетки, макрофаги, фибробласты и кератиноциты продуцируют IFN типа I при выключении TREX1, в то время как В-клетки, кардиомиоциты, нейроны и астроциты - нет (Peschkeetal. (2016) *J Immunol.* 197: 2157-2166). Таким образом, ингибирование функции TREX1 в

фагоцитных клетках, которые содержат *S Typhimurium*, будет усиливать их провоспалительную активность, в то же время вызывая накопление цитозольной ДНК из фагоцитозированных опухолевых клеток, которые затем могут активировать путь cGAS/STING. Применение microPНК-103 ингибирует экспрессию TREX1, нарушающую репарацию и ангиогенез ДНК, и приводит к уменьшению роста опухоли *in vivo* (см. публикацию США № 2014/0127284, Chereshtal.).

Исследования показали, что экспрессия cGAS и/или STING ингибируется по сравнению с раком прямой кишки, в то время как экспрессия STING утрачивается во многих первичных и метастатических меланомах и HPV + злокачественных опухолях. STING остается незатронутой во всех находящихся в опухолях APC, которые непрерывно отбирают антигенную среду TME, включая Batf3/CD103/CD8альфа + DC, которые сшивают опухолевые антигены с CD8 + Т-клетками, и эти APC также легко фагоцитируют *S. typhimurium* или активированы IFN типа I из соседних макрофагов, которые имеют фагоцитозированную *S typhimurium*, содержащую отключенный ген TREX1.

Инактивация TREX1 усиливает иммунный ответ, обеспечивая цитозольное накопление dsДНК для связывания с ферментом, циклическим GMP-AMP (cGAMP) синтазой (cGAS), цитозольным ДНК-датчиком, который запускает продукцию интерферонов типа I и других цитокинов посредством активации пути передачи сигналов STING (Sun et al. (2013) Science 339 (6121): 786-7911; Wu et al. (2013) Science 339 (6121): 826-830). Было показано, что активация пути STING индуцирует мощный врожденный и адаптивный противоопухолевый иммунитет (Corrales et al. (2015) Cell Reports 77: 1018-1030).

Таким образом, варианты осуществления иммуностимулирующих бактериальных штаммов, в соответствии с настоящим изобретением, вводят для ингибирования TREX1 в находящихся в опухоли APC, ионы индуцируют активацию cGAS/STING, тем самым активируя эти DC для сшивания опухолевых антигенов хозяина с CD8 + Т-клетками и индуцируя локальную и системную регрессию опухоли и долговременный противоопухолевый иммунитет (Corrales et al. (2015) Cell Reports 77: 1018-1030; Zitvogel et al. (2015) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 7 (5): 393-405)

Имуностимулирующие бактерии, представленные здесь, экспрессируют PНК против TREX1, и потеря TREX1 и последующая активация связанного с cGAS/STING разрушения сосудов усиливают колонизацию опухоли *S typhimurium*.

2. PD-L1

Запрограммированный белок клеточной гибели 1 (PD -1) представляет собой иммуноингибирующий рецептор, который участвует в отрицательной регуляции иммунных ответов. Его родственник лиганд, лиганд-лиганд 1 (PD-L1), экспрессируется на APC при связывании с PD -1 с Т-клетками приводит к потере эффекторной функции CD8 + Т-клеток, индуцируя Т-клеточную толерантность. Экспрессия PD-1 часто связана с агрессивностью опухоли и снижением выживания в некоторых злокачественных опухолях человека (Gao et al. (2009) Clin. Cancer Res 15 (3): 971-979).

Антитела, сконструированные таким образом, чтобы блокировать иммунные контрольные точки, такие как анти-PD-L1 (например, пербролизумаб, авелумаб, дурвалумаб) и анти-PD-1 (например, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб), успешно предотвращают разрушение иммунной толерантности. Только для части обработанных пациентов была обнаружена польза. (Ribas (2015) N.Engl. J Med. 373 (16): 1490-1492; Topalian et al. (2012) N.Engl. J Med 366 (26): 2443-54). Наряду с приобретением токсичности, терапия PD -1/PD-L1 часто приводит к резистентности, и сопутствующее применение антител против CTLA -4 (например, ипилимумаба) показало ограниченный успех в клинических испытаниях с существенной дополнительной токсичностью. Для ограничения токсичности и усиления активности блокады PD-L1, иммуностимулирующие бактерии с shRNA до PD-L1, как описано здесь, будут проявлять синергизм с активацией TLR иммунных клеток как для активации, так и для усиления противоопухолевого иммунитета.

3. VISTA

Другие избыточные контрольные точки в иммунной активации могут синергически действовать с PD -1/PD-L1 и CTLA -4, такие как V-домен (Ig)-супрессор активации Т-клеток (VISTA). VISTA экспрессируется, главным образом, на APC, в частности на инфильтрирующих опухоль миелоидных клетках и клетках-супрессорах, полученных из миелоидных клеток (MDSC), и в меньшей степени на регуляторных Т-клетках (CD4 + Foxp3 + Tregs) (Wang et al. (2011) J Exp Med. 208 (3): 577-592). Подобно PD-L1, позитивная регуляция VISTA непосредственно подавляет пролиферацию Т-клеток и цитотоксическую функцию (Liu et al. (2015) PNAS 112 (21): 6682-6687). Было показано, что моноклональное антитело, направленное на VISTA, удаляет микроокружение опухоли у мышей, увеличивая активацию APC и усиливая противоопухолевый иммунитет (LeMercier et al. (2014) Cancer Res. 74 (7): 1933-1944). Клинически, было показано, что экспрессия VISTA повышалась на находящихся в опухоли макрофагах после лечения с

помощью терапии анти-CTLA -4 при раке простаты, демонстрируя компенсаторную регуляцию иммунных контрольных точек (Gaoetal. (2017) Nat. Med. 23 (5): 551-555). Большая часть экспрессии VISTA не должна быть расположена во внутриклеточном компартменте миелоидных клеток, а не на поверхности, что может ограничить эффективность подхода моноклональных антител (Dengetal. (2016) Immunother. Cancer 4: 86). Способность ингибировать VISTA с использованием нацеленных на опухоль бактерий, содержащих shРНК к VISTA, как описано здесь, будет более эффективно и полностью ингибировать функцию подавления Т-клеток VISTA, приводящую к активации Т-клеточного иммунитета против опухоли и регрессии опухоли.

4. SIRP α

Одним из механизмов, с помощью которых избегают удаления опухолевых клеток, является предотвращение их фагоцитоза врожденными иммунными клетками. Фагоцитоз ингибируется поверхностной экспрессией CD47, которая широко экспрессируется на гемопозитических и негемопозитических клетках (Liuetal. (2015) PLoS ONE 10 (9): e0137345). После связывания CD47 его рецептора инициируется ингибирующий сигнал для фагоцитоза. SIRP α экспрессируется в большом количестве на фагоцитных клетках, включая макрофаги, гранулоциты и DC. По существу, взаимодействие белок-белок между CD47 и SIRP α представляет собой другой класс иммунных контрольных точек, уникальных для APC, и находящихся в опухоли макрофагов, в частности. Эффективность CD47 при предотвращении фагоцитоза доказывается тем фактом, что она часто повышается в широком разнообразии опухолей, что позволяет избежать фагоцитоза APC в микросреде опухоли (Liuetal(2015) Nat. Med. 21 (10): 1209-1215). Было исследовано несколько способов блокирования взаимодействия CD47/SIRP α , включая разработку антител против CD47 или анти-SIRP α или фрагментов антител, применение небольших пептидов, которые связываются либо с белком, либо с подавителем экспрессии CD47 (патентная Публикация США № 2013/0142786, 2014/0242095; международная патентная публикация WO 2015/191861; McCrackenEtal. (2015) Clin. CancerRes 21 (16): 3597-3601).

Взаимодействие CD47/SIRP α также служит для сохранения долговечности красных кровяных клеток путем предотвращения их фагоцитарной элиминации (Murataetal. (2014) J Biochem 155 (6): 335-344). Таким образом, системные способы лечения, такие как антитела против CD47, которые в широком смысле нарушают такое взаимодействие, привели к токсичности анемии (HuangetAl. (2017). J.Thorac. Dis. 9 (2): E168-E174). Системная терапия на основе SIRP α также снижает риск

неблагоприятных событий, таких как повреждение органа путем создания системных гиперфагоцитных самопоглощающих макрофагов. Использование иммуностимулирующих бактерий, содержащих shRNA-SIRPальфа, таких как приведенные здесь, будет локализовать разрушение CD47/SIRPальфа в микроокружении опухоли и исключать эти неблагоприятные события. Кроме того, ингибирование SIRPальфа в контексте бактериальной активации опосредуемых TLR провоспалительных путей передачи сигналов будет сильно активировать эти макрофаги, чтобы стать гиперфагоцитарными по отношению к соседним опухолевым клеткам (Bianetal. (2016) PNAS. 113 (37): E5434-E5443).

5. β -катенин

Пути иммунной контрольной точки показывают примеры множественных уровней регуляции, которые существуют для предотвращения гиперактивации иммунной системы и аутоиммунитета, и трудности в применении этих путей для усиления противоопухолевого иммунитета. Один механизм по которому опухоли эволюционировали, чтобы быть резистентными к терапии контрольной точки, включает отсутствие инфильтрации Т-Клеток и дендритных клеток (DC), описано как не-Т-клеточно-воспаленные, или «холодные опухоли» (Sharmaetal. (2017) Cell 9; 168 (4): 707-723). Идентифицированы несколько механизмов, присущих опухолям, которые приводят к исключению противоопухолевых Т-Клеток и устойчивости к иммунотерапии. В меланоме, в частности, молекулярное профилирование опухолей контрольной точки выявило сигнатуру повышенного бета-катенина и его последующих генов-мишеней, коррелируя с отсутствием инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (Gajewskietal. (2011) Curr. Opin. Immunol. 23 (2): 286-292).

CTNNB1 представляет собой онкоген, который кодирует бета-катенин, и может индуцировать экспрессию генов c-Myc и циклин D1, что приводит к пролиферации опухоли. Мутации в CTNNB1 связаны с некоторыми злокачественными опухолями. Сайленсинг гена CTNNB1/бета-катенин с использованием векторов shRNA S Typhimurium можно использовать при лечении рака (Guoetal. (2011) Gene therapy 18: 95-105; Публикация США № 202015/0009153, 2016/0369282; международная публикация WO 2015/032165). Например, сайлесинг shRNA CTNNB1 с использованием штамма S typhimurium SL7207 в качестве вектора доставки, снижало пролиферацию и рост опухоли у мышей с ксенотрансплантатом SW480 при сравнении с контрольными клетками и снижало экспрессию C-Мусициклина D1 (Guo et al (2011) Gene therapy 18: 95-105).

Глушение (сайлесинг) CTNNB1 для лечения гепатобластомы также может быть достигнуто с использованием miРНК с или без применения антител против иммунных контрольных точек PD-1 PD-L1 (Публикация заявки WO 2017/005773). Применение siРНК или shРНК-мишени CTNNB1, доставляемых через альтернативные векторы, такие как липосомы, для лечения связанных с CTNNB1 видов рака, включая аденокарциномы и плоскоклеточные карциномы, также может иметь место (патентная публикация США № 2009/0111762, 2012/0294929).

Повышенные уровни β -катенина непосредственно ингибируют хемокин CCL4 из клеток CD103/CD8a + DC, тем самым предотвращая их инициирование опухолевыми антигенспецифичными CD8 + Т-клетками (Spranger *Et al.* (2015) *Nature* 523 (7559): 231-235). β -катенин является основным медиатором сигнального пути WNT, ключевым эмбриональным фактором развития, который также является критическим для регенерации взрослых тканей, гомеостаза и гематопоза (Clever *et al.* (2012) *Cell* 149 (6): 1192-1205). Избыточная передача WNT β -катенина участвует в различных видах рака (Tai *et al.* (2015) *Oncologist* 20 (10): 1189-1198). Соответственно, было разработано несколько стратегий для передачи WNT/ β -катенин, но успех был затруднен за счет отсутствия специфичности к микроокружению опухоли, что приводит к внецелевой токсичности для кишечных клеток, костного метаболизма и гематопоза (Kahn (2014) *Nat. Rev. Drug Dis.* 13 (7): 513-532). Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, преодолевают эти проблемы.

Например, преимущество использования иммуностимулирующих бактерий с shРНК к β -катенину, как описано здесь, заключается в усилении опосредованной хемокином инфильтрацией Т-клеток, и превращением холодной Опухоли в опухолевую среду, воспаленную Т-клетками, без системной токсичности существующих терапевтических воздействий. Кроме того, бактериальная активация путей врожденной иммунной сигнализации TLR синергизируется с ингибированием β -катенина для дальнейшей стимуляции иммунной активации и противоопухолевого иммунитета.

6. TGF- β

Трансформирующий фактор роста бета (TGF-бета) представляет собой плеiotропный цитокин с многочисленными ролями в эмбриогенезе, заживлении ран, ангиогенезе и иммунной регуляции. Он существует в трех изоформах в клетках

млекопитающих, TGF-бета1, TGF-бета 2 и TGF-бета 3; TGF-бета1 является наиболее преобладающим в иммунных клетках (Esebanmenet al. (2017) ImmunolRes 65: 987-994). Роль TGF-бета в качестве иммунодепрессанта является наиболее доминирующей функцией. Его активация из латентной формы в микроокружении опухоли, в частности, обладает сильным иммуносупрессивным действием на DC и их способностью к толиризовать антиген-специфические T-клетки. TGF-бета может также непосредственно преобразовывать Th1 CD4 + T-клетки в иммуносупрессивные Treg, способствуя развитию толерантности к опухоли (Travis et al. (2014) Annu Rev Immunol. 32: 51-82). На основе его опухолеспецифических иммуносупрессивных функций и независимо от его известных свойств, стимулирующих рост и метастазирование раковых клеток, ингибирование TGF-бета является целью раковой терапии. Высокая сигнальная активность TGF-бета была продемонстрирована в нескольких типах опухолей человека, включая CRC, HCC, PDAC и NSCLC (Colak et al. (2017) Trends in Cancer 3: 1). Системное ингибирование TGF-бета может приводить к неприемлемой аутоиммунной токсичности, и его ингибирование должно быть локализованным в микроокружении опухоли. По существу, нацеливающие на опухоль иммуностимулирующие бактерии с РНК, такие как shrРНК, к TGF-бета, представленные здесь, или shРНК к TGF-бетаRII, разрушают иммунную толерантность к опухоли и стимулируют противоопухолевый иммунитет.

7. VEGF

Ангиогенез, или развитие новых кровеносных сосудов, является важным шагом для любого микроокружения опухоли, чтобы стать установленным в таком качестве. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) является критическим митогеном для эндотелиальной пролиферации и ангиогенеза, а ингибирование VEGF в микроокружении опухоли заметно снижает сосудистость опухоли, тем самым снижая кровоснабжение опухоли (Kim et al. (1993) Nature 362(6423):841-4). Это раннее исследование привело к появлению интереса к ингибиторам моноклональных антител VEGF, бевацизумаба (Avastin; Genentech), который в комбинации с химиотерапией стал стандартным для метастатической CRC. Системное введение бевацизумаба также демонстрировало значительную токсичность, включая многолисленные фатальные случаи в исследовании фазы II NSCLC, главным образом, из-за кровоизлияний. По существу, было оценено несколько следующих поколений антиангиогенных соединений, таких как антитело против рецептора 2 VEGF (Cyramza, Imclone) и ингибитор антиангиогенной тирозинкиназы axitinib (Inlyta, Pfizer), но не была преодолена системная токсичность или значительно улучшено безрегрессирующее выживание (Alshanti et al.

(2018) *Curr. Oncol.* 25 (Suppl1): S45-S58). Хотя противоопухолевая активность анти-VEGF-терапии продемонстрировала некоторую надежду, системная токсичность является четко ограничивающей. По существу, терапия, которая нацелена только на микроокружение опухоли, такую как иммуностимулирующая нацеленная на опухоль бактерия с shРНК к VEGF, предоставленная в настоящем описании, обеспечивает локальную антиангиогенную терапию, в то же время предотвращая системную токсичность. Это лечебное воздействие имеет дополнительное преимущество, заключающееся в том, что оно воспринимается в миелоидных клетках, которые преимущественно продуцируют VEGF в микроокружении опухоли, где он будет оказывать максимальное воздействие на прогрессирование опухоли (Osterbergetal. (2016) *Neuro- Oncology.* 18 (7): 939-949).

8. Дополнительные примеры мишеней контрольной точки

Примеры мишеней контрольной точки, для которых РНК, такие как микроРНК и shРНК, могут быть получены или приведены в качестве примера в данном описании, включают, но не ограничиваются ими:

Мишень контрольной точки
CTLA-4
PD-L1 (B7-H1)
PD-L2
PD-1, PD-2
IDO1
IDO2
SIRP альфа, CD47
VISTA (B7-H5)
LIGHT
HVEM
CD28
LAG3, TIM3, TIGIT
Galectin-9

Мишень контрольной точки
CEACAM1, CD155, CD112, CD226, CD244 (2B4),
B7-H2, B7-H3, CD137, ICOS, GITR, B7-H4. B7-H6
CD137, CD27, CD40/CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD137(4-1BB), CD200, CD272 (BTLA), CD160
A2a рецептор, A2b рецептор, HHLA2, ILT- 2, ILT-4, gp49B, PIR-B
OX40/OX-40L, BTLA, ICOS, HLA-G, ILT-2/4
KIR, GITR, TIM1, TIM4

Другие примерные цели включают в себя, но не ограничиваются этим:

Мишень
CTNNB1 (бета-катенин)
STAT3
BCL-2
MDR1
Arginase1
iNOS
TGF- β
IL-10
pGE2
VEGF
KSP
HER2
KRAS
TAK1
PLK1
K-Ras (Ras)
Стаблин-1/CLEVER-1
РНаза H2
ДНаза II

Н. Фармацевтическое производство, композиции и препаративные формы

В данном описании представлены способы получения фармацевтических композиций и композиций, содержащих любую из предлагаемых в настоящем описании иммуностимулирующих бактерий и фармацевтически приемлемых наполнителей или добавок. Фармацевтические композиции могут быть использованы при лечении заболеваний, таких как гиперпролиферативные заболевания или состояния, такие как опухоль или рак. Иммуностимулирующие бактерии могут быть введены в виде однократной терапии или могут быть введены в комбинированной терапии дополнительным средством или обработкой. Композиции могут быть составлены для

однократного введения дозы или для многократного введения дозы. Агенты могут быть составлены для прямого введения. Композиции могут быть представлены в виде жидкой или высушенной композиции.

1. Производство

а. Производство банка клеток

Поскольку активный ингредиент иммунотерапевтического средства, описанного здесь, состоит из сконструированных самореплицирующихся бактерий, выбранный состав будет размножаться в ряд банков клеток, которые будут поддерживаться для длительного хранения и в качестве исходного материала для производства лекарственного вещества. Банки клеток получают в текущих хороших технологиях производства (cGMP) в соответствующем производственном оборудовании в соответствии с кодексом федеральных правил (CFR) 21 часть 211 или другим регулятором. В качестве активного агента иммунотерапевтического средства является живая бактерия, описанные здесь продукты по определению являются нестерильными и не могут быть окончательно стерилизованы. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы гарантировать, что в процессе производства используются асептические процедуры для предотвращения загрязнения. По существу все исходные материалы и растворы должны быть стерилизованы перед использованием в процессе производства.

Банк маточных клеток (МСВ) получают путем последовательного выделения отдельных колоний выбранного бактериального штамма для обеспечения отсутствия примесей в исходном материале. Стерильный культуральный сосуд, содержащий стерильные среды (могут представлять собой сложные среды, например, LB Или MSBB, или определенные среды, например M9, дополненные соответствующими питательными веществами), инокулируют одной хорошо выделенной бактериальной колонией, и бактериям дают возможность реплицироваться, например, инкубированием при 37° с при встряхивании. Затем бактерии получают для криоконсервирования путем суспендирования в растворе, содержащем криозащитный агент или агенты.

Примеры криозащитных агентов включают: белки, такие как сывороточный альбумин человека или быка, желатин, иммуноглобулины; углеводы, включая моносахариды (галактозу, D-маннозу, сорбозу и тд) и их производные (например, метилглюкозид), дисахариды (трегалоза, сахароза и тд), циклодекстрины и полисахариды (раффиноза, мальтодекстрины, декстраны и тд), аминокислоты (глутамат, глицин, аланин, аргинин или гистидин, триптофан, тирозин, лейцин, фенилаланин и тд); метиламины,

такие как бетаин; полиолы, такие как трехатомные или высшие сахарные спирты, например глицерин, эритрит, глицерин, арабит, ксилит, сорбит и маннит; пропиленгликоль; полиэтиленгликоль; поверхностно-активные вещества например, плуроник; или органические соединения серы, такие как диметилсульфоксид (ДМСО), и их комбинации. Растворы для криоконсервирования могут включать один или несколько криопротективных агентов в растворе, который может также содержать соли (например, хлорид натрия, хлорид калия, сульфат магния и или буферирующие агенты, такие как фосфат натрия, трис (гидроксиметил) аминометан (ТРИС), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота (HEPES) и другие такие буферные агенты, известные специалистам в данной области.

Суспензию бактерий в растворе для криоконсервирования можно получить либо путем добавления концентрированного криозащитного агента, либо агентов к культуральному материалу для достижения конечной концентрации, которая сохраняет жизнеспособность бактерий во время процесса замораживания и оттаивания (например, от 0,5% до 20% конечной концентрации глицерина), или путем сбора бактерий (например, центрифугированием) и суспендированием в растворе криостабилизатора с соответствующей конечной концентрацией криопротективного агента (ов). Затем суспензию бактерий в растворе для криоконсервирования заполняют в соответствующие стерильные флаконы (пластик или стекло) с помощью системы укупоривания контейнера, которая способна сохранять целостность укупорочного средства в замороженном состоянии (например, пробки и обжимные уплотнители). Затем ампулы замораживают (либо медленно с помощью морозильника с контролируемой скоростью, либо быстро путем помещения непосредственно в морозильник). Затем МСВ хранят в замороженном состоянии при температуре, которая сохраняет долгосрочную жизнеспособность (например, при температуре или ниже -60°C). Размороженный материал тщательно характеризуют для обеспечения идентичности, чистоты и активности с помощью соответствующих органов.

Банки рабочих клеток (WCB) получают таким же образом, как и банк клеток-хозяев, но исходный материал получают из МСВ. Материал МСВ может быть непосредственно перенесен в сосуд для ферментации, содержащий стерильные среды, и расширен, как описано выше. Затем бактерии суспендируют в растворе для криоконсервирования, помещают в емкости, герметизируют и замораживают при температуре или ниже -20°C . Множество WCB может быть получено из материала МСВ, и материал WCB может быть использован для получения дополнительных банков клеток

(например, банк рабочих клеток изготовителя (MWCB). WCB хранят в замороженном виде и характеризуют для обеспечения идентичности, чистоты и активности. Материал WCB обычно представляет собой исходный материал, используемый при получении веществ, таких как сконструированные бактерии.

в. Получение лекарственного вещества

Лекарственное вещество получают с использованием асептических процессов под cGMP, как описано выше. В качестве исходного материала для производства лекарственного вещества под cGMP обычно используют материал для обработки рабочих клеток, однако можно использовать и другие группы клеток (например, MCB или MWCB). Асептическую обработку используют для всех клеточных терапий, включая бактериальную клеточную терапию. Бактерии из банка клеток размножаются ферментацией, что может быть достигнуто путем получения предварительной культуры (например, во встряхиваемой колбе) или путем прямой инокуляции ферментера. Ферментацию осуществляют в стерильном биореакторе или в колбе, которые могут быть одноразовыми или повторно используемыми. Бактерии собирают путем концентрирования (например, путем центрифугирования, непрерывного центрифугирования или фильтрации с тангенциальным потоком). Концентрированные бактерии очищают от медиа-компонентов и бактериальных метаболитов путем обмена среды с буфером (например, диафильтрацией). Сыпучий лекарственный продукт составляется и сохраняется в виде промежуточного продукта (например, путем замораживания или сушки) или непосредственно перерабатывается в лекарственный продукт. Лекарственное вещество исследуют на идентичность, прочность, чистоту, активность и качество.

с. Производство лекарственных продуктов

Лекарственный продукт определяется как конечный состав активного вещества, содержащегося в его конечном контейнере. Лекарственный продукт получают с использованием асептических процессов под действием cGMP. Лекарственный продукт получают из лекарственного вещества. Лекарственное вещество размораживают или восстанавливают, если необходимо, затем готовят для соответствующей цели. Поскольку активным компонентом лекарственного продукта являются живые, сконструированные бактерии, прочность определяется количеством CFU, содержащихся в суспензии. Продукт разбавляют в конечной композиции, подходящей для хранения и использования, как

описано ниже. Контейнеры заполняют и герметизируют укупорочной системой контейнера, и лекарственный продукт маркируют. Лекарственный продукт хранят при подходящей температуре для сохранения стабильности и проверяют на идентичность, прочность, чистоту, активность и качество и высвобождают для использования человеком, если он удовлетворяет указанным критериям принятия.

2. Композиции

Фармацевтически приемлемые композиции получают с учетом утверждений регуляторного агентства или другого агентства, в соответствии с общепризнанными фармакопеями для применения у животных и у человека. Композиции могут быть приготовлены в виде растворов, суспензий, порошков или препаратов с замедленным высвобождением. Обычно соединения формулируют в фармацевтические композиции с использованием методик и методик, хорошо известных в данной области (см. например, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126). Состав должен соответствовать способу введения. Композиции могут быть составлены для введения любым способом, известным специалистам в данной области, включая внутримышечное, внутривенное, интрадермальное, внутривентральное, подкожное, внутрипухоловое, эпидуральное, назальное, пероральное, вагинальное, ректальное, местное, местное, ушное, ингаляционное, трансбуккальное (например, сублингвальное) и трансдермальное введение или любой путь. Возможны также и другие способы введения. Введение может быть локальным, местным или системным в зависимости от места обработки. Местное введение в область, нуждающуюся в лечении, может быть достигнуто, например, но без ограничения, местной инфузией во время операции, местным применением, например, в сочетании с раневой повязкой после операции, путем инъекции, с помощью катетера, посредством суппозитория или посредством имплантата. Композиции также могут быть введены с другими биологически активными агентами, либо последовательно, периодически, либо в том же составе. Введение также может включать системы с контролируемым высвобождением, включая препараты с контролируемым высвобождением и контролируемое высвобождение устройства, например, с помощью насоса.

Наиболее подходящий путь в любом данном случае зависит от различных факторов, таких как природа заболевания, развитие заболевания, тяжесть заболевания и

конкретная композиция, которая используется. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде лекарственных форм, подходящих для каждого пути введения. В частности, композиции могут быть приготовлены в виде любых подходящих фармацевтических препаратов для системного, местного внутрибрюшинного, перорального или прямого введения. Например, композиции могут быть составлены для введения подкожно, внутримышечно, внутритрахеально, внутривенно или внутрикожно. Способы введения могут быть использованы для уменьшения воздействия активного агента на процессы деградации, такие как иммунологическое вмешательство через антигенные и иммуногенные ответы. Примеры таких способов включают местное введение в месте обработки или непрерывной инфузии.

Иммуностимулирующие бактерии могут быть включены в состав пригодных для использования фармацевтических препаратов, таких как растворы, суспензии, таблетки, диспергируемые таблетки, пилюли, капсулы, порошки, препаративные формы с замедленным высвобождением или эликсиры, для перорального введения, а также препараты для трансдермального пластыря и ингаляторы для сухого порошка.

Обычно соединения вводят в фармацевтические композиции с использованием методик и методик, хорошо известных в данной области (см. например, *Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition, 1985, 126*). Как правило, способ приготовления является функцией пути введения. Композиции могут быть приготовлены в виде сухих (лиофилизированных или других форм остекловывания) или жидкой формы. Если композиции представлены в высушенной форме, они могут быть восстановлены непосредственно перед использованием путем добавления соответствующего буфера, например стерильного физиологического раствора.

3. Препаративные формы

а. Жидкости, инъеклируемые формы, эмульсии

Препарат обычно изготавливают таким образом, чтобы он подходил к пути введения. В настоящем описании рассматривается парентеральное введение, обычно охарактеризованное инъекцией или вливанием, либо подкожно, внутримышечно, внутримышечно, внутривенно или внутрикожно. Препараты бактерий для парентерального введения включают суспензии, готовые к инъекции (прямое введение)

или замороженную суспензию, которую оттаивают перед использованием, сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к комбинированию с раствором ресуспендирования непосредственно перед использованием, и эмульсии. Высушенные термостабильные композиции, такие как лиофилизированные композиции, могут быть использованы для хранения единичных доз для последующего использования.

Фармацевтический препарат может быть в замороженном жидком виде, например, суспензия. Если в замороженном жидком виде, препарат может быть предоставлен в качестве концентрированного препарата для размораживания и разбавления до терапевтически эффективной концентрации перед использованием.

Фармацевтические препараты также могут быть предоставлены в форме, которая не требует оттаивания или разбавления для использования. Такие жидкие препараты могут быть подготовлены обычными средствами с фармацевтически приемлемыми добавками, по мере необходимости, такими как суспендирующие агенты (например, сорбитол, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгирующие вещества (например, лецитин или акация); неводные носители (например, миндальное масло, масляные эфиры или дробные растительные масла); и консерванты, пригодные для использования с микробными терапевтическими средствами. Фармацевтические препараты могут быть представлены в сушеном виде, такие как лиофилизированные или спрей, для восстановления с водой или другим стерильным подходящим носителем перед использованием.

Подходящими являются, например, вода, солевой раствор, декстроза или глицерин. Растворы могут быть как водные так и неводные. При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический солевой раствор или фосфат буферный солевой раствор (PBS) и другие буферные растворы, используемые для внутривенной гидратации. Для внутриопухолевого введения растворов, содержащих разбавители, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль, и полипропиленгликоль, эмульсии масла и смеси из них может быть целесообразными для поддержания локализации инъекционного вещества.

Фармацевтические составы могут включать носителей или других добавки. Например, фармацевтические композиции, предоставляемые здесь, могут содержать любой или несколько разбавитель (и), адъювант (ы), связующее (ие), покрытие (я), наполнитель (и), ароматизатор (ы), краситель (и), смазка (и), консервант (ы), моющее средство (а), или сорбент (ы) и их комбинации. Например, фармацевтически приемлемые носители или

добавки, используемые в парентеральных препаратах включают водные носители, неводные носители, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, секвестрирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Композиции, в том числе жидкие препараты, могут быть подготовлены обычными средствами с фармацевтически приемлемыми добавками.

Фармацевтические составы могут включать в себя носителей, таких как разбавитель, адъювант, или носитель, с которым композиции вводятся. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" Э. В. Мартина. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения или агента, как правило, в очищенной форме или частично очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, с тем чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло. Вода является типичным носителем. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, особенно для инъекционных растворов. Композиции могут содержать вместе с активным ингредиентом: разбавители, такие как лактоза, сахароза, дикальцийфосфат, или карбоксиметилцеллюлоза; смазка, такая как стеарат магния, стеарат кальция и тальк; и связующие, такие как крахмал, желатин, глюкоза, патока, поливинилпирролидин, целлюлозы и производные от них, povidone, crospovidones и другие подобные связующие известны специалистам. Подходящие фармацевтические вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеаратглицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду и этанол. Например, подходящими являются, например, вода, солевой раствор, декстрога, глицерин или этанол.

Состав, при желании, также может содержать другие незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, агенты рН буферизации, стабилизаторы, усилители растворимости, и другие такие агенты, как, например, ацетат натрия, триэтаноламинолеат и циклодекстрин.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают в себя водные носители, неводные носители, противомикробные средства,

изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, приостанавливающие и дисперсионные агенты, эмульгирующие агенты, секвестрирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных носителей включают инъекции хлорида натрия, инъекции Рингера, изотонические инъекции декстрозы, стерильные инъекции воды, инъекции декстрозы. Неводные парентеральные транспортные средства включают масла растительного происхождения, хлопковое масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаингидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают натрийкарбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгирующие вещества включают, например, полисорбаты, такие как полисорбат 80 (TWEEN 80). Секвестрирующие или хелатирующие агенты, такие как EDTA, могут быть включены. Фармацевтические носители также включают полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой носителей и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулировки pH. Неантимикробные консерванты могут быть включены.

Фармацевтические составы также могут содержать другие незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, агенты pH буферизации, стабилизаторы, усилители растворимости, и другие такие агенты, как, например, ацетат натрия, монолауратсорбитан, триэтаноламинолеат и циклодекстрин.

Имплантация системы медленного высвобождения или устойчивого высвобождения, так что постоянный уровень дозировки поддерживается (см., например, патент США 3,710,795) также рассматривается здесь. Процент активных соединений, содержащихся в таких парентеральных составах, в значительной степени зависит от их специфического характера, а также от активности соединения и потребностей субъекта.

в. Высушенные термостойкие составы

Бактерии могут быть высушены. Сушеные термостабильные составы, такие как лиофилизированные или распыляемые сухие порошки и стекло, могут быть восстановлены для введения в качестве растворов, эмульсий и других смесей. Высушенная термостабильная композиция может быть приготовлена из любого из

жидких составов, таких как суспензии, описанные выше. Фармацевтические препараты могут быть представлены в лиофилизированной или остеклованной форме для восстановления с водой или другим подходящим носителем перед использованием.

Термостабильную композицию готовят для введения путем восстановления высушенного соединения стерильным раствором. Раствор может содержать наполнитель, который улучшает стабильность или другой фармакологический признак активного вещества или восстановленного раствора, приготовленного из порошка. Термостабильную композицию готовят растворением наполнителя, такого как декстроза, сорбит, фруктоза, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкоза, сахароза или другой подходящий агент, в подходящем буфере, таком как цитрат, натрий или калий фосфат или другой такой буфер, известный специалистам в данной области. Затем к полученной смеси добавляют лекарственное вещество и перемешивают до смешивания. Полученную смесь разделяют на ампулы для сушки. Каждая ампула будет содержать одну дозу, содержащую от 1×10^5 до 1×10^{11} CFU на флакон. После сушки сосуд для продукта герметизируют с помощью системы закупоривания контейнера, которая предотвращает проникновение влаги или загрязнения в герметичный сосуд. Высушенный продукт можно хранить в соответствующих условиях, например при -20°C , 4°C или комнатной температуре. Восстановление этой высушенной композиции водой или буферным раствором обеспечивает композицию для применения при парентеральном введении. Точное количество зависит от показания, обработанного и выбранного соединения. Такое количество может быть определено эмпирически.

4. Композиции для других способов введения

В зависимости от состояния, подвергающегося лечению, также рассматриваются другие пути введения в дополнение к парентеральным, такие как местное применение, трансдермальные пластыри, пероральное и ректальное введение. Суспензии и порошки, описанные выше, могут вводиться перорально или могут быть восстановлены для перорального введения. Фармацевтические лекарственные формы для ректального введения представляют собой ректальные суппозитории, капсулы и таблетки и желатиновые капсулы для системного эффекта. Ректальные суппозитории включают твердые тела для введения в прямую кишку, которые плавятся или размягчаются при температуре тела, высвобождая один или более фармакологически или терапевтически активных ингредиентов. Фармацевтически приемлемыми веществами в ректальных

суппозиториях являются основания или носители и агенты для повышения температуры плавления. Примеры оснований включают масло какао (theobroma oil), глицерин-желатин, carbowax (полиоксиэтиленгликоль) и соответствующие смеси моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот. Могут быть использованы комбинации различных оснований. Агенты для повышения температуры плавления суппозиториев включают спермацет и воск. Ректальные суппозитории могут быть получены либо прессованием, либо формованием. Типичный вес ректального суппозитория составляет от около 2 до 3 г. Таблетки и капсулы для ректального введения получают с использованием одного и того же фармацевтически приемлемого вещества и теми же способами, что и для композиций для перорального введения. Композиции, пригодные для ректального введения, могут быть представлены в виде суппозиториев с единичной дозой. Они могут быть получены путем смешивания лекарственного вещества с одним или несколькими обычными твердыми носителями, например какао-маслом, и затем формованием полученной смеси.

Для перорального введения фармацевтические композиции могут принимать форму, например, таблеток или капсул, полученных обычными способами с фармацевтически приемлемыми эксципиентами, такими как связывающие агенты (например, предварительно желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк или диоксид кремния); дезинтегранты (например, картофельный крахмал или натрийкрахмалгликолят); или смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты способами, хорошо известными в данной области.

Композиции, пригодные для трансбуккального (сублингвального) введения, включают, например, лепешки, содержащие активное соединение в ароматизированной основе, обычно сахарозе и аравийской камеди или трагаканте; и пастилки, содержащие соединение в инертном растворителе, таком как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь.

Местные смеси готовят, как описано для местного и системного введения. Полученные смеси могут представлять собой растворы, суспензии, эмульсии или т.п. и состояются в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, ирригаций, спреев, суппозиториев, бандажей, дермальных пластырей или любых других составов, пригодных для местного применения.

Композиции могут быть приготовлены в виде аэрозолей для местного применения, таких как ингаляция (см. например, патенты США NN 4044126; 4414209 и 4364923, которые описывают аэрозоли для доставки стероида, полезного для лечения заболеваний легких). Эти составы для введения в дыхательные пути могут быть в форме аэрозоля или раствора для распылителя или в виде порошка микрофима для инсуффляции, по отдельности или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы композиции обычно имеют диаметры менее 50 микрон или менее 10 микрон.

Соединения могут быть приготовлены для местного или местного применения, например для местного нанесения на кожу и слизистые оболочки, например в глаз, в форме гелей, кремов и лосьонов и для нанесения на глаз или для внутрикишечного или внутрисосудистого применения. Местное введение рассматривается для трансдермальной доставки, а также для введения в глаза или слизистую оболочку, или для ингаляционных терапий. Назальные растворы активного соединения по отдельности или в комбинации с другим также могут быть введены с фармацевтически приемлемыми наполнителями.

Предлагаются композиции, пригодные для трансдермального введения. Они могут быть представлены в любом подходящем формате, таком как отдельные пластыри, приспособленные для того, чтобы оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Такие пластыри содержат активное соединение в возможнобуферном водном растворе, например, от 0,1 до 0,2 М концентрации по отношению к активному соединению. Композиции, пригодные для трансдермального введения, также могут доставляться с помощью ионтофореза (см. например, Tyle, P. (1986) *Pharmaceutical Research* 3 (6): 318-326) и обычно принимают форму возможнобуферного водного раствора активного соединения.

Фармацевтические композиции также можно вводить с помощью препаратов с регулируемым высвобождением и/или устройств доставки (см. например, Патенты США 353809; 3598123; 3630200; 3845770; 3916899; 4008719; 4769027; 5059595; 5073543; 5, 120, 548; 5591767; 5639476; 5674533 и 5733566).

5. Дозы и введение

Композиции могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций для однократной дозы или многократного введения. Иммуностимулирующие бактерии могут быть включены в количестве, достаточном для создания терапевтически полезного

эффекта при отсутствии нежелательных побочных эффектов у пациента, подвергающегося лечению. Например, концентрацию фармацевтически активного соединения регулируют таким образом, чтобы инъекция обеспечивала эффективное количество для получения желаемого фармакологического эффекта. Терапевтически эффективную концентрацию можно определить эмпирически путем тестирования иммуностимулирующих бактерий в известных системах *in vitro* и *in vivo*, например, с использованием описанных здесь анализов или известных в данной области техники. Например, могут быть использованы стандартные клинические методы. Анализы *In vitro* и животные модели могут быть использованы для того, чтобы помочь идентифицировать оптимальные диапазоны доз. Точная доза, которая может быть определена эмпирически, может зависеть от возраста, веса, площади поверхности тела и состояния пациента или животного, конкретных вводимых иммуностимулирующих бактерий, пути введения, типа заболевания, подлежащего лечению, и тяжести заболевания.

Следовательно, следует понимать, что точная дозировка и продолжительность лечения зависят от заболевания, подвергающегося лечению, и могут быть определены эмпирически с использованием известных методик тестирования или экстраполяцией из *in vivo* или *in vitro* тестовых данных. Концентрации и дозы также могут варьироваться в зависимости от тяжести состояния, которое должно быть облегчено. Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования должны быть скорректированы с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональной оценкой человека, вводящего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны концентрации, приведенные в данном описании, являются только примерными и не предназначены для ограничения объема или применения композиций и комбинаций, содержащих их. Композиции могут вводиться ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно или один раз. Как правило, режимы дозирования выбирают так, чтобы ограничить токсичность. Следует отметить, что лечащий врач будет знать, как и когда прекратить, прерывать или регулировать терапию до более низких доз из-за токсичности, или костного мозга, печени или почек, или других тканевых дисфункций. Лечащий врач также знает, как и когда необходимо регулировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ не является адекватным (исключая токсические побочные эффекты).

Имуностимулирующие бактерии включены в композицию в количестве, достаточном для создания терапевтически полезного эффекта. Например, это количество

является таким, которое достигает терапевтического эффекта при лечении гиперпролиферативного заболевания или состояния, такого как рак.

Фармацевтически и терапевтически активные соединения и их производные обычно составляют и вводят в виде единичных лекарственных форм или множества лекарственных форм. Каждая единичная доза содержит определенное количество терапевтически активного соединения, достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем, носителем или разбавителем. Стандартные лекарственные формы включают, но не ограничиваются ими, таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, парентеральные суспензии и растворы или суспензии для орального применения, а также эмульсии масла-вода, содержащие подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых производных. Стандартные лекарственные формы могут содержаться во флаконах, ампулах и шприцах или индивидуально упакованных таблетках или капсулах. Единичные дозированные формы можно вводить в виде фракций или их кратных доз. Форма с множеством доз представляет собой множество идентичных единичных дозированных форм, упакованных в один контейнер для введения в виде разделенных единичных доз. Примеры форм с множеством доз включают в себя ампулы, бутылки из таблеток или капсул, или бутылки с наконечниками или галлонами. Следовательно, форма с множеством доз представляет собой множество единичных доз, которые не сегрегированы в упаковке. Обычно лекарственные формы или композиции, содержат активный ингредиент в интервале 0,005 % до 100%, причем остаток, полученный из нетоксичного носителя, может быть получен. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде лекарственных форм, подходящих для каждого пути введения.

Парентеральные препараты с единичной дозой упаковывают в ампулу, флакон или шприц с иглой. Объем жидкого раствора или восстановленного порошкапрепарата, содержащего фармацевтически активное соединение, является функцией заболевания, подлежащего лечению, и конкретного изделия, выбранного для упаковки. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными, как известно и практикуется в данной области.

Как указано, композиции, представленные здесь, могут быть приготовлены любым способом, известным специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, подкожное, внутримышечное, внутривенное, интрадермальное, внутрикожное, внутрибрюшинное, эпидуральное, вагинальное, ректальное, местное, ушное, трансдермальное введение или любой другой путь введения. Составы, пригодные для

таких способов, известны специалистам в данной области. Композиции также могут быть введены с другими биологически активными агентами, либо последовательно, периодически, либо в том же составе.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью препаратов регулируемого высвобождения и/или устройств доставки (см. например, Патенты США 353809; 3598123; 3630200; 3845770; 3847770; 3916899; 4008719; 4687660; 4769027; 5059595; 5073543; 5120548; 5354556; 5591767; 5639476; 5674533 и 5733566). Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для введения выбранных композиций, и такие частицы могут быть легко получены.

6. Упаковка и производимые изделия

Также предлагаются изделия, содержащие упаковочные материалы, любую фармацевтическую композицию, представленную здесь, и этикетку, которая указывает, что композиции должны использоваться для лечения заболеваний или состояний, как описано в настоящей заявке. Например, этикетка может указывать, что обработка предназначена для опухоли или рака.

Комбинации иммуностимулирующих бактерий, описанных здесь, и другого терапевтического агента также могут быть упакованы в производимые изделия. Например, промышленное изделие содержит фармацевтическую композицию, содержащую композицию иммуностимулирующих бактерий и не содержащую дополнительных агентов. В других примерах, производимое изделие содержит другой дополнительный терапевтический агент, такой как другое противораковое средство. В этом примере агенты могут содержаться вместе или отдельно в упаковке в виде произведенных изделий.

Изделия, изготовленные в соответствии с настоящим изобретением, содержат упаковочные материалы. Упаковочные материалы для использования в упаковочных фармацевтических продуктах хорошо известны специалистам в данной области. См. например, патенты США 5323907, 5052258 и 5033252, каждый из которых полностью включен в данное описание в качестве ссылки. Примеры фармацевтических упаковочных материалов включают в себя, но не ограничиваются ими, блистерные упаковки, бутылки, трубки, ингаляторы, насосы, мешки, пузырьки, контейнеры, шприцы, бутылки и любой упаковочный материал, пригодный для выбранного состава и намеченный способ введения и лечения. Примерами изделий для изготовления являются контейнеры, включающие в себя однокамерные и двухкамерные контейнеры. Контейнеры включают в

себя, но не ограничиваются ими, трубки, бутылки и шприцы. Кроме того, контейнеры могут включать в себя иглу для внутривенного введения.

Выбор упаковки зависит от агентов и от того, будут ли такие композиции упакованы вместе или отдельно. Обычно упаковка не вступает в реакцию с содержащимися в ней композициями. В других примерах некоторые из компонентов могут быть упакованы в виде смеси. В других примерах все компоненты упакованы отдельно. Так, например, компоненты могут быть упакованы в виде отдельных композиций, которые при смешивании непосредственно перед введением могут быть введены вместе.

Альтернативно, компоненты могут быть упакованы в виде отдельных композиций для раздельного введения.

Выбранные композиции, и произведенные продукты, также могут быть представлены в виде наборов. Наборы могут включать фармацевтическую композицию, описанную здесь, и изделие для введения. Композиции могут содержаться в изделии для введения или могут быть представлены отдельно, чтобы быть добавленными позже. Набор может включать инструкции для применения, включая дозы, режимы дозирования и инструкции для способов введения. Наборы также могут включать фармацевтическую композицию, описанную здесь, и элемент для диагностики.

I. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Способы, представленные здесь, включают способы введения или использования иммуностимулирующих бактерий для лечения субъектов, имеющих заболевание или состояние, симптомы которых могут быть ослаблены или уменьшены путем введения таких бактерий, таких как рак. В конкретных примерах заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак. Кроме того, способы комбинированной терапии с одним или несколькими дополнительными агентами для лечения, такими как противораковое средство, такое как онколитический вирус, иммунотерапевтическое средство и/или средство против гиалуронана, такое как гиалуронидаза, также предлагаются. Бактерии могут вводиться любым подходящим путем, включая, но не ограничиваясь ими, парентеральный, системный, местный, такой как внутриопухолевый, внутривенный, ректальный, пероральный, внутримышечный, слизистый и другие пути. Из-за модификаций описанных здесь бактерий решены проблемы, связанные с системным

введением. Для каждого пути введения предлагаются составы, пригодные для каждого пути введения. Специалист в данной области может установить подходящие схемы и дозы и выбирать пути.

1. Опухоли

Иммуностимулирующие бактерии, комбинации, применения и способы, представленные здесь, применимы для лечения всех типов опухолей, включая злокачественные опухоли, в частности солидные опухоли, включая рак легких, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак головы и шеи, рак яичника, рак печени, рак поджелудочной железы, рак почек, рак молочной железы, колоректальный рак и рак простаты. Способы также могут быть использованы для гематологических злокачественных опухолей.

Опухоли и злокачественные опухоли, подверженные лечению способами, и способы, представленные здесь, включают, но не ограничиваются ими, те, которые происходят в иммунной системе, скелетную систему, мышцы и сердце, грудь, поджелудочную железу, желудочно-кишечный тракт, центральную и периферическую нервную систему, почечную систему, репродуктивную систему, дыхательную систему, кожу, системы соединительной ткани, включая суставы, жировые ткани и кровеносную систему, включая стенки кровеносных сосудов. Примеры опухолей, которые могут быть обработаны иммуностимулирующими бактериями, приведенными в настоящем описании, включают карциномы, глиомы, саркомы (включая липосаркому), аденокарциномы, аденосаркомы и аденомы. Такие опухоли могут происходить практически во всех частях тела, включая, например, грудную клетку, сердце, легкое, тонкий кишечник, толстую кишку, селезенку, почку, мочевой пузырь, головку и шеи, яичник, простату, головной мозг, поджелудочную железу, кожу, кость, костный мозг, кровь, тимус, матку, яички, шейку или печень.

Опухоли скелетной системы включают, например, саркомы и бластомы, такие как остеосаркома, хондросаркома и хондробластома. Мышцы и сердечные опухоли включают опухоли как скелетных, так и гладких мышц, например лейомиомы (доброкачественные опухоли гладкой мускулатуры), лейомиосаркомы, рабдомиомы (доброкачественные опухоли скелетных мышц), рабдомиосаркомы и саркому сердца. Опухоли желудочно-кишечного тракта включают, например, опухоли рта, пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки и колоректальных опухолей, а также опухолей желудочно-кишечных

секреторных органов, таких как слюнные железы, печень, поджелудочная железа и желчных путей. Опухоли центральной нервной системы включают опухоли головного мозга, сетчатки и спинного мозга и могут также исходить из связанной соединительной ткани, кости, кровеносных сосудов или нервной ткани. Также рассматривается лечение опухолей периферической нервной системы. Опухоли периферической нервной системы включают злокачественные опухоли оболочки периферических нервов. Опухоли почечной системы включают опухоли почек, например почечную клеточную карциному, а также опухоли мочеточников и мочевого пузыря. Опухоли репродуктивной системы включают опухоли шейки матки, матки, яичника, простаты, яичек и родственных секреторных желез. Опухоли иммунной системы включают как основанные на крови, так и солидные опухоли, включая лимфомы. Опухоли дыхательной системы включают опухоли носовых ходов, бронхов и легких. Опухоли молочной железы включают, например, как полостную, так и дуктальную карциному.

Другие примеры опухолей, которые могут быть обработаны иммуностимулирующими бактериями и описанными здесь способами, включают саркому Капоши, неоплазмы ЦНС, нейробластомы, капиллярные гемобластомы, менингиомы и церебральные метастазы, меланому, желудочно-кишечные и почечные карциномы и саркомы, рабдомиосаркому, глиобластому (такую как глиобластомамultiforme) и лейомиосаркому. Примеры других видов рака, которые можно лечить, как представлено здесь, включают, но не ограничиваются ими, лимфому, бластому, нейроэндокринные опухоли, мезотелиому, шванному, менингиому, меланому и лейкоз или лимфоидные злокачественные заболевания. Примеры таких видов рака включают гематологические злокачественные заболевания, такие как лимфома Ходжкина; неходжкинские лимфомы (лимфома буркитта, лимфоцитарная лимфома/хронический лимфоцитарный лейкоз, микоз, лимфома, фолликулярная лимфомалимфоцитарный лейкоз/лимфома и Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз/лимфома, тимима, опухоли зрелых Т-и НК-клеток, включая периферические т-клеточные лейкозы, взрослые т-клеточные лейкомии/т-клеточные лимфомы и крупный гранулированный лимфоцитарный лейкоз, клетки лангерганса, гипероцитоз, миелоидные неоплазии, такие как острые миелогенные лейкозы, включая АML с созреванием, АML без дифференцировки, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз/лейкоз и острый моноцитарный лейкоз, миелодиспластические синдромы и хронические миелопролиферативные нарушения, включая хронический миелогенный лейкоз; опухоли центральной нервной системы, такие как глиома, глиобластома, нейробластома,

астроцитомы, медуллобластомы, эндодонма и ретинобластомы; солидные опухоли головы и шеи (например, рак носоглоточной железы, рак слюнной железы и рак пищевода), легкого (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и сквамозную карциному легкого), пищеварительную систему (например, рак желудка или желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак желчного протока или желчных путей, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак и рак анальной карциномы), репродуктивную систему (например, яичка, пенис или рак простаты, рак матки, влагалища, вульварного, шейного, яичника и эндометриального рака), кожу (например, меланома, базальная клеточная карцинома, плоскоклеточный рак, актиничный кератоз, кожная меланома), печень (например, рак печени, гепатоцеллюлярный рак и гепатома), кости (например, остеокластома и остеолитические костные злокачественные опухоли), дополнительные ткани и органы (например, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак почек или почек, рак щитовидной железы, рак молочной железы, рак брюшины и саркома Капоши), опухоли сосудистой системы (например, ангиосаркомы и гемангиоперицитомы), опухоли Вильмса, ретинобластомы, остеосаркомы и саркому Эдвингса.

2. Введение

При осуществлении способов, описанных в настоящем документе, иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь, могут быть введены субъекту, включая субъекта, имеющего опухоль или имеющие неопластические клетки, или субъекта, подлежащего иммунизации. Одну или несколько стадий можно проводить до, одновременно с или после введения

иммуностимулирующие бактерии субъекту, включая, но не ограничиваясь этим, диагностику субъекта при условии, подходящем для введения иммуностимулирующих бактерий, определения иммунокомпетентности субъекта, иммунизации субъекта, лечения субъекта химиотерапевтическим агентом, лечения субъекта излучением или хирургического лечения субъекта.

Для вариантов осуществления, которые включают введение иммуностимулирующих бактерий в организм, несущий опухоль, для терапевтических целей, субъект, как правило, ранее был диагностирован при неопластическом состоянии.

Способы диагностики также могут включать в себя определение типа неопластического состояния, определение стадии неопластических состояний, определение размера одной или нескольких опухолей у субъекта, определение наличие или отсутствие метастазирующих или неопластических клеток в лимфатических узлах субъекта или определение наличие метастаз субъекта.

Некоторые варианты осуществления терапевтических способов введения иммуностимулирующих бактерий для субъекта могут включать стадию определения размера первичной опухоли или стадии неопластического заболевания, и если размер первичной опухоли равен или превышает пороговый объем, или если стадия неопластического заболевания находится на или выше пороговой стадии, то иммуностимулирующую бактерию вводят субъекту. В аналогичном варианте осуществления, если размер первичной опухоли ниже порогового объема, или если стадия неопластического заболевания находится на или ниже пороговой стадии, иммуностимулирующая бактерия еще не вводят субъекту; такие способы могут включать мониторинг субъекта до тех пор, пока размер опухоли или неопластическая стадия заболевания не достигнет порогового значения, и затем производят введение иммуностимулирующей бактерии субъекту. Пороговые размеры могут варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая скорость роста опухоли, способность иммуностимулирующей бактерии инфицировать опухоль и иммунокомпетентность субъекта. Как правило, пороговый размер будет иметь размер, достаточный для иммуностимулирующей бактерии, чтобы она накапливалась и реплицировалась в опухоли или вблизи нее, не будучи полностью удаленной иммунной системой хозяина, и обычно также будет иметь размер, достаточный для поддержания бактериальной инфекции в течение времени, достаточного для того, чтобы хозяину установить иммунный ответ против опухолевых клеток, обычно примерно одну неделю или более, примерно десять дней или более, или примерно две недели или более. Примерные пороговые ступени являются любой ступенью за самой нижней ступенью (например, стадия I или эквивалент) или любая стадия, где первичная опухоль превышает пороговый размер, или любая стадия, где обнаруживаются метастатические клетки.

Может использоваться любой способ введения микроорганизма субъекту, при условии, что способ введения позволяет иммуностимулирующим бактериям поступать в опухоль или метастазы. Способы введения могут включать, но не ограничиваются ими, внутривенный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, местный, внутриопухолевый, многопункционный, ингаляционный, интраназальный, пероральный,

внутриполостный (например, введение в мочевой пузырь через катетер, введение в кишечник суппозитория или клизмы), ушное, ректальное и глазное введение.

Специалист в данной области может выбрать любой способ введения, совместимый с субъектом и бактериями, и что также, вероятно, может привести к тому, что бактерии достигают опухолей и/или метастазов. Путь введения может быть выбран специалистом в данной области в соответствии с любым из множества факторов, включая природу заболевания, вид опухоли и конкретные бактерии, содержащиеся в фармацевтической композиции. Введение в целевой участок может быть выполнено, например, путем баллистической доставки, в виде коллоидной дисперсной системы, или системное введение может быть осуществлено путем инъекции в артерию.

Режим дозирования может быть любым из множества способов и количеств и может быть определен специалистом в данной области в соответствии с известными клиническими факторами. Разовая доза может быть терапевтически эффективной для лечения заболевания или нарушения, при котором иммунная стимуляция влияет на лечение. Примером такой стимуляции является иммунный ответ, который включает в себя, но не ограничивается этим, один или оба из специфического иммунного ответа и неспецифического иммунного ответа, как специфических, так и неспецифических ответов, врожденной реакции, первичного иммунного ответа, адаптивного иммунитета, вторичного иммунного ответа, иммунного ответа памяти, активации иммунной клетки, пролиферации или дифференциации иммунных клеток и экспрессия цитокина

Как известно в области медицины, дозы для субъекта могут зависеть от многих факторов, включая вид субъекта, размер, площадь поверхности тела, возраст, пол, иммунокомпетентность и общее состояние здоровья, конкретные бактерии, которые должны быть введены, продолжительность и путь введения, вид и стадия заболевания, например размер опухоли, и другие факторы, такие как лекарственные средства, вводимые одновременно. В дополнение к указанным выше факторам такие уровни могут зависеть от инфекционности бактерий и природы бактерий, что может быть определено специалистом в данной области. В настоящих способах соответствующие минимальные уровни дозировки бактерий могут быть уровнями, достаточными для того, чтобы бактерии выживали, росли и реплицировались в опухоли или метастазе. Примерные минимальные уровни для введения бактерии в 65 кг человека могут включать по меньшей мере около 5×10^6 колониеобразующих единиц (CFU), по меньшей мере около 1×10^7 CFU, по меньшей мере около 5×10^7 CFU, по меньшей мере около 1×10^8 CFU или, по меньшей мере, около 1×10^9 CFU. В настоящих способах соответствующие максимальные

уровни дозировки бактерий могут быть уровнями, которые не являются токсичными для хозяина, уровни, которые не вызывают спленомегалии $3 \times$ или более, уровней, которые не приводят к образованию колоний или бляшек в нормальных тканях или органах после приблизительно 1 дня или после приблизительно 3 дней или после приблизительно 7 дней. Примерные максимальные уровни для введения бактерии в 65 кг человека могут включать не более чем примерно 5×10^{10} CFU, не более чем примерно 1×10^{10} CFU, не более чем примерно 5×10^9 CFU, не более чем примерно 1×10^{10} CFU или не более чем примерно 1×10^9 CFU.

Способы и применения, представленные здесь, могут включать однократное введение иммуностимулирующих бактерий субъекту или многократные введения иммуностимулирующих бактерий субъекту или другим из множества режимов, включая комбинированную терапию с другими противоопухолевыми терапевтическими средствами и/или обработками. Они включают, например, клеточную терапию, такую как введение модифицированных иммунных клеток; терапию CAR-T; терапию CRISPR; иммунотерапию, такую как ингибиторы иммунной контрольной точки, такие как антитела и фрагменты антител; химиотерапевтические и химиотерапевтические соединения, такие как нуклеозидные аналоги; хирургию; онколитическую вирусную терапию; и лучевую терапию.

Имуностимулирующие бактерии или фармацевтические композиции, содержащие иммуностимулирующие бактерии, могут быть использованы в способах лечения, при этом лечение включает комбинированную терапию, в которой вводят второе противораковое средство или лечение. Второе противораковое средство или лечение вводят до, одновременно с или периодически иммуностимулирующей бактерией или фармацевтической композицией и может представлять собой иммунотерапию, онколитическую вирусную терапию, облучение, химиотерапию или хирургию, например. Иммунотерапия может представлять собой антитело или фрагмент антитела, такой как антигенсвязывающий фрагмент, включая анти-PD -1, или анти-PD -L1, или анти-CTLA4, или анти-IL6, или анти-VEGF, или анти-VEGFR, или анти-VEGFR2 антитело, или их фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления одно введение является достаточным для того, чтобы установить иммуностимулирующие бактерии в опухоли, где бактерии могут заселять и могут вызывать или усиливать противоопухолевый ответ у субъекта. В других вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии, предоставленные для использования в способах по настоящему изобретению, можно вводить в различных

случаях, разделенных по времени, как правило, по меньшей мере, на один день. Отдельные введения могут повышать вероятность доставки бактерии в опухоль или метастазы, где предыдущее введение может быть неэффективным при доставке бактерии в опухоль или метастазы. В вариантах осуществления отдельные введения могут увеличивать места на опухоли или метастазе, где может происходить бактериальная колонизация/пролиферация, или может в противном случае увеличивать титр бактерий, накапливаемых в опухоли, которая может увеличивать или усиливать иммунный ответ хозяина против опухоли хозяина.

При раздельном введении каждое введение может быть дозированным количеством, которое является таким же или отличным от других доз введения. В одном варианте осуществления все дозы введения являются одинаковыми. В других вариантах осуществления первое дозированное количество может быть более крупным дозированным количеством, чем одно или более последующих дозированных количеств, например, по меньшей мере, в 10 раз больше, по меньшей мере, в 100 раз больше или, по меньшей мере, в 1000 раз больше, чем последующие дозы. В примере способа раздельного введения, первая доза больше одной или более последующих доз, все последующие дозы могут быть одинаковыми, или меньшими по сравнению с первым введением.

Отдельные введения могут включать любое число двух или более введений, включая два, три, четыре, пять или шесть введений. Специалист в данной области легко может определить количество введений для выполнения или желательность выполнения одного или более дополнительных введений в соответствии со способами, известными в данной области техники, для мониторинга терапевтических методов и других способов мониторинга, представленных здесь. Соответственно, способы, представленные здесь, включают в себя способы предоставления субъекту одного или более введений иммуностимулирующих бактерий, где количество введений может быть определено мониторингом субъекта, и на основании результатов мониторинга определяют, следует ли обеспечить одно или более дополнительных введений. Определение того, следует ли обеспечить одно или более дополнительных введений, может быть основано на множестве результатов мониторинга, включая, но не ограничиваясь этим, указание на рост опухоли или ингибирование роста опухоли, появление новых метастазов или ингибирование метастазирования, титр анти-бактериального антитела субъекта, титр противоопухолевого антитела субъекта, общее состояние здоровья субъекта и вес субъекта.

Период времени между введениями может быть любым из множества периодов времени. Период времени между введениями может быть функцией любого из множества

факторов, включая стадии мониторинга, как описано в связи с количеством введений, периодом времени для субъекта, чтобы установить иммунный ответ, периодом времени для субъекта для очистки бактерий от нормальной ткани или периодом времени для бактериальной колонизации/пролиферации в опухоли или метастазе. В одном примере период времени может быть функцией периода времени для субъекта для того, чтобы установить иммунный ответ; например, период времени может быть больше, чем период времени для субъекта, чтобы установить иммунный ответ, такой как более чем примерно одна неделя, более чем примерно десять дней, более чем примерно две недели или более чем примерно месяц; в другом примере период времени может быть меньше, чем период времени для субъекта, чтобы установить иммунный ответ, такой как менее чем около одной недели, менее чем примерно десять дней, менее чем примерно две недели, или менее чем примерно месяц. В другом примере период времени может быть функцией периода времени для бактериальной колонизации/пролиферации в опухоли или метастазе; например, период времени может быть больше, чем период времени для детектируемого сигнала, который возникает в опухоли или метастазе после введения микроорганизма, экспрессирующего обнаруживаемый маркер, например около 3 дней, около 5 дней, около недели, около десяти дней, около двух недель или около месяца.

Способы, используемые здесь, также могут быть выполнены путем введения композиции, такие как суспензии и другие составы, содержащие иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящей заявке. Такие композиции содержат бактерии и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель, как это описано здесь или известно специалистам в данной области.

Как обсуждалось выше, применение и способы, предоставленные здесь, также могут включать введение одного или более терапевтических соединений, таких как противоопухолевые соединения или другие терапевтические средства, субъекту в дополнение к введению иммуностимулирующих бактерий субъекту. Терапевтические соединения могут действовать независимо или в сочетании с иммуностимулирующими бактериями для терапевтических эффектов опухоли. Терапевтические соединения, которые могут действовать независимо, включают любое из множества известных химиотерапевтических соединений, которые могут ингибировать рост опухоли, ингибировать рост и/или образование метастазов, уменьшать размер опухоли или метастаза, устранять опухоль или метастазирование, не снижая способность иммуностимулирующих бактерий накапливаться в опухоли, реплицироваться в опухоли и вызывать или усиливать противоопухолевый иммунный ответ у субъекта. Примеры таких

химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими, алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бисульфан, малоисульфан и пиросульфан; андрогены, такие как калькустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, меметиостан, тестолактон; антиадреналины, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гoserелин; антибиотики, такие как акланомицины, актиномицинфлуомицин, калихеамицин, каррубицин, карминомицин, карзанофилин, хроминомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелмицин, митомины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливицины, перомицин, портемицин, пуромицин, квиламицин, родорубицин, стрептоногрин, стрептозоцин, буксомицин, уенимекс, цинностатин, зорубицин; антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибиторы ароматазы 4 (5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кетоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (Fareston); антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как денптерин, метотрексат, птерптерин, тримексат; азиридины, такие как бензодепан, карбокстон, этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтилклизмин, триэтиленфосфорамидтриэтилендиоамид и триметиллолмеламин; компенсирующие фолиевую кислоту, такие как фолиевая кислота; азотные мумиды, такие как хлорамбуцил, меклопазин, хлорфос-фамид, эстрамастин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтамину, мелфалан, новинбихин, фенэстерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, раминмустин; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластинпроизводные пуриновых аналогов, такие как аргининдеиминаза и аспарагиназа; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, энцитабин, флоксуридин, 5-FU; таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел, и их альбумированные формы (тепаклитаксел и пав-доцетаксел), ингибитор топоизомеразы RFS 2000; ингибитор тимидилатсинтазы (такой как totouDEX); дополнительные химиотерапевтические средства, включая альдофосфамид гликозид; аминолевулиновую кислоту; амсакрин; бестрибуцил; бисантрен; эдарексилат; дифформетилорнитин (DMFO); эфлонитин; эллиптиум ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; Ionidамин; митогузон; митоксантрон; мопидамиол; нитрокрин; пентостатин; фенамины; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK ®; фураноксан;

спирогерманий; тенизоновую кислоту; триазакидон; 2,2', 2''-трихлортриэтиламин; урета; виндезин; дакарбазин; манмустин; миобронтол; митолактол; пипобромат; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; этопозид (VP -16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; Винкрестин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; Xeloda; ибандронат; СРТ -11; ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и ингибиторы топоизомеразы, такие как иринотекан. Также могут быть использованы фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше соединений.

Терапевтические соединения, которые действуют совместно с иммуностимулирующими бактериями, включают, например, соединения, которые повышают иммунный ответ, вызванный свойствами бактерий, например, путем увеличения экспрессии РНК, такой как shРНК и miРНК, которые ингибируют, подавляют или нарушают экспрессию генов контрольной точки, таких как PD-L1 Или TREX1 или других генов контрольных точек, или соединения, которые могут дополнительно усилить бактериальную колонизацию/пролиферацию. Например, соединение, изменяющее экспрессию гена, может индуцировать или увеличивать транскрипцию гена в бактерии, такой как экзогенный ген, например, кодирующую shРНК, которая ингибирует, подавляет или нарушает экспрессию одного или нескольких контрольных генов, вызывая тем самым иммунный ответ. Любое из широкого разнообразия соединений, которые могут изменять экспрессию гена, известны в данной области, включая IPTG И RU486. Примеры генов, экспрессия которых может регулироваться с повышением, включают в себя белки и молекулы РНК, включая токсины, ферменты, которые могут превращать пролекарство в противоопухолевое лекарственное средство, цитокины, белки, регулирующие транскрипцию, shРНК, siRNA и рибозимы. В других вариантах осуществления изобретения, терапевтические соединения, которые могут действовать совместно с иммуностимулирующими бактериями для увеличения колонизации/пролиферации или иммунного ответа, обладающего свойствами бактерий, представляют собой соединения, которые могут взаимодействовать с экспрессированным бактериями генным продуктом, и такое взаимодействие может привести к повышенному уничтожению опухолевых клеток или к повышению противоопухолевого ответа или иммунного ответа у субъекта. Терапевтическое соединение, которое может взаимодействовать с экспрессируемым бактериями генным продуктом, может включать, например, пролекарство или другое соединение, которое малотоксично или не обладает токсичностью или другой

биологической активностью в его вводимой форме, но после взаимодействия с экспрессируемым бактериями генным продуктом соединение может развивать свойство, которое приводит к гибели опухолевых клеток, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксичность, способность индуцировать апоптоз или способность инициировать иммунный ответ. В данной области известны различные пролекарственные вещества, включая ганцикловир, 5-фторурацил, 6-метилпурин дезоксирибозид, цефалоспоринодоксорубин, 4-[2-хлорэтил] п-(2-хлорэтил)(2-мезулоксиэтил)амино] бензоил-L-глутаминовую кислоту, ацетоминофен, индол-3-уксусную кислоту, СВ1954, 7-этил-10-[4-(1-пиперидино)-1-пиперидино] карбонил окситетрациклитедин, бис-(2-хлорэтил) амино-4-гидрокси фениламино метинон 28, 1-хлорэтил-5-гидрокси -1,2-дигидро -3Н-бенз[е]индол, эпирубин-глюкоронид, 5'- дезокси 5-фторуридин, цитозин арабинозид и линамарин.

3. Мониторинг

Способы, представленные здесь, могут дополнительно включать в себя один или более этапов мониторинга субъекта, мониторинга опухоли и/или мониторинга иммуностимулирующих бактерий, вводимых субъекту. В описанные здесь способы могут быть включены любые из множества этапов мониторинга, включая, но не ограничиваясь этим, мониторинг размера опухоли, мониторинг наличия и/или размера метастаз, мониторинг лимфатических узлов субъекта, мониторинг веса субъекта или других индикаторов состояния здоровья, включая маркеры крови или мочи, мониторинг титра анти-бактериального антитела, мониторинг бактериальной экспрессии детектируемого генного продукта, непосредственно контролируя бактериальный титр в опухоли, ткани или органе субъекта.

Цель мониторинга может быть просто для оценки состояния здоровья субъекта или развития терапевтического лечения субъекта, или может быть для определения того, является необходимым или нет дальнейшее введение одной и той же или другой иммуностимулирующей бактерии, или для определения, когда вводить соединение субъекту, где соединение может действовать для повышения эффективности терапевтического способа или соединение может воздействовать на снижение патогенности бактерий, вводимых субъекту.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные здесь, могут включать мониторинг одного или нескольких бактериально экспрессированных генов. Бактерии, такие как те, которые представлены здесь или хорошо известны в данной

области, могут экспрессировать один или более обнаруживаемых генных продуктов, включая, но не ограничиваясь ими, детектируемые белки.

Как предусмотрено здесь, измерение обнаруживаемого генного продукта, экспрессируемого в бактериях, может обеспечить точное определение уровня бактерий, присутствующих у субъекта. Как дополнительно представлено здесь, измерение местоположения обнаруживаемого генного продукта, например, методами визуализации, включая томографические способы, может определять локализацию бактерий у субъекта. Соответственно, способы, предоставленные здесь, которые включают в себя мониторинг выявляемого бактериального генного продукта, можно использовать для определения наличия или отсутствия бактерий в одном или нескольких органах или тканях субъекта и/или наличие или отсутствие бактерий в опухоли или метастазах субъекта. Кроме того, способы, представленные здесь, которые включают мониторинг выявляемого бактериального генного продукта, можно использовать для определения титра бактерий, присутствующих в одном или нескольких органах, тканях, опухолях или метастазах. Способы, включающие мониторинг локализации и/или титра бактерий у субъекта, могут быть использованы для определения патогенности бактерий, так как бактериальная инфекция и, в частности, уровень инфекции нормальных тканей и органов могут указывать на патогенность бактерий. Способы, включающие мониторинг локализации и/или титра иммуностимулирующих бактерий у субъекта, могут выполняться в нескольких временных точках и, соответственно, могут определять скорость бактериальной репликации у субъекта, включая скорость бактериальной репликации в одном или нескольких органах или тканях субъекта; соответственно, способы, которые включают мониторинг бактериального генного продукта, могут быть использованы для определения способности бактерий к репликации. Способы, представленные здесь, также могут быть использованы для количественного определения иммуностимулирующих бактерий, присутствующих в различных органах или тканях, и опухолях или метастазах, и, таким образом, могут указывать степень преимущественного накопления бактерий у субъекта; соответственно анализ продукта бактериального гена может быть использован в способах определения способности бактерий накапливаться в опухоли или метастазах в предпочтениях к нормальным тканям или органам. Поскольку иммуностимулирующие бактерии, используемые в описанных здесь способах, могут накапливаться во всей опухоли или могут накапливаться в нескольких сайтах в опухоли, и могут также накапливаться в метастазах, способы, предоставленные здесь для мониторинга бактериального генного продукта, могут быть использованы для определения размера

опухоли или числа метастаз, присутствующих у субъекта. Мониторинг такого присутствия бактериального генного продукта в опухоли или метастазах в течение некоторого интервала времени можно использовать для оценки изменений в опухоли или метастазах, включая рост или усадку опухоли, или развитие новых метастаз или исчезновение метастаз, и также можно использовать для определения скорости роста или усадки опухоли или развития новых метастаз или исчезновение метастазов или изменение скорости роста или усадки опухоли или развитие новых метастаз или исчезновение метастаз. Соответственно, мониторинг бактериального генного продукта может быть использован для мониторинга опухолевого заболевания у субъекта или для определения эффективности лечения неопластического заболевания, путем определения скорости роста или усадки опухоли или развития новых метастаз или исчезновения метастаз или изменения скорости роста или усадки опухоли или развития новых метастаз или исчезновения метастаз.

Любой из множества детектируемых белков может быть детектирован мониторингом, примерами которых являются любые из множества флуоресцирующих белков (например, белки, связывающие белки и антитела, где соединение, которое специфически связывается с рецептором, связывающим белком или антителом, может быть детектируемым агентом или может быть меченным детектируемым веществом (например, радионуклидом или агентом визуализации).

Размер опухоли и/или метастаз можно контролировать любым из множества способов, известных в данной области, включая методы внешней оценки или способы томографического или магнитного формирования изображения. В дополнение к методам, известным в данной области, способы, представленные здесь, например, мониторинг экспрессии бактериального гена, могут быть использованы для контроля размера опухоли и/или метастаз.

Мониторинг за несколько временных точек может предоставлять информацию, относящуюся к увеличению или уменьшению размера опухоли или метастазирования, и может также предоставлять информацию относительно присутствия дополнительных опухолей и/или метастаз у субъекта. Контроль размера опухоли в течение нескольких временных точек может обеспечить информацию о развитии опухолевого заболевания у субъекта, включая эффективность лечения неопластического заболевания у субъекта.

Способы, представленные здесь, также могут включать мониторинг титра антител у субъекта, включая антитела, продуцируемые в ответ на введение

иммуностимулирующих бактерий. Бактерии, вводимые в описанных здесь способах, могут вызывать иммунный ответ на эндогенные бактериальные антигены. Бактерии, вводимые в описанных здесь способах, также могут вызывать иммунный ответ на экзогенные гены, экспрессируемые бактериями. Бактерии, вводимые в описанных здесь способах, также могут вызывать иммунный ответ на опухолевые антигены. Контроль титра антител против бактериальных антигенов, бактериально экспрессируемых экзогенных генных продуктов или опухолевых антигенов может использоваться для контроля токсичности бактерий, мониторинга эффективности способов лечения или мониторинга уровня продукта гена или антител для получения и/или сбора.

Контроль титра антител может быть использован для контроля токсичности бактерий. Титр антител против бактерий может изменяться в течение периода времени после введения бактерий субъекту, причем в некоторых конкретных временных точках титр антител против бактериального антигена может указывать на более высокую токсичность, в то время как в другие моменты времени титр антител против бактериального антигена может указывать на более высокую токсичность. Бактерии, используемые в описанных здесь способах, могут быть иммуногенными и, следовательно, могут вызывать иммунный ответ вскоре после введения бактерий субъекту. Как правило, иммуностимулирующие бактерии, против которых иммунная система субъекта может установить сильный иммунный ответ, могут представлять собой бактерии, которые имеют низкую токсичность, когда иммунная система субъекта может удалить бактерии из всех нормальных органов или тканей. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления высокий титр антител против бактериальных антигенов вскоре после введения бактерий субъекту может указывать на низкую токсичность бактерий.

В других вариантах осуществления контроль титра антител может использоваться для контроля эффективности способов лечения. В представленных здесь способах титр антител, такой как титр антителаантиопухолевого антигена, может указывать эффективность терапевтического способа, такого как терапевтический способ лечения неопластических заболеваний. Терапевтические способы, представленные здесь, могут включать индуцирование или усиление иммунного ответа против опухоли и/или метастаз. Таким образом, путем мониторинга титра антител против опухолевого антигена можно контролировать эффективность терапевтического способа, вызывая или усиливая иммунный ответ против опухоли и/или метастаз.

В других вариантах осуществления мониторинг титра антител может быть использован для мониторинга уровня продукта гена или антител для получения и/или

сбора информации. В данном описании способы могут быть использованы для получения белков, молекул РНК или других соединений, в частности молекул РНК, таких как shРНК, путем экспрессии экзогенного гена в микроорганизме, который накапливается в опухоли. Мониторинг титра антител против белка, молекулы РНК или другого соединения может указывать на уровень продуцирования белка, молекулы РНК или другого соединения микроорганизмами, накопленными опухолью, а также может непосредственно указывать уровень антител, специфичных для такого белка, молекулы РНК или другого соединения.

Способы, представленные здесь, также могут включать в себя способы мониторинга состояния субъекта. Некоторые из раскрытых здесь способов представляют собой терапевтические способы, включая терапевтические способы лечения неопластических заболеваний. Мониторинг состояния пациента может быть использован для определения эффективности терапевтического способа, как известно в данной области техники. Способы, представленные здесь, также могут включать стадию введения субъекту иммуностимулирующей бактерии, как описано здесь. Наблюдение за состоянием здоровья субъекта может быть использовано для определения патогенности иммуностимулирующей бактерии, введенной субъекту. Можно контролировать любой из множества способов диагностики заболеваний, таких как неопластическое заболевание, инфекционное заболевание или заболевание, связанное с иммунитетом, как известно в данной области техники. Например, вес, кровяное давление, импульс, дыхание, цвет, температура или другое наблюдаемое состояние субъекта может указывать на здоровье субъекта. Кроме того, наличие или отсутствие или уровень одного или более компонентов в образце от субъекта может указывать на здоровье субъекта. Типичные образцы могут включать образцы крови и мочи, где наличие или отсутствие или уровень одного или более компонентов может быть определено путем выполнения, например, анализа крови панели или диагностического теста на основе мочи. Примерные компоненты, показывающие состояние здоровья субъекта, включают в себя, но не ограничиваются этим, концентрацию белых кровяных клеток, гематокрит и концентрацию с-реактивного белка.

Способы, представленные здесь, могут включать в себя мониторинг терапии, где терапевтические решения могут быть основаны на результатах мониторинга. Терапевтические способы, представленные здесь, могут включать введение субъекту иммуностимулирующих бактерий, где бактерии могут предпочтительно аккумулироваться в опухоли и/или метастазе, и где бактерии могут вызывать или усиливать противоопухолевый иммунный ответ. Такие терапевтические способы могут

включать различные стадии, включая многократные введения конкретной иммуностимулирующей бактерии, введение второй иммуностимулирующей бактерии или введение терапевтического соединения. Определение количества, времени или типа иммуностимулирующих бактерий или соединения для введения субъекту может быть основано на одном или нескольких результатах мониторинга субъекта. Например, титр антител у субъекта можно использовать для определения того, является ли желательным введение иммуностимулирующих бактерий и, возможно, соединения, количества бактерий и/или соединения для введения и тип бактерий и/или соединения для введения, где, например, низкий титр антител может указывать на желательность введения дополнительной иммуностимулирующей бактерии, другой иммуностимулирующей бактерии и/или терапевтического соединения, такого как соединение, которое индуцирует экспрессию бактериального гена, или терапевтического соединения, которое эффективно независимо от иммуностимулирующих бактерий.

В другом примере общее состояние здоровья субъекта может использоваться для определения того, является ли желательным введение иммуностимулирующей бактерии и, возможно, соединения, количества бактерий или соединения для введения, и типа бактерии и/или соединения для введения, например, определение того, что субъект является здоровым, может указывать на желательность введения дополнительных бактерий, различных бактерий, или терапевтического соединения, такого как соединение, которое индуцирует бактериальный ген (например, shРНК, которая ингибирует один или несколько контрольных генов). В другом примере для определения, является ли желательным введение иммуностимулирующей бактерии и, возможно, соединения, количества бактерий и/или соединения для введения, и типа бактерии и/или соединения для введения, где, например, является желательным введение иммуностимулирующей бактерии и, возможно, соединения, количества бактерий и/или соединения, и типа бактерии и/или соединения для введения, например определение того, что субъект является здоровым, может указывать на желательность введения дополнительных бактерий, различных бактерий или терапевтического соединения, такого как соединение, которое индуцирует бактериальный ген (например, shРНК, который ингибирует один или несколько контрольных генов). Такие способы мониторинга могут использоваться для определения того, является ли терапевтический способ эффективным, независимо от того, является ли терапевтический способ патогенным для субъекта, независимо от того, накапливаются ли нет бактерии в опухоли или метастазе, и независимо от того, накапливаются ли нет бактерии в нормальных тканях или органах. Исходя из таких

определений, желательность и форма дополнительных терапевтических способов могут быть получены.

В другом примере контроль может определять, находятся ли или нет иммуностимулирующие бактерии в опухоли или метастазе субъекта. При таком определении может быть принято решение для дополнительного введения дополнительных бактерий, другой иммуностимулирующей бактерии и, возможно, соединения субъекту.

Ж.ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Краткое описание некоторых примерных сконструированных иммуностимулирующих бактериальных штаммов и номенклатуры:

Штамм #	Плазмида	Основа штамма	Мишени РНК	Альтернативное название
AST-100	Нет	YS1646	Нет	VNP 20009
AST-101	Нет	YS1646-ASD	Нет	ASD (<i>asd</i> ген неактивен)
AST-102	pEQU6	YS1646	Нет	YS1646 (pEQU6 – плазмида)
AST-103	pEQU6	YS1646	Скрамблировано (shPHK)	YS1646 (pEQU6-shSCR)
AST-104	pEQU6	YS1646	muTREX1 (shPHK) ARI-108	YS1646 (pEQU6-shTREX1)
AST-105	pEQU6	YS1646	muPD-L1 (shPHK) ARI-115	YS1646 (pEQU6-shPDL1)
AST-106	pEQU6	YS1646	muTREX1 (microPHK)	YS1646 (pEQU6-miTREX1)

Штамм #	Плазмида	Основа штамма	Мишени РНК	Альтернативное название
			ARI-203	
AST-107	pATI-U6	YS1646-ASD	Scrambled (shPHK)	ASD (pATI-shSCR)
AST-108	pATI-U6	YS1646-ASD	muTREX1 (shPHK) ARI-108	ASD (pATI-shTREX1)
AST-109	pATIKAN-U6	YS1646-ASD	Скрамблировано (shPHK)	ASD (pATIKan-shSCR)
AST-110	pATIKAN-U6	YS1646-ASD	muTREX1 (shPHK) ARI-108	ASD (pATIKan-shTREX1)
AST-111	Нет	YS1646-ASD-fljb-fluC	Нет	ASD/FLG (<i>asd</i> флагеллиннеактивны)
AST-112	pATI-U6	YS1646-ASD-fljb-fluC	muTREX1 (shPHK) ARI-108	ASD/FLG (pATI-shTREX1)
AST-113	pATI-U6	YS1646-ASD-fljb-fluC	muTREX1 (shPHK) ARI-108	ASD/FLG (pATI-U6 Kan shTREX1)
AST-114	Нет	YS1646-ASD-LLO	Нет	ASD/LLO (<i>asd</i> неактивен / cytoLLO активен)
AST-115	pATI-U6	YS1646-ASD-LLO	muTREX1 (shPHK) ARI-108	ASD/LLO (pATIKan-shTREX1)
AST-116	pATIKanpBRori-U6	YS1646-ASD	Скрамблировано	ASD (pATIKanLow-shSCR)
AST-117	pATIKanpBRori-U6	YS1646-ASD	muTREX1 (shPHK) ARI-108	ASD (pATIKanLow-shTREX1)
AST-	pATIKanpBRori-	YS1646-	muTREX1	ASD/FLG

Штамм #	Плазмида	Основа штамма	Мишени РНК	Альтернативное название
118	U6	ASD-fljb-flIC	(shPHK) ARI-108	(pATIKanLow-shTREX1)
AST-119	pATIKanpBRori-U6	YS1646-ASD-pMTL-LLO	muTREX1 (shPHK) ARI-108	ASD/LLO (pATIKanLow-shTREX1)
AST-120	pEQU6	YS1646-ASD-pMTL-LLO	muTREX1 (microPHK) ARI-203	ASD/LLO(pEQU6-miTREX1) суицидальный
AST-121	pEQU6	YS1646	muVISTA ARI-157	YS1646 (pEQU6-shVISTA)
AST-122	pEQU6	YS1646	muTGF-бета ARI-149	YS1646 (pEQU6-TGF-бета)
AST-123	pEQU6	YS1645	мибета-катенин ARI-166	YS1646 (pEQU6-бета-катенин)

Следует понимать, что эти штаммы перечислены для ссылки; те же делеции и инсерции могут быть осуществлены в штамме *Salmonella typhimurium* дикого типа, таком как штамм, депонированный под регистрационным номером ATCC 14028, или штамм, имеющий все его идентифицирующие характеристики. Штамм дикого типа может быть дополнительно сделан ауксотрофным по отношению к аденозину с помощью соответствующих селекции или делеций. Конструкция и применение этих штаммов описаны в заявке PCTWO 2019/014398 и в заявке на патент США № 2019/0017050.

Пример 1

Штамм AST -101, был получен. Он представляет собой аттенуированный штамм *Salmonella typhimurium*, полученный из штамма YS1646 (который может быть приобретен из ATCC, каталог # 202165), который был сконструирован таким образом, чтобы он был с неактивным *asd* (нокаут гена *asd*). В этом примере делеция гена *Salmonella typhimurium* YS1646 *asd* была сконструирована с использованием модификаций метода Datsenko и Wanner (Proc Natl Acad Sci USA 97: 6640-6645), как показано на фиг 1, и описывается ниже. Способы и полученные продукты в этом примере и все примеры, приведенные ниже,

могут быть использованы с другими исходными бактериями, такими как *Salmonella typhimurium* дикого типа, такие как штамм, депонированный под регистрационным номером ATCC 14028.

Введение Лямбда-Красной хелперной плазмиды в YS1646

Штамм YS1646 был приготовлен таким образом, чтобы он был электрокомпетентным, как описано ранее (Sambrook J, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory) путем выращивания культуры в LB и концентрирования 10-кратного и трехкратного промывания охлажденным на льду 10% глицерином. Электрокомпетентный штамм подвергали электропорации с лямбда-Красной хелперной плазмидой pKD46 (SEQ ID NO: 218) с использованием 0,2-сантиметровой целевой кюветы при следующих параметрах: 2,5 кВ, 186 ом, 50 пФ. Трансформанты, несущие pKD46, выращивали в 5 мл среды SOC с ампициллином и 1 мМ L-арабинозой при 30° с и отбирали на чашках с LB-агаром, содержащим ампициллин. Клон YS1646, содержащий лямбда-красную хелперную плазмиду pKD46, затем был сделан электрокомпетентным, как описано выше для YS1646.

Конструирование кассеты для нокаута гена *asd*

Ген *asd* из генома YS 1646 (Broadway et Al. (2014) J Biotechnology 192: 177-178) использовали для конструирования кассеты с нокаутом гена *asd*. Плазмиду, содержащую 204 и 203 bp гомологии с левой и правой областями, соответственно, гена *asd*, трансформировали в компетентные клетки DHS-альфа. Кассету гена канамицина, фланкированную *lox P*, клонировали в эту плазмиду. Затем кассету для нокаута гена *asd* усиливали с помощью ПЦР с использованием праймеров *asd* -1 и *asd* -2 (таблица 1) и очищали на геле.

Выполнение делеции гена *asd*

Штамм YS1646, несущий плазмиду pKD46, подвергали электропорации с помощью иммобилизационной кассеты линейного гена *asd* гена *asd*. Электропорированные клетки

извлекали в среде SOC и высевали на чашки сагаром LB с добавлением канамицина (20 мкг/мл) и диаминопимелиновой кислоты (DAP, 50 Мкг/мл). Во время этой стадии рекомбиназа лямбда-красного индуцирует гомологичную рекомбинацию хромосомного *asd*-гена с *kan*-кассетой (из-за присутствия гомологичных фланкирующих последовательностей выше и ниже хромосомного *asd*-гена), и нокаутирует хромосомную копию гена *asd*. Наличие разрушенного гена *asd* в отобранных резистентных к канамицину клонах подтверждали с помощью ПЦР-амплификации с использованием праймеров из генома YS1646, фланкирующих сайты расщепления (праймер *asd* -3) и из сайта множественного клонирования (праймер *scFv* -3) (таблица 1). Колонии также дублируют на чашках с LB И без дополнительного DAP для демонстрации ауксотрофии DAP. Все клоны с делецией гена *asd* не способны расти в отсутствие дополнительного DAP, демонстрируя ауксотрофию DAP.

Таблица 1. Информация о праймере

Именованиепраймера	Последовательность праймера	SEQ ID NO.
<i>asd</i> -1	ccttctaacgcaaattccctg	219
<i>asd</i> -2	ccaatgctctgcttaactcctg	220
<i>asd</i> -3	gcctcgccatgtttcagtagc	221
<i>asd</i> -4	ggtctggtgcattccgagtagc	222
<i>scFv</i> -3	cataatctgggtccttggctctgc	223

Удаление кассеты канамицина

Селектируемый маркер *kan* удаляли с использованием сайт-специфичной рекомбинантной системы Cre/loxP. Мутантный ген YS1646*asd KanR* Трансформировали рJW168 (чувствительной к температуре плазмидой, экспрессирующей рекомбиназу SEQ ID NO: 224). Колонии AmpR отбирали при 30° C; затем рJW168 удаляли путем роста при 42° Отобранный клон (AST -101) затем тестировали на потерю *kan* путем нанесения реплики на чашки с агаром LB с канамицином и без канамицина и подтверждали с помощью ПЦР-проверки с использованием праймеров из генома YS1646, фланкирующих сайты расщепления (праймер *asd* -3 и *asd* -4, для последовательности праймера см. таблицу 1).

Характеристика мутантного Штамма AST -101 с делецией *asd*

Мутант *asd* AST -101 не способен расти на чашках с LB-агаром при 37° C, но способен расти на чашках LB, содержащих 50 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты (DAP). Скорость роста мутанта *asd* оценивали в жидкой среде LB, и она не способна расти в жидкой LB, но была способна расти в LB с добавлением 50 мкг/мл DAP, как определено измерением поглощения при 600 нМ.

Подтверждение последовательности локуса AST -101 *Asd* после делеции гена *asd*.

Делеционный штамм гена AST -101 *asd* подтверждали секвенированием ДНК с использованием праймеров *asd* -3 и *asd* -4. Секвенирование области, фланкирующей локус *asd*, было выполнено, и последовательность подтвердила, что ген *asd* был удален из хромосомы YS1646.

Пример 2

Получение модифицированных штаммов *Salmonellatyphimurium* из дикого типа *Salmonellatyphimurium*

Гены *purl*, *msbB* и *asd* были отдельно удалены из генома штамма *Salmonellatyphimurium* ATCC 14028 дикого типа с использованием системы рекомбинационной красной рекомбинации лямбда, как описано в Datsenko and Wanner (Proc Natl Acad Sci USA 97: 6640-6645), для получения штамма-основы, обозначенного как 14028:Δ*purI*/Δ*msbB*/Δ*asd*. Гены флагеллина *fljB* и *fliC* затем удаляли для получения штамма 14028:Δ*purI*/Δ*msbB*/Δ*asd*/Δ*fljB*/Δ*fliC*, затем был удален ген *pagP* для получения штамма 14028:Δ*purI*/Δ*msbB*/Δ*asd*/Δ*fljB*/Δ*fliC*/Δ*pagP*. Штаммы 14028:Δ*purI*/Δ*msbB*/Δ*asd*/Δ*fljB*/Δ*fliC* и 14028:Δ*purI*/Δ*msbB*/Δ*asd*/Δ*fljB*/Δ*fliC*/Δ*pagP* были электропорированы в плазмиду, содержащую функциональный ген *asd*, чтобы дополнить хромосомное удаление *asd* и обеспечить поддержание плазмиды *in vivo*, и эукариотическую

экспрессионную кассету, кодирующую красный флуоресцентный белок mCherry под контролем промотора EF11-альфа.

Пример 3

Модифицированные мишени *Salmonellatyphimurium* демонстрируют устойчивый рост ингибирования опухоли в множественных сингенных моделях опухоли мышей

PD-L1

Иммунная система включала несколько проверок и балансов для ограничения аутоиммунитета. Запрограммированный белок клеточной гибели 1 (PD-1) и запрограммированный лиганд 1 гибели (PD-L1) представляют собой два примера многочисленных ингибирующих "иммунных контрольных точек", которые функционируют путем понижающей регуляции иммунных ответов. Связывание PD-L1 с PD-1 влияет на сигнальные пути CD8 + Т-клеток, ухудшая пролиферацию и эффекторную функцию CD8 + Т-Клеток, и индуцирует толерантность т-Клеток (Topalianetal(2012) N Engl J Med 366: 3443-3447).

Колонизация опухоли модифицированной *Salmonellatyphimurium*, доставляющей shPHK к нокдауну гена PD-1, нарушает его связывание с PD -1, и его ингибирование CD8 + Т-клеточной функции. Ингибирование контрольной точки PD-L1/PD -1 синергически хорошо согласуется с иммуностимулирующим *S typhimurium*, содержащим плазмидную ДНК CpG, все водной терапевтической модальности. Вместо РНК иммуностимулирующую бактерию можно модифицировать для кодирования антигенсвязывающего фрагмента или одноцепочечного антитела, которое ингибирует PD-L1 или PD -1, для ингибирования пути PD-1.

Для демонстрации эффективности *invivo* штамма YS1646, содержащего плазмиду, кодирующую shPHK против PD-L1 (AST -105), или другой ингибитор PD-L1 или путь PD-1, этот штамм, в сравнении с штаммом AST-102 (содержащим контрольную плазмиду, которая также содержит звенья CpG), оценивали в модели карциномы ободочной кишки мыши. Для данного эксперимента 6-8-недельных самок мышей BALB/c (10 мышей на группу) инокулировали в правую боковую поверхность карциномы ободочной кишки

СТ26 (2×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мышей с установленными боковыми опухолями внутривенно (IV) инъектировали дважды в четыре дня, с 5×10^6 КОЕ AST -105 или AST -102, или вводили анти-PD-L1 антитело (4 мг/кг, биоксокеточный клон 10F9G2). Через шесть часов после первой IV дозы мышам брали кровь, и плазму собирали и оценивали на провоспалительные цитокины с использованием набора для мышинного воспаления сцитометрией и анализировали с помощью FACS (BD Biosciences).

Обработка штаммом AST -105 продемонстрировала статистически значимое ингибирование опухоли по сравнению с обработкой содержащим плазмиду контрольным штаммом AST -102 (69% TGI, $p = 0,05$, день 25). Ингибирование роста опухоли было также больше для лечения AST -105 (экспрессирующего shPD-L1), чем при системном введении анти-PD-L1 антитела (68% TGI против анти-PD-L1).

В сравнении с продуцированием врожденных провоспалительных цитокинов через 6 часов после внутривенной инъекции цитокины, индуцированные штаммом AST -105, были значительно выше по сравнению с анти-PD-L1 антителом ($P < 0,05$) и намного выше, чем у AST -102. Эти данные демонстрируют, что ингибирование PD-L1 внутри микроокружения опухоли, по сравнению с системным введением анти-PD-L1 антитела, однозначно активирует сильные провоспалительные цитокины, которые индуцируют противоопухолевый иммунитет и способствуют ингибированию роста опухоли в мышинной модели карциномы ободочной кишки.

Пример 4

Внутриопухолевое введение модифицированной *S typhimurium* shTREX1 обеспечивает дистальную колонизацию опухоли и полные противоопухолевые ответы в модели карциномы толстой кишки мыши

Отличительным признаком индукции адаптивного иммунитета к опухоли является способность индуцировать регрессию дистальной, необработанной опухоли. Для оценки способности штамма YS1646, содержащего плазмиду pEQU6 shPНК, индуцировать первичный и дистальный рост ингибирования опухоли в модели карциномы толстой кишки мышам с двумя боковыми сторонами 6-8-недельных самок мышам BALB/c (10 мышам на группу) инокулировали в правую и левую стороны с помощью карциномы

ободочной кишки CT26 (2×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мыши, несущие установленные боковые опухоли, были интратрахеально (IT), инъецированными дважды в четыре дня, в правую боковую опухоль с 5×10^6 КОЕ AST -104, (pEQ6 shTREX1 в YS1646), AST -105 (pEQ6 shPD -11 в YS1646) или AST -102 (плазмидный контроль в YS1646), и сравнивали с контролем PBS.

IT-инъекция AST -104 и AST -105 индуцирует значительное ингибирование роста опухоли в инъецированной опухоли по сравнению с контролем PBS (AST-105-60,5% TGI, $p = 0,03$; AST-104-61,4% TGI, $p = 0,03$ день 25). В отличие от AST -105 только AST -104 индуцирует значительное ингибирование роста дистальной, необработанной опухоли по сравнению с PBS (60% TGI, $P < 0,0001$, день 25) и значительное ингибирование роста дистальной опухоли по сравнению с AST -102, содержащим плазмидный контроль ($p = 0,004$, день 25). Штамм AST -104 также демонстрирует значительную регрессию опухоли и увеличенное выживание по сравнению с контролем PBS ($p = 0,0076$, Log-rank (Mantel-Cox) тест) с 2/10 полных ремиссий.

Для определения того, были ли бактерии колонизированы, а также дистальных опухолей, мышей, несущих опухоль, обработанных AST-104, умерщвляют и собирают опухоли. Инъецированные и дистальные опухоли переносили в м-пробирки и гомогенизировали в PBS с использованием диссоциатора gentleMACS™ (MiltenyiBiotec). Гомогенаты опухоли последовательно разбавляли и высевали на чашки с агаром LB и инкубировали при 37° C для определения колониеобразующих единиц (КОЕ). Как показано на фиг 2, дистальную опухоль колонизировали в той же степени, что и инъецированная опухоль, что указывает на то, что сконструированные штаммы *Salmonella*, для которых применяли интраперитонеальный путь введения, способны транзит и колонизировать дистальные поражения. Эти данные демонстрируют эффективность введения иммуностимулирующих бактерий внутрь опухоли с возможностью системной колонизации дистальных опухолевых поражений предпочтительно над другими органами, и эффективность активации пути интерферона типа I, что приводит к системной регрессии опухоли и полной ремиссии.

Пример 5

Модифицированные штаммы *S typhimurium* с плазмидами, содержащими CpG-Элементы, демонстрируют повышенную противоопухолевую активность по сравнению сродительским штаммом YS1646

Toll-подобные рецепторы (TLR) являются ключевыми рецепторами для определения связанных с патогенами молекулярных структур (PAMP) и активации врожденного иммунитета против патогенов (Akira et al. (2001) Nat. Immunol. 2 (8): 675-680). Из них TLR9 ответственен за распознавание гликозилированных звеньев CpG в патогенной ДНК, что не встречается в природе в ДНК млекопитающих (McKelvey et al. (2011) J Autoimmunity 36: 76). Распознавание звеньев CpG при фагоцитозе патогенов в эндосомах в подмножествах иммунных клеток индуцирует IFR7-зависимую сигнализацию интерферона типа I и активирует врожденный и адаптивный иммунитет. Здесь показано, что штамм *S typhimurium* YS1646, несущий модифицированные плазмиды *Salmonella typhimurium*, содержащие звенья CpG (YS1646 pEQU6 скремблирование), аналогичным образом активируют TLR9 и индуцируют опосредованный IFN типа I врожденный и адаптивный иммунитет по сравнению с штаммом YS1646 без плазмиды.

Звенья CpG в сконструированных плазмидах, используемых здесь, показаны в таблице 2. Плазмида pEQU6 shSCR (неродственная shPHK) в штамме AST -103 обладает 362 звеньями CpG, что указывает на то, что доставка плазмиды на основе *Salmonella* может быть иммуностимулирующей и оказывать противоопухолевое действие по сравнению с теми же *Salmonella*, не имеющими трансформации с этой плазмидой. Для оценки способности CpG-содержащих плазмид в YS1646 индуцировать ингибирование роста опухоли в модели карциномы ободочной кишки мыши 6-8-недельных самок мышей BALB/c (9 мышей на группу) инокулировали подкожно (SC) в правый бок с CT26 (2×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мышей с установленными боковыми опухолями внутривенно инъецировали тремя дозами 5×10^6 CEUs YS 1646 (AST -100) или YS1646, содержащих shPHK скремблированную плазмиду со звеньями CpG (AST -103), и сравнивали с контролем PBS.

Таблица 2. Звенья CpG в сконструированных плазмидах

Наименование последовательности	Число звеньев CpG	SEQ ID NO.
pBR322 Начало	80	243

pEQU6 (shSCR)	362	244
Asdген ORF	234	242
pATI-2.0	538	245

Как показано на фиг.3, штамм YS1646 (AST-100) демонстрирует умеренное управление опухолью (32% TGI, $p = ns$, день 28) по сравнению с PBS. Штамм AST -103, который отличается от YS1646 только путем добавления CpG-содержащей плазмиды, кодирующей неродственную скремблированную shPНК, демонстрирует высокозначимое ингибирование роста опухоли по сравнению с одним YS1646, не трансформированным и, следовательно, отсутствует плазида ($p = 0,004$, день 32).

Ген *asd* обладает 234 звеньями CpG (таблица 2), что указывает на то, что плазида, содержащая его, может обладать иммуностимулирующими свойствами. Как показано на фиг.16, AST -109 (YS 1646-ASD со скремблированной shPНК) имел 51% ингибирования роста опухоли в сравнении с PBS, что указывает на сильный иммуностимулирующий эффект.

Эти данные демонстрируют мощные иммуностимулирующие свойства плазмидной ДНК, содержащей активирующие TRU9CpG-звенья TLR9 внутри направленного против опухоли штамма *S typhimurium*.

Пример 6

Синтез вектора

Комплементация делеций *asd* посредством экспрессии *asd* из плазмид

Плазмиду (pATIU6) синтезировали химически и собирали (SEQ ID NO: 225). Плазида содержала следующие признаки: начало или репликация в большом количестве копий (pUC19), промотор U6 для проведения экспрессии короткой шпильки, ген устойчивости к ампициллину, фланкированный сайтами рестрикции HindIII для последующего удаления, и ген *asd*, содержащий 85 пар оснований последовательности, расположенной выше стартового кодона (SEQ ID NO: 246). В этот вектор, shRNA, нацеливающие на мышиную TREX1 Или скремблированную неродственную shPНК-последовательность, вводят путем рестрикции рестриктазами SpeI и XhoI и

лигирование миклонированием в *E coli* DH5-alpha. Полученные плазмиды, обозначенные pATI-shTREX1 и pATI-shSCR, соответственно, амплифицировали в *E coli* и очищали для трансформации в штамм AST -101 с нокаутом *asd* путем электропорации и клонального отбора на чашках с LB amp для получения штаммов AST -108 и AST -107 соответственно. Мутанты *asc*, дополненные плазмидами pATIU6, полученными из pATIU6, способны расти в LB-агаре и жидкой среде в отсутствие DAP.

В последующей итерации ген устойчивости к ампициллину (AmpR) из pATI-shTREX1 заменяли на ген устойчивости к канамицину. Это осуществляют путем расщепления плазмиды pATI-shTREX1 с помощью Hind III с последующей очисткой геля для удаления гена AmpR. Производили ПЦР-амплификацию гена устойчивости к канамицину (KanR) с использованием праймеров APR -001 И APR -002 (SEQ ID NO: 226 и SEQ ID NO: 227), расщепление Hind III или лигирование в очищенный гель, расщепленную плазмиду pATIU6.

В последующих итерациях одноточечную мутацию вводили в плазмиду pATIKan в начале репликации pUC19 с использованием набора для направленного мутагенеза Q5® (NewEnglandBiolabs) и праймеров APR -003 (SEQ ID NO: 228) И APR -004 (SEQ ID NO: 229) для изменения нуклеотида Т в положении 148 до С. Эта мутация делает начало репликации гомологичным началу репликации pBR322, для уменьшения числа копий плазмиды.

Праймер ID	Описание	Последовательность	SEQ ID NO
APR-001	Канпрайм epF	AAAAAAGCTTGCAGCTCTGGCCCGTG	226
APR-002	Канпрайм epR	AAAAAAGCTTTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGA	227
APR-003	pATlori T148CF	ACACTAGAAGgACAGTATTTGGTATCTG	228
APR-004	pATlori T148CR	AGCCGTAGTTAGGCCACC	229

pATI2.0

Сконструировали и синтезировали плазмиду, которая содержит следующие признаки: начало репликации pBR322, последовательность ДНК-мишени ДНК SV40 (DTS), терминатор tmB, промотор U6 для проведения экспрессии shРНК с последующим фланкированием сайтами рестрикции для клонирования промотора и shРНК или microРНК, ген *asd*, терминатор *tmG* и ген устойчивости к канамицину, фланкирование сайтами *Hind*III для отверждения, и сайт множественного клонирования (SEQ ID NO: 247). Кроме того, была сконструирована и синтезирована плазида для экспрессии двух отдельных shРНК или microРНК. Эта плазида содержит следующие признаки: начало репликации pBR322, последовательность ДНК-мишени ДНК SV40 (DTS), терминатор *tmB*, промотор U6 для активации экспрессии shРНК с последующим фланкированием сайтами рестрикции для клонирования промотора и shRNA или microРНК, промотор *H1* для возбуждения экспрессии 2-й shРНК или microРНК, ген *asd*, терминатор *tmG* и ген устойчивости к канамицину, фланкированный сайтами *Hind*III для отверждения, и сайт множественного клонирования (SEQ ID NO: 245).

Пример 7***S typhimurium* флагеллинокаутный штамм - конструирование путем делеции генов *fliC* и *fliJ***

В данном примере штаммы *S typhimurium* были сконструированы для того, чтобы не было флагеллиновых субъединиц *fliC* и *fliJ* для уменьшения провоспалительной сигнализации. Делеции *fliC* и *fliJ* последовательно конструировали в хромосоме штамма YS 1646 (AST -101) с удаленным геном *asd* (AST -101).

Делеция *fliC*

В этом примере *fliC* был удален из хромосомы штамма AST -101 с использованием модификаций метода Datsenko и Wanner (Proc Natl Acad Sci USA 97: 6640-6645 (2000)), как подробно описано в примере 1 и схематически изображено на фиг.4. Последовательности гена гомологичного гена *fliC* были упорядочены, которые содержали 224 и 245 оснований гомологичной последовательности, фланкирующей ген *fliC*, клонированы в плазмиду,

называемую pSL0147 (SEQ ID NO: 230). Затем кассету гена канамицина, фланкированную сайтами cre/lox p, клонировали в pSL0147, затем кассету для нокаута гена *fliC* амплифицировали с помощью ПЦР с праймером *flic* -1 (SEQ ID NO: 232) и *flic* -2 (SEQ ID NO: 233) и очищали на геле и вводили в штамм AST -101, несущий чувствительную к температуре рекомбинационную плазмиду pKD46 путем электропорации. Электропорированные клетки извлекали в среде SOC + DAP и высевали на чашки с агаром LB с добавлением канамицина (20 мкг/мл) и диаминопимелиновой кислоты (DAP, 50 мкг/мл). Колонии отбирали и скринировали для введения нокаутного фрагмента с помощью ПЦР с использованием праймеров *flic* -3 (SEQ ID NO: 234) и *flic* -4 (SEQ ID NO: 235). Затем pKD46 отверждали путем культивирования выбранного штамма устойчивости к канамицину при 42° C и скрининга на потерю устойчивости к ампициллину. Затем маркер устойчивости к канамицину был излечен путем электропорации температурочувствительной плазмиды, экспрессирующей Cre-рекомбиназу (pJW1680), а Amp-колонии отбирали при 30° C; затем pJW168 удаляли путем выращивания культур при 42° C. Отобранные клоны, нокаутирующие *fliC*, затем тестировали на потерю устойчивости к канамицину с помощью ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих сайты расщепления (*flic* -3 и *flic* -4), и оценки электрофоретической подвижности на агарозных гелях.

Делеция *fliB*

Затем *fliB* удаляли в плазмиде *asd/fliC* с удаленной YS1646 с использованием модификаций способов, описанных выше. Синтетические последовательности гомологичных генов *fliB*, которые содержали 249 и 213 оснований левой и правой последовательностей, соответственно, фланкирующих ген *fliC*, синтезировали и клонировали в плазмиду, называемую pSL0148 (SEQ ID NO: 231). Затем кассету гена канамицина, фланкированную сайтами CRE/loxP, клонировали в pSL0148, и затем кассету для нокаута гена *fliB* амплифицировали с помощью ПЦР с праймером *fliB*-1 (SEQ ID NO: 236) и *fliB* -2 (SEQ ID NO: 237) и очищали на геле и вводили в AST -101, несущую чувствительную к температуре рекомбинационную плазмиду pKD46 путем электропорации. Затем ген устойчивости к канамицину был излечен посредством cre-опосредованной рекомбинации, как описано выше, и чувствительные к температуре плазмиды были отверждены путем роста при подходящей температуре. Нокаутные

последовательности гена *fliC* и *fljB* амплифицировали с помощью ПЦП с использованием праймеров *flic*-3 и *flic*-4 или *fljb*-3 (SEQ ID NO: 238) и *fljb*-4 (SEQ ID NO: 239) и подтверждали секвенированием ДНК. Это мутантное производное YS1646 *asd/fliC/fljB* для обозначали AST -111.

Информация о последовательности праймера

Наименование праймера	Последовательность праймера	SEQ ID NO.
<i>flic</i> -1	CGTTATCGGCAATCTGGAGGC	232
<i>flic</i> -2	CCAGCCCTTACAACAGTGGTC	233
<i>flic</i> -3	GTCTGTCAACAACCTGGTCTAAC GG	234
<i>flic</i> -4	AGACGGTCCTCATCCAGATAAG G	235
<i>fljb</i> -1	TTCCAGACGACAAGAGTATCGC	236
<i>fljb</i> -2	CCTTTAGGTTTATCCGAAGCCAG AATC	237
<i>fljb</i> -3	CACCAGGTTTTTCACGCTGC	238
<i>fljb</i> -4	ACACGCATTTACGCCTGTCTG	239

Характеристика *In vitro* сконструированного нокаутного штамма *S. typhimurium*

Штамм *asd*, полученный из штамма YS1646, содержащий делеции как *fliC*, так и *fljB*, называемый здесь AST-111 или ASD/FLG, оценивали путем нанесения 10 мкл культуры на плавающие чашки (LB, содержащий 0,3% агара и 50 мг/мл DAP). Хотя подвижность наблюдалась для YS1646 и AST -101, делетированного *asd*, подвижность не была очевидной при использовании штамма AST -111 с делециями *asd/fliC/fljB*. Затем штамм AST-111 подвергли электропорации с рАТIshTREX1 (плазмида, содержащая ген *asd* и *shP*НК-нацеливающий TREX1) для получения AST-112, и ее скорость роста в отсутствие DAP оценивали. Как показано на фиг.5, штамм ASD/FLG (рАТI-shTREX1) AST-112 способен реплицироваться в LB в отсутствие дополнительного DAP и расти со скоростью, сравнимой с штаммом *asd*, содержащим рАТIshTREX1 (AST -108). Эти данные показывают, что исключение флагеллина не снижает пригодность *S. typhimurium* *in vitro*.

Исключение субъединиц флагеллина снижает пироптоз в макрофагах. Для демонстрации этого 5×10^5 клеток мыши RAW-dual™ (InvivoGen, SanDiego, Ca.) инфицировали штаммом с делецией *asd/fliC/fljB*, содержащем плазмиду shTREX1 с низким числом копий, обозначенную AST-118, или штаммом с удаленным *asd*, содержащим ту же плазмиду (AST-117) при MOI приблизительно 100 в тесте на защиту от гентамицина. После 24 часов заражения супернатанты культуры собирали и оценивали на выделение лактатдегидрогеназы в качестве маркера клеточной гибели с использованием набора для анализа цитотоксичности Pierce™ LDH (ThermoFisherScientific, Waltham, Ma.). AST-117 индуцирует 75% максимальное высвобождение LDH, в то время как AST-118 индуцирует 54% максимальное высвобождение LDH, что свидетельствует о том, что делеция генов флагеллина снижает индуцируемый *S typhimurium* пироптоз.

Нокаутный штамм ASD/FLG, содержащий плазмиду shTrex1, демонстрирует повышенную противоопухолевую активность, усиленные ответы интерферона гамма и повышенную колонизацию опухоли у мышей по сравнению с родительским штаммом asd.

Для оценки влияния нокаутных штаммов флагеллина, вводимых в мышинной модели карциномы ободочной кишки, 6-8-недельных самок мышей BALB/c (10 мышей на группу) инокулировали в правый бок с CT26 (2×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мышей с установленными боковыми опухолями внутривенно инъецировали тремя недельными дозами 5×10^6 КОЕ штамма ASD/FLG, содержащего плазмиду pATIKan-shTREX1 (AST-113), или штамм ASD с той же плазмидой pATIKan-shTREX1 (AST-110) и по сравнению с контролем PBS. Через шесть часов после первой IV дозы у мышей брали кровь, и плазму собирали и оценивали на провоспалительные цитокины с использованием набора для мышинного воспаления сцитометрией и анализировали с помощью FACS (BD Biosciences).

Как показано на фиг.6, штамм AST-113, неспособный к образованию флагелл и содержащий плазмиду pATIshTREX1 (ASD/FLG pATI-shTREX11, демонстрирует улучшенный контроль опухоли по сравнению с родительским ASD pATI-shTREX11 штаммом AST-110, и значимый контроль опухоли по сравнению с контролем PBS (54% TGI, $p = 0,02$, день 17).

Сравнивая уровни системных цитокинов в сыворотке через 6 часов после внутривенной инъекции, цитокины, индуцированные штаммом AST-113, были сравнимы для TNF-альфа и IL-6 по сравнению с родительским штаммом AST-110, способным к образованию флагелл. Уровни эффективного противоопухолевого или иммунного цитокина IFN-гамма были значительно выше для AST-113 по сравнению с AST-110, что указывает на то, что штамм, дефицитный по флагеллину, может обеспечить превосходную противоопухолевую активность по сравнению с родительским штаммом, нокаутным по *asd* (см. фиг.7).

Через 35 дней после имплантации опухоли (через 12 дней после последней дозы генной терапии *Salmonella*) три мыши на группу умерщвляют, и опухоли гомогенизируют и высевают на чашки LB для подсчета количества образующих колоний единиц (КОЕ) на грамм ткани опухоли, как описано выше. Как показано на фиг 8, штамм AST-113, делетированный по *fliC* и *fliB* и содержащий плазмиду *pAT1shTREX1*, способен колонизировать опухоли, по меньшей мере, так же, как и штамм, который имел делецию гена *asd* и содержал ту же плазмиду (AST-110). AST-113 колонизированные опухоли со средним значением $1,2 \times 10^7$ КОЕ на грамм ткани по сравнению со средним значением $2,1 \times 10^6$ КОЕ/г опухоли для AST-110, что указывает на то, что отсутствие флагеллина может привести к повышенной колонизации опухоли более чем в 5 раз выше, чем у штаммов с функциональной флагеллой. Вместе эти данные показывают, что, в противоположность ожиданию из уровня техники, не только флагелла не требуется для колонизации опухоли, но ее потеря может усилить колонизацию опухоли и противоопухолевый иммунитет.

Пример 8

***S typhimurium*, сконструированный для экспрессии cytoLLO для усиленной доставки плазмиды**

В этом примере с удаленным *asd* штамм YS1646, описанный в примере 1 (AST-101), был дополнительно модифицирован для экспрессии белка листериолизина O (LLO), не имеющего сигнальной последовательности, которая накапливается в цитоплазме штамма *Salmonella* (упоминаемого здесь как cytoLLO). LLO представляет собой

зависимый от холестерина порообразующий цитолизин, который секретируется из *Listeria monocytogenes* и опосредует фагосомальную утечку бактерий. Ген, кодирующий LLO, с удаленными кодонами 2-24, синтезировали с кодонами, оптимизированными для экспрессии в *Salmonella*. Последовательность открытой рамки считывания cytoLLO представлена в SEQ ID NO: 240. Ген cytoLLO был помещен под контролем промотора, индуцирующего транскрипцию в *S. typhimurium* (SEQ ID NO: 241, воспроизведенный ниже). Экспрессионную кассету cytoLLO встраивали в одну копию в нокаутный локус *asd* штамма AST-101, делетированного по *asd*, с использованием модификаций метода Datsenko и Wanner (Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97: 6640-6645), как описано в примере 1

Последовательность промотора, приводящего в действие экспрессию cytoLLO

Промотор LLO	attatgtcttgacatgtagtgagtgaggctggtataatgcagcaag	SEQ ID NO: 241
-----------------	--	-------------------

Делеционный по *asd* штамм с экспрессионной кассетой cytoLLO, вставленной в локус *asd* (упоминаемый здесь как ASD/LLO или AST-114), был дополнительно модифицирован путем электропорации с плазмидой pATI, кодирующей ген *asd*, который позволяет штамму расти в отсутствие экзогенного DAP и выбирает для поддержания плазмиды, а также содержит промотор U6, приводящий в действие экспрессию shTREX1, как описано в примере 6 (называемый здесь ASD/LLO (pATI-shTREX1) или AST-115). Как показано на фиг 9, штамм ASD/LLO (pATI-shTREX1) AST-115 рос с сравнимой скоростью с делетированным по *asd* штаммом, содержащим ту же плазмиду (pATI-shTREX1), AST-110, демонстрируя то, что нокаут LLO не влияет на бактериальную пригодность *in vitro*.

S. typhimurium, сконструированный для получения cytoLLO, демонстрируют мощную противоопухолевую активность

Для определения того, обеспечивал ли ген cytoLLO противоопухолевую эффективность, штамм ASD/LLO (pATI-shTREX1) AST-115 оценивали на мышинной модели карциномы ободочной кишки. Для этого исследования 6-8-недельных самок мышей BALB/c (8 мышей на группу) инокулировали в правый бок с CT26 (2×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мышам с установленными боковыми опухолями внутривенно инъецировали одну дозу 5×10^6 КОЕ AST-115 и сравнивали с контролем PBS.

Как показано на фиг.10, добавление гена *cytoLLO* в штамм *asd ASD/LLO* (рATI-shTREX1) продемонстрировало значительное управление опухолью по сравнению с контролем PBS (76% TGI, $p = 0,002$, день 28) и сравнимую эффективность после одной дозы до предыдущих исследований, в которых получали плазмиду, содержащую TREX1 shrPHK, в нескольких дозах. Эти данные демонстрируют опосредованное *cytoLLO* преимущество доставки большего количества плазмиды в цитозоль, что приводит к более интенсивному нокдауну гена, тем самым улучшая терапевтическую эффективность PHK против мишеней, таких как TREX1.

Пример 9

Аденозинауксотрофные штаммы *S typhimurium*

Штаммы, представленные здесь, конструируют так, чтобы они были ауксотрофными по отношению к аденозину. В результате они ослабляются *in vivo*, поскольку они не способны реплицироваться в низких концентрациях аденозина нормальной ткани, поэтому колонизация происходит главным образом в микроокружении твердой опухоли, где уровни аденозина являются высокими. Штамм *Salmonella* YS1646 (AST -100) является производным штамма ATCC 14028 дикого типа и сконструирован так, чтобы он был ауксотрофным для пурина из-за разрушения гена *purI* (Lowetal(2004) *Methods Mol. Med.* 90: 47-60). Последующий анализ всего генома YS 1646 показал, что ген *purI* (синоним *purM*) не был фактически удален, а вместо этого был разрушен с помощью хромосомной инверсии (Broadwayetal. (2014) *J Biotechnol.* 20: 177-178), что весь ген все еще содержался в двух частях хромосомы YS1646, которая фланкирована инсерционными последовательностями (одна из которых имеет активную транспозазу).

Наличие полной генетической последовательности гена *purI*, открывает возможность реверсии к гену дикого типа. В то время как это было ранее показано, что ауксотрофия пурина YS 1646 была стабильной после последовательного пассажа *in vitro*, не ясно, какая скорость реверсии (Clairmontetal. (2000) *J Infect. Dis.* 181: 1996-2002).

Здесь показано, что при использовании аденозина YS1646 способен реплицироваться в минимальной среде, тогда как родительский штамм ATCC 14028 дикого типа может расти в минимальной среде, которая не дополнена аденозином. YS1646

выращивали в течение ночи в среде LB, промытой минимальной средой M9, и разбавляли до минимальной среды M9, не содержащей аденозина, или возрастающими концентрациями аденозина. Рост измеряли, используя спектрофотометр SpectraMax® M3 (MolecularDevices) при 37° C, считывая OD₆₀₀ каждые 15 минут.

Как показано на фиг. 11, Штамм YS1646 был способен реплицироваться, когда аденозин был обеспечен в концентрациях от 11 до 300 микромолей, но был полностью неспособен реплицироваться в среде M9 или M9 с добавлением 130 наномолей аденозина. Эти данные показывают, что мутанты *rugI* способны реплицироваться в концентрациях аденозина, которые обнаруживаются в микроокружении опухоли, но не в концентрациях, обнаруженных в нормальных тканях. Сконструированные ауксотрофные штаммы аденозина, приведенные в качестве примера в данном описании, включают штаммы, в которых все или части открытой рамки считывания *rugI* удаляются из хромосомы для предотвращения реверсии к дикого типа. Такие делеции генов могут быть достигнуты с использованием системы лямбда-красного, как описано в Примере 1.

Штаммы *Salmonella*, содержащие разрушения *rugI*, дополнительно сконструировали так, чтобы они содержали делецию гена *asd* (ASD), как описано в примере 1, или содержащую делецию гена *asd*, сконструированную таким образом, чтобы они имели делеции *fliC* и *fliB* (ASD/FLG), как описано в примере 7, или мутанты *asd*, сконструированные далее для экспрессии *cytoLLO* (ASD/LLO), как описано в примере 8, и дополненные плазмидой с низким количеством копий (*pATLow*), экспрессирующую *asd*, как описано в Примере 6 (штаммы AST-117, AST-118 и AST-119, соответственно), также оценивали на рост в минимальной среде M9. Данные на фиг. 12 показывают, что каждый штамм способен реплицироваться, когда аденозин был получен в концентрациях от 11 до 300 микромолей, но был полностью неспособен реплицироваться в среде M9 или M9 с добавлением 130 наномолей аденозина.

Пример 10

Характеристика и применение системы комплементации гена *asd* in vitro. Рост штаммов с комплементом гена *asd*

Для оценки пригодности бактериальных штаммов, содержащих плазмиды, проводили кривые роста в жидкой среде LB, используя планшет-ридер Spectramax При 37° с, считывая OD600 каждые 15 минут. Как показано на фиг.13, штамм YS1646, содержащий плазмиду pEQU6-shTREX1 (AST -104) с низким числом копий, рос сравнимо с штаммом YS1646, который не содержал плазмиды (AST -100). Штамм *asd*, несущий высококопийную плазмиду shTREX1 с геном *asd*, который может дополнить делецию *asd* (AST-110), способен реплицироваться в LB в отсутствие DAP, но рос медленнее, чем штамм YS1646. Делеционный по *asd* штамм, содержащий экспрессирующую плазмиду shTREX-1 с низкокопийным источником репликации и ген *asd*, который может дополнить делецию *asd* (pATIlow-shTREX1), штамм AST-117, рос более высокой скоростью, чем AST-110. Эти данные демонстрируют, что плазмиды с низким числом копий, которые дополняют делецию гена *asd*, превосходят плазмиды с высоким числом копий, так как они обеспечивают более высокие скорости репликации *S typhimurium* *in vitro*.

Внутриклеточный рост дополненных по *asd* штаммов

Для измерения пригодности мутантов *asd*, дополненных *asd* на высоко-и низкокопийных плаزمиды, способность бактериальных штаммов реплицироваться внутриклеточно в линиях опухолевых клеток мышей оценивали с использованием анализа защиты гентамицина. В этом анализе клетки меланомы мыши B16.F 10 или клетки линии CT26 рака толстой кишки мыши инфицировали мутантными штаммами *Salmonella*, содержащими плазмиды, которые содержат комплементарный ген *asd* и имеют либо высококопийное начало репликации, AST-110 (ASD pATI-shTREX1), либо низкокопийное начало репликации, AST-117 (ASD pATIlowcopy-shTREX1). Клетки инфицировали при множественности приблизительно 5 бактерий на клетку в течение 30 минут, затем клетки промывали PBS и добавляли среду, содержащую гентамицин, для уничтожения внеклеточных бактерий. Внутриклеточные бактерии не убиваются гентамицином, поскольку они не пересекают клеточную мембрану. В различные моменты времени после заражения клеточные монослои лизировали осмотическим шоком с водой и клеточные лизаты разбавляли и высевали на LB-агар для подсчета выживших колониеобразующих единиц (КОЕ).

Как показано на фиг.14, мутантный по *asd* штамм, дополненный высококопирующей плазмидой AST-110, имел начальное снижение КОЕ, но был способен расти в клетках

B16.F10, но не в клетках СТ26, демонстрируя, что система комплементации гена *asd* является достаточной для поддержки роста внутри опухолевых клеток млекопитающих. Мутантный штамм *asd*, содержащий низкокопийную плазмиду AST-117, способен мигрировать и реплицироваться в обоих типах клеток, демонстрируя, что комплементация гена *asd* на низкокопийной плазмиде позволяет обеспечить устойчивый мутантный рост в клетках млекопитающих. Штамм с низкокопийной плазмидой реплицировался до более высокого числа в обоих типах опухолевых клеток по сравнению с штаммом с высококопирующей плазмидой. Это демонстрирует, что штаммы *Salmonella* с низкокопийными плазмидами обладают улучшенной пригодностью по сравнению с штаммами с высококопийными плазмидами.

Поддержание плазмиды в опухолях с использованием системы комплементации *asd*

В этом примере мышей, несущих опухоль СТ26, обрабатывали штаммом YS1646, содержащим плазмиду, которая экспрессирует shРНК-нацеливающий TREX1 (pEQU6-TREX1), штамм AST-104, или штамм с делецией *asd* YS1646, содержащий плазмиду с функциональным геном *asd* и shРНК-нацеливающий TREX1 (pATI-shTREX1), штамм AST-110. Через 12 дней после конечной инъекции *Salmonella* опухоли гомогенизировали и гомогенаты серийно разводили и высевали на чашки с агаром LB для подсчета общего количества присутствующих КОЕ, или на чашки LB, содержащие канамицин, для перечисления количества устойчивых к канамицину колоний.

Как показано на фиг. 15, *S typhimurium*, который не имел селективного давления для поддержания плазмиды shРНК, AST-104, продемонстрировал потерю плазмиды так как процент колоний, устойчивых к канамицину (KanR), был менее 10%. Штамм, который использовал систему комплементации гена *asd* для поддержания плазмиды, AST-110, имел почти идентичное число неустойчивых к канамицину и устойчивых к канамицину КОЕ. Эти данные показывают, что система комплементации гена *asd* является достаточной для поддержания плазмиды в контексте микроокружения опухоли у мышей.

Повышенная противоопухолевая эффективность с использованием системы комплементации *asd*

Система комплементации *asd* предназначена для предотвращения потери плазмиды и потенцирования противоопухолевой эффективности ингибиторной РНК-доставки штаммами *S typhimurium* *in vivo*. Для того чтобы проверить это, штаммы, с удаленными *asd*, содержащие плазмиду *shTREX1* (AST -110) или скремблированный контроль (AST -109), которые содержат функциональную кассету гена *asd*, сравнивали с YS1646, содержащим *pEQU6-shTREX1* (AST -104 плазида, в которой отсутствует кассета гена *asd* и поэтому не имеет механизма для поддержки плазмид) для противоопухолевой эффективности в модели карциномы толстой кишки мыши. Для данного эксперимента 6-8-недельных самок мышей BALB/c (8 мышей на группу) инокулировали в правый бок с CT26 (2×10^5 клеток в 100 мкл PBS). В мышей, несущих установленные боковые опухоли, вводили дважды, на 8-й и 18-й день, 5×10^6 КОЕ AST -109 (ASD, трансформированных *pATI-shScramble*), AST-110 (ASD, трансформированный *pATI-shTREX1*), или AST -104 (YS1646, трансформированный *pEQU6-shTREX1*), и сравнивали с контролем PBS.

Как показано на фиг.16, штамм YS1646 AST -104 продемонстрировал контроль опухоли по сравнению с PBS (70% TGI, день 28), несмотря на продемонстрированную потерю плазмиды в течение времени. Штамм *asd*, содержащий контроль скремблирования в плазмиде *pATI* с системой комплементации гена *asd* (AST -109), продемонстрировал контроль опухоли по сравнению с PBS (51% TGI, день 25), что указывает на то, что поддерживаемая доставка CpG-плазмид стимулирует противоопухолевую реакцию. Штамм *asd*, содержащий плазмиду с системой комплементации *asd* и *shTREX1* (AST-110) показал наивысшее ингибирование роста опухоли по сравнению с PBS (82% TGI, $P = 0,002$, день 25). Эти данные демонстрируют, что улучшенная активность достигается путем предотвращения потери плазмиды с использованием системы комплементации *asd* и доставки *shTREX1* по сравнению с YS1646, содержащими плазмиды без систем комплементации гена или *shTREX1*

Штаммы *S typhimurium* с низкокопийными плазмидами демонстрируют превосходную противоопухолевую эффективность и колонизацию опухоли по сравнению с высококопийными плазмидами.

Для сравнения противоопухолевой эффективности низкокопийной плазмиды shTREX1 с системой комплементации *asd* относительно высококопирующей плазмиды shTREX1 на мышинной модели карциномы ободочной кишки 6-8-недельных самок мышей BALB/c (10 мышей на группу) инокулировали в правый бок CT26 (2×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мышей с установленными боковыми опухолями внутривенно инъецировали двумя недельными дозами 5×10^6 КОЕ AST-117 (ASD (pATI_{Low}-shTREX1)) или AST-110 (ASD (pATI-shTREX1)) и сравнивали с инъекциями PBS в качестве отрицательного контроля. Как показано на фиг.17, штамм с низкокопирующей плазмидой AST-117 демонстрирует превосходную противоопухолевую эффективность по сравнению с штаммом с высококопирующей плазмидой AST-110 (Высокая: 59% TGI, низкая: 79% TGI, $p = 0,042$, день 25).

В конце исследования ингибирования роста опухоли 4 мышей из каждой группы умерщвляют, и опухоли и селезенки гомогенизируют, как описано выше, для оценки колонизации опухоли и отношения колонизации опухоли к селезенке. Как показано на фиг.18А, для штамма, содержащего плазмиду с низким копированием, AST-117, колонизация опухоли была на уровне, более чем в 100 раз выше, чем для штамма с высококопирующей плазмидой, AST-110. Когда вычисляли отношение колоний, выделенных из опухоли и селезенки, AST-117 имеет более чем 10-кратное более высокое отношение опухоли к колонизации селезенки по сравнению с AST-110 (фигура 18В), демонстрируя, что штамм с низкокопирующей плазмидой обладает большей специфичностью к колонизации опухоли, чем штамм с высококопирующей плазмидой.

Эти данные демонстрируют ранее неизвестный признак, что *S.typhimurium*, сконструированные для доставки плазмид, кодирующих интерферирующие РНК, имеют улучшенные характеристики колонизации опухоли и противоопухолевую эффективность, когда плазмиды имеют низкое число копий начал репликации.

Пример 11

Конструирование автолитического штамма *S typhimurium* для доставки РНК.

Как описано выше, ген *asd* в *S.typhimurium* кодирует аспартат-полуальдегид-дегидрогеназу. Делеция этого гена делает бактерии ауксотрофными для

диаминопимелиновой кислоты (DAP) при выращивании *In vitro* или *in vivo*. Этот пример применяет делеционный штамм *asd* (описанный в примере 1), который является ауксотрофным для DAP и содержит плазмиду, пригодную для доставки РНК, которая не содержит *asd* -комплементирующий ген так, чтобы штамм был дефектным для репликации *in vivo*. Этот штамм размножается *in vitro* в присутствии DAP и растет нормально, а затем вводится в качестве иммунотерапевтического средства на хозяев млекопитающих, где отсутствует DAP, что приводит к автолизу бактерий. Автолитические штаммы способны внедрять клетки-хозяева, но не способны реплицироваться из-за отсутствия DAP в тканях млекопитающих; эта комбинация признаков обеспечивает опосредованный РНК нокдауни повышенную безопасность относительно реплицирующихся штаммов.

В этом примере штамм с делецией *asd* YS1646 (AST -101, описанный в примере 1) дополнительно модифицировали для экспрессии *cytoLLO* для получения штамма AST-114 (описанного в примере 8), подвергали электропорации так, чтобы он содержал плазмиду, кодирующую ARI -203 (microРНК, направленную на TREX1), для получения штамма AST -120 (ASD/LLO (pEQU6-miTREX1)). Когда этот штамм вводят в несущих опухоль мышей, бактерии поглощаются клетками-хозяевами и входят в сальмонеллу, содержащую вакуоль (SCV). В этой среде отсутствие DAP предотвращает репликацию и приводит к лизису бактерий в SCV. Лизис AST -120 позволяет высвободить плазмиду, и накопленный *cytoLLO*, который образует поры в мембране SVC, содержащей холестерин, приводя к эффективной доставке плазмиды в цитозоль клетки-хозяина.

Способность автолитического штамма AST -120 реплицироваться в LB в присутствии или в отсутствие DAP оценивали с использованием спектрофотометра SpectraMax ® M3 (MolecularDevices) при 37° C, считывание OD600 каждые 15 минут. Как показано на фиг. 19, AST -120 способен расти прочно в LB, дополненной 50 мкг/мл DAP, но не может реплицироваться только в LB.

Увеличение ослабления автолитических *S typhimurium* мышей

Для определения того, был ли автолитический штамм AST -120, сконструированный для доставки *cytoLLO* и microРНК, направленной на TREX1, ослаблен для вирулентности, проводили исследование медианной летальной дозы (ЛД 50

). Возрастающие дозы AST -120, варьирующие от 1×10^6 до 5×10^7 КОЕ, вводили мышам C57BL/6 (штамм мыши, который является высокочувствительным к LPS). После внутривенного введения AST -120 хорошо переносится при всех дозах с кратковременными потерями веса, наблюдаемыми после одной дозы. Вторую дозу вводили через 7 дней после первой дозы, и одна мышь из четырех, при самой высокой дозе (5×10^7 КОЕ), была обнаружена как требующей эвтаназии. Все другие мыши, которым вводили AST -120, претерпели кратковременную потерю веса, но восстановлены. Эти данные показывают, что ЛД 50 Для автолитического штамма *S typhimurium*, доставляющего микроРНК, направленную на TREX1 (AST -120), превышает 5×10^7 КОЕ. Известно, что ЛД 50 Для штамма VNP20009 составляет приблизительно 5×10^6 КОЕ у мышей C57BL/6 (Lee et al. (2000) International Journal of Toxicology 19: 19-25), демонстрируя, что AST -120 является, по меньшей мере, 10-кратным ослаблением по сравнению с VNP20009.

Противоопухолевая активность автолитического *S typhimurium*

Для определения того, был ли автолитический штамм AST -120, сконструированный для доставки cytoLLO и микроРНК, направленной на TREX1, был способен обеспечить противоопухолевую реакцию, 6-8-недельных самок мышей BALB/c (10 мышей на группу) инокулировали в правый бок CT26 (2×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мышам с установленными боковыми опухолями внутривенно инъецировали одну дозу 5×10^6 КОЕ автолитического штамма AST -120 (ASD/LLO (PEQU6-miTREX1)) и сравнивали с мышами, обработанными PBS в качестве контроля. Как показано на фиг.20, противоопухолевую реакцию определяли только после одной дозы по сравнению с животными, обработанными только PBS (52,4% TGI, $p = 0,02$, день 17). Вместе эти данные демонстрируют, что *S. Typhimurium*, сконструированный таким образом, чтобы он был автолитическим путем ауксотрофии DAP и сконструирован таким образом, чтобы он содержал плазмиду для доставки РНК нацеленной на TREX1, был более ослабленным и может вызывать противоопухолевую реакцию.

Пример 12

Примеры штаммов, сконструированных для увеличения переносимости делеция *adrA* или *csgD*

В этом примере живой аттенуированный штамм *Salmonella Typhimurium*, который содержит делецию *purl*, делецию *msbB*, делецию гена *asd* и сконструирован для доставки плазмид, кодирующих интерферирующую РНК, дополнительно модифицирован для удаления *adrA*, гена, требуемого для образования биопленки *Salmonella typhimurium*. Сальмонеллы, которые не могут образовывать биопленки, поглощаются более быстро фагоцитными клетками хозяина и удаляются быстрее. Это увеличение внутриклеточной локализации повышает эффективность доставки плазмиды и "нокдаун" генов за счет интерференции РНК. Повышенная скорость выведения из опухолей/тканей увеличивает переносимость терапии, а отсутствие образования биопленки предотвращает колонизацию протезирующих и желчных пузырей у пациентов. В другом примере живой аттенуированный штамм *Salmonella Typhimurium*, который содержит делецию *purl*, делецию *msbB*, делецию гена *asd* и сконструирован для доставки плазмид, кодирующих интерферирующую РНК, дополнительно модифицирован для удаления *csgD*. Этот ген ответственен за активацию *adrA*, а также индуцирует экспрессию фимбрий *curli*, агониста TLR2. Потеря *csgD* также предотвращает образование биопленки с дополнительным преимуществом ингибирования активации TLR2, тем самым дополнительно снижая бактериальную вирулентность и усиливая доставку РНК.

делеция *pagP*

В этом примере живой аттенуированный штамм *S Typhimurium*, который содержит делецию *purl*, делецию *msbB* и делецию гена *asd*, и сконструирован для доставки плазмид, кодирующих интерферирующую РНК, дополнительно модифицирован для удаления *pagP*. Ген *pagP* индуцируется в течение инфекционного жизненного цикла *S typhimurium* и кодирует фермент, который пальмитилирует липид А. В *S typhimurium* дикого типа, экспрессия *pagP* приводит к образованию липида А, который является гепта-ацилированным. В мутанте *msbB*, в котором не может быть добавлена концевая ацильная цепь липида А, экспрессия *pagP* приводит к получению гекса-ацилированного LPS. Было показано, что гексаацилированный LPS является наиболее провоспалительным. В этом примере штамм, с удаленными *pagP* и *msbB*, может продуцировать только пентаацилированный LPS, обеспечивая более низкие провоспалительные цитокины,

повышенную переносимость и повышенный адаптивный иммунитет, когда бактерии сконструированы для доставки интерферирующих РНК.

делеция *hilA*

В этом примере живой аттенуированный штамм *Salmonella typhimurium*, который содержит делецию *rugI*, делецию *msbB* и делецию гена *asd*, и сконструирован для доставки плазмид, кодирующих интерферирующую РНК, дополнительно модифицирован для удаления *hilA*. *hilA* представляет собой регуляторный ген, который необходим для экспрессии патогенной системы 1 (SPI-1), связанной с системой секреции типа 3 (T3SS). Эта система секреции ответственна за инъекирование эффекторных белков в цитозоль фагоцитных клеток-хозяев, таких как эпителиальные клетки, которые вызывают поглощение модифицированной *S typhimurium*. Было показано, что SPI-1 T3SS является существенной для пересечения кишечного эпителиального слоя, но не является обязательным для инфекции, когда бактерии инъекированы парентерально. Инъекция некоторых белков и самого игольчатого комплекса может также индуцировать активацию воспаления и пироптоза фагоцитных клеток. Эта провоспалительная гибель клеток может ограничивать инициирование устойчивого адаптивного иммунного ответа, непосредственно индуцируя гибель антиген-презентирующих клеток (APC), а также модифицирование цитокиновой среды для предотвращения образования Т-Клеток памяти. В этом примере дополнительная делеция гена *hilA* из терапевтического штамма *Salmonella typhimurium*, который вводится либо внутривенно, либо в *intratum*, фокусирует инфекцию *Salmonella typhimurium* в отношении фагоцитных клеток, которые не требуют SPI-1 T3SS для поглощения, и затем продлевает продолжительность жизни этих фагоцитных клеток. Мутация *hilA* снижает количество провоспалительных цитокинов, увеличивая переносимость терапии, а также качество адаптивного иммунного ответа.

Пример 13

Мутанты с делецией *hilA* растут нормально *in vitro*.

Ген *hilA* был удален из штамма YS1646 *S. typhimurium* с удаленным геном *asd*, и в штамме YS1646 удалены *asd*, и флагеллин генов *fljB* и *fliC*, используя

рекомбинационную систему, как описано в Datsenko и Wanner (Proc . Natl. Acad. Sci. США 97: 6640-6645(2000)), чтобы сделать штаммы *HilA/ASD* и *HilA/FLG/ASD*, соответственно. Эти штаммы были затем электропорированы с плазмидой, содержащей функциональный ген *asd* (в дополнение к удаленному гену *asd* и обеспечения плазмидного поддержания *in vivo*) и эукариотической экспрессионной кассетой, содержащей U6 промотор. Скорости роста штаммов *HilA/ASD* (pATI-miTREX1) и *HilA/FLG/ASD* (pATI-miTREX1) были затем определены и сравнены с штаммами *ASD* (pATI-miTREX1) и YS1646 при 37 градусах Цельсия в бульоне LB, измерено OD600 с помощью Spectramax 96 (молекулярные устройства). Каждый модифицированный штамм рос со скоростью, сопоставимой с родительским штаммом YS1646 *in vitro*, что указывает на то, что удаление *hilA* не снижает пригодность бактерий *in vitro*.

Пример 14

Мутанты с делецией *HilA* приводят к меньшей гибели клеток для человеческих моноцитарных клеток

Для оценки того, индуцирует ли мутант с делецией *hilA* меньший пироптоз, чем штаммы, способные продуцировать SPI -1, моноцитарные клетки THP -1 человека инфицировали множеством инфекций (MOI) с 1000 бактерий штаммами YS1646, *ASD* (pATI-miTREX1), *FLG/ASD* (pATI-miTREX1) и *HilA/ASD* (pATI-miTREX1). После 1 часа заражения удаляли внеклеточные бактерии и среду заменяли средой, содержащей гентамицин в количестве 100 мкг/мл для уничтожения внеклеточных бактерий. Через 4 часа после заражения клетки собирали и жизнеспособность клеток THP -1 оценивали, используя поглощение реагента CellTiter-Glo (Promega), и измеряя люминесценцию с использованием 96-луночного планшет-ридера Spectramax (Moleculardevices). Несмотря на то, что инфицирование YS1646 привело к 86% гибели клеток, инфицирование *HilA/ASD* (pATI-miTREX1) приводило только к 46% гибели клеток. % мертвых клеток для штаммов *ASD* (pATI-miTREX1) и *FLG/ASD* (pATI-miTREX1) показали промежуточные фенотипы с 77% и 68% клеточной гибели соответственно. Эти данные показывают, что удаленные штаммы *hilA* индуцируют меньшую гибель клеток в моноцитных клетках человека, чем штаммы *S Typhimurium*, способные экспрессировать SPI-1

Пример 15

Мутанты с делецией *hilA* имеют пониженную способность инфицировать эпителиальные клетки человека

Клетки HeLa инфицировали множественными заражениями 500 бактерий штаммами YS1646, ASD (pATI-miTREX1), FLG/ASD (pATI-miTREX1) и *hilA*/ASD (pATI-miTREX1). Через 1 час удаляют внеклеточные бактерии и среду заменяют средой, содержащей гентамицин в количестве 100 мкг/мл для уничтожения внеклеточных бактерий. Через 4 часа после заражения клетки собирали и лизировали осмотическим шоком, и число жизнеспособных колониеобразующих единиц бактерий исчислялось при серийных разведениях и размещении на чашках с LB-агаром. $4,6 \times 10^3$ КОЕ/лунку извлекали для YS1646 и только $2,0 \times 10^2$ КОЕ извлекали для штамма *hilA*/ASD (pATI-miTREX1). Штаммы ASD (pATI-miTREX1) и FLG/ASD (pATI-miTREX1) показали промежуточные фенотипы с соответственно $8,0 \times 10^2$ КОЕ и $6,0 \times 10^2$ КОЕ. Эти данные показывают, что штаммы с делецией *hilA* индуцируют меньшее поглощение эпителиальных клеток человека, чем штаммы *S typhimurium*, способные экспрессировать SPI-1

Пример 16

Мутанты с делецией *PagP* имеют пентаацилированный LPS и вызывают снижение воспалительных цитокинов

Ген *pagP* удаляют из делетированного *poasd S typhimurium* YS1646 (который содержит делецию *purI/M* и *msbB*) с использованием системы как описано в Datsenko and Wanner (Proc Natl Acad Sci USA 97: 6640-6645 (2000)) для получения штамма *PagP*/ASD. Этот штамм затем подвергали электропорации плазмидой, содержащей функциональный ген *asd* (чтобы дополнить удаленный ген *asd* и обеспечить поддержание плазмиды *in vivo*), и эукариотическую экспрессионную кассету, содержащую промотор U6, приводящий в действие экспрессию микроРНК, направленную на мышиный TREX-1 (pATI-miTREX1), для получения штамма *PagP*/ASD (pATI-miTREX1). Затем Липид А экстрагировали из этого штамма и оценивали с помощью лазерной десорбционной/ионизационной масс-спектрометрии (MALDI MS) и сравнивали с

штаммом *S typhimurium* ATCC 14028 дикого типа, штаммом YS1646 (который делегирован для *msbB* и *pagP*) и штаммом YS1646, делегированным по гену *asd* и дополненным плазмидой *pATI-miTREX1*. *Salmonella* дикого типа содержит минорный пик липида А с массой 2034 и основной пик с массой 1796, соответствующий гептаацелированным и гексаацелированным видам, соответственно, благодаря присутствию функциональных генов *msbB* и *pagP*. Мутированные с делецией *msbB* штаммы YS1646 и ASD (*pATI-miTREX1*) имели основные пики при 1828 и 1585, соответствующие смеси гексаацелированного и пентаацелированного LPS. Штамм, Делегированный из *msbB* и *pagP* штамм, *PagP/ASD* (*pATI-TREX1*) имел только один пик с массой 1585. Эти данные демонстрируют, что делеция *pagP* предотвращает пальмитоилирование LPS, тем самым ограничивая его одним пентаацелированным видом.

Для определения того, был ли пентаацелированный LPS из мутантных штаммов *pagP* с пониженной передачей TLR-4, 4 мкг очищенного LPS из штаммов, описанных выше, добавляли к моноцитарным клеткам человека THP-1, и супернатанты оценивали через 24 часа на присутствие воспалительных цитокинов с использованием набора *cytometricboundation* (CBA) (BD Biosciences). LPS из штамма *PagP* индуцирует 1/4 количества TNF-альфа по сравнению с LPS дикого типа и в 7 раз меньше IL-6, чем у дикого типа. Мутантный LPS по *pagP* индуцирует в 22 раз меньше IL-6, чем YS1646, что свидетельствует о том, что пентаацелированные виды LPS из мутанта по *pagP* значительно менее воспалительные в клетках человека и указывает на то, что мутант по *pagP* будет лучше переносимым у человека.

Пример 17

Мутанты с делецией *FLG*, *HilA* и *PagP* более ослаблены, чем штамм YS1646 у мышей

Для определения того, являются ли модифицированные штаммы, описанные выше, более ослабленными, чем штамм YS1646, проводят исследование медианной летальной дозы (ЛД 50). Мышам C57BL/6 вводили внутривенно с возрастающими концентрациями штаммы YS1646, *FLG/ASD* (*pATI-TREX1*), *HilA/ASD* (*pATI-TREX1*) или *PagP/ASD* (*pATI-TREX1*). Обнаружено, что ЛД 50 для штамма YS1646 составляет $1,6 \times 10^6$ КОЕ, что согласуется с опубликованными сообщениями для этого штамма. LD 50 для штамма *HilA/ASD* (*pATI-TREX1*) была определена как $5,3 \times 10^6$ КОЕ, демонстрируя 3-кратное

снижение вирулентности. Установлено, что ЛД₅₀ Для штамма PagP/ASD (pATI-TREX1) составляет $6,9 \times 10^6$ КОЕ, что свидетельствует о 4-кратном снижении вирулентности. LD₅₀ Для Штамма FLG/ASD (pATI-TREX1) Определяют как $> 7 \times 10^6$ КОЕ, демонстрируя снижение вирулентности в 4,4 раза по сравнению с штаммом YS1646. Эти данные показывают, что генетические модификации, описанные выше, снижают вирулентность терапии *S typhimurium* приводят к повышенной переносимости у человека. В Фазе I клинических испытаний VNP20009 (TosoEtal. (2002) J Clin. Oncol. 20 (1): 142-152), присутствие бактерий в опухолях пациентов наблюдали только частично при двух самых высоких испытанных дозах, $3E8$ КОЕ/м² (33% наличия) и $1E9$ КОЕ/м² (присутствие 50%), что указывает на то, что допустимая доза VNP20009 была слишком низкой для достижения колонизации. Путем улучшения переносимости штаммов с помощью описанных выше модификаций можно вводить более высокие дозы, чем VNP20009. Это улучшает как процент пациентов, у которых они колонизированы, так и уровень терапевтической колонизации на опухоль.

Пример 18

Делеционные Мутанты поHilA демонстрируют значительную противоопухолевую активность у мышей и сравнительная активность мутантов, делеционныхpoflJb/fliC

Мутация *hilA* должна предотвращать повышающую регуляцию T3SS и предотвращать гибель пироптозных клеток инфицированных макрофагов. Это должно повысить переносимость и противоопухолевую эффективность содержащих плазмиду целевых штаммов *in vivo*. Для проверки этого штаммы $\Delta hilA/\Delta asd$, содержащие плазмиду *miTREX1* (*HilA/ASD* (pATI-*miTrex1*)) или контрольный носитель, сравнивали с штаммами $\Delta fljB/\Delta fliC/\Delta asd$, содержащими плазмиду *miTREX1* (*FLG/ASD* (pATI-*miTREX1*)) для эффективности опухоли в модели карциномы ободочной кишки мыши. 6 8-недельных самок мышей C57BL/6 (9 мышей на группу) инокулировали в правой боковой поверхности MC38 (5×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мышей с установленными боковыми опухолями внутривенно инъецировали на 8-й день с 3×10^5 КОЕ штаммами *HilA/ASD* (pATI-*miTrex1*), *FLG/ASD* (pATI-*miTrex1*) или PBS-носителем. Вес тела и опухоли измеряли дважды в неделю. Измерения опухолей проводили с использованием

электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывали по модифицированной эллипсоидной формуле $1/2$ (длина \times ширина 2). Мышей умерщвляют, когда размер опухоли достигает $> 20\%$ веса тела или становится некротическим в соответствии с правилами IACUC.

Данные показывают, что штамм *HilA/ASD* (pATI-miTrex1) индуцирует сильное регулирование опухоли по сравнению с PBS (83,6% TGI, день 25), в том числе 1/9 полных регрессий опухоли. Эти данные сравнимы с данными, наблюдаемыми при использовании штамма FLG/ASD (pATI-miTrex1) по сравнению с PBS (82,8% TGI, день 25). Таким образом, штамм $\Delta hilA$ обеспечивает сравнимую или большую активность в мышинной модели опухоли чем штамм $\Delta fljB/\Delta fliC$.

Пример 19

Мутанты с делецией *HilA* демонстрируют значительно более низкий уровень системных цитокинов, чем родительский штамм VNP20009, и повышенную колонизацию. По сравнению с мутантами с делецией *fljB/fliC*

Для проверки влияния штаммов $\Delta hilA/\Delta asd$ и $\Delta fljB/\Delta fliC/\Delta asd$ на колонизацию и переносимость опухоли, по сравнению с родительским штаммом VNP20009, эти штаммы, содержащие плазмиду miTREX1, оценивали в модели карциномы ободочной кишки мыши. 6-8-недельных самок мышей C57BL/6 (3 мыши на группу) инокулировали в правый бок клетками MC38 (5×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мыши, несущие установленные боковые опухоли, были инъецированы на 8-й день 3×10^5 и 1×10^5 КОЕ *HilA/ASD* (pATI-miTrex1), FLG/ASD (pATI-miTrex1), VNP20009 или PBS (Контроль). У мышей брали кровь через 2 часа после введения и сыворотку оценивали на системные цитокины с помощью матрицы цитометрических шариков для воспаления мышей (BD Biosciences) на проточном цитометре (Novocyte). На 3-й день после введения дозы мышей умерщвляют, и опухоли, селезенку и печень собирают и взвешивают. Ткани гомогенизировали в 10 мл стерильного PBS (М пробирки, GentleMacs, MiltenyiBiotec), затем проводили 10-кратные серийные разведения и высевали на чашки с агаром LB (Luria Бульон), содержащим LB + Канамицин (Sigma). На следующий день определяли колониеобразующие единицы (КОЕ) и оценивали общее количество КОЕ на грамм ткани.

Было показано, что уровни IL -6 в сыворотке крови мышей показывают наиболее точную корреляцию клинической переносимости. Уровни IL -6 от VNP20009 в дозе 3×10^5 CFU усредняли 11,755 пг/мл по сравнению с базовой линией 18 пг/мл PBS. Уровни HilA/ASD (pATI-miTrex1) и FLG/ASD (pATI-miTrex1) IL -6 в дозе 3×10^5 КОЕ были значительно ниже, чем уровни VNP20009 (3570 пг/мл и 3,850 пг/мл соответственно). Эти данные демонстрируют значительно увеличенную переносимость мутантных штаммов по сравнению с родительским штаммом VNNP20009. Сравнение колонизации опухолей, селезенки и печени через 3 дня после введения дозы 5 КОЕ, общей колонизации селезенки между HilA/ASD (pATI-miTrex1) и FLG/ASD (pATI-miTrex1) показало, что они были сопоставимыми (HilA: $2,1 \times 10^4$ КОЕ/г, против FLG: $1,2 \times 10^4$ КОЕ/г), тогда как штамм FLG/ASD (pATI-miTrex1) имел несколько меньшую колонизацию в печени (HilA: $7,4 \times 10^3$ КОЕ/г, против FLG: $1,5 \times 10^3$ КОЕ/г). Было показано, что колонизация опухоли штамма HilA/ASD (pATI-miTrex1) была в среднем $2,6 \times 10^4$ КОЕ/г, что значительно выше, чем у необнаружимых уровней в опухолях FLG/ASD (pATI-miTrex1) в тот же момент времени. Эти данные демонстрируют высокую степень переносимости и улучшенные свойства колонизации опухоли, штамм $\Delta hilA/\Delta asd$

Пример 20

Штаммы иммуномодулятора *S typhimurium* демонстрируют экспрессию гетерологичных белков в моноцитах человека

Как описано выше, ген *hilA* и гены флагеллина *fliB* и *fliC* были удалены из штамма YS1646 *S typhimurium* с удаленным геном *asd*, генерируя штаммы HilA/ASD и FLG/ASD соответственно. Кроме того, штамм FLG/ASD был дополнительно модифицирован для экспрессии белка листериолизина O (LLO), не имеющего сигнальной последовательности (cytoLLO), которая накапливается в цитоплазме штамма *Salmonella* (FLG/ASD/cLLO). Эти штаммы подвергали электропорации плазмидой, содержащей экспрессионную кассету для промотора EF1 альфа и мышинового цитокина IL -2 (*muIL -2*). Кроме того, штамм FLG/ASD подвергали электропорации с экспрессирующей плазмидой для IL-15δ в качестве контроля для неродственного цитокина. Дополнительные конструкции создавали с использованием промотора CMV.

Для определения того, могут ли эти штаммы, содержащие экспрессирующие плазмиды, инфицировать моноциты человека и индуцировать продукцию мышиного IL -2, моноцитарные клетки THP1 человека высевали при 50000 клеток/лунку в RPMI (выходящую) + 10% Nu сыворотки (Gibco) за один день до заражения. Клетки инфицировали при MOI 50 в течение одного часа в RPMI, Затем промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в RPMI + 100 мкг/мл гентамицина (Sigma). Супернатанты собирали через 48 часов из 96-луночного планшета и оценивали на концентрацию мышиного IL -2 с помощью ELISA (R&D Systems). Было установлено, что концентрация IL -2, обнаруженная в контрольных лунках FLG/ASD-IL158, является очень низкой, как ожидалось, и, вероятно, отражает некоторую перекрестную реактивность на эндогенный IL -2 человека (6,52 пг/мл). Напротив, штамм FLG/ASD-IL -2 индуцировал среднее значение 35,1 пг/мл IL -2, и даже более высокая концентрация IL -2 была измерена для FLG/ASD/cLLO штамма, 59,8 пг/мл. Самые высокие уровни были обнаружены в штамме HilA/ASD-IL-2, 103.4 пг/mL. These data demonstrate the feasibility of expressing and secreting functional heterologous proteins, such as IL-2, from the *S. typhimurium* immune modulator platform strains.

Эти данные демонстрируют целесообразность экспрессии и секреции функциональных гетерологических белков, таких как IL-2, из штаммов платформы иммуномодулятора *S. typhimurium*.

Пример 21

Клеточная инфекция с мутантом $\Delta hilA$ приводит к меньшей инфекции эпителиальных клеток человека

Чтобы продемонстрировать, что в штаммах *S. typhimurium* с делецией *hilA* снижена способность заражать эпителиальные клетки, клетки шейки матки HeLa были инфицированы следующими штаммами *S. typhimurium*: YS1646, YS1646 Δasd and YS1646 $\Delta asd/\Delta hilA$, содержащими плазмиды, кодирующие функциональный ген *asd* для поддержания плазмиды. 1×10^6 клеток HeLa клетки были помещены в DMEM и 10% FBS. Клетки были заражены культурами *S. typhimurium* в течение 1 часа, затем клетки были промыты PBS и среда была заменена средой, содержащей 50 пг/мл гентамицина для уничтожения внеклеточных бактерий. После 4 часов, монослой HeLa были вымыты PBS

и лизированы 1% Triton X 100 буфером для выпуска внутриклеточных бактерий. Лизаты были последовательно разбавлены и посеяны на пластинах LB агара для количественной оценки количества внутриклеточных бактерий. Штамм с удалением *hilA* показал 90% сокращение восстановленных CFU по сравнению с штаммами с функциональным геном *hilA*, демонстрируя, что удаление *hilA* значительно уменьшает инфекцию *S. Typhimurium* клеток, полученных из эпителиальных.

Пример 22

Инфекция клеток мутантами $\Delta hilA$ or $\Delta fljB/\Delta fljC$ ведет к меньшему пироптозу человеческих макрофагов

Для демонстрации того, что штаммы $\Delta hilA$ or $\Delta fljB/\Delta fljC$ *S. Typhimurium* имеют пониженную способность вызывать гибель клеток макрофагов, THP-1 клетки человеческих макрофагов были инфицированы следующими штаммами *S. typhimurium*: YS1646, YS1646 Δasd , YS1646 $\Delta asd/\Delta fljB/\Delta fljC$, и YS1646 $\Delta asd/\Delta hilA$, содержащие плазмиды, кодирующие функциональный ген *asd* для обеспечения поддержания плазмиды. 5×10^4 клетки были помещены в DMEM и 10% FBS. Клетки были заражены промытой фазой культур *S. typhimurium* в течение 1 часа при MOI100 на клетку, затем клетки были промыты PBS, а среда была заменена на среду, содержащую 50 мкг/мл гентамицина для уничтожения внеклеточных бактерий, и 50 нг/мл интерферона гамма. Через 24 часа клетки THP-1 были окрашены реагентом CellTiter-Glo® (Promega), и процент жизнеспособных клеток был определен с помощью анализа жизнеспособности люминесцентных клеток с помощью считывателя пластин Spectramax для количественной оценки люминесценции.

Клетки, инфицированные штаммом с делецией *hilA*, имели примерно 72% жизнеспособных клеток, в то время как YS1646-инфицированные клетки имели только 38% жизнеспособности, демонстрируя, что удаление *hilA* предотвращает гибель клеток человеческих макрофагов. Клетки, инфицированные плазмидно-содержащими штаммами YS1646 Δasd и YS1646 $\Delta asd/\Delta fljB/\Delta fljC$, соответственно, имели 40% и 51% жизнеспособности, что свидетельствует о том, что удаление генов флагеллина также предотвращает гибель клеток человеческих макрофагов.

Пример 23

Инфекция человеческих макрофагов иммуностимулирующим штаммом *S. Typhimurium* содержащим плазмиду кодирующую каскету экспрессии IL-2, приводит к секреции IL-2

Секреция IL-2

Человеческие макрофаги THP-1 были инфицированы следующими штаммами *S. typhimurium*: YS1646 $\Delta asd/\Delta fljB/\Delta fliC$, YS1646 Δasd -cytoLLO, и YS1646 $\Delta asd/\Delta hilA$, содержащими плазмиды, кодирующие каскету экспрессии для мышинового IL-2 с эукариотическим промоутером, и функциональный ген *asd* для обеспечения поддержания плазмиды. 5×10^4 клеток были помещены в DMEM и 10% FBS. Клетки были заражены промытой *S. typhimurium* в течение 1 часа в MOI 50 CFUs на клетку, затем клетки были промыты PBS и среда была заменена среду, содержащую 50 мкг/мл гентамицина для уничтожения внеклеточных бактерий. После 48 часов, клеточные супернатанты были удалены и протестированы на IL-2 с помощью системы R&D Systems™ Mouse IL-2 Quantikine ELISA Kit. The оставшиеся клетки были окрашены CellTiter-Glo® реагентом (Promega), и процент жизнеспособных клеток был определен с помощью считывателя пластины Spectramax для количественной оценки люминесцентности. Штаммы YS1646 $\Delta asd/\Delta fljB/\Delta fliC$, YS1646 Δasd -cytoLLO, и YS1646 $\Delta asd/\Delta hilA$, содержащие плазмиды, кодирующие каскеты экспрессии мышинового IL-2, экспрессировали 35 pg/mL, 60 pg/mL, and 103 pg/mL of IL-2, соответственно.

Пример 24

Штаммы *S. typhimurium* экспрессирующие мышинный IL-2, демонстрируют возможное ингибирование роста опухоли *in vivo*

Иммуностимуляторные штаммы *S. typhimurium*, содержащие удаления в *hilA* или генах флагеллина *fljB* и *fliC* в штамме YS1646 *S. typhimurium*, были объединены с удалением гена *asd* для формирования штаммов YS1646 $\Delta asd/\Delta hilA$ и YS1646

Δasd/ΔfljB/ΔfliC, соответственно. Эти штаммы были электропорированы с плазмидой, содержащей экспрессию кассеты для промотора EF1α и мышинового цитокина IL-2.

Чтобы показать, что штаммы *S. typhimurium*, содержащие плазмиды экспрессии ИЛ-2, вызывают противоопухолевую эффективность, штаммы *Δasd/ΔhilA*, содержащие плазмиду *muIL-2*, или штаммы *Δasd/ΔfljB/ΔfliC*, содержащие плазмиду *muIL-2*, были сравнены с контролем носителей. 6-8-недельные самки мышей C57BL/6 (5 мышей на группу) были привита на правом боку клетками MC38 (5 x 10⁵ клеток в 100 мкл PBS). Мышам, несущим установленные боковые опухоли, вводились на 8-й день 5 x 10⁵ CFU *Δasd/ΔhilA* (pATI-*muIL-2*), *Δasd/ΔfljB/ΔfliC* (pATI-*muIL-2*), или контроль носителя. Вес тела и опухоли измерялись два раза в неделю. Измерения опухоли проводились с использованием электронных калиперов (Фаулер, Ньютон, Массачусетс). Объем опухоли рассчитывался по модифицированной формуле эллипсоида $1/2$ (длина × ширина²). Мышей усыпали, когда размер опухоли достиг >20% массы тела или стал некротическим, в соответствии с правилами IACUC.

Эксперимент показал, что штамм *Δasd/ΔhilA* (pATI-*muIL-2*) имеет значительный контроль опухоли по сравнению с PBS (P = 0.003, день 21). Эти данные были сопоставимы с данными, наблюдаемыми с штаммом *Δasd/ΔfljB/ΔfliC* (pATI-*muIL-2*), который также продемонстрировал значительное ингибирование роста опухоли по сравнению с PBS (P = 0.005, день 21). Таким образом, оба штамма демонстрируют способность экспрессированного ИЛ-2 мощно подавлять ингибирование роста опухоли в модели рака.

Пример 25

Штаммы *pagP*, *fljB*/*fliC*, и *pagP*/*fljB*/*fliC* демонстрируют значительно более высокую жизнеспособность в сыворотке крови человека по сравнению с VNP20009 (YS1646)

Как описано здесь, VNP20009 (YS1646) демонстрирует ограниченную колонизацию опухоли у людей после системного введения. Здесь показано, что VNP20009 инактивируется факторами комплимента в крови человека. Чтобы продемонстрировать это, штаммы YS1646 и *E. coli*D10B были сравнены с образцовыми иммуностимуляторными бактериями, представленными здесь, которые содержат дополнительные мутации, которые изменяют поверхность бактерий. Эти штаммы были YS1646 (*pagP*), YS1646 (*fljB*/*fliC*), и YS1646 (*pagP*/*fljB*/*fliC*). Эти три штамма, в

дополнение к культурам YS1646 и *A. coli*D10B, были инкубированы сывороткой или тепло-инактивированной (HI) сывороткой либо из сгущенной крови мышей, либо здоровых доноров человека ($n=3$), в течение 3 часов при температуре 37 градусов по Цельсию. После инкубации сывороткой бактерии были последовательно разбавлены и размещены на агарных пластинах LB, и были измерены единицы формирования колонии (КОЕ).

В сыворотке мыши все штаммы оставались на 100% жизнеспособными и были полностью устойчивы к инактивации. В сыворотке крови человека все штаммы были на 100% жизнеспособными в инактивированной тепло сыворотке. Штамм *E. coli* D10B был полностью ликвидирован через 3 часа во всей сыворотке крови человека. Штамм YS1646 продемонстрировал только 6,37% живых колоний, демонстрируя, что колонизация опухоли клинического штамма YS1646 была ограничена из-за комплимента инактивации в крови человека. Для штамма YS1646 (*fljB*-/*fliC*-) осталось 31,47% живых колоний, а для штамма YS1646 (*ragP*-) осталось 72,9% живых колоний после инкубации с человеческой сывороткой в течение 3 часов. Комбинированный штамм YS1646 (*ragP*-/*fljB*-/*fliC*-) был полностью устойчив к комплиментам в сыворотке крови человека.

Эти данные объясняют, почему VNP20009 имел очень низкую колонизацию опухоли при системном введении. Здесь показано, что VNP20009 (YS1646) очень чувствителен к инактивации в сыворотке крови человека, но не в сыворотке мыши. Эти данные объясняют, почему ограниченная колонизация опухолей наблюдалась у людей, в то время как опухоли мышей были колонизированы на высоком уровне. Удаление *fljB*/*fliC* или *ragP*, или сочетание этих мутаций, частично или полностью спасает этот фенотип. Таким образом, повышенная стабильность наблюдается в сыворотке крови человека со штаммами с делециями *fljB*/*fliC*, *ragP*, или *ragP*/*fljB*/*fliC*, обеспечивает увеличение колонизации опухоли человека.

Эти данные и другие представленные в настоящем (см., например, примеры 7, 16 и 17 выше) показывают, что удаление флагелл и/или *ragP* увеличивает колонизацию опухоли, улучшает переносимость и повышает противоопухолевую активность иммуностимуляторных бактерий. Пример 16 показывает, что LPS от иммуностимуляторных бактерий, которые *ragP* индуцированы, в 22 раза меньше IL-6, чем LPS от YS1646, и, следовательно, *ragP* бактерии менее воспалительные в клетках человека. Пример 17 показывает, что каждый и все мутанты с делециями FLG, *HilA* и *RagP* более ослаблены, чем YS1646.

Иммуностимулирующие бактерии, такие как штаммы *Salmonella*, включая штаммы дикого типа, которые представляют собой один или оба -флагеллин и *ragP*, проявляют свойства, которые повышают колонизацию (микроокружения опухоли)/опухоли и повышают противоопухолевую активность. Такие штаммы могут быть использованы для доставки терапевтической полезной нагрузки, такой как иммунотерапевтический продукт и/или другой противоопухолевый продукт, а также могут включать модификации, которые улучшают терапевтические свойства, такие как делеция *hilA* и/или *msbB*, ауксотрофия аденозина другие свойства, как описано в настоящем описании. Полученные штаммы более эффективно нацелены на (микроокружение опухоли)/опухоль благодаря модификациям, которые изменяют инфекционность, токсичность в отношении определенных клеток и требования к питанию такие как ауксотрофия для пуринов, которые обеспечиваются в опухолевой среде.

Пример 26

Колонизация *in vivo*

Гены *asd* и флагеллина (*fljB/fliC*) были удалены из штамма YS1646, который является *purl/msbB* с использованием системы как описано ранее (см. Datsenko and Wanner (2000) Proc. Natl Acad Sci USA 97: 6640-6645), для получения штамма YS1646 Δ FLG/ Δ ASD. Штамм YS1646 Δ FLG/ Δ ASD затем трансформировали электропорацией бактериальной плазмидой pRPSM-mCherry, содержащей 1) функциональную кассету экспрессии *asd* для дополнения хромосомной делеции *asd* для поддержания плазмиды *in vivo*, и 2) конститутивную экспрессионную кассету mCherry под контролем бактериального промотора *rpsm* (*rpsm-mCherry*). Бактериальные колонии, трансформированные этой плазмидой, были визуально красными по цвету из-за экспрессии красного флуоресцентного белка mCherry. Для оценки колонизации опухоли трансформированный бактериальный штамм (YS 1646 Δ FLG/ Δ ASD (pRPSM-mCherry)) тестировали *in vivo* в мышинной модели карциномы ободочной кишки. 6-8-Недельных самок мышей C57BL/6 (3 мыши на группу) инокулировали подкожно в правый бок клетками MC38 (5×10^5 клеток в 100 мкл PBS).

Мышей, несущих большие установленные боковые опухоли, внутривенно инъецировали 1×10^6 КОЕ YS 1646 Δ FLG/ Δ ASD(pRPSM-mCherry). Опухоли собирали через 3 дня и

диссоциировали в одноклеточную суспензию (MiltenyiBiotec). Клетки окрашивали красителем ZombieAqua™ с фиксацией жизнеспособности (BioLegend), который проникает в мертвые, но не живые клетки. Клетки инкубировали со следующими антителами: бриллиантовый фиолетовый 510™ антимышиный CD45 (клон 30-F11, биолегд); бриллиантовый фиолетовый 421™ против мышиного CD8a (клон 53-6. 7, Biolegend); PE антимышиный CD3e (Клон 145-201, BioLegend); FITC анти-мышиный CD4 (клон RM4-5, Biolegend); PE/Cy7 антимышиный/человеческий CD11b (клон m1/70, Biolegend); бриллиантовый фиолетовый 785™ антимышиный Lyb6c (клон НК1,4, биолегд); Бриллиантовый Фиолетовый 605™ Против мыши Lyb6G (клон 1a8, Biolegend); APC антимышиный F4/80 (клон BM8, Biolegend); и PercP/Cy5.5 антимышиный CD24 (клон M1/69, Biolegend). Затем клетки сортируют с помощью проточной цитометрии (Novocyte) с использованием различных поверхностных маркеров и mCherry + (PE TexasRed) для определения/локализации бактериального поглощения собранными клетками.

Клетки CD45, которые включают стромальные и опухолевые клетки, не показали обнаруживаемой бактериальной колонизации, при этом 0,076% клеток являются положительными для mCherry, по сравнению с уровнем фонового окрашивания 0,067%. CD45 + опухоль-проникающие миелоидные клетки были положительными в отношении mCherry, с 7,27% моноцитов, 3,33% дендритных клеток (DC) и 8,96% макрофагов, являющихся положительными для mCherry, что указывает на поглощение бактерий YS1646 ΔFLG/ΔASD (pRPSM-mCherry). Контрольный штамм, содержащий интактную флагеллу, тестировали параллельно. В отличие от штамма AFLG, клетки CD45, инфицированные флагеллин контрольным штаммом, при 0,36% клеток CD45, являющихся положительными для mCherry, что было в 5,37 раз больше, чем фоновое окрашивание (0,067%). Флагеллин контрольный штамм также инфицировал CD45 + Миелоидные популяции, при этом 5,71% моноцитов, 5,56% DC и 9,52% макрофагов были положительными для mCherry. Эти данные показывают, что штаммы нокаутирующие флагеллу накапливаются в популяциях миелоидных клеток опухоли, но не в опухоли или стромальных клетках, тогда как штаммы с интактными флагеллами инфицируют все типы клеток. Таким образом, штаммы, с нокаутом флагеллы демонстрируют опухолевую миелоидную колонизацию *in vivo*.

Пример 27

Нокаутфлагеллы (fljB/fliC)

иштаммы Δ ragP демонстрируют повышенную переносимость и пониженную иммуногенность in vivo

Ген Δ ragP удаляли из штаммов *S typhimurium* YS1646 Δ ASD и YS1646 Δ FLG/ Δ ASD, генерируя штаммы YS1646 Δ PagP/ Δ ASD и YS1646 Δ PagP/ Δ FLG/ Δ ASD соответственно. Штаммы YS1646 Δ FLG/ Δ ASD, YS1646 Δ PagP/ Δ ASD, и YS1646 Δ PagP/ Δ FLG/ Δ ASD трансформировали электропорацией плазмидами, кодирующими ген *nasd*, а также эукариотическую экспрессионную кассету, кодирующую мышинный IL -2 (muIL -2). Для проверки переносимости этих штаммов in vivo проводили исследование ЛД 50 в 6-8-недельных самках мышей BALB/c. Мышам внутривенно инъецировали 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 , 1×10^7 или 3×10^7 КОЕ штаммов YS1646, YS1646 Δ FLG/ Δ ASD (muIL -2), YS1646 Δ PagP/ Δ ASD (muIL -2) или YS1646 YS1646 Δ PagP/ Δ FLG/ Δ ASD (muIL -2). Затем мышей контролируют по заболеваемости и смертности, и рассчитывают значения ЛД 50. Результаты показаны в приведенной ниже таблице.

Бактериальный штамм	LD ₅₀
YS1646	7.24×10^6
YS1646 Δ FLG/ Δ ASD (muIL-2)	2.07×10^7
YS1646 Δ PagP/ Δ ASD (muIL-2)	1.39×10^7
YS1646 Δ PagP/ Δ FLG/ Δ ASD (muIL-2)	Не рассчитано

Значения LD 50 для штаммов YS1646 Δ FLG/ Δ ASD (muIL -2) и YS1646 Δ PagP/ Δ ASD (muIL -2) были выше, чем значения LD50 для родительского штамма YS1646, что указывает на то, что переносимость делеционных мутантов по флагеллину и *ragP*, экспрессирующих мышинный IL -2, была выше in vivo. LD50 для штамма YS1646 YS1646 Δ PagP/ Δ FLG/ Δ ASD (muIL-2) не вычислялся, поскольку животные не погибли в течение всего исследования, но был больше $6,2 \times 10^7$ КОЕ, что соответствует почти 10-кратному улучшению переносимости по сравнению с родительским штаммом YS1646.

Для сравнения иммуногенности различных бактериальных штаммов мышей, которые выжили 3×10^6 КОЕ (N = 5, за исключением YS1646, где N = 4), брали кровь на

40-й день после внутривенного введения, а анти-Salmonellasывороточные антитела титровали. Сыворотки мышей, обработанных различными мутантными штаммами бактерий и контрольных мышей, высевают в 96-луночный планшет для ПЦР и последовательно разводят в PBS. Культуры штаммов *Styphimurium*, содержащие плазмиду pRPSM-mCherry, центрифугировали и промывали, затем ресуспендировали в буфере для фиксации проточной цитометрией. Для анализа 25 мкл культуры mCherry +, содержащей 1×10^6 КОЕ, добавляли к сывороткам и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре.

После инкубации, бактериальные образцы были центрифугированы и вымыты дважды с PBS, вращая их при 4000 об/мин в течение 5 минут, а затем повторно в PBS, содержащий вторичное антитело против мыши FcAlexaFluor® 488 (1/400 разбавления из бульона), и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре в темноте. Образцы затем мыли три раза с PBS, вращая их на 4000 об /мин в течение 5 минут, ресуспендировали в PBS, и проанализировали цитометрией потока (Novocyte). Результаты показали, что мыши с родительским штаммом YS1646, имели самые высокие титры антител, со средней интенсивностью флуоресценции (МФО) 29, 196 плюс минус 20, 730.

Сыворотка от мышей, вводимых с штаммом YS1646 Δ FLG/ Δ ASD (muIL-2), имела МФО $7,941 \pm 9,290$; от мышей, вводимых с штаммом YS1646 Δ PagP/ Δ ASD (muIL-2) имела МФО $3,454 \pm 3,860$; и сыворотка от мышей, вводимых с штаммом YS1646 Δ PagP/ Δ FLG/ Δ ASD (muIL-2), имела самые низкие титры антител сыворотки, с МФО $2,295 \pm 2,444$. Данные свидетельствуют о том, что удаление генов, кодирующих флагеллу (*fljB/fliC*) или *pagP*, приводит к штаммам с уменьшенной иммуногенностью, и что сочетание мутаций (Δ PagP/ Δ FLG) еще больше снижает иммуногенность по сравнению с родительским штаммом без удалений.

В целом данные демонстрируют улучшенную переносимость и пониженную иммуногенность штаммов Δ FLG и Δ PagP с использованием штамма Δ PagP/ Δ FLG/ Δ ASD, демонстрирующего наиболее благоприятную переносимость и самую низкую иммуногенность.

Поскольку специалистам в данной области техники будут очевидны модификации, подразумевается, что данное изобретение ограничено только объемом прилагаемой формулы изобретения.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки и/или так, что он индуцирует меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках.
2. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован, при этом бактерия представляет собой флагеллин(*fliC/fliB*) и/или *ragP*, где бактерия дикого типа содержит флагеллу.
3. Иммуностимулирующая бактерия по п.1 или 2, которая представляет собой флагеллин(*fliC/fliB*) и в котором терапевтический продукт представляет собой противораковый продукт.
4. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-3, которая представляет собой флагеллин(*fliC/fliB*), где противораковым терапевтическим продуктом является белок.
5. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой полипептид-антагонист TGF-бета, в котором геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что он индуцирует меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках (снижает пироптоз), в результате чего иммуностимулирующая бактерия накапливается в опухолях или в микроокружении опухоли или в находящихся в опухоли иммунных клетках, чтобы тем самым доставлять полипептид-антагонист TGF-бета в микроокружение опухоли.
6. Иммуностимулирующая бактерия по п.5, отличающаяся тем, что TGF-бета антагонист выбран из антитела против TGF-бета, антитела против TGF-бета-рецептора и растворимого пептида-антагониста TGF-бета.
7. Иммуностимулирующая бактерия по п.5 или 6, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид-антагонист TGF-бета, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную последовательность для секреции кодированного полипептида.

8. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что плазида кодирует иммуностимулирующий белок, где иммуностимулирующий белок придает или вносит вклад в противоопухолевый иммунный ответ в микроокружении опухоли.
9. Иммуностимулирующая бактерия по п.8, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок, который придает или вносит вклад в противоопухолевый иммунный ответ в микроокружении опухоли, выбран из одного или нескольких из:IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-36 гамма, IL-2, который имеет ослабленное связывание сIL-2Ra, IL-15/IL-15R альфа цепным комплексом, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IL-2, модифицированный таким образом, что он не связывается сIL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон-α, интерферон-β, интерферон-γ, CCL3, CCL4, CCL5, белками, которые вовлечены в или которые действуют или усиливают рекрутмент/устойчивость т-клеток, CD40, CD40-лигандом, CD28, OX40, OX40-лигандом, 4-1 BB, 4-1 BB-лигандом, членами семейства B7-CD28, антагонистами CD47, антагонистами полипептида TGF-бета и членамисуперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).
10. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
11. Иммуностимулирующая бактерия по п.10, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который выбран из Fab, Fab', F (ab')₂, одноцепочечного Fv (scFv), Fv, dsFv, нанотела, фрагмента ди-антитела и одноцепочечного антитела.
12. Иммуностимулирующая бактерия по п.10 или п.11, отличающаяся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными или являются человеческими.
13. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.10-12, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является антагонистом PD -1, PD-L1, CTLA -4, VEGF, VEGFR2 или IL -6.
14. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-13, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой противораковое терапевтическое средство.

15. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован, посредством чего бактерией является *pagP/msbB*.
16. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, который является иммуностимулирующим белком, где: иммуностимулирующий белок, будучи экспрессированным в субъекте млекопитающего, придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли; иммуностимулирующий белок кодируется в плазмиде в бактериях под контролем эукариотического промотора; и геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки.
17. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующих терапевтический продукт, который является иммуностимулирующим белком, где: иммуностимулирующий белок, будучи экспрессированным в субъекте млекопитающего, придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли; иммуностимулирующий белок кодируется в плазмиде в бактериях под контролем эукариотического промотора; и геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что он индуцирует меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках.
18. Иммуностимулирующая бактерия по п.16 или 17, отличающаяся тем, что геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки, и он индуцирует меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках.
19. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-18, содержащая мутацию в геноме бактерии, которая снижает токсичность или инфекционность неиммунных клеток в хозяине.

20. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-19, отличающаяся тем, что бактерией является *pagP*.
21. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.16-19, в которой иммуностимулирующая бактерия представляет собой один или более из *purI* (*purM*), *msbB*, *purD*, флагеллин (*fliC*/*fljB*), *pagP*, *adrA*, *CsgD*, *QseC*, and *hilA*.
22. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-21, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия представляет собой *hilA* и/или флагеллин(*fliC*/*fljB*)..
23. Иммуностимулирующая бактерия по п.22, которая представляет собой *pagP*
24. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-23, которая представляет собой *pagP*/*msbB*.
25. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-23, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия представляет собой *hilA*.
26. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-25, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический продукт, функционально связана для экспрессии с нуклеиновой кислотой, кодирующей секреторный сигнал, посредством чего при экспрессии в хозяине терапевтический продукт секретируется.
27. Иммуностимулирующая бактерия по п.26, в которой терапевтический продукт представляет собой белок.
28. Иммуностимулирующая бактерия по п.27, в которой терапевтический продукт представляет собой иммуностимулирующий белок.
29. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-28, отличающаяся тем, что бактерией является флагеллин(*fliC*/*fljB*) и *pagP*.
30. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-29, в которой бактерия является ауксотрофной для аденозина, или для аденозина и аденина.
31. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-30, отличающаяся тем, что иммуностимулирующей бактерией является аспартат-полуальдегид-дегидрогеназа (*asd*).
32. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-31, которая представляет собой аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*), где бактерия является *asd* благодаря

- разрушению или делеции всех или части эндогенного гена, кодирующего аспарат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*), посредством чего эндогенный *asd* не экспрессируется.
33. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-32, которая кодирует аспарат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*) на плазмиде под контролем бактериального промотора.
34. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-32, которая кодирует аспарат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*) на плазмиде под контролем эукариотического промотора.
35. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-34, которая представляет собой *msbB*
36. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-35, которая представляет собой *purI* (*purM*)
37. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-36, которая представляет собой *asd*, *purI*, *msbB*, и один или более из флагеллин (*fliC*/*fljB*) and *pagP*.
38. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-37, которая является ауксотрофной для аденозина.
39. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-38, отличающаяся тем, что плазида присутствует в небольшом количестве копий или в среднем количестве копий.
40. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-38, отличающаяся тем, что плазида содержит сайт инициации репликации от среднего числа копий до низкого.
41. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-38, отличающаяся тем, что плазида содержит сайт инициации репликации с низким числом копий.
42. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-41, отличающаяся тем, что плазида присутствует в небольшом количестве копий.
43. Иммуностимулирующая бактерия по п.39, в которой среднее число копий составляет менее 150 или менее примерно 150 и более 20 или около 20 или между 20 или 25 и 150 копий.
44. Иммуностимулирующая бактерия по п.42, в которой низкое число копий составляет менее 25 или менее 20 или менее 25 или менее 20 копий.

45. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-44, в которой начало репликации в плазмиде выбирают из происходящих из pBR322, p15A, pSC101, pMB1, colE1, colE2, pPS10, R6K, R1, RK2, и pUC.
46. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-44, которая кодирует терапевтический продукт на плазмиде в бактериях, где экспрессия продукта находится под контролем эукариотических регуляторных сигналов.
47. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-44, отличающаяся тем, что геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что он индуцирует меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках (снижает пироптоз), и иммуностимулирующая бактерия накапливается в опухолях или в микроокружении опухоли или в находящихся в опухоли иммунных клетках, чтобы тем самым доставить кодируемый терапевтический продукт.
48. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-46, отличающаяся тем, что плазида кодирует терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора.
49. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-48, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой противораковое терапевтическое средство.
50. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-49, отличающаяся тем, что противораковое терапевтическое средство представляет собой белок, стимулирующий иммунную систему хозяина.
51. Иммуностимулирующая бактерия по п.48, в которой терапевтический продукт представляет собой нуклеиновую кислоту или белок.
52. Иммуностимулирующая бактерия по п.51, в которой терапевтический продукт представляет собой белок.
53. Иммуностимулирующая бактерия по п.52, в которой:
терапевтический продукт представляет собой иммуностимулирующий белок;
иммуностимулирующий белок, будучи экспрессированным в субъекте млекопитающего, придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли;

- иммуностимулирующий белок кодируется в плазмиде в бактериях под контролем эукариотического промотора; и
- геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки.
54. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-49, в которой терапевтический продукт представляет собой РНК, которая нацеливает на иммунную контрольную точку.
55. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-54, отличающаяся тем, что терапевтический продукт экспрессируется под контролем эукариотического промотора, представляющего собой промотор РНК-полимеразы II или промотор РНК-полимеразы III.
56. Иммуностимулирующая бактерия по п.55, в которой промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II, который представляет собой вирусный промотор или промотор РНК-полимеразы II млекопитающего.
57. Иммуностимулирующая бактерия по п.56, в которой промотор представляет собой вирусный промотор, выбранный из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора SV40, промотора вируса Эпштейна-Барра (EBV), промотора вируса герпеса и промотора аденовируса.
58. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.53-56, отличающаяся тем, что промотор активен в микроокружении опухоли (ТМЕ) эукариотического субъекта.
59. Иммуностимулирующая бактерия по п.58, в которой промотор активен в гипоксических условиях или в условиях, когда рН меньше 7.
60. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-53, отличающаяся тем, что терапевтический продукт находится под контролем промотора, выбранного из промотора фактора удлинения-1 (EF1) или промотора UBC, или промотора PGK, промотора CAGG, промотора EIF4a1, промотора CBA (бета актина цыпленка), промотора MND и промотора CD68.
61. Иммуностимулирующая бактерия по п.60, в которой промотор представляет собой промотор EF1 альфа.
62. Иммуностимулирующая бактерия по п.56 или п.57, в которой промотор представляет собой вирусный промотор, который является поздним промотором.

63. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-62, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, где:
 иммуностимулирующая бактерия представляет собой разновидность *Salmonella*;
 иммуностимулирующая бактерия представляет собой аденозинуксотрон и представляет собой флагеллин(*fliC*⁻/*fljB*⁻); и
 терапевтический продукт, кодируемый на плазмиде, экспрессируется под контролем эукариотических регуляторных последовательностей.
64. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-63, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический продукт на плазмиде, функционально связана с регуляторными последовательностями, распознаваемыми эукариотическим хозяином.
65. Иммуностимулирующая бактерия по п.64, в которой регуляторные последовательности содержат терминатор и/или промоторы, выбранные из SV40, hGH, BGH, бета-глобулина кур и генов rbGlob (глобулин кролика).
66. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-65, содержащая мутацию в геноме бактерии, которая снижает токсичность или инфекционность неиммунных клеток в хозяине.
67. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-66, в которой бактерия представляет собой *pagP*.
68. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-67, в которой иммуностимулирующей бактерией является флагеллин(*fliC*⁻/*fljB*⁻) и/или *pagP*⁻, и один и более из *purI*(*purM*⁻),*msbB*⁻, *purD*⁻, *adrA*⁻, *CsgD*⁻, *QseC*⁻, и *hilA*⁻.
69. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-68, которая представляет собой *pagP* .
70. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-69, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия представляет собой *hilA* и флагеллин (*fliC*/*fljB*).
71. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-70, причем иммуностимулирующая бактерия представляет собой *hilA*⁻, *pagP*⁻, и флагеллин (*fliC*⁻/*fljB*⁻).

72. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-71, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический продукт на плазмиде, функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей секреторный сигнал, посредством чего при экспрессии в хозяине продукт секретируется.
73. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-72, отличающаяся тем, что плазида кодирует иммуностимулирующий белок, который придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли.
74. Иммуностимулирующая бактерия по п.73, в которой иммуностимулирующим белком, который придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли, является цитокин.
75. Иммуностимулирующая бактерия по п.73, в которой иммуностимулирующим белком, который придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли, является хемокин.
76. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.73-75, в которой иммуностимулирующий белок, который придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли, выбирают из одного или нескольких из: IL -2, IL -7, IL -12 P70 (IL -12 p40 + IL -12 p35) IL -15, IL -36 гамма, IL -2, который имеет ослабленное связывание с IL -2 га, IL -15/IL -15 R-альфа-цепочечным комплексом, IL -18, IL -2, модифицированный таким образом, что он не связывается с IL -2 га, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, CCL3, CCL4, CCL5, белками, которые вовлечены в или которые действуют или усиливают рекрутмент/устойчивость т-клеток, CD40, CD40-лиганд, CD28, OX40, OX40-лиганд, 4-1 BB, 4-1 BB-лиганд, члены семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антагонисты полипептида TGF-бета и члены суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).
77. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующих полипептид-антагонист TGF-beta, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что он индуцирует меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках (снижает пироптоз), в результате чего иммуностимулирующая бактерия накапливается в опухолях или в микроокружении опухоли или в находящихся в

- опухоли иммунных клетках, чтобы таким образом доставлять полипептид-антагонист TGF-бета в микроокружение опухоли.
78. Иммуностимулирующая бактерия по п.76, в которой антагонист TGF-бета выбран из анти-TGF-бета-антитела, антитела против TGF-бета-рецептора и растворимого пептида-антагониста TGF-бета.
79. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.73-76, в которой иммуностимулирующий белок, который придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли, кодируется в плазмиде так, что при экспрессии он является мембранным.
80. Иммуностимулирующая бактерия по п.76, в которой антагонист TGF-бета выбран из анти-TGF-бета антитела.
81. Иммуностимулирующая бактерия по п.77 или п.78, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид-антагонист TGF-бета, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную последовательность для секреции кодированного полипептида.
82. Иммуностимулирующая бактерия по п.73, в которой иммуностимулирующим белком, который придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли, является интерлейкин.
83. Иммуностимулирующая бактерия по п.82, отличающаяся тем, что интерлейкин представляет собой IL -2, который модифицирован так, что он не связывается с IL -2 Ra, в результате чего пролиферация регуляторных т-клеток снижается или ингибируется.
84. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-83, отличающаяся тем, что плазида содержит одну или более из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок листериолизин O (LLO), в котором отсутствует сигнальная последовательность (cytoLLO), звено CpG, последовательность, направленная на ядерную мишень ДНК (DTS), и связывающийся с ретиноевой кислотой ген-1 (RIG-1).
85. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-84, отличающаяся тем, что плазида кодирует последовательность нуклеотидов, которая является агонистом индуцируемого ретиноевой кислотой гена I (RIG -1).

86. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-85, которая модифицирована так, чтобы иметь пониженную патогенность, посредством чего инфицирование эпителиальных и/или других неиммунных клеток уменьшается относительно бактерии без модификации.
87. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-86, которая имеет модификацию в системе секреции типа 3 или системе секреции типа 4.
88. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-87, в которой иммуностимулирующая бактерия включает делецию *purl*, делецию *msbB*, делецию *asd* и делецию *adrA*.
89. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-88, которая включает нуклеиновую кислоту, которая включает звено CpG, где звено CpG распознается toll-подобным рецептором 9 (TLR9).
90. Иммуностимулирующая бактерия по п.89, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, содержащая звено CpG, кодируется в плазмиде.
91. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-90, которая включает нуклеиновую кислоту, кодирующую звено CpG, где нуклеиновая кислота, кодирующая звено CpG, включена в или является частью бактериального гена, который кодируется на плазмиде.
92. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 89-91, в которой ген, который содержит звено CpG, представляет собой *asd*, где *asd* кодируется в плазмиде.
93. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-92, в которой бактерия кодирует *asd* на плазмиде, и ее экспрессия находится под контролем бактериального промотора для экспрессии при культивировании бактерии *in vitro*.
94. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-93, которая представляет собой *msbB/asd/purl*.
95. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-94, в которой *prgH* и/или *prgK* инактивированы или удалены.
96. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-95, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую *cytO/LLO*, который представляет собой белок листериолизин O (LLO), не содержащий сигнальную последовательность.

97. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-96, которая содержит ДНК-ядерную направляющую последовательность (DTS), кодируемую на плазмиде.
98. Иммуностимулирующая бактерия по п.97, в которой DTS представляет собой SV40-DTS.
99. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-98, которая имеет делецию или модификацию в гене, кодирующем эндонуклеазу I (*endA*), посредством чего активность *endA* ингибируется или удаляется.
100. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-99, которая содержит один или несколько звеньев *СpG*, селектируемый маркер гена *asd* для поддержания плазмиды и ДНК-ядерную направляющую последовательность.
101. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-100, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия включает делецию *purI*, делецию *msbB*, делецию *asd* и, возможно, делецию *adrA*.
102. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-101, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия содержит:
- одну или несколько мутаций в гене, который изменяет биосинтез липополисахарида, выбранного из одного или нескольких из *rfaL*, *rfaG*, *rfaH*, *rfaD*, *rfaP*, *rFb*, *rfa*, *msbB*, *htrB*, *firA*, *pagL*, *pagP*, *lpxR*, *arnT*, *eptA*, и *lpxT*; и/или
- одну или несколько мутаций, которые вносят суицидный ген и выбран из одного или нескольких *sacB*, *nuk*, *hok*, *gef*, *kil* и *phlA*; и/или
- одна или более из мутаций, которая вводит бактериальный лизисный ген и выбран из одного или обоих из *hly* и *cly*, и/или
- мутацию в одном или более вирулентных факторах (*s*), выбранных из *IsyA*, *pag*, *prg*, *iscA*, *virG*, *plc* и *uact*; и/или
- одну или несколько мутаций в гене, который модифицирует стрессовый ответ, выбран из *recA*, *htrA*, *htpR*, *hsp* и *groEL* и/или
- мутацию в *min*, которая нарушает клеточный цикл; и/или

- одну или несколько мутаций в гене, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, выбранные из *суа*, *срр*, *phoP/phoQ* и *ompR*.
103. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-102, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой противоопухолевое антитело или его фрагмент или представляет собой цитотоксин.
104. Иммуностимулирующая бактерия по п.103, отличающаяся тем, что противоопухолевое антитело или его фрагмент представляют собой Fab, Fab', scFab, scFv, Fvфрагмент или нанотело.
105. Иммуностимулирующая бактерия по п.103, в которой терапевтический продукт представляет собой цитотоксин, выбранный из рицина, сапорина и токсина shiga.
106. Иммуностимулирующая бактерия по п.103, в которой терапевтический продукт представляет собой противоопухолевое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который является ингибитором иммунной контрольной точки.
107. Иммуностимулирующая бактерия по п.3 или 106, отличающаяся тем, что антитело представляет собой анти-PD -1, анти-CTLA4, анти-PD -L1, анти-VEGF, анти-VEGFR или анти-IL6 антитело или их антигенсвязывающий фрагмент.
108. Иммуностимулирующая бактерия по п.107, в которой антитело представляет собой одноцепочечное антитело.
109. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-108, отличающаяся тем, что бактерия кодирует опухолевый антиген.
110. Иммуностимулирующая бактерия по п.109, в которой опухолевый антиген представляет собой неоантиген.
111. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-109, кодирующая ингибиторную РНК или кассету CRISPR, где:
ингибиторная РНК или CRISPR-кассета кодируется в плазмиде в бактериях под контролем эукариотического промотора; и
РНК или кассета CRISPR ингибирует или разрушает или подавляет иммунную контрольную точку.

112. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-111, в которой терапевтический продукт представляет собой иммуностимулирующий белок, который придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли, и/или представляет собой последовательность нуклеотидов, кодирующих ингибиторную РНК, где терапевтический продукт, будучи экспрессированным у млекопитающего, придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли.
113. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-112, в которой терапевтический продукт представляет собой РНК, а кодирующая РНК представляет собой короткую РНК-шпильку (shРНК) или микроРНК (miРНК).
114. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-113, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой ингибирующую РНК;
- ингибирующая РНК, будучи экспрессирована у млекопитающего, придает или способствует противоопухолевому иммунитету;
- ингибирующая РНК кодируется в плазмиде в бактериях под контролем эукариотического промотора; и
- геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован так, что он индуцирует меньшую гибель клеток в находящихся в опухоли иммунных клетках, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что она предпочтительно инфицирует находящиеся в опухоли иммунные клетки.
115. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-114, отличающаяся тем, что плазида в бактериях кодирует терапевтический продукт, представляющий собой антитело или его фрагмент, или ингибирующую РНК или CRISPR-кассету, которая ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию одной или нескольких из трех первичных восстановительных экзонуклеаз 1 (TREX1), PD-1, PD-L1 (B7-H1), VEGF, TGF-бета изоформа 1, бета-катенин, CTLA-4, PD-L2, PD-2, IDO1, IDO2, SIRP α , CD47, VISTA (B7-H5), LIGHT, HVEM, CD28, LAG3, TIM3, TIGIT, Галектин-9, CEACAM1, CD155, CD112, CD226, CD244 (2B4), B7-H2, B7-H3, ICOS, GITR, B7-H4, B7-H6, CD27, CD40, CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD137 (4-1BB), CD200, CD272 (BTLA), CD160, CD39, CD73, A2a рецептор, A2b рецептор, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B, HLA-G, OX40, OX-40L, KIR, TIM1, TIM4, STAT3, Стабилин-1 (CLEVER-1), ДНКзаII и РНКзаH2.

116. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-114, в которой плазмида кодирует shРНК или микроРНК, которая ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию изоформы 1 TGF-бета, но не изоформы 2 TGF-бета или изоформы 3 TGF-бета; или
- плазмида кодирует shРНК или микроРНК, которая ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию изоформ TGF-beta 1 и 3, а не изоформы TGF-бета 2.
117. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-114, которая кодирует РНК, где РНК экспрессируется под контролем промотора РНК-полимеразы III (RNAP III) или РНК-полимеразы II (RNAP II).
118. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-117, в которой терапевтический продукт, кодируемый на плазмиде, представляет собой РНК и/или кассету CRISPR, которая ингибирует или разрушает или подавляет иммунную контрольную точку, где РНК экспрессируется под контролем промотора RNAP II, который является вирусным промотором или промотором RNAP II млекопитающего.
119. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-118, которая кодирует антитело против рака или его антигенсвязывающий фрагмент.
120. Иммуностимулирующая бактерия по п.119, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является антигенсвязывающим фрагментом, выбранным из Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечного Fv (scFv), Fv, dsFv, нанотел и ди-антитела.
121. Иммуностимулирующая бактерия по п.119 или п.120, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является ингибирующим анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-CTLA4, анти-VEGF, анти-VEGFR2 или анти-IL-6-антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.
122. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.119-121, в которой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой scFv.
123. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-122, отличающаяся тем, что бактерия представляет собой грамотрицательную бактерию.
124. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-122, в которой бактерия представляет собой штамм *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Bifidobacteriae*, *Rickettsia*, *Vibrio*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Cholera*, *Corynebacterium*,

Citrobacter, Chlamydia, Haemophilus, Brucella, Mycobacterium, Mycoplasma, Legionella, Rhodococcus, Pseudomonas, Helicobacter, Bacillus, или Erysipelothrix, или их ослабленный штамм или модифицированный штамм любого из предшествующих списков бактериальных штаммов.

125. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-124, отличающаяся тем, что немодифицированная бактерия представляет собой ослабленную бактерию.

126. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-124, отличающаяся тем, что немодифицированная бактерия представляет собой штамм дикого типа.

127. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-126, которая представляет собой штамм *Salmonella*.

128. Иммуностимулирующая бактерия по п.127, которая представляет собой штамм *Salmonellatyphimurium*.

129. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-124, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия получена из штамма AST -100 (VNP20009 или YS1646), или штамма ATCC 14028, или штамма, имеющего все идентифицирующие характеристики штамма ATCC 14028

130. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-129, отличающаяся тем, что иммуностимулирующую бактерию получают из штаммов *Salmonellatyphimurium* выбранных из штаммов, обозначенных AST-100, VNP20009, YS1646 (ATCC #202165), RE88, SL7207, χ 8429, χ 8431, χ 8468 или штамма ATCC 14028 дикого типа.

131. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-130, которая содержит, кодированную на плазмиде, нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок, который представляет собой один или более из GM-CSF, IL -2, IL -7, IL -12 P70 (IL -12 p40 + IL -12 p35) IL -15, IL -15/IL -15 R-альфа-цепочечный комплекс, IL -2, который имеет ослабленное связывание с IL -2 Ra, IL -18, IL -36 гамма, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые вовлечены в действие или усиливают рекрутмент/устойчивость т-клеток, CD40, CD40-лиганда, OX40, OX40-Лиганда, 4-1 BB, 4-1 BB лиганда, представителей семейства B7-CD28, антагониста полипептида TGF-бета, антагониста CD47, интерферона-альфа, интерферона-бета, интерферона-гамма или членов суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

132. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-130, которая содержит, кодированную на плазмиде, нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический белок, который представляет собой один или несколько GM-CSF, IL -2, IL -7, IL -12, IL -15, IL -18, IL -21, IL -12 P70 (IL -12 p40 + IL -12 p35), комплекс IL -15/IL -15 R, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, молекулы, вовлеченные в потенциальный рекрутмент/устойчивость т-клеток, CD40, лиганд CD40 (CD40L), OX40 лиганд OX40, (OX40L), 4-1 BB, 4-1 BB лиганд (4-1 BBL), интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, члены семейства B7-CD28 и члены суперсемейства TNFR.
133. Иммуностимулирующая бактерия по п.131, которая включает нуклеиновую кислоту, кодирующую два из терапевтических белков.
134. Иммуностимулирующая бактерия по п.133, отличающаяся тем, что различные промоторы и терминаторы управляют экспрессией каждого терапевтического белка.
135. Иммуностимулирующая бактерия по п.133, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтические белки, экспрессируется из одного промотора и включает один терминатор, а последовательность, кодирующая каждый белок, содержит внутренний сайт вхождения врибосому (IRES), посредством чего кодированная нуклеиновая кислота является полицистронной.
136. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-135, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический белок, находится под контролем промотора, выбранного из EF -1 альфа, CMV, eIF4A1, CAG, MND или GAPDH.
137. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-136, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический белок, включает терминаторы, выбранные из терминатора SV40, терминатора гена, кодирующего гормон роста человека (HGH), терминатора гена, кодирующего бычий гормон роста (BGH), и терминатора гена, кодирующего кроличий бета-глобулин (rbGlob).
138. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-136, в которой плаزمид, которая кодирует терапевтический продукт, содержит конструкцию, которая включает энхансер, промотор, открытую рамку считывания, кодирующую терапевтический белок, и полиA tail.
139. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-136, отличающаяся тем, что плазмид, которая кодирует терапевтический продукт, содержит конструкцию, которая

включает один или более из энхансера, промотора, IRES, открытую рамку считывания, кодирующую терапевтический продукт, и полиA tail.

140. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-136, в которой плазида, которая кодирует терапевтический продукт, содержит конструкцию, которая включает энхансер, промотор, IRES, последовательность локализации, открытую рамку считывания, кодирующую терапевтический продукт, и полиA tail.

141. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 138-140, отличающаяся тем, что конструкция на плазмиде, кодирующей терапевтический продукт, содержит вируса гепатита (WHP) посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE).

142. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-141, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия является ауксотрофной для аденозина и включает:

делецию в своих нуклеиновых кислотах, кодирующих флагеллу;

делецию в endA и

плазмиду, которая кодирует CytoLLO, содержит последовательность ядерной локализации, содержит систему asd плазмидной комплементации и кодирует терапевтический продукт, который ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию иммунной контрольной точки или другой мишени, ингибирование, супрессия или нарушение которой повышает противоопухолевую иммунную реакцию в субъекте.

143. Иммуностимулирующая бактерия по п.142, в которой терапевтический продукт представляет собой РНК, или антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

144. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-143, в которой бактерия была обработана полиоксином для снижения пирогенности.

145. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуностимулирующую бактерию по любому из пп.1-144 в фармацевтически приемлемом носителе.

146. Фармацевтическая композиция по п.145, которая предназначена для введения без разбавления.

147. Фармацевтическая композиция по п.145 или п.146, которая приготовлена в виде единичной дозы.

148. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 145-147, которая предназначена для парентерального введения.
149. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 145-147, которая предназначена для системного введения.
150. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 145-147, которая предназначена для внутриопухолевого или внутривентрикулярного введения.
151. Способ лечения рака, который включает солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль у субъекта, включающий введение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп.1-144, или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 145-150.
152. Способ по п.151, отличающийся тем, что иммуностимулирующую бактерию или фармацевтическую композицию вводят системно.
153. Способ по п.151, отличающийся тем, что иммуностимулирующую бактерию или фармацевтическую композицию вводят интраназально или интравентрикулярно.
154. Применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп.1-144 или фармацевтической композиции по любому из пунктов 145-150 для лечения рака, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у субъекта.
155. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-144 для применения для лечения рака, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у субъекта.
156. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 151-155, где субъектом является человек.
157. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.151-156, отличающиеся тем, что рак включает солидную опухоль.
158. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.151-156, отличающиеся тем, что рак включает гематологическое злокачественное новообразование.

159. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 151, 152 и 154-158, в которых лечение включает системное введение иммуностимулирующей бактерии или фармацевтической композиции.
160. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 151-159, в которой лечение включает комбинированную терапию, в которой применяют второе противораковое средство или лечение.
161. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по п. 160, в которой второе противораковое средство или лечение применяют до, одновременно с, после или с перерывами с иммуностимулирующей бактерией или фармацевтической композицией.
162. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по п. 161, в которой второе противораковое средство или лечение представляет собой иммунотерапию.
163. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по п. 161, в которой второе противораковое средство или лечение включает онколитическую вирусную терапию.
164. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 160-162, в которой второе противораковое средство или лечение включает введение антитела или фрагмента антитела.
165. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по п. 161, в которой второе противораковое средство или лечение включает излучение или химиотерапию.
166. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по п. 162 или п. 164, в которой второе противораковое средство или лечение представляет собой иммунотерапию, которая включает введение анти-PD -1, или анти-PD -L1, или анти-CTLA4, или анти-IL6, или анти-VEGF, или анти-VEGFR2 антитела, или его фрагмента.
167. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 160-162, 164 и 166, где:
- второе противораковое средство или лечение включает введение антитела или фрагмента антитела; и
- фрагмент антитела представляет собой scFv или нанотело.

168. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 153 -167, где введение иммуностимулирующей бактерии является парентеральным.
169. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 154 -167, где введение иммуностимулирующей бактерии является пероральным или ректальным или аэрозолем в легкое или внутриопухолевым.
170. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 154-168, в которой введение иммуностимулирующей бактерии является внутривенным, внутримышечным или подкожным.
171. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 151-170, в которых рак выбран из лейкемии, лимфомы, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы и шеи, *colocutum*, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.
172. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 151-171, в которой иммуностимулирующая бактерия представляет собой *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, или виды *Ecoli*.
173. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 151-172, в которой бактерия является видом *Salmonella*.
174. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 151-173, в которой бактерия представляет собой штамм *Salmonellatyphimurium*.
175. Способ по п. 174, в котором *Salmonellatyphimurium* получают из штамма *Salmonellatyphimurium* дикого типа, имеющего все идентифицирующие характеристики штамма, депонированного под номером ATCC № 14028, или из штамма, депонированного под номером ATCC № 14028
176. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 153-175, в котором введение иммуностимулирующей бактерии осуществляют путем внутрибрюшинного или внутриопухолевого введения.
177. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 151-176, где субъект имеет метастатический рак.

178. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 151-177, где бактерия представляет собой h1A.
179. Выделенная клетка, содержащая иммуностимулирующую бактерию по любому из пп.1-144.
180. Клетка по п.179, которая представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, опухолевую клетку или первичную клеточную линию.
181. Клетка по п.179, которая представляет собой гемопоэтическую клетку.
182. Клетка по п.179, которая представляет собой Т-клетку.
183. Клетка по любому из пунктов 179-182, которая продуцируется ex vivo путем инфицирования клетки иммуностимулирующей бактерией.
184. Выделенная клетка или культивируемые клетки, содержащие иммуностимулирующую бактерию по любому из пп.1-144.
185. Клетка по п.184, которая представляет собой Т-клетку или гемопоэтическую клетку.
186. Клетка по п.184 или 185, которая продуцируется ex vivo путем инфицирования клетки иммуностимулирующей бактерией.
187. Способ лечения рака, включающий введение клетки по любому из пунктов 179-186 субъекту с раком, который включает солидную опухоль или представляет собой гематологическое злокачественное новообразование.
188. Способ по п.187, в котором рак включает солидную опухоль.
189. Способ по п.187 или 188, в котором рак является метастатическим.
190. Способ по любому из пп.187-189, в котором рак выбран из лимфомы, лейкоза, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы и шеи, колоректума, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.
191. Применение клетки по любому из пунктов 179-186 для лечения рака.

192. Применение по п.191, в котором рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.
193. Применение по п.191 или 192, в котором рак является метастатическим.
194. Применение по любому из пп.191-193, в котором рак выбран из лимфомы, лейкоза, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы и шеи, колоректума, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.
195. Способ повышения способности терапевтической бактерии колонизировать опухоль, включающий модификацию генома, при этом бактерия представляет собой флагеллин (fliC/fljB) и/или ragP, и где бактерия включает плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, который является противораковым агентом или лечением.
196. Способ по п.195, в котором терапевтическая бактерия представляет собой иммуностимулирующую бактерию.
197. Способ по п.195 или 196, в котором бактерия является видом *Salmonella*.
198. Способ по п.197, в котором бактерией является *SalmonellaTyphimurium*.
199. Способ по п.198, в котором *Salmonellatyphimurium* получают из *Salmonellatyphimurium* дикого типа, имеющей все идентифицирующие характеристики штамма, депонированного под регистрационным номером ATCC 14028.
200. Способ по п.196, в котором бактерия представляет собой иммуностимулирующую бактерию по любому из пп.1-144.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуностимулирующая бактерия, включающая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где:
терапевтический продукт представляет собой противораковый терапевтический продукт;
геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован, за счет чего бактерия является флагеллодефицитной; и
бактерия дикого типа включает флагеллу.
2. Иммуностимулирующая бактерия по п.1, являющаяся флагеллин⁻ (*fliC/fliB*) и *pagP*.
3. Иммуностимулирующая бактерия по п. 2, являющаяся флагеллин⁻ (*fliC/fliB*), и *pagP*, и *msbB*, за счет чего иммуностимулирующая бактерия имеет пентаацилированный липополисахарид (ЛПС).
4. Иммуностимулирующая бактерия по п. 1, являющаяся *pagP*/*msbB*.
5. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-4, где противораковый терапевтический продукт представляет собой иммуностимулирующий белок, который создает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли.
6. Иммуностимулирующая бактерия по п. 5, где иммуностимулирующий белок, который создает или содействует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, является цитокином.
7. Иммуностимулирующая бактерия по п. 5, где иммуностимулирующий белок, который создает или содействует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, является хемокином.
8. Иммуностимулирующая бактерия по п. 5, где иммуностимулирующий белок, который создает или содействует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, выбран из одного или более из группы, включающей: IL-2, IL-7, IL-12P70 (IL-12P40 + IL-12P35), IL-15, IL-36 гамма, IL-2, который имеет пониженное связывание с IL-2Ra, IL-15/IL-15R альфа-цепочечный комплекс, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IL-2, модифицированный таким образом, что он обладает пониженным связыванием

или не связывается с IL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон- α , интерферон- β , интерферон- γ , CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые вовлечены в или которые действуют или усиливают рекрутмент/устойчивость Т клеток, CD40, лиганд CD40, CD28, OX40, лиганд OX40, 4-1BB, лиганд 4-1BB, члены B7-CD28 семейства, антагонисты CD47, полипептидные антагонисты TGF-бета и члены суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

9. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-4 где терапевтический продукт является полипептидом антагонистом TGF-бета.

10. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-4, где противораковый продукт является антагонистом TGF-бета, выбранным из антитела анти-TGF-бета, антитела рецептора анти-TGF-бета и растворимого полипептида антагониста TGF-бета.

11. Иммуностимулирующая бактерия по п. 9 или п. 10, где нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид антагонист TGF-бета, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную последовательность для секреции кодируемого продукта.

12. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

13. Иммуностимулирующая бактерия по п. 12, отличающаяся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из Fab, Fab', F(ab')₂, одноцепочечного Fv (scFv), Fv, dsFv, нанотела, фрагмента диатела и одноцепочечного антитела.

14. Иммуностимулирующая бактерия по п. 12 или п. 13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным или человеческим.

15. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 12-14, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антагонист PD-1, PD-L1, CTLA-4, VEGF, VEGFR2 или IL-6.

16. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-15, являющаяся *pagP*.

17. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-16, где иммуностимулирующая бактерия является одной или более из *purI* (*purM*), *msbB*, *purD*, флагеллин (*fliC*/*fljB*), *pagP*, *adrA*, *csgD*, *qseC* и *hilA*.

18. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-17, где иммуностимулирующая бактерия является *hilA*⁻ и/или флагеллин⁻ (*fliC*/*fljB*).
19. Иммуностимулирующая бактерия по п. 18, являющаяся *pagP*⁻.
20. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-19, являющаяся *pagP*⁻/*msbB*.
21. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-20, где нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический продукт, функционально связана для экспрессии с нуклеиновой кислотой, кодирующей секреторный сигнал, за счет чего при экспрессии в хозяине секретируется терапевтический продукт.
22. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-21, где бактерия является ауксотрофной для аденозина, или для аденозина и аденина.
23. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-22, являющаяся аспартат-полуальдегиддегидрогеназа⁻ (*asd*).
24. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-23 являющаяся аспартат-полуальдегиддегидрогеназа⁻ (*asd*), причем бактерия является *asd*⁻ благодаря разрушению или делеции всего или части эндогенного гена, кодирующего аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*), за счет чего эндогенная *asd* не экспрессируется.
25. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-24, кодирующая аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*) на плазмиде под контролем бактериального промотора.
26. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-25, являющаяся *msbB*.
27. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-26, являющаяся *purI* (*purM*).
28. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-27, являющаяся *asd*, *purI*, *msbB* и одной или обеими из флагеллин⁻ (*fliC*/*fljB*) и *pagP*.
29. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-28, являющаяся ауксотрофной для аденозина.

30. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-29, отличающаяся тем, что плаزمида присутствует в небольшом количестве копий или в среднем количестве копий.
31. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-29, отличающаяся тем, что плазмида содержит сайт инициации репликации от среднего числа копий до низкого.
32. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-29, отличающаяся тем, что плазмида содержит сайт инициации репликации с низким числом копий.
33. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-32, отличающаяся тем, что плазмида присутствует в небольшом количестве копий.
34. Иммуностимулирующая бактерия по п. 30, в которой среднее число копий составляет менее 150 или менее примерно 150 и более 20 или около 20, или между 20 и 150 копиями.
35. Иммуностимулирующая бактерия по п. 33, в которой низкое число копий составляет менее 25, или менее 20, или менее примерно 25, или менее примерно 20 копий.
36. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-35, в которой точка начала репликации в плазмиде выбирают из точек, происходящих из pBR322, p15A, pSC101, pMB1, colE1, colE2, pPS10, R6K, R1, RK2 и pUC.
37. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-36, которая кодирует терапевтический продукт на плазмиде в бактерии, причем экспрессия продукта находится под контролем эукариотических регуляторных сигналов.
38. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-37, отличающаяся тем, что противораковое терапевтическое средство представляет собой белок, стимулирующий иммунную систему хозяина.
39. Иммуностимулирующая бактерия по п. 38, где терапевтический продукт представляет собой нуклеиновую кислоту или белок.
40. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-39, где противораковый терапевтический продукт экспрессируется под контролем эукариотического промотора, который является промотором РНК полимеразы II или промотором РНК полимеразы III.
41. Иммуностимулирующая бактерия по п. 40, где промотор является промотором РНК-полимеразы II, который представляет собой вирусный промотор или промотор РНК-полимеразы II млекопитающего.

42. Иммуностимулирующая бактерия по п. 41, в которой промотор представляет собой вирусный промотор, выбранный из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора SV40, промотора вируса Эпштейна-Барра (EBV), промотора вируса герпеса и промотора аденовируса.
43. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 40-42, отличающаяся тем, что промотор активен в микроокружении опухоли (TME) эукариотического субъекта.
44. Иммуностимулирующая бактерия по п. 43, отличающаяся тем, что промотор активен в условиях гипоксии или в условиях, когда pH меньше 7.
45. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-40, отличающаяся тем, что противораковый терапевтический продукт находится под контролем промотора, выбранного из промотора фактора удлинения-1 (EF1) альфа, или промотора UBC, или промотора PGK, промотора CAGG, промотора EIF4a1, промотора CBA (бета актина цыпленка), промотора MND и промотора CD68.
46. Иммуностимулирующая бактерия по п. 45, в которой промотор представляет собой промотор EF1 альфа.
47. Иммуностимулирующая бактерия по п. 41 или п. 42, где промотор представляет собой вирусный промотор, который является поздним промотором.
48. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-47, содержащая плазмиду, кодирующую противораковый терапевтический продукт, где:
иммуностимулирующая бактерия представляет собой вид *Salmonella*;
иммуностимулирующая бактерия представляет собой аденозин ауксотроф и является флагеллин⁻ (*fliC⁻/fljB⁻*); и
терапевтический продукт, кодируемый на плазмиде, экспрессируется под контролем эукариотических регуляторных последовательностей.
49. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-48, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический продукт на плазмиде, функционально связана с регуляторными последовательностями, распознаваемыми эукариотическим хозяином.
50. Иммуностимулирующая бактерия по п. 49, в которой регуляторные последовательности содержат терминатор и/или промоторы, выбранные из SV40, hGH, BGH, бета-глобулина кур и генов *rbGlob* (глобулина кролика).

51. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-50, содержащая мутацию в геноме бактерии, которая снижает токсичность или инфекционность неиммунных клеток в хозяине.
52. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-51, в которой бактерия является *pagP*.
53. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-52, где иммуностимулирующей бактерией является флагеллин (*flhC/flhB*) и/или *pagP*, и одной или более из *purI(purM)*, *msbB*, *purD*, *adrA*, *CsgD*, *QseC*, и *hilA*.
54. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-53, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический продукт на плазмиде, функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей секреторный сигнал, за счет чего, при экспрессии в хозяине, продукт секретируется.
55. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 7-54, где иммуностимулирующий белок, который создает или содействует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, кодируется на плазмиде таким образом, что при экспрессии он присоединен к мембране.
56. Иммуностимулирующая бактерия по п. 55, где иммуностимулирующий белок, который создает или содействует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, представляет собой полипептид антагонист TGF-бета, являющийся антителом анти-TGF-бета.
57. Иммуностимулирующая бактерия по п. 56, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид антагонист TGF-бета, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную последовательность для секреции кодированного полипептида.
58. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 7-54, где иммуностимулирующим белком, который придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли, является интерлейкин.
59. Иммуностимулирующая бактерия по п. 58, отличающаяся тем, что интерлейкин представляет собой IL-2, который модифицирован таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, в результате чего пролиферация регуляторных Т-клеток снижается или ингибируется.

60. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-59, отличающаяся тем, что плазида содержит одну или более из последовательности нуклеиновой кислоты, (кислот), кодирующей белок листериолизин О (LLO), в котором отсутствует сигнальная последовательность (cytoLLO), мотив CpG, ДНК-ядерная направляющая последовательность (DTS), и элемент связывания индуцируемого ретиноевой кислотой гена I (RIG -1).
61. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-60, отличающаяся тем, что плазида кодирует последовательность нуклеотидов, которая является агонистом индуцируемого ретиноевой кислотой гена I (RIG -1).
62. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-61, которая модифицирована таким образом, чтобы иметь пониженную патогенность, за счет чего инфицирование эпителиальных и/или других неиммунных клеток снижено по сравнению с бактерией без модификации.
63. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-62, которая имеет модификацию в системе секреции типа 3 или в системе секреции типа 4.
64. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-63, где иммуностимулирующая бактерия включает делецию *purl*, делецию *msbB*, делецию *asd* и делецию *adrA*.
65. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-64, которая содержит нуклеиновую кислоту, включающую CpG мотив, где CpG мотив распознается толл-подобным рецептором 9 (TLR9).
66. Иммуностимулирующая бактерия по п. 65, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, содержащая CpG мотив, кодируется на плазмиде.
67. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-66, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CpG мотив, причем нуклеиновая кислота, кодирующая CpG мотив, включена в или является частью бактериального гена, который кодируется на плазмиде.
68. Иммуностимулирующая бактерия по п. 67, в которой ген, содержащий CpG мотив, представляет собой *asd*, где *asd* кодируется на плазмиде.

69. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-68, где бактерия кодирует *asd* на плазмиде, и ее экспрессия находится под контролем бактериального промотора для экспрессии при культивировании бактерии *in vitro*.
70. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-69, которая является *msbB⁻/asd/purI*.
71. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-70, в которой *prgH* и/или *prgK* инактивированы или удалены.
72. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-71, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую *cytO*, который представляет собой белок листериолизин О (LLO), не содержащий сигнальную последовательность.
73. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-72, которая содержит ДНК-ядерную направляющую последовательность (DTS), кодируемую на плазмиде.
74. Иммуностимулирующая бактерия по п. 73, в которой DTS представляет собой SV40 DTS.
75. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-74, которая имеет делецию или модификацию в гене, кодирующем эндонуклеазу I (*endA*), за счет чего активность *endA* ингибируется или элиминируется.
76. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-75, которая содержит один или несколько из CpG мотива, селективируемого маркера гена *asd* для поддержания плазмиды и ДНК-ядерной направляющей последовательности.
77. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-76, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия включает делецию *purl*, делецию *msbB*, делецию *asd* и, необязательно, делецию *adrA*.
78. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-77, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия содержит:
- одну или несколько мутаций, изменяющих биосинтез липополисахарида, в гене выбранном из одного или нескольких из *rfaL*, *rfaG*, *rfaH*, *rfaD*, *rfaP*, *rFb*, *rfa*, *msbB*, *htrB*, *firA*, *pagL*, *pagP*, *lpxR*, *arnT*, *eptA*, и *lpxT*; и/или
 - одну или несколько мутаций, вносящих суицидный ген и выбранный из одного или нескольких из *sacB*, *nuk*, *hok*, *gef*, *kil* и *phlA*; и/или

- одну или более из мутаций, вводящих бактериальный лизисный ген и выбранный из одного или обоих из *hly* и *cly*, и/или мутацию в одном или более вирулентных факторах, выбранных из *IsyA*, *pag*, *prg*, *iscA*, *virG*, *plc* и *act*; и/или одну или несколько мутаций, модифицирующих стрессовый ответ, в гене, выбранном из *recA*, *htrA*, *htpR*, *hsp* и *groEL*; и/или мутацию в *min*, которая нарушает клеточный цикл; и/или одну или несколько мутаций, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, в гене, выбранном из *суа*, *сrр*, *phoP/phoQ* и *ompR*.
79. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-78, отличающаяся тем, что противораковый терапевтический продукт представляет собой противоопухолевое антитело или его фрагмент, или представляет собой цитотоксин.
80. Иммуностимулирующая бактерия по п. 79, отличающаяся тем, что противоопухолевое антитело или его фрагмент представляют собой Fab, Fab', scFab, scFv, Fv фрагмент или нанотело.
81. Иммуностимулирующая бактерия по п. 79, в которой противораковый терапевтический продукт представляет собой цитотоксин, выбранный из рицина, сапорина и токсина shiga
82. Иммуностимулирующая бактерия по п. 79, в которой противораковый терапевтический продукт представляет собой противоопухолевое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который является ингибитором иммунной контрольной точки.
83. Иммуностимулирующая бактерия по п. 79 или п. 82, отличающаяся тем, что антитело представляет собой анти-PD-1, анти-CTLA4, анти-PD-L1, анти-VEGF, анти-VEGFR или анти-IL6 антитело или их антигенсвязывающий фрагмент.
84. Иммуностимулирующая бактерия по п. 83, в которой антитело представляет собой одноцепочечное антитело.
85. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-84, отличающаяся тем, что бактерия кодирует опухолевый антиген.
86. Иммуностимулирующая бактерия по п. 85, в которой опухолевый антиген представляет собой неоантиген.

87. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-86, кодирующая ингибиторную РНК (РНКи) или кассету CRISPR, где:
ингибиторная РНК или CRISPR-кассета кодируется на плазмиде в бактерии под контролем эукариотического промотора; и
РНКи или кассета CRISPR ингибирует, или разрушает, или подавляет иммунную контрольную точку.
88. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-87, где:
противораковый терапевтический продукт представляет собой иммуностимулирующий белок, который придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли, и/или представляет собой последовательность нуклеотидов, кодирующих ингибиторную РНК (РНКи), и
терапевтический продукт, будучи экспрессированным у млекопитающего, придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли.
89. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-88, где бактерия представляет собой штамм *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Bifidobacteriae*, *Rickettsia*, *Vibrio*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Cholera*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bacillus* или *Erysipelothrix*, или их ослабленный штамм, или модифицированный штамм любого из предшествующего списка бактериальных штаммов.
90. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-89, где немодифицированная бактерия представляет собой ослабленную бактерию.
91. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-89, где немодифицированная бактерия представляет собой штамм дикого типа.
92. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-91, представляющая собой штамм *Salmonella*.
93. Иммуностимулирующая бактерия по п. 92, представляющая собой штамм *Salmonella typhimurium*
94. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-93, где иммуностимулирующую бактерию получают из штамма AST-100 (VNP20009 или

YS1646), или штамма ATCC 14028, или штамма, имеющего все идентификационные характеристики штамма ATCC 14028.

95. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-94, где иммуностимулирующую бактерию получают из штамма *Salmonella typhimurium*, выбранного из штаммов AST-100, VNP20009, YS1646 (ATCC №202165), RE88, SL7207, χ 8429, χ 8431, χ 8468 или штамма дикого типа ATCC 14028.

96. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-95 включающая нуклеиновую кислоту, кодирующую два терапевтических белка.

97. Иммуностимулирующая бактерия по п. 96, отличающаяся тем, что различные промоторы и терминаторы контролируют экспрессию каждого терапевтического белка.

98. Иммуностимулирующая бактерия по п. 96, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтические белки, экспрессируется от одного промотора и включает один терминатор, и последовательность, кодирующая каждый белок, включает внутреннее место входа рибосомы (IRES), за счет чего закодированная нуклеиновая кислота является полицистронной.

99. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-98, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический белок, находится под контролем промотора, выбранного из EF-1 альфа, CMV, eIF4A1, CAG, MND или GAPDH промоторов.

100. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-99, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический белок, включает терминаторы, выбранные из терминатора SV40, терминатора гена, кодирующего гормон роста человека (HGH), терминатора гена, кодирующего бычий гормон роста (BGH), и терминатора гена, кодирующего кроличий бета-глобулин (rbGlob).

101. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-99, где плазида, которая кодирует терапевтический продукт, содержит конструкцию, включающую энхансер, промотор, открытую рамку считывания, кодирующую терапевтический белок, и цепь полиА.

102. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-99, отличающаяся тем, что плазида, которая кодирует терапевтический продукт, содержит конструкцию,

включающую один или более из энхансера, промотора, IRES, открытой рамки считывания, кодирующей терапевтический продукт, и цепи полиА.

103. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-99, где плазида, которая кодирует терапевтический продукт, содержит конструкцию, включающую энхансер, промотор, IRES, последовательность локализации, открытую рамку считывания, кодирующую терапевтический продукт, и цепь полиА.

104. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 101-103, отличающаяся тем, что конструкция на плазмиде, кодирующая терапевтический продукт, содержит посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита сурков (WHP).

105. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-104, где бактерия была обработана полимиксином для снижения пирогенности.

106. Фармацевтическая композиция, включающая иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 1-105 в фармацевтически приемлемом носителе.

107. Фармацевтическая композиция по п. 106, которая предназначена для введения без разбавления.

108. Фармацевтическая композиция по п. 106 или п. 107, которая приготовлена в виде одной дозы.

109. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 106-108, которая предназначена для парентерального введения.

110. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 106-108, которая предназначена для системного введения.

111. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 106-108, которая предназначена для внутриопухолевого или внутриперитонеального введения.

112. Способ лечения рака, включая солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у субъекта, включающий введение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 1-105 или фармацевтической композиции по любому из пунктов 106-111.

113. Способ по п. 112, отличающийся тем, что иммуностимулирующую бактерию или фармацевтическую композицию вводят системно.

114. Способ по п. 112, отличающийся тем, что иммуностимулирующую бактерию или фармацевтическую композицию вводят внутрь опухоли или интраперитонеально.
115. Применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 1-105 или фармацевтической композиции по любому из пунктов 106-111 для лечения рака, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у субъекта.
116. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-105 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 106-111 для применения для лечения рака, включающего солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у субъекта.
117. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 112-116, где субъектом является человек.
118. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 112-117, где рак включает солидную опухоль.
119. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 112-117, где рак включает гематологическое злокачественное новообразование.
120. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 112, 113 и 115-117, где лечение включает системное введение иммуностимулирующей бактерии или фармацевтической композиции.
121. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 112-120, где лечение включает комбинированную терапию, в которой применяют второе противораковое средство или лечение.
122. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по п. 121, где второе противораковое средство или лечение применяют до, одновременно с, после или с перерывами с иммуностимулирующей бактерией или фармацевтической композицией.
123. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по п. 122, где второе противораковое средство или лечение представляет собой иммунотерапию.
124. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по п. 122, где второе противораковое средство или лечение включает онколитическую вирусную терапию.

125. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 121-123, где второе противораковое средство или лечение включает введение антитела или фрагмента антитела.
126. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по п. 122, где второе противораковое средство или лечение включает облучение или химиотерапию.
127. Способ или применение или иммуностимулирующая бактерия по п. 123 или п. 125, где второе противораковое средство или лечение представляет собой иммунотерапию, включающую введение анти-PD-1, или анти-PD-L1, или анти-CTLA4, или анти-IL6, или анти-VEGF, или анти-VEGFR2 антитела или его фрагмента.
128. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 121-123, 125 и 127, где:
второе противораковое средство или лечение включает введение антитела или фрагмента антитела; и
фрагмент антитела представляет собой scFv или нанотело.
129. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 114-128, где введение иммуностимулирующей бактерии является парентеральным.
130. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 115-128, где введение иммуностимулирующей бактерии является пероральным, или ректальным, или с помощью аэрозоля в легкое, или внутриопухолевым.
131. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 115-128, где введение иммуностимулирующей бактерии является внутривенным, внутримышечным или подкожным.
132. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 112-131, где рак выбран из лейкемии, лимфомы, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы и шеи, ободочной и прямой кишки, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.
133. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 112-132, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой виды *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* или *E. coli*.

134. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 112-133, где бактерия является видом *Salmonella*.
135. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 112-134, где бактерия представляет собой штамм *Salmonella typhimurium*.
136. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по п. 135, в котором *Salmonella typhimurium* получают из штамма *Salmonella typhimurium* дикого типа, имеющего все идентификационные характеристики штамма, депонированного под номером ATCC № 14028, или из штамма, депонированного под номером ATCC № 14028
137. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пунктов 114-136, где введение иммуностимулирующей бактерии осуществляют путем интраперитонеального или внутриопухолевого введения.
138. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 112-137, где субъект имеет метастатический рак.
139. Способ, или применение, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 112-138, где бактерия является флагеллин⁻ и *pagP/msbB*.
140. Выделенная клетка, содержащая иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 1-105.
141. Клетка по п. 140, которая представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, опухолевую клетку или первичную клеточную линию.
142. Клетка по п. 140, которая представляет собой гематопозитическую клетку
143. Клетка по п. 140, которая представляет собой Т-клетку.
144. Клетка по любому из пунктов 140-143, которая продуцируется *ex vivo* путем инфицирования клетки иммуностимулирующей бактерией.
145. Выделенная клетка или культивированные клетки, содержащие иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 1-105.
146. Клетка по п. 145, которая представляет собой Т-клетку или гематопозитическую клетку.
147. Клетка по п. 145 или п. 146, которая продуцируется *ex vivo* путем инфицирования клетки иммуностимулирующей бактерией.

148. Способ лечения рака, включающий введение клетки по любому из пунктов 140-147 субъекту с раком, который включает солидную опухоль или представляет собой гематологическое злокачественное новообразование.
149. Способ по п. 148, где рак включает солидную опухоль.
150. Способ по п. 148 или п. 149, где рак является метастатическим.
151. Способ по любому из пп. 148-150, где рак выбран из лимфомы, лейкоза, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы и шеи, колоректума, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.
152. Применение клетки по любому из пунктов 140-147 для лечения рака.
153. Применение по п. 152, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.
154. Применение по п. 152 или п. 153, где рак является метастатическим.
155. Применение по любому из пп. 152-154, где рак выбран из лимфомы, лейкоза, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы и шеи, колоректума, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.
156. Способ повышения способности терапевтической бактерии колонизировать опухоль, включающий модификацию генома, за счет чего бактерия является флагеллин (*fliC/fliB*) и/или *pagP*, и где бактерия включает плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, который является противораковым агентом или лечением.
157. Способ по п. 156, где терапевтическая бактерия является иммуностимулирующей бактерией.
158. Способ по п. 156 или п. 157, где бактерия является видом *Salmonella*.
159. Способ по п. 158, где бактерией является *Salmonella typhimurium*.
160. Способ по п. 159, где *Salmonella typhimurium* получают из *Salmonella typhimurium* дикого типа, имеющей все идентификационные характеристики штамма, депонированного под регистрационным номером ATCC 14028.

161. Способ по п. 157, где бактерия представляет собой иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 1-105.

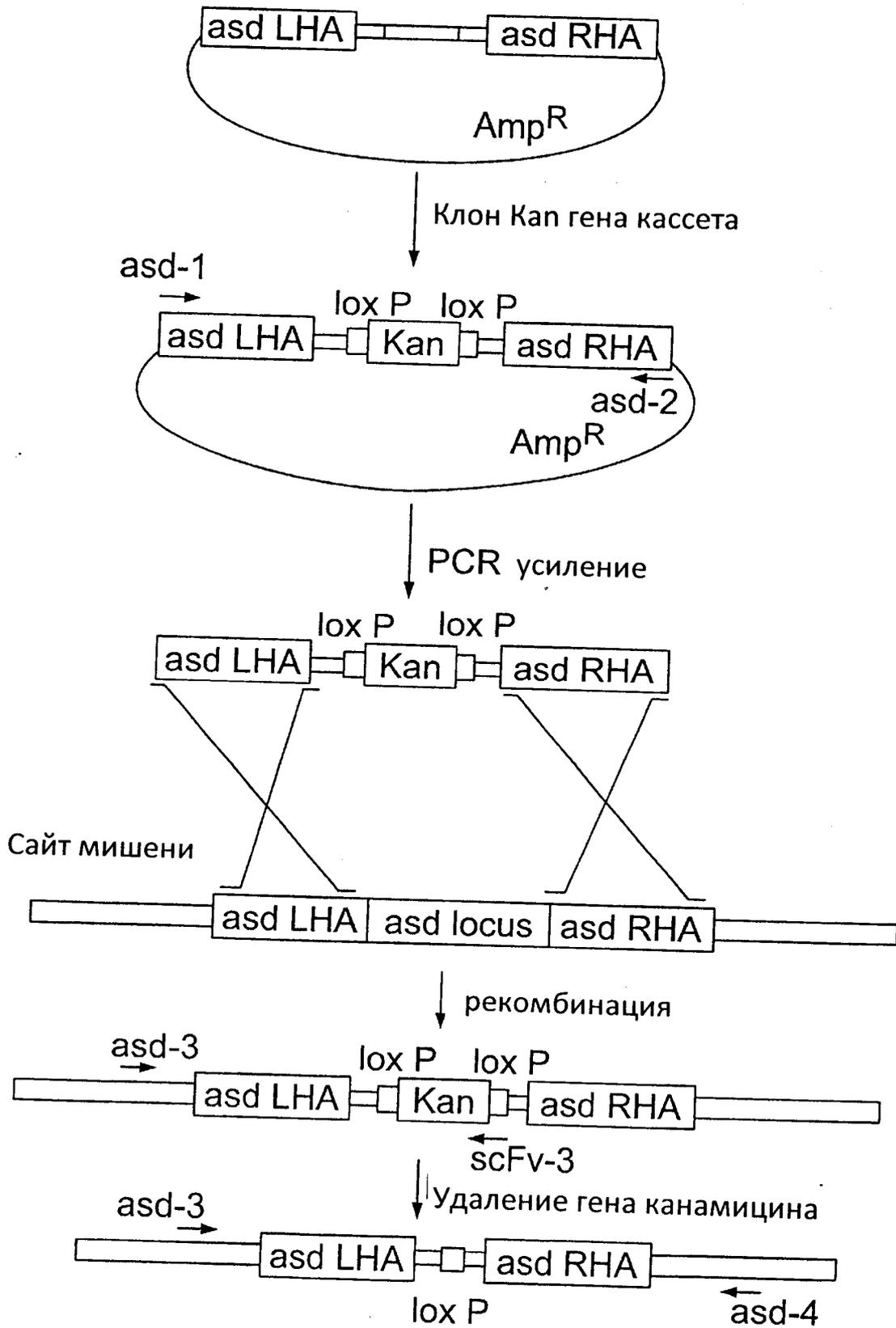
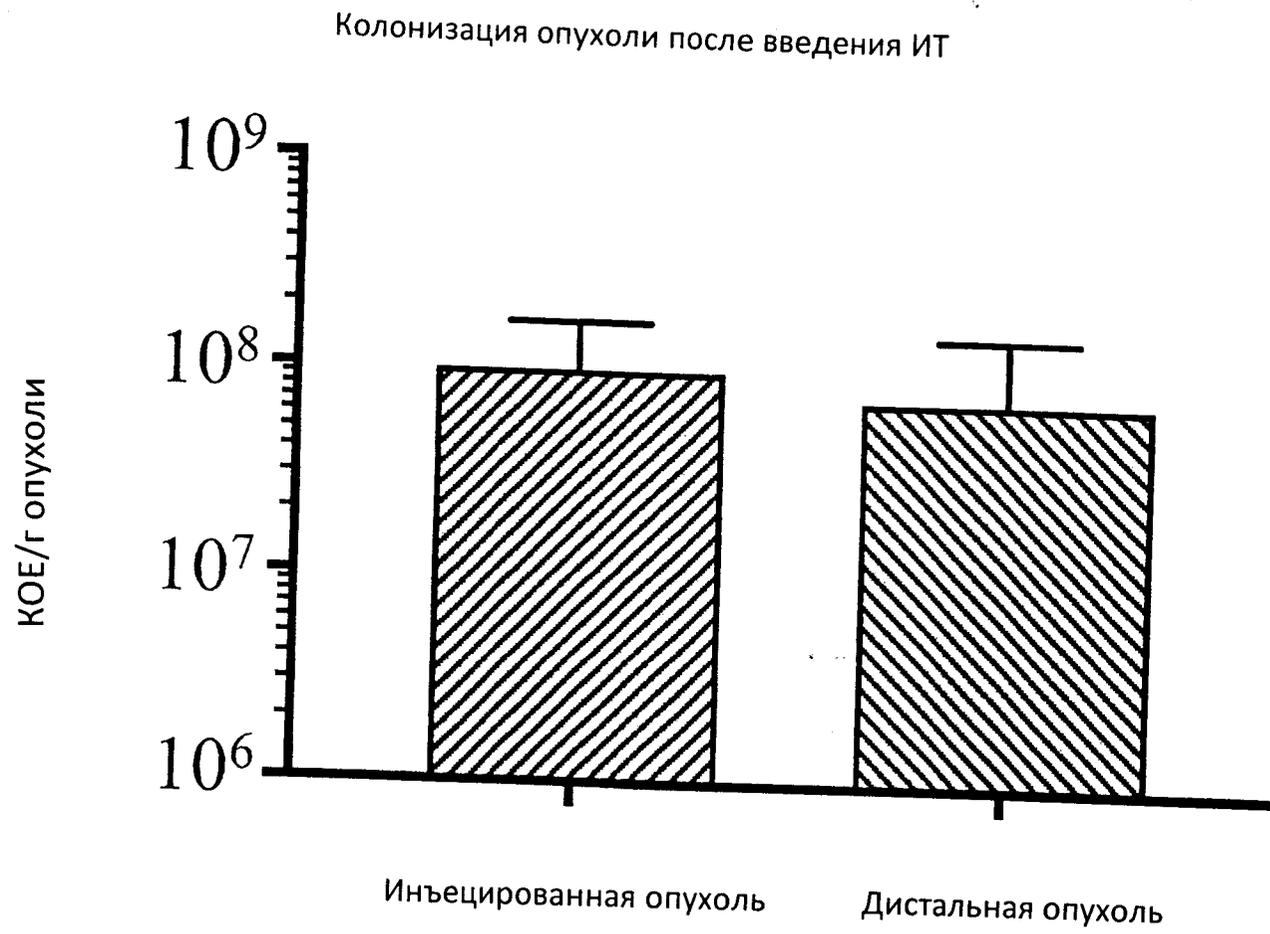


Figure 1



2/26

Figure 2

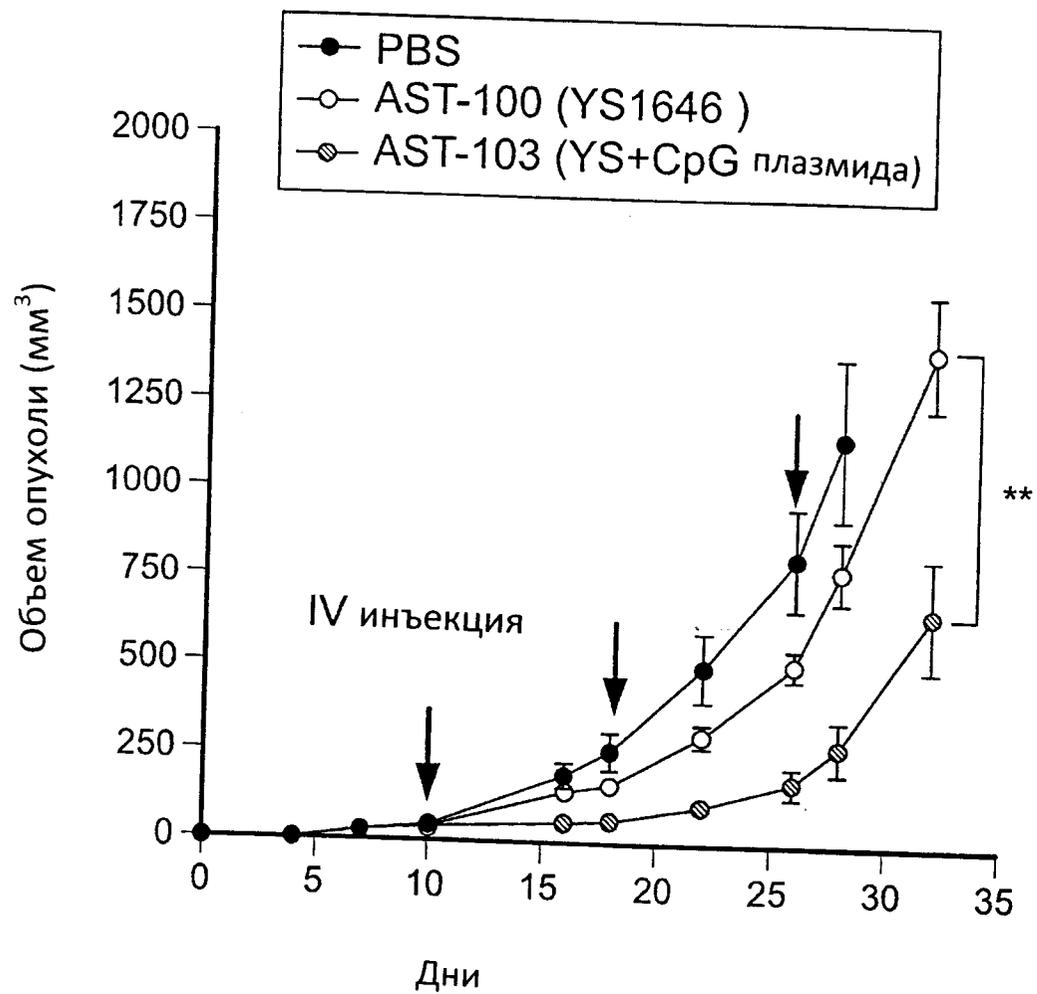
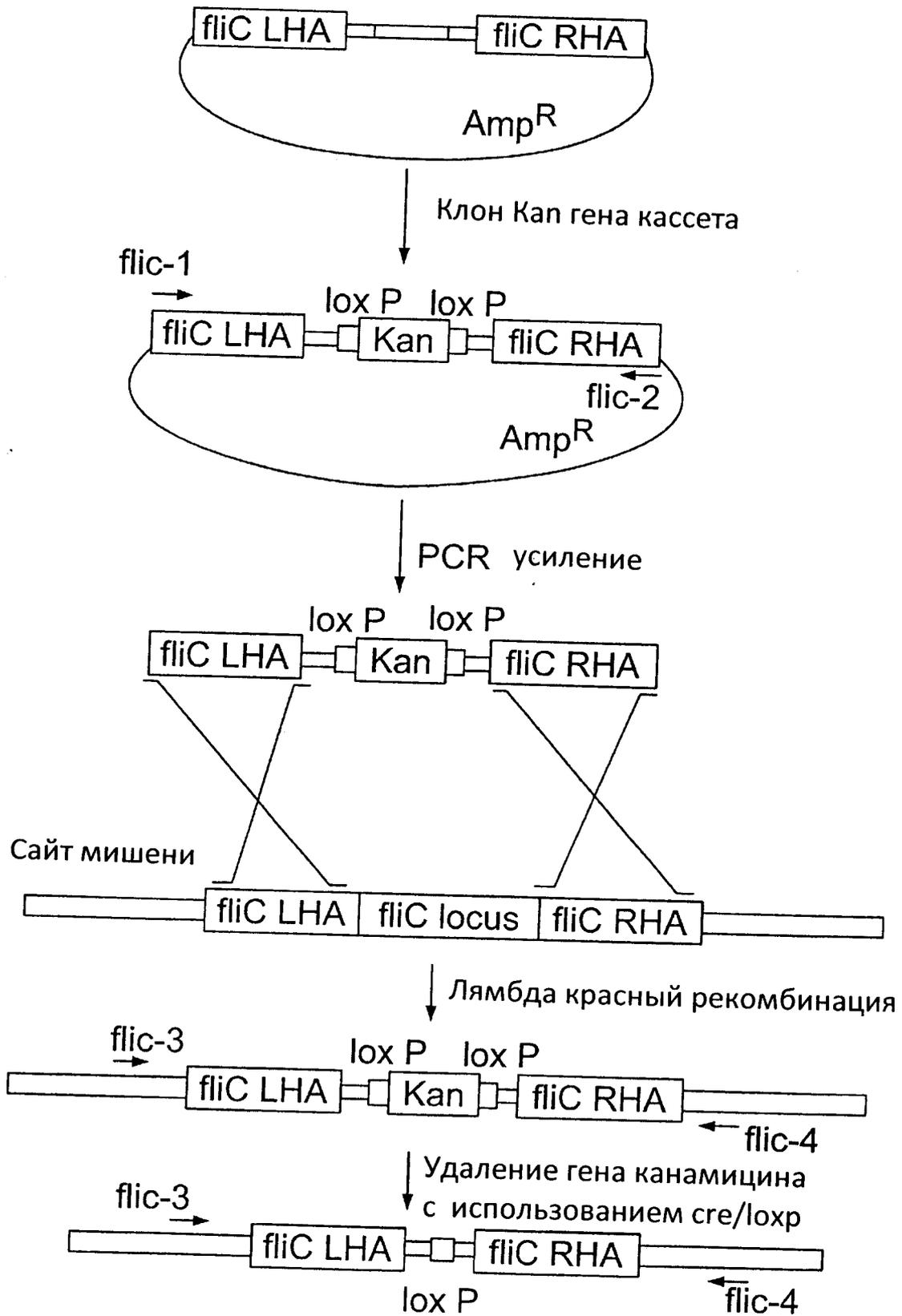


Figure 3

4/26



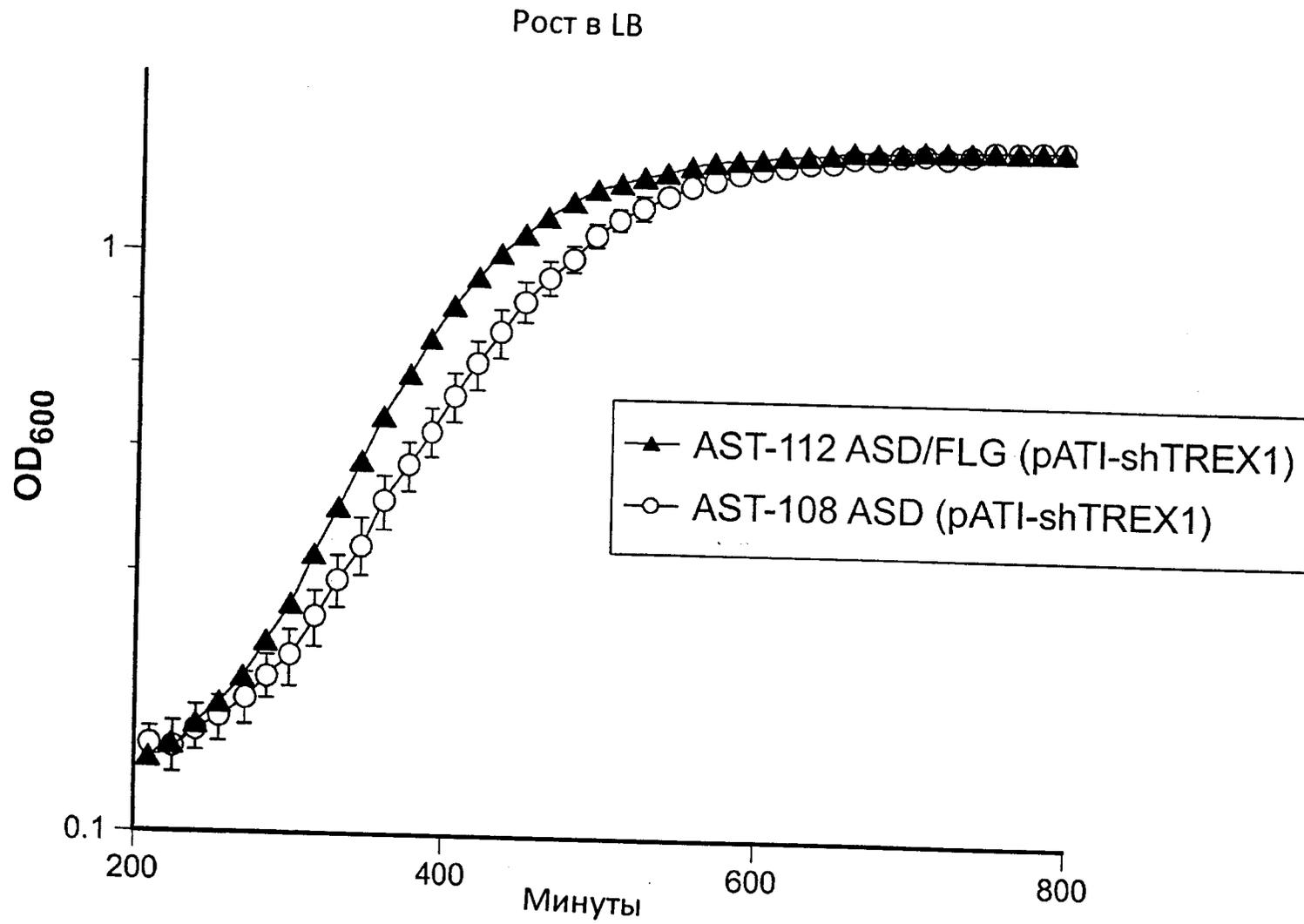


Figure 5

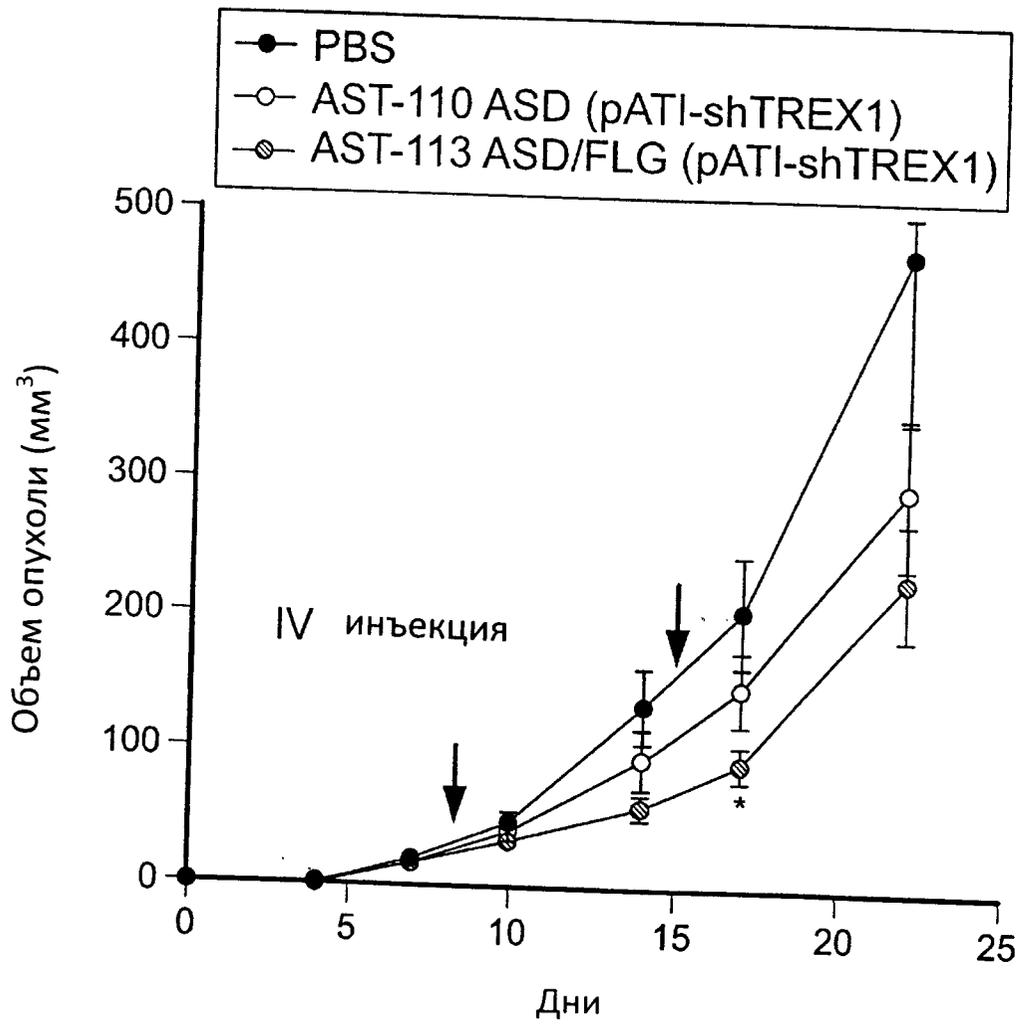
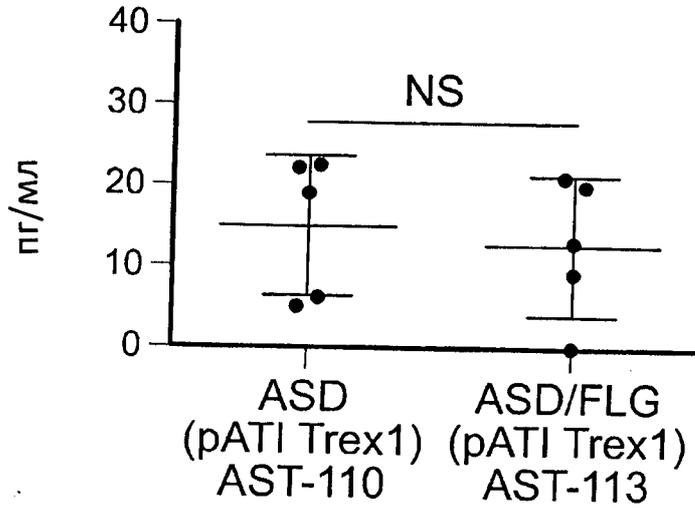


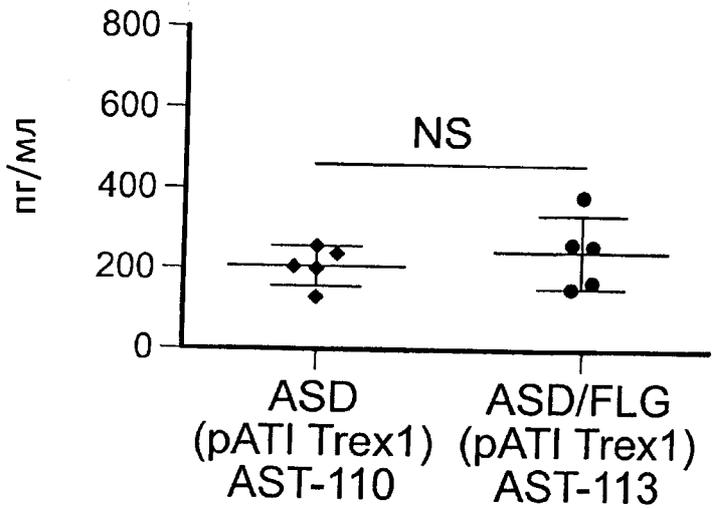
Figure 6

7/26

TNF α



IL-6



IFN- γ

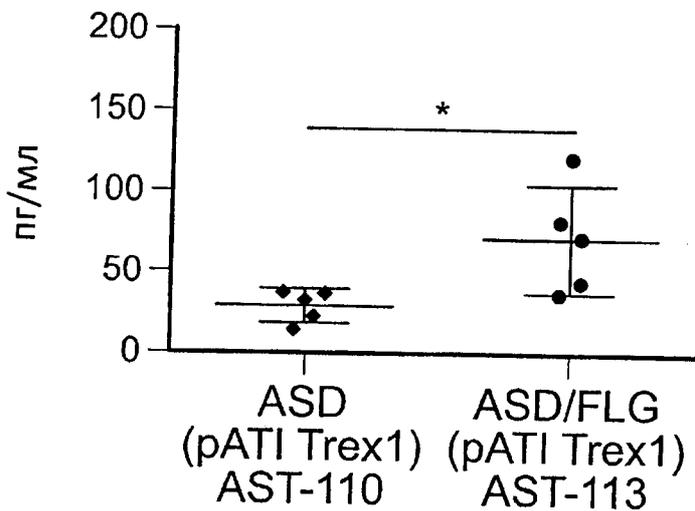


Figure 7

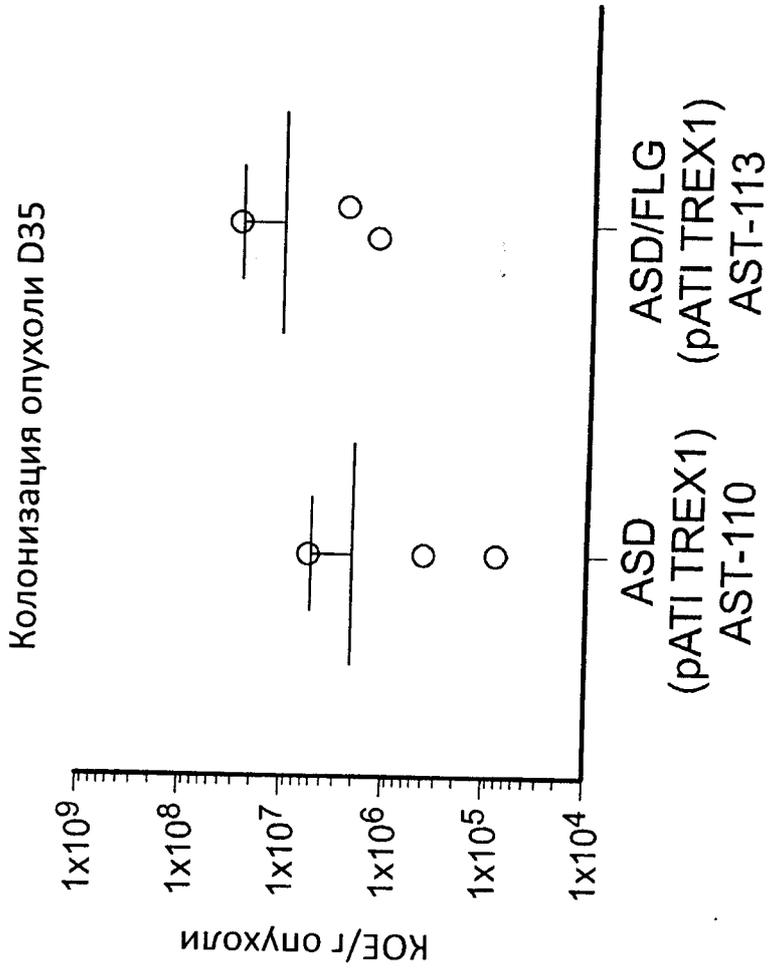
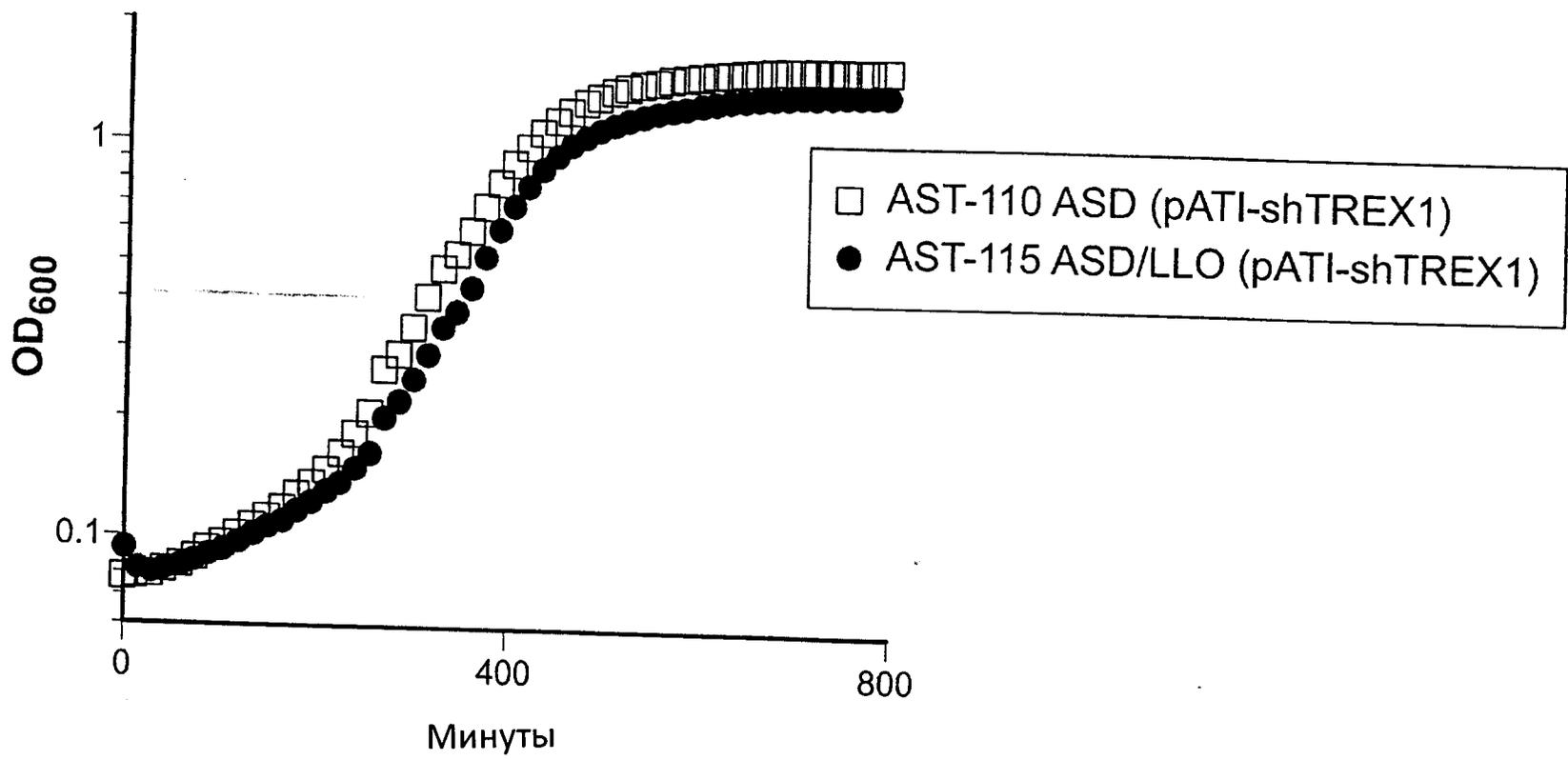


Figure 8

Рост в LB



9/26

Figure 9

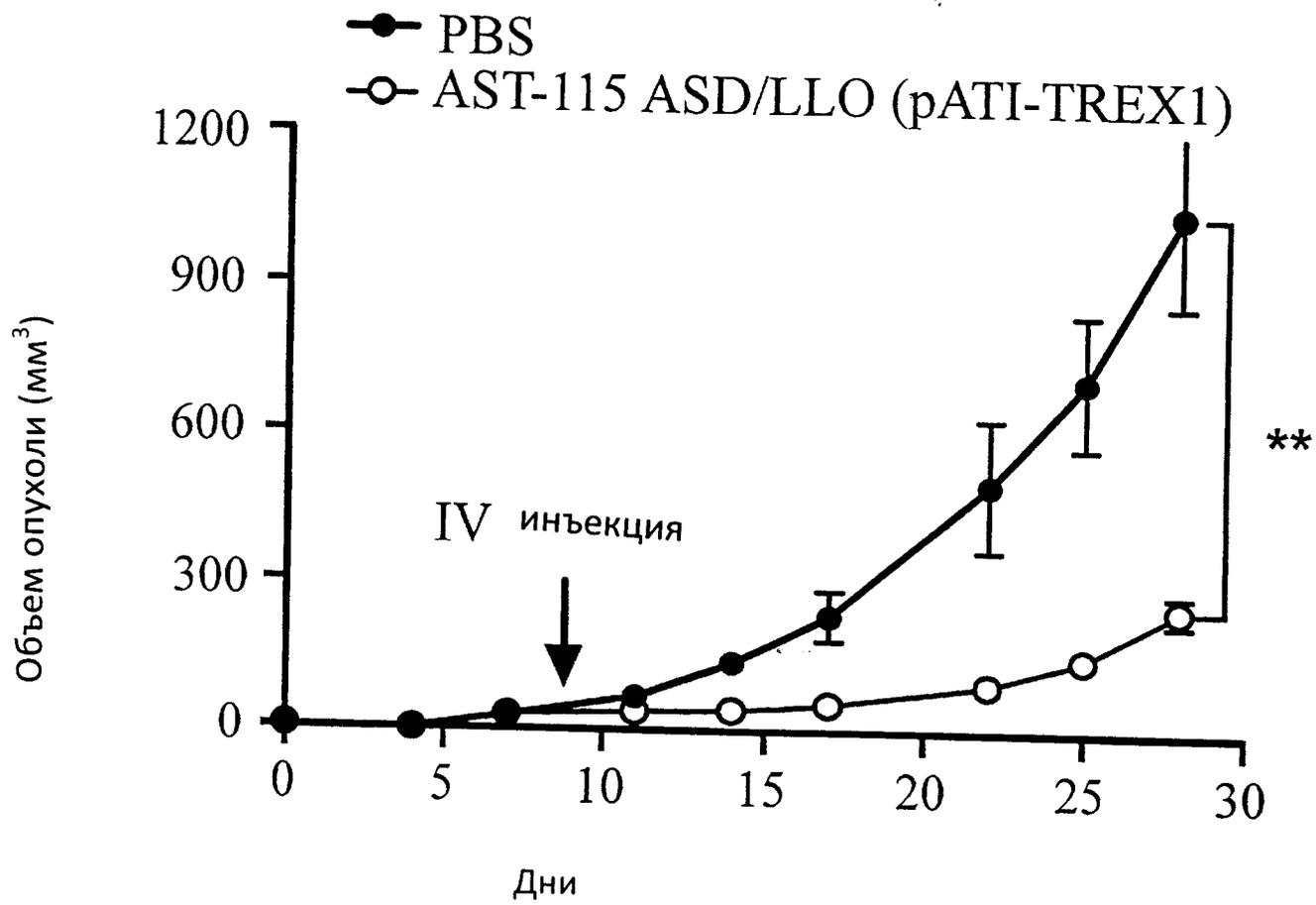


Figure 10

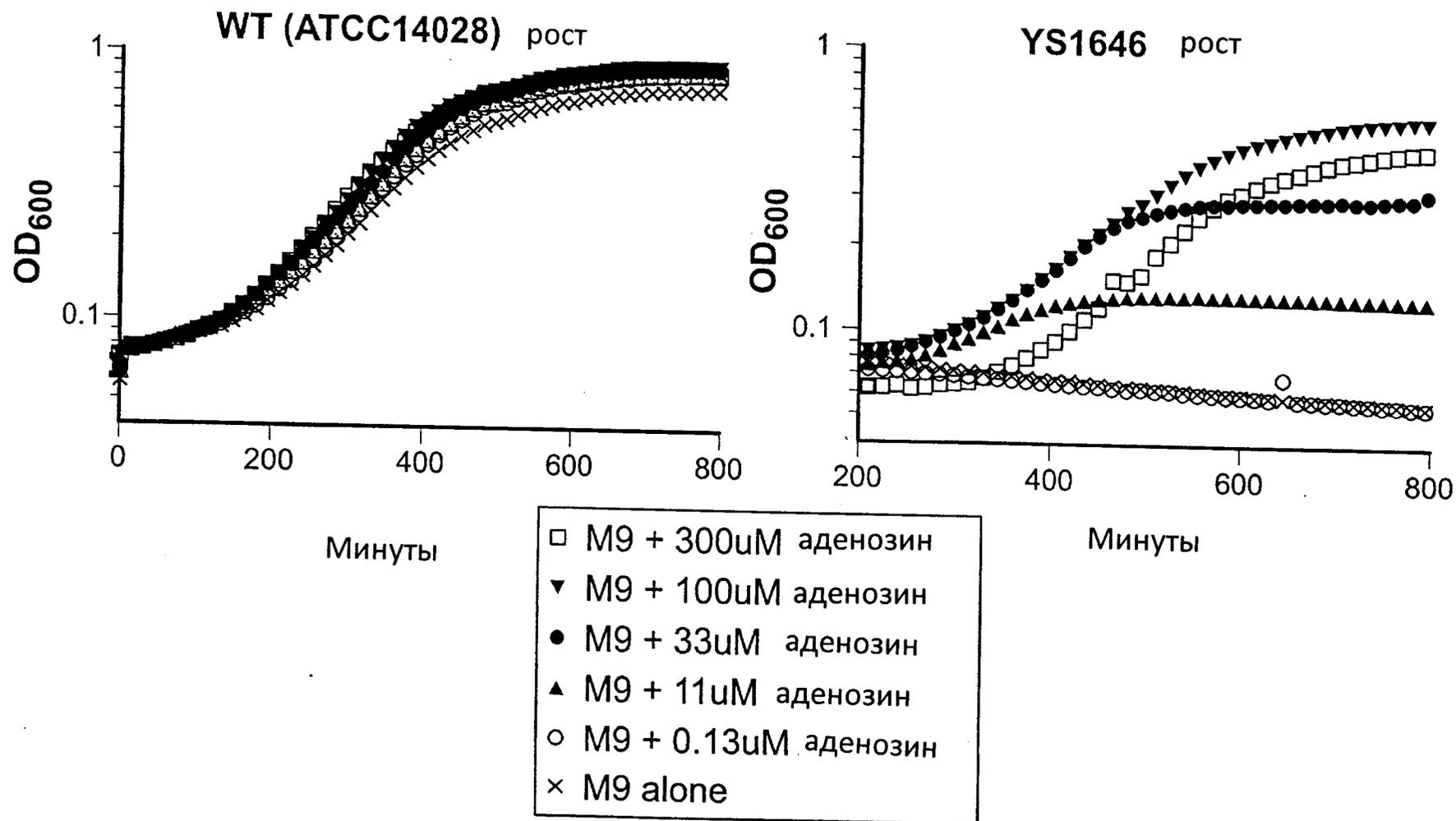
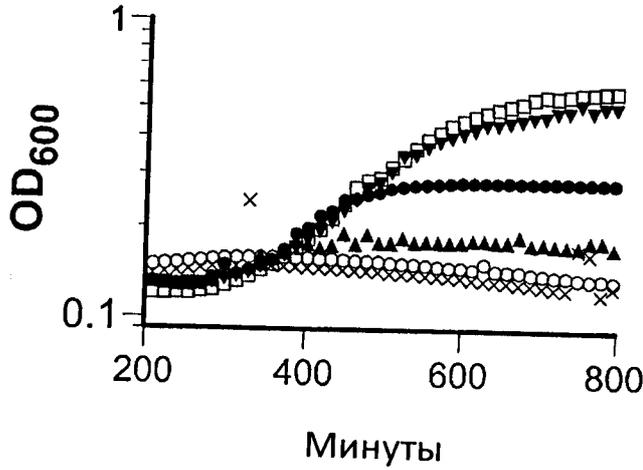


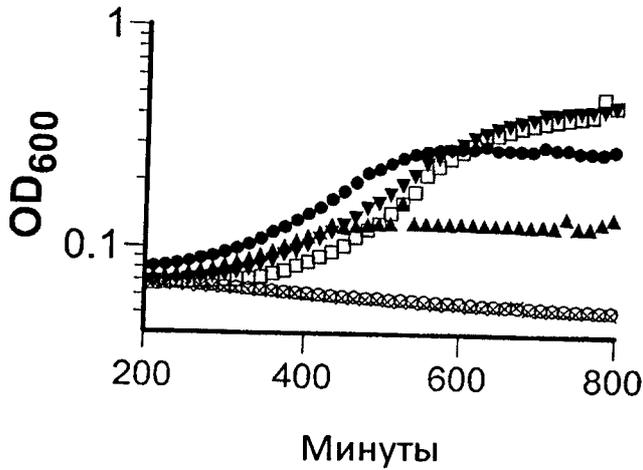
Figure 11

12/26

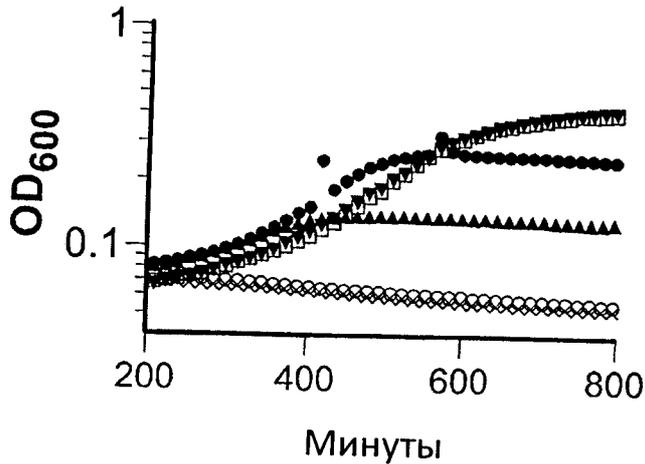
**AST-117 ASD
(pATIIlow-shTREX1)**



**AST-118 ASD/FLG
(pATIIlow-shTREX1)**



**AST-119 ASD/LLO
(pATI-low-shTREX1)**



- M9 + 300μM аденозин
- ▼ M9 + 100μM аденозин
- M9 + 33μM аденозин
- ▲ M9 + 11μM аденозин
- M9 + 0.13μM аденозин
- × M9 только

Figure 12

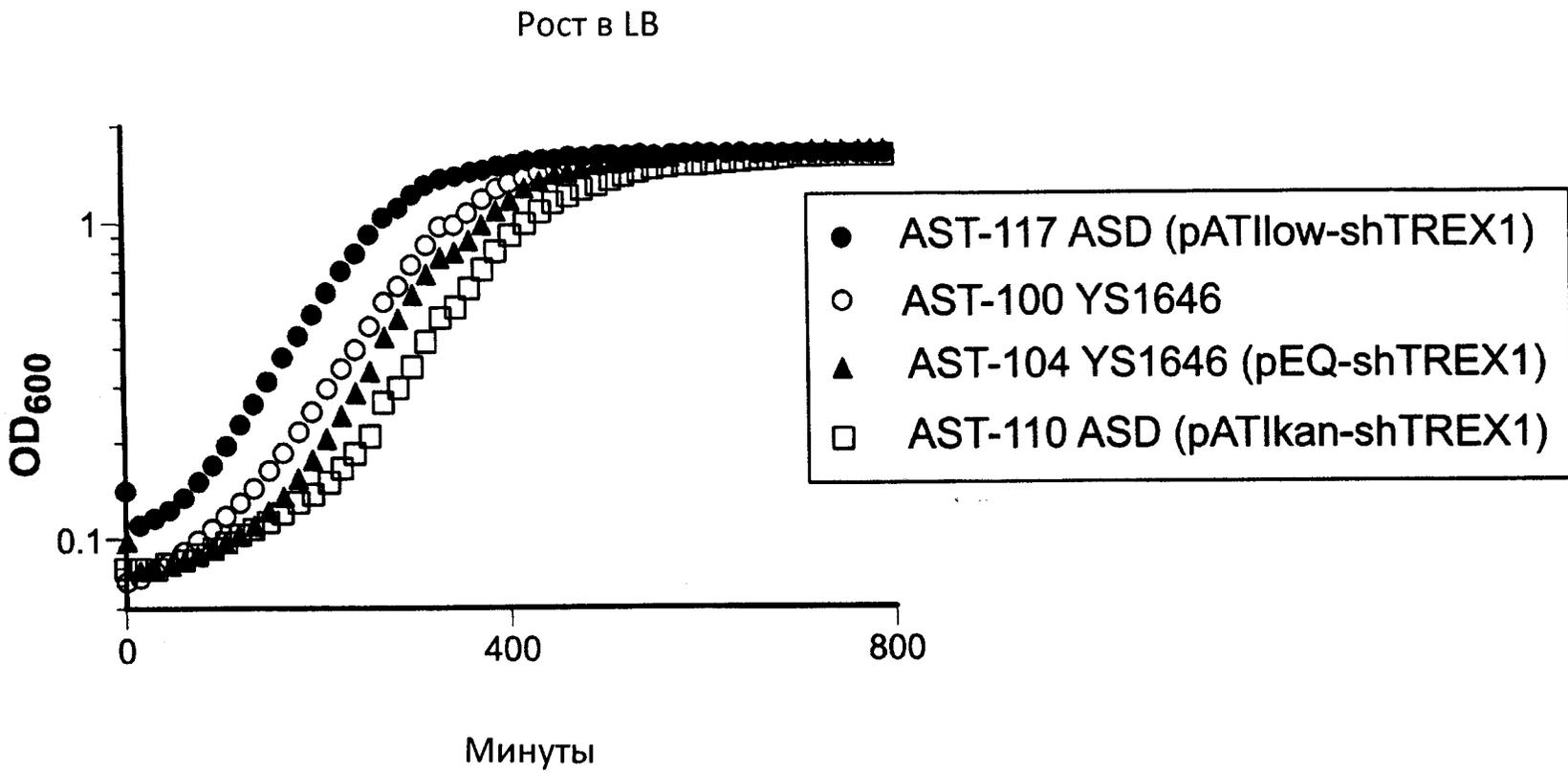


Figure 13

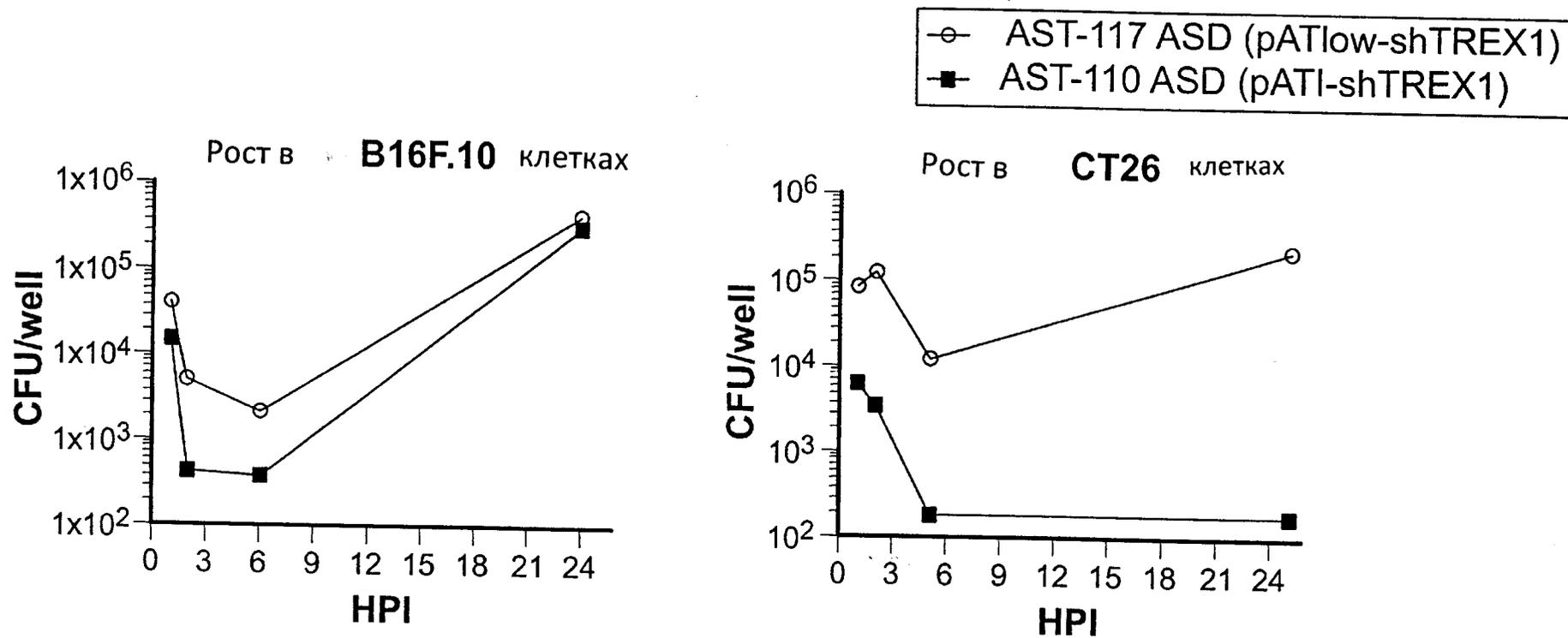
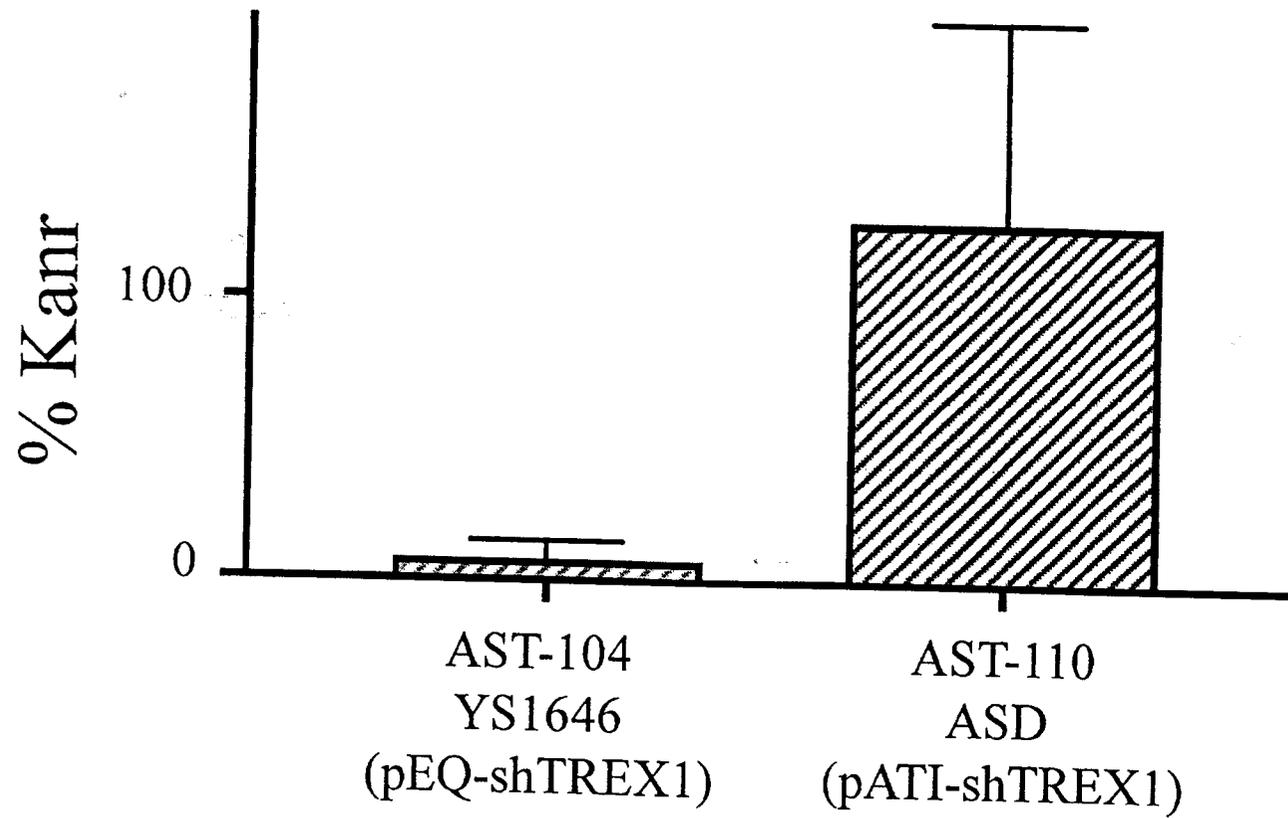


Figure 14

% плазмид удерживаемых в опухоли



15/26

Figure 15

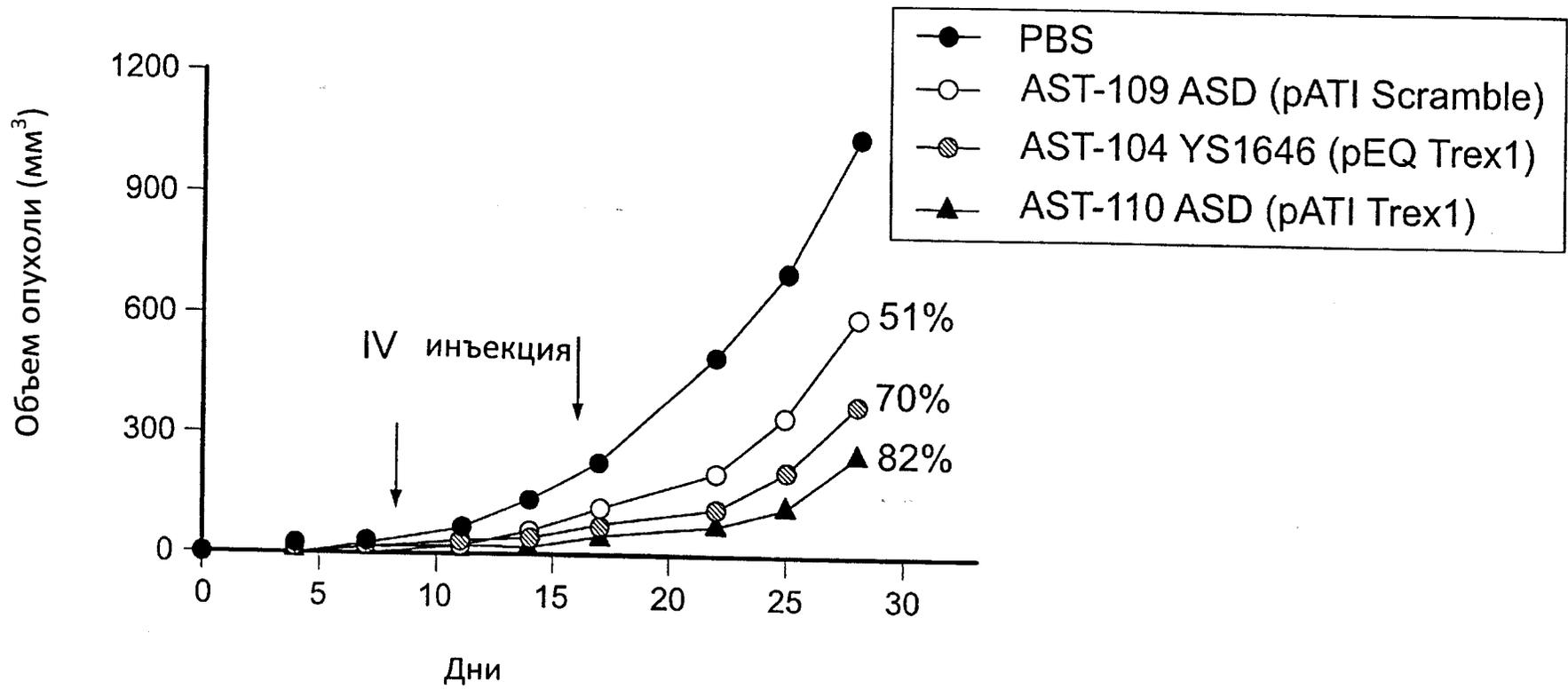
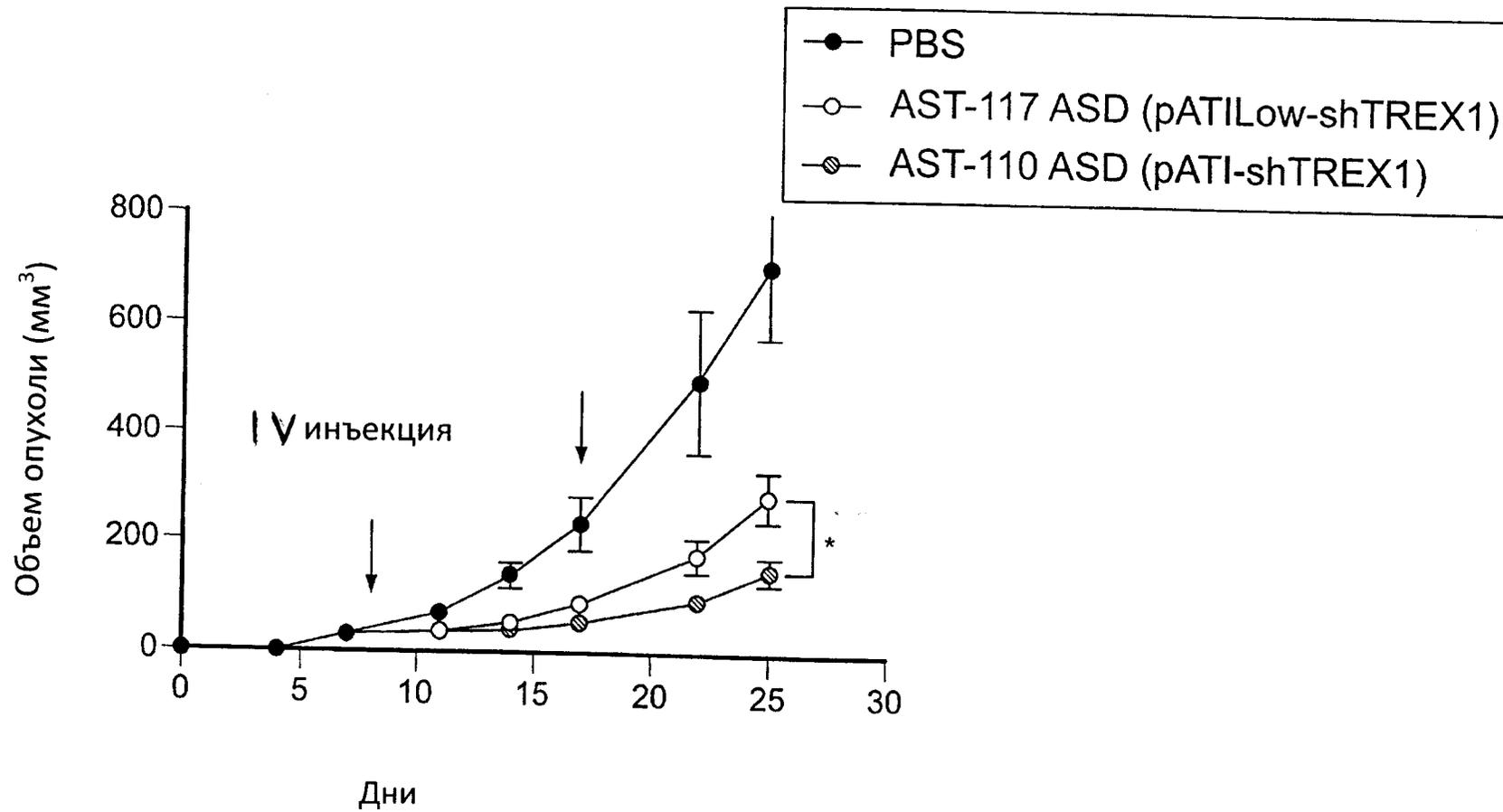


Figure 16



17/26

Figure 17

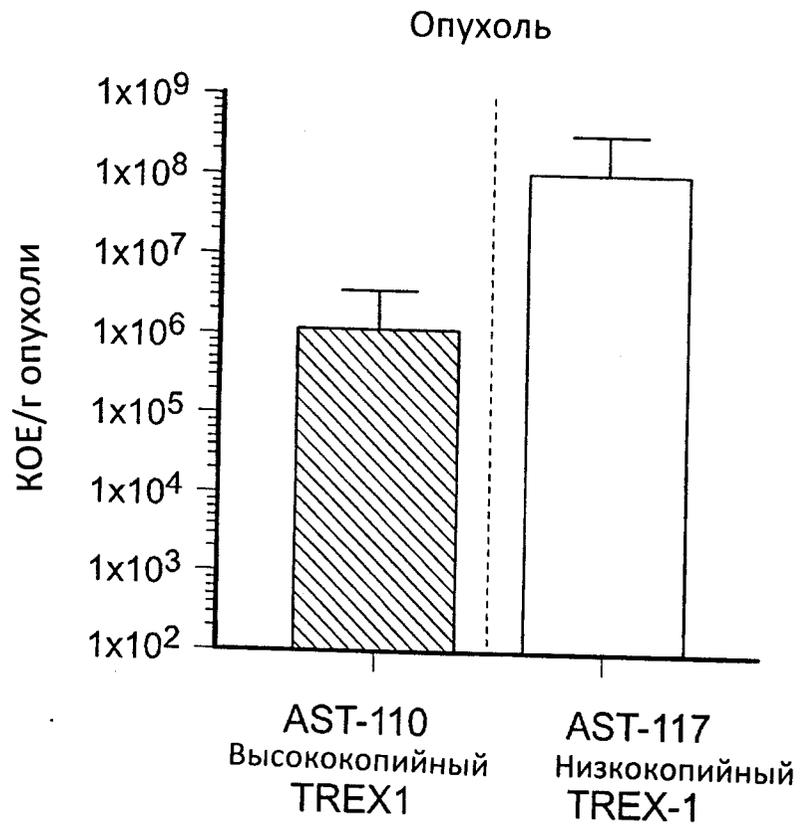


Figure 18A

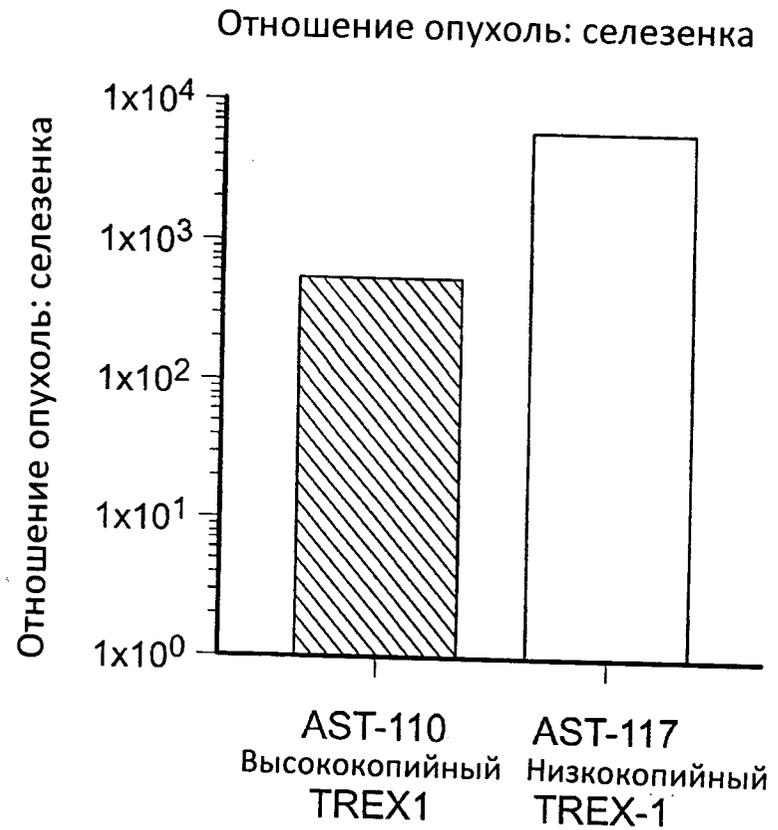
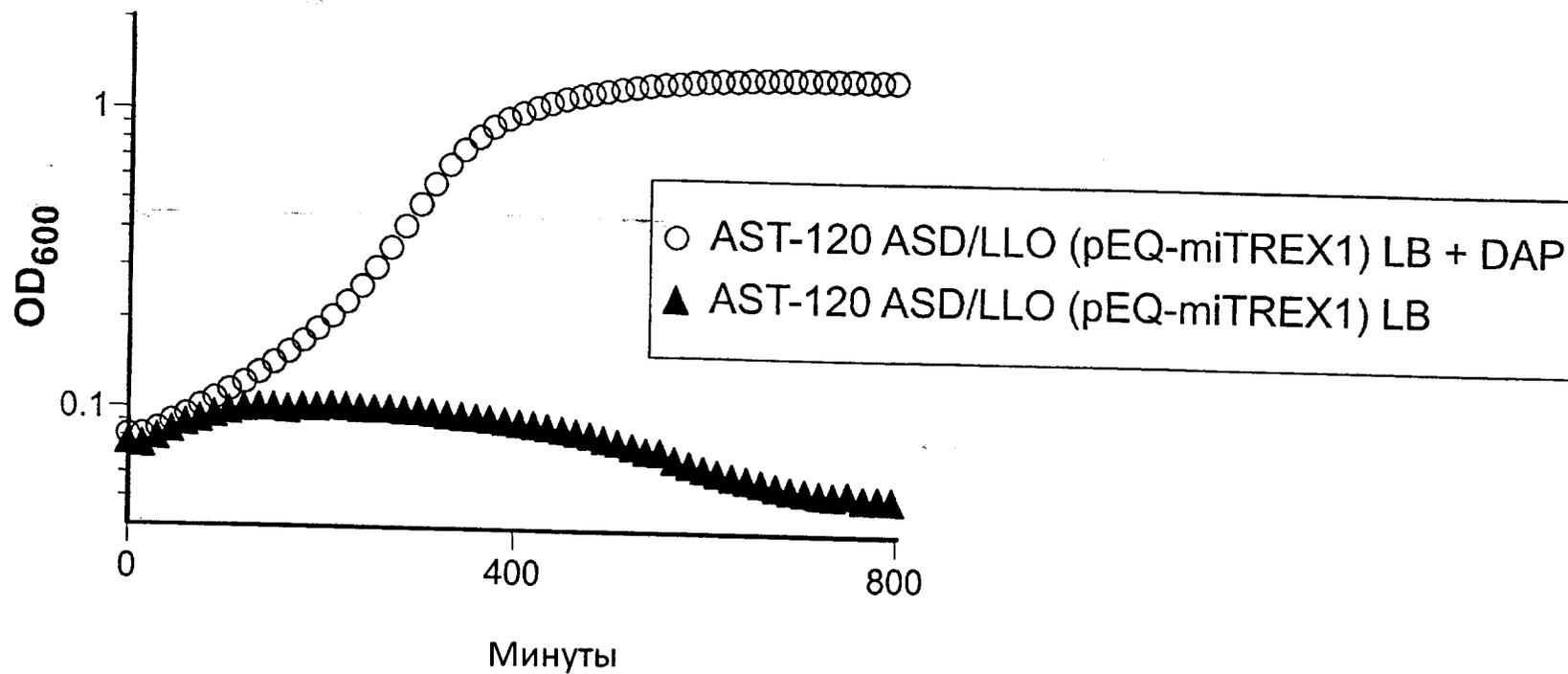


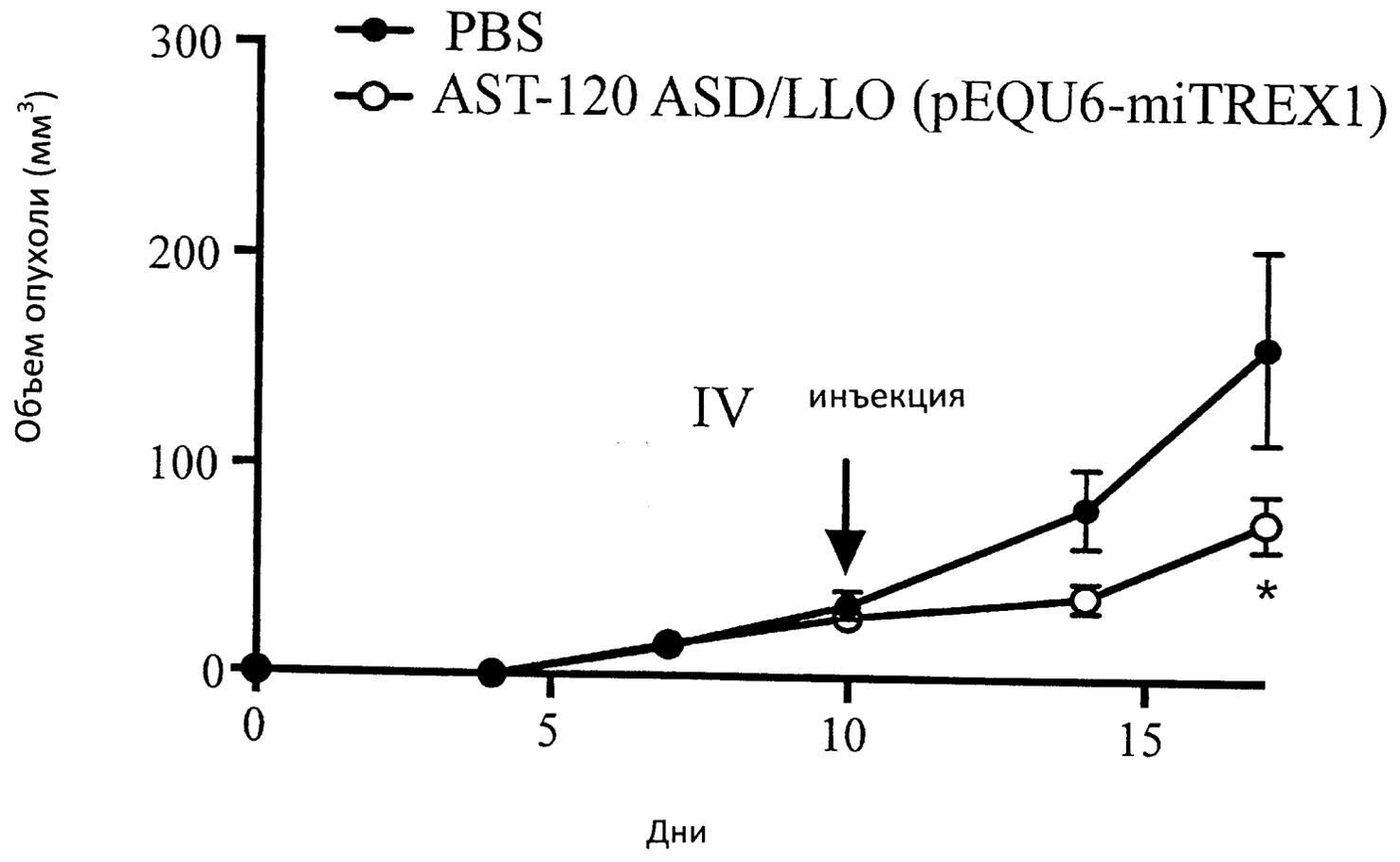
Figure 18B

Рост в бульоне



19/26

Figure 19



20/26

Figure 20

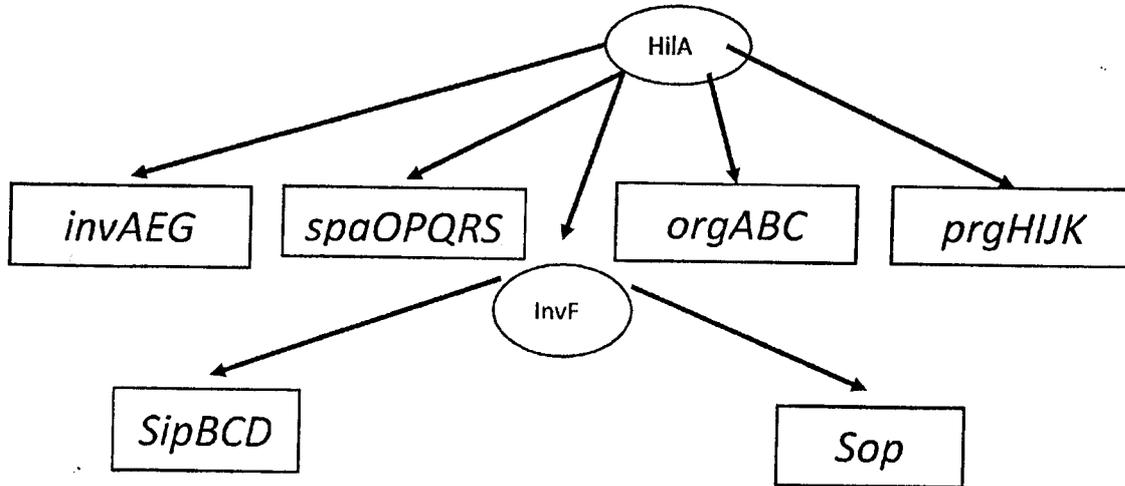


Figure 21

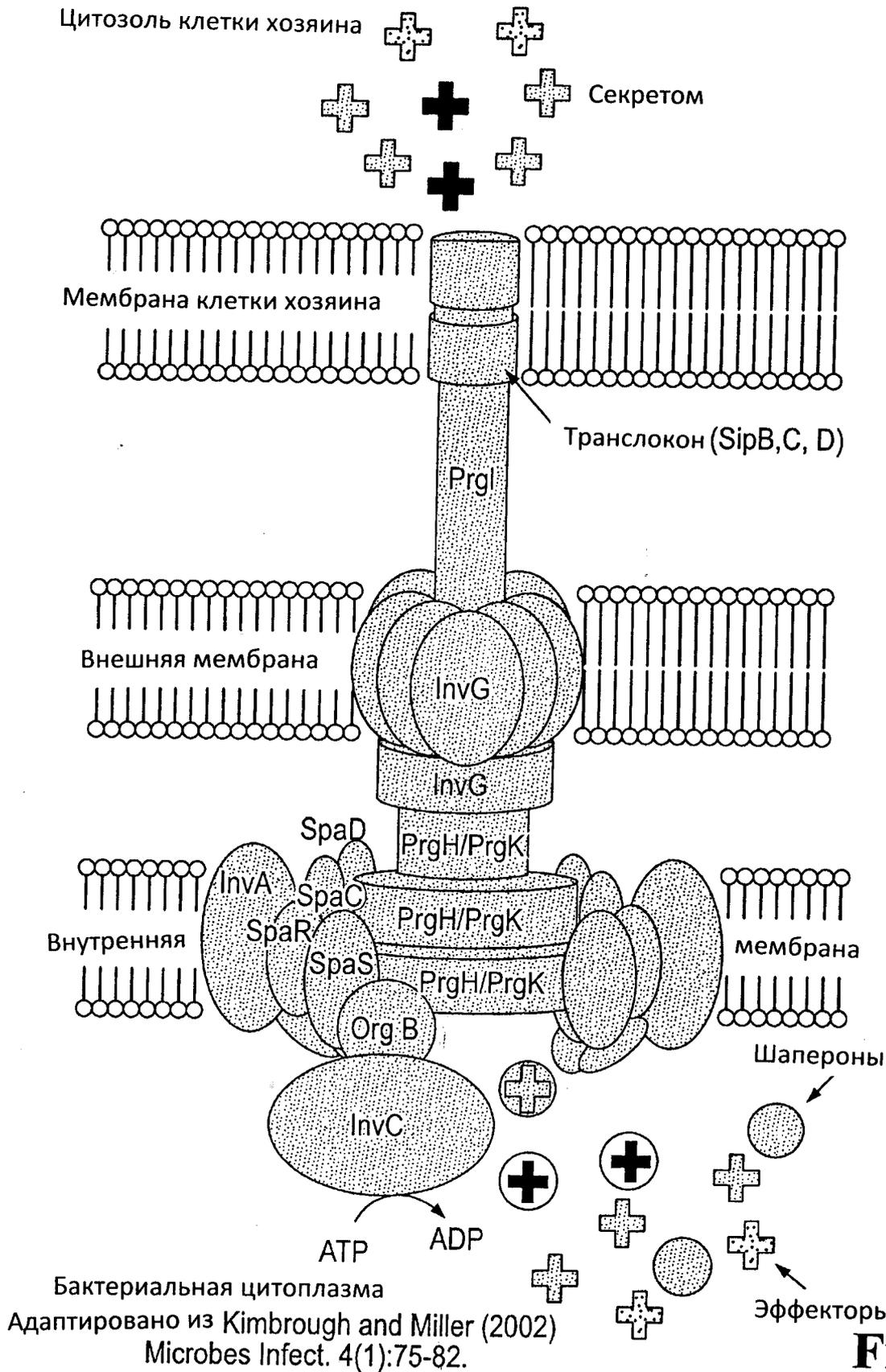
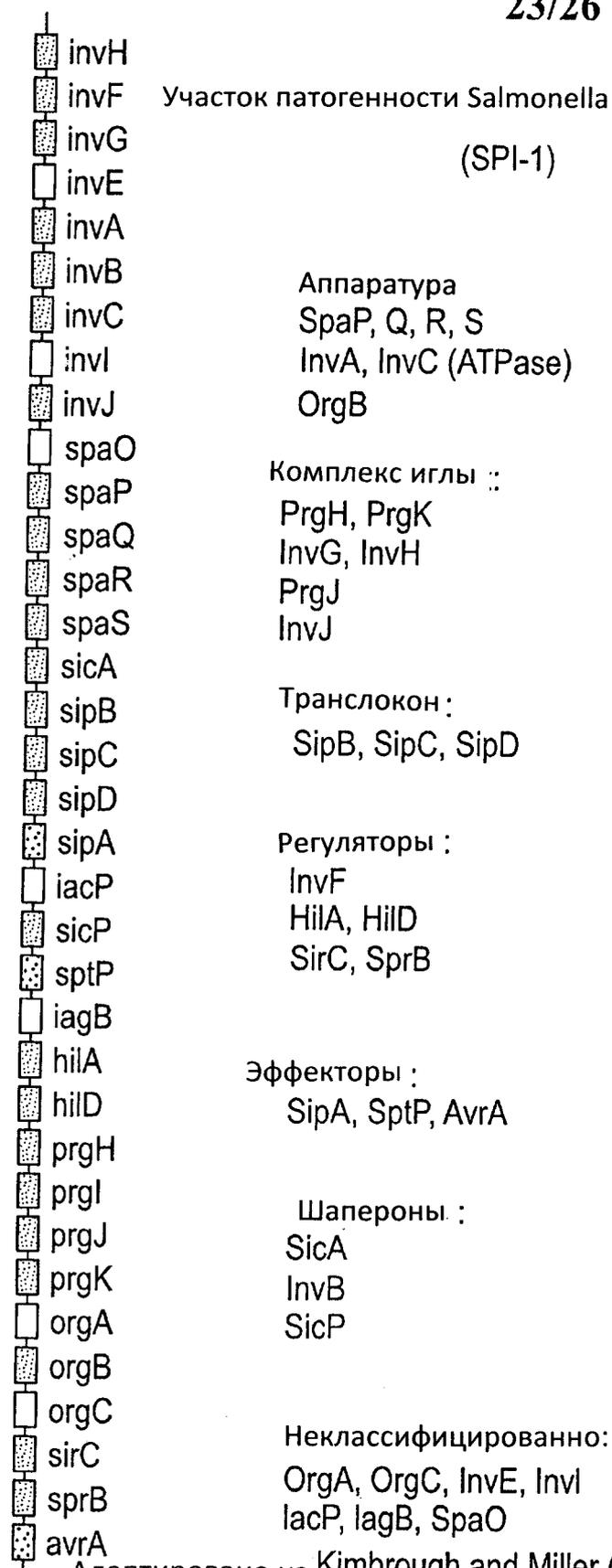
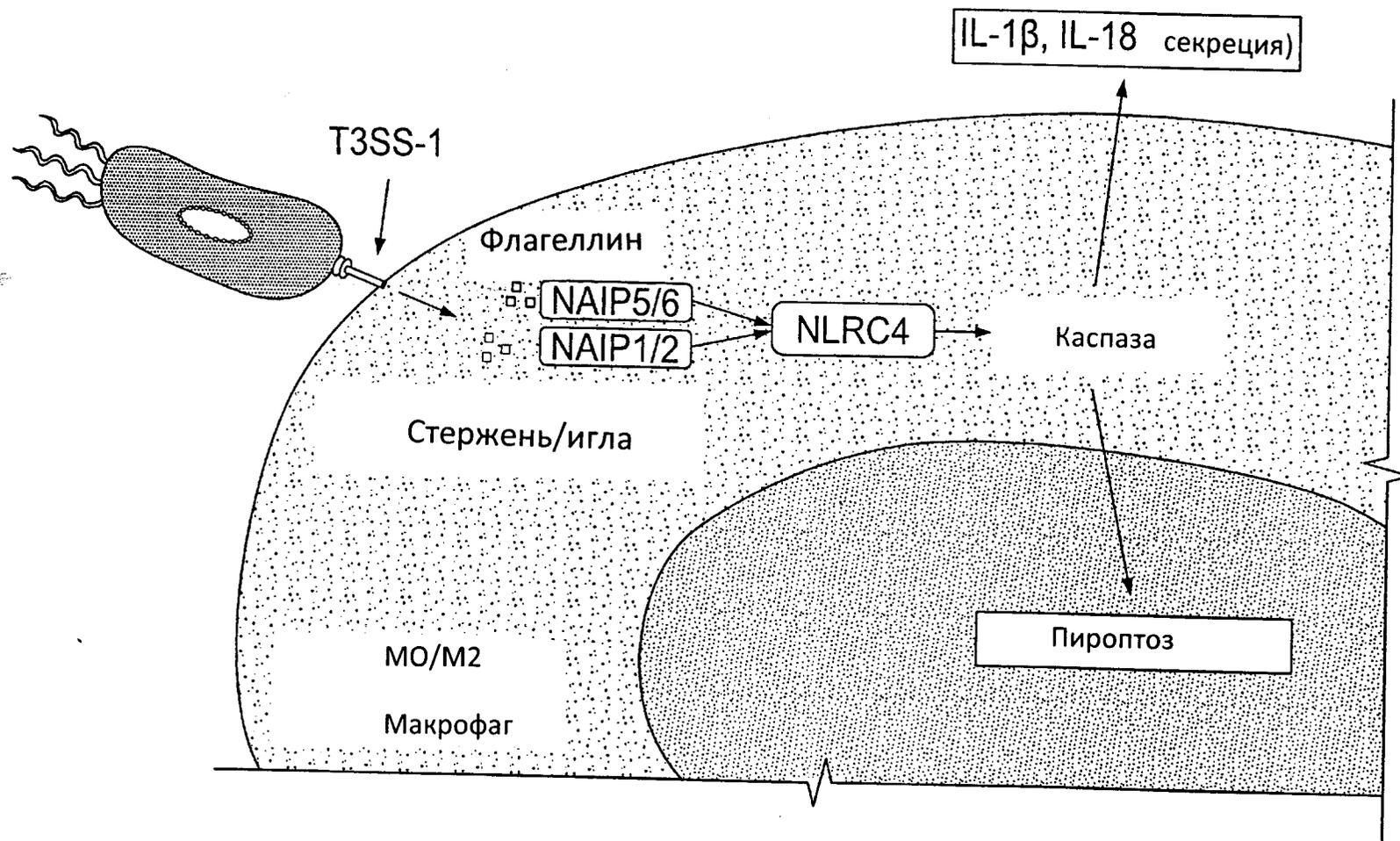


Figure 22



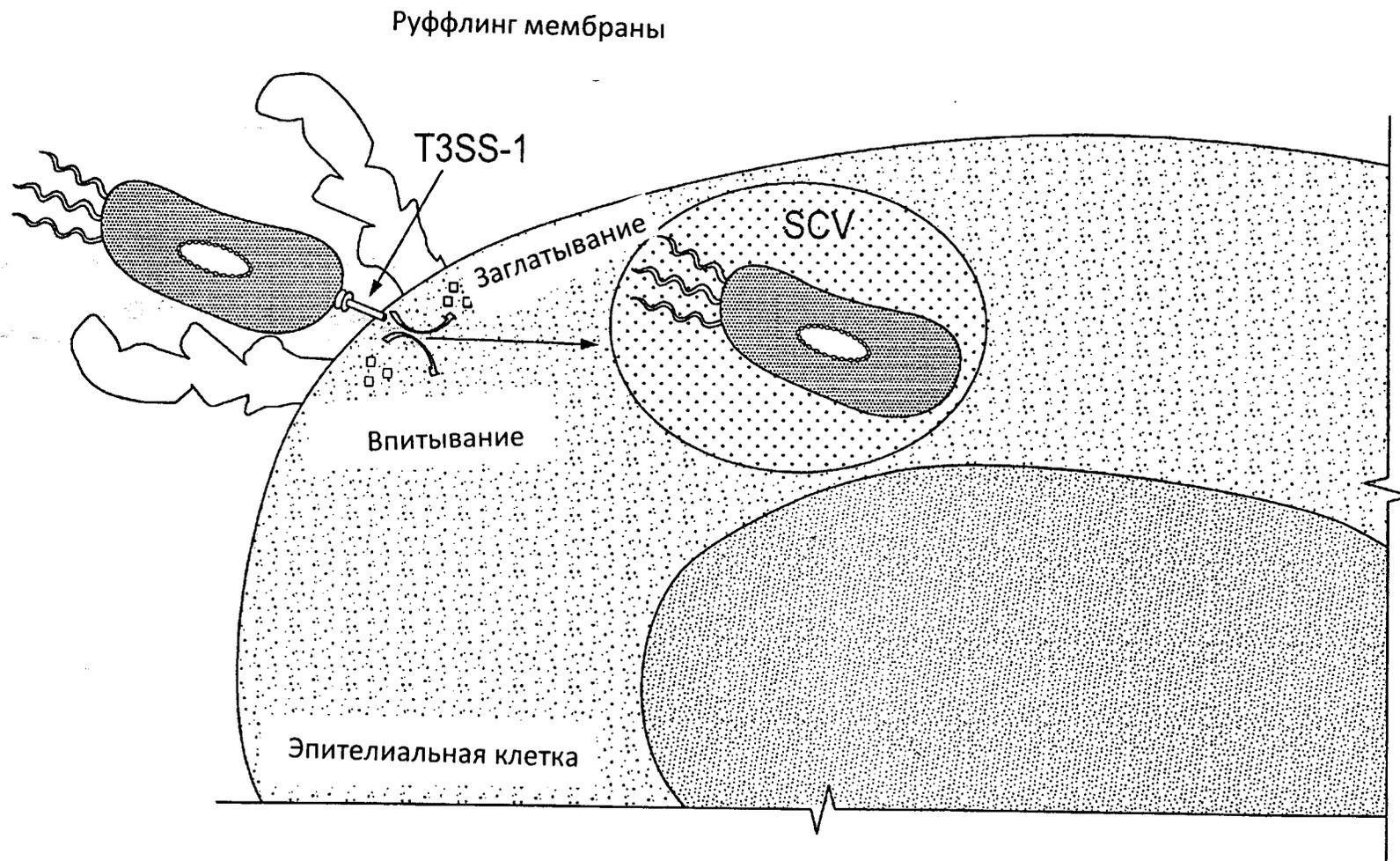
Адаптировано из Kimbrough and Miller (2002)
Microbes Infect. 4(1):75-82.

Figure 22 (Cont.)



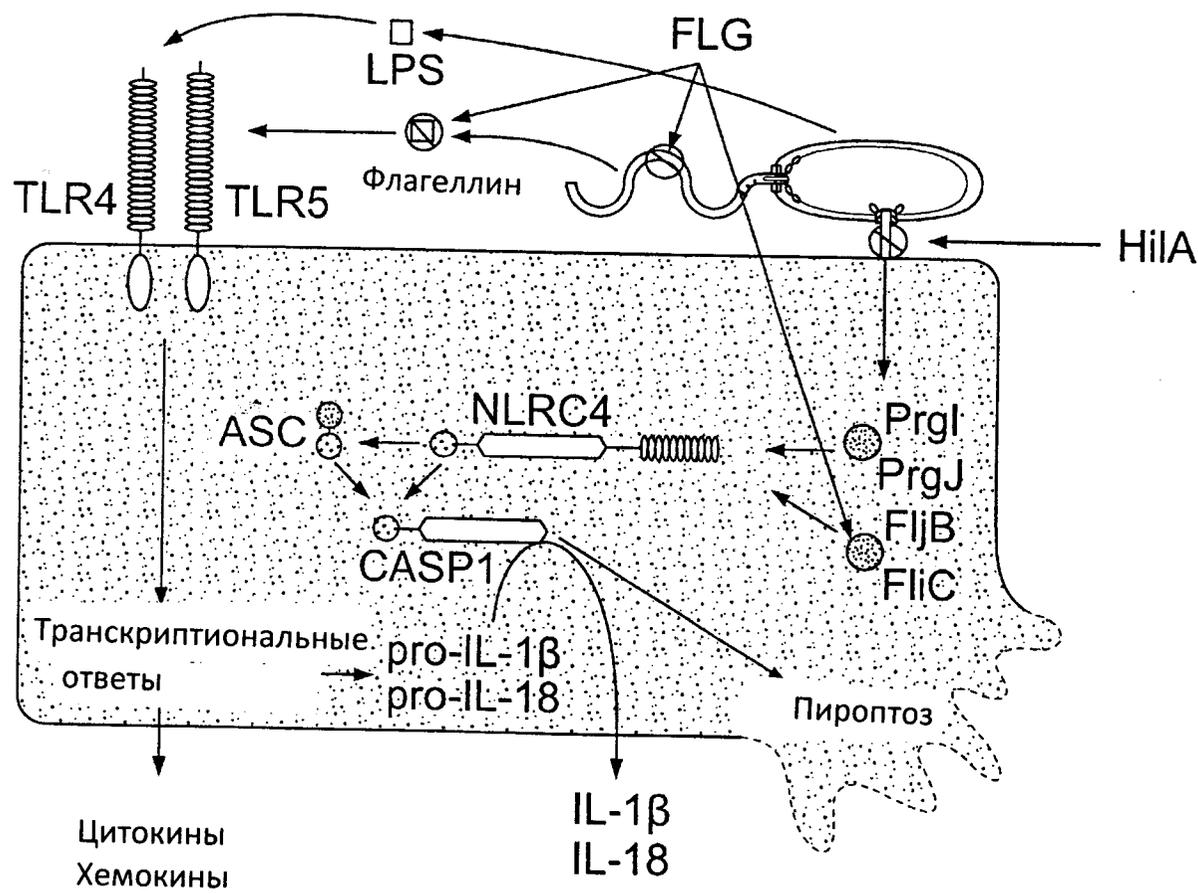
24/26

Figure 23



25/26

Figure 24



26/26

Miao and Rajan (2011) Front. Micro. 2:85

Figure 25