(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202100228 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.30

(22) Дата подачи заявки
2020.02.27

(51) Int. Cl. ***C07K 14/47*** (2006.01)
C07K 14/46 (2006.01)
C07K 14/465 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, СОЗДАННЫЕ ДЛЯ КОЛОНИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ, НАХОДЯЩИЕСЯ В ОПУХОЛИ ИММУННЫЕ КЛЕТКИ И МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ

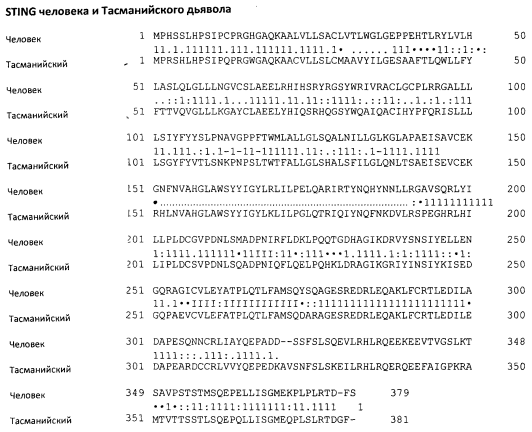
(31) **62/811,521; 62/828,990; 62/934,478; 62/962,140**
(32) **2019.02.27; 2019.04.03; 2019.11.12; 2020.01.16**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/020240**
(87) **WO 2020/176809 2020.09.03**

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

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

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

(57) Предложены иммуностимулирующие бактерии для доставки, которые имеют повышенную колонизацию опухолей, микроокружения опухоли и/или находящихся в опухоли иммунных клеток, и повышенную противоопухолевую активность. Иммуностимулирующие бактерии модифицированы делецией генов, кодирующих флагеллы, и модификацией генов, так что функциональные флагеллы не производятся, и/или модифицированы делецией pagP или модификацией pagP с получением неактивного продукта pagP. В результате иммуностимулирующие бактерии являются флагеллин- и pagP$^-$. Иммуностимулирующие бактерии могут иметь дополнительные модификации генома, так что бактерии являются ауксотрофными по аденозину и/или пурину. Бактерии могут быть один или более из asd$^-$, purI$^-$ и msbB$^-$. Иммуностимулирующие бактерии, такие как виды Salmonella, модифицированы так, что они кодируют белки, индуцирующие экспрессию интерферона (INF) типа I или являются их вариантами, которые приводят к конститутивной экспрессии INF типа I. Бактерии могут кодировать модифицированные белки стимулятора генов интерферона (STING) нечеловеческих видов, которые имеют пониженную сигнальную активность NF-κB и, возможно, повышенную сигнальную активность пути INF типа I по сравнению с человеческим STING. Бактерии преимущественно инфицируют иммунные клетки в микроокружении опухоли, или находящиеся в опухоли иммунные клетки, и/или индуцируют меньшую гибель иммунных клеток, чем других клеток. Также предложены способы ингибирования роста или снижения объема солидных опухолей посредством введения иммуностимулирующих бактерий.



202100228 A1

202100228 A1

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, СОЗДАННЫЕ ДЛЯ КОЛОНИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ, НАХОДЯЩИЕСЯ В ОПУХОЛИ ИММУННЫЕ КЛЕТКИ, И МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ

СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

Приоритет заявлен в предварительной заявке США 62 /962140, поданной 16 января 2020, озаглавленной «Иммуностимулирующие бактерии, сконструированные для колонизации опухолей, резидентные иммунные клетки и мокроокружение опухоли» , заявитель ApplicantActymTherapeutics, Inc., иизобретателиChristopherD. Thanos, LauraHixGlickman, JustinSkoble, AlexandreCharlesMichelIannello, иHaixingKehoe.

Приоритет также заявлен в предварительной заявке на патент США № 62/934,478, поданной 12 ноября 2019 года, озаглавленной «Иммуностимулирующие бактерии, сконструированные для колонизации опухолей и микроокружение опухоли», заявитель ActymTherapeutics, Inc, и изобретатели ChristopherDThanos, LauraHixGlickman, JustinSkoble, иAlexandreCharlesMichelIannello.

Приоритет также заявлен в предварительной заявке на патент США № 62/828,990, поданной 03 апреля 2019, озаглавленной «Штаммы Salmonella сконструированные для колонизации опухоли и микроокружение опухоли», заявитель Actym Therapeutics, Inc, and изобретатели ChristopherDThanos, LauraHixGlickman, JustinSkoble, иAlexandreCharlesMichelIannello.

Приоритет также заявлен в предварительной заявке на патент США № 62/811,521, поданной 27 февраля 2019, озаглавленной "Нацеленные на опухоль микроорганизмы, которые способствуют иммуностимулированию микроокружения опухоли," заявительActymTherapeutics, Inc, авторыChristopherDThanos, LauraHixGlickman, JustinSkoble, иAlexandreCharlesMichelIanello.

Где допускается, предмет каждого из этих приложений включен в настоящий документ посредством ссылки. Иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные в каждом из этих применений, могут быть модифицированы, как описано в настоящей заявке, и такие бактерии включены в настоящий документ посредством ссылки.

ВВЕДЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ ЛИСТИНГА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДОСТАВЛЕННОГО ЭЛЕКТРОННО

Подана электронная версия перечня последовательностей, содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки. Электронный файл был создан февраля 27, 2020, имеет размер 603 килобайта и назван 1706SEQPC.txt

УРОВЕНЬ

При развитии опухолей развивается иммуносупрессивная среда. Они инициируют множество механизмов для уклонения от иммунного надзора, перепрограммируют противоопухолевые иммунные клетки для подавления иммунитета и непрерывно мутируют резистентность к раковой терапии (см., *напр.* Mahoney *etal.* (2015) *Nat. Rev. DrugDiscov.* 14(8):561- 584).В области иммунотерапии рака было сделано большое число исследований, о чем свидетельствуют клинические успехи в области анти-CTLA4, анти-PD-1 и анти-PD-Ll антител иммунной контрольной точки (см. например, Buchbinder *etal.* (2015)1 *Clin. Invest.* 125: 3377-3383; Hodi *et al.* (2015)1 *Clin. Invest.* 125:3392-4000; and Chen *et al.* (2015) *JClin. Invest.* 125:3384-3391).

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии, и может быть использовано при конструировании иммунотерапий, преодолевающих иммунную толерантность и уход, при ограничении аутоиммуно-связанных токсичностей текущей иммунотерапии, в том числе в области иммуноонкологии. Следовательно, необходимы дополнительные и инновационные иммунотерапии и другие виды терапии.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены бактерии, модифицированные как иммуностимулирующие для противораковой терапии. Иммуностимулирующие бактерии, как указано в настоящем документе, обеспечивают многогранный подход к противоопухолевой терапии. Бактерии обеспечивают платформу, в которой существуют многочисленные средства, обладающие противоопухолевой иммуностимулирующей активностью.Как представлено в настоящем документе, бактерии, такие как виды Salmonella, точно настроены так, чтобы иметь мощную противоопухолевую активность путем увеличения их способности накапливаться в опухолях или мишенях, резидентно-иммунных клетках и/или опухолевой микросреде (TME). Это достигается

модификациями, которые, например, изменяют тип клеток, которые они могут инфицировать(тропизм), их токсичность, их способность покинуть иммунную систему, такая как уходящая инактивация комплемента, и/или среды, в которых они могут реплицироваться. Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать, например, продукты, которые усиливают или вызывают иммунный ответ и другие терапевтические/противораковые продукты.Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, благодаря их улучшенной колонизации опухолей/опухолевых микроокружений/опухолерезидентных иммунных клеток и их устойчивости к комплементу и другим антибактериальным иммунным ответам могут вводиться системно.

Бактерии по своей природе стимулируют иммунную систему; бактериальная инфекция индуцирует иммунные и воспалительные пути и ответы, некоторые из которых желательны для противоопухолевого лечения, а другие являются нежелательными. Модификация бактерий путем удаления или модификации генов и продуктов, которые приводят к нежелательным воспалительным откликам, и добавления или модификации генов, которые индуцируют желательные иммуностимулирующие противоопухолевые ответы, улучшает противоопухолевую активность бактерий.

Бактерии накапливаются в опухолевых клетках и тканях и реплицирующиеся в них могут лизировать клетки. Бактерии мигрируют из мест введения и могут накапливаться в других (например, дистальных/метастатических) опухолях и опухолевых клетках, чтобы обеспечить аскопальный эффект.

Бактерии, предложенные в настоящем документе, модифицированы таким образом, что они предпочтительно инфицируют и накапливаются в резидентных иммунных клетках, опухолях и опухолевой микросреде, и доставлять их плазмиды, которые кодируют терапевтические противораковые белки и продукты. При этом эти свойства этих бактерий используют для получения иммуностимулирующих бактерий с несколькими противоопухолевыми активностями и свойствами, которые могут действовать индивидуально и синергически.

Геномы бактерий, предусмотренных в настоящем документе, модифицированы для увеличения накопления в опухолях и в опухолерезидентных иммунных клетках, а также в опухолевой микросреде. Это осуществляется в настоящем документе путем удаления или отключения генов, ответственных за инфицирование или инвазию

неопухолевых клеток, таких как эпителиальные клетки, и/или снижения цитопатогенности бактерий, в частности иммунных клеток и резидентных иммунных клеток.

При накоплении в опухолерезидентных иммунных клетках экспрессируются белки, кодируемые на плазмидах под контролем эукариотических регуляторных сигналов, и секретируются в TME. Иммуностимулирующие бактерии, представленные в данном документе, кодируют белки, которые обладают противораковой активностью, например, путем модулирования противоопухолевого иммунного ответа. Бактерии, представленные в данном документе, кодируют белки, которые приводят к экспрессии интерферона типа I (IFN).

Такие белки включают STING (стимулятор генов интерферона) и другие иммуностимулирующие белки являются частью пути цитозольной ДНК/РНК-датчика, что приводит к экспрессии IFN типа I, а также варианты этих белков, которые увеличивают экспрессию IFN типа I или что приводит к конститутивной экспрессии IFN. Например, иммуностимулирующие белки включают конститутивно активные варианты цитозольных ДНК/РНК датчиков, например, с мутациями с функцией прироста.

Предложены композиции, их применение и способы, которые модулируют иммунные ответы для лечения заболеваний, в том числе для лечения рака. Композиции содержат иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе. Также предложены способы лечения и применения бактерий для обработки. Субъекты для лечения включают людей и других приматов, домашних животных, таких как собаки и кошки, и других животных, таких как лошади, коровы и другие животные и зооживотные.

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

Также предложены способы ингибирования роста или уменьшения объема солидной опухоли путем введения иммуностимулирующих бактерий или фармацевтических композиций или применения композиций для лечения. Например, предложены способы введения или применения композиции, которая содержит, для одной дозы,

эффективное количество иммуностимулирующей бактерии, такой как виды Salmonella, субъекту, такому как человек, имеющий солидный рак опухоли.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, кодирующие иммуностимулирующие белки, которые являются конститутивно активными белками, которые стимулируют или вызывают экспрессию IFN типа I. Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать другие противоопухолевые средства, такие как РНК, и цитокины и хемокины, и другие модификации бактерий и плазмид, описанные в данном документе, могут быть объединены в любой желаемой комбинации.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые имеют повышенную колонизацию опухолей, опухолевую микросреду и/или опухоль-резидентные иммунные клетки и повышенную противоопухолевую активность. Иммуностимулирующие бактерии модифицируют делецией генов, кодирующих флагеллы, и/или модификацией генов таким образом, что функциональные флагеллы не образуются, и/или делецией *pagP* или модификацией *pagP* для получения неактивного продукта *pagP* . В результате иммуностимулирующие бактерии являются флагеллином- *(IliC/fljB⁻) и*/или *pagP⁻* . Альтернативно, или дополнительно, иммуностимулирующие бактерии могут представлять собой pagP/msbB -.

Иммуностимулирующие бактерии могут представлять собой аспартат-полуальдегид дегидрогеназу (asd -), например, посредством нарушения или делеции всей или части эндогенного гена, кодирующего аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (asd), при этом эндогенный asd не экспрессируется. Иммуностимулирующие бактерии могут быть модифицированы для кодирования аспартат-полуальдегиддегидрогеназы (asd) на плазмиде под контролем бактериального промотора для выращивания бактерий invitro, так что бактерии будут иметь ограниченную репликацию invivo.

Иммуностимулирующие бактерии могут иметь дополнительные геномные модификации, так что бактерии представляют собой аденозиновые или пуриновые ауксотрофы. Бактерии могут быть являются одним или более asd⁻, purl-и msbB -. Иммуностимулирующие бактерии, такие как виды Salmonella, модифицированы для кодирования иммуностимулирующих белков, которые придают противоопухолевую активность в микроокружении опухоли и/или модифицированы таким образом, что бактерии предпочтительно инфицируют иммунные клетки в микроокружении опухоли или опухолевые иммунные клетки и/или вызывают меньшую гибель клеток в иммунных клетках, чем в других клетках.Также предложены способы ингибирования

роста или уменьшения объема солидной опухоли путем введения иммуностимулирующих бактерий.

Предложены способы увеличения колонизации опухоли иммуностимулирующими бактериями, такими как разновидность Salmonella, путем модификации генома иммуностимулирующей бактерии, которая должна быть флагеллином-(fliC-/ fljB -), в результате чего флагелла не получается, и/или на pagP -. В частности, бактерии представляют собой флагеллин-аденозиновыеауксотрофы, а также являются asd ⁻ Бактерии, представляющие собой флагеллин, получены из бактериальных видов, которые экспрессируют флагеллы.

Бактерии также содержат плазмиды, которые кодируют терапевтические продукты, такие как противоопухолевые агенты, белки, повышающие иммунный ответ субъекта, и/или белки, которые приводят к конститутивной или повышенной экспрессии иммуностимулирующих белков, таких как интерферон типа I (IFN), включая интерферон-Р.Это включает в себя кодирование белков, которые стимулируют иммунную систему как часть пути, который приводит к экспрессии IFN типа I, и, в частности, посредством рендеринга таких белков конститутивно активными.

Плазмиды также могут кодировать иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, которые повышают противоопухолевый иммунный ответ у субъекта. Бактерии содержат плазмиды, которые кодируют противораковые терапевтические средства, такие как интерферирующая РНК, включающая микроРНК, shРНК и siРНК, которые предназначены для подавления, ингибирования, нарушения или иным образом молчания генов и продуктов иммунной контрольной точки, и других мишеней, которые играют роль в путях, которые являются иммунодепрессивными. Бактерии также могут кодировать опухолевые антигены на плазмидах для стимуляции иммунного ответа против опухолей.

Кодируемые белки экспрессируются под контролем промоторов, распознаваемых эукариотическими промоторами, такими как промоторы млекопитающих и животных, или вирусных. Бактерии могут экспрессировать один, два или более из терапевтических белков/продуктов, включая комбинации стимулирующих усиление иммуностимулирующих белков и/или цитокинов. Эти гетерологичные белки кодируются на плазмиде под контролем промотора, такого как промотор РНК-полимеразы II или III, распознаваемый эукариотическим хостом.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиду, кодирующую продукт под контролем эукариотического промотора, где геном указанного продукта модифицирован, в результате чего бактерия является флагеллином-(fliC-fljB -) и/или pagP. Бактерии могут представлять собой один или оба из флагеллина-(fliC-/ fljB -) и pagP. Эти иммуностимулирующие бактерии проявляют повышенную опухолеопухолевую микроокружение и опухоль-резидентную иммунную колонизацию клеток и обладают повышенной противоопухолевой активностью.

Также предложены иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован, посредством чего бактерия является*pagP⁻ ImsbB⁻*. Эти бактерии также имеют повышенную колонизацию опухолей, опухоль-резидентных иммунных клеток и опухолевую микросреду. Вследствие результирующего изменения в бактериальных мембранах и структуре главный иммунный ответ, такой как активность комплемента, изменяется так, что бактерии не устраняются при системном введении.Эти бактерии также могут представлять собой флагеллин-(fliC-/ fljB -) и могут содержать другие модификации, как описано в настоящем документе, включая модификации, которые изменяют клетки, которые они могут инфицировать, приводя к накоплению в микроокружения опухоли, опухолях и резидентных иммунных клетках.Следовательно, иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, могут вводиться системно и проявлять высокий уровень колонизации опухоли/опухолевого микроокружения и/или опухолерезидентной колонизации иммунных клеток.

Эти иммуностимулирующие бактерии могут быть *purI⁻ (purN1), один или более из asst, urnsbB⁻ ,и один и более из флагеллина⁻ (fliC /fljB) upagP⁻*

Иммуностимулирующие бактерии могут быть одна или более из *pull⁻ (puriVt), nisbB⁻ ,pur,0⁻* , flagellin⁻ *(fliC/fljB), page⁻, adrA:* , *csg,D⁻* , *aser, hdA:* , *1ppA:* and*1pp,8⁻* , ифлагеллин⁻ *(fliC /fljB)* и/илиpage⁻, и/или*nish,81 pagP⁻* . Например, иммуностимулирующие бактерии могут включать мутации в геноме, такие как делеции или нарушения, которые снижают токсичность или инфективностьнеиммунных клеток в хозяине. Например, иммуностимулирующие бактерии могут быть *page⁻*.

В качестве другого примера, иммуностимулирующие бактерии могут представлять собой флагеллин-(MC/ fljB -), а также могут быть*page*⁻.

Бактерии могут быть модифицированы таким образом, что они накапливаются и экспрессируют терапевтический продукт (продукты) в резидентных иммунных клетках и в опухолевой микросреде (TME), тем самым доставляя иммунотерапевтический противоопухолевый продукт в окружающую среду, в которой они обладают полезной активностью, и позволяют избежать неблагоприятных или токсических побочных эффектов от экспрессии в других клетках/средах.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуностимулирующий белок (ки)/терапевтический продукт (ы) могут быть функционально связаны с экспрессией нуклеиновых кислот, кодирующих секреторный сигнал, посредством чего при экспрессии в хозяине иммуностимулирующий белок/терапевтический продукт секретируется в опухолевую микросреду.

Как обсуждалось выше, геном иммуностимулирующих бактерий также модифицирован таким образом, что бактерии предпочтительно инфицируют иммунные клетки, такие как резидентные иммунные клетки, и/или геном модифицирован так, что бактерии индуцируют меньшую гибель клеток в резидентных иммунных клетках (пониженный пироптоз), чем немодифицированные бактерии.

В результате иммуностимулирующие бактерии накапливаются или накапливаются в большей степени, чем бактерии без модификаций, в опухолях или в микроокружении опухоли или в резидентных иммунных клетках, чтобы тем самым доставлять иммуностимулирующий белок (ки) и их конститутивно активные варианты, и другие терапевтические продукты, в клетку для стимуляции или индукции экспрессии интерферона типа I.

Бактерии могут быть одна или более из флагеллин⁻*/fljB), page*⁻*, unisbB*⁻ ,и могут включать дру

Иммуностимулирующие бактерии также могут представлять собой аспартат-полуальдегиддегидрогеназу-*(asd")* , такую как s за счет нарушения или делеции всей или части эндогенного гена, кодирующего аспартат-полуальдегиддегидрогеназу*(asd)*, при этом эндогенный asd не экспрессируется. Эти иммуностимулирующие бактерии могут быть модифицированы для кодирования аспартат-полуальдегиддегидрогеназы(asd) на плазмиде под контролем бактериального промотора так, чтобы бактерии могли продуцироваться invitro.

Иммуностимулирующие бактерии могут представлять собой ауксотрофные для конкретных питательных веществ, которые богаты или накапливаются в опухолевой микросреде, такой как аденозин и аденин. Кроме того, они могут быть модифицированы таким образом, чтобы быть ауксотрофными для таких питательных веществ, чтобы уменьшить или устранить их способность реплицироваться. Инактивированные/делетированные гены бактериального генома могут быть дополнены путем обеспечения их на плазмиде под контролем промоторов, распознаваемых хостом.

Кроме того, геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он предпочтительно инфицирует опухоль-резидентные иммунные клетки. Это достигается путем удаления или разрушения бактериальных генов, которые играют роль в инвазивности или инфекционности бактерий, и/или которые играют роль в индуцировании гибели клеток.Бактерии модифицируют, чтобы предпочтительно инфицировать резидентные иммунные клетки, и/или индуцировать меньшую гибель клеток в таких клетках, чем немодифицированные бактерии, или в других клетках, которые могут инфицировать бактерии.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, могут включать модификацию бактериального генома, при этом бактерия индуцирует меньшую гибель клеток в резидентных иммунных клетках; и/или модификацию бактериального генома, при этом бактерия накапливается более эффективно в опухолях, TME или опухолерезидентных иммунных клетках.Эти иммуностимулирующие бактерии могут быть дополнительно модифицированы таким образом, что бактерии предпочтительно инфицируют опухоль-резидентные иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующей бактерии может быть модифицирован таким образом, что он индуцирует меньшую гибель клеток в резидентных иммунных клетках (уменьшает пироптоз), в результате чего иммуностимулирующая бактерия накапливается в опухолях или в микроокружении опухоли или в резидентных иммунных клетках, чтобы тем самым доставлять конститутивно активный иммуностимулирующий белокили другой терапевтический продукт (ы), в клетку для стимуляции или индукции экспрессии IFN типа I.

Иммуностимулирующие бактерии могут включать делеции или модификации одного или более генов или оперонов, участвующих в SPI-1-зависимой инвазии (и/или SPI -2), при этом иммуностимулирующие бактерии не проникают в или инфицируют эпителиальные клетки. Примерами генов,

которые могут быть удалены или инактивированы, являются один или более из *avrA, hilA, hilD , invA, invB, invC , invE, invF , invG, invH, invl, invJ, iacP , iagB, spa0, spaP, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB , orgC , prgH, prgl, prgJ, prgK, sicA, sicP , sipA, sipB,sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB,* and*sptP.*

Устранение способности инфицировать эпителиальные клетки также может быть достигнуто путем конструирования иммуностимулирующих бактерий, которые содержат нокдауны или делеции генов, кодирующих белки, вовлеченные в SPI-1-независимую инвазию, такую как один или более генов, выбранных из *rck, pagN, hlyE, pegsrgD, srgA, srgB,* and*srgC* . Аналогично, иммуностимулирующие бактерии могут включать делеции в генах и/или оперонах в SPI-2, например, для создания бактерий, позволяющих избежать вакуоль, содержащую Salmonella (SCV). Эти гены включают, например, *sifA, sseJ, sseL, sopD2, pipB2, sseF, sseG, spvB, usteA.*

Например, иммуностимулирующие бактерии могут быть модифицированы таким образом, чтобы иметь пониженную патогенность, посредством чего снижается инфекция эпителиальных и/или других неиммунных клеток, относительно бактерии без модификации. Они включают в себямодификацию системы секреции типа 3 (T3SS) или системы секреции 4 типа (T4SS), такую как модификация пути SPI -1 или системы T3SSSalmonella, как описано и проиллюстрировано в данном документе.

Бактерии дополнительно могут быть модифицированы для индукции меньшей гибели клеток, например, делецией или разрушением нуклеиновых кислот, кодирующих PagP (липид А пальмитоилтрансферазы), что снижает вирулентность бактерии.

Геном иммуностимулирующих бактерий, предусмотренных в настоящем документе, может быть модифицирован для увеличения или усиления инфицирования иммунных клеток, в частности иммунных клеток в микроокружении опухоли, таких как фагоцитарные клетки. Это включает снижение инфекции неиммунных клеток, таких как эпителиальные клетки, или увеличение инфицирования иммунных клеток. Бактерии также могут быть модифицированы для снижения пироптоза в иммунных клетках.Многочисленные модификации бактериального генома могут выполнять одну или обе из возрастающей инфекции иммунных клеток и снижения пироптоза.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, 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, белок PrgJ, белок Prgl и QseC.

Терапевтические продукты, закодированные на плазмидах для экспрессии в эукариотическом, таком как человек, хозяине, находятся под контролем эукариотических регуляторных последовательностей, включая эукариотические промоторы, такие как промоторы, распознаваемые РНК полимеразой II или III. Они включают промоторы вирусной и РНК-полимеразы II млекопитающих.

Примеры вирусных промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор вируса Эпштейна Барра (EBV), промотор вируса герпеса, промотор респираторно-синцитиального вируса (RSV) и промотор аденовируса. Другие промоторы РНК-полимеразы II включают, но не ограничиваются ими, промотор фактора элонгации-1 (EF -1) альфа промотор, или промотор UbC (лентивирус), или промотор PGK (3-фосфоглицераткиназа), синтетический промотор MND и синтетический промотор, такой как промотор CAGG (или CAG).

Синтетический промотор CAG содержит ранний энхансер (C) цитомегаловируса (CMV); промотор, первый экзон и первый интрон гена бета-актина цыпленка (A); и акцептор гена бета-глобина кролика (G).MND является синтетическим промотором, который содержит область U3 модифицированной LTRMoMuLV с миелопролиферативным энхансером вируса саркомы (MND-промотор мышиного лейкоза (миелопролиферативный энхансер саркомы), отрицательный контрольный участок делетирован, d1587rev-связывающий сайт замещен; см. например, Lietal (2010) JNeurosci. Methods 189: 56-64).

Могут быть использованы другие сильные регулятивные или конститутивные промоторы.Примерами промоторов являются промотор EF -1 альфа, CMV, SV40, PGK, EIF4A1, CAG и CD68 промоторы. Регуляторные последовательности также включают терминаторы, энхансеры, секреторные и другие миграционные сигналы.

Плазмиды, включенные в иммуностимулирующие бактерии, могут присутствовать в низком количестве копий или количестве копий среды, например, путем выбора начала репликации, что приводит к низкому числу копий. Здесь показано, что противоопухолевая активность и другие свойства бактерий улучшены, когда плазмида присутствует в низком количестве до среднего числа копий, где число копий среды составляет менее 150 или менее чем приблизительно 150 и более чем 20 или

приблизительно 20 или находится между 20 или 25 и 150, и низкое число копий составляет менее чем 25 или менее чем 20 или менее чем приблизительно 25 или менее чем приблизительно 20 копий.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, включают любые штаммы и бактерии, описанные в заявке на патент США № 16/033,187, дополнительно модифицированные для экспрессии иммуностимулирующего белка и/или чтобы предпочтительно инфицировать и/или быть менее токсичными в иммунных клетках в микроокружении опухоли, или в резидентных иммунных клетках, как описано и проиллюстрировано в данном документе.

Кодированные терапевтические белки /продукты

Иммуностимулирующие бактерии кодируют терапевтический белок или продукт, на плазмиду в бактериях, под контролем эукариотического промотора, который при экспрессии у субъекта-млекопитающего придает или вносит свой вклад в противоопухолевый иммунитет в микроокружения опухоли.

Продукты, кодируемые иммуностимулирующими бактериями, включают белки, являющиеся частью пути цитозольной ДНК/РНК-датчика, что приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN) и его вариантам. Они включают вариантные белки с повышенной активностью и вариантные белки, которые приводят к конститутивной экспрессии интерферонов I типа.Они также включают белки, которые встречаются в природе или с помощью мутации, имеют пониженную сигнальную активность в путях, которые приводят к нежелательным иммунным реакциям, но которые имеют активность, стимулирующую интерферон I типа и/или стимулирующую интерферон-бета активность, сравнимую с нативными человеческими белками или больше. В частности, иммуностимулирующие бактерии кодируют прирост-функцию (GOF) вариантов иммуностимулирующего белка, который в немодифицированной форме является частью пути цитозольного ДНК/РНК-датчика, что приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN).

Примерами являются конститутивно активные варианты иммуностимулирующего белка, который, у людей, способствует или вызывает интерферонопатий, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия предпочтительно инфицирует резидентные иммунные клетки,

и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он индуцирует меньшую гибель клеток в резидентных иммунных клетках (уменьшает пироптоз), при этом иммуностимулирующая бактерия накапливается в опухолях или в микроокружении опухоли или в резидентных иммунных клетках, чтобы тем самым доставлять конститутивно активный иммуностимулирующий белок в клетку для стимуляции или индукции экспрессии IFN типа I.

Вариант может включать в себя мутацию, которая исключает сайт фосфорилирования в иммуностимулирующем белке, чтобы тем самым снизить фактор каппа-свет-цепь-энхансер сигналов активированной В-клетки Это включает, например, STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5, IRF-7, TRIM56, **RIP1,** Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, иSNRNP200, и их варианты, такие как те, которые экспрессируются в интерферонопатиях и их консервативных изменениях, которые обладают конститутивной активностью или повышенной активностью. В некоторых вариантах осуществления, они включают в себя белки, которые индуцируют IFN типа I, такие как STING, RIG-I, IRF -3, IRF -7 или MDA5, и их варианты, которые обладают повышенной активностью или конститутивной активностью, где иммуностимулирующий белок представляет собой STING, RIG-I, IRF -3, IRF -7 или MDA5.

Таким образом, в настоящем документе предложены иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиду, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую вариант иммуностимулирующего белка, который в немодифицированной форме является частью пути цитозольного ДНК/РНК-датчика, что приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN).Эти белки с функцией усиления кодируются на плазмиде под контролем эукариотических регуляторных сигналов, включая промоторы, и возможно другие регуляторные сигналы, такие как энхансеры, полиА и терминаторы транскрипции.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие белки/продукты на плазмиде, могут быть мультиплексированы, в результате чего множество продуктов кодируются. Стратегии для совместной экспрессии мультигена включают использование множества промоторов в одном векторе, слитых белках, сайтах протеолитического расщепления между генами, внутренними участками входа рибосомы (IRES) и саморасщепляющимся (с рибосомным пропуском) 2А пептидами.

2A пептиды представляют собой 18-22 аминокислотные вирусные олигопептиды, которые опосредуют расщепление полипептидов при трансляции в эукариотических клетках.Таким образом, предусмотрены плазмиды, которые кодируют терапевтические продукты на плазмиде под контролем одного промотора, включая саморасщепляющиеся пептиды 2A между кодирующими частями, такими как T2A, P2A, F2A и E2A.
Немодифицированные формы иммуностимулирующих белков представляют собой белки в сигнальном пути, который воспринимает цитозольную ДНК/РНК. Они включают те белки, которые модифицированы заменами аминокислот или делециями, которые увеличивают активность и/или создают конститутивную активность. Предложены иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиду, кодирующую усилительную функцию, конститутивно активный вариант иммуностимулирующего белка.
Эти белки с функцией усиления включают в себя белки в сигнальном пути, что приводит к экспрессии интерферона типа I, включая белки, которые, у людей, способствуют или вызывают интерферонопатию, и мутанты с функцией усиления, которые модифицированы, были выбраны, в результате конститутивной экспрессии интерферона типа I.
Иммуностимулирующий белок в немодифицированной форме является таким, который воспринимает или взаимодействует непосредственно или опосредованно как часть сигнального пути с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами или циклическими динуклеотидами, для индукции экспрессии интерферона типа I, а вариантный белок индуцирует экспрессию интерферона типа I в отсутствие восприятия или взаимодействия с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами или циклическими динуклеотидами (CDN).Включены варианты функции усиления, не требующие цитозольной нуклеиновой кислоты, нуклеотидов, динуклеотидов или циклических динуклеотидов для достижения экспрессии интерферона типа I. Примерами таких белков являются STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, andSNRNP200.

В этих иммуностимулирующих бактериях кодируемый вариантный белок с функцией усиления может быть таким, который устраняет сайт фосфорилирования в иммуностимулирующем белке, чтобы тем самым

снизить фактор каппа-свет-цепь-усилитель активированной В-клетки (NF-КВ) сигнализации.Альтернативно, бактерии могут включать одну или более замен аминокислотного серина (S) или треонина (Т) на сайте фосфорилирования аспарагиновой кислотой (D), которая является фосфимиметиком, и приводит к повышенной или конститутивной активности.

Примеры белков в сигнальных путях, которые приводят к экспрессии интерферона типа I, являются STING, RIG-I, IRF-3, IRF-7 andMDAS.

В настоящем документе описаны иллюстративные мутации, которые приводят к активности функции усиления для каждого из этих белков.Мутации включают те, в которых закодированный иммуностимулирующий белок представляет собой вариант STING, RIG-I, IRF -3, IRF -7 или MDAS,

в котором один или более сериновый (S) или треониновый остаток (и), которые являются/являются фосфорилированными вследствие вирусной инфекции,/заменены аспарагиновой кислотой (D), в результате чего полученный вариант представляет собой фосфимиметик, который конститутивно индуцирует интерферон типа I.

Например, предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, в которых иммуностимулирующий белок представляет собой IRF -3, который имеет одну или более замен) по остаткам в положениях 385,386,396, 398, 402, 404 и 405, и остатки заменены остатками аспарагиновой кислоты; это включает IRF -3, который имеет замену S396D со ссылкой на SEQIDNO: 312, и IRF -3, который содержит мутации S396D/S398D/S402D/T404D/S405D со ссылкой на SEQIDNO: 312. Другие примеры представляют собой иммуностимулирующие бактерии, где иммуностимулирующий белок выбран из STING, MDAS, IRF-7 иRIG-I, где мутации выбраны вSTING, со ссылкой на человеческий STING согласно SEQIDNO: 305-309, одна или более выбраны из: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A,

E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, и S324A/S326A; b) в MDA5, соссылкойна SEQ ID NO:310,

однаилиболее: T3311, T331R, A489T, R822Q, G821S, A946T, R337G, D393V, G495R, R720Q, R779H, R779C, L372F, и A452T; c) в RIG-I, соссылкойна SEQ ID NO:311, однаилиболееиз E373A и C268F; и d) в IRF-7, соссылкойнаSEQ ID NO:313, однаилиболееиз: S477D/S479D, S475D/S477D/S479D, S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D и A247-467.

Эти замены могут быть заменены консервативными мутациями в соответствии с таблицей типовых консервативных аминокислотных замен ниже.

Также предложены носители, такие как экзосомы, липосомы, онколитические вирусы, наночастицы, иммуностимулирующие бактерии и другие такие носители, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие белки с функцией усиления и другие терапевтические продукты, как описано выше и где-либо еще в данном документе.

Например, предусмотрены носители, содержащие нуклеиновые кислоты, в целом ДНК, кодирующие иммуностимулирующий белок с функцией усиления, являющийся частью сигнального пути, который приводит к экспрессии интерферона типа I. Варианты функции усиления могут выполнить экспрессию конститутивного интерферона типа I.

Например, эти варианты включают в себя любой обсуждаемый в данном документе, такой как модифицированный STING, где: модификации в отношении STING делают его активность конститутивной, так что он не требует cGAMP (или других лигандов/CDN) для активности; модифицированный STING кодируется модифицированным геном *TMEA1173*; эти модификации включают инсерции, делеции или замены аминокислот; и модифицированный STINGобладает повышенной иммуностимулирующей активностью по сравнению с немодифицированным. Эти аминокислотные замены в STING, со ссылкой на человеческий STING согласно SEQIDNO: 305-309, включают один или более выбранных из ряда: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A,

E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, and S324A/S326A.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, также могут содержать последовательность нуклеотидов, кодирующих иммуностимулирующий белок, который при экспрессии у субъекта-млекопитающего придает или вносит свой вклад в противодействие или иммунитет в микроокружении опухоли; иммуностимулирующий белок кодируется на плазмиде в бактерии под контролем эукариотического промотора.Примеры промоторов включают, но не ограничиваются ими, альфа промотор фактора элонгации-1 (EF1), или промотор UbC, или промотор PGK, или промотор CAGG или CAG.

Иммуностимулирующий бактериальный агент также может кодировать ингибирующую РНК , которая при экспрессии у субъекта-млекопитающего придает или вносит свой вклад в противоопухолевый иммунитет. РНК кодируют на плазмиде в бактерии под контролем эукариотического промотора. Геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он индуцирует меньшую гибель клеток в резидентных иммунных клетках и/или так, что он накапливается в резидентных иммунных клетках и в микроокружении опухоли.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, также могут кодировать другие иммуностимулирующие белки. Иммуностимулирующий белок может представлять собой цитокин, такой как хемокин. Примерами иммуностимулирующих белков являютсяIL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-15/IL-15Rкомплекс альфа цепи, IL-36 гамма, IL-18, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCLS,белки, которые вовлечены в или которые действуют или потенцируют рекрутинг/персистенцию Т-клеток, CD40, CD40Лиганд (CD4OL), OX40, OX40 Лиганд (OX4OL), 4-1BB, 4-1BBЛиганд (4-1BBL), члены семейства B7-CD28 , и элементы суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR). В некоторых вариантах осуществления они включают, например, IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-23, IL-36 гамма, IL -2, который имеет ослабленное связывание с IL -2 Ra, комплекс IL -15/IL -15 R альфа-цепь, IL -18, IL -2, модифицированный таким образом, что он не связывается с IL -2 Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон-а, интерферон-0, CCL3, CCL4, CCLS, белки, вовлеченные в действие или потенцирование, рекрутинг/персистенцию Т-клеток, CD40, CD40 Лиганд, 0X40, 0X40 Лиганд, 4-1 BB, 4-IBBЛиганд, элементы семейства B7-CD28, антагонисты TGF-бета полипептида и элементы суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR).

Иммуностимулирующие бактерии могут включать последовательность нуклеотидов, кодирующих ингибирующую РНК, которая ингибирует, подавляет или разрушает экспрессию иммунной контрольной точки. РНК могут быть кодированы на плазмиде в бактериях. Нуклеотиды, кодирующие иммуностимулирующий белок, и возможно РНК, могут находиться на плазмиде, присутствующей в количестве от низкого до среднего от числа копий среды.

Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать терапевтические продукты, такие как РНК или кассета CRISPR, которая ингибирует, подавляет или нарушает экспрессию иммунной контрольной точки или другой мишени, ингибирование которой, подавление или нарушение увеличивает противоопухолевый иммунный ответ у субъекта; РНК или кассету CRISPR кодируют на плазмиде в бактерии.Другие терапевтические продукты включают, например, антитела, которые связываются с иммунными контрольными точками для ингибирования их активности, таких как, например, анти-PD -1, анти-PD-L1 и анти-CTLA -4 антитела.

РНК включает все формы двухцепочечной РНК, которая может быть использована для молчания экспрессии целевых нуклеиновых кислот. РНК включает shРНК, siРНК и микроРНК (miРНК). Любая из этих форм может быть заменена в раскрытых и описанных здесь вариантах осуществления. В общем, РНК кодируют на плазмиде в бактериях.

Плазмиды могут включать другие гетерологичные нуклеиновые кислоты, которые кодируют представляющие интерес продукты, которые модулируют или добавляют активность или продукты в бактерию, или другие такие продукты, которые могут модулировать иммунную систему субъекта, подлежащего лечению бактерией. Бактериальные гены также могут быть добавлены, удалены или разрушены. Эти гены могут кодировать продукты для роста и репликации бактерий, или продукты, которые также модулируют иммунный ответ хозяина к бактериям.

Бактериальные виды включают, но не ограничиваются ими, штаммы *Salmonella, Shigella, Listeria, E. coli, uBifidobacteriae* .Например, *Shigella sonnei, Shigella flexneri, Shigella dysenteriae, Listeria monocytogenes, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Salmonella gallinarum,*и*Salmonella enteritidis.*

Видывключают, 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, uErysipelothrix, илиегоаттенуированныйштаммилимодифицированныйштаммлюбогоизпре дшествующихперечнейштаммовбактерий.

Другиеподходящиевидыбактерийвключают*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, Haemophilussomnus , Brucella abortus, Mycobacterium intracellulare, Legionella pneumophila, Rhodococcusequi, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter mustelae, Vibrio cholerae, Bacillus subtilis, Erysipelothrixrhusiopathiae, Y ersinia enterocolitica, Rochalimaeaquintana,* and *Agrobacterium tumerfacium.*

Salmonella представлен здесь и, в частности, штаммами Salmonellatyphimurium, такими как штамм, обозначенный YS1646 (ATCC # 202165) или VNP20009, и штамм дикого типа, депонированный в ATCC № 14028, или штамм, имеющий все идентифицирующие характеристики ATCC # 14028.

Другие штаммы включают, например, RE88, SL7207, x 8429,x 8431 и x 8468.

Примерные штаммы Salmonella, представленные в настоящем документе, являются иммуностимулирующими штаммами AST-104, AST-105, AST-106, AST-108, AST-110, AST-112, AST-113, AST-115, AST-1 17, AST-118, AST-119, AST-120, AST-121, AST-122, andAST-123.

Эти штаммы могут быть дополнительно модифицированы для кодирования иммуностимулирующих белков, которые являются вариантами усиления белков в сигнальных путях, которые приводят к экспрессии интерферона типа I или других иммуномодуляторных белков.Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать иммуностимулирующие белки, повышающие иммунный ответ в микроокружении опухоли, такие как цитокины.

Иммуностимулирующие бактерии также могут быть модифицированы для предпочтительно инфицирования иммунных клеток в микроокружении опухоли или инфицирования резидентных иммунных клеток и/или для индукции меньшей гибели клеток в таких иммунных клетках, как описано в настоящем документе.Последовательности и описания приведены в подробном описании, примерах и перечне последовательностей. Иммуностимулирующие бактерии могут быть получены из аттенуированных штаммов бактерий, или они становятся ослабленными за счет модификации, описанных в данном документе, таких как делеция asd, посредством чего репликация ограничена invivo.

Понятно, что в случаях, в которых бактериальные гены модифицируются и упоминаются в данном документе, они упоминаются в отношении их обозначения (название) в разновидностях Salmonella, которые являются примерами бактерий, из которых могут быть получены иммуностимулирующие бактерии. Специалист распознает, что другие виды имеют соответствующие белки, но их обозначение или название может отличаться от имени Salmonella.Однако общее раскрытие изобретения может быть применено к другим видам бактерий. Например, как показано в настоящем документе, делеция или инактивация флагеллина (fliC-/ fljB -) в Salmonella и/или pagP приводит к увеличению колонизации опухолей.

Аналогичные гены флагеллы или подобных функций для инфицирования могут быть модифицированы другими видами бактерий для достижения повышенной колонизации опухоли. Аналогично,инактивация/делеция бактериальных продуктов, таких как продукты pagP и/или msbB, как описано в настоящем документе, может снижать активацию комплемента и/или другие воспалительные реакции, тем самым увеличивая нацеливание на опухоли, резидентные иммунные клетки и опухолевую микросреду. Соответствующие гены в других видах, которые вовлечены в активацию пути комплемента или другого воспалительного пути, могут быть удалены, как проиллюстрировано здесь для Salmonella.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, кодируют ингибиторы различных генов, которые способствуют уменьшению противоопухолевых иммунных ответов и/или экспрессии генов и/или генных продуктов и/или продуктов, которые стимулируют иммунную систему, и тем самым являются иммуностимулирующими.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, имеют свойства, которые делают их иммуностимулирующим. Аденозинауксотрофия также является иммуностимулирующей. Они также могут кодировать на плазмиде терапевтические полезные нагрузки, такие как конститутивно активные мутанты STING и другие иммуностимулирующие белки.Эффекты этой комбинации усилены штаммами, представленными в настоящем документе, которые являются ауксотрофными для аденозина, что обеспечивает преимущественное накопление или рекрутинг в богатые аденозинобогащенныеиммуносупрессорные микросреды (TME). Уменьшение аденозина в таких TME дополнительно усиливает иммуностимулирующие эффекты. Такие комбинации признаков в любом из известных штаммов бактерий, или которые могут быть сконструированы для терапевтического введения, обеспечивают аналогичные иммуностимулирующие эффекты. Сконструированные иммуностимулирующие бактерии, такие как иммуностимулирующие бактерии Styphimurium, предложенные в настоящем документе, содержат множество синергетических модальностей для индукции иммунной повторной активации холодных опухолей для стимуляции опухолеспецифических иммунных ответов, ингибирующих опухолеспецифические иммунные ответы, при ингибировании путей иммунной контрольной точки.

В варианты осуществления изобретения включают аденозиновуюауксотрофию и повышенное сосудистое разрушение.Это улучшение нацеливания на опухоль через аденозиновуюауксотрофию и усиленное разрушение сосудов повышает эффективность при локализации воспаления для ограничения системного цитокинового воздействия и аутоиммунных токсичностей, наблюдаемых другими способами иммунотерапии.

Гетерологичные белки, такие как иммуностимулирующие белки и иммуностимулирующие белки с функцией усиления, и РНК экспрессируются на плазмидах под контролем промоторов, которые распознаются промоторами транскрипции эукариотических клеток-хозяев, таких как РНК-полимеразы II (RNAPII) и РНК-полимеразы III (RNAPIII). Промоторы RNAPIII обычно конститутивно экспрессируются в эукариотическом хозяине; промоторы RNAPII могут регулироваться.Предложены терапевтические продукты/иммуностимулирующие белки на плазмидах, стабильно

экспрессируемые бактериями. Примерами таких бактерий являются штаммы Salmonella, в общем аттенуированные штаммы, либо ослабленные другими способами, либо за счет модификаций, описанных в данном документе, таких как аденозиноваяауксотрофия. Примерами штаммов Salmonella являются модифицированные штаммы Styphimurium, которые имеют дефектный ген asd. Эти бактерии могут быть модифицированы, чтобы включать в себя несущий функциональный asd ген на введенной плазмиде; это поддерживает выбор для плазмиды таким образом, что система поддержания/отбора плазмиды на основе антибиотика не нужна. acd-дефектные штаммы, не содержащие функциональный asd-ген на плазмиде, автолитические в клетке-хозяине. Промоторы могут быть выбраны для окружающей среды опухолевой клетки, такие как промотор, экспрессированный в микроокружении опухоли (TME), промотор, экспрессированный в гипоксических условиях, или промотор, экспрессированный в условиях, где pH меньше 7. Плазмиды в любой из описанных и перечисленных выше бактерий кодируют терапевтические продукты. Плазмиды могут присутствовать во многих копий или менее. Это можно управляться выбором элементов, таких как начало репликации. Плазмиды с низким и высоким и средним числом копий и точки начала репликации хорошо известны специалистам в данной области техники и могут быть выбраны.В вариантах осуществления иммуностимулирующих бактерий в данном случае плазмида может присутствовать в низкой до среднего числа копий, например, около 150 или 150 и менее копий, до низкого числа копий, которое меньше чем около 25 или около 20 или 25 копий. Примерами начала репликации являются те, которые получены из pBR322, p15A, pSC101, pMB1, colE1, colE2, pPS10, R6K, R1, RK2, andpUC.

Плазмиды кодируют терапевтические полипептиды, такие как полипептиды, которые индуцируют интерфероны I типа, такие как те, которые экспрессируются в интерферонопатиях, и/или любые терапевтические белки, описанные в данном документе, и/или известные специалистам в данной области техники для применения в терапии рака.

Плазмиды также могут включать последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих белок листеролизинО (LLO), не содержащий сигнальную последовательность (cytoLLO), CpG-звено, последовательность ядерного нацеливания ДНК (DTS) и индуцируемый ретиноевой кислотой связывающий элемент гена-I (RIG-I).

Иммуностимулирующая бактерия, содержащая нуклеиновые кислоты, может включать CpG-звено, распознаваемое рецептором 9 (TLR9). CpG-звено может кодироваться на плазмиде CpG-звено может быть включено в или является частью бактериального гена, который кодируется на плазмиде. Например, ген, который содержит CpGs, может быть asd, кодированным на плазмиде. Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, могут включать один или более из CpG-звена, селективный маркер гена asd для поддержания плазмиды и последовательность для нацеливания на ядерную ДНК.

Иммуностимулирующие бактерии могут быть флагеллинодефицитными, например, посредством делеций или разрушения гена (генов), кодирующих флагеллы. Например, предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат делеции в генах, кодирующих один или оба из флагеллиновых субъединиц fliC и fljB, в результате чего бактерия является дефицитной по флагеллам, и при этом бактерия дикого типа экспрессирует флагеллы. Иммуностимулирующие бактерии также могут иметь делецию или модификацию в гене, кодирующем эндонуклеазу I (endA), в результате чего активность endA ингибируется или устраняется.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, могут представлять собой аспартат-олуальдегиддегидрогеназу-(asd $^{-}$), которая обеспечивает рост в среде с добавлением DAP, но ограничивает репликацию invivo при введении субъекту для лечения.Такие бактерии будут самоограничительными, что может быть полезным для обработки. Бактерия может быть asd за счет нарушения или делеции 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 invivo.

Любая из иммуностимулирующих бактерий, предусмотренных в настоящем документе, может включать нуклеиновую кислоту, в общем, на плазмиде, которая включает в себя CpG-звено или CpG-остров, где CpG-звено распознается рецептором 9 (TLR9). Нуклеиновая кислота кодирует звенья или островки CpG в прокариотах, и, таким образом, CpG звено может быть включено в или может быть частью бактериального гена, кодируемого на

плазмиде. Например, бактериальный ген asd содержит иммуностимулирующие CpG.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, могут быть ауксотрофными для аденозина, или аденозина и аденина. Любая из бактерий в данном документе может быть представленаауксотрофом для аденозина, что преимущественно может повышать противоопухолевую активность, поскольку аденозин накапливается во многих опухолях и является иммуносупрессорным.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, могут быть флагеллинодефицитными, где бактерия дикого типа содержит флагеллы. Они могут быть визуализированы флагеллином, нарушая или удаляя всю или часть гена или генов, которые кодируют флагеллы. Например, предложены иммуностимулирующие бактерии, которые имеют делеции в генах, кодирующих один или оба из флагеллиновых субъединиц FliC и FljB, в результате чего бактерии являются дефицитными по флагеллам. Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, могут включать нуклеиновую кислоту, кодирующую cytoLLO, который представляет собой белок листеролизинО (LLO), не содержащий сигнальную последовательность периплазматического секрета так, что он накапливается в цитоплазме.

Эта мутация преимущественно комбинируется с asd бактерии. LLO представляет собой зависящий от холестерина порообразующий гемолизин из Listeriamonocytogenes, который опосредует фагосомальный выход бактерий. При введении автолизата в опухолевые клетки-хозяева, такие как люди, бактерии воспринимаются фагоцитарными иммунными клетками и входят в вакуоль.

При этом отсутствие DAP предотвращает репликацию бактерий и приводит к автолизу бактерий в вакуоле. Затем лизис высвобождает плазмиду и накопленный LLO образует поры в холестеринсодержащей вакуольной мембране и обеспечивает доставку плазмиды в цитозоль клетки-хозяина. При этом терапевтические продукты можно экспрессировать с использованием механизмов клетки-хозяина и высвобождаться в микросреду опухоли для осуществления противоопухолевой терапии.

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

Иммуностимулирующие бактерии могут иметь делецию или модификацию в гене, кодирующем эндонуклеазу-1 (endA), в результате чего активность endA ингибируется или устраняется. Примерами этих являются иммуностимулирующие бактерии, которые содержат один или более из CpG-звена, селективного маркера гена asd для поддержания плазмиды и последовательности для нацеливания на ядерную ДНК.

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

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

Плазмиды в любой из иммуностимулирующих бактерий также могут кодировать последовательность нуклеотидов, которая является агонистом индуцируемого ретиноевой кислотой гена I (RIG-I) или связывающего элемента RIG-I.

Иммуностимулирующие бактерии могут включать одну или более делеций в генах, таких как один или более из *purI⁻ (purM), msbB⁻, purD⁻, (MC⁻IfljB⁻), pagP⁻, adrA⁻, csgD" uWA⁻*. В качестве иммуностимулирующей бактерии может быть использована msbB -. Например, иммуностимулирующие бактерии могут содержать одну или более делеций purl, делецию msbB, делецию asd и делецию adrA, и возможно делецию csgD. Примеры делеций/модификаций бактериальных генов представляют собой любое из следующего:мутации в гене, которая изменяет биосинтез липополисахарида, выбранных из одного или более из*rfaL, rfaG, rfaH, rfaD , rfaP , rFb, rfa, msbB, htrB, firA, pagL, pagP , lpxR, arnT, eptA, u1pxT; u*/или одну или более из мутации, которая вводит суицидный ген и выбрана из одного или более из*sacB, nuk, hok, gef, kilulUph1A; u*/илиодну или более из

мутации, которая вводит ген бактериального лизиса и выбрана из одного или обоих из hly и cly; и/илимутацию в одном или более факторах вирулентности, выбранных из *IsyA, pag, prg, iscA, virG , plcuact; u*/илиодну или более мутаций, которые изменяют ответ на стресс, выбранных из *recA, htrA, htpR, hspugroEL; u*/илимутацию в min, которая разрушает цикл клеток; и/или одну или более мутаций, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, выбранные из *cya, crp, phoP/phoQ, uompR.*

Иммуностимулирующая 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 его аттенуированный штамм или модифицированный штамм любого из предшествующего списка штаммов бактерий.

Примерами иммуностимулирующих бактерий являются те, где плазмида содержит одну или более из последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белок листерилизинаО (LLO), не содержащий сигнальную последовательность (cytoLO), CpG-звено, последовательность ядерного нацеливания ДНК (DTS) и индуцируемый ретиноевой кислотой связующий элемент гена-I (RIG-I). При этом плазмида содержит два или более терапевтических продуктов под контролем отдельных промоторов, каждый из которых разделен по меньшей мере на приблизительно 75 нуклеотидов, или по меньшей мере 75 нуклеотидов, до приблизительно или по меньшей мере 100,150,200, 250,300,350, 400,450,500, 550,600,700, 800,900,1000, 1100,1200,1300, 1400, 1500 нуклеотидов (или пар оснований), вплоть до приблизительно 1600 или 1600 нуклеотидов (или пар оснований), или от 75 до 1500 или 1600 нуклеотидов (или пар оснований).

Другие примерные иммуностимулирующие бактерии включают те, которые являются ауксотрофными для аденозина, и содержат: одну или более делеций в гене (ax), кодирующих флагеллы; делецию в endA; плазмиду, которая кодирует CytoLLO; последовательность ядерной локализации; и систему комплементации плазмиды asd; и кодирует терапевтический продукт, включающий в себя варианты иммуностимулирующего белка с функцией усиления, который в немодифицированной форме, является частью пути цитозольного ДНК/РНК-датчика, что приводит к экспрессии интерферона

типа I (IFN), как любой описанный в настоящем документе.Такие иммуностимулирующие бактерии включают штаммы Salmonella, такие как штамм Salmonellatyphimurium дикого типа, такой как штамм, депонированный подрегистрационным номером ATCC 14028 или штамм, имеющий все идентифицирующие характеристики штамма, депонированного под номером доступа ATCC № 14028. Другие штаммы включают, например, аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium, выбранный из штаммов, обозначенных как AST -100, VNP20009, или штаммы YS1646 (ATCC # 202165), RE88, SL7207, x 8429, x 8431 и x 8468. Иммуностимулирующие бактерии могут содержать одну или более из делеций purl, делеции msbB, делеции asd и делеции adrA, в дополнение к модификациям, которые увеличивают накопление в опухолевых клетках и/или снижают гибель клеток, и могут кодировать иммуностимулирующий белок, как описано в настоящем документе.

Иммуностимулирующие бактерии также могут включать:одну или более из мутации в гене, которая изменяет биосинтезлипополисахарида, выбранного из одного или более из*rfaL, rfaG, rfaH, rfaD, rfaP , rFb, rfa, msbB, htrB, firA, pagL, pagP , lpxR, arnT, eptA, u1pxT; u*/илиодну или более из мутации, которая вводит суицидный ген и выбрана из одного или более из *sacB, nuk, hok, gef, kiluphlA; u*/илиодну или более из мутации, которая вводит ген бактериального лизиса и выбрана из одного или обоих из hly и cly; и/или мутацию в одном или более факторах вирулентности, выбранных из *IsyA, pag,prg, iscA, virG , plcuact; u*/илиодну или более мутаций, которые изменяют ответ на стресс, выбрана из числа recA, htrA, htpR, hsp и groEL; и/илимутацию в min, которая разрушает цикл клеток; и/или одну или более мутаций, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, выбранные из cya, crp, phoP/phoQ и ompR.

Штаммы могут представлять собой один или более из msbB -, asd,hilA- и/или флагеллина*(fliCAB)*- и/или pagP -.Терапевтический продукт, такой как варианты иммуностимулирующего белка с функцией усиления, который в немодифицированной форме является частью пути датчика цитозольной ДНК/РНК, что приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN), РНК и иммуностимулирующих белков, таких как хемокины/цитокины, экспрессируются под контролем промотора, распознаваемого хозяином,

такого как промотор RNAPIII или промотор RNAPII, как описано в настоящем документе.

Иммуностимулирующая бактерия может представлять собой штамм*Salmonella, Shigella, E. coli, Bifidobacteriae, Rickettsia, Vibrio, Listeria,Klebsiella, Bordetella, Neisseria, Aeromonas ,Francisella, Cholera,Cotynebacterium, Citrobacter, Chlamydia, Haemophilus, Brucella, Mycobacterium,*

Mycoplasma, Legionella, Rhodococcus, Pseudomonas , Helicobacter, Bacillus, or *Erysipelothrix,*

или его аттенуированный штамм или модифицированный штамм любого из предшествующих перечней штаммов бактерий.Как правило, штамм является аттенуированным в хозяине, либо в виде аттенуированного штамма, либо за счет модификаций, изменяющих его свойства, включая клетки, которые могут инфицировать и его способность реплицироваться в определенных клетках или всех клетках.

Штаммы Salmonella, такие как Styphimurium, являются примерами бактерий. Примеры штаммов включают штаммы Salmonellatyphimurium, полученные из штаммов, обозначенных как AST -100, VNP20009, или штаммы YS1646 (ATCC # 202165), RE88, SL7207, x 8429, x 8431, x 8468, и штамм дикого типа ATCC # 14028.

Предложены композиции, содержащие иммуностимулирующие бактерии. Такие композиции содержат бактерии и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель. Иммуностимулирующие бактерии включают любые описанные в настоящем документе или в патентах/заявках, включенных в данный документ или известных специалистам в данной области. Такие бактерии модифицированы для кодирования варианта иммуностимулирующего белка, являющегося частью сигнального пути, приводящего к экспрессии интерферона типа I.

Белок, такой как белок STING, модифицирован так, что он обладает повышенной активностью и/или приводит к конститутивной экспрессии интерферона типа I, такого как интерферон-a или интерферон-ft. Бактерии также могут кодировать иммуностимулирующий белок, который увеличивает противоопухолевую активность в микроокружении опухоли или в опухоли, такой как цитокин.Геномы бактерий могут быть модифицированы, чтобы иметь повышенную инфективность иммунных клеток, и или пониженную

инфективностьнеиммунных клеток, и/или пониженную способность индуцировать гибель иммунных клеток.

Таким образом, бактерии модифицированы, как описано в настоящем документе, для накопления в опухолях или опухолевых микросредах или опухолевых иммунных клетках, и/или для доставки иммуностимулирующих белков, способствующих противоопухолевой активности.Иммуностимулирующие бактерии могут дополнительно содержать плазмиду, кодирующую РНК, такую как miРНК или shРНК, или кассету CRISPR, которая нацелена на иммунную контрольную точку, или иным образом усиливать противоопухолевую активность бактерий.

Однократная доза является терапевтически эффективной для лечения заболевания или нарушения, в котором лечение вызывает иммунную стимуляцию. Примером такой стимуляции является иммунный ответ, который включает, но не ограничивается этим, один или оба из конкретных:иммунный ответ и неспецифический иммунный ответ, специфические и неспецифические иммунные ответы, врожденный ответ, первичный иммунный ответ, адаптивный иммунитет, вторичный иммунный ответ, иммунный ответ памяти, активацию иммунной клетки, пролиферацию иммунных клеток, дифференцировку иммунных клеток и экспрессию цитокинов.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые являются агонистами cGAS. Примерами таких бактерий являются виды Salmonella, такие как Styphimurium, те один или оба из агониста cGAS и агонист стимулятора генов интерферона (STING). Они могут быть введены, например, в применениях и способах, таких как лучевая терапия и химиотерапия, в которых продуцируется или накапливается цитозольная ДНК.

STING активирует врожденный иммунитет в ответ на обнаружение нуклеиновых кислот в цитозоле.Нисходящую сигнализацию активируют путем связывания циклических динуклеотидов (CDN), которые синтезируются бактериями или с помощью фермента cGAS хозяина в ответ на связывание с цитозольнойдвухцепочечной ДНК (dsДНК). Бактериальные и хозяйские CDN имеют различные фосфатные мостиковые структуры, которые дифференцируют их способность активировать STING. CDN синтезируют бактериями или с помощью фермента хозяина cGAS в ответ на связывание цитозольнойdsДНК. IFN-13 является сигнатурным цитокином активированного STING.

Также предложены модифицированные нечеловеческие белки STING и химеры белков STING, а также средства доставки, включающие любые описанные здесь, включая бактерии, липосомы, экзосомы, миницеллы, наночастицы, векторы, такие как онколитический вирус, фармацевтические композиции, содержащие белки и/или средства доставки, клетки, кодирующие или содержащие эти белки STING, и/или содержащие средства доставки , и их применения и способы лечения раковых заболеваний.Модифицированные нечеловеческие белки STINGи химеры белковSTING, а также средствадоставки, клетки, иммуностимулирующие бактерии, применения, способы и фармацевтические композиции включают, но не ограничиваются ими:

1.Модифицированные нечеловеческие протезные белки, где нечеловеческий белок STING является таким, который имеет более низкую активацию NF-KB, чем белок STING человека, и, возможноно, активность активации/сигнализации интерферона I более высокого типа, по сравнению с белком STING дикого типа (WT). Эти нечеловеческие протезные белки модифицируют так, чтобы они включали мутацию или мутации, так что они обладают повышенной активностью или действуют конститутивно, в отсутствие сигнализации цитозольной нуклеиновой кислоты.

Мутации, как правило, представляют собой аминокислотные мутации, которые происходят в интерферонопатии у людей, таких как описанные выше для человеческого STING. Соответствующие мутации вводят в нечеловеческие белкиSTING, где соответствующие аминокислотные остатки идентифицируют путем выравнивания (см. например. Фигуры 1-13). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления изобретения сайт связывания TRAF6 в С-концевом хвосте (CTT) белка STING удаляют, снижая активность сигнализации NF-KB.

Модифицированные белки STING, в частности белки STING человека, представляют собой химеры, в которых CTT (С-концевая хвостовая) область в белковом белке от одного вида, такого как человек, заменена CTT от белка STING другого вида, не являющегося человеком, который обладает меньшей активностью сигнализации NF-kB и/или активностью сигнализации IFN высшего типа, чем у человека. Кроме того, сайт связывания TRAF6 может удаляться из CTT в этих химерах.

Модифицированные белки STING 2, которые также включают мутации 1.

2. Средства доставки, такие как иммуностимулирующие бактерии, любые предусмотренные в данном документе или известные специалистам в данной области, включая экзосомы, миниселлы, липосомы, наночастицы, онколитические вирусы и другие вирусные векторы, которые кодируют модифицированные белки STING любого из 1-3.

3. Средства доставки, такие как иммуностимулирующие бактерии, любые предусмотренные здесь или известные специалистам в данной области, включая экзосомы, миниселлы, липосомы, наночастицы, онколитические вирусы и другие вирусные векторы, которые кодируют немодифицированные STING из нечеловеческих видов, у которых STING-белок обладает сниженной сигнальной активностью NF-KB по сравнению с активностью STING человека и, возможно, повышенной активностью, стимулирующей/сигнализирующей активность интерферона типа I.

4. Клетки (незиготы, если человек), такие как клетки, используемые для клеточной терапии, такие как Т-клетки и стволовые клетки, и клетки, используемые для получения белков любого из 1-3.

5. Фармацевтические композиции, содержащие белки STING 1-3 или средства доставки 4 и 5, или клетки 6.

6. Применение и способы лечения рака путем введения любого из 1-7, как описано в настоящем документе, для иммуностимулирующих бактерий.

7. Предложены также иммуностимулирующие бактерии, кодирующие нечеловеческие протезные белки STING, в частности любые, которые имеют пониженную активность NF-KB (сигнальную активность) и аналогичную или большую активность, стимулирующую интерферон I типа или стимулирующую интерферон-0 активность по сравнению с человеческим STING.

В настоящем документе описаны анализы и способы для оценки активности NF-KB (сигнальная активность) и интерферона типа I стимулирующая активность или интерферона 0 стимулирующая активность STING, а также известные специалистам в данной области.

Способы включают те, которые описаны, например, в deOlivehraMannetal(2019) CellReports 27: 1165-1175, который описывает, в том числе, интерферон-0 и NF-KB

сигнальную активность STING белков из различных видов, в том числе человека, тем самым идентифицируя белки STING из различных видов, которые имеют более низкую активность NF-KB, чем у человека, и те, которые также имеют сравнимую или более высокую активность интерферона-0, чем у человеческого STING, deOliveiraMannetal(2019) представляет виды выравниваний и идентифицирует домены STING, включая CTT-домен (см. также, SupplementalInformationfordeOliveiraMann*etal.* (2019)).

Нечеловеческиебелки, неограничиваясьими, могутпредставлятьсобой, нонеограничиваютсяими, STING белкиследующихвидов: Tasmanian devil *(Sarcophilus harrisii;* SEQ ID NO:331), marmoset *(Callithrix jacchus;* SEQ ID NO:341), cattle *(Bos taurus;* SEQ ID NO:342), cat *(Fells catus;* SEQ ID NO:338), ostrich *(Struthio camelus australis;* SEQ ID NO:343), crested ibis *(Nipponianippon;* SEQ ID NO:344), coelacanth *(Latimeriachalumnae;* SEQ ID NOs:345-346), boar *(Sus scrofa;* SEQ ID NO:347), bat*(Rousettus aegyptiacus;* SEQ ID NO:348), manatee *(Trichechus manatuslatirostris;* SEQ ID NO:349), ghost shark *(Callorhinchusmilii;* SEQ ID NO:350), mouse *(Mus musculus;* SEQ ID NO:351), and zebrafish *(Danio rerio;* SEQ ID NO:330).

Эти белки STING позвоночных легко активизируют иммунную сигнализацию в клетках человека, что указывает на то, что молекулярный механизм сигнализацииSTING используется у позвоночных 25 (см, deOliveiraMann*etal.* (2019) *CellReports*27:1165-1175).

Также предложены фармацевтические композиции, содержащие любую из иммуностимулирующих бактерий и другие средства доставки, их применение для лечения рака и способы лечения рака. Способы и применения включают лечение субъекта, имеющего рак, включающий введение иммуностимулирующей бактерии или фармацевтической композиции субъекту, такому как человек.Предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение иммуностимулирующей бактерии.

Способы и применения включают комбинированную терапию, в которой вводят второй противораковый агент или лечение. Второй противораковый агент может представлять собой химиотерапевтический агент, который приводит к цитозольной ДНК, или лучевой терапии, или ингибитора иммунной контрольной точки, таких как анти-PD -1, или анти-PD-Ll или анти-CTLA -4 антитело, или CAR-T-клетки или другие

терапевтические клетки, такие как стволовые клетки, TIL-клетки и модифицированные клетки для терапии рака.

Введение может быть любым подходящим способом, таким как парентеральное, и может включать дополнительные агенты, которые могут облегчать или усиливать доставку. Введение может быть перорально или ректально или с помощью аэрозоля в легкое, или внутриротовым, внутривенным, внутримышечным или подкожным. Введение может быть любым подходящим путем, включая системное или местное, такое как парентеральное, включая, например, пероральное или ректальное или аэрозольное введение в легкие, внутриротовое, внутривенное, внутримышечное или подкожное.

Злокачественные опухоли включают солидные опухоли и гематологические злокачественные опухоли, такие как, но не ограничиваясь ими, лимфома, лейкемия, рак желудка и рак молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, колоректума, яичника, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки и печени.

Иммуностимулирующие бактерии могут быть составлены в композиции для введения, такие как суспензии. Они могут быть высушены и сохранены в виде порошков.

Также представлены комбинации иммуностимулирующих бактерий с другими противораковыми агентами.

Предусмотрены комбинированные терапии для лечения злокачественных опухолей и злокачественных новообразований. Иммуностимулирующие бактерии можно вводить до, после, периодически или одновременно с другими раковыми терапиями, включая лучевую терапию, химиотерапию, в частности генотоксическую химиотерапию, которые приводят к цитозольной ДНК, и иммунотерапии, таких как антитела ингибитора контрольной точки, включая антитела против PD -1, антитела против PD-L1 и антитела против CTLA -4, и другие такие иммунотерапии.

Также предложены изолированные клетки, которые содержат иммуностимулирующие бактерии или которые содержат любое из других доставочных средств, таких как экзосомы, липосомы и другие такие средства, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие белки вариантов белков и другие терапевтические продукты, как описано в настоящем документе. Клетки включают, но не ограничиваются ими,

иммунные клетки, стволовые клетки, опухолевые клетки, первичные клеточные линии и другие клетки, используемые в клеточной терапии.Примеры клеток включают, например, гемопоэтические клетки, такие как Т-клетки, и гематопоэтические стволовые клетки. Гемопоэтическая клетка может быть химерной антигенной миелоидной клеткой, такой как макрофаг.

Средства доставки и иммуностимулирующие бактерии могут быть введены в клетки exvivo. Таким образом, например, предложены изолированные клетки, которые содержат иммуностимулирующие бактерии, где: иммуностимулирующая бактерия модифицирована таким образом, что она предпочтительно инфицирует опухоль-резидентные иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он индуцирует меньшую гибель клеток в резидентных иммунных клетках; и клетка представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, клетку из первичной клеточной линии или опухолевую клетку.

Клетки используют в способах клеточной терапии, таких как для лечения раковых заболеваний. Клетки могут быть аллогенными или аутологичными для подлежащего лечению субъекта.

Также предложены способы увеличения колонизации опухолей/опухолевых микроокружений иммуностимулирующими бактериями. Способы включают, например, модификацию генома бактерии для визуализации бактерии flagelin-(fliC-/fljB) и/или pagP -.

Термины и выражения, которые используются, используются в качестве терминов описания без ограничения, и нет намерения в использовании таких терминов и выражений для исключения любых эквивалентов признаков, показанных и описанных или их частей, но признно, что предполагаются различные модификации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 представлено совмещение человеческих белков дикого типа и белков TasmanianSTING.

На Фигуре 2 представлено совмещение белков человека и мартышкиSTING дикого типа.

На Фигуре 3 представлено совмещение белков человеческого и крупного рогатого скота STING дикого типа.

На фигуре 4 представлено совмещение белков человека и кота STING дикого типа.

На Фигуре 5 представлено совмещение белков человеческого и страусиного белка STING дикого типа.

На Фигуре 6 показано совмещение белков дикого типа человеческого дикого типа и хохлатого ибиса.

На Фигуре 7 представлено совмещение белков, человеческих и целакантаSTING дикого типа (SEQIDNO: 345).

Фигура 8 изображает совмещение белков человеческого и данioSTING дикого типа.

На Фигуре 9 представлено совмещение белков человеческого и кабана STING дикого типа.

На фигуре 10 представлено совмещение белков человека и летучей мыши STING дикого типа.

На Фигуре 11 представлено совмещение белков человека и ламантина STING дикого типа.

Фигура 12 изображает совмещение белков человека дикого типа и белков акулы дикого типа.

На Фигуре 13 представлено совмещение белков человеческого и мышиного STING дикого типа.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ

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 техники, к которой относятся изобретение (ия). Все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности GenBank, базы данных, веб-сайты и другие опубликованные материалы, называемые в настоящем описании, если не указано иное, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.В случае, когда имеется множество определений для терминов в данном документе, используются те, которые в этой части преобладают. Если ссылка делается на URL или другой такой идентификатор или адрес, понятно, что такие идентификаторы могут изменяться, и конкретная информация в сети Интернет может поступать и проходить, но эквивалентная информация может быть найдена посредством поиска в сети Интернет. Ссылка на нее свидетельствует о наличии и общедоступном распространении такой информации.

Как используется в настоящем документе, терапевтические бактерии представляют собой бактерии, которые влияют на терапию, такую как рак или противоопухолевая терапия, при введении субъекту, такому как человек.

При использовании в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии представляют собой терапевтические бактерии, которые при введении субъекту накапливаются в иммунизированных тканях и клетках, таких как опухоли, и реплицируются и/или экспрессируют продукты, которые являются иммуностимулирующими или которые приводят к иммуностимуляции.Например, иммуностимулирующие бактерии аттенуированы в хозяине за счет снижения токсичности или патогенности и/или благодаря кодированным продуктам, снижающим токсичность или патогенность, поскольку иммуностимулирующие бактерии не могут реплицироваться и/или экспрессировать продукты (или имеют сниженную репликацию/экспрессию продукта), за исключением, главным образом, в иммунизированных средах.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, модифицированы для кодирования продукта или продуктов или проявляют признак или свойство, которое делает их иммуностимулирующим. Такие продукты, свойства и признаки включают, но не ограничиваются, например, по меньшей мере один из: иммуностимулирующий белок, такой как цитокин или костимулирующая молекула;

ДНК/РНК-датчик или его функциональный вариант (например., STING, MDA5, RIG-I); РНК, такие как siРНК (shРНК и microРНК), CRISPR, те мишени,

разрушающие или запрещающие ген 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 бактерии ауксотрофными для метаболита, который является иммуносупрессорным или который находится в иммуносупрессорном пути, как аденозин.

Как используется в настоящем документе, обозначения штамма VNP20009 (см. например, Международная публикация PCT № WO 99/13053, см. также патент США № 6863894) и YS1646 и 41.2.9 используются взаимозаменяемо и каждый относится к штамму, депонированному в Американской коллекции типовых культур и выделенному регистрационному номеру № 202165. VNP20009 представляет собой модифицированный аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium, содержащий делеции в msbB и purl, и был получен из штамма дикого типа ATCC 14028.

При использовании в настоящем документе используются обозначения YS1456 и 8.7 взаимозаменяемо и каждый относится к штамму, депонированному в Американской коллекции типовых культур и выделенному регистрационному номеру № 202164 (см. патент США № 6863894).

При использовании в настоящем документе интерферонопатия относится к нарушению, связанному с повышающей регуляцией интерферона за счет мутации в генном продукте, вовлеченном в путь, который регулирует или индуцирует экспрессию интерферона. Активность продуктов обычно регулируется медиатором, таким как цитозольная ДНК или РНК или нуклеотиды; при мутации активность конститутивная.

ИнтерферонопатииI типа включают спектр состояний, в том числе тяжелые формы синдрома Aicardi-Goutieres (AGS) и FamilialChilblainLupus (FCL). Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие мутированные продукты с этими свойствами, могут быть получены invitro, например, путем выбора для мутаций, которые приводят к усилению функции в продукте, по сравнению с продуктом, который имеет нормальную активность или имеет дополнительную функцию усиления по сравнению со с заболеваниями, описанными в настоящем документе.

При использовании в настоящем документе мутация с функцией усиления представляет собой мутацию, которая повышает активность белка по сравнению с тем же белком, который не имеет мутации. Например, если белок представляет собой рецептор, он будет иметь повышенную аффинность к лиганду; если он является ферментом, он будет обладать повышенной активностью, включая конститутивную активность.

При использовании в настоящем документе начало репликации представляет собой последовательность ДНК, в которой репликация инициируется на хромосоме, плазмиде или вирусе. Для малой ДНК, включая бактериальные плазмиды и малые вирусы, достаточно одного начала.

Начало репликации определяет число копий вектора, которое зависит от выбранного начала репликации. Например, если вектор экспрессии получен из плазмиды pBR322 с низким числом копий, то он находится между приблизительно 25-50 копий/клетку и, если получен из плазмиды pUC с высоким числом копий, он может составлять 150-200 копий/клетку.

При использовании в настоящем документе среднее число копий плазмиды в клетках составляет примерно 150 или менее 150, низкое число копий 15-30, такое как 20 или менее 20. Низкое до среднего число копий среды составляет менее 150. Высокое число копий составляет более 150 копий/клетку.

Как используется в настоящем документе, пептиды 2A являются 18-22 аминокислотными вируснымиолигопептидами, которые опосредуют расщепление полипептидов при трансляции в эукариотических клетках. Обозначение "2A" относится к конкретной области вирусного генома и к различным вирусам 2, которые, как правило, были названы после того, как вирус был получен. Примерами таких являются F2A (вирус ящура 2A), E2A (лошадиный ринит), P2A (яичовирус свиной -1 2A) и T2A (Thoseaasigavirus 2A). (См. например, Liuetal. (2017) ScientificReports 7: 2193, фиг 1, для кодирования последовательностей; см. также SEQIDNO: 367-370).

При использовании в настоящем документе CpG-звено представляет собой набор оснований, которые включают неметилированный центральный CpG ("p" относится к фосфодиэфирной связи между последовательными C и G нуклеотидами), окруженными по меньшей мере одной базовой фланкирующей (на 3'и 5'стороне) центральной CpG. ОлигодезоксинуклеотидCpG представляет собой

олигодезоксинуклеотид, который имеет длину по меньшей мере приблизительно десяти нуклеотидов и включает неметилированныйCpG. По меньшей мере, С 5'CG 3'является неметилированным.

В настоящем документе связывающая последовательность RIG-I относится к структуре 5'трифосфата (5'ppp) непосредственно, или которая синтезирована РНК polIII из последовательности поли (dA-dT), которая посредством взаимодействия с RIG-I может активировать IFN типа I через путь RIG-I. РНК включает по меньшей мере четыре рибонуклеотида (A-A-A-A); она может содержать 4,5,6, 7,8,9, 10 или более. Последовательность связывания RIG-I вводится в плазмиду в бактерии для транскрипции в полиА.

При использовании в настоящем документе термин "цитокины" представляет собой широкую и свободную категорию малых белков (-5-20 кДа), которые важны для сигнализации в клетках. Цитокины включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухоли. Цитокины представляют собой клеточные сигнальные молекулы, способствующие связи в иммунных ответах, и стимулируют движение клеток к очагам воспаления, инфекции и травмы.

Как используется в настоящем документе, такие хемокины относятся к хемоаттрактантам (хемотаксическим) цитокинам, которые связываются с хемокиновыми рецепторами и включают белки, выделенные из природных источников, а также полученные синтетически, как рекомбинантным способом, или химическим синтезом.

Примеры хемокинов включают, но не ограничиваются ими,IL-8, IL-10, GCP-2, GRO-a, GRO-0, GRO-y, ENA-78, PBP, CTAPIII, NAP-2, LAPF-4, MIG (CXCL9), CXCL10, CXCL11, PF4, IP-10, SDF-la, SDF-10, SDF-2, MCP-1, MCP-2, MCP-3,

MCP-4, MCP-5,(CCL3), MIP-10 (CCL4), MIP-1y, MIP-2, MIP-2a, MIP-3a, MIP-4, MIP-5, MDC, HCC-1, ALP, лунгкин, Tim-1, эотаксин-1, эотаксин-2, I-309, SCYA17, TRAC, RANTES (CCLS), DC-CK-1, лимфотактин, ифракталкин, и другие, известные специалистам. Хемокины вовлечены в миграцию иммунных клеток в очаги воспаления, а также при созревании иммунных клеток и при формировании адаптивных иммунных ответов.

В настоящем документе "иммуностимулирующий белок" представляет собой белок, который проявляет или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли. Примерами таких белков являются цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, такие как, но не ограничиваются ими,GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36 гамма, IFNa, IFNP, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15/IL-15Rкомплекс альфа цепи, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCLS, молекулы, вовлеченные в потенциальное рекрутирование/персистенцию Т-клеток, CD40, CD40-лиганда (CD40L), 0X40, 0X40-лиганда (OX40L), 4-IBB, 4-IBB-лиганда (4-1BBL), членов семейства B7-CD28 и членов суперсемействаTNFR.

При использовании в настоящем документе, путь датчика цитозольной ДНК/РНК является таким, который инициируется присутствием ДНК, РНК, нуклеотидов, динуклеотидов, циклических нуклеотидов и/или циклических динуклеотидов или других молекул нуклеиновой кислоты, что приводит к получению интерферона типа I. Молекулы нуклеиновой кислоты в цитозоле происходят из вирусного или бактериального или излучения или другого такого воздействия, приводящего к активации иммунного ответа у хозяина.

В настоящем документе иммуностимулирующий белок, который индуцирует врожденный иммунный ответ, такой как индукция интерферона типа I, представляет собой белок, который является частью цитокинового пути ДНК/РНК датчика, что приводит к экспрессии медиатора иммунного ответа, такого как интерферон типа I.Например, как описано в настоящем документе, и известно специалистам в данной области техники, цитозольная ДНК воспринимается cGAS, приводя к получению cGAMP и последующей STING (Стимулятор генов интерферона)/TBK1 (ТАНК-связывающая киназа 1)/IRF3 (фактор регуляторного интерферона), и продукции IFN типа I.

Бактериальные циклические динуклеотиды (CDN, такие как бактериальная циклическая di-AMP) также активируют STING. Таким образом, STING представляет собой иммуностимулирующий белок, который индуцирует интерферон I типа. 5 '- трифосфат РНК и двухцепочечная РНК считываются RIG -1 и либо MDA -5, либо MDA -5/LGP2.

Это приводит к полимеризации митохондриального MAVS (митохондриального антивирусного-сигнального белка), а также активирует TBK1 и IRF3. Белки в таких путях являются иммуностимулирующими белками, которые приводят к экспрессии медиаторов врожденного иммунного ответа, таких как интерферон типа I.

Иммуностимулирующие белки в сигнальных путях ДНК/РНК могут быть модифицированы таким образом, чтобы они обладали повышенной активностью или действовали конститутивно, в отсутствие цитозольной нуклеиновой кислоты, чтобы привести к иммунной реакции, такой как экспрессия интерферона типа I.

При использовании в настоящем документе термин "карбоксиконцевой хвост" или "С-концевой хвост" (CTT) врожденного иммунного белка относится к С-концевой части белка STING, который, в белке STING дикого типа, привязан к домену связывания cGAMP гибкой линкерной областью. CTT включает сайт связывания IRF3, сайт связывания TBK1 и сайт связывания TRAF6.STING способствует индуцированию продукции интерферона бета (IFN-beta) посредством фосфорилирования С-концевого хвоста белка STING (CTT) с помощью TANK-связывающей киназы 1 (TBK1). Взаимодействие между STING и TBK1 опосредуется эволюционно консервативным растяжением восьми аминокислотных остатков в карбоксиконцевом хвосте (CTT) STING.

TRAF6 катализирует образование связанных с К63 убиквитин-цепочек на STING, приводящи[к активации транскрипционного фактора NF-KB и индукции альтернативной STING-зависимой программы экспрессии генов.
Делеция сайта связывания TRAF6 в CTT может уменьшить активацию сигнализации NF-KB. Замещение CTT человека (или его частей) на CTT (или его соответствующей частью) от STING видов с низкой активацией NF-KB может снижать активацию NF-KB посредством STING человека. STING CTT представляет собой неструктурированный участок ~ 40 аминокислот, который содержит звенья последовательности, необходимые для фосфорилированияSTING и рекрутинга IRF3 (см. deOliveiraMann*etal.* (2019) *CellReports 27:1165-1175).* В качестве первичного сайта фосфорилирования TBK1, который является частью звена LxIS, совместно используемого среди врожденных иммунных адаптерных белков, которые активируют сигнализацию инрерферона (см.deOliveiraMann*etal.* (2019) *CellReports 27:1165-1175).*CTT человека содержит второе звено PxPLOR, которое включает в себя остаток L374, который необходим для связывания TBK1; последовательности LxIS и PxPLR являются консервативными среди аллелей STING позвоночных (см. deOliveiraMann*etal.* (2019) *CellReports 27:1165-1175).* Типовые STINGTCT-последовательности и сайты связывания IRF3, TBK1 и TRAF6 представлены в следующей таблице:

Вид	С-концевая хвостовая	SEQ ID	IRF3 сайт	TBK1 сайт	TRAF6 сайт
человек	EKEEVT VG SLKT SAVP ST	352	PELLIS	PLPLRT	DFS
тасманск	RQEEFAIGPKRAMTVTTS	353	PQLLIS	PLSLRT	DGF
Мартышк	EEEEVTVGSLKTSEVP ST	354	PELLIS	PLPLRS	DLF
Крупный	EREVTMGSTETSVMPGSS	355	PELLIS	PLPLRS	DVF
Кот	EREVTVGSVGTSMVRNPS	356	PNLLIS	PLPLRT	DVF
Страус	RQEEYTVCDGTLCSTDLS	357	LSLQIS	PQPLR	DCL
Кабан	EREVTMGSAETSVVPTS	358	PELLIS	PLPLRS	DIF
Летучая	EKEEVTVGTVGTYEAPGS	359	PELLIS	PLPLRT	DIF
Ламантин	EREEVTVGSVGTSVVP SP S SP S TS SLSQEPKLLIS	360	PKLLIS	PLPLRT	DVF
Хохлатый	CHEEYTVYEGNQPHNP	361	LNLQIS	PQPLR	DCF
Целакант	QKEEYFMSEQTQPNSSSTS	362	PQLMIS	PHTL	QVC
Целакант	QKEEYFMSEQTQPNSSSTS	363	PQLMIS	PHTLK	GF

Данио	DGEIFMDPTNEVHPVPEE GPV	364	PTLMFS	PQSLRS	EPVETTDY
Акула	LTEYPVAEPSNANETDCM	365	PHLMIS	PKPLRS	YCP
Мышь	EKEEVTMNAPMTSVAPPP	366	PRLLIS	PLPLRT	DLI

При использовании в настоящем документе бактерия, которая модифицирована таким образом, что она приводит к меньшей гибели клеток в резидентных иммунных клетках, является менее токсичной, чем бактерия без модификации, или такой, которая обладает сниженной вирулентностью по сравнению с бактерией без модификации. Примерами таких модификаций являются те, которые исключают пироптоз и которые изменяют профили ЛПС на бактерии.Эти модификации включают нарушение или делецию генов флагеллина, один или более компонентов пути SPI -1, такие как HiIA, стержневой белок, игольчатый белок, QseC и pagP.

Как используется в настоящем документе, бактерия, которая модифицирована таким образом, что она предпочтительно инфицирует опухоль-резидентные иммунные клетки, имеет модификацию в его геноме, что снижает ее способность инфицировать клетки, отличные от иммунных клеток. Примерами таких модификаций являются модификации, которые нарушают систему секреции 3 типа или систему секреции 4 типа или другие гены или системы, которые влияют на способность бактерии проникать в неиммунную клетку.Например, разрушение/удаление компонента SPI -1, которое необходимо для инфицирования клеток, таких как эпителиальные клетки, но не влияет на инфицирование иммунных клеток, таких как фагоцитарные клетки, посредством Salmonella.

В настоящем документе термин "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 техники, например, с использованием методов рекомбинантной ДНК.

При использовании в настоящем документе модификация в бактериальном геноме или плазмиде или гене включает делеции, замены и вставки нуклеиновой кислоты.

При использовании в настоящем документе РНК-интерференция представляет собой биологический процесс, в котором молекулы РНК ингибируют экспрессию или трансляцию генов, нейтрализуя нацеленные молекулы мРНК для ингибирования трансляции и, таким образом, экспрессии целевого гена.

При использовании в настоящем документе молекулы РНК, которые действуют через РНК, называют ингибированием за счет сайленсинга экспрессии целевого гена. Экспрессия сайленсинга означает, что экспрессия целевого гена снижается или подавляется или ингибируется.

Как используется в настоящем документе, подавление экспрессии генов посредством РНК является указанным для ингибирования, подавления, нарушения или молчания экспрессии целевого гена. Целевой ген содержит последовательности нуклеотидов, которые соответствуют последовательностям в ингибирующей РНК, в результате чего ингибирующая РНК подавляет экспрессию мРНК.Небольшие интерферирующие РНК (siРНК) представляют собой небольшие фрагменты двухцепочечных (ds) РНК, обычно около 21 нуклеотидов, с 3'- нависающими (2 нуклеотидами) на каждом конце, которые могут быть использованы для "интерферирования" с трансляцией белков посредством связывания с и способствуя деградации мессенджера РНК (мРНК) на специфических последовательностях.

При этом siРНК предотвращают продуцирование специфических белков на основе нуклеотидных последовательностей их соответствующих мРНК. Процесс называется РНК-интерференцией , а также упоминается как подавление siРНК или нокдаун siРНК. Короткая шпилечная РНК или малая шпилечная РНК (shРНК) представляет собой искусственную молекулу РНК с герметичным шпилечным поворотом, которая может быть использована для молчания экспрессии гена-мишени посредством РНК-интерференции.Экспрессия shРНК в клетках обычно осуществляется путем доставки плазмид или через вирусные или бактериальные векторы.

Как используется в настоящем документе, ингибирование, подавление, разрушение или сайленсинг целевого гена относится к процессам, которые изменяют экспрессию, такую как трансляция целевого гена, посредством чего снижается активность или экспрессия продукта, кодируемого целевым геном. Снижение включает полное выключение или частичное нокаутирование, посредством чего, со ссылкой на иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные в данном документе, и введение, осуществляют обработку.

При использовании в настоящем документе опухолевая микросреда (TME) 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).Существуют условия, которые включают, но не ограничиваются ими, повышенную васкуляризацию, гипоксию, низкий pH, повышенную концентрацию лактата, повышенную концентрацию пирувата, повышенное внутритканевое давление текучей среды и измененные метаболиты или метаболизм, такие как более высокие уровни аденозина, указывающие на опухоль.

При использовании в настоящем документе интерфероны I типа человека (IFN) представляют собой подгруппу белков интерферона, которые регулируют активность иммунной системы. Все IFN типа I связываются с конкретным рецепторным комплексом клеточной поверхности, таким как IFN-рецептор. Интерфероны типа I включают IFN-a и IFN-beta, среди прочих. Белки IFN-beta продуцируются фибробластами и обладают противовирусной активностью, которая вовлечена главным образом в врожденный иммунный ответ. Два вида IFN-beta являются IFN-betaI (INFBI) и IFN-beta 3 (INFB3).

При использовании в настоящем документе перечисление , что нуклеиновая кислота или кодированная РНК-мишени представляет собой ген, означает, что он ингибирует или подавляет или подавляет экспрессию гена любым механизмом. Обычно такая нуклеиновая кислота включает по меньшей мере часть, комплементарную целевому гену, где часть является достаточной для образования гибрида с комплементарной частью.

При использовании в настоящем документе термин "делеция" относится к делеции одного или более нуклеотидов или аминокислот по сравнению с последовательностью, такой как целевой полинуклеотид или полипептид или последовательность нативного или дикого типа.

При использовании в настоящем документе термин "вставка", если относится к нуклеиновой кислоте или аминокислотной последовательности, описывает включение одного или более дополнительных нуклеотидов или аминокислот в пределах целевого, нативного, дикого типа или другой соответствующей последовательности. Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит одну или более

вставок по сравнению с последовательностью дикого типа, содержит один или более дополнительных нуклеотидов в пределах линейной длины последовательности.

При использовании в настоящем документе другие добавки, относящиеся к нуклеиновой кислоте и аминокислотным последовательностям, описывают добавление нуклеотидов или аминокислот на оба конца по сравнению с другой последовательностью.

В настоящем документе термин "замена" или "замена" относится к замене одного или более нуклеотидов или аминокислот в нативной, мишени, дикого типа или другой последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида с альтернативным нуклеотидом или аминокислотой, без изменения длины (как описано в числах остатков) молекулы. Таким образом, одна или более замен в молекуле не изменяет количество аминокислотных остатков или нуклеотидов молекулы.Аминокислотные замены по сравнению с конкретным полипептидом могут быть выражены в терминах количества аминокислотного остатка по длине полипептидной последовательности.

Как используется в настоящем документе, в положении, соответствующем положению или перечислению, что нуклеотиды или аминокислотные положения могут соответствовать нуклеотидам или аминокислотным позициям в раскрытой последовательности, такой как изложенная в перечне последовательностей, относится к нуклеотидам или аминокислотным позициям, идентифицированным при сравнивании с раскрытой последовательностью для максимизации идентичности с использованием стандартного алгоритма сравнивания, такого как алгоритм GAP. Путем сравнивания последовательностей специалист в данной области может идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве направляющих.

В общем, для идентификации соответствующих положений последовательности аминокислот сравнены таким образом, что получают соответствие наивысшего порядка (см, напр., *ComputationalMolecularBiology,* 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., и 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. и

Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; и Carrillo *et al.* (1988) *SIAMJAppliedMath*48:1073).

При использовании (сравнении) в настоящем документе выравнивание (сравнение)последовательности относится к применению гомологии для выравнивания (сравнения) двух или более последовательностей нуклеотидов или аминокислот. Обычно совмещают две или более последовательности, которые связаны на 50% или более идентичности. Выровненный набор последовательностей относится к 2 или более последовательностям, которые выровнены в соответствующих положениях и могут включать в себя выравнивающие последовательности, полученные из РНК, таких как EST и другие кДНК, выровненные с геномной ДНК последовательностью.

Связанные или вариантные полипептиды или молекулы нуклеиновой кислоты могут быть выровнены любым способом, известным специалистам в данной области. Такие способы, как правило, включают в себя способы, такие как использование ручных выравниваний и использование многочисленных доступных для выравнивания программ (например, BLASTP) и других, известных специалистам в данной области техники. Путем выравнивания последовательностей полипептидов или нуклеиновых кислот специалист в данной области может идентифицировать аналогичные участки или положения, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве направляющих.

Кроме того, специалист в данной области также может использовать консервативные аминокислотные или нуклеотидные остатки в качестве направляющих для нахождения соответствующих аминокислотных или нуклеотидных остатков между и среди человеческих и нечеловеческих последовательностей.Соответствующие положения также могут быть основаны на структурном выравнивании, например, с использованием компьютерных моделируемых выравниваний белковой структуры.

В других случаях могут быть идентифицированы соответствующие области. Специалист в данной области также может использовать консервативные аминокислотные остатки в качестве направляющих для нахождения соответствующих аминокислотных остатков между человеческими и нечеловеческими последовательностями.

Используемый в настоящем документе термин "свойство" полипептида, такого как антитело, относится к любому свойству, проявляемому полипептидом, включая, но не ограничиваясь этим, специфичность связывания, структурную конфигурацию или конформацию, стабильность белка, устойчивость к протеолизу, конформационную устойчивость, термотолерантность и толерантность к условиям pH. Изменения свойств могут изменять селективную активность полипептида. Например, изменение связывающей специфичности полипептида антитела может изменять способность связывать антиген и/или различные связывающие активности, такие как аффинность или авидность, или активность invivo полипептида.

Используемый в настоящем документе термин "ингибирующая активность" или "функциональная активность" полипептида, такого как антитело, относится к любой активности, проявляемой полипептидом. Такие действия могут быть определены эмпирически. Примеры активностей включают, но не ограничиваются ими, способность взаимодействовать с биомолекулой, например, посредством связывания антигена, связывания ДНК, связывания лиганда, или димеризации, или ферментативную активность, например, активностькиназы или протеолитическую активность.

Для антитела (включая фрагменты антител) активности включают, но не ограничиваются ими, способность специфически связываться с конкретным антигеном, аффинность связывания антигена (например. высокая или низкая аффинность), авидность связывания антигена (например, высокая или низкая авидность), эффекторные функции, такие как способность стимулировать нейтрализацию или просвет антигена, нейтрализацию вируса и активность invivo, такие как способность предотвращать инфицирование или инвазию патогена или для обеспечения клиренса, или для проникновения в конкретную ткань или текучую среду или клетку в теле.

Активность может быть оценена invitro или invivo с использованием распознанных анализов, таких как ELISA, проточная цитометрия, поверхностный плазмонный резонанс или эквивалентные анализы для измерения включения или выключения, иммуногистохимию и иммунофлюоресцентную гистологию и микроскопию, анализы на клеточной основе, проточную цитометрию и анализы связывания (например, анализы панорамирования).

При использовании в настоящем документе термин "связанный" или его грамматические вариации относится к участию молекулы в любом притягивающем взаимодействии с другой молекулой, что приводит к стабильной ассоциации, в которой две молекулы находятся в непосредственной близости друг к другу.

Связывание включает, но не ограничивается ими, нековалентные связи, ковалентные связи (такие как обратимые и необратимые ковалентные связи), и включает взаимодействия между молекулами, такими как, но не ограничиваясь ими, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды и небольшие молекулы, такие как химические соединения, включая лекарственные средства.

В настоящем документе термин "антитело" относится к иммуноглобулинам и фрагментам иммуноглобулина, независимо от того, является ли он природным или частично или полностью синтетическим, такой как рекомбинантно продуцируемый, включая любой его фрагмент, содержащий, по меньшей мере, часть вариабельной тяжелой цепи и легкую область молекулы иммуноглобулина, которая является достаточной для образования антигенсвязывающего участка и, при сборке, для специфического связывания антигена.Таким образом, антитело включает любой белок, имеющий связывающий домен, который является гомологичным или по существу гомологичным антигенсвязывающему домену иммуноглобулина (сайт объединения антитела).

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 представлять собой полноразмерную тяжелую цепь иммуноглобулина или ее часть, достаточную для образования антигенсвязывающего участка (например.тяжелые цепи включают, но не ограничиваются ими, цепи VH, цепи VH-CH1 и цепи VH-CH1-CH2-CH3), и каждая легкая цепь может представлять собой полноразмерную легкую цепь или ее часть, достаточную для образования антигенсвязывающего участка (например, легкие цепи включают, но не ограничиваются ими, цепи VL и цепи VL-CL). Каждая из пар тяжелой цепи (H и H') имеет одну легкую цепь (L и L' соответственно).Обычно антитела минимально включают все или по меньшей мере часть вариабельной тяжелой (VH) цепи и/или вариабельной легкой (VL) цепи. Антитело также может включать всю или часть константной области.

Для целей настоящего изобретения термин "антитело" включает полноразмерные антитела и их части, включающие фрагменты антител, такие как анти-EGFR фрагменты антител. Фрагменты антител включают, но не ограничиваются ими, Fab-фрагменты, Fab'- фрагменты, F (ab') $_2$ фрагменты Fv, фрагменты Fv, дисульфид-связанный Fvs (dsFv), фрагменты Fd, одноцепочечныеFvs (scFv), одноцепочечные Fabs (scFab), диатела, анти-идиотипические (анти-id) антитела или антигенсвязывающие фрагменты любого из указанных выше.

Антитело также включает синтетические антитела, рекомбинантно продуцируемые антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие антитела, нечеловеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и интратела.

Антитела, предложенные в настоящем документе, включают элементы любого класса иммуноглобулинов (например, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY), любой подкласс (например, IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, IgAl и IgA2) или подподкласс (например, IgG2a и IgG2b).

В настоящем документе термин "нуклеиновая кислота" относится к по меньшей мере двум сцепленным нуклеотидам или производным нуклеотидов, включая дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК), соединенные вместе, как правило, фосфодиэфирными связями. Также в термин "нуклеиновая кислота" включены аналоги нуклеиновых кислот, такие как пептидная нуклеиновая кислота (PNA), фосфоротиоатная ДНК, и другие такие аналоги и производные или их комбинации.

Нуклеиновые кислоты также включают ДНК и производные РНК, содержащие, например, нуклеотидный аналог или "основную" связь, отличную от фосфодиэфирной связи, например фосфотриэфирную связь, фосфорамидатную связь, фосфоротиоатную связь, тиоэфирную связь или пептидную связь (пептидную нуклеиновую кислоту). Термин также включает в качестве эквивалентов производные, варианты и аналоги любой РНК или ДНК из нуклеотидных аналогов, одиночных (смысловых или антисмысловых) и двухцепочечных нуклеиновых кислот. Дезоксирибонуклеотиды включают дезоксиаденозин, дезоксицитидин, дезоксигуанозин и дезокситимидин.

Для РНК основание урацила является уридином.

При использовании в настоящем документе выделенная молекула нуклеиновой кислоты является такой, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. "Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может быть по существу свободна от другого клеточного материала или культуральной среды при продуцировании рекомбинантными методами, или по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе.Иллюстративные выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, предложенные в настоящем документе, включают выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело или антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящем документе термин "функционально связанный" со ссылкой на последовательности нуклеиновой кислоты, области, элементы или домены означает, что области нуклеиновых кислот функционально связаны друг с другом. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая лидерный пептид, может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, где нуклеиновые кислоты могут транскрибироваться и транслироваться для экспрессии функционального слитого белка, при этом лидерный пептид осуществляет 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 в качестве единственного транскрипта мРНК, но трансляция транскрипта мРНК может привести к экспрессии одного из двух экспрессируемых полипептидов. Например, стоп-кодон может быть расположен между нуклеиновой кислотой, кодирующей первый полипептид, и кодированием нуклеиновой кислоты второго полипептида, так что при введении в клетку-подавитель полученный единичный транскрипт мРНК может транслироваться для получения либо слитого белка, содержащего первый и второй полипептиды, либо может транслироваться 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.

В настоящем документе термин "синтетический" относится к молекуле нуклеиновой кислоты или молекуле полипептида, которая получена рекомбинантными способами и/или методами химического синтеза.

При использовании в настоящем документе остатки встречающихся в природе а-аминокислот представляют собой остатки тех 20 а-аминокислот, встречающихся в природе, которые включены в белок посредством специфического распознавания молекулы заряженной тРНК с его родственным кодоном мРНК у людей.

В настоящем документе термин "полипептид" относится к двум или более аминокислотам, ковалентно связанным. Термины "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо в данном документе.

В настоящем документе термин "пептид" относится к полипептиду, который имеет длину от 2 до приблизительно 40 аминокислот.

В настоящем документе аминокислота представляет собой органическое соединение, содержащее аминогруппу и группу карбоновой кислоты. Полипептид содержит две или более аминокислот. Для целей настоящего изобретения аминокислоты, содержащиеся в антителах, включают двадцать встречающиеся в природе аминокислот (см. таблицу ниже), неприродные аминокислоты и аналоги аминокислот (например, аминокислоты, в которых а-углерод имеет боковую цепь).

При использовании в настоящем документе аминокислоты, которые встречаются в различных аминокислотных последовательностях полипептидов, появляющихся в данном документе, идентифицируются в соответствии с их хорошо известными, трехбуквенными или однобуквенными аббревиатурами (см. таблицу ниже). Нуклеотиды, которые встречаются в различных молекулах и фрагментах нуклеиновой кислоты, обозначены стандартными однобуквенными обозначениями, используемыми в данной области техники.

В настоящем документе термин "аминокислотный остаток" относится к аминокислоте, образующейся при химическом расщеплении (гидролизе) полипептида на его пептидных связях. Аминокислотные остатки, описанные в настоящем документе, как правило, находятся в L-изомерной форме.

Остатки в D-изомерной форме могут быть заменены на любой L-аминокислотный остаток, при условии, что желательное функциональное свойство сохраняется полипептидом.

NH_2 относится к свободной аминогруппе, присутствующей на аминоконце полипептида. COOH относится к свободной карбоксигруппе, присутствующей на карбоксильном конце полипептида.

В соответствии со стандартной номенклатурой полипептидов, описанной в JBiol. Chem, 243: 3557-59 (1968) и принятой при 37 CFR § § 1.821-1.822, аббревиатуры для аминокислотных остатков показаны в следующей таблице:

Таблица соответствия

СИМВОЛ		
1-буквенный	**3-буквенный**	**Аминокислота**
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
P	Pro	Пролин
K	Lys	Лизин
H	His	Гистидин
Q	Gln	Глутамин
E	Glu	Глутамовая кислота
Z	Glx	Глутамовая кислотаи/или
W	Trp	Триптофан
R	Arg	Аргинин
D	Asp	Аспарагиновая кислота
N	Asn	Аспарагин
B	Asx	Аспарагиновая кислота и/иди
C	Cys	Цистеин
X	Xaa	Неизвестные или другие

Все последовательности аминокислотных остатков, представленных в настоящем документе по формуле, имеют левостороннюю ориентацию в традиционном

направлении аминоконца к карбоксильному концу. Фраза "аминокислотный остаток" включает аминокислоты, перечисленные в приведенной выше таблице соответствия, модифицированные, неприродные и необычные аминокислоты.Черта в начале или конце аминокислотной последовательности остатка указывает пептидную связь с дополнительной последовательностью одного или более аминокислотных остатков или с аминоконцевой группой, такой как NH2 или с карбоксильной концевой группой, такой как COOH.

В пептиде или белке подходящие консервативные замены аминокислот известны специалистам в данной области и обычно могут быть выполнены без изменения биологической активности полученной молекулы. Специалисты в данной области техники признают, что, в общем, одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида по существу не изменяют биологическую активность (см. например, Watsonetal. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, the Benjamin/Cumings Pub. Co, p 224).

Такие замены, такие как в описанных и предусмотренных в настоящем документе мутациях с функцией усиления, могут быть выполнены в соответствии с примерными заменами, изложенными в следующей таблице:

Примерыконсервативныхзаменаминокислот

Первоначаль	**Пример**
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)	Tip; Phe

Val (V)	Ile; Leu

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

Как используется в настоящем документе, встречающиеся в природе аминокислоты могут относиться к 20 L-аминокислотам, которые встречаются в полипептидах.
В настоящем документе термин "неприродная аминокислота" относится к органическому соединению, которое имеет структуру, подобную природной аминокислоте, но модифицировано структурно для имитации структуры и реакционной способности природной аминокислоты.
Таким образом, не встречающиеся в природе 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), b-аланин/f3-аминопропионовую кислоту (Bala), 2-аминомасляную кислоту (Abu), 4-аминомасляную кислоту/пиперидиновую кислоту (4Abu), 6-аминокапроновую кислоту (Acp), 2-аминогептановую кислоту (Ahe), 2-аминоизомасляную кислоту (Aib), 3-аминоизомасляную кислоту (Baib), 2-аминопимелиновую кислоту (Apm),
2,4-диаминомасляную кислоту (Dbu), десмозин (Des), 2,2'- диаминопимелиновую кислоту (Dpm), 2,3-диаминопропионовую кислоту (Dpr), N-этилглицин (EtGly), N-этиласпарагин (EtAsn), гидроксилизин (Hyl), алло-гидроксилизин (Ahyl), 3-гидроксипролин (3Hyp), 4-гидроксипролин (4Hyp), изодесмозин (Ide), алло-изолейцин (Aile), N-метилглицин, саркозин (MeGly), N-метилизолейцин (Melle), 6-N-метиллизин (MeLys), N-метилвалин (MeVal), норвалин (Nva), норлейцин (Nle) и орнитин (Orn).

При использовании в настоящем документе конструкция ДНК представляет собой одноцепочечную или двухцепочечную, линейную или кольцевую молекулу ДНК, которая содержит сегменты ДНК, объединенные и наложенные способом, не найденным в природе. Конструкции ДНК существуют в результате действий человека и включают клоны и другие копии произведенных молекул.

При использовании в настоящем документе сегмент ДНК является частью большей молекулы ДНК, имеющей заданные атрибуты. Например, сегмент ДНК, кодирующий указанный полипептид, является частью более длинной молекулы ДНК, такой как плазмида или фрагмент плазмиды, который при считывании с 5' в 3' направлении кодирует последовательность аминокислот указанного полипептида.

В настоящем документе термин "полинуклеотид" означает одноцепочечный или двухцепочечный полимер дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидных оснований, считанных с 5'- конца на 3'- конец. Полинуклеотиды включают РНК и ДНК и могут быть выделены из природных источников, синтезированных invitro, или получены из комбинации природных и синтетических молекул. Длина молекулы полинуклеотида приведена в настоящем документе в терминах нуклеотидов (сокращенно nt) или пар оснований (сокращенно bp).

Термин "нуклеотиды" используют для одноцепочечных и двухцепочечных молекул, где контекст позволяет. Когда термин применяется к двухцепочечным молекулам, он используется для обозначения общей длины и будет пониматься как эквивалентный термину пары оснований. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что две цепи двухцепочечногополинуклеотида могут немного отличаться по длине и что их концы могут быть разупорядочены; таким образом, все нуклеотиды в молекуле двухцепочечногополинуклеотида не могут быть спаренными. Такие неспаренные концы обычно не превышают 20 нуклеотидов в длину.

При использовании в настоящем документе получение рекомбинантными способами относится к применению хорошо известных методов молекулярной биологии для экспрессии белков, кодируемых клонированной ДНК.

В настоящем документе термин "гетерологичная нуклеиновая кислота" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует продукты (те РНК и/или белки), которые обычно не продуцируются invivo клеткой, в которой она экспрессируется, или нуклеиновая кислота, которая находится в локусе, в котором она обычно не встречается, или которая опосредует или кодирует медиаторы, которые изменяют экспрессию эндогенной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, путем воздействия на транскрипцию, трансляцию или другие регулятивные биохимические процессы. Гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, также называется чужеродной нуклеиновой кислотой.

Любая нуклеиновая кислота, такая как ДНК, что специалист в данной области техники распознает или рассматривает как гетерологичная или чужеродная к клетке, в которой она экспрессируется, здесь охватывается гетерологичной нуклеиновой кислотой; гетерологичная нуклеиновая кислота включает экзогенно добавленную нуклеиновую кислоту, которая также экспрессируется эндогенно.Гетерологичная нуклеиновая кислота, как правило, не является эндогенной для клетки, в которую она введена, но была получена из другой клетки или получена синтетически или вводится в геномный локус, в котором она не встречается естественным образом, или ее экспрессия находится под контролем регуляторных последовательностей или последовательности, которая отличается от естественной регуляторной последовательности или последовательностей.

Примеры гетерологичной нуклеиновой кислоты в данном документе включают, но не ограничиваются ими, нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок в пути сенсора ДНК/РНК или его вариант с функцией усиления, или иммуностимулирующий белок, такой как цитокин, который придает или вносит вклад в противоопухолевый иммунитет в микроокружении опухоли.

В иммуностимулирующих бактериях гетерологичная нуклеиновая кислота, как правило, кодируется в введенной плазмиде, но она может быть введена в геном бактерии, такой как промотор, который изменяет экспрессию бактериального продукта.

Гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, включает нуклеиновую кислоту, которая может, некоторым образом, опосредовать экспрессию ДНК, которая кодирует терапевтический продукт, или может кодировать продукт, такой как пептид или РНК, который некоторым образом опосредует, прямо или косвенно, экспрессию терапевтического продукта.

При использовании в настоящем документе клеточная терапия включает доставку клеток субъекту для лечения заболевания или состояния. Клетки, которые могут быть аллогенными или аутологичными, модифицированы exvivo, такие как инфицирование клеток иммуностимулирующими бактериями, предусмотренными в данном документе, так что они доставляются или экспрессируют продукты при введении субъекту.

При использовании в настоящем документе генетическая терапия включает перенос гетерологичной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, в определенные клетки, такие как клетки-мишени, млекопитающего, в частности человека, с нарушением или состоянием, для которого необходима такая терапия. Нуклеиновая кислота, такая как ДНК, вводится в выбранные клетки-мишени таким образом, что гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, экспрессируется, и вырабатывается терапевтический продукт (продукты).Генетическая терапия также может быть использована для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей генный продукт, который заменяет дефектный ген или дополняет генный продукт, продуцируемый млекопитающим или клеткой, в которой он вводится. Введенная нуклеиновая кислота может кодировать терапевтическое соединение, такое как фактор роста или его ингибитор, или фактор некроза опухоли или его ингибитор, такой как их рецептор, который обычно не получен в хозяине млекопитающего или не продуцируется в терапевтически эффективных количествах или в терапевтически полезном времени.

Гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, кодирующая терапевтический продукт, может быть модифицирована перед введением в клетки пораженного хозяина для усиления или иного изменения продукта или его экспрессии. Генетическая терапия может также включать доставку ингибитора или репрессора или другого модулятора генной экспрессии.

В настоящем документе термин "экспрессия" относится к процессу, с помощью которого полипептиды продуцируются транскрипцией и трансляцией полинуклеотидов. Уровень экспрессии полипептида может быть оценен с использованием любого способа, известного в данной области техники, включая, например, способы определения количества полипептида, полученного из клетки-хозяина.Такие способы могут включать, но не ограничиваются ими, количественное определение полипептида в клеточном лизате с помощью ELISA, окрашивания Кумасси синего после гель-электрофореза, анализа белка по Lowry и анализа белка по Bradford.

Используемый в настоящем документе термин "клетка-хозяин" представляет собой клетку, которая используется для приема, поддержания, воспроизведения и/или усиления вектора. Клетка-хозяин также может быть использована для экспрессии полипептида, кодируемого вектором. Нуклеиновая кислота, содержащаяся в векторе, реплицируется, когда клетка-хозяин делится, тем самым усиливая нуклеиновые

кислоты. При использовании в настоящем документе вектор представляет собой реплицируемую нуклеиновую кислоту, из которой один или несколько гетерологичных белков могут экспрессироваться, когда вектор преобразуется в соответствующую клетку-хозяина. Ссылка на вектор включает те векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид или его фрагмент, как правило, путем ограничения дайджеста и лигирования.

Ссылка на вектор также включает те векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, такой как модифицированное антитело против EGFR.Вектор используют для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в клетку-хозяина для амплификации нуклеиновой кислоты или для экспрессии/отображения полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. Векторы, как правило, остаются эписомальными, но могут быть сконструированы для осуществления интеграции гена или его части в хромосому генома. Также рассмотрены векторы, представляющие собой искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы дрожжей и искусственные хромосомы млекопитающих. Выбор и использование таких носителей хорошо известны специалистам в данной области техники. Векторы также включают вирусные векторы и виральные векторы. Виральные векторы представляют собой сконструированные вирусы, которые функционально связаны с экзогенными генами для передачи (в качестве носителей) экзогенных генов в клетки.

В настоящем документе термин "вектор экспрессии" включает векторы, способные экспрессировать ДНК, функционально связанные с регуляторными последовательностями, такими как промоторные области, которые способны осуществлять экспрессию таких фрагментов ДНК. Такие дополнительные сегменты могут включать в себя последовательности промотора и терминатора и могут включать в себя один или более источников репликации, один или более селектируемых маркеров, усилитель, сигнал полиаденилирования и т.п.

Векторы экспрессии, как правило, получены из плазмиды или вирусной ДНК, или могут содержать элементы обоих. Таким образом, экспрессионный вектор относится к рекомбинантной ДНК или РНК-конструкции, такой как плазмида, фаг, рекомбинантный вирус или другой вектор, который при введении в соответствующую клетку-хозяина приводит к экспрессии клонированной ДНК.Соответствующие экспрессионные векторы хорошо известны специалистам в данной области и

включают те, которые реплицируются в эукариотических клетках и/или прокариотических клетках, и те, которые остаются эписомными или теми, которые интегрируются в геном клетки-хозяина.

В настоящем документе термин "первичная последовательность" относится к последовательности аминокислотных остатков в полипептиде или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты.

При использовании в настоящем документе термин "идентичность последовательностей" относится к количеству одинаковых или подобных аминокислот или нуклеотидных оснований в сравнении между тестируемым и эталонным поли-пептидом или полинуклеотидом. Идентичность последовательностей может быть определена с помощью выравнивания последовательности последовательностей нуклеиновой кислоты или белка для идентификации областей сходства или идентичности.

Для целей в настоящем документе идентичность последовательностей обычно определяют по выравниванию для идентификации идентичных остатков. Выравнивание может быть локальным или глобальным. Рассогласованности и зазоры могут быть идентифицированы между сравниваемыми последовательностями. Зазоры представляют собой нулевые аминокислоты или нуклеотиды, вставленные между остатками выровненных последовательностей таким образом, что одинаковые или аналогичные символы совмещены. Как правило, могут быть внутренние и концевые зазоры.

При использовании зазоров можно определить идентичность последовательности без учета торцевых зазоров (например. концевые пробелы не расставлены). Альтернативно, идентичность последовательности может быть определена без учета зазоров как числа идентичных положений/длины полной выровненной последовательности x 100.

При использовании в настоящем документе термин "глобальное выравнивание" представляет собой выравнивание, которое выравнивает две последовательности от начала до конца, выравнивая (сравнивая) каждую букву в каждой последовательности только один раз. Получают выравнивание независимо от того, имеется или нет сходство или идентичность между последовательностями. Например, 50% идентичности последовательности на основе глобального совмещения означает, что

при выравнивании полной последовательности двух сравниваемых последовательностей каждый из 100 нуклеотидов в длину, 50% остатков одинаковы.

Понятно, что глобальное выравнивание также может быть использовано при определении идентичности последовательностей, даже когда длина выровненных последовательностей не является одинаковой. Различия в терминальных концах последовательностей учитываются при определении идентичности последовательности, пока не будет выбрано отсутствие учета концевых зазоров. В целом, глобальное выравнивание используется на последовательностях, которые имеют значительное сходство по большей части их длины.

Примерные алгоритмы для выполнения глобального выравнивания включают в себя алгоритм Needleman-Wunsch (Needlemanetal. (1970) JMol. Biol. 48: 443). Примерные программы для выполнения глобального выравнивания являются общедоступными и включают в себя инструмент совмещения глобальной последовательности, доступный в NationalCenterforBiotechnologyInformation (NCBI) web-сайт (ncbi.nlm.nih.gov /), и программу, доступную на deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

При использовании в настоящем документе термин "локальное выравнивание" представляет собой выравнивание, которое выравнивает две последовательности, но только выравнивает те части последовательностей, которые имеют сходство или идентичность.

Следовательно, локальное выравнивание определяет, присутствуют ли подсегменты одной последовательности в другой последовательности. Локальные алгоритмы выравнивания включают в себя алгоритм BLAST или Smith-Waterman*(Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)).

Например, 50% идентичности последовательности на основе локального выравнивания, означает, что при выравнивании полной последовательности двух сравниваемых последовательностей любой длины область сходства или идентичность 100 нуклеотидов в длину имеет 50% остатков, которые одинаковы в области сходства или идентичности.

Для целей в настоящем документе идентичность последовательностей может быть определена стандартными программами алгоритма выравнивания, используемыми

каждым поставщиком. Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать в себя: (1) матрицу сравнения(содержащую значение 1 для идентичности и 0 для неидентичности) и взвешенную матрицу сравнения

Gribskov*et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 6745,какописаноSchwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure,* National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979);

(2) Вклад 3,0 для каждого зазора и дополнительный 0,10 вклад для каждого символа в каждом зазоре; и (3) отсутствие вклада для торцевых зазоров.Независимо от того, имеют ли какие-либо две молекулы нуклеиновой кислоты нуклеотидные последовательности или любые два полипептида, аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% "идентичны," или другие подобные вариации, перечисляющие процентную идентичность, могут быть определены с использованием известных компьютерных алгоритмов на основе локального или глобального выравнивания*(см.напр.,* wikipedia.org/wiki/Sequence предоставляющие ссылки на десятки известных и общедоступных баз данных выравнивания и программ). В общем случае, для целей настоящего документа, идентичность последовательностей определяется с использованием компьютерных алгоритмов на основе глобального выравнивания, такого как инструмент для выравнивания глобальной последовательности Needleman-WunschGlobalSequenceAlignmenttoolдоступного изNCBUBLAST(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PageTYPE=BlastHome); LAlign (WilliamPearsonimplementingtheHuangandMilleralgorithm*(Adv. Appl. Math.* (1991) 12:337-357)); и программы отXiaoquiHuangдоступной в deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

При этом, как правило, полноразмерная последовательность каждого из сравниваемых полипептидов или нуклеотидов выровнена по всей длине каждой последовательности при глобальном выравнивании. Локальное выравнивание также может быть использовано, когда сравниваемые последовательности имеют по существу одинаковую длину.

Таким образом, при использовании в настоящем документе термин "идентичность" представляет собой сравнение или выравнивание между тестируемым и эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В одном неограничивающем примере по меньшей мере 90% идентичности означает от 90 до 100% относительно эталонного полипептида или полинуклеотида.

Идентичность на уровне 90% или более указывает на тот факт, что, предполагая, что в иллюстративных целях тестируемый и эталонный полипептид или полинуклеотидная с длиной 100 аминокислот или нуклеотидов сравниваются, не более 10% (те 10 из 100) аминокислот или нуклеотидов в тестируемом полипептиде или полинуклеотиде отличаются от эталонного полипептида. Аналогичные сравнения могут быть выполнены между исследуемым и эталонным полинуклеотидами.

Такие различия могут быть представлены как точечные мутации, случайным образом распределенные по всей длине аминокислотной последовательности, или они могут быть кластеры в одном или более местоположениях переменной длины вплоть до максимально допустимой, например, 10/100 аминокислот (приблизительно 90% идентичности). Различия также могут быть обусловлены делециями или отсечениями аминокислотных остатков. Различия определяются как замены нуклеиновых кислот или аминокислот, инсерции или делеции.

В зависимости от длины сравниваемых последовательностей, на уровне гомологии или идентичностей выше примерно 85-90%, результат может быть независимым от набора параметров программы и зазора; такие высокие уровни идентичности могут быть легко оценены, часто не полагаясь на программное обеспечение.

При использовании в настоящем документе термин "заболевание или нарушение" относится к патологическому состоянию организма, возникающему в результате причины или состояния, включая, но не ограничиваясь этим, инфекции, приобретенные условия и генетические условия, и которые характеризуется идентифицируемыми симптомами.

При использовании в настоящем документе термин "лечение" субъекта с заболеванием или состоянием означает, что симптомы субъекта частично или полностью облегчаются или остаются статическими после обработки.

При использовании в настоящем документе лечение относится к любым эффектам, которые облегчают симптомы заболевания или расстройства. Лечение включает профилактику, терапию.

Изобретение также охватывает любое фармацевтическое применение любой иммуностимулирующей бактерии или композиции, предусмотренной в данном документе.

В настоящем документе профилактика относится к профилактике потенциального заболевания и/или предупреждения ухудшения симптомов или прогрессирования заболевания.

В настоящем документе термин "профилактика" или профилактика и их грамматически эквивалентные формы относится к способам, в которых снижается риск или вероятность развития заболевания или состояния.

В настоящем документе термин "фармацевтически эффективное средство" включает любой терапевтический агент или биологически активные агенты, включая, но не ограничиваясь ими, анестетики, вазоконстрикторы, диспергирующие агенты и обычные терапевтические лекарственные средства, включая низкомолекулярные лекарственные средства и терапевтические белки.

Используемый в настоящем документе термин "терапевтический эффект" означает эффект, полученный в результате лечения субъекта, который изменяет, как правило, улучшает или облегчает симптомы заболевания или состояния, или купирует заболевание или состояние.

В настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, которое, по меньшей мере, достаточно для получения терапевтического эффекта после введения субъекту. Следовательно, это количество, необходимое для профилактики, лечения, облегчения, купирования или частичного купирования симптома заболевания или расстройства.

В настоящем документе термин "терапевтическая эффективность" относится к способности агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, для получения терапевтического эффекта у субъекта, которому был введен агент, соединение, материал или композиция, содержащая соединение.

В контексте настоящего документа профилактически эффективное количество или "профилактически эффективная доза" относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, которое при введении субъекту будет иметь предполагаемый профилактический эффект, например, предотвращения или задержки начала, или повторного возникновения, заболевания или симптомов, снижения вероятности возникновения, или повторного возникновения, заболевания или симптомов, или снижения частоты возникновения вирусной инфекции.Полный профилактический эффект не обязательно происходит путем введения одной дозы и может происходить только после введения серии доз. Таким образом, профилактически эффективное количество можно вводить в одном или нескольких введениях.

При использовании в настоящем документе облегчение симптомов конкретного заболевания или расстройства посредством лечения, такого как введение фармацевтической композиции или другого терапевтического средства, относится к любому уменьшению, постоянному или временному, затяжному или переходному, симптомов, которые могут быть приписаны или связаны с введением композиции или терапевтического средства.

В настоящем документе термин "противораковое средство" относится к любому средству, которое является разрушающим или токсичным для злокачественных клеток и тканей. Например, противораковые агенты включают агенты, которые уничтожают раковые клетки или иным образом ингибируют рост опухолей или раковых клеток. Примерами противораковых агентов являются химиотерапевтические агенты.

Используемый здесь термин "терапевтическая активность" относится к активности invivo терапевтического полипептида. Как правило, терапевтическая активность представляет собой активность, которая связана с лечением заболевания или состояния.

Используемый здесь термин "субъект" относится к животному, в том числе млекопитающему, такому как человек.

Как используется в настоящем документе, пациент относится к субъекту-человеку.

Как используется в настоящем документе, животное включает любое животное, такое как, но не ограничиваясь этим, приматы, включая людей, гориллы и обезьяны; грызуны, такие как мыши и крысы; куры; жвачные животные, такие как козы, коровы, олени и овцы; и свиньи и другие животные. Нечеловеческие животные исключают человека в качестве предполагаемого животного. Полипептиды, предложенные в настоящем документе, относятся к любому источнику, животному, растению, прокариотическому и грибковому. Большинство полипептидов имеют животное происхождение, в том числе из млекопитающих.

В настоящем документе термин "композиция" относится к любой смеси. Может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водная, неводная или любая их комбинация.

В настоящем документе термин "комбинация" относится к любой ассоциации между двумя или более элементами. Комбинация может быть двумя или более отдельными элементами, такими как две композиции или две совокупности, их смесь, такая как единая смесь двух или более элементов, или любое их изменение. Элементы комбинации, как правило, функционально связаны или связаны.

При использовании в настоящем документе комбинированная терапия относится к введению двух или более различных терапевтических средств. Различные терапевтические агенты могут быть обеспечены и вводиться по отдельности, последовательно, прерывисто или могут быть обеспечены в одной композиции.

В настоящем документе набор представляет собой упакованную комбинацию, которая может включать другие элементы, такие как дополнительные реагенты и инструкции для использования комбинации или их элементы, в том числе, но не ограничиваясь этим, активацию, введение, диагностику и оценку биологической активности или свойства.

Используемый в настоящем документе термин "форма дозы" относится к физически дискретным единицам, подходящим для людей и животных и упакованным по отдельности, как известно в данной области техники.

В настоящем документе термин "единичная лекарственная форма" относится к композиции для непосредственного введения.

При использовании в настоящем документе многодозовый состав относится к композиции, которая содержит множество доз терапевтического агента и которая может быть непосредственно введена для обеспечения нескольких единичных доз терапевтического агента. Дозы можно вводить в течение минут, часов, недель, дней или месяцев. Многодозовые составы могут обеспечить возможность регулирования дозы, объединения дозы и/или разделения дозы.Поскольку многодозовые составы используются во времени, они обычно содержат один или более консервантов для предотвращения микробного роста.

Как используется в настоящем документе, промышленное изделие для изготовления представляет собой изделие, которое выполнено и продается. Используемый в настоящей заявке термин предназначен для охвата любых композиций, представленных в настоящем документе, содержащихся в изделиях упаковки.

В настоящем документе термин "текучая среда" относится к любой композиции, которая может течь. Жидкости, таким образом, охватывают композиции, которые находятся в форме полутвердых веществ, паст, растворов, водных смесей, гелей, лосьонов, кремов и других таких композиций.

В настоящем документе выделенный или очищенный полипептид или белок (например, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) или его биологически активная часть (например, выделенный антигенсвязывающий фрагмент), по существу, не содержит клеточного материала или других загрязняющих белков из клетки или ткани, из которой получают белок, или по существу свободен от химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе.

Препараты могут быть определены как по существу свободные, если они являются свободными от легко обнаруживаемых примесей, как определено стандартными методами анализа, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), используемая специалистами в данной области техники для оценки такой чистоты, или достаточно чистой так, что дальнейшая очистка не обнаружит возможности изменения физико-химических свойств, таких как ферментативная и биологическая активность вещества.

Способы очистки соединений с получением по существу химически чистых соединений известны специалистам в данной области. Однако химически чистое соединение может представлять собой смесь стереоизомеров. В таких случаях дополнительная очистка может увеличить удельную активность соединения.

В настоящем документе термин "клеточный экстракт" или "лизат" относится к препарату или фракции, которая выполнена из лизированной или разрушенной клетки.

Используемый в настоящем документе термин "контрольный образец" относится к образцу, который по существу идентичен испытательному образцу, за исключением того, что он не обрабатывается тестовым параметром, или, если он представляет собой образец плазмы, он может быть от нормального добровольца, не подверженного влиянию интересующего состояния.

Контроль также может быть внутренним контролем.

При использовании в настоящем документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, 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, чтобы ссылаться только на альтернативы или альтернативы являются взаимоисключающими.

При использовании в настоящем документе диапазоны и количества могут быть выражены в зависимости от конкретного значения или диапазона. Они также включают в себя точное количество. Следовательно, приблизительно 5 аминокислот относятся к приблизительно 5 аминокислотам, а также к 5 аминокислотам.

При использовании в настоящем документе термин "необязательное" или "необязательно" означает, что впоследствии описанное событие или обстоятельство происходит или не происходит, и что описание включает в себя случаи, где указанное событие или обстоятельство происходит и случаи, когда оно не происходит.

При использовании в настоящем документе аббревиатуры для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, если не указано иное, используют в

соответствии с их общим использованием, аббревиатурой или IUPAC-IUBCommissiononBiochemicalNomenclature (see, *Biochem. (1972)* 11(9):1726-1732).

Для ясности описания, а не в качестве ограничения, подробное описание разделено на подсекции, которые следуют далее.

B. ОБЗОР ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Предложены модифицированные бактерии, называемые иммуностимулирующими бактериями в данном документе, которые накапливаются и/или реплицируются в опухолях и кодируют ингибирующие РНК, такие как сконструированные shРНК и сконструированные microРНК, которые нацелены на гены-мишени, ингибирование, подавление или подавление сайленсинга вызывает противоопухолевую терапию, при экспрессии РНК в обрабатываемом субъекте. Штаммы бактерий для модификации являются любыми подходящими для терапевтического применения. Модифицированные иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, предназначены для применения и для способов лечения рака. Бактерии модифицируют для таких применений и способов.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, модифицируют делецией или модификацией бактериальных генов для ослабления их воспалительных реакций и модифицируют для усиления противоопухолевых иммунных ответов в хозяевах, обработанных бактериями. Например, плазмиды, кодирующие терапевтические, такие как противоопухолевые, продукты в хозяине, включены в бактерии, и бактерии могут быть ауксотрофными для аденозина.

Ослабление воспалительной реакции на бактерии может быть осуществлено делецией гена msbB, снижающего TNF-alpha в клетке-хозяине, и/или выбивания флагеллиновых генов. Бактерии модифицируют для стимуляции противоопухолевой активности хозяина, например, путем добавления плазмид, кодирующих иммуностимулирующие белки, белки STING, вариантные белки STING и белки, которые нацелены на иммунные контрольные точки хозяина, и путем добавления нуклеиновой кислоты с CpG.

Бактериальные штаммы могут представлять собой аттенуированные штаммы или штаммы, которые аттенуированы стандартными способами или такие, что благодаря модификациям, предоставленным в настоящем документе, аттенуированы в том, что

их способность колонизироваться ограничена, главным образом, иммуногенными тканями и органами, в частности иммунными и опухолевыми клетками, в том числе солидными опухолями.Для целей настоящего изобретения бактерии не обязательно ослаблены по себе, а скорее содержат модификацию (ы), такие как геномные модификации, которые ограничивают или изменяют клетки, инфицированные бактериями. Бактерии включают, но не ограничиваются ими, штаммы *Salmonella, Shigella, Listeria, E. coli, uBifidobacteriae.* Например,онивключают*Shigella sonnei, Shigella flexneri, Shigella dysenteriae, Listeriamonocytogenes, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Salmonella gallinarum,* and *Salmonella enteritidis.* Другиеподходящиебактериивключают*Rickettsia, Klebsiella, Bordetella, Neisseria, Aeromonas, Francisella, Corynebacterium, Citrobacter, Chlamydia, Haernophilus, Brucella, Mycobacterium, Mycoplasma, Legionella, Rhodococcus , Pseudomonas, Helicobacter, Vibrio, Bacillus, uErysipelothrix.* Например,*Rickettsia rickettsiae, Rickettsia prowazekii, Rickettsiatsutsugamuchi, Rickettsia mooseri, Rickettsia sibirica, Bordetella bronchiseptica, Neisseria meningitidis , Neisseria gonorrhoeae, Aeromonas eucrenophila, Aeromonassalmonicida, Francisellatularensis, Corynebacterium pseudotuberculosis,Citrobacterfreundii, Chlamydia pneumoniae, Haemophilussomnus , Brucella abortus , Mycobacterium intracellulare, Legionella pneumophila, Rhodococcusequi, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter mustelae, Vibrio cholerae, Bacillus subtilis, Erysipelothrixrhusiopathiae, Yersinia enterocolitica, Rochalimaeaquintana,* and *Agrobacterium tumerfacium.*

Бактерии накапливаются за счет одного или более свойств, включая, диффузию, миграцию и хемотаксис на иммунопривелигированные ткани или органы или среды, среды, которые обеспечивают питательные вещества или другие молекулы, для которых они являются ауксотрофными и/или средами, которые содержат реплицирующиеся клетки, которые обеспечивают среды для входа и репликации бактерий. Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, и виды, влияющие на такую терапию, включают виды Salmonella, Listeria и E.Coli. Бактерии содержат плазмиды, которые кодируют терапевтический продукт или продукты, экспрессируемые под контролем эукариотического промотора, такого как РНК-полимераза (RNAP) II или III промотор. Как правило, RNAPIII (также упоминаемый как промотор POLITE) являются конститутивными, и RNAPII (также упоминаемый как POLII)могут регулироваться. В тех случаях, когда множество продуктов кодируются,

экспрессия каждого из них может находиться под контролем различных промоторов.

Среди бактерий, представленных в настоящем документе, имеются бактерии, которые модифицированы таким образом, что они являются ауксотрофными для аденозина. Это может быть достигнуто путем модификации или делеции генов, участвующих в синтезе пуринов, метаболизме или транспорте. Например, разрушение гена tsx в разновидностях Salmonella, таких как Salmonellatyphi, приводит к аденозиновойауксотрофии.Аденозин является иммуносупрессорным и накапливается до высоких концентраций в опухолях; ауксотропность для аденозина улучшает противоопухолевую активность бактерий, поскольку бактерии избирательно реплицируются в тканях, богатых аденозином.

Также предложены бактерии, которые модифицированы таким образом, что они имеют дефектный ген asd. Эти бактерии для применения invivo модифицируют так, чтобы включать в себя несущий функциональный asd ген на введенной плазмиде; это поддерживает выбор для плазмиды таким образом, что не требуется система обслуживания/отбора плазмиды на основе антибиотика. Также предложено применение asd-дефектных штаммов, не содержащих функциональный ген asd на плазмиде, и, таким образом, они сконструированы таким образом, чтобы быть автолизными в клетке-хозяине.

Также предложены бактерии, которые модифицированы таким образом, что они не способны продуцировать флагеллы. Это может быть достигнуто путем модификации бактерий путем удаления генов, кодирующих флагеллиновые субъединицы. Модифицированные бактерии, не имеющие флагеллина, являются менее воспалительными и, следовательно, лучше переносятся и индуцируют более мощный противоопухолевый ответ.

Также предложены бактерии, которые модифицированы для получения листерилизина О, что улучшает доставку плазмиды в фагоцитарных клетках.

Также предложены бактерии, модифицированные для переноса низкокопийнойCpG-содержащей плазмиды. Плазмида дополнительно может включать другие модификации.

Бактерии также могут быть модифицированы для роста таким образом, чтобы бактерии, если они являются видами Salmonella, экспрессировали менее токсичный SPI -1 ген. В Salmonella гены, ответственные за вирулентность, инвазию, выживаемость и дополнительный кишечный разброс, расположены в островках патогенности патогенности (SPI).

Бактерии могут быть дополнительно модифицированы для других желательных признаков, в том числе для выбора плазмидного обслуживания, в частности для селекции 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. Примеры бактерий для модификации, как описано в настоящем документе, представляют собой сконструированные штаммы Salmonellatyphimurium, такие как штамм YS1646 (ATCCCatalog # 202165; см. также публикацию Международной заявки PCT № WO 99/13053, также называемый VNP20009), который сконструирован плазмидами для дополнения нокаута гена asd и сохранения свободной от антибиотика плазмиды.

Предложены модифицированные иммуностимулирующие бактериальные штаммы, которые являются ауксотрофными для аденозина, а также фармацевтические композиции, содержащие такие штаммы, предназначенные для введения субъекту, такому как человек, для применения в способах лечения опухолей и раковых заболеваний.

Сконструированные в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии содержат множество синергетических модальностей для индукции иммунной повторной активации холодных опухолей и для стимуляции опухолеспецифических иммунных ответов, ингибирующих опухолеспецифические иммунные ответы, при ингибировании путей иммунной контрольной точки.

Улучшенное нацеливание на опухоль через аденозиновуюауксотрофию и повышенное разрушение сосудов приводит к улучшенной потенции, локализуя воспаление для ограничения системного цитокинового воздействия и аутоиммунных токсичностей, наблюдаемых с другими способами иммунотерапии. Примерами таких

бактерий являются штаммы Styphimurium, включая такие модификации штамма YS1646, в частности asd-штаммы, и штаммов дикого типа.

C. ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА

Иммуносупрессивная среда, находящаяся в микроокружении опухоли (TME), представляет собой драйвер инициации и прогрессирования опухоли. Раковые заболевания выходят за пределы иммунной системы, не поддаются контролю и содержат опухоли. Множество опухолеспецифичных механизмов создают опухолевые среды, в которых иммунная система вынуждена переносить опухоли и их клетки вместо их устранения. Целью иммунотерапии рака является восстановление естественной способности иммунной системы к устранению опухолей.

1. Иммунотерапия

Проводят поиск нескольких клинических методов иммунотерапии рака в отношении противоопухолевого иммунитета против противоопухолевого иммунитета. Стратегии стимулировать иммунитет путем непосредственного введения цитокинов, таких как IL -2 и IFN-a, приводила к умеренным клиническим ответам у неосновных у пациентов, при этом наблюдались серьезные системные воспалительные токсичности (Sharmaetal. (2011) Nat. Rev. Cancer 11: 805-812).

Иммунная система вызвала несколько дисбалансов для ограничения аутоиммунитета, таких как повышающая регуляция запрограммированного белка гибели клеток 1 (PD - 1) на Т-клетках и связывание его с его родственным лигандом, запрограммированный лиганд 1 гибели (PD-L1), который экспрессируется как на антигенпрезентирующих клетках (АПК), так и опухолевых клетках.

Связывание PD-L1 с PD -1 интерферирует с $CD8^+$ Т клеточных сигнальных путей, ухудшающих пролиферацию и эффекторную функцию $CD8^+$ Т-клетки и индуцирует толерантность Т-клеток. PD -1 и PD-L1 являются двумя примерами многочисленных ингибирующих "иммунных контрольных точек", которые функционируют путем понижающей регуляции иммунных ответов.

Другие ингибирующие иммунные контрольные точки включают цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA -4), сигнальный регуляторный белок а (SIRPa), V-домен Ig-супрессор активации Т-клеток (VISTA),

запрограммированный лиганд 2 смерти (PD-L2), индоламин 2,3-диоксигеназу (IDO) 1 и 2, ген активации лимфоцитов 3 (LAG3), галектин -9, Т-клеточный иммунорецептор с Ig и ITIM доменами (TIGIT), иммуноглобулин Т-клеток и муцин-домен (TIM -3, также известный как клеточный рецептор вируса гепатита А 2 (HAVCR2)), медиатор входа герпесвируса (HVM), CD39, CD73, B7-H3 (также известный как CD276), B7-H4,CD47, CD48, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD155, CD160, CD244 (2B4), B-andT-лимфоцитов аттенюатор (BTLA, илиCD272) и раково-эмбриональную антигенную молекулу адгезии 1 (CEACAMI, или CD66a).

Антитела, предназначенные для блокирования иммунных контрольных точек, таких как анти-PD -1 (например, пембролизумаб, ниволумаб) и анти-PD-Ll (например, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб), обладают успехом в предотвращении развития Т-клеток и нарушения иммунной толерантности. Только часть обработанных пациентов демонстрирует клиническое преимущество, и те, которые часто присутствуют с аутоиммунными анатоксинами (см. например, Ribas (2015) *N. Engl. JMed.* 373:1490-1492; Topalian*etal.* (2012) *N. Engl. IMed.* 366:2443-2454) Это является дополнительным доказательством потребности в терапиях, представленных в данном документе, которые являются более эффективными и менее токсичными.

Другая стратегия блокады контрольной точки ингибирует индукцию CTLA -4 на Т-клетках, при этом связываются и ингибируются костимулирующие рецепторы на АПК, таких как CD80 или CD86, из-конкурирующей состимулирующей кластерной дифференциации 28 (CD28), которая связывает те же рецепторы, но с более низкой аффинностью. 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) обладала клиническим успехом и долговечностью у некоторых пациентов, в то же время проявляя еще более высокую частоту возникновения тяжелых связанных с иммунной системой неблагоприятных событий

(см., например, Hodi*etal.* (2010) N. *Engl. J. Med.* 363:711-723; Schadendorf*et al.* (2015) *JClin. Oncol.* 33:1889-1894).

Было показано, что опухоли разрабатывают устойчивость к антителам против иммунной контрольной точки, что подчеркивает необходимость в более длительных противораковых терапиях, таких как те, которые приведены в настоящем документе.

2. Адоптивная иммунотерапия

При стремлении реактивировать холодную опухоль, чтобы стать более иммуногенными, класс иммунотерапии, известный как адоптивная клеточная терапия (АСТ), охватывает множество стратегий для связывания иммунных клеток и перепрограммирования их для получения противоопухолевой активности (Zielinski*etal.* (2011) *Immunol. Rev.* 240:40-51).

На основе дендритных клеток вводят генетически сконструированные дендритные клетки (ДК) с более иммуностимулирующими свойствами.Эти терапии не были успешными, поскольку они не разрушают иммунную толерантность к раку (см. например, Rosenbergetal. (2004) Nat. Med. 12: 1279).

Способ, использующий целые облученные опухолевые клетки, содержащие эндогенные опухолевые антигены и гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), для стимуляции рекрутинга DC, известного как GVMAX, аналогично оказался неудачным в клинике из-за отсутствия способности к нарушению толерантности к опухоли (Copier*etal.* (2010) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12:14-20). Отдельная аутологичная терапия на основе клеток, Sipuleuel-T (Provenge), была одобрена FDA в 2010 году для кастрационно-устойчивого рака предстательной железы. Она использует АПК, извлеченные из пациента, и повторно использованную для экспрессии антигена фосфатазы предстательной железы (PAP) для стимуляции ответа Т-клеток, затем повторно вводят после лимфоабляции.

К сожалению, его более широкое применение ограничено низкими наблюдаемыми объективными скоростями реакции и высокими затратами, и использование ограничено только ранними стадиями рака предстательной железы (Anassietal (2011) PT 36 (4): 197-202). Аналогично, в аутологичных Т-клеточных терапиях (АТС) собирают собственные Т-клетки пациента и

реактивируют их exvivo для преодоления толерантности к опухоли, затем повторно вводят их пациенту после лимфоабляции. АТС имеют ограниченный клинический успех, и только в меланоме, при создании серьезных проблем безопасности и осуществимости, которые ограничивают их полезность (Yeeetal. (2013) Clin. CancerRes 19: 4550-4552).

При терапии химерными антигенными рецепторами Т-клеток (CAR-T) Т-клетки, собранные у пациентов, были подвергнуты повторному конструированию для экспрессии слитого белка между Т-клеточным рецептором и антителом Ig вариабельного внеклеточного домена. Это придает им антиген-распознающие свойства антител с цитолитическими свойствами активированных Т-клеток (Sadelin (2015) Clin. Invest. 125: 3392-400).

Успех был ограничен В-клетками и кроветворными злокачественными новообразованиями, при наличии не связанных с иммунной системой неблагоприятных событий (Jacksonetal. (2016) Nat. Rev. Clin. Oncol. 13: 370-383).

Опухоли также могут мутировать и избегают узнавания с распознаванием антигеном-мишенью, включая CD 19 (Ruellaetal. (2016) Comput Struct Biotechnol J 14: 357-362) иEGFRvIII (O'Rourke et al. (2017) Sci Transl Med. Jul 19; 9 (399): eaaa0984), тем самым улучшая иммунитет. В то время как CAR-T терапии одобрены в контексте гематологических злокачественных новообразований, они встречают значительные трудности для осуществимости лечения солидных опухолей при преодолении высокоиммуносупрессорной природы микроокружения твердой опухоли. Для потенциального обеспечения осуществимости терапии против солидных опухолей необходимы ряд дополнительных модификаций существующих терапий CAR-T(Kakarla, *etal.* (2014) *CancerJ.* Mar-Apr; 20(2):151-155).

3. Раковые вакцины и онколитические вирусы.

Холодные опухоли с отсутствием инфильтрации Т-клеток и дендритных клеток (DC) не являются Т-клеточно-воспаленными (Sharmaetal (2017) Cell 9; 168 (4): 707-723).

При стремлении реактивировать холодовую опухоль чтобы она стала более иммуногенной, другой класс иммунотерапевтических

микроорганизмовнеобходим, которые могут накапливаться в опухолях, либо природных, либо созданных. Они включают вирусы, предназначенные для стимуляции иммунной системы, чтобы экспрессировать опухолевые антигены, активируя, тем самым, и перепрограммируя иммунную систему для отбраковки опухоли.

Раковые вакцины на основе вирусов оказались неудачными клинически для ряда факторов, включая уже существующий или приобретенный иммунитет к самому вирусному вектору, а также из-за отсутствия достаточной иммуногенности к экспрессированным опухолевым антигенам (Laroccaetal.(2011) *CancerJ.* 17(5):359-371).

Отсутствие надлежащей адъювантной активации АПК также затрудняет применение других невирусных векторных раковых вакцин, таких как ДНК-вакцины.Онколитические вирусы предпочтительно реплицируются при делении опухолевых клеток над здоровой тканью, после чего последующий лизис опухолевых клеток приводит к иммуногенной гибели опухолевых клеток и последующей вирусной диссеминации.

Онколитический вирус Talimogenelaherparepvec (T-VEC), который использует модифицированный вирус простого герпеса в сочетании с цитокином GM-CSF, рекрутирующим DC, является одобренным FDA для метастатической меланомы (Bastinetal. (2016) Biomedines 4 (3): 21).

Несмотря на то, что демонстрируется клиническое преимущество у некоторых пациентов с меланомой, и при меньшем количестве иммунных токсичностей, чем при других иммунотерапиях, его эффективность была ограничена; существует отсутствие дистальной эффективности опухоли и расширение области применения к другим типам опухолей. Другие вакцины на основе онколитического вируса (OV), такие как те, которые используют парамиксовирус, реовирус и пикорнавирус, среди прочих, имеют аналогичные ограничения при индуцировании системного противоопухолевого иммунитета (Chiocaetal. (2014) CancerImmunol. Res 2 (4): 295-300). Системное введение онколитических вирусов представляет уникальные проблемы. После IV введения вирус быстро разбавляют, что требует высоких титров, что может привести к гепатотоксичности.При наличии уже существующего иммунитета вирус быстро нейтрализуется в крови, а приобретенный иммунитет затем ограничивает повторное дозирование (Marounetal. (2017) *FutureVirol.* 12(4):193-213).

Из ограничений вакцинных векторов на основе вирусов и онколитических вирусов, наибольшие ограничения могут представлять собой сам вирус. Вирусные антигены имеют более высокую аффинность к рецепторам Т-клеток человека (TCR) по сравнению с опухолевыми антигенами (Aleksicetal. (2012) EurJImmunol. 42 (12): 3174-3179). Представленные вирусные векторные антигены с помощью MEIC -1 на поверхности даже высокоактивированных АПК будут оконтурированы для связывания с TCR, что приводит к очень плохому антигенспецифическому противоопухолевому иммунитету. Иммуностимулирующий вектор, нацеливающий на опухоль, согласно настоящему описанию, который сам по себе не обеспечивает высокоаффинных Т-клеточных эпитопов, может обойти эти ограничения.

D. БАКТЕРИАЛЬНАЯ РАКОВАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ

В настоящем документе предложены иммуностимулирующие бактерии, которые модифицированы таким образом, что они накапливаются в резидентных иммунных клетках, и не инфицируют эпителиальные или другие клетки. Иммуностимулирующие бактерии содержат плазмиды, которые кодируют и экспрессируют, под контролем распознаваемого промотора, и секретируют, терапевтические продукты, такие как иммуностимулирующие белки, которые являются частью пути цитозольной ДНК/РНК-датчика, что приводит к экспрессии IFN типа I.

Таким образом, иммуностимулирующие бактерии являются раковыми лекарственными средствами, которые за счет модификации бактериального генома и кодируемого терапевтического продукта (ов) обеспечивают иммунотерапию непосредственно в опухолевую микросреду. Бактерии и способы и применения, предложенные в данном документе, решают предшествующие проблемы, встречающиеся с другими противораковыми иммунотерапевтическими средствами.

Иммуностимулирующие белки, являющиеся частью пути цитозольной ДНК/РНК-датчика, приводящие к экспрессии IFN типа I, в дополнение к экспрессии в них

иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, могут быть кодированы или обеспечены в других носителях, таких как экзосомы, липосомы, онколитические вирусы и векторы генной терапии.

1. Бактериальная терапия

Острое воспаление, связанное с микробной инфекцией, связывали с самопроизвольным устранением опухолей. Вывод, что бактерии имеют противораковую активность, возвращается к 1800-ым, когда несколько врачей наблюдали регрессию опухолей у пациентов, инфицированных Streptococcuspyogenes.

WilliamColeyначаи первое исследование с использованием бактерий для лечения рака конечной стадии и разработал вакцину, состоящую из S. pyogenes и Serratiamarcescens.Эту вакцину успешно использовали для лечения различных видов рака, в том числе саркомы, карцином, лимфом и меланом.

После этого ряд бактерий, включая виды Clostridium, Mycobacterium, Bifidobacterium, Listeria, таких как Lmonocytogenes, и виды Escherichia, исследовали в качестве источников противораковых вакцин (см., напр., WO1999/013053 иWO 2001/025399; Bermudes*etal.* (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:194-199; Patya*et al.* (2010) *Journal of Biomedical Science* 17:21; иPaweleke*t al.* (2003) *LancetOncol.4:548-556).*

Бактерии могут инфицировать животные и человеческие клетки, а некоторые обладают врожденной способностью доставлять ДНК в цитозоль клеток. Бактерии также пригодны для терапии, поскольку они могут вводиться перорально, они быстро распространяются invitro и invivo, и они могут храниться и транспортироваться в лиофилизированном состоянии.

Бактериальная генетика легко манипулируется, и полные геномы для многих штаммов полностью охарактеризованы (Feigneretal. (2016) mbio 7 (5): e01220-16).В результате бактерии используются для доставки и экспрессии различных генов, включая те, которые кодируют цитокины, ингибиторы ангиогенеза, токсины и ферменты, превращающие пролекарства.

Salmonella, например, использовали для экспрессии иммуностимулирующих молекул, таких как IL-18 (Loefflere*tal.* (2008) *Cancer Gene Ther.* 15(12):787-794), LIGHT (Loeffler *et al.* (2007) *PNAS* 104(31):12879-12883), иFasлиганд (Loefler et al (2008) J Natl

Cancer Inst. 100: 1113-1116), длялеченияопухолей.Бактериальные векторы также дешевле и их легче продуцировать, чем вирусные векторы, и бактериальная доставка является благоприятной по сравнению с вирусной доставкой, поскольку она может быть быстро устранена антибиотиками при необходимости, делая ее более безопасную альтернативу.

Однако для использования штаммы не должны быть патогенными или непатогенными после модификации, для применения в качестве терапевтического средства. Например, при лечении рака терапевтические бактериальные штаммы должны быть ослаблены или визуализированы достаточно нетоксичными, чтобы не вызывать системное заболевание и/или септический шок, но все еще поддерживать некоторый уровень инфекционности для эффективной колонизации опухолей.

Описаны генетически модифицированные бактерии, которые должны быть использованы в качестве противоопухолевых агентов для индукции прямых опухолевых эффектов и/или для доставки противоопухолевых молекул (Clairmont, *etal.* (2000) J. *Infect. Dis.* 181:1996-2002; Bermudes, D. *et al.* (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:194199; Zhao, M. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:755-760; Zhao, M. *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66:7647-7652).

Срединихбиоинженерныештаммы Salmonella enterica serovar typhimurium (S typhimurium). Эти бактерии накапливаются предпочтительно в 1, 000 раз больше в опухолях, чем в нормальных тканях и диспергированы гомогенно в опухолевых тканях (Pawelek, *J. etal.* (1997) *CancerRes.* 57:4537-4544; Low, K. B. *etal.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:37-41). Репликация позволяет бактерии продуцировать и доставлять множество противоопухолевых терапевтических агентов при высоких концентрациях непосредственно в опухоли, при этом минимизируя токсичность к нормальным тканям. Эти аттенуированные бактерии безопасны у мышей, свиней и обезьян при введении внутривенно (Zhao, M. *etal.* (2005) *Proc NallAcad SciUSA* 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), аопределенныеживыеаттенуированныештаммы Salmonella хорошопереносятсяпослепероральноговведениявклиническихисследованиях (Chatfield, S. N. *et al.* (1992) *Biotechnology* 10:888-892; DiPetrillo, M. D. *et al.* (1999) *Vaccine* 18:449- 459; Hohmann, E. L. *et al.* (1996) *J. Infect. Dis.* 173:1408-1414; Sirard, J. C. *et al.* (1999) *Immunol. Rev.* 171:5-26). *S. typhimurium*phoP/phoQоперон

является типичной двухкомпонентной бактериальной регуляторной системой, содержащей связанный с киназой сенсор (PhoQ) и цитоплазмический транскрипционный регулятор (PhoP: Miller, S. *I. etal.* (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5054-5058; Groisman, E. A. *et al.* (1989)*ProcNatlAcadSciUSA*86: 7077-7081). PhoP/phoQтребуется для вирулентности, и его делеция приводит к плохой выживаемости этой бактерии в макрофагах и выраженном ослаблении у мышей и людей (Miller, S. *I. etal.* (1989) *Proc NatiAcad Sci USA* 86:5054-5058; Groisman, E. A. *et al.* (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7077-7081; Galan, J. E. and Curtiss, R. III. (1989) *MicrobPathog*6:433-443; Fields, P. I. *et al.*(1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5189-5193). Штаммы с делецией PhoP/phoQприменялись как эффективные средства доставки вакцин (Galan, J. E. andCurtiss, R. III. (1989) *MicrobPathog*6:433-443; Fields, P. I. *et al.* (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5189-5193; Angelakopoulos, H. and Hohmann, E. L. (2000) *Infect Immun*68:2135-2141). Ослабленные *Salmonellae*применялись для целевой доставки опухолевых белков (Bermudes, D. *etal.* (2002) *CurrOpin Drug DiscovDevel*5:194-199; Tjuvajev*J. et al.* (2001) *J Control Release* 74:313-315).

Раковые терапии на основе бактерий продемонстрировали ограниченную клиническую пользу. Различные виды бактерий, в том числе *Clostridiumnovyi*(Dang*etal.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(26):15155-15160; патентные публикации США 2017/0020931 и 2015/0147315; иU.S. PatentNos. 7,344,710 и 3,936,354), *Mycobacteriumbovis*(2015/0224151 и 2015/0071873), *Bifidobacteriumbifidum*(Kimura*etal.* (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.* (2004) J. *Immunol.* 173:420-427; U.S. Patent Publication No. 2006/0051380) and *Escherichia coli* (U.S. Patent No. 9,320,787),былиизученыкаквозможныеагентыдляпротиворакковойтерапии.

Штамм BacillusCalmette-Guerin (BCG), например, одобрен для лечения рака мочевого пузыря у людей и является более эффективным, чем внутрипузырная химиотерапия, часто используемая в качестве первой линии лечения (Gardliketal. (2011) Genetherapy 18: 425-431).

Другой подход использует Listeriamonocytogenes, живую аттенуированную внутриклеточную бактерию, способную индуцировать сильный $CD8^+$ Т-клеточный

праймер к экспрессированным опухолевым антигенам у мышей (Leetal (2012) Clin. CancerRes 18 (3): 858-868).

В клиническом исследовании вакцины на основе Listeria, содержащей мезотелин опухолевого антигена, вместе с аллогенной вакциной на основе рака поджелудочной железы в подгрудном подходе, у пациентов с развитым раком поджелудочной железы отмечается срединная выживаемость 6,1 месяцев, по сравнению со средней выживаемостью 3,9 месяцев для пациентов, обработанных только вакциной GVAX (Leetal (2015) JClin. Oncol. 33 (12): 1325-1333).

Эти результаты не были реплицированы в исследовании большей фазы 2b, возможно, из-за трудностей при попытках индуцировать иммунитет к низкоаффинномусамоантигену, такому как мезотелин.

Бактериальные штаммы могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе. Штаммы могут быть аттенуированы или их клеточными мишенями, модифицированными стандартными способами, и/или делецией или модификацией генов, и путем изменения или введения генов, которые делают бактерии, способные расти invivo, главным образом, в иммунологических средах, таких как TME, в опухолевых клетках, в резидентных иммунных клетках и солидных опухолях. Исходные штаммы для модификации, описанные в данном документе, могут быть выбраны из, например,*Shigella, Listeria, E. coli, Bifidobacteriae*and*Salmonella.* Например, *Shigella sonnei, Shigella flexneri, Shigella dysenteriae, Listeria monocytogenes, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Salmonella gallinarum,* and *Salmonella enteritidis.*

Другиеподходящиебактериальныештаммывключают*Rickettsia, Klebsiella, Bordetella, Neisseria,Aeromonas, Francisella, Corynebacterium, Citrobacter, Chlarnydia, Haemophilus,Brucella, Mycobacterium, Mycoplasma, Legionella, Rhodococcus, Pseudomonas, Helicobacter, Vibrio, Bacillus,* and *Erysipelothrix.* Например, *Rickettsia rickettsiae,Rickettsiaprowazecki, Rickettsia tsutsugamuchi, Rickettsia mooseri, Rickettsia sibirica, Bordetella bronchiseptica, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Aeromonas eucrenophila, Aeromonas salmonicida, Francisellatularensis, Corynebacterium pseudo tuberculosis, Citrobacter freundii, Chlamydia pneumoniae,Haemophilussomnus, 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, в том числе иммуностимулирующие, бактерии можно модифицировать, как описано в настоящем документе.

2. Сравнение иммунного ответа на бактерии и вирусы

Бактерии, такие как вирусы, имеют преимущество как природные иммуностимулирующие агенты. Бактерии и вирусы содержат консервативные структуры, известные как связанные с патогеном молекулярные паттерны (ПАМП), которые воспринимаются рецепторами распознавания образов-хозяев (PRR). Распознавание PMP по PRR инициирует последующие каскады сигнализации, приводящие к индукции цитокинов и хемокинов, и инициированию иммунных ответов (Iwasaki и Medzhitov (2010) Science 327 (5963): 291-295).Способ, в котором врожденная иммунная система сцепляется PPP, и от того, какой тип инфекционного агента определяет соответствующий адаптивный иммунный ответ для борьбы с патогеном.

Класс PRR, известных как Toll-подобные рецепторы (TLR), распознает PAMP, происходящие из бактериальных и вирусных источников, и расположены в различных отсеках внутри ячейки. TLR связывают диапазон лигандов, включая липополисахарид (TLR4), липопротеины (TLR2), флагеллин (TLR5), неметилированныеCpG звенья 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).

Styphimurium, в значительной степени опосредуется посредством TLR2, TLR4 и TLR5 (Aripaaetal (201 1) Cell 144 (5): 675-688). Эти сигналы TLR через молекулы адаптера MyD88 и TRIF опосредуют индукцию зависимых провоспалительных цитокинов NF-KB, таких как TNF-a, IL -6 и IFN-y(Pandeyet. Al (2015) ColdSpringHarbPerspectBiol 7 (l): a016246).

Другая категория PRR является семейством nod-подобного рецептора (NLR). Эти рецепторы находятся в цитозоле клеток-хозяев и распознают внутриклеточные PAMP. Например, было показано, что флагеллинStyphimurium активирует путь NLRC4/NAIP5, что приводит к расщеплению каспазы -1 и индукции провоспалительных цитокинов IL-113 b и IL -18, что приводит к гибели пироптотических клеток инфицированных макрофагов (Finketal (2007) CellMicrobiol. 9 (11): 2562-2570).

При взаимодействии TLR2, TLR4, TLR5 и инфламмасом индуцируются провоспалительные цитокины, которые опосредуют бактерии, активируют преимущественно NF-KB-ведомый сигнальный каскад, который приводит к рекрутированию и активации нейтрофилов, макрофагов и $CD4^+$ Т-клеток, но не DC и $CD8^+$ Т-клеок, необходимых для противоопухолевого иммунитета (Liuetal. (2017) SignalTransfortTargetyTher. 2:e17023).

Для активации $CD8^+$ опосредованного Т-клеточного противоопухолевого иммунитета, IRF3/IRF7-зависимый тип интерферона I типа является критическим для активации DC и перекрестного представления опухолевых антигенов для стимуляции $CD8^+$ Т клеточного прайминга(Diamond*etal.* (2011)1 *Exp. Med.* 208(10):1989-2003; Fuerte*setal.* (2011) *JExp. Med.* 208(10):2005-2016).

Интерфероны типа I (IFN-a, IFN-13) представляют собой сигнатурные цитокины, индуцированные двумя различными TLR-зависимыми и TLR-независимыми путями сигнализации. Зависимый от TLR путь для индуцированияIFN-13 происходит после эндоцитоза патогенов, посредством чего TLR3, 7, 8 и 9 детектируют элементы патоген-производных ДНК и РНК в эндосомах.

TLR 7 и 8 распознают вирусные нуклеозиды и нуклеотиды, и их синтетические агонисты, такие как резиквимод и имиквимод, клинически подтверждены (Chietal. (2017) FrontiersinPharmacology 8: 304).

Синтетическая dsPHK, такая как полиинозиновая: полицитидиловая кислота (поли (I: C)) и поли ICLC, аналог, который составлен с поли L лизином для предотвращения расщепления РНКазы, является агонистом путей TLR3 и MDAS и мощным индуктором IFN-f3 (Caskeyetal (2011) JExpMed. 208 (12): 2357-66).

Определение TLR9 эндосомных звеньев CpG, присутствующих в вирусной и бактериальной ДНК, может также индуцировать IFN-3 через IRF3. Кроме того, показано, что TLR4 индуцирует IFN-13 посредством MyD88-независимой TRIF активации IRF3 (Owen*etal.* (2016) *rnBio.7:1* e02051-15). Было показано, что активация TLR4 DC не зависит от IFN типа I, так что способность TLR4 активировать ДК по типу IIFN, вероятно, не является биологически релевантной (Huetal. (2015) ProcNatlAcadSciUSA 1 12 (45): 13994-13999). Кроме того, сигнализация TLR4 не показана для непосредственного привлечения или активации $CD8^+$ Т-клетки.

Из TLR-независимого типа IIFN-пути опосредуется распознаванием хозяина одноцепочечной (ss) и двухцепочечной (ds) РНК в цитозоле.

Они воспринимаются РНК геликазами, включая индуцируемый ретиноевой кислотой ген I (RIG-I), ген, связанный с дифференцировкой меланомы 5 (MDA -5), и через стимулятор 1 промотора IFN-f3,(IPS-1; также известный как митохондриальный антивирусный белок или MAVS) адаптор белком опосредованного фосфорилирования фактора транскрипции IRF -3, приводящее к индукции IFN-I3 (Ireton и Gale (201 1) Viruses 3 (6): 906-919).

Синтетические RIG-I-связывающие элементы также были обнаружены в обычных лентивирусных векторах shRNA, в форме динуклеотидной последовательности AA на начальном участке транскрипции промотора U6. Его последующая делеция в плазмиде предохраняла конституцию активации IFN-мишени I типа (Pebamardetal (2004) Differentiation. 72: 103-111).

Второй тип индукции интерферона TLR-независимого типа I опосредован стимулятором генов интерферона (STING), резидентным адаптерным белком ER-резидентного типа, который теперь распознается как центральный медиатор для определения цитозольнойdsДНК из инфекционных патогенов или аберрантного повреждения клеток хозяина (Barber (2011) Immunol. Rev 243 (1): 99-108).

STING сигнализация приводит в действие TANK связывающую киназу (TBK1)/IRF3 и ось сигнализации NF-KB, что приводит к индукции IFN-13 и других провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые сильно активируют врожденный и адаптивный иммунитет (Burdetteetal. (2011) Nature 478 (7370): 515-518).

При выявлении цитозольнойdsДНК через STING требуется циклическая GMP-AMPсинтаза (cGAS), нуклеотидилтрансфераза клетки-хозяина, которая непосредственно связывает dsDNA, и в ответ синтезирует циклического динуклеотида (CDN) второй мессенджер, циклический GPMP-AMP (cGAMP), который связывает и активирует STING (Sun *et al.* (2013) *Science* 339(6121):786-791; Wu *et al.* (2013) *Science*339(6121):826-830).

CDN, полученные из бактерий, такие как c-di-AMP, полученные из внутриклеточных Listeriamonocytogenes, также могут непосредственно

связываться с мышиным STING, но только 3 из 5 аллелей STING человека.

В отличие от CDN, продуцируемых бактериями, в которых два пуриновых нуклеозида соединены фосфатным мостиком 3'-3'- связями, межнуклеотидный фосфатный мостик в cGAMP, синтезированный cGAS млекопитающих, соединен неканонической 2'-3'- связью.

Эти 2'-3'молекулы имеют 300-кратное сродство по сравнению с бактериальными 3'-3'- CDN и, таким образом, являются более сильнодействующими физиологическими лигандами человеческого STING(см, напр., Civril*etal.* (2013) *Nature* 498(7454):332-337; Diner *et al.* (2013) *Cell Rep.* 3(5):1355-1361; Gao *et al.* (2013) *Sci. Signal*6(269):p11; Ablasser*etal.* (2013) *Nature*503(7477):530-534).

Сигнальный путь cGAS/STING у людей развился, чтобы предпочтительно реагировать на вирусные патогены по бактериальным патогенам, и это может объяснить, почему предыдущие бактериальные вакцины, содержащие опухолевые антигены-хозяева, были выполнены для плохого $CD8^+$ Т-клеточный прайминг вектора для человека.

TLR-независимая активация $CD8^+$ Т-клеток с помощьюSTING-зависимых сигналов IFN типа I от обычных DC являются первичным механизмом, с помощью которого обнаружены вирусы, с получением TLR-зависимого типа IIFN с помощью плазмацитоидныхDC, функционирующих только тогда, когда сигнальный путь был вирулирован-инактивирован (Hervas-Stubbsetal. (2014) JImmunol. 193: 1151-1161).

Кроме того, для бактерий, таких как Styphimurium, с возможностью индуцированияIFN-beta через TLR4, $CD8^+$ Т-клетки не индуцируются и не требуются для клиренса или защитного иммунитета (Lee*etal.* (2012) *ImmunolLett.* 148(2): 138-143).

Отсутствие физиологически релевантных $CD8^+$ Т-эпитопов для многих штаммов бактерий, включая Styphimurium, привело к защитному иммунитет к последующим инфекциям, даже для тех же генетических штаммов (Lo*etal.* (1999)1 *Immunol.* 162:5398-5406).

Раковые иммунотерапии на основе бактерий ограничены их способностью индуцировать IFN типа I, привлекая его и активируя $CD8^+$ Т-клетки,

необходимые для стимуляции кросс-презентации опухолевого антигена и длительного противоопухолевого иммунитета.

Иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные здесь, однако, сконструированы таким образом, чтобы решить эту проблему.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, индуцируют вирусно-подобный TLR-независимуюсигнализацию IFN типа I, а не TLR-зависимую бактериальную иммунную сигнализацию, которая предпочтительно индуцирует $CD8^+$ Т-клеточный противоопухолевый иммунитет.

STING активирует врожденный иммунитет в ответ на обнаружение нуклеиновых кислот в цитозоле. Нисходящую сигнализацию активируют путем связывания CDN, которые синтезируют бактериями или с помощью cGAS-хозяина в ответ на связывание с цитозольнойdsДНК.

Полученные бактериальные и хозяйские CDN имеют различные фосфатные мостики, которые дифференцируют их способность активировать STING . IFN-3 является сигнатурным цитокином активированного STING, и вирально-индуцированный IFN типа I, а не бактериально индуцированный IFN, необходим для эффективного $CD8^+$ Т-клеточного противоопухолевого иммунитета. Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, включают те, которые являются агонистами STING, и те, которые экспрессируют STING.

3. Терапия*Salmonella*

Salmonella является примером бактериального рода, который может быть использован в качестве противоракового терапевтического средства. Salmonella, проиллюстрированный в настоящем документе, представляет собой аттенуированный вид или является таким, который, благодаря модификациям, описанным в настоящем документе, для применения в качестве противоракового терапевтического средства, обладает пониженной токсичностью.

4 Опухолетропные бактерии

Ряд видов бактерий продемонстрировал предпочтительную репликацию в солидных опухолях при введении с дистального участка. Они включают, но не ограничиваются ими, виды Salmonella, Bifodobacterium, Clostridium и Escherichia. Полагают, что естественные противоопухолевые свойства бактерий в сочетании с врожденным иммунным ответом хозяина на бактериальную инфекцию опосредуют противоопухолевый ответ.

Показано, что указанная опухолевая ткань позволяет уменьшить размер опухолей до различной степени.Одним вносящим вклад фактором в рост опухоли этих видов бактерий является способность реплицироваться в аноксических или гипоксических средах. Для повышения эффективности противоопухолевого ответа (обзор в Zuetal. (2014) CritRevMicrobiol дополнительно разработали ряд этих природных опухолетропных бактерий. 40 (3): 225-235; и Feigner et al. (2017) Microbial Biotechnology 10 (5): 1074 – 1078).

b. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Salmonellaentericaserovartyphimurium (Styphimurium) является примером бактериального вида для применения в качестве противоракового терапевтического средства. Один подход к использованию бактерий для стимуляции иммунитета хозяина к раку был осуществлен через грамотрицательную факультативную анаэробную Styphimurium, которая предпочтительно накапливается в гипоксических и некротических зонах в организме, включая опухолевые микроокружения. S.typhimurium накапливается в этих средах вследствие наличия нутриентов из некроза тканей, вытекающей сосудистой сети опухоли, и их повышенной вероятности выживать в иммунной системе микроокружения опухоли (Babanetal. (2010) *BioengineeredBugs 1(6):385-*394).Styphimurium способен расти в обоих аэробных и анаэробных условиях; поэтому он способен колонизировать малые опухоли, которые являются менее гипоксическими, и большие опухоли, которые являются более гипоксическими. Styphimurium является грамотрицательным, факультативным патогеном, который передается через фекально-оральный путь. Она 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 Styphimurium дикого типа стимулирует TNF-a индукцию, приводящую к цитокиновому каскаду и септическому шоку, который, если не необработанный, может быть фатальным.В результате патогенные бактериальные штаммы, такие как Styphimurium, должны быть ослаблены для предотвращения системной инфекции, не полностью подавляя их способность эффективно колонизировать опухолевые ткани.

Ослабление часто достигается посредством мутации ячеистой структуры, что может вызывать иммунный ответ, такой как бактериальная наружная мембрана, или ограничения ее способности реплицироваться при отсутствии дополнительных питательных веществ.

Styphimurium является внутриклеточным патогеном, который быстро поглощается миелоидными клетками, такими как макрофаги, или может индуцировать свое собственное поглощение в нефагоцитарных клетках, таких как эпителиальные клетки. Однократно внутри клеток он может реплицироваться в Salmonella, содержащей вакуоль (SCV), и может также выходить в цитозоль некоторых эпителиальных клеток.Идентифицированы многие молекулярные детерминанты патогенности Styphimurium и кластеры генов в островках патогенности Salmonella(SPI).Два из наилучших охарактеризованных островков патогенности представляют собой SPI -1, который отвечает за опосредованную бактериальную инвазию нефагоцитарных клеток, и SPI -2, который необходим для репликации в SCV (Agbor и McCormick (2011) CellMicrobiol.13 (12): 1858-1869). Оба из этих островков патогенности кодируют макромолекулярные структуры, называемые тремя системами секреции (T3SS), которые могут транслоцироватьэффекторные белки через основную мембрану (Galan и Wolf-Watz (2006) Nature 444: 567573).

c. Аттенуирование бактерий

Терапевтические бактерии для введения для лечения рака должны быть модифицированы таким образом, чтобы они не вызывали заболевания. Различные способы достижения этого известны в данной области техники. Ауксотрофные мутации, например, делают бактерии неспособными синтезировать существенную питательную среду, и широко используются делеции/мутации в генах, таких как aro, pur, gua, thy, nad и asd (патентная публикация США № 2012/0009153).

Питательные вещества, продуцируемые путями биосинтеза, включающие эти гены, часто недоступны в клетках-хозяевах, и, по существу, бактериальная выживаемость является сложной задачей.

Например, ослабление Salmonella и других видов может быть достигнуто путем делеции гена aroA, являющегося частью пути, связывающего гликолиз с биосинтезом ароматической аминокислоты (Feigneretal (2016) Mbio 7 (5): e01220-16).Таким образом, делеция aroA приводит к бактериальной ауксотрофии для ароматических аминокислот и последующему ослаблению (публикация патента США № № 2003/0170276, 2003/0175297, 2012 /0009153 и 2016/0369282; публикации международной заявки № WO 2015/032165 и WO 2016/025582). Аналогично, другие ферменты, участвующие в пути биосинтеза ароматических аминокислот, включая aroC и aroD, были удалены для достижения ослабления (патентная публикация США № 2016/0369282;

Международная публикация заявки № WO 2016/025582). Например, штамм StyphimuriumSL7207 представляет ароматической аминокислоты ауксотроф (aroA-мутант); штаммы Al и Al-R-ауксотрофы лейцин-аргинин. VNP20009 представляет собой пуриновый ауксотроф (purl-мутант). Как показано в настоящем документе, он также является ауксотрофным дляиммуносупрессивного нуклеозида аденозина. Мутации, которые ослабляют бактерии, также включают, но не ограничиваются ими, мутации в генах, которые изменяют биосинтез липополисахарида, такие как rfaL, rfaG, rfaH, rfaD, rfaP, rFb, rfa, msbB, htrB, firA, pagL, pagP, IpxR, arnT, ep/A и IpxT; мутации, которые вводят суицидный ген, такой как sacB, nuk, hok, gefkil или phlA; мутации, которые вводят ген бактериального лизиса, такой как hly и ly; мутации в факторах вирулентности, такие как isyA, pag, prg, iscA, virgG, pic и Act-мутации, которые модифицируют стресс-ответ, такие как recA, htrA, htpR, hsp и groEL; мутации, нарушающие клеточный цикл, такие как min; и мутации, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, такие как cya, crp, phoP/phoQ, и ompR(патентные публикации США 2012/0009153, 2003/0170276, 2007/0298012; патент США No 6,190,657; WO 2015/032165; Felgner*etal.* (2016) *Gut microbes* 7(2): 171-177; 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):1941419419).

В идеальном случае генетические ослабители содержат делеции генов, а не точечные мутации для предотвращения спонтанных компенсаторных мутаций, которые могут привести к реверсии вирулентного фенотипа.

Мутанты *msbB*$^-$

Ферментный липид биосинтеза миристоилтрансферазы, кодируемый геном msbB в Styphimurium, катализирует добавление терминальной миристилгруппы в липидный домен липополисахарида (LPS) (Lowetal (1999) Nat. Biotechnol. 17 (1): 37-41). Делеция msbB, таким образом, изменяет ацильную композицию липидного домена LPS, основной компонент наружных мембран грамотрицательных бактерий.Такая модификация значительно снижает способность LPS индуцировать септический шок, ослабляя бактериальный штамм и снижая потенциально вредное продуцирование TNFa, тем самым снижая системную токсичность. Мутанты StyphimuriummsbB сохраняют свою способность предпочтительно колонизировать опухоли через другие ткани у мышей и сохраняют противоопухолевую активность, таким образом, увеличивая терапевтический индекс иммунотерапевтических средств на основе Salmonella (см. например, патенты публикации США № 2003/0170276,2003 /0109026, 2004/0229338, 2005/0255088 и 2007/0298012).Например, делеция msbB в штамме StyphimuriumVNP20009 приводит к получению преимущественно пента-ацилированногоLPS, который менее токсичен, чем нативныйгекса-ацилированныйLPS, и обеспечивает системную доставку без индукции токсического шока (Leeetal (2000) InternationalJournalofToxitology 19: 19-25).Другие мутации LPS могут быть введены в штаммы бактерий, представленные в данном документе, включая штаммы Salmonella, которые существенно снижают вирулентность, и тем самым обеспечивают более низкую токсичность, и позволяют вводить более высокие дозы.

i. Мутанты purr

Используют иммуностимулирующие бактерии, которые могут быть аттенуированы путем придания им ауксотрофных свойств для одного или более основных питательных веществ, таких как пурины (например, аденин), нуклеозиды (например, аденозин) или аминокислоты (например, аргинин и лейцин). В частности, в вариантах осуществления иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем

документе, таких как Styphimurium, бактерии визуализируются ауксотрофом для аденозина, который предпочтительно накапливается в микроокружении опухоли.

Следовательно, штаммы иммуностимулирующих бактерий, описанные в настоящем документе, ослаблены, так как они требуют аденозина для роста, и они предпочтительно колонизируют TME.

В путь биосинтеза вовлечена фосфорибозиламиноимидазол-синтетаза, фермент, кодируемый геном purl (синонимом гена purM)

Таким образом, разрушение гена purl делает бактерии ауксотрофными для пуринов. Кроме того, ослабленные мутанты purl обогащены в опухолевой среде и обладают значительной противоопухолевой активностью (Paweleketal. (1997) CancerResearch 57: 4537-4544). Ранее было описано, что эта колонизация приводит к высокой концентрации пуринов, присутствующих в интерстициальной жидкости опухолей в результате их быстрого клеточного оборота.

Поскольку purl-бактерии не способны синтезировать пурины, они требуют внешнего источника аденина, и полагают, что это приводит к их ограниченному росту в обогащенной пурином опухолевой микросреде (Rosenbergetal. (2002) JImmunotherapy 25 (3): 218-225). В то время как штамм VNP20009 как первоначально сообщалось, содержал делецию гена purl (Lowetal (2003) Methodsin MolecularMedicineVol 90, SuicideGeneTherapy 47-59), последующий анализ всего генома VNP20009 показал, что ген purl не делетирован, но разрушается хромосомной инверсией (Broadwayetal. (2014) Journalof Biotechnology 192: 177-178). Весь ген содержится в пределах двух частей хромосомы VNP20009, фланкированной встраиваемыми последовательностями (одна из которых имеет активную транспозазу).

Здесь показано, что мутантные штаммы purl мутантов Styphimurium являются ауксотрофными для нуклеозидного аденозина, высокообогащенным в опухолевых микросредах. Следовательно, при использовании VNP20009 нет необходимости вводить любую дальнейшую модификацию для достижения аденозиновойауксотрофии. Для других штаммов и бактерий ген purl может быть разрушен, так как он был в VNP20009, или он может содержать делецию всей или части гена purl для предотвращения реверсии до гена дикого типа.

iii. Комбинации ослабляющих мутаций

Бактерия с множественными генетическими ослаблениями посредством делеций генов на различающихся участках хромосомы желательна для бактериальной иммунотерапии, поскольку ослабление может быть увеличено, при снижении возможности реверсии к вирулентному фенотипу путем приобретения генов путем гомологичной рекомбинации с генетическим материалом дикого типа. Восстановление вирулентности путем гомологичной рекомбинации потребовало бы двух отдельных рекомбинационных событий в пределах одного и того же организма. В идеальном случае комбинация ослабляющих мутаций, выбранных для использования в иммунотерапевтическом агенте увеличивает переносимость без снижения потенции, тем самым увеличивая терапевтический индекс. Например, как обсуждается ниже, разрушение генов msbB и purl в штамме StyphimuriumVNP20009 используется для нацеливания на опухоль и подавления роста, и обладает низкой токсичностью в моделях на животных (Clairmont*etal.* (2000)1 *Infect. Dis.* 181:1996-2002; Bermudes*et al.* (2000) *Cancer Gene Therapy: Past Achievements and Future Challenges, издано* Habib Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 57-63; Low *et al.* (2003) *Methods in Molecular Medicine,* Vol. 90, *Suicide Gene Therapy:47-59;* Lee *et al.* (2000) *International Journal of Toxicology* 19:19-25; Rosenberg *et al.* (2002)1 *Immunotherapy* 25(3):218-225; Broadway *et al.* (2014)1 *Biotechnology* 192:177-178; Loeffler *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(31):12879-12883; Luo *et al.* (2002) *OncologyResearch* 12:501-508).

Однако VNP20009 не показывает те же накопление опухоли и противоопухолевую активность в исследованиях на человеке. Более высокие дозы, которые необходимы для проявления любой противоопухолевой активности, таким образом, невозможны вследствие токсичности. В настоящем документе предложены иммуностимулирующие бактерии, содержащие комбинации генетических модификаций, которые, например, снижают вирулентность, повышают переносимость, снижают или устраняют бактериальную инфекцию эпителиальных (и других неиммунных) клеток, позволяют увеличить накопление в опухолерезидентных иммунных клетках и снизить гибель клеток резидентных иммунных клеток, среди других желательных свойств, улучшающих терапевтический индекс.

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

Примером терапевтической бактерии, которая может быть модифицирована, как описано в настоящем документе, является штамм, обозначенный как VNP20009 (ATCC # 202165, YS1646). Клинический кандидат, VNP20009 (ATCC # 202165, YS1646), был по меньшей мере 50000-кратным аттенуированным для безопасности посредством делеции как генов msbB, так и purl (Classiontetal (2000) JInfect. Dis. 181: 1996-2002; Low et al (2003) Methods in Molecular Medicine, Vol 90, Suicide Gene Therapy 47-59; 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 липидного А-домена липополисахарида, основного компонента грамотрицательных бактериальных наружных мембран (Lowetal (1999) Nat. Biotechnol. 17 (1): 37-41).

Это предотвращает индуцированный липополисахаридом септический шок, ослабляющий бактериальный штамм и снижающий системную токсичность, при этом снижая потенциально вредное продуцирование TNFa(Dinarello, C.A. (1997) *Chest 112(6* Suppl):321S-329S; Lowe*tal. (1999) Nat. Biotechnol.* 17(1):37-41) Делеция гена purl делает бактерии ауксотрофными для пуринов, которые дополнительно ослабляют бактерии и обогащают ее в микроокружении опухоли (Paweleketal (1997) CancerRes 57 : 4537-4544; Broadwayetal. (2014) JBiotechnology 192: 177-178).

Накопление VNP20009 в опухолях приводит к комбинации факторов, включающих: присущую инвазивность родительского штамма, ATCC # 14028, его способность реплицироваться в гипоксических средах, и требование к высокой концентрации пуринов, присутствующих в интерстициальной жидкости опухолей.Также показано, что VNP20009 ауксотрофный для нуклеозидного аденозина, который может накапливаться до патологически высоких уровней в микроокружении опухоли и вносить вклад в иммуносупрессорную опухолевую микросреду (PeterVaupelandAmulfMayerOxygenTransportto. Tissue)(XXVII, Advances in Experimental Medicine and Biology 876 chapter 22, pp. 177-183).

При введении VNP20009 мышам, несущим синергические или человеческие опухоли, бактерии, накопленные преимущественно внутри внеклеточных компонентов опухолей, в соотношениях, превышающих 300-1000 к 1, снижают индукцию TNFa и продемонстрировали ингибирование роста опухоли, а также пролонгированную выживаемость по сравнению с контрольными мышами (Clairmont*etal.* (2000)1 *Infect. Dis.* 181:1996-2002). Результаты клинического испытания фазы 1 у людей показали, что в то время какVNP20009 является относительно безопасным и хорошо переносится, наблюдается плохое накопление в опухолях меланомы человека, и было продемонстрировано очень мало противоопухолевой активности (Tosoetal. (2002) JClin. Oncol.20 (1): 142-152). Более высокие дозы, которые потребовались бы для воздействия на любую противоопухолевую активность, невозможны из-за токсичности, которая коррелирует с высокими уровнями провоспалительных цитокинов.

Другие штаммы Styphimurium могут быть использованы для нацеленной на опухоль доставки и терапии, такие как, например, лейцин-аргинин ауксотрофA-1 (Zhao*etal.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*102(3):755-760; Yu*etal.* (2012) *ScientificReports*2:436; патент СШАNo. 8,822,194; патентная публикация США No. 2014/0178341) и его производноеAR-1 (Yu*etal.* (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):123133); штамм*S. typhimurium* SL7207 (Guo *et al.* (2011) *Genetherapy*18:95-105; патентные публикации США 2012/0009153, 2016/0369282 и 2016/0184456) и анаэробные производные YB1 (WO 2015/032165; Yu*etal.* (2012) *ScientificReports*2:436; Leschner*etal.* (2009) *PLoSONE*4(8):e6692); *aroAYaro.0*мутантный штамм*S. typhimurium*BRD509, производное SL1344 (дикого типа) штамм (Yoon*etal.* (2017) *European J. of Cancer* 70:48-61); *asdicyalcrp*мутантныйштамм*S. typhimurium* x4550 (Sorenson *et al.* (2010) *Biologics: Targets & Therapy* 4:61-73) иштамм*phoR /phoq S. typhimurium* LH430 (WO 2008/091375).

Штамм VNP20009 не показал клиническое преимущество в исследовании с участием пациентов с развитой меланомой, но лечение безопасно вводить продвинутым пациентам с раком. Устанавливают максимально переносимую дозу (МТП). Следовательно, данный штамм, а также другие аналогичным образом сконструированные бактериальные штаммы могут быть использованы в качестве исходного материала для нацеливания на опухоль, доставки терапевтических средств доставки.Модификации, предложенные в настоящем документе, обеспечивают стратегию повышения эффективности, за счет повышения противоопухолевой эффективности и/или безопасности и переносимости терапевтического агента.

v. *S. typhimurium*сконструированные для доставки макромолекул

Styphimurium также был модифицирован для доставки ассоциированного с опухолью антигена (TAA) сурвивина (SVN) на APC для первичного адаптивного иммунитета (патентная публикация США № 2014/0186401; Xuetal (2014) CancerRes 74 (21): 6260-6270).SVN является ингибитором белка апоптоза (LAP), который увеличивает выживаемость клеток и обеспечивает контроль клеточного цикла и сверхэкспрессируется во всех солидных опухолях и плохо экспрессируется в нормальных тканях

В этой технологии используют островок патогенности Salmonella 2 (SPI -2) и систему секреции III типа (T3SS) для доставки TAA в цитозоль АПК, которые затем активируют для индукции TAA-специфичного $CD8^+$ Т-клетки и противоопухолевый иммунитет (Xuetal. (2014) CancerRes 74 (21): 6260-6270). Подобно вакцинам TAA на основе Listeria, этот подход продемонстрировал перспективу в мышиных моделях, но показывает специфичность к опухолеспецифическому антигену Т-клеток у людей.

В дополнение к доставке гена Styphimurium также был использован для доставки малых интерферирующих РНК (siРНК) и коротких шпилечных РНК (shРНК) для терапии рака. Например, ослабленные Styphimurium были модифицированы для экспрессии некоторых shРНК, таких как те, что нацелены на STAT3 и IDO1 (WO 2008/091375; и патент США № 9,453,227).

VNP20009, трансформированный плазмидой shRNA против иммуносупрессорного гена индололаминдеоксигеназы (IDO), успешно подавлял экспрессию IDO в мышиной модели меланомы, что приводило к гибели опухолевых клеток и значительной

инфильтрации опухоли нейтрофилами (Blacheetal. (2012) CancerRes 72 (24): 6447-6456). Объединение этого вектора с совместным введением PEGPH20 (фермент, истощающий внеклеточный гиалуронан), показал положительные результаты при лечении панкреатического протока опухоли аденокарциномы (Manuel*etal.* (2015) *CancerImmunol. Res.* 3(9):1096-1107; патентная публикация США No. 2016/0184456).

В другом исследовании было обнаружено, что Styphimurium штамм, ослабленный делецией *aphoPlphoQ* и экспрессирующий преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3)-специфической shRNA, ингибирует рост опухоли и уменьшает количество метастатических органов, продлевает срок службы мышей C57BL6 (Zhangetal. (2007) CancerRes 67 (12): 5859-5864).

В другом примере штамм S.typhimuriumSL7207 был использован для доставки shPHK, нацеленной на CTNNB1, ген, который кодирует f3-катенин (Guoetal (2011) Genetherapy 18: 95-105; патентные публикации США No 2009/0123426, 2016/0369282), а штамм S.typhimuriumVNP20009 был использован для доставки shPHK, нацеленной на STAT3 (Manueletal. (2011) CancerRes 71 (12): 4183-4191; публикация патента США № № 2009/0208534, 2014/0186401 и 2016/0184456; публикация международной заявки № № WO 2008/091375 и WO 2012/149364).

В опухолевые клетки, используя *S.typhimurium*штаммы Al-R и VNP20009S, были доставлены siPHK, нацеленные на гены аутофагиAtg5 и Beclinl (Liuetal (2016) Oncotarget 7 (16): 22873-22882). Улучшение таких штаммов является необходимым, так что они более эффективно стимулируют иммунный ответ, и имеют другие полезные свойства, такие как иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе.

Дополнительные и альтернативные модификации различных бактерий были описаны в опубликованной Международной заявке PCT № WO 2019/014398 и публикации США № 2019/0017050, бактерии, описанные в каждой из этих публикаций, также описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе, для дополнительного улучшения иммуностимулирующих и нацеливающих на опухоль свойств.

Бактерии могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе, для уменьшения воспалительных эффектов и, таким образом, становятся менее токсичными. В результате, например, можно вводить более высокие дозы. Любой из

этих штаммов Salmonella, а также другие виды бактерий, известные специалистам в данной области и/или перечисленные выше и в настоящем документе, могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе, например, путем введения аденозиновойауксотрофы. Примеры представляют собой виды Styphimurium, описанные в настоящем документе.

Штаммы бактерий, предложенные в настоящем документе, сконструированы для доставки терапевтических молекул/продуктов. Штаммы в данном документе предоставляют иммуностимулирующие белки, включая модифицированные варианты функциональные варианты цитозольных ДНК/РНК-датчиков, которые могут конститутивно вызывать/индуцировать экспрессию IFN типа I, и другие иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ в опухолевой микросреде.Штаммы также могут включать геномные модификации, которые снижают пироптоз фагоцитарных клеток, тем самым обеспечивая более надежный иммунный ответ, и/или снижают или устраняют способность инфицировать/инвазионные эпителиальные клетки, но сохраняют способность инфицировать/инвазировать фагоцитарные клетки, так что они накапливаются более эффективно в опухолях и в резидентных иммунных клетках. Бактериальные штаммы кодируют терапевтические продукты.Накопление в резидентных иммунных клетках позволяет экспрессировать и секретировать кодированные терапевтические продукты в опухолевую микросреду, повышая терапевтическую эффективность.

4. Улучшения иммуностимулирующих бактерий для увеличения терапевтического индекса и экспрессии в опухолерезидентных иммунных клетках

В настоящем документе предложены усовершенствования иммуностимулирующих бактерий, которые снижают токсичность и улучшают противоопухолевую активность. Примеры таких усовершенствований являются следующими. Они описаны в отношении Salmonella, в частности S Typhimurium, понятно, что специалист в данной области может влиять на аналогичные улучшения других видов бактерий и других штаммов Salmonella

a. Делеция гена asd

Ген asd в бактериях кодирует аспартат-полуальдегиддегидрогеназу. asd - мутанты Styphimurium обладают обязательным требованием диаминопимелиновой кислоты (DAP), которая необходима для синтеза клеточной стенки и будет подвергаться лизису в среде, лишенной DAP.

Эта DAPауксотрофия может быть использована для селекции плазмиды и поддержания стабильности плазмиды invivo, без применения антибиотиков, когда ген asd дополнен в транс на плазмиде. Системы селекции плазмиды на основе не антибиотика являются преимущественными и позволяют: 1) применение вводимых антибиотиков в качестве механизма быстрого клиренса при неблагоприятных симптомах и 2) безантибиотической схеме производства, где такое применение обычно избегают.Система комплементации гена asd обеспечивает такой отбор (Galanetal. (1990) Gene 94 (l): 29-35). использование системы комплементации гена asd для поддержания плазмид в микроокружении опухоли, как ожидается, повышает активность Styphimurium, сконструированного для доставки плазмид, кодирующих гены, и терапевтических продуктов/белков, таких как белки STING, и других иммуностимулирующих белков, как описано в настоящем документе.

Альтернативное применение для asd-мутанта Styphimurium заключается в том, чтобы использовать ауксотрофиюDAP для получения аутолитического (или суицидного) штамма для доставки макромолекул в инфицированные клетки без способности постоянно колонизировать опухоли-хозяева. Делеция гена asd делает бактерии ауксотрофными для DAP при выращивании invitro или invivo. Пример, описанный в данном документе (см. например,, Пример 3) обеспечивает штамм ASD, который является ауксотрофным для DAP и содержит плазмиду, которая кодирует терапевтический продукт, и которая не содержит гена, дополняющего ASD, приводя к штамму, дефектному для репликации invivo.

Этот штамм размножается invitro в присутствии DAP и растет нормально, а затем вводится в качестве иммунотерапевтического агента млекопитающему, где DAP не присутствует. Суицидный штамм способен проникать в клетки-хозяева, но не способен реплицироваться из-за отсутствия DAP в тканях млекопитающего, лизирования автоматически и доставки его цитозольного содержимого (например, плазмид или белков).

В примерах, приведенных в настоящем документе, штамм VNP20009 с делецией asd дополнительно модифицирован для экспрессии белка LLO, не содержащего эндогенной последовательности сигналов периплазматического секрета (cytoLO), заставляя его накапливаться в цитоплазме Salmonella. LLO представляет собой зависящий от холестерина порообразующий гемолизин из Listeriamonocytogenes, который опосредует фагосомальный выход бактерий.При введении автолизата в опухоленесущие мыши бактерии отбирают фагоцитарными иммунными клетками и вводят в полость сальмонелл, содержащую вакуоль (SCV).В этом случае отсутствие ДАР предотвратит репликацию бактерий и приводит к автолизу бактерий в SCV. Лизис суицидного штамма затем позволяет высвободить плазмиду и накопленную LLO, которая образует поры в мембране SVC, содержащей холестерин, и обеспечивает доставку плазмиды в цитозоль клетки-хозяина. При этом генные продукты, кодируемые на плазмиде, которые находятся под контролем эукариотического промотора, могут быть экспрессированы механизмом клетки-хозяина

b. Аденозиноваяауксотрофия

Метаболиты, полученные из триптофановых и АТФ/аденозиновых путей, являются основными драйверами при формировании иммуносупрессивной среды внутри опухоли.

Аденозин, который существует в свободной форме внутри и снаружи клеток, является эффектором иммунной функции. Аденозин уменьшает Т-клеточным рецептором индуцированною активациюNF-KB, и ингибирует IL -2, IL -4 и IFN. Аденозин снижает Т-клеточную цитотоксичность, увеличивает Т-клеточную анергию и увеличивает Т-клеточную дифференцировку к Foxp3 $^{+}$ или Lag -3 $^{+}$ регуляторных Т-клеток (T-gregs). В NK-клетках аденозин снижает продукцию IFN и подавляет цитотоксичность NK-клеток.

Аденозин блокирует адгезию нейтрофилов и экстравазацию, снижает фагоцитоз, ослабляет уровни супероксида и оксида азота. Аденозин также снижает экспрессию TNF-a, IL -12 и MIP-la (CCL3) на макрофагах, ослабляет экспрессию MHC класса II и повышает уровни IL -10 и IL -6.

Активность аденозинового иммуномодулирующего действия происходит после его высвобождения во внеклеточное пространство опухоли и активации аденозиновыхрецепторов (ADR) на поверхностях целевых иммунных клеток, раковых клеток или эндотелиальных клеток. Высокие уровни аденозина в микроокружении опухоли приводят к локальной иммуносупрессии, что ограничивает способность иммунной системы устранить 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 ATP или ADP, полученных из мертвых или красящих клеток. CD39 преобразует внеклеточный ATP (или ADP) в 5'AMP, который преобразуется в аденозин посредством CD73. При гипоксических условиях опухоли увеличивают экспрессию CD39 и CD73 на эндотелиальных клетках микросреды, увеличивая тем самым 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, возникающая в микроокружении опухоли, также ингибирует аденилаткиназу (АК), которая преобразует аденозин в AMP, приводя к очень высоким концентрациям внеклеточного аденозина.Внеклеточную концентрацию аденозина в микроокружении гипоксической опухоли измеряли при 10-100 мМ, что составляет приблизительно в 100-1000 раз выше, чем типичная концентрация внеклеточного аденозина приблизительно 0,1 мкМ (Vaupeletal. (2016) Adv Exp Med Biol. 876: 177-183; Antonioli et al (2013) Nat. Rev. Can. 13: 842-857).

Поскольку гипоксические области в опухолях являются дистальными от микрососудов, локальная концентрация аденозина в некоторых областях опухоли может быть выше, чем в других.

Для прямого воздействия на ингибирование 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, прежде всего посредством стимуляции рецепторов A2A и A2B.

Стимуляция рецепторов на эндотелиальных клетках может регулировать экспрессию межклеточной молекулы адгезии 1 (ICAM -1) и Е-селектина на эндотелиальных клетках, поддерживать целостность сосудов и стимулировать рост сосудов (Antoniolietal (2013) Nat. Rev. Can. 13: 842-857).

Активация одного или более из A2A, A2B или A3 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 непосредственно регулировать пролиферацию опухолевых клеток, апоптоз и метастазирование путем взаимодействия с рецепторами на раковых клетках. Например, исследования показали, что активация Ai и A2A рецепторов стимулируют опухолевых клеток
пролиферацию в некоторых клеточных линиях рака молочной железы, и активация A2B рецепторов имеют ростостимулирующие свойства в клетках карциномы толстой кишки (Antoniolietal (2013) Nat. Rev. Can. 13: 842-857).

Аденозин также может инициировать апоптоз раковых клеток, и различные исследования коррелировали эту активность с активацией внешнего апоптотического пути через A3 или собственный апоптотический путь через A2A A2B (Antoniolietal (2013)). Аденозин может способствовать миграции и метастазированию опухолевых клеток, за счет увеличения подвижности клеток, адгезии к внеклеточной матрице, и экспрессии белков и рецепторов присоединения клеток, способствующих движению и подвижности клеток.

Внеклеточное высвобождение аденозинтрифосфата (ATP) происходит из стимулированных иммунных клеток и поврежденных, окрашивающих или напряженных клеток. Семейство NLR пурин-содержащее 3 (NLRP3) инфламмасомы, стимулированное этим внеклеточным высвобождением ATP, активирует каспазы -1 и приводит к секреции цитокинов IL-1(3 и IL -18, которые, в свою очередь, активируют врожденные и адаптивные иммунные ответы (Stagg и Smyth (2010) Oncogene 29: 5346-5358).

АТФ катаболизируют в аденозин ферментами CD39 и CD73. Активированный аденозин действует как высокоиммуносупрессивный метаболит с помощью механизма с отрицательной обратной связью и имеет плеиотропный эффект

против множества типов иммунных клеток в микроокружении гипоксической опухоли (Stagg и Smyth (2010) Oncogene 29: 5346-5358).

Аденозиновые рецепторы A2A и A2B экспрессируются на множестве иммунных клеток и стимулируются аденозином для стимуляции опосредованных cAMP сигнальных изменений, что приводит к иммуносупрессивным фенотипам Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, тучных клеток, макрофагов, нейтрофилов и NKT-клеток.

В результате этого уровни аденозина могут накапливаться до более чем в сто раз их нормальной концентрации в патологических тканях, таких как солидные опухоли, которые были показаны для сверхэкспрессииэкто-нуклеотидаз, таких как CD73.Также показано, что аденозин способствует ангиогенезу и развитию опухоли. Таким образом, сконструированная бактерия, которая является ауксотрофной для аденозина, будет проявлять усиленное нацеливание на опухоль и колонизацию.

Иммуностимулирующие бактерии, такие как Salmonellatyphi, могут быть выполнены ауксотрофными для аденозина делецией гена tsx (Bucareyetal. (2005) Infection and Immunity 73 (10): 6210-6219) илиделециейpurD (Husseed (2005) Infection and Immunity 73 (3): 1598-1605). В грамотрицательныхбактериях Xanthomonas oryzaebылопоказано, чтоштаммснокаутомгенаpurDауксотрофендляаденозина (Park et al (2007) FEMS Microbiol Lett 276: 55-59).

Как проиллюстрировано в данном документе, штамм S. typhimuriumVNP20009 является ауксотрофным для аденозина за счет удаления purl и, следовательно, дополнительная модификация для придания ему ауксотрофии по аденозину не требуется. Следовательно, варианты иммуностимулирующих бактериальных штаммов, как указано в настоящем документе, являются ауксотрофными для аденозина.

Такие ауксотрофные бактерии избирательно реплицируются в микроокружении опухоли, дополнительно увеличивая накопление и репликацию вводимых бактерий в опухолях, и снижая уровни аденозина в и вокруг опухолей, тем самым уменьшая или устраняя иммуносупрессию, вызванную накоплением аденозина.

Примеры таких бактерий, представленные в данном документе, представляют собой модифицированный штамм Styphimurium, содержащий *purIlmsbB*-мутации, для обеспечения аденозиновойауксотрофии. Другие геномные

мутации также могут быть включены для придания других преимущественных свойств бактериям, как описано в настоящем документе.

c. Штаммы с дефицитом по флагеллину.

Флагеллы – это органеллы на поверхности бактерий, которые состоят из длинной нити, прикрепленной через крюк к двигателю, который может вращаться по часовой стрелке или против часовой стрелки для обеспечения средства передвижения.

Флагеллы в S Typhimurium являются важными для хемотаксиса и для установления инфекции через пероральный путь, за счет способности опосредовать моторику через слизистый слой в желудочно-кишечном тракте.

Хотя было продемонстрировано, что флагеллы требуются для хемотаксиса и колонизации опухолевых цилиндроидов invitro (KasinskasandForbes (2007) CancerRes 67 (7): 3201-3209), и показано, что подвижность важна для проникновения опухоли (ToleyandForbes (2012) IntegrBiol (Camb). 4 (2): 165-176), флагеллынетребуютсядляколонизациионухоли у животных, когдабактериивводятвнутривенно (Stritzker et al (2010) International Journal of Medical Microbiology 300: 449-456).

Каждая флагеллярная нить составлена из десятков тысяч флагеллиновых субъединиц. Хромосома Styphimurium содержит два гена, fliC и fljB, которые кодируют антигенно различимые флагеллиновыемономеры. Мутанты, дефектные как для fliC, так и fljB, являются немотильнымии авирулентными при введении через пероральный путь инфекции, но сохраняют вирулентность при парентеральном введении.

Флагеллин является основной провоспалительной детерминантой Salmonella (Zengetal (2003) JImmunol. 171: 3668-3674), и непосредственно распознается TLRS на поверхности клеток, и NLRC4 в цитозоле (Lightfield*etal.* (2008) *NatImmunol.*9(10):1171-1178).

Оба пути приводят к провоспалительным реакциям, приводящим к секреции цитокинов, включая IL-10, IL -18, TNF-a и IL -6.Были предприняты попытки создания иммунотерапии рака на основе Salmonella более мощными за счет увеличения провоспалительного ответа на флагеллин по конструированию бактерий для секреции флагеллина B Vibriovulnificus , который индуцирует

большее воспаление, чем флагеллин, кодируемый fliC и fljB (Zhengetal (2017) SciTransl. Med. 9 (376): eaak9537).

Предложены иммуностимулирующие бактерии, такие как SalmonellaStyphimurium, сконструированные при отсутствии флагеллиновых субъединиц fliC, так и fljB, для снижения провоспалительной сигнализации. Например, как показано в настоящем документе, штамм Salmonella, лишенный msbB, приводит к уменьшению индукции TNF-альфа, объединяется с нокаутамиfliC и fljB. Полученный штамм Salmonella обладает сочетанием снижения индукции TNF-альфа и снижением распознавания TLR5. Эти модификации, msbB -, fliC- и fljB- могут быть объединены с бактериальной плазмидой, необязательно содержащей CpGs, а также кассетой экспрессии сДНК для обеспечения экспрессии гетерологичного белка (белков) под контролем эукариотического промотора, такого как, например, ингибиторы прироста пути распространения белков, иммуностимулирующие цитокины, и/или также ингибирующая молекула (ы) РНК. Полученные бактерии обладают пониженной провоспалительной сигнализацией и сильной противоопухолевой активностью. Исключение флагелл придает дополнительные преимущественные свойства, которые увеличивают терапевтический индекс бактерий. Например, как показано в данном документе (см. например. Пример 6), устранение флагелл (те в Salmonella, fliC-/ fljBj, уменьшает пироптоз в мышиных макрофагах и в моноцитах человека, приводит к неспособности инфицировать эпителиальные клетки, и ограничивает поглощение бактерий опухолерезидентными иммунными/миелоидными клетками.

Как описано ниже и в другом месте в настоящем документе, делеция флагелл может быть объединена с одной или несколькими другими геномными модификациями, которые придают полезные свойства, которые улучшают терапевтический индекс бактерий, включая, например, asd -, msbB -, purl -, pagP -, csgD -, adrA-и/или другие модификации, как описано в настоящем документе. Такие модифицированные бактерии могут быть трансформированы плазмидой, кодирующей терапевтические продукты, повышающие антиопухолевый или иммунный ответ у субъекта, включая, например, цитозольные датчики ДНК/РНК и их мутанты с усилением функции, а также иммуностимулирующие белки, такие как цитокины.

Например, как представлено в настоящем документе, fliC-и fljB-двойной мутант конструировали в asd-делетированном штамме StyphimuriumVNP20009.

VNP20009, которая аттенуирована на вирулентность посредством нарушения *ofpurkpurM,* сконструирована так, чтобы содержать делецию msbB, что приводит к получению липида А субъединицы LPS, который является менее токсигенным, чем липид дикого типа

Это приводит к уменьшению продукции TNF-a в модели мыши после внутривенного введения, по сравнению с штаммами с липидом дикого типа А. Также конструируют fliC-и fljB-двойной мутант на штамме дикого типа Styphimurium, содержащий делеции asd, purl/purM и msbB.

Полученные штаммы являются примерами штаммов, которые аттенуированы для бактериального воспаления путем модификации липида А для снижения сигнализации TLR2/4, и удаления флагеллиновых субъединиц для снижения распознавания TLR5 и индукции инфламмасом.

Делеция флагеллиновых субъединиц в сочетании с модификацией LPS позволяет большую переносимость в хозяине и направляет иммуностимулирующий ответ на получение иммуностимулирующих белков и/или доставку РНК-интерференции против желаемых мишеней в TME, что вызывает противоопухолевый ответ и способствует адаптивному иммунному ответу на опухоль.

d. Делеция генов в биосинтетическом пути LPS

Липополисахарид (LPS) грамотрицательных бактерий является основным компонентом наружного листка бактериальной мембраны. Он состоит из трех основных частей, липида а, неповторяющегося ядра олигосахарида и О-антигена (или полисахарида О). Антиген О представляет собой крайнюю часть на ЛПС и служит в качестве защитного слоя против бактериальной проницаемости, однако сахарная композиция О-антигена широко варьируется между штаммами. Липид А и олигосахаридное ядро варьируют менее и, как правило, являются консервативными в пределах штаммов одного вида. Липид А представляет собой часть LPS, которая bvttn активность эндотоксина. Обычно он представляет собой дисахарид с множественными жирными кислотами. Эти гидрофобные цепи жирных кислот вводят LPS в бактериальную мембрану, а остальная часть LPS выступает из клеточной поверхности.

Липидный домен ответственен за большую часть токсичности грамотрицательных бактерий. Как правило, LPS в крови распознается в

качестве значимого связанного с патогеном молекулярного паттерна (PAMP) и индуцирует провоспалительный ответ.

LPS представляет собой лиганд для мембраносвязанного рецепторного комплекса, содержащего CD14, MD2 и TLR4.TLR4 представляет собой трансмембранный белок, который может сигнализировать через пути MyD88 и TRF, чтобы стимулировать путь NFIc13 и приводить к продуцированию провоспалительных цитокинов, таких как TNF-a и IL-113, результатом которых может быть эндотоксический шок, который может быть фатальным. ЛПС в цитозоле клеток млекопитающих может связываться непосредственно с доменными доменами CARDкаспаз 4, 5 и 11, приводящими к аутоактивации и пироптозной гибели клеток (Hagaretal. (2015) CellResearch 25: 149-150). Задокументированы состав липида А и токсигенность липидных вариантов. Например, монофосфорилированный липид А является гораздо менее воспалительным чем липид А с множественными фосфатными группами. Количество и длина ацильных цепей на липиде а также могут оказывать сильное влияние на степень токсичности.

Канонический липид а из E. coli имеет шесть ацильных цепей, и это гекса-ацилирование является малотоксичным. Липид Styphimurium аналогичен липиду E coll , представляет собой глюкозамин дисахарид, который несет четыре первичных и две вторичные гидроксиацильные цепи (Raetz и Whitfield (2002) Annu. Rev. Biochem 71: 635-700). Как описано выше, msbB-мутанты Styphimurium не могут подвергаться терминальному миристолированиюLPS и продуцировать преимущественно пента-ацилированный липид А, который значительно менее токсичен, чем гекса-ацилированный 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 ацилаS. typhimurium является переменной, а с бактериями дикого типа может быть гекса-или пента-ацилированная. Способность Styphimuriumпальмитироваться повышает устойчивость к антимикробным пептидам, секретируемым в фаголизосомы.

В случае Styphimurium дикого типа экспрессия pagP приводит к липиду А, который является гепта-ацилированным. В msbB-мутанте (в котором терминальная ацильная цепь липида а не может быть добавлена), индукция pagP приводит к гексаацилированномуLPS (Kongetal. (2011) InfectionandImmunity 79 (12): 5027-5038).

Было показано, что гекса-ацилированный ЛПС является наиболее провоспалительным.В то время как другие группы пытаются использовать этот провоспалительный сигнал, например, посредством делеции pagP, чтобы позволить продуцировать только гекса-ацилированныйLPS (Fisheretal. (2016) GutMicrobis 7 (2): 171-177; Fiegneretal (2018) Oncoimmunology 7 (2): el382791), это может привести к плохой переносимости, вследствие TNF-a-опосредованной провоспалительной природы LPS и парадоксически менее адаптивного иммунитета (Kocijanicetal (2017) Oncotarget 8 (30): 49988-50001).

LPS является сильным агонистом TLR4, который индуцирует TNF-a и IL -6. Лимитирующая предельной токсичностью доза в клиническом испытании IVVNP20009 (Tosoetal. (2002) JClin. Oncol.20 (1): 142-152) при 1E9 CFE/м ^{2} была цитокин-опосредованной (лихорадка, гипотензия), с уровнями TNF-a> 100,000 пг/мл и уровни IL -6 > 10,000 пг/мл в сыворотке в течение 2 часов.

Несмотря на делецию msbB в VNP20009 и ее уменьшенную пирогенность, LPS все еще может быть токсичен в высоких дозах, возможно, из-за присутствия гекса-ацилированногоLPS. Таким образом, штамм pagP/msbB лучше переносится при более высоких дозах, поскольку он не может продуцировать гекса-ацилированныйLPS, и позволит дозировать у человека на уровне или выше 1E9 КОЕ/м ^{2}. Повышение дозировки может привести к увеличению колонизации опухоли, повышению терапевтической эффективности иммуностимулирующих бактерий.

При этом бактерии Salmonella, такие как Styphimurium, сконструированы для отсутствия как флагеллина субъединиц fliC, так и fljB, для снижения провоспалительной сигнализации. Например, как показано в настоящем документе, штамм Salmonella, лишенный msbB, приводит к уменьшению индукции TNF-альфа, объединяется с нокаутами fliC и fljB. Это приводит к созданию штамма Salmonella, который имеет комбинированное снижение

индукции TNF-alpha и снижение распознавания TLR5.Эти модификации могут быть скомбинированы с pagP-и другими геномными модификациями, рассмотренными в данном документе, и полученный бактериальный штамм может быть трансформирован иммуностимулирующей плазмидой (кодирующей иммуностимулирующий белок (и)), необязательно содержащий CpG. Полученные бактерии имеют пониженную провоспалительную сигнализацию, но устойчивую противоопухолевую активность. В качестве примера в настоящем документе представлены живые аттенуированные штаммы Salmonella, такие как примерный штамм Styphimurium, которые могут продуцировать пента-ацилированныеLPS, которые содержат делецию гена msbB (что предотвращает терминальное миристоилирование липида а, как описано выше), и что дополнительно модифицировано делецией pagP (предотвращающей пальмитоилирование). Штамм, модифицированный для получения пента-ацилированногоLPS, обеспечивает 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 терапевтического продукта (ов), такого как гетерологичные иммуностимулирующие белки и/или интерферирующие РНК против, например, иммунных контрольных точек.В настоящем документе, например, мутант pagP также может быть построен на asd, msbB, purl/purM и fliCfljBделетированный штамм StyphimuriumVNP20009, или другие штаммы, как описано в данном документе, или Styphimurium дикого типа. Полученные штаммы являются примерами штаммов, которые аттенуированы для бактериального воспаления путем модификации липида А для снижения сигнализации TLR2/4, и удаления флагеллиновых субъединиц для снижения распознавания TLR5, и удаления pagP с получением пента-ацилированногоLPS.Делеция флагеллиновых субъединиц в сочетании с модификацией LPS позволяет большую переносимость в клетке-хозяине и большую стабильность в крови и устойчивость к фиксации комплемента, обеспечивая улучшенный перенос к участку опухоли, для того чтобы направлять иммуностимулирующий ответ по направлению к продукции любого генного продукта, такого как

иммуностимулирующие белки и/или доставку РНК-интерференции против желаемых мишеней в TME для вызова противоопухолевого ответа и промотирования адаптивного иммунного ответа на опухоль.

e. Делеции в генах, требуемых для образования биопленки

Бактерии и грибы способны образовывать многоклеточные структуры, называемые биопленками. Бактериальные биопленки заключены в смесь секретируемых и клеточных со стенками ассоциированных полисахаридов, гликопротеинов и гликолипидов, а также внеклеточных ДНК, известных в совокупности как внеклеточные полимерные вещества. Эти внеклеточные полимерные вещества защищают бактерии от множественных воздействий, таких как очищающие агенты, антибиотики и антимикробные пептиды.

Бактериальные биопленки обеспечивают колонизацию поверхностей, а также вызывают значительную инфекцию инъекционных портов и катетеров. Биопленки также могут образовываться в тканях во время течения инфекции, что приводит к увеличению продолжительности бактериальной персистенции и ограничивает эффективность антибиотикотерапии. Хроническая персистенция бактерий в биопленках связана с повышенным онкогенезом, например, (DiDomenico*etal.* (2017) *Int. J. Mol. Sci.* 18:1887).Образование биопленки Styphimurium регулируется CsgD. CsgD активирует оперон csgBAC, что приводит к увеличению продукции субъединиц CsgA и CsgB (Zakikhanyetal. (2010) MolecularMicrobiology 77 (3): 771-786). CsgA распознается как PAMP по TLR2 и индуцирует продукцию IL -8 из макрофагов человека (Tukeletal. (2005) MolecularMicrobiology 58 (1): 289-304).Далее CsgD косвенно увеличивает продукцию целлюлозы путем активации гена adrA, который кодирует дигуанилатциклазу.

Низкомолекулярный циклический ди-гуанозинмонофосфат (c-di-GMP), генерируемый apdA, представляет собой повсеместно распространенный вторичный мессенджер, обнаруживаемый почти всеми видами бактерий. AdrA-опосредованное увеличение c-

di-GMP повышает экспрессию гена синтазы целлюлозы bcsA, что, в свою очередь, повышает продуктивность целлюлозы через стимуляцию оперонов bcsABZC и bcsEFG.

Снижение способности иммуностимулирующих бактерий, таких как Styphimurium, к формированию биопленок может быть достигнуто путем делеции генов, вовлеченных в образование биопленки,например, *csgD, csgA, csgB, adrA, bcsA, bcsB, bcsZ, bcsE, bcsF, bcsG, dsbA*or*dsbB*(Anwar*etal.* (2014) *PLoSOne*9(8):e106095).

Styphimurium может образовывать биопленки в солидных опухолях в качестве защиты от фагоцитоза клетками-хозяевами. Мутанты Salmonella, которые не могут образовывать биопленки, быстро воспринимаются фагоцитарными клетками хозяина и очищены от инфицированных опухолей (Crulletal. (2011) CellularMicrobiology 13 (8): 1223-1233).Это увеличение внутриклеточной локализации в фагоцитарных клетках может уменьшать персистенцию внеклеточных бактерий, а также повысить эффективность доставки плазмиды, экспрессии и высвобождения кодированных терапевтических продуктов в TME, а также нокдауна гена посредством РНК-интерференции, как описано в настоящем документе.

Иммуностимулирующие бактерии, сконструированные для снижения образования биопленки, будут увеличивать скорость клиренса из опухолей/тканей и, следовательно, повышать переносимость терапии, и будет предотвращать колонизацию протезирования у пациентов, тем самым повышая терапевтическую пользу этих штаммов. Миметики аденозина могут ингибировать образование биопленки typhimurium, указывающее, что высокая концентрация аденозина в микроокружении опухоли может способствовать образованию связанной с опухолью биопленки (Koopmanetal. (2015) AntimicrobAgentsChemother 59: 76-84).

Как указано в настоящем документе, живые аттенуированные штаммы бактерий, такие как S typhimurium, которые содержат нарушение purl (и, следовательно, колонизируют богатые аденозными опухолями опухоли), и также предотвращают образование биопленок путем делеции одного или более генов, необходимых для образования биопленки, конструируют для доставки плазмид, кодирующих терапевтические продукты, такие как цитозольные датчики ДНК/РНК и их функциональные варианты, и другие иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, и интерферирующая РНК, для стимуляции устойчивого противоопухолевого иммунного ответа.

Ген adrA кодирует дигуанилатциклазу, которая продуцирует с-ди-GMP, который необходим для образования биопленки Styphimurium. с-ди-GMP связывается с и является агонистом для цитозольного белка STING. Иммуностимулирующие бактерии, которые снижены в продукции с-ди-GMP через делецию adrA, являются противоинтуитивными, но бактериальные мутанты, такие как мутанты Styphimurium, которые не способны образовывать биопленки (включая мутанты adrA), продемонстрировали снижение терапевтического потенциала в мышиных моделях опухолей (Crulletal. (201 1) CellularMicrobiology 13 (8): 1223-1233). Несколько человеческих аллелей STING являются неподходящими для связывания бактериально продуцируемых 3'3'CDN (Corralesetal. (2015) CellReports 11: 1018-1030).

Как описано в настоящем документе, бактериальные штаммы, такие как штаммы Styphimurium, которые сконструированы таким образом, чтобы быть ауксотрофными по аденозину, и снижены в их способности индуцировать провоспалительные цитокины путем модификации LPS и/или делеции флагеллина, и/или делеции генов, необходимых для образования биопленки, дополнительно модифицированы для доставки интерферирующих РНК, и других терапевтических, противораковых продуктов, таких как иммуностимулирующие белки, включая цитозольные ДНК/РНК датчики и их функциональные варианты (например. STING и др.) и цитокины, для повышения устойчивых противоопухолевых иммунных ответов.

f. *Salmonella*,сконструированная для выхода сальмонелл, содержащих вакуоль (SCV)

Salmonella, такие как Styphimurium, являются внутриклеточными патогенами, которые реплицируются преимущественно в связанном с мембраной отсеке, называемом сальмонеллу содержащей вакуоль (SCV). В некоторых эпителиальных клеточных линиях и с низкой частотой Styphimurium выходят в цитозоль, где они могут реплицироваться. Сальмонеллы, сконструированные для выхода SCV с более высокой эффективностью, будет более эффективными при доставке макромолекул, таких как плазмиды, в цитозоль клетки-хозяина, так как липидныйбислойSCV- это потенциальный барьер.

Выделение плазмиды в цитозоль хозяина позволяет экспрессировать терапевтические продукты, кодируемые на плазмиде, которые находятся под контролем

распознаваемых хозяином регуляторных сигналов, таких как эукариотические промоторы, повышающие эффективность производства и доставки терапевтических продуктов к TME, в частности, когда бактерии фагоцитируются резидентными иммунными клетками и улучшают терапевтический индекс бактерий.

В настоящем документе предложены штаммы Salmonella и способы, которые имеют повышенную частоту выхода SCV. Как обсуждается ниже и в другом месте в данном документе, это достигается делецией генов, необходимых для образования индуцированного Salmonellaфиламента (SIF). Эти мутанты обладают повышенной частотой выхода SCV и могут реплицироваться в цитозоле клетки-хозяина. Например, было продемонстрировано увеличение доставки плазмиды с использованием мутанта sifA из Styphimurium.

Ген sifA кодирует секретируемый эффекторный белок SPI -2 T3SS -2, который имитирует или активирует семейство RhoA хозяина GTPases (Ohlsonetal (2008) CellHouse&Microbe 4: 434-446). Могут быть нацелены другие гены, кодирующие секретируемые эффекторы, участвующие в образовании SIF. Они включают, например, *sseJ, sseL, sopD2, pipB2, sseF, sseG, spvB usteA.* Повышение выхода Styphimurium путем предотвращения образования SIF высвобождает живые бактерии в цитозоль, где они могут реплицироваться.

Другой способ усиления выхода Styphimurium из SCV и увеличения доставки макромолекул, таких как плазмиды, в цитозоль, представляет собой экспрессию гетерологичного гемолизина, который приводит к образованию пор в, или разрыве, мембраны SCV. Один такой гемолизин представляет собой белок ListerolysinO (LLO) из Listeriamonocytogenes, кодируемый геном hlyA. LLO представляет собой зависимый от холестерина порообразующий цитолизин, который секретируется из *L. monocytogenes*и преимущественно ответственный за выброс фагосомы и вход в цитозоль клеток-хозяев.

Секреция LLO из Styphimurium может привести к выбросу бактерий и приводит к репликации в цитозоле. Для предотвращения выхода интактного Styphimurium из SCV и репликации в цитозоле, нуклеотиды, кодирующие сигнальную последовательность секреции, могут быть удалены из гена, продуцирующего cytoLLO. Таким образом, активный LLO содержится в цитоплазме S Typhimurium и LLO высвобождаются только тогда, когда бактерии подвергаются лизису (например, вследствие отсутствия внутриклеточного DAP в штамме asct).

Бактериальный лизис в SCV обеспечивает высвобождение плазмиды инакопленного цитоLLO, который будет образовывать поры в SCV, обеспечивая доставку плазмиды в цитозоль клетки-хозяина, где указанный кодированный терапевтический продукт (ы) может быть выделен.

Как указано в настоящем документе, штаммы Salmonella, такие как штамм Styphimurium VNP20009, сконструированный для экспрессии cytoLLO для усиления доставки плазмид для экспрессии терапевтических продуктов, таких как STING белки и их варианты, и других иммуностимулирующих белков, может повысить терапевтическую эффективность иммуностимулирующих бактерий. Это является преимущественным, где бактерии сконструированы для накопления в резидентных иммунных клетках, как здесь, при этом выраженные терапевтические продукты высвобождаются непосредственно в опухолевую микросреду.

g. Делеции геновSPI-1 иSPI-2 и/илидругих геновдля устранения способности бактерий инфицировать эпителиальные клетки, включая делецию флагеллы

Как описано выше, патогенез в некоторых видах бактерий, в том числе виды Salmonella, такие как Styphimurium, включает кластер генов, называемых островками патогенности Salmonella (SPI). Styphimurium является внутриклеточным патогеном, который быстро поглощается миелоидными клетками, такими как макрофаги, или может индуцировать свое собственное поглощение в нефагоцитарных клетках, таких как эпителиальные клетки.

Внутри клеток он может реплицироваться в вакуоли, содержащей Salmonella (SCV), и может также выходить в цитозоль некоторых эпителиальных клеток. Два наилучшим образом охарактеризованные островка патогенности представляют собой SPI -1, который отвечает за опосредованную бактериальную инвазию нефагоцитарных клеток, таких как эпителиальные клетки, и SPI -2, который необходим для репликации в SCV (Agbor и McCormick (2011) CellMicrobiol. 13 (12): 1858-1869). SPI -1 и SPI -2 кодируют макромолекулярные структуры, называемые системами секреции (T3SS), которые могут транслоцироватьэффекторные белки через мембрану (Galan и Wolf-Watz (2006) Nature 444: 567-573).

I Salmonella Pathogensisостровка 1 (SPI -1)

i. Островок патогенности *1Salmonella* (SPI-1)

SPI-1-Зависимая инвазия клеток хозяина

Инвазионно-ассоциированный островок 1 патогенности Salmonella (SPI -1), включающий в себя систему секреции 3 типа (T3SS), отвечает за транслокацию эффекторных белков в цитозоль клеток-хозяев, вызывая перестройку актина, что приводит к поглощению Salmonella. Salmonella захватывает нефагоцитарные эпителиальные клетки кишечника с использованием системы секреции 3 типа (T3SS), кодируемой SPI -1, которая образует игольчатую структуру, которая инжектирует эффекторные белки непосредственно в цитозоль клеток-хозяев.

Эти эффекторные белки приводят к перестановке цитоскелета эукариотической клетки для облегчения инвазии кишечного эпителия, а также индуцируют провоспалительные цитокины. Локус SPI -1 включает в себя 39 генов, которые кодируют компоненты этой системы инвазии (см. например, Kimbrough*etal.* (2002) *MicrobesInfect.* 4(1):75-82).

Гены SPI -1 содержат ряд оперонов, в том числе: *sitABCD, sprB, avrA, hilC, orgABC, prgKIIH, hilD, hilA, iagB, sptP, sicC, iacP, sipADCB, sicA, spaOPQRS, invFGEABCII,* and*invH.*

Опероны и гены и их функции описаны и показаны, например, в Kimbrough*etal.* ((2002) *MicrobesInfect.* 4(1):75-82). SPI-1 гены включают, но не ограничиваясь этим: *avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invI, iacP , iagB, spaO, spaP, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgl, prgJ, prgK, sicA, sicP , sipA, sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB, usptP.*

T3SN являются комплексами, играющими большую роль в инфекционности грамотрицательных бактерий, путем инъекции бактериальных белковых эффекторов непосредственно в клетки-хозяева в ATP-зависимом режиме. Комплексы T3SS пересекают внутреннюю и наружную бактериальные мембраны

и создают поры в мембранах эукариотических клеток при контакте с клеткой-хозяином. Они состоят из экспортирующего устройства, игольчатого комплекса и транслокатора на кончике иглы (см. например, Kimbrough*etal.* (2002) *MicrobesInfect.* 4(1):75-82) Игольчатый комплекс включает игольчатый белок Prgl, базальный корпус, который закрепляет комплекс в бактериальных мембранах и состоит из белков PrgH, PrgK и InvG, и других белков, включая

InvH, PrgJ (стержневой белок) и InvJ.Транслоцином, образующим поры в клетке-хозяине, является комплекс белков SipB, SipC и SipD. Устройство экспортирования, которое обеспечивает транслокацию эффекторных белков, состоит из белков SpaP, SpaQ, SpaR, SpaS, InvA, InvC и OrgB.

Цитоплазматическая сортирующая платформа, которая устанавливает конкретный порядок секреции белка, состоит из белков SpaO, OrgA и OrgB (см. например, Manonetal. (2012), Salmonella, Chapter 17, eds.AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364).

Эффекторы, транслоцированные в клетку-хозяина с помощью T3SS -1 (T3SSSPI -1), включаютSipA, SipC, SopB, SopD, SopE, SopE2 и SptP, которые являются существенными для инвазии клеток. Например, мутанты sipA S. Typhimurium имеют пониженную инвазию 60-80%, делеция sipC приводит к 95% снижению инвазии, а делеция sopB приводит к 50% снижению инвазии (см. например, Manonetal (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364).

Другие эффекторы включают в себя AvrA, который управляет Salmonella-индуцированным воспалением. Шапероны, которые связывают секретируемые белки и сохраняют их в конформации, компетентной к секреции, включают SicA, InvB и SicP. Регуляторы транскрипции включают HilA, HilD, InvF, SirC и SprB.

Неклассифицированные белки T3SSSPI -1, которые имеют различные функции в секреции типа III, включают OrgC, InvE, Invl, IacP и IagB (см. например, Kimbrough*etal.* (2002) *MicrobesInfect.* 4(1):75-82).

SPI -1 T3SS является существенным для пересечения эпителиального слоя кишечника, но является расходным для инфицирования при парентеральном введении бактерий. Введение некоторых белков (например, Prgl и PrgJ) и самого игольного комплекса может также вызывать активацию воспаления и пироптоз фагоцитарных клеток.

Эта провоспалительная гибель клеток может ограничивать инициирование устойчивого адаптивного иммунного ответа путем прямого индуцирования гибели антиген-презентирующих клеток (АПС), а также модификации цитокиновой среды для предотвращения образования Т-клеток памяти. Таким образом, инактивация SPI-1-зависимой инвазии, посредством инактивации или нокаута одного или более генов, вовлеченных в SPI -1, устраняет способность бактерий инфицировать эпителиальные клетки, но не влияет на

их способность инфицировать или захватывать фагоцитарные клетки, включая фагоцитарные иммунные клетки, такие как ассоциированные с опухолью миелоидные клетки. Гены SPI-1 включают, но не ограничиваясь этим, один или более из: *avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF , invG,invH, invl, invJ, iacP, iagB, spa0, spaP , spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH,prgl, prgJ, prgK, sicA, sicP , sipA, sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2,sprB,* and*sptP.*

SPI-l-Независимая инвазия клетки-хозяина

Было показано, что мутанты Salmonella, лишенные T3SS -1, внедряют многочисленные клеточные линии/типы, с помощью механизма независимой инвазии T3SS -1, включающего несколько белков, включая инвазиныRck, PagN и HlyE. Оперон rck содержит 6 открытых считывающих кадров:*peft, srgD, srgA, srgB, rcku srgC*. peft кодирует транскрипционный регулятор оперона pef, который вовлечен в биосинтез pefфимбрий.

Эти фимбрии вовлечены в образование биопленки, адгезию к мышиной тонкой кишке и накопление жидкости в детской мыши. SrgA окисляет дисульфидную связь PefA, основную структурную субъединицу Pefфимбрий.

SrgD кодирует предполагаемый регулятор транскрипции; SrgD вместе с Pen функционирует для индуцирования синергетической отрицательной регуляции экспрессии гена флагелл. SrgB кодирует предполагаемый внешний мембранный белок, и srgC кодирует предполагаемый транскрипционный регулятор (см. например, Manonetal (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364).

Rck представляет собой наружный мембранный белок 17 кДа, кодируемый большой вирулентной плазмидой из SEnteritidis и STyphimurium, который индуцирует адгезию к и инвазию эпителиальных клеток, и придает высокий уровень устойчивости к нейтрализации комплементом, за счет предотвращения образования комплекса мембранной атаки.

Мутант rck проявлял 2-3-кратное снижение инвазии эпителиальных клеток по сравнению с штаммом дикого типа, в то время как сверхэкспрессиягск приводит к повышенной инвазии.Rck индуцирует вход в клетки рецептор-опосредованным процессом, способствуя локальному ремоделированию актина и слабым и плотно прилегающим расширениям мембраны.

Таким образом, Salmonella может входить в клетки двумя различными механизмами: триггерный механизм, опосредованный комплексом T3SS -1, и механизм застежки-молнии, индуцированный Rck (см. например, Manonetal (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364).

Показано, что инвазинPagN является внешним мембранным белком, который играет роль в инвазии Salmonella. Экспрессия PagN регулируется phoP. Специфические стимулы, например, подкисленное окружение макрофагов фагосомы или низкие Mg^{2+} концентрации считываются PhoQ, которая затем активирует PhoP для регулирования специфических генов. Показано, что делеция pagN в Styphimurium приводит к 3-кратному снижению инвазии энтероцитов, без изменения адгезии клеток.

Несмотря на то, что PAGN-опосредованный механизм входа не является полностью понятным, было показано, что полимеризация актина необходима для инвазии. Исследования показали, что pagN требуется для выживаемости Salmonella у мышей BALB/c, и что мутант pagN менее конкурентен для колонизации селезенки мышей, чем родительский штамм.

Поскольку pagN активируется PhoP, он главным образом экспрессируется внутриклеточно, где активность участка SPI -1, кодирующего T3SS -1, понижена. Таким образом, возможно, что бактерии, выходящие из эпителиальных клеток или макрофагов, имеют оптимальный уровень экспрессии PagN, но имеют низкую экспрессию T3SS -1, что может опосредовать последующие взаимодействия с другими клетками, встречающимися после разрушения клетки-хозяина, что указывает на роль PagN в патогенезе Salmonella (см. например, Manonetal (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364).

HlyE имеет более 90% идентичности последовательности с гемолизином E.coli (ClyA). Белок HlyEлизирует эпителиальные клетки при экспортировании из бактериальных клеток через высвобождение везикул наружной мембраны и вовлечен в инвазию эпителиальных клеток. HlyE также вовлечен в установление системной инфекции Salmonella (см. например, Manonetal (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364).

В результате, устранение способности бактерий инфицировать эпителиальные клетки также может быть достигнуто путем конструирования иммуностимулирующих

бактерий в данном документе для содержания нокаутов или делеций/нарушений генов, кодирующих белки, вовлеченные в SPI-1-независимую инвазию, такую как один или более генов rck, pagN, hlyE, peflsrgD, srgA, srgB и srgC.

Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, включают гены с делецией или разрушением гена hilA и/или других генов в пути T3SS. При введении этих бактерий, таких как внутривенно или внутримышечно, инфекция фокусируется в сторону фагоцитарных клеток, таких как макрофаги и дендритные клетки, которые не требуют SPI -1 T3SS для поглощения.

Это повышает профиль безопасности иммуностимулирующих бактерий, представленных в данном документе.Предотвращает нецелевую инвазию клеток и предотвращает фекально-оральную передачу. В дополнение к снижению поглощения Salmonellанефагоцитарными клетками, такими как эпителиальные клетки, делеция или разрушение генов в этом пути также увеличивает продолжительность жизни фагоцитарных клеток, за счет предотвращения активации воспаления и пироптоза в макрофагах, таким образом, индуцируя меньшую гибель клеток в макрофагах человека, по сравнению с бактериями, не содержащими делецию в этом пути.

Например, делеция генов в пути SPI -1 (например, белки иглы и стержня) может предотвращать пироптоз путем предотвращения активации воспаления, но поддерживает сигнализацию TLR5. Это, в свою очередь, позволяет пролонгировать секрецию кодированных белков, таких как STING белки или другие терапевтические/противораковые продукты, кодируемые иммуностимулирующими бактериями, предусмотренными в данном документе, и разрешает миграцию макрофагов к опухолям, тем самым улучшая эффективность иммуностимулирующих бактерий.

Как описано в настоящем документе, предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, которые модифицированы таким образом, что они не инфицируют эпителиальные клетки, но сохраняют способность инфицировать фагоцитарные клетки, включая резидентные иммунные клетки, тем самым эффективно нацеливая иммуностимулирующие бактерии, и кодированные терапевтические продукты, в опухолевую микросреду.Это достигается путем удаления или выбивания любого из белков в SPI -1, включая, но не ограничиваясь этим, делеции еще одного из них: *avrA, hilA, hilD, invA,invB, invC, invE, invF, invG, invH, invl, invJ, iacP, iagB, spaO, spaP, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgl, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA, sipB,*

sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB, and*sptP,* aswellasoneormoreof*rck, pagN, hlyE, pefI, srgD, srgA, srgB,* and*srgC.*

Иммуностимулирующие бактерии, не инфицирующие эпителиальные клетки, могут быть дополнительно модифицированы, как описано в настоящем документе, для кодирования терапевтических продуктов, которые стимулируют иммунную систему, включая, например, продукты, которые индуцируют интерферон I типа (например, цитозольные ДНК/РНК датчики и их варианты), а также для кодирования иммуностимулирующих белков, таких как цитокины.

Бактерии, как правило, имеют делецию asd, чтобы сделать их неспособными реплицироваться в хозяине млекопитающего.Например, предложены штаммы Styphimurium, модифицированные делецией одного или более генов SPI -1, а также модифицированные одной или более из делеции purI, делеции msbB и делеции asd, и дополнительно модифицированные путем доставки плазмид, кодирующих терапевтические продукты, такие как белки, стимулирующие иммунную систему, такие как цитозольные ДНК/РНК датчики и их мутанты функцией усиления, которые индуцируют интерферон I типа и/или иммуностимулирующие цитокины.

Например, предложены бактерии с делециями регуляторного гена (например. hilA или invF), необходимые для экспрессии SPI-1-ассоциированной системы секреции 3 типа (T3SS -1), структурного гена T3SS -1 (например, invG или prgH) и/или эффекторного гена 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 более из этих генов устраняет инфицирование/инвазию эпителиальных клеток.Делеция одного или более генов, таких как hilA, обеспечивает иммуностимулирующие бактерии, которые могут вводиться внутривенно или внутримышечно, приводя к инфекции фагоцитарных клеток, которые не требуют SPI -1 T3SS для поглощения, а также продлевает долговечность этих фагоцитарных клеток. Мутация hilA также уменьшает количество провоспалительных цитокинов, повышая переносимость терапии, а также качество адаптивного иммунного ответа.

Дополнительно или альтернативно, иммуностимулирующие бактерии могут содержать нокауты или делеции в генах для инактивации продуктов, вовлеченных в SPI-1-независимую инфекцию/инвазию, такую как один или более генов pagN, hlyE,

peg, srgD, srgA, srgB и srgC, уменьшения или устраняя способности бактерий инфицировать эпителиальные клетки.

Как описано в настоящем документе, гены, вовлеченные в путь SPI -1, и бактериальные флагеллы, активируют воспаляемость в фагоцитарных клетках (иммунные клетки), инициируя пироптоз. Выбивание или разрушение генов SPI -1 и генов, кодирующих флагеллы, уменьшает или устраняет пироптоз, а также исключает инфицирование эпителиальных клеток, что приводит к увеличению инфицирования фагоцитарных клеток.

Таким образом, иммуностимулирующие бактерии могут содержать нокауты или делеции для инактивации продуктов генов, которые индуцируют гибель клеток резидентных иммунных клеток, таких как гены, кодирующие белки, которые непосредственно распознаются инфламмасомами; они включают fljB, fliC, prgI и prg. Как показано в настоящем документе (см. например, пример 6), устранение флагелл (те в Salmonella, (fliC-/ fljB -), уменьшает пироптоз в мышиных макрофагах и в моноцитах человека, чтоприводит к неспособности инфицировать эпителиальные клетки, и ограничивает поглощение бактерий резидентными/миелоидными клетками.

Таким образом, предложены иммуностимулирующие бактерии, которые накапливаются в фагоцитарных клетках, в частности, резидентных иммунных клетках, в которых они экспрессируют продукты, кодируемые на плазмидах, которые управляются эукариотическими регуляторными сигналами, такими как РНК-полимераза II. Продукты включают те, которые вызывают иммунные ответы, такие как пути, повышающие экспрессию интерферонов I типа, которые увеличивают иммунный ответ хозяина в микроокружения опухоли. Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать другие продукты, в том числе иммуностимулирующие белки, такие как IL -2, дополнительно усиливая иммунный ответ в микроокружении опухоли.

ii. Островок патогенности Salmonella 2 (SPI -2)

Salmonella также имеют островок патогенности Salmonella 2 (SPI -2), кодирующий другой T3SS, который активируется после введения бактерии в клетку-хозяина, и интерферирует с созреванием фагосом, что приводит к образованию

специализированной сальмонелл-содержащей вакуоли (SCV), где Salmonella находится во время внутриклеточной выживаемости и репликации.SPI -2 T3SS эффекторы включают SseB, SseC, SseD и SpiC, которые отвечают за сборку F-актинового покрытия вокруг внутриклеточных бактерий; это покрытие актина способствует слиянию SCV с актин-содержащими везикулами и предотвращает его слияние с неблагоприятными отсеками. SIFA отвечает за образование Salmonella-индуцированных филаментов (SIF), которые являются канальцами, которые соединяют отдельные SCV в инфицированной клетке.SifA является существенным для поддержания целостности SCV, и мутанты SifA высвобождаются в цитозоль клеток-хозяев.

SseF и SseG являются компонентами SPI -2 T3SS, которые вовлечены в позиционирование SCV и процессы клеточной транспортировки, которые направляют материалы, необходимые для выживания и репликации бактерий, на SCV. SseF и SseG также вовлечены в образование SIF.Другие эффекторы SPI -2 T3SS включают PipB2, SopD2 и SseJ, которые вовлечены в формирование SIF и SCV, и поддержание целостности вакуоли;SpvC, SceL и SspH1, которые вовлечены в иммунную сигнализацию хозяина; и SteC, SspH2, SrfH/Ssel и SpvB, которые вовлечены в формирование сети SCVF-актина, в миграции инфицированных фагоцитов, в ингибировании полимеризации актина, и при разборке P-тела в инфицированных клетках (Cobumetal (2007)ClinicalMicrobiologyReviews 20 (4): 535-549; FigueiraandHolden (2012)Microbiology 158: 1 147-1161).

Иммуностимулирующие бактерии в данном документе могут включать делеции или модификации в любом из генов SPI -2 T3SS, которые влияют на образование или целостность SCV и связанных структур, таких как SIF. Эти мутанты обладают повышенной частотой выхода SCV и могут реплицироваться в цитозоле. Например, иммуностимулирующие бактерии, такие как виды Salmonella, сконструированные для выхода SCV, более эффективны при доставке макромолекул, таких как плазмиды, в цитозоль клетки-хозяина, поскольку липидный бислойSCV является потенциальным барьером.

Повышение выхода бактерий из SCV путем предотвращения образованияSIF высвобождает живые бактерии в цитозоль, где они могут реплицироваться и экспрессировать кодированные терапевтические продукты или белки под контролем клеточных механизмов (т.е., под контролем эукариотических регуляторных элементов, таких как эукариотические промоторы). Это повышает терапевтическую

эффективность бактерий и достигается делецией или мутацией генов, необходимых для формирования индуцированного Salmonella (SIF), включая, например, sifA -, sseJ, sseL, sopD2, pipB2, sseF, sseG, spvB и steA.

Иммуностимулирующие бактерии, которые могут выходить из SCV, можно дополнительно модифицировать, как описано в настоящем документе, для кодирования продуктов, которые стимулируют иммунную систему, включая, например, продукты, которые индуцируют интерферон I типа, а также кодируют цитокины. Бактерии, как правило, имеют делецию asd, чтобы сделать их неспособными реплицироваться в хозяине млекопитающего.

h. Эндонуклеазы -1 (endA) мутации для увеличения доставки плазмиды

Ген endA (например, SEQIDNO: 250) кодирует эндонуклеазу (например, SEQIDNO: 251), которая опосредует деградацию двухцепочечной ДНК (dsДНК) в периплазме грамотрицательных бактерий. Большинство общих штаммов лабораторных E.coli являются endA, так как мутация в гене endA позволяет повысить выход плазмидной ДНК.

Этот ген сохраняется среди видов.Для облегчения доставки интактной плазмидной ДНК ген endA сконструированных иммуностимулирующих бактерий удаляют или мутируют для предотвращения его эндонуклеазной активности. Примером таких мутаций является замена аминокислоты E208K (Durfee, etal (2008) JBacteriol. 190 (7): 2597-2606) или соответствующая мутации в представляющей интерес форме.

endA, включая e208, является консервативной среди видов бактерий, включая Salmonella (см. например, SEQIDNO: 251).

Таким образом, мутация E208K может быть использована для устранения эндонуклеазной активности в других видах, включая виды Salmonella. Специалисты в данной области могут вносить другие мутации или делеции для устранения активности endA. Осуществление этой мутации или удаление или разрушение гена для устранения активности endA в иммуностимулирующих бактериях, таких как Salmonella, повышает эффективность доставки интактной плазмидной ДНК, тем самым увеличивая экспрессию кодированного терапевтического продукта (ов) и усиливая противоопухолевую эффективность.

RIG-Iсвязывающие последовательности

Как обсуждалось выше, интерфероны типа I (IFN-a, IFN-(3) представляют собой сигнатурные цитокины, индуцированные различными TLR-зависимыми и TLR-независимыми путями сигнализации. Из TLR-независимых путей IFN типа I опосредуется распознавание одноцепочечных (ss) и двухцепочечных (ds) РНК в цитозоле.

Они воспринимаются РНК геликазами, включая ретиноевой кислотой индуцируемый ген I (RIG-I), ген, связанный с дифференцировкой меланомы 5 (MDA -5), и через промоторныйIFN-f3 стимулятор 1 (IPS -1)адапторопосредованного белком фосфорилирования фактора транскрипции IRF -3, приводящее к индукции IFN типа I (IretonandGale (2011) Viruses 3 (6): 906-919). RIG-I распознает dsРНК и ssРНК, содержащие 5'- трифосфаты.

Этот фрагмент может непосредственно связывать RIG-I или ,быть синтезированным из матрицы поли (dA-dT) посредством полиДНК-зависимой РНК-полимеразы III (PolIII) (Chiu, YHetal (2009) Cell 138 (3): 576-91). Шаблон поли (dA-dT), содержащий две динонуклеотидные последовательности АА, встречается на стартовом участке транскрипции промотора U6 в общем векторе клонирования лентивирусноййshRNA.

Его последующая делеция в плазмиде предупреждает активацию IFN типа I (Pebernard et al (2004) Differentiation. 72: 103-111).Последовательность связывания RIG-I может быть включена в плазмиды, предусмотренные в данном документе; это включение может увеличивать иммуностимуляцию, индуцируя продукцию IFN типа I, что повышает противоопухолевую активность иммуностимулирующих бактерий в данном документе.

Ингибирование ДНКазыII

Другая нуклеаза, ответственная за деградацию чужеродной и собственной ДНК, представляет собой ДНКазуII, эндонуклеазу, которая находится в эндосомном отсеке и разрушает ДНК после апоптоза. Отсутствие ДНКазыII (ДНКазы 2а у мышей) приводит к накоплению эндосомальной ДНК, которая выходит в цитозоль и активирует cGAS/STING сигнализацию (LanYYetal. (2014) CellRep. 9 (1): 180-192).

Дефицит ДНКазы у человека представляет собой интерферонопатию аутоиммунного типа I. При раке окрашивающие опухолевые клетки, которые питаются резидентными макрофагами, предотвращают активацию cGAS/STING и потенциальный аутоиммунитет, посредством расщепления ДНКазойII ДНК внутри эндосомного отделения (Ahnetal. (2018) CancerCell 33: 862-873).

Следовательно, варианты иммуностимулирующих бактериальных штаммов, как предусмотрено в данном документе, которые кодируют продукты, которые могут ингибировать ДНКазуII в опухолевой микросреде, могут вызывать накопление эндоцитозированнойапоптотической опухолевой ДНК в цитозоле, где он может действовать в качестве сильнодействующего агониста cGAS/STING.

k. Ингибирование РНКазыH2

В то время как TREX1 (трехосновная репаративнаяэкзонуклеаза 1) и функция ДНКазыII для очистки аберрантного накопления ДНК, РНКаза H2 функционирует аналогично устранению патогенного накопления РНК: гибридов ДНК в цитозоле. Дефициты РНКазы H2 также вносят вклад в аутоиммунный фенотип синдрома Aicardi-Goutieres (Rabe, B (2013) JMol. Med. 91: 1235-1240).

Показано, что потеря Рнказы H2 и последующее накопление РНК: ДНК гибридов или внедренных в геном рибонуклеотидных субстратов активирует cGAS/STING сигнализацию (MacKenzieetal (2016) EMBOJApr 15; 35 (8): 831-44). Следовательно, варианты иммуностимулирующих бактериальных штаммов, которые кодируют продукты, которые ингибируют или снижают экспрессию РНКазы H2, тем самым ингибируя РНКазу H2, приводят к получению гибридов РНК:ДНК, и их производных , которые активируют cGAS/STING сигнализацию и усиливают противоопухолевый иммунитет.

1. Ингибирование Стабилин-1/CLEVER-1

Другая молекула, экспрессируемая преимущественно на моноцитах, и вовлечена в регулирующий иммунитет, представляет собой стабилин -1 (ген STAB1 гена, известный также как CLEVER -1, FEEL-1). Стабилин -1 представляет собой трансмембранный белок типа I, появляющийся на эндотелиальных клетках и

макрофагах после воспаления, и, в частности, на опухолеассоциированных макрофагах (Kzhyshkowskaetal (2006) JCell. Mol. Med.10 (3): 635-649).

При воспалительной активации стабилин -1 действует в качестве поглотителя и способствует заживлению ран , и может предотвратить повреждение тканей, такое как фиброз печени (Rantakarietal. (2016) ProcNatlAcadSciUSA 1 13 (33): 9298-9303). Повышающая регуляция стабилина -1 непосредственно ингибирует антигенспецифические Т-клеточные ответы, а нокдаун по siPHK в моноцитах продемонстрировал усиление их провоспалительных функций (Palani, Setal. (2016) JImmunol. 196: 115-123). Следовательно, варианты иммуностимулирующих бактериальных штаммов, которые кодируют продукты, которые ингибируют или снижают экспрессию стабилин-1/CLEVER -1 в микроокружении опухоли, усиливают провоспалительные функции опухоль-резидентных макрофагов.

m. Звенья CpGи островкиCpG

Неметилированные звенья цитидин-фосфат-гуанозина (CpG) преобладают в бактериях, но не позвоночных, геномной ДНК. Патогенные ДНК и синтетические олигодезоксинуклеотиды (ODN), содержащие CpG звенья, активируют механизмы защиты хозяина, приводящие к врожденным и приобретенным иммунным ответам.

Неметилированные звенья CpG содержат центральную неметилированнуюдинуклеотиднуюCG плюс фланкирующую области.У человека были идентифицированы четыре различных класса CpGODN, основываясь на различиях в структуре и характере иммунного ответа, которые они индуцируют. К-тип ODN (также называемый В-типом) содержат от 1 до 5 звеньевCpG, как правило, на фосфоротиоатном остове. D-типа ODN (также упоминаемые как А-тип) имеют смешанные фосфодиэфирные/фосфоротиоатные остовы и имеют однозвеноCpG, фланкированное палиндромическими последовательностями, позволяющими формировать структуру "стебель-петля", а также звенья поли G на концах 3'и 5 '. С-типа ODN имеют фосфоротиоатный остов и содержат множество палиндромныхpCG-звеньев, которые могут образовывать структуры или димеры стволовой петли.pCGODN класса Р-класса имеют фосфоротиоатный остов и содержат множество звеньев CpG с двойными линкерами, которые

могут образовывать стрижки на их 3'- концах, богатых GC (SchieermannandKlinman (2014), Vaccine 32 (48): 6377-6389).

Для целей настоящего изобретения CpG кодируются в плазмидной ДНК; они могут быть введены в качестве звена или в гене.

Рецепторы (TLR) являются ключевыми рецепторами для восприятия связанных с патогеном молекулярных паттернов (PAMP) и активации врожденного иммунитета против патогенов (Akiraetal (2001) Nat. Immunol. 2 (8): 675-680).TLR9 распознает гипометилированныезвеньяCpG в ДНК прокариот, которые не встречаются естественным образом в ДНК млекопитающих (McKelveyetal (2011) JAutoimmunity 36: 76-86).Распознавание звеньев CpG при фагоцитозе патогенов в эндосомы в подмножествах иммунных клеток индуцирует IRF7-зависимую сигнальную сигнализацию интерферона типа I и активирует врожденный и адаптивный иммунитет.Иммуностимулирующие бактерии, такие как виды Salmonella, такие как штаммы S. typhimurium, несущие плазмиды, содержащие CpG островки/звенья, предложены здесь.
Эти бактерии могут активировать TLR9 и индуцировать IFN-опосредованный врожденный и адаптивный иммунитет. Как проиллюстрировано в настоящем документе, бактериальные плазмиды, которые содержатгипометилированныеCpG островки могут вызывать врожденные и адаптивные противоопухолевые иммунные ответы, которые, в комбинации с кодированными продуктами, такими как вариантные белки STING с усилением функции, могут иметь синергическую или повышенную противоопухолевую активность. Например, ген asd (см. например. SEQIDNO: 48) кодирует высокую частоту гипометилированныхCpG островков.

ЗвеньяCpG могут быть включены в комбинацию с любым из терапевтических продуктов, таких как STING белки и их мутанты, описанные в настоящем документе или указанные в данном документе, в иммуностимулирующих бактериях и, таким образом, усиливают или улучшают иммунный ответ, модулируя TLR, такие как TLR9.

Иммуностимулирующие CpG могут быть включены в плазмиды, включая нуклеиновую кислоту, обычно из бактериального гена (например, asd), которая кодирует генный продукт, а также путем добавления нуклеиновой кислоты, которая

включает CpG звенья. Плазмиды в данном документе могут включать CpG звенья. Иллюстративные звенья CpG известны (см. например, патенты США № 8,232,259, 8,426,375 и 8,241,844).Они включают, например, синтетические иммуностимулирующие олигонуклеотиды, от 10 до 100, 10 и 20, 10 и 30, 10 и 40, 10 и 50, или 10 и 75 пар оснований, имеющие общую формулу: *(CpG)n,* где n -число повторов.

В общем случае используют, по меньшей мере, один или два повторов, при этом основания не CG могут быть вкраплены. Специалисты в данной области техники очень хорошо знакомы с общим использованием CpG-звеньев для индукции иммунного ответа путем модуляции TLR, в частности TLR9.

5. Модификации, которые увеличивают поглощение грамотрицательных бактерий, таких как Salmonella, иммунными клетками, и снижают гибель иммунных клеток

Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, такие как примерные штаммы Styphimurium, могут быть модифицированы для увеличения поглощения иммунных клеток, таких как резидентные иммунные клетки, и для уменьшения поглощения неиммунными клетками, такими как эпителиальные клетки.

Бактерии также могут быть модифицированы для снижения гибели иммунных клеток, так как посредством снижения пироптоза макрофагов. Многочисленные модификации бактериального генома могут выполнять одну или обе из возрастающей инфекции иммунных клеток и снижения пироптоза. Иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные в данном документе, включают в себя такие модификации как, например, делеции и/или нарушения генов, участвующих в пути SPI-1 T3SS, такие как разрушение или делеция hilA, белка стержня и/или белка иглы, и/или разрушение/делеция других бактериальных генов, кодирующих флагеллин. Эти модификации позволяют бактериям накапливаться в резидентных иммунных клетках, где они могут экспрессировать кодированный терапевтический продукт (продукты) и высвобождать их непосредственно в опухолевую микросреду, повышая терапевтическую эффективность.

Кроме того, продлевается срок службы опухоль-резидентных макрофагов, например, за счет уменьшения пироптоза, позволяет эффективно получать кодированные терапевтические продукты, а также активировать иммунный ответ в микроокружении опухоли, дополнительно повышая противоопухолевую терапевтическую эффективность бактерий.

a. Бактериальное поглощение иммунными клетками

Геном иммуностимулирующих бактерий, предусмотренных в настоящем документе, может быть модифицирован для увеличения или усиления инфицирования иммунных клеток, в частности иммунных клеток в микроокружении опухоли, таких как фагоцитарные клетки. Это включает снижение инфицирования неиммунных клеток, таких как эпителиальные клетки, или увеличение инфицирования иммунных клеток.Инвазивный фенотип грамотрицательных бактерий, таких как Salmonella, может привести к активности генов, кодируемых в путях, способствующих инвазии клеток-хозяев.

Связанный с инвазией остров 1 патогенности Salmonella (SPI -1) Salmonella является примерным. SPI -1 включает в себя систему секреции 3 типа (T3SS), которая отвечает за транслокацию эффекторных белков в цитозоль клеток-хозяев. Эти белки могут вызывать перекомпоновки актина, приводящие к поглощению Salmonella.Эффекторы T3SS опосредуют захват Styphimurium в нефагоцитарные клетки-хозяева, такие как эпителиальные клетки. Показано, что SPI -1 T3SS является существенным для пересечения эпителиального слоя кишечника, но является незаменимым для инфицирования при введении бактерий например, парентерально. Мутанты SPI -1 имеют дефекты при инвазии эпителиальных клеток, резко снижая вирулентность полости рта, но воспринимаются обычно фагоцитарными клетками, такими как макрофаги (Kongelal (2012) ProcNatlAcadSciUSA 109 (47): 19414-19419).

Иммуностимулирующие бактерии, такие как штаммы Styphimurium, предложенные в настоящем документе, могут быть сконструированы с мутациями в генах SPI -1 T3SS, предотвращая их поглощение эпителиальными клетками, и фокусируя их на иммунные клетки, такие как макрофаги, такие как опухолеассоциированные макрофаги, усиливающие противоопухолевый иммунный ответ. Дополнительно, как показано в настоящем документе (см. например,, пример 6), устранение флагелл,

приводит к неспособности инфицировать эпителиальные клетки, и ограничивает поглощение бактерий резидентными иммуно-миелоидными клетками. Таким образом, в вариантах осуществления настоящего изобретения иммуностимулирующие бактерии могут быть модифицированы делецией или разрушением генов в SPI -1 T3SS и/или делецией или разрушением генов, кодирующих флагеллы, для предотвращения или уменьшения инфицирования нефагоцитарных клеток (например. эпителиальных клеток) и увеличения или ограничения инфекции резидентных миелоидных клеток.Такие бактерии также могут быть модифицированы плазмидами, кодирующими терапевтический продукт (продукты), такие как те, которые индуцируют IFN типа I, и иммуностимулирующие цитокины, дополнительно усиливающие противоопухолевый иммунный ответ и терапевтическую эффективность путем экспрессии терапевтических продуктов в резидентных иммунных клетках.

b. Пироптоз макрофагов

Макрофаг NLRC4 инфламмасомы, который играет роль в врожденных иммунных и антимикробных реакциях, представляет собой большой многобелковый комплекс, распознающий цитозольные патогены и обеспечивающий автокаталитическую активацию каспазы -1.

Активация каспазы -1 вызывает созревание и высвобождение провоспалительных цитокинов IL-10 и IL -18, и запускает пироптоз, быструю воспалительную форму гибели клеток макрофагов. Эта провоспалительная гибель клеток может ограничивать инициирование устойчивого адаптивного иммунного ответа путем прямого индуцирования гибели антиген-презентирующих клеток (APC), а также модификацию цитокиновой среды для предотвращения образования Т-клеток памяти.

Инфицирование определенными грамотрицательными бактериями, кодирующими 3 или 4 системы секреции, такими как Salmonellatyphimurium и Pseudomonasaeruginosa, инициирует активацию NLRC4 инфламмасомы при распознавании бактериальных лигандов, таких как игольчатый белок, стержневой белок и флагеллин, после транслокации в цитозоль клетки-хозяина посредством островка патогенности 1 системы секреции типа IIISalmonella типа (SPI -1 T3SS).Пироптоз не ограничен макрофагами; каспазы-1-зависимая гибель наблюдается в дендритных клетках после

инфицирования Salmonella (Lietal. (2016) Scientific Reports 6: 37447; Chen et al. (2014) Cell Reports 8: 570-582; Fink and Carrison (2007) Cellular Microbiology 9 (1 1): 2562-2570). Как показано в настоящем документе, выбивание генов в геноме Salmonella, вовлеченных в индукцию пироптоза, усиливает противоопухолевый иммунный ответ. Это предотвращает потерю иммунных клеток, включая макрофаги, после бактериальной инфекции.

Например,гены, кодирующие HilA, стержневой белок (PrgJ), игольчатый белок (Prgl), флагеллин и/или QseC, могут быть выбиты/разрушены в иммуностимулирующих бактериях, представленных в данном документе.

Флагеллин

Как обсуждалось выше, для некоторых видов бактерий, таких как Salmonella, флагеллин, в дополнение к SPI -1 T3SS, необходим для запуска пироптоза в макрофагах, и может быть обнаружен, и активирует, макрофагальные NLRC4 инфламмасомы. Флагеллин, являющийся основным компонентом флагелл, распознается TLR5. Salmonella кодирует два гена флагеллина, fliC и fljB, а устранение флагеллиновых субъединиц уменьшает пироптоз в макрофагах.

Например, STyphimurium с делециями в fliC и fljB приводит к значительному снижению секреции IL-1 по сравнению с штаммом дикого типа, в то время как поглощение клеток и внутриклеточная репликация бактерии остаются незатронутыми. Это демонстрирует, что флагеллин играет существенную роль в активации инфламмасом.

Кроме того, было обнаружено, что штаммы Styphimurium, разработанные для конститутивной экспрессии FLIC, индуцируют пироптоз макрофагов (см. например. Li et al(2016) Scientific Reports 6: 37447; Fink and Carrison (2007) Cellular Microbiology 9 (11): 2562-2570; и Winter et al (2015) Infect. Immun. 83 (4): 1546-1555).

Геном иммуностимулирующих бактерий в данном документе может быть модифицирован для удаления, разрушения или мутации генов флагеллинafliC и fljB в Styphimurium, приводящих к уменьшению гибели резидентных иммунных клеток, таких как макрофаги, и усиления противоопухолевого иммунного ответа иммуностимулирующих бактерий.

i. Белки SPI-1

Белки SPI -1 также активируют NLRC4 в макрофагах, активируют каспазы -1 и приводят к гибели клеток через пироптоз. Эти эффекторы включают, но не ограничиваются ими, стержневой белок (PrgJ) и игольный белок (Prgl), например.

Стержневой белок (PrgJ)

ИнфламмасомаNLRC4 также выявляет афлагеллированнуюStyphimurium. Флагеллин-независимый ответ обусловлен обнаружением PrgJ, который представляет собой стержневой белок SPI -1 T3SS в Styphimurium. Доставка очищенного белка PrgJ к цитозолю макрофагов приводит к быстрой активации NLRC4-зависимой активации каспазы -1, а также секреции IL-1, подобной эффектам, индуцированным флагеллином (Miaoetal. (2010) ProcNatlAcadSciUSA 107 (7): 3076-3080).Таким образом, мутация или нокаут гена, кодирующего PrgJ в Styphimurium, может снизить макрофагальный пироптоз, которыйповышает противоопухолевый иммунный эффект иммуностимулирующих бактерий за счет сохранения иммунных клеток, восприимчивых к уничтожению бактериями.

Игольчатый белок (Prgl)

Prgl, представляющий собой игольчатый белок SPI -1 T3SS в Styphimurium, также распознается и активирует NLRC4 инфламмасому. Доставка STyphimuriumPrl в цитозоль первичных моноцитарных макрофагов человека приводит к секреции IL-1 и последующей гибели клеток. Показано, что мутант Salmonella, экспрессирующий Prgl, но не флагеллин, активизирует инфламмасому в первичных макрофагах, полученных из моноцитов, в более поздние моменты времени, чем штаммы, экспрессирующие флагеллин (Kortmannelal (2015) JImmunol. 195: 815-819). Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, таким образом, могут быть модифицированы для замены или удаления гена, кодирующего игольчатый белок в Styphimurium, для предотвращения пироптоза иммунных клеток и усиления противоопухолевого иммунного эффекта.

iii. **QseC**

Сенсорный белок QseC представляет собой высококонсервативную мембранную гистидинсенсорнуюкиназу, которая обнаруживается во многих

грамотрицательных бактериях, и которая реагирует на окружающую среду и регулирует экспрессию нескольких факторов вирулентности. Эти факторы вирулентности включают, например, ген flhDC, который кодирует главный регулятор биосинтеза флагелл в Styphimurium; ген sopB, который кодирует белок, который играет роль в инвазии нефагоцитарных клеток, раннее созревание и регуляцию переноса Salmonella-содержащего вакуоля (SCV), и ингибирование SCV-лизосом слияния; и ген sifA, который необходим для поддержания SCV и целостности мембраны.

Показано, что селективное ингибирование QseC по LED209 ингибирует бактериальную вирулентность без подавления роста Styphimurium, ингибируяQseC-опосредованную активацию экспрессии, связанной с вирулентностью (например, flhDC, sifA и sopB), и частично защищает мыши от смерти после заражения Styphimurium или Francisellatularensis. Было обнаружено, что блокада QseC ингибирует активацию каспазы -1, высвобождение IL-1, и Styphimurium-индуцированный пироптоз макрофагов, ингибируя избыточную активацию инфламасомм в инфицированных макрофагах.

Ингибирование QseC также подавляет экспрессию и подвижность генов флагелл и подавляет способность к инвазии и репликации Styphimurium в эпителиальных клетках (Lietal. (2016) ScientificReports 6: 37447). Таким образом, модификация иммуностимулирующих бактерий в данном документе, мутацией или нокаутом гена, кодирующего QseC, может усилить противоопухолевый иммунный ответ фокусировкой инфекции STyphimurium на неэпителиальные клетки и снижением гибели клеток в иммунных клетках, так как посредством предотвращения пироптоза в макрофагах.

6. Условия бактериальной культуры

Условия культивирования бактерий могут влиять на их экспрессию генов. Описано, что Styphimurium может индуцировать быстрое провоспалительноекаспазо-зависимую клеточную гибель макрофагов, но не эпителиальных клеток, в пределах от 30 до 60 мин инфекции, механизмом, включающим SPI -1 и связанным с ним T3SS -1 (Lundberget. Al (1999) JournalofBacteriology 181 (11): 3433-3437).Известно, что эта гибель клеток опосредуется активацией инфламмасомы, что впоследствии активирует каспазу -1, что способствует созреванию и высвобождению IL-1 и IL -18 и

инициирует новую форму гибели клеток, называемую пироптозом (BrozandMonack (201 1) Immunol. Rev. 243 (1): 174-190).

Эта пироптическая активность может быть индуцирована с использованием фазовых бактерий, тогда как стационарные фазовые бактерии не индуцируют эту быструю гибель клеток в макрофагах.Индуцируют гены SPI -1 во время роста бактерий. Таким образом, при уборке Styphimurium, для использования терапевтически, на стационарной фазе можно предотвратить быстрый пироптоз макрофагов.

Макрофаги являются важными медиаторами врожденной иммунной системы и могут действовать как секретирующие цитокины, критические для установления соответствующих противоопухолевых реакций.Кроме того, ограничение секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-113 и IL -18, будет улучшать переносимость вводимого Styphimurium при терапии. Как представлено в настоящем документе, иммуностимулирующий Styphimurium, собранный на стационарной фазе, будет использоваться для индукции противоопухолевых реакций.

7. Увеличенная колонизация опухоли

VNP20009 представляет собой аттенуированную микробную терапию на основе Styphimurium, разработанную для лечения рака. VNP20009 ослабляют через делецию генов msbB и purl (purM). Делеция purl делает микробную ауксотрофию для пуринов или аденозина.Делеция гена msbB снижает токсичность, связанную с бактериальным липополисахаридом (LPS), путем предотвращения добавления концевой миристилгруппы в липидный домен A и получения менее токсичной формы липида A (Khanetal (1998) Mol. Microbiol. 29: 571-579).

Имеется различие между мышью и людьми в способности VNP20009 колонизировать опухоли. Системное введение VNP20009 приводило к колонизации опухолей мыши; в то время как системное введение VNP20009 у людей приводит к очень малой колонизации опухоли. Было показано, что у мышей VNP20009 демонстрировал высокую степень колонизации опухоли после системного введения (см. например. Clairmont et al. (2000) J Infect. Dis. 181: 1996-2002; Bermudes et al(2001) Biotechnol Genet Eng Rev. 18: 219-33).

При исследовании фазы 1 у пациентов с развитой меланомой, однако, очень мало VNP20009 обнаруживали в опухолях человека после 30-минутной внутривенной инфузии (см. Tosoetal. (2002). Clin. Oncol. 20: 142-52). Пациенты, введенные в исследование затем, оценивая более длинную, четырехчасовую инфузию VNP20009, также продемонстрировали отсутствие обнаруживаемых VNP20009 после биопсии опухоли (Heimannetal (2003) JImmunother. 26: 179-180).

После внутриопухолевого введения была обнаружена колонизация производного VNP20009 (Nemunatisetal (2003) CancerGeneTher. 10: 737-44). Непосредственное внутриопухолевое введение VNP20009 в опухоли человека приводит к колонизации опухоли, указывая на то, что опухоли человека могут колонизироваться на высоком уровне, и что различие в колонизации опухоли между мышами и людьми происходит только после системного введения.

Штаммы, такие как VNP20009, инактивированы комплементом человека, что приводит к низкой колонизации опухоли. В настоящем документе предложены штаммы, которые обеспечивают улучшенную устойчивость к комплементу. Эти штаммы содержат модификации в бактериальном геноме, а также могут нести плазмиду, обычно в низком или среднем количестве копий, чтобы (необязательно) кодировать гены, чтобы обеспечить репликацию (asd под контролем эукариотического промотора), и нуклеиновую кислоту (ы), кодирующую терапевтический продукт (ы), такой как, но не ограничиваясь ими, цитокины, мутанты белков с функцией усиления, которые стимулируют продукцию интерферона типа I, и другие такие терапевтические гены/продукты, как описано в другом месте в данном документе.

Таблица ниже обобщает генотипы/модификации бактерий, их функциональные эффекты и эффекты/выгоды.

Генотип/Модификац	Функц эффект	Эффект/выгода
Apurl	Пурин/аденозинау	Специфическое обогащение
AmsbB	LPS поверхностнаямол	Уменьшенное узнаваниеTLR4
		цитокиновыйпрофиль(TNF-a)

Штаммы, представленные в настоящем документе, представляют собой AFLG, так что они не имеют флагелл и/или DpagP. Дополнительно штаммы являются одним или

более из Dpurl (DpurM), DmsbB и Dasd (в бактериальном геноме). Модифицируют плазмиду для кодирования продуктов под контролем распознаваемых хозяином промоторов (например. эукариотических промоторов, таких как промоторы РНК-полимеразы II, в том числе у эукариот, и животных вирусов).Плазмиды могут кодировать asd, чтобы обеспечить репликацию invivo, а также нуклеиновые кислоты с другими полезными функциями (например, CpG) и генные продукты, как описано в другом месте в данном документе.

Генотип/Молифик	**Функциональн эффект**	**Эффекты/Преимущества**
		Улучшенная безопасность
AFLG	Нокаут флагеллы	Удаляет основной воспалительныйи иммуносуппрессивный элементРаспознавание
ΔapagP	LPS поверхностнаямо	Удаляет основной воспалительный и иммуносуппрессивный
Δasd(в геноме)	Поддержание	Улучшенная доставка плазмид
Плазмида	Экспрессия генныхпродукт овподконтроле	Эукариотический промотерограничиваетэкспр ессиюв клеткисодержащие плазмиду

Иммуностимулирующие бактерии получены из подходящих штаммов бактерий, в том числе аттенуированных и дикого типа или других неослабленных штаммов. Бактериальные штаммы могут представлять собой аттенуированные штаммы или штаммы, которые аттенуированы стандартными способами, или что благодаря модификациям, представленным в настоящем документе, аттенуированы в том, что их способность колонизироваться ограничена, главным образом, иммуногенными тканями и органами, в частности иммунными и опухолевыми клетками, в том числе солидными опухолями.Бактерии включают, но не ограничиваются ими, штаммы Salmonella, Shigella, Listeria, Ecoli и Bifidobacteriae. Например,онивключают*Shigella sonnei, Shigella flexneri, Shigella dysenteriae,Listeriarnonocytogenes, Salmonella typhi, Salmonella typhirnurium, Salmonella gallinarum,* and *Salmonella*

enteritidis . Другиеподходящебактериивключают*Rickettsia, Klebsiella, Bordetella, Neisseria, Aeromonas, Francisella, Corynebacterium, Citrobacter, Chlamydia, Haemophilus, Brucella, Mycobacterium, Mycoplasma, Legionella, Rhodococcus, Pseudomonas, Helicobacter, Vibrio, Bacillus,* и*Erysipelothrix.* Например, *Rickettsia rickettsiae, Rickettsia prowazekii, Rickettsia tsutsugamuchi, Rickettsia mooseri, Rickettsia sibirica, Bordetella bronchiseptica, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Aeromonas eucrenophila, Aeromonas salmonicida, Francisellatularensis, Corynebacteriumpseudotuberculosis, Citrobacter freundii, Chlamydia pneumoniae, Haemophilus, somnus, Brucella abortus, Mycobacterium intracellulare, Legionella pneumophila, Rhodococcusequi, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter mustelae, Vibrio cholerae, Bacillus subtilis, Erysipelothrixrhusiopathiae, Yersinia enterocolitica, Rochalimaeaquintana,* and *Agrobacteriurntumerfacium.*

Примерами иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, являются виды Сальмонелл. Примеры бактерий для модификации, как описано в настоящем документе, представляют собой штаммы дикого типа Salmonella, такие как штамм, который имеет все идентифицирующие характеристики штамма, депонированного в ATCC как регистрационный № 14028. Сконструированные штаммы Salmonellatyphimurium, такие как штамм YS1646 (ATCCCatalog # 202165; также называемый VNP20009, см. также Международную публикацию PCT WO 99/13053), сконструированные плазмидами, для комплемента нокаута гена asd и содержания свободной от антибиотика плазмиды. Затем модифицируют штаммы для удаления флагеллиновых генов и/или удаления pagP. Штаммы также являются ауксотрофными для пуринов, в частности аденозина, и являются asd ¯ и msbB -. Asd ген может быть предусмотрен на плазмиде для репликации в эукариотическом хозяине. Эти делеции и плазмиды описаны в другом месте в данном документе.

Любые нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтические продукты и иммуностимулирующие белки и другие продукты, описанные в другом месте в настоящем документе и/или известные специалистам в данной области, могут быть включены в плазмиду. Плазмида, как правило, присутствует в количестве копий от низкого до среднего, как описано в другом месте в данном документе.Терапевтические продукты включают

мутанты цитозольных ДНК/РНК датчиков, которые могут конститутивно вызывать/индуцировать экспрессию IFN типа I, и другие иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ в опухолевой микросреде, и другие подобные продукты, описанные в данном документе.

E. НЕ-ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ БЕЛКИ STING И МУТАЦИИ С ФУНКЦИЕЙ УСИЛЕНИЯ В БЕЛКАХ, СТИМУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫЙ ОТВЕТ В ОПУХОЛЕВОЙ МИКРОсРЕДЕ

Предложены иммуностимулирующие бактерии, содержащие последовательности нуклеотидов, которые кодируют генные продукты, которые являются терапевтическими, в частности, противораковыми продуктами, включая продукты, которые способствуют или стимулируют противоопухолевую или противовирусную иммунную реакцию. Среди терапевтических продуктов включены продукты, называемые цитозольными датчиками ДНК/РНК, которые вызывают иммунные ответы при воздействии нуклеиновых кислот, таких как РНК, ДНК, нуклеотиды, динуклеотиды, циклические нуклеотиды, циклические динуклеотиды и другие таких молекулы в цитозоле клеток.

Иммуностимулирующие бактерии в данном документе кодируют модифицированные продукты, которые обладают повышенной активностью или которые конститутивно вызывают иммунные ответы, и не требуют наличия в цитозоле продуктов ДНК/РНК. Примерами являются кодируемые белки, которые включают в себя мутации, повышающие иммунные ответы в микроокружении опухоли.Не только предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, но и другие средства доставки могут быть использованы для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих такие бактерии, иммуностимулирующие белки или для доставки кодированных белков.Эти средства доставки включают экзосомы, векторы и вирусы. Например, онколитические вирусы также могут быть модифицированы для экспрессии целевых продуктов, в частности онколитических вирусов, таких как вирус осповакцины, являющиеся цитоплазматическими вирусами. Кодированные продукты с высоким коэффициентом усиления могут быть доставлены в экзосомы,

липосомы и другие подходящие средства, как правило, нацеленные на опухоли. Иммуностимулирующие бактерии, которые кодируют продукты с функцией усиления (и/или другие терапевтические продукты) включают иммуностимулирующие бактерии, которые предпочтительно инфицируют опухоли, включая резидентные иммунные клетки, и/или иммуностимулирующие бактерии, в которых геном модифицирован таким образом, что бактерии индуцируют меньшую гибель клеток в резидентных иммунных клетках,иммуностимулирующие бактерии накапливают в опухолевых клетках и опухолерезидентных иммунных клетках, чтобы таким образом доставлять конститутивно активные белки и/или другие терапевтические продукты в клетки и опухолевую микросреду, стимулировать иммунный ответ против опухоли.

Иммуностимулирующие бактерии дополнительно могут кодировать опухолевый антиген у субъекта для усиления ответа против конкретной опухоли.Любая из иммуностимулирующих бактерий, предусмотренных в данном документе и описанная выше и ниже, может быть модифицирована для кодирования такого усиления. Продукт кодируется на плазмиде под контролем промотора и любых других желаемых регуляторных последовательностей, распознаваемых в эукариотической, такой как человек, или другого животного, или млекопитающего, субъекта. Как правило, нуклеиновая кислота, кодирующая целевой продукт, находится под контролем промотора РНК-полимеразы II.

Терапевтические продукты включают в себя варианты с функцией усиления, которые включают белки STING и другие белки в сигнальном пути интерферона типа I, как описано в настоящем документе, и другие противораковые продукты, экспрессируются под контролем эукариотического промотора.Промоторы включают, например, промотор EF -1 alpha, CMV, SV40, PGK, EIF4a1, CAG, CD68 и синтетические промоторы MND; вирусные промоторы, такие как промоторы O, MSCV и TLR, и промотор респираторно-синцитиального вируса (RSV); клеточные промоторы, такие как EIF -1 a; индуцируемые химерные промоторы, такие как tet-CMV; и тканеспецифические промоторы (Changetal (2013) ColdSpringHarbProtoc; doi: 10.1101/pdb.tprot075853).

Дополнительно любые из бактерий, описанных в данном документе для модификации, такие 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 аттенуированные штаммы или модифицированные штаммы, экзосомы, липосомы и онколитические вирусы, могут быть модифицированы путем введения плазмид, содержащих, или кодированные на плазмиде в бактериях, нуклеиновые кислоты, кодирующие продукт (продукты) с функцией усиления под контролем промотора РНК-полимеразы, распознаваемого хостом. В клетках инфицированных субъектов экспрессируются продукты с функцией усиления.Иммуностимулирующие бактерии включают те, которые модифицированы, как описано в настоящем документе, для накопления или предпочтительно инфицирования, опухолей и резидентных иммунных клеток. Например, иммуностимулирующие бактерии, которые кодируют продукты с функцией усиления, приводящие к экспрессии, или конститутивной экспрессии интерферона типа I (IFN), такого как IFN-бета, дополнительно модифицированы, чтобы иметь пониженную способность или способность инфицировать эпителиальные клетки, но способны инфицировать фагоцитарные клетки, включая опухолерезидентные иммунные клетки и/или бактерии модифицированы таким образом, что они не убивают инфицированные фагоцитарные клетки. Иммуностимулирующие бактерии в данном документе могут кодировать продукты, называемые цитозольными датчиками ДНК/РНК, которые вызывают иммунные ответы при воздействии нуклеиновых кислот, таких как РНК, ДНК, нуклеотиды, динуклеотиды, циклические нуклеотиды, циклические динуклеотиды, и другие такие молекулы, в цитозоле клеток. е

Иммуностимулирующие бактерии в данном документе кодируют модифицированные продукты, которые конститутивно вызывают иммунные ответы, и не требуют наличия ДНК/РНК и других нуклеотидов в цитозоле. Примерами являются компоненты путей, которые индуцируют экспрессию интерферона типа I.Рассматриваемые в настоящем документе продукты включают модифицированные формы этих ДНК/РНК-датчиков, которые имеют конститутивную активность или повышенную активность (продукты с функцией

усиления), так что интерферон (ы) типа I экспрессируется или продуцируется в отсутствие нуклеотидов, динуклеотидов, циклических нуклеотидов, циклических динуклеотидов и других таких лигандов, в цитозоле клеток. Экспрессия этих модифицированных продуктов в клетках, в частности в опухолевых клетках и опухоль-резидентных иммунных клетках, приводит к конститутивной экспрессии интерферонов I типа, в том числе интерферона-бета, в микроокружения опухоли. Поскольку иммуностимулирующие бактерии, а также онколитические вирусы (и другие средства доставки, как описано в настоящем документе), которые экспрессируют эти продукты, накапливаются в или предпочтительно инфицируют опухолевые клетки и опухолевые иммунные клетки, при этом продукты экспрессируются в микроокружении опухоли, что приводит к увеличению иммунных ответов в микроокружении опухоли и повышению терапевтической эффективности.

Примерные генные продукты, которые могут быть кодированы в иммуностимулирующих бактериях и других носителях, включают, но не ограничиваются ими, белки, смысловые или вовлеченные в врожденные пути, которые распознают цитозольную ДНК/РНК и активируют продукцию интерферона типа I. Белки, участвующие в распознавании врожденного ДНК/РНК, которые активируют интерферон типа I, включают, но не ограничиваются ими: STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-7, TRIM56, RIP1/RIPK1, Sec5/EXOC2, TRAF2, TRAF3, TRAF6, STAT1, LGP2/DHX58, DDX3/DDX3X, DHX9/DDX9, DDX1, DDX21, DHX15/DDX15, DHX33/DDX33, DHX36/DDX36, DDX60, иSNRNP200.

Известны мутации с усилением функции в любом из этих белков, которые приводят к конститутивному типу интерферона I типа, или могут быть идентифицированы, и могут быть доставлены иммуностимулирующими бактериями или другими векторами и доставочными средствами, такими как экзосомы или липосомы, в опухолевую микросреду, посредством инфекции клеток или нацеливанием и связыванием с опухолевыми клетками. Мутации с функцией усиления включают те, которые идентифицированы у индивидуумов с нарушениями, полученными из экспрессии интерферона конститутивного типа I. Примерами продуктов с функцией усиления являются те, которые встречаются у субъектов с интерферонопатией.Как

отмечено выше, мутации могут быть идентифицированы скринингом также для выработки продукции, с функцией усиления.

Иммуностимулирующие бактерии в данном документе кодируют такие белки, такие как STING, включая нечеловеческие белки STING, которые имеют сигнальную активность NF-KB ниже, чем сигнальная активность NF-KB у человеческого STING, и варианты белков STING и других датчиков ДНК/РНК, которые конститутивно вызывают иммунные ответы, и не требуют присутствия ДНК/РНК или других нуклеотидных лигандов в цитозоле. Примерами таких являются компоненты путей, которые индуцируют экспрессию интерферона типа I.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие идентифицированные мутантные продукты с функцией усиления, могут быть дополнительно модифицированы для улучшения свойств для экспрессии. Модификации включают, например, оптимизацию кодонов для повышения транскрипционной эффективности у млекопитающего, в частности человека, такие как снижение содержания GC или динуклеотидаCpG, удаление участков криптического сплайсинга, негативных островков CpG, замену последовательности Shine-Dalgamo (SD) и замену TATA и/или терминальных сигналов для повышения эффективности транскрипции.

Кроме того, кодоны могут быть оптимизированы для повышения эффективности трансляции путем изменения смещения использования кодонов, уменьшения содержания GC, уменьшения вторичной структуры мРНК, удаления участков PolyA, удаления звеньев нестабильности РНК (ARE), уменьшения стабильной свободной энергии мРНК, модификации внутренних участков chi и участков связывания рибосом и уменьшения вторичных структур РНК.

1. Интерфероны и пути I типа

T

Известны пути индукции интерферона типа I, опосредованные распознаванием клеток нуклеиновых кислот, таких как одноцепочечная и двухцепочечная РНК, и циклических ди-нуклеотидов и других таких форм нуклеиновых кислот для индуцированияIFN типа I Также представлен рецептор (TLR)-независимый тип IFN типа I, опосредованный распознаванием одноцепочечных (ss) и двухцепочечных (ds) РНК в цитозоле.

Эти нуклеиновые кислоты воспринимаются РНК геликазами, включая индуцируемый ретиноевой кислотой ген I (RIG-I), ген, связанный с дифференцировкой меланомы 5 (MDA -5), и через промоторный белок-опосредованный IFN-b стимулятор 1 (IPS -1)-опосредованного фосфорилирования фактора транскрипции IRP -3, приводящего к индукции IFN-beta (Ireton и Gale (201 1) Viruses 3 (6): 906-919).

Как рассмотрено в настоящем документе, белки в этих путях могут быть модифицированы или могут существовать в качестве вариантов, которые приводят к конститутивной экспрессии интерферонов типа I (также называемых интерфероном типа 1), которые включают IFN-a и IFN-f3.

В настоящем документе предложены иммуностимулирующие бактерии и другие носители, включающие экзосомы, липосомы и онколитические вирусы, которые кодируют вариантные белки.Эти носители могут быть использованы для лечения рака путем непосредственного введения субъекту и/или путем введения их в клетки, аллогенные или аутологичные, для применения в протоколах клеточной терапии.

Интерфероны типа I (IFN; также называемые интерфероном типа 1) включают IFN-альфа и IFN-бета, и являются плейотропными цитокинами с противовирусной, противоопухолевой и иммунорегуляторной активностью. IFN-бета продуцируется большинством типов клеток; IFN-альфа, прежде всего, продуцируется гематопоэтическими клетками, в частности плазмацитоидными дендритными клетками.

IFN типа I получают после восприятия связанных с патогеном молекулярных паттернов (PAMP), в том числе микробных и вирусных нуклеиновых кислот и LPS (липополисахаридов), по рецепторам распознавания образов (PRR) и цитокинами.

Они вовлечены в врожденный иммунный ответ против патогенов, в том числе вирусных, инфекционных, и представляют собой сильнодействующие

иммуномодуляторы, способствующие проявлению антигена, опосредуют созреванию DC тока, активируют цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), естественные киллерные (NK) клетки и макрофаги, и активируют адаптивную иммунную систему, способствуя развитию высокоаффинныхантигенспецифических Т-и В-клеточных ответов и иммунологической памяти.

IFN типа I проявляет антипролиферативные и проапоптотические эффекты на опухоли и обладает антиангиогенными эффектами на новообразование опухоли. Они индуцируют экспрессию молекул MHC класса I на поверхностях опухолевых клеток, повышают иммуногенность опухолевых клеток и активируют их цитотоксичность. IFN типа I был использован в качестве терапевтического средства для лечения рака и вирусных инфекций.

Например, IFN-a (продаваемый под торговой маркойIntron®/Roferon®-A одобрен для лечения волосистой клеточной лейкемии, злокачественной меланомы, СПИД-связанной саркомы Капоши и фолликулярной неходжкинской лимфомы, а также используется при лечении хронического миелогенного лейкозалейкемии (CML), почечно-клеточной карциномы, нейроэндокринных опухолей, множественной миеломы, нефолликулярнойнеходжкинской лимфомы, десмоидных опухолей и кожной Т-клеточной лимфомы (Ivaskiv и Donlin (2014) Nat. Rev. Immunol. 14 (L): 36-49; Kalliolias and Ivashi (2010) Arthritis Research & Therapy 12 (Suppl): s 1; Lee, Sand Margolin, K (201 1) Cancer 3: 3856-3893). Индуцирующий или вызванный интерферон типа I обеспечивает противоопухолевый иммунитет для лечения рака.

2. Интерферонопатии типа Iи мутанты с усилением функции

Индукция интерферонов I типа (IFN), провоспалительных цитокинов и хемокинов необходима для установки иммунного ответа, предотвращающего или ингибирующего инфицирование патогенами. Этот ответ также может быть эффективным в качестве противоопухолевого агента.

Иммуностимулирующие бактерии и другие носители, предложенные в данном документе, кодируют белки, которые конститутивно индуцируют IFN типа I. Среди этих белков имеются те, которые встречаются у индивидуумов с различными заболеваниями или расстройствами, которые включают в себя более высокую продукцию модуляторов иммунного ответа. Например, чрезмерное продуцирование или дефектное негативное регулирование IFN типа Iи провоспалительных цитокинов может привести к нежелательным эффектам, таким как воспалительные и аутоиммунные заболевания.

Расстройства, включающие в себя сверхпродукцию, в целом хронические, типа I IFN и провоспалительные цитокины, называются интерферонопатией (см. например, LuandMacDougall (2017) *Front. Genet.* 8:118; andKonno*etal.* (2018) *CellReports*23:1112-1123).

Расстройства и клинические фенотипы, связанные с интерферонопатией I типа, включают синдром Aicardi-Gautieres (AGS), STING-ассоциированную васкулопатию с наступлением в детстве (SAVI), синдром Singleton-Merten (SMS), атипичную SMS, семейную красную волчанку (FCL), двусторонний стриатальный некроз (BSN), цереброваскулярную болезнь (CVD), дисхроматоз симметричности (DSH), спастический парапарез (SP), X-связанное ретикулятное пигментное расстройство (XLPDR), протеасомно-ассоциированныйаутовоспалительный синдром (PRAS), внутричерепнуюкальцификацию (ICC), восприимчивость к микобактериальной болезни (MSMD),и испондилогенную дисплазию (SPEND) (см. например, Roderoetal (2016) J ExpMed. 213 (12): 2527-2538).

Эти фенотипы связаны с конкретными генотипами, включающими мутации в генах, приводящих к конститутивной деятельности продуктов, вовлеченных в индукцию IFN типа I.

Замедленная активация интерфероновой сигнализации может быть обусловлена: 1) мутациями с потерей функции, приводящими к повышенной цитозольной ДНК (например. мутации в TREX1 и SAMHD1) или повышенная цитозольная РНК/ДНК гибридов (например, мутации в RNASEH2A,RNASEH2B, RNASEH2C и POLA1);

2) мутации с потерей функции, приводящие к дефекту в редактировании РНК и аномальному восприятию видов РНК самонуклеиновой кислоты в цитозоле (например, мутации в ADAR1); 3) мутации сусилением функции, приводящие к

конститутивной активации сигнальных путей цитозольногоIFN/повышенной чувствительности к лигандамцитозольной нуклеиновой кислоты, (мутации в RIG-I, MD5 и STING); 4) мутации с потерей функции, приводящие к аберрантной РНК-сигнализации через MAVS, вызываемой возмущением развернутой белковой реакции (например, мутации в SKIV2L); 5) мутацию с потерей функции в молекулах, ответственных за ограничение выработки IFN-рецептора (IFNARI/2), приводящую к неконтролируемому продуцированию IFN-стимулированного гена (ISG) (например, мутации в USP18 и ISG 15);

6) протеасомальную дисфункцию, приводящую к увеличению сигнализации IFN через неизвестный механизм (мутации в PSMA3, PSMB4 и PSMB8); и 7) мутации с с потерей функции в TRAP/ACP 5 и Clq, где механизмы, приводящие к сигнализации IFN типа I, остаются неясными (Roderoetal (2016). 1ExpMed. 213 (12): 2527-2538).

Представляющие интерес мутации представляют собой мутации, приводящие к усилению функции. Известны мутации в STING, MD5 и RIG-I, связанные с усилением функции (GOF), приводящие к конститутивной активации кодированных белков и/или повышенной чувствительности или повышенной аффинности или связывания с эндогенными лигандами. С SAVI и FCL связаны GOF-мутации в STING; GOF-мутации в MDAS связаны с AGS и SMS; и GOF-мутации в RIG-I связаны с атипичными SMS.

Иммуностимулирующие бактерии и онколитические вирусы, предложенные в настоящем документе, которые кодируют эти белки с мутациями с усилением функции, используют конститутивную активацию этих белков для увеличения продукции IFN I типа и провоспалительных цитокинов. В настоящем документе предложены иммуностимулирующие бактерии, нацеливающие на опухоль, а также онколитические вирусы и другие носители, которые кодируют STING, MD5 и/или RIG-I с мутациями с функцией усиления.

Такие иммуностимулирующие бактерии и другие средства доставки повышают продукцию IFN I типа и провоспалительных цитокинов в микроокружении опухоли, потенцируя противоопухолевый иммунный ответ и улучшая терапевтическую эффективность иммуностимулирующих бактерий.

Ген, кодирующий STING, упоминается как *TMEA4173,* ген, кодирующий MD5, представляет собой IFIH1, и ген, кодирующий RIG-I, составляет DDX58.Существует

множество аллелей для каждого гена и известные мутации, которые могут происходить в генах с любым из аллелей, что приводит к усилению функции. Мутации, перечисленные ниже, могут происходить по отдельности или могут быть использованы в любой комбинации.

Другие мутации, которые приводят к усилению функции, могут быть идентифицированы с помощью стандартных протоколов скрининга/мутации. В таблице ниже перечислены примерные мутации с усилением функции в каждом из STING/TMEM173 (SEQ ID NOs: 305-309),MDA5/IFIH1 (SEQ ID NO: 310) и RIG-I/DDX58 (SEQ ID NO: 311).

Могут быть введены другие мутации, такие как делеция или замена сайта фосфорилирования или сайтов, такие как 324-326 SLS —>ALA в STING, и другие замены для устранения сайта фосфорилирования для снижения сигнализации ядерного фактора-КВ (NF-КВ) в STING, или другие белки, которые используют такую сигнализацию, также могут быть введены.

Полученные белки могут быть кодированы в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем документе. Белки кодируются на плазмидах в иммуностимулирующих бактериях или могут быть кодированы на геноме онколитического вируса или доставляются через доставочное средство, такое как экзосома или липосома.

Таблицамутантовсфункциейусиления

Примеры нормально	**Мутации с функцией**
STING/TMEM173	S102P
	V147L
	V147M
	N154S
	V155M
	G166E
	C206Y
	G207E
	S102P/F279L
	F279L
	R281Q
	R284G
	R284S
	R284M
	R284K

(SEQ ID NOs: 305-309)	R284T
	R197A
	D205A
	R310A
	R293A

Примеры нормально	Мутации с функцией
	T294A
	E296A
	RI 97A/D205A
	S272A/O273A
	R310A/E316A
	E316A
	E316N
	E316O
	S272A
	R293A/T294A/E296A
	D231A
	R232A
	K236A
	O273A
	S358A/E360A/S366A
	D231A/R232A/K236A/R238
	S358A
	E360A
	S366A
	R238A
	R375A
	S324A/S326A
IVEDA5/IFIHI (SEQ ID NO: 310)	T3311
	T331R
	A489T
	R822O
	G821S
	A946T
	R337G
	D393V
	G495R
	R720O
	R7791-I
	R779C
	L372F
	A452T
RIG-I	E373A
	C268F

Аминокислотные остатки R197, D205, R310, R293, T294, E296, 5272, Q273, E316, D231, R232, K236, S358, E360, S366 и R238, со ссылкой на последовательность STING человека, как изложено в SEQ ID N0: 305-309, соответствуют аминокислотным остаткам 8196, D204, R309, R292, T293, E295, S271, Q272, E315, D230, R231, K235, S357, E359, 5365 и R237, соответственно, со ссылкой на последовательность STING мыши, как изложено в SEQ ID NO: 351.

3. Опосредованная STING иммунная активация

STING (стимулятор генов интерферона), также известный как трансмембранный белок 173 (TMEM173), медиатор активации IRF3 (MITA), метионин-пролин-тирозин-серин (MPYS), и эндоплазматического ретикулума (ER) IFN-стимулятор (ERIS), представляет собой 379 аминокислотный белок, происходящий в эндоплазматическом ретикулуме, и который функционирует в качестве сигнального адаптерного белка, контролирующего транскрипцию генов иммунного ответа, таких как TFN типа I и провоспалительные цитокины.

Стимуляция сигнального пути STING активирует эндотелиальные клетки и индуцирует повышающую регуляцию генов интерферона-ответа, генов пути апоптоза и гибели эндотелиальных клеток в культуре и экспрессии фактора ткани, который является мощным инициатором коагуляционного каскада (Liuetal (2014) N Engl. J Med. 371: 507-518).

За счет его роли в стимуляции выработки IFN и воспаления человеческий STING является иммунотерапевтической мишенью для рака и инфекционных заболеваний. Например, исследования показали, что непосредственная активация STING его лигандами циклических динуклеотидов (CDN) может индуцировать гибель опухоли. В результате опухоли с повышенной экспрессией STING могут быть уничтожены непосредственно за счет активации пути гибели клеток, опосредованного STING.

Активация сигнального пути в дендритных клетках (DC) способствует созреванию DC, что инициирует $CD8^+$ Т-клеточно-опосредованные цитотоксические реакции и генерирует ответ для предотвращения рецидива рака. STING также может повысить терапевтическую эффективность лучевой терапии и химиотерапии за счет выделяемой ДНК, полученной в результате этих обработок.

У мышей эффективность вакцины Pneumovax23® зависит от STING, поскольку вакцина неэффективна в мышиной модели человеческой аллели *HAQ* с потерей функции. CDN теряют свою адъювантную активность у мышей HAQ, демонстрируя роль STING при инфекции.

Сигнализация STING вызывают иммунное распознавание опухолевых антигенов и приводит к сильным противоопухолевым ответам. Проведенные исследования показали, что экспрессия STING и сигнализация подавляются во многих случаях рака, включая колоректальную карциному, и эта потеря сигнализации STING сигнализирует ответные реакции ДНК и противоопухолевую реакцию Т-клеток.

Также теряется/дерегулируется экспрессия STINGво многих первичных и метастатических меланомах и в лимфоме Burkett, раке молочной железы, лейкозе, лимфоме, HPV $^{+}$ раке, HCV-или HBV-связанной гепатоцеллюлярной карциноме и ассоциированном с вирусом раке.

Восстановление STING в линии раковых клеток, таких как 293T и MCF7, которые являются дефектными во внутриклеточной ДНК-сигнализации, спасает внутриклеточный путь и может индуцировать IFN типа I и другие пути сигнальной трансдукции (см. например, публикацию заявки на патент США № 2018/0085432). В результате для иммунотерапии рака разрабатываются агонистические агонисты STING.

Публикация патентной заявки США 2018 /0085432 описывает применение последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих STING дикого типа, для модуляции иммунной системы для лечения заболеваний, таких как вызываемые посторонними агентами, такими как инфекции бактериями, грибами, паразитами и вирусами, а также для индукции противоопухолевого ответа.

STING может быть введен пациентам для лечения рака в виде полинуклеотида, полипептида, пептида, антисмысловогоолигонуклеотида, в векторах, экспрессирующих STING, антитела и т.п. Векторы включают вирусные векторы (аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, VSV и ретровирусы), липосомы, другие липидсодержащие комплексы, и другие макромолекулярные комплексы, способные опосредовать доставку полинуклеотида в клетку-хозяина (публикация US 2018/0085432).

Публикация США 2018 /0311343 описывает введение мРНК, кодирующей конститутивно активный человеческий полипептид STING, с мРНК, кодирующей представляющий интерес антиген, такой как опухоль, вирусный или бактериальный антиген, для того, чтобы привести к иммунной реакции против антигена.

В качестве цитозольного ДНК/РНК-датчика STING играет важную роль в врожденном иммунитете. STING, за счет его взаимодействия с продуктом из цитозольнойdsДНК, «определяет» цитозольнуюdsДНК из инфекционных патогенов или аберрантного повреждения клетки-хозяина.

При выявлении цитозольнойdsДНК через STING требуется циклическая GMP-AMP синтаза (cGAS), нуклеотидилтрансфераза клетки-хозяина, которая непосредственно связывается с dsДНК, и в ответ синтезирует циклического динуклеотида (CDN) второй мессенджер, циклический GPM-AMP (cGAMP), который связывается с и активирует STING (см. например, Barber (2011) *Immunol. Rev.* 243(1):99-108; Sun *et al.* (2013) *Science* 339(6121):786-791; and Wu *et al.* (2013) *Science* 339(6121):826-830).

STING также активируется CDN, синтезированными бактериями в цитозоле, включая циклический ди-GMP и циклический ди-AMP. STINGдимерзуется после связывания с CDN и активирует TANK связывающую киназу (TBK1), которая затем фосфорилирует факторы транскрипции IRF -3 и NF-KB.

Активация IRF3 -, IRF7-и NF-KB-зависимых сигнальных путей индуцирует продуцирование IFN-I3 и других провоспалительных цитокинов, таких как TNF-a, IL -12p40 и IFN-гамма, которые сильно активируют врожденный и адаптивный иммунитет (Burdetteetal (2011) Nature 478 (7370): 515-518).

Аберрантный или вариантный STING, который конститутивно действует без связывания с CDN, происходит у субъектов с интерферонопатией. Таким образом, STINGможет конститутивно индуцировать продукцию IFN типа I. STING кодируется TMEM173.

4. **Аллели***TMEM1 73*

Стимулятор генов интерферона (STING) кодируется трансмембранного белка 173 (TMEA417 3) геном, который представляет собой ген ~ 7 кб. Ген *TMEA417 3* человека характеризуется значительной неоднородностью и расслоением аллелей. Наиболее распространенный аллель TMEA4173 человека обозначается как R232 (ссылка на аминокислоту, присутствующую в остатке 232; см. SEQIDNO: 305-309, задает последовательности различных аллелей *TMEA1173* человека).

Более половины американской популяции относятся не к R232/R232. Второй наиболее распространенный аллель представляет собой R71H-G230A-R293Q (HAQ). Другие общие аллели включают AQ (G230A-R293Q), Q293 и H232. Было обнаружено, что клетки HAQ/HAQ экспрессируют белок STING в очень низкой степени и имеют пониженные уровни транскриптов TMEA1173 по сравнению с клетками R232/R232. R232/R232 является наиболее распространенным генотипом у европейцев, тогда как HAQ/R232 является наиболее распространенным генотипом в восточной Азии.

Африканцы не имеют генотипов HAQ/HAQ, но имеют аллель Q293, и ~ 4% африканцев AQ/AQ, которые отсутствуют в других этнических популяциях. HAQ и H232 являются вероятными по аллелям с потерей функции и 30% восточных азиатов и ~ 10% европейцев имеют HAQ/HAQ, HAQ/H232, или H232/H232 (PatelandJin (2018) Genes&Immunity, doi: 10.1038/s41435-018-0029-9).

4. Конститутивная экспрессия STINGи мутации с усилением функции

Несколько активирующих или (GOF) мутаций с усилением функции в TMEA4173, наследуемых и denovo, были связаны с редким автовоспалительным заболеванием, известным как SAVI (STING-связанная васкулопатия с наступлением в детстве). SAVI

представляет собой аутосомно-доминантную болезнь и характеризуется системным воспалением, интерстициальным легочным заболеванием, кожным васкулитом и рецидивирующей бактериальной инфекцией.

SAVI с мутациями denovo TMEA4173, как правило, характеризуется ранним началом (< 8 недель) и тяжелым фенотипом, в то время как семейные мутации приводят к позднему началу (подростки и взрослые) и мягким клиническим симптомам.

Унаследованные мутации активации TMEA4173 включают G166E и V155M, тогда как мутации denovo включают N154S, V155M, V147M, V147L, C206Y, R284G, R281Q and S102P/F279L (PatelandJin (2018) *Genes&Immunity,* doi:10.1038/s41435-018-0029-9).

Другие активирующие мутации TMEA4173, которые были идентифицированы, включают R284M, R284K, R284T и R375A (патентная публикация США № 2018/0311343).Другая мутация с функцией усиления в TMEA4173 представляет собой R284S, что приводит к высококонститутивно активному STING и было обнаружено, инициирует врожденную иммунную сигнализацию при отсутствии активации CDN, приводя к хроническому продуцированию провоспалительных цитокинов (Konnoetal. (2018) CellReports 23: 1112-1123).

Мутации TMEM1 73, такие как N154S, V155M и V147L, и/или любая из мутаций, перечисленных в таблице выше, по отдельности или в любой комбинации, приводит к STINGc усилением функции, которая является конститутивно активной и гиперчувствительной к стимуляции лиганда, приводящей к хроническому активированию пути STING- интерферон.Это было продемонстрировано (Liuetal. (2014) NEngl. J. Med. 371: 507-518).

Конструкции мутировавшего TMEM173 (с каждой из замен V147L, N154S, V155M и мутант с потерей функции V155R) и немутированныеTMEAll 73 трансфецировали в STING- отрицательные клетки HEK293T и стимулировали с помощью лигандаSTING, cGAMP.

Клетки, трансфицированныеN154S, V155M и V147L мутантами, проявляли высоко повышенную активность IFNB1 (ген, кодирующий IFN-3) активность, которая не была значимо повышена посредством стимуляции с помощью STINGлигандасGAMP .Клетки, трансфицированные мутантом с

потерей функции (V155R), немутировавшимсяTMEM173 или контрольной плазмидой, не имели значительной базовой активации.
Стимуляция cGAMP приводила в результате к реакции зависимым от дозы образом в клетках с немутированнымTMEM173, и привела к минимальному ответу только при самой высокой концентрации cGAMP, в клетках, экспрессирующих мутант с потерей функции (Liuetal. (2014) NEngl. JMed. 371: 507-518).Эти результаты показывают, что активирующие мутации TMEAll 73 приводят к конститутивной активации STING, даже при отсутствии стимуляции cGAMP.
G207E является другой мутацией с усилением функции, которая вызывает алопецию, фоточувствительность, дисфункцию щитовидной железы и SAVI-признаки. Мутация G207E вызывает конститутивную активацию связанных с воспалением путей в клетках HEK, а также аберрантную сигнатуру интерферона и активацию инфламмасомм в мононуклеарных клетках периферической крови пациента (PBMC).

С использованием вариантов STING с аллелемR232 или H232 и мутацией GOFG207E было показано, что после стимуляции CDN вариант R232 + G207E привел к незначительному увеличению активности в путях IFN-0 и STAT1/2, в то время как вариант H232 + G207E, уровень IFN-0 оставался постоянным, и STAT1/2 продемонстрировал пониженную активность.
Оба варианта показали сходную активацию пути STAT3 и NF-KB после стимуляции.Эти результаты показывают, что R в положении 232 является важным для связывания cGAMP и индукции IFN, и показывают, что мутанты G207E приводят к конститутивной активации сигнального пути STING и зависимой от лигандагиперактивации пути NF-KB.

Пациенты с аллелем R232 и G207E имели более тяжелую болезнь; этот полиморфизм усиливает конститутивную активацию мутантного STING, приводя к сверхэкспрессии нижерасположенных мишеней, таких как IFN, IL1-13 и IL -18 (см. например, Keskitaloetal(2018), доступный от: doi.org/10.1101/394353).

67 аминокислот в мышином STING (см. например, SEQ ID NO: 351) были мутированы (Burdetteetal (2011) Nature 478 (7370): 515-518) либо по отдельности, либо

в группах, чтобы идентифицировать аминокислоты, участвующие в циклическом di-GMP (c-di-GMP) связывании и/или индукции IFN. Среди идентифицированных мутантов были гиперактивные мутанты R196A/D204A, S271A/Q272A, R309A/E315A, E315A, E315N, E315QandS271A (соответствующиеR197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316QиS272A, соответственно, соссылкой на последовательность человеческогоSTINGсогласноSEQIDNO:305-309), чтоспонтанноиндуцируютIFNпри низких уровнях трансфекции и не отвечают на c-di-GMP, и мутантыR374A, R292A/T293A/E295A/E299A,D230A, R231A, K235A, Q272A, S357A/E359A/S365A, D230A/R231A/K235A/R237AиR237A (соответственноR375A, R293A/T294A/E296A (нет эквивалентов вE299Ав человеческомSTING), D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238AиR238A, соответственно, со ссылкой на человеческий STING, согласноSEQIDNO:305-309), что индуцирует IFN при сверхэкспрессии, но не реагирует на c-di-GMP.

Введение нуклеиновых кислот, кодирующих STING дикого типа, может индуцировать иммунный ответ; введение мутантовSTINGс усилением функции, обладающих конститутивной активностью, как описано в настоящем документе, в нацеленных на опухоль носителях, приводит к более мощному иммунному ответу и более эффективным противораковым терапевтическим средствам.

Усиленный иммунный ответ путем целенаправленного введения конститутивно активных STING или других таких модифицированных датчиков ДНК/РНК, таких как мутанты с усилением функции MDAS или RIG-I, как указано в настоящем документе, обеспечивает терапевтически более эффективную противораковую обработку.

Например, как описано в настоящем документе, модифицируют иммуностимулирующие бактерии так, что они не инфицируют эпителиальные клетки, но сохраняют способность инфицировать фагоцитарные клетки, включая резидентные иммунные клетки, эффективно нацеливают иммуностимулирующие бактерии на опухолевую микросреду, улучшая терапевтическую эффективность и профилактику нежелательных системных иммунных ответов.

Эти бактерии, нацеленные на опухоль, сконструированы таким образом, чтобы кодировать мутанты STINGс усилением функции, мутанты MDA5 или RIG-I, которые

конститутивно активны, например, даже при отсутствии стимуляции лиганда, обеспечивая сильный ответ IFN типа I для улучшения иммунного ответа против рака в микроокружении опухоли.Таким образом, например, введение конститутивно активированного STING может обеспечить альтернативное средство для усиления сигнализации STING для иммунотерапевтического лечения рака. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуностимулирующие бактерии, нацеленные на опухоль, представленные в настоящем документе, а также онколитические вирусы, могут быть модифицированы для кодированияSTING/TMEM731 (SEQ ID NOs: 305-309) с мутантами с усилением функции, выбранными из S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, R197A, D205A, R197A/D205A, C206Y, G207E, D231A, R232A, K236A, R238A, D231A/R232A/K236A/R238A, S272A, Q273A, S272A/Q273A, F279L, S102P/F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R293A, T294A, E296A, R293A/T294A/E296A, R310A, E316A, E316N, E316Q, R310A/E316A, S324A/S326A, S358A, E360A, S366A, S358A/E360A/S366A, и R375A.

6. НЕЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ БЕЛКИ STING И ИХ ВАРИАНТЫ С ПОВЫШЕННОЙ ИЛИ КОНСТИТУТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И ХИМЕРЫ STING, И ИХ ВАРИАНТЫ С ПОВЫШЕННОЙ ИЛИ КОНСТИТУТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Как обсуждалось выше, цитозольнаядвухцепочечная ДНК (dsДНК) стимулирует продукцию интерферона типа I (IFN) через эндоплазматический ретикулум (ER)-резидентный адаптерный белок (стимулятор IFN-генов), который активирует фактор транскрипции интерферона-фактора 3 (IRF3). В результате индукции типа IfIn и активации дендритных клеток (ДК) и кросс-презентации опухолевых антигенов активируется $CD8^+$ Т-клеточный противоопухолевый иммунитет.

Сигнализация STINGтакже активирует ядерный фактор каппа-свет-цепь усилитель активированной В-клетки (NF-KB) оси сигнализации, что приводит к провоспалительной реакции, но не активацииDC и $CD8^+$ Т-клеткок, что необходимо для противоопухолевого иммунитета.

При распознавании 2'3' cGAMP, STINGтранслоцируют из эндоплазматического ретикулума через аппарат Гольджи, позволяя рекрутировать комплекс TANK-связывающей киназы 1 (TBK1) и активировать факторы транскрипции IRF3 и NF-KB.

Для активации TBK1 и стимуляции фосфорилирования IRF3 необходимо и достаточно для активации TBK1 и стимулировать фосфорилирование IRF3, а также вовлечь в сигнализацию NF-kB.

CTT представляет собой неструктурированный участок приблизительно 40 аминокислот, который содержит последовательность звеньев, необходимых для дегустации фосфорилирования STING и рекрутинга IRF3. IRF3 и NF-KB ниже по ходу сигнализации относят к конкретным звеньям последовательности внутри С-концевого хвоста (CTT) STING, которые являются консервативными среди видов позвоночных. Модульные звенья в CTT, включающие IRF3, TBK1 и TRAF6 связывающие модули, контролируют прочность и специфичность сигнальных и иммунных ответов.

В зависимости от вида и соответствующих характеристик их STINGCTT дискретных элементов могут быть затронуты и иногда противоположены ответные реакции IRF -3 и NF-KB. STING CTT-элементы диктуют и тонко настраивают баланс между двумя сигнальными путями, что приводит к различным биологическим ответам. В иммунных клетках человека и мыши, например,зависимая от STING активация IRF -3 приводит преимущественно к ответу, включающему интерферон типа I.

Сигнализация STING в клетках человека также приводит к проведению провоспалительного ответа через канонические и, возможно, неканонические пути NF-KB через рекрутинг TRAF6.

Остаток S366 STING человека (см. например, SEQ ID N0: 305-309) представляет собой первичный сайт фосфорилирования TBK1, который является частью звена LxIS в CTT, который необходим для связывания IRF3, в то время как второе звено PxPLR, включающее остаток L374, необходимо для связывания TBK1. Звенья LxIS и PxPLR являются высококонсервативными во всех аллелях STING позвоночных.

В других видах сигнальная сигналы STING, преимущественно, приводят к активации сигнальной оси NF-KB. Например, CTT, ответственный за гиперактивацию сигнализации NF-KB, содержит расширение с высококонсервативным звеном pxExxD на крайнем С-конце, который не присутствует в аллелях связывания человека и млекопитающих; это звено имеет сходство с сайтами связывания с рецептором фактора некроза опухоли 6 (TRAF6).В то время как роль TRAF6 в сигнализации

STING человека является несущественной, рекрутинг TRAF6 является существенным для активации NF-KB, индуцированной STING.

Химера STING человек-данио, гдеSTINGчеловека был сконструирован так, чтобы содержать данioSTINGCTT-модуль DPVETTDY, индуцировала более чем активацию, превышающую более чем в 100 раз активацию NF-KB, что указывает на то, что эта область является необходимой и достаточной для прямого повышения активации сигнала NF-kB. Добавление CTT даниотакже приводит к усиленному ответу STING-интерферону (см.deOliveiraMann*etal.* (2019) *CellReports*27:1165-1175).

Различия между видами в балансе между сигнализацией IRF3 и NF-kB используют в данном документе для получения модифицированных STING-белков, которые имеют уменьшенную сигнализацию NF-KB, и/или, необязательно, повышенную сигнализацию IRF3, таким образом, когда белок STING доставляется и экспрессируется в TME, полученный ответ представляет собой повышенную противоопухолевую/противовирусную реакцию, по сравнению с немодифицированным белкомSTING.

В некоторых вариантах осуществления изобретения белки STING из видов, которые имеют малую или не имеют сигнальной активности NF-KB в носителях, включая любые из иммуностимулирующих бактерий, описанных в данном документе или известные специалистам в данной области техники, предусмотрены белки от видов, которые обладают низкой или отсутствием активности сигнализации NF-KB, включая любые из иммуностимулирующих бактерий, описанных в данном документе или известные специалистам в данной области техники, а также в других носителях, таких как вирусные векторы, включая онколитические векторы, миниклетки, экзосомы, липосомы и в клетках, таких как Т-клетки, используемые в клеточной терапии и используемые для доставки средств, таких как бактерии и онколитические векторы.

Нечеловеческиебелкимогутпредставлятьсобой, нонеограничиваютсяими, белки STING следующихвидов: Tasmanian devil *(Sarcophilus harrisii;* SEQ ID NO:331), marmoset *(Callithrix jacchus;* SEQ ID NO:341), cattle *(Bos taurus;* SEQ ID NO:342), cat *(Fells catus;* SEQ ID NO:338), ostrich *(Struthio camelus australis;* SEQ ID NO:343), crested ibis *(Nipponianippon;* SEQ ID NO:344), coelacanth *(Latimeriachalumnae;* SEQ ID NOs:345-346), boar *(Sus scrota;* SEQ ID NO:347), bat*(Rousettus aegyptiacus;* SEQ ID NO:348), manatee *(Trichechus manatuslatirostris;* SEQ

ID NO:349), ghost shark *(Callorhinchus milli;* SEQ ID NO:350), и mouse *(Mus musculus;* SEQ ID NO:351).

Эти белки STING позвоночных легко активизируют иммунную сигнализацию в клетках человека, что указывает на то, что молекулярный механизм STING-сигнализации используется позвоночниками (см. deOliveiraMannetal. (2019) CellReports 27: 1165-1175).

В других вариантах осуществления изобретения белки STING, не являющиеся человеческими, содержат любую из конститутивных экспрессий STING и мутаций в соответствующих локусах в нечеловеческом STING (см. фиг. 1-13, которые представляют иллюстративные сравнения, и пример 28, который обеспечивает соответствующие мутации в различных видах) с таковымив человеческом STING, описаны в разделе 5 выше.

В других вариантах осуществления изобретения предложены химеры белков STING. В химерах область CTT или ее часть, которая придает или участвует в сигнализации/активности NF-KB, первого вида STING белка заменяется соответствующим CTT или его частью (ами) из второго вида, белок STING которого имеет меньшую или очень малую, меньшую, чем человеческую, NF-KB сигнальную активность. CTT от второго вида также, или в качестве альтернативы, обладает повышенной сигнализацией IFN типа I.В целом, первый вид-это человек, а CTT или его часть (и)-от STING вида, такого как Tasmanandevil, marmodset, cat, ostrich, boar, bat, manifory, crestedibis, coelache, и ghostshark,которые имеют намного меньшую активность NF-KB. Таким образом, в результате получается белок STING, который индуцирует интерферон I типа, что является важным для противоопухолевой активности, и который ограничен или не имеет активности NF-KB, что не является желательным в антиопухолевой активности или терапии.Химеры могут дополнительно включать конститутивную экспрессию STING и мутации с усилением функции в соответствующих локусах для увеличения или визуализации конститутивной активности интерферона типа I. Во всех вариантах осуществления звено связывания TRAF6 может быть удалено для дальнейшего снижения или устранения активности, которая не является желательной в противоопухолевой терапии.

Эти нечеловеческие белки STING, химеры и мутанты предоставляются в носителях, таких как любые описанные в настоящем документе или известные специалистам в данной области, включая онколитические вирусные векторы, клетки, такие как стволовые клетки и Т-клетки, используемые в клеточной терапии, экзосомы, минипосылки, липосомы и иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, которые накапливаются в резидентных иммунных клетках, и доставляют кодированные белки в опухолевую микросреду и опухоли.

Нечеловеческие белки STING, модифицированные белки STING и химеры, предназначены для применения в качестве терапевтических средств для лечения опухолей, как описано в настоящем документе, или в других способах, известных специалистам в данной области. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие белки STING, средства доставки и кодирующие нуклеиновые кислоты.

7. Другие генные продукты, которые действуют как цитозольные ДНК/РНК датчики и конститутивные варианты

Другие генные продукты, которые взаимодействуют с цитозольными нуклеиновыми кислотами, представляют собой индуцируемые ретиноевой кислотой ген I (RIG-I)-подобные рецепторы (RLR), которые включают RIG-I и MDA5 (связанный с меланомой белок 5). RLR представляют собой цитоплазматические датчики вирусной dsРНК и нуклеиновых кислот, секретируемых бактериями, и включают RIG-I, MDA5 и LGP2 (лаборатория генетики и физиологии 2). При связывании лиганда, такого как вирусная dsРНК, RIG-I и MD5 активируют митохондриальный противовирусный сигнальный адаптерный белок, или MAVS, который рекрутирует связанные с рецепторами фактора некроза опухоли (TNF)-ассоциированные факторы (TRAF), для сборки сигнального комплекса на наружных мембранах митохондрий.

Далее сигнальные компоненты, рекрутированные TRAF, приводят к фосфорилированию и активации IRF -3 (интерферон-регуляторный фактор 3), IRF -7, NF-KB (ядерный фактор каппа-легкая цепь-энхансер активированных B-клеток) и AP -1 (активирующий белок 1). В результате индуцируется экспрессия IFN, провоспалительных цитокинов и других генов, вовлеченных в удаление патогена (см. например. LuandMacDougall*(2017) Front. Genet.* 8:118).

Таким образом, конститутивная активация MD5 и RIG-I за счет мутаций с усилением функции приводит к индукции IFN типа I, что может быть использовано для усиления противоопухолевого иммунного ответа у иммуностимулирующих бактерий и онколитических вирусов.

b. MDA5/IFIH1

Другой ген интерферонопатии представляет собой IFN-индуцированный геликазой C домен-содержащий белок 1 (IFIH1), известный также как связанный с меланомой белок 5 (MDA5), являющийся членом RIG-I-подобного семейства цитоплазматических рецепторов РНК DExD/H, кодируемый IFIH1, представляет собой 1025 аминокислотный цитоплазматический рецептор-распознаватель, который воспринимает вирусную двухцепочечную РНК (dsРНК) и секретируемые бактериальные нуклеиновые кислоты в цитоплазме, и активирует сигнализацию IFN типа I через адаптерную молекулу, MAVS (митохондриальный антивирусный сигнальный белок).MAVS рекрутирует фактор некроза опухоли (TNF)-ассоциированные факторы (TRAF), которые, в свою очередь, рекрутируют ниже по потоку компоненты сигнализации, приводящие к фосфорилированию и активации IRF -3 (интерферон-регуляторный фактор 3), IRF -7, NF-KB (ядерный фактор каппа-легкая цепь-энхансер активированных B-клеток) и AP -1 (активаторный белок 1). Это приводит к экспрессии IFN, провоспалительных цитокинов и других генов, вовлеченных в удаление патогена (Rutsch*etal.* (2015) Am. *J. Hum. Genet.* 96:275-282; Rice *et al.* (2014) *Nat. Genet.* 46(5):503-509; Lu and MacDougall *(2017) Front. Genet.* 8:118).

Вариантысусилениемфункции (GOF) IfIH1 встречаютсяусубъектовсаутоиммунныминарушениями, включаясиндром Aicardi-Goutieres (AGS) и Singleton-Mertenсиндром (SMS),

характеризующиесявыраженнымсосудистымвоспалением. AGS представляет собой воспалительное заболевание, в частности воздействующее на головной мозг и кожу, и характеризуется повышающей регуляцией интерферон-индуцированных транскриптов.

AGS обычно происходит из-за мутаций в любом из генов, кодирующих ДНК экзонуклеазы TREX1, трех неаллельных компонентов комплекса эндонуклеазы РНКазы H2, дезоксинуклеозидтрифосфаттрифосфогидролазу SAMHD1, и двухцепочечный РНК редактирующий фермент ADAR1.

Некоторые пациенты с AGS не имеют мутаций в любом из этих шести генов, но имеют GOF мутации в IFIH1, что указывает на то, что этот ген также участвует в AGS. Синдром Singleton-Merten (SMS) представляет собой аутосомно-доминантное расстройство, характеризующееся аномалиями в кровеносных сосудах (например. кальцификация), зубов (например, периодонтит с ранним началом, резорбция корней) и костей (например,, остеопения, акро-остеолиз, остеопороз). Гены сигнатур интерферона повышаются у пациентов с SMS, которые были связаны с мутациями GOF в IFIH1 (Rice*etal.* (2014) *Nat. Genet.* 46(5):503-509; Rutsch*etal.* (2015) Am. J. *Hum. Genet.* 96:275-282).

Стимулирующую активность INF-0 IFIH1 дикого типа и шесть мутантов IFIH1 GOF идентифицированных в пациентах AGS (R720Q, R779H, R337G, R779C, G495R, D393V)

сравнивали в клетках HEK293T, которые показывают низкие уровни эндогенных вирусных рецепторов РНК. IFIH1 дикого типа был индуцирован при связывании длинного (> 1 kb) аналога dsРНК полиинозиновой-полицитидиловой кислоты, (polyI:C), но не коротким 162 bpdsРНК, и имел минимальную активность в отсутствие эндогенной РНК. Мутанты IFIH1 показывали значительную индукцию сигнализации IFN в ответ на короткую dsРНК 162bp, в дополнение к сильной сигнализации в ответ на polyI:C.

Мутанты также демонстрируют 4-10-кратное повышение уровня базовой сигнальной активности в отсутствие экзогенного лиганда (Rice*etal.* (2014) *Nat. Genet.* 46(5):503-509).

Другая мутация IFIH1 с усилением функции, R822Q, была идентифицирована как вызывающая SMS, инициируя продукцию IFN типа I, и приводя к ранней артериальной кальцификации, а также к воспалению и резорбции зубов.

HEK293T (которые имеют самые низкие уровни экспрессии эндогенного IFIH1) использовали для сверхэкспрессии дикого типа и R822Q MDAS.Экспрессия IfIH1 дикого типа привела к увеличению экспрессии IFNB1 (интерферон, beta 1, фибробласт) зависимым от дозы образом, тогда как мутированный IFIH1 привел к примерно в 20 раз больше экспрессии IFNB1.

Последующая стимуляция аналоговым поли (TC) dsRNA, R822Q IFIH1 приводит к более высоким уровням экспрессии IFNB1, чем IFIH1 дикого типа, что указывает на то, что R822Q IFIH1 гиперактивен.Также была повышена экспрессия генов сигнатуры интерферона, таких как *IFI27 , IFI44L, IFIT 1, ISG 15 , RSG 15 , RSAD2 uSIGLEC 1* в образцах цельной крови из SMS пациентов, что было в соответствии с более высоким уровнем экспрессии IFNB1 на R822QIFIH1 (Rutschetal (2015) AmJHum. Genet. 96: 275-282).

Сигнатура интерферона, наблюдаемая у пациентов с другой мутацией IFIH1 GOF, A489T, указывает на интерферонопатию I типа; IFIH1 A489T ассоциируется с повышенным продуцированием интерферона и фенотипами, напоминающими красноволновую волчанку, AGS и SMS (Burssztejnetal (2015) Br. J Dermatol. 173 (6): 1505-1513). Вариант A489T не только приводит к индукции IFN после стимуляции аналогового поли (I: C) длинным dsРНК, но также коротким dsРНК. У пациентов с фенотипами SMS выявлено две дополнительные мутации с усилением функции в IFIH1, T3311 и T331R, которые представляют значительную повышающую регуляцию IFN-индуцированных транскриптов. Варианты T3311 и T331R привели к увеличению экспрессии IFN-beta, даже при отсутствии экзогенного лигандadsРНК, согласующегося с наблюдаемой конститутивной активацией MDAS (LuandMacDougall*(2017) Front. Genet.* 8:118).A946T-другая мутация IFIH1 GOF, что приводит к увеличению продукции IFN типа I, способствующему воспалению и повышению риска аутоиммунитета. Мутация A946T в IFIH1 приводит к аддитивным эффектам при их объединении cTMEA1173 R232 аллелью и G207E GOF-мутацией, приводящей к выраженному фенотипу раннего начала с признаками, аналогичными SAVI (Keskitalo*etal.* (2018) препринт, доступный отdoi.org/10.1101/394353).

G821S представляет собой GOF-мутацию в IFIH1, которая, как было показано, приводит к спонтанно развитым волчанкоподобным аутоиммунным симптомам в модели мыши (Rutschetal. (2015) Am J Hum. Genet. 96 : 275-282), в то время как IFIH1 -мутации A452T, R779H и L372F, идентифицированные у индивидуумов с AGS, были показаны для того, чтобы вызвать избыточную продукцию интерферона типа I (Odaetal. (2014) Am J Hum. Genet. 95: 121-125).

Нацеленные на опухоль иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, а также онколитические вирусы, могут быть модифицированы для кодирования MDAS/IFIH1 (SEQ ID NO: 310) с мутациями с функцией усиления, выбранными из T331I, T331R, R337G, L372F, D393V,A452T, A489T, G495R, R720Q, R779H, R779C, G821 S, R822Q и A946T, по отдельности или в любой комбинации.

c. RIG 1

Ген ретиноевой кислоты I (RIG-I), также известный какDDX58 (DEXD/H-boxгеликаза 58), представляет собой другой белок, конститутивная активация которого связана с развитием интерферонопатий, таких как атипические SMS. RIG-I, такой как MDA5/IFIH1, является членом семейства RIG-I-подобного рецептора (RLR) и представляет собой имеющий 925 остатков рецептор, который функционирует при обнаружении вирусной dsPHK.RIG-I инициирует врожденный иммунный ответ на вирусную РНК через независимые пути, способствующие экспрессии IFN типа I и типа III и провоспалительных цитокинов (Jangetal (2015) Am J Hum. Genet. 96: 266-274; Lu и MacDougall (2017) Front. Genet. 8: 118). Было обнаружено, что атипичное SMS, без признаков зубных аномалий, но с переменными фенотипами, включая глаукому, кальциноз аорты и скелетные аномалии, вызывается мутациями в гене DEXD/H-boxгеликаза 58 (DDX58), который кодирует индуцируемый ретиноевой кислотой ген I (RIG-I). В частности, мутации E373A и C268F в DDX58 были идентифицированы как вызывающие усиление функции в RIG-I. Повышенные количества мутированных DDX58 связаны со значительным увеличением базальных уровней активности репортерного гена NF-KB, и эта активность дополнительно повышена посредством стимуляции аналоговым poly(I:C)dsPHK.

Мутации RIG-I также вызвали IRF -3 фосфорилирование и димеризацию на базальном уровне, и привели к повышенной экспрессии IFNB1, интерферон-стимулированного гена 15 (ISG15) и лиганда 5 хемокина (CCL5) как в базальных, так и в поли (I:C) трансфицированных клетках HEK293FT.Эти результаты показывают, что мутированная DDX58/RIG-I приводит к конститутивной активации, что приводит к увеличению активности IFN и стимулированной IFN-экспрессии (Jangetal. (2015) Am J Hum. Genet. 96: 266-274; Lu и MacDougall (2017) Front. Genet. 8: 118).

Иммуностимулирующие бактерии, нацеленные на опухоль, и онколитические вирусы, предложенные в настоящем документе, могут быть модифицированы для кодирования RIG-I/DDX58 (SEQ ID NO: 311) с мутациями с функцией усиления, такими как, но не ограничиваясь, E373A и C268F, по отдельности или в комбинации.

d.IRF-3 иIRF-7

Ассоциированные с патогеном молекулярные паттерны (PAMP) распознаются рецепторами распознавания образов (PRR), такими как рецепторы RIG-I-подобные, RIG-I и MDA5, что приводит к передаче сигналов ниже по потоку через факторы транскрипции IRF -3, IRF -7 и NF-KB, что приводит к получению IFN типа I, IRF -3 (интерферон-регуляторный фактор 3) и IRF-7 -ключевые активаторы генов INF типа I

После индуцированного вирусом С-концевого фосфорилирования (через TBK1) активированный IRF -3 и IRF -7 образуют гомодимеры, транслоцируют из цитоплазмы в ядро и связываются с IFN-стимулированными ответными элементами (ISRE) для индуцированияIFN-ответов типа I. IRF -3 конститутивно экспрессируется в нестимулированных клетках и существует в виде неактивной цитоплазматической формы, в то время как IRF -7 не конститутивно экспрессируется в клетках и индуцируется IFN, липополисахаридом и вирусной инфекцией.

Сверхэкспрессия IRF -3 значительно увеличивает опосредованную вирусом экспрессию генов IFN типа I, что приводит к индукции противовирусного состояния. Также было показано, что активация IRF -3 подавляет транскрипцию CC-хемокиновых RANTES (CCL5) после вирусной инфекции (Linetal. (1999) Mol. CellBiol. 19 (4): 2465-2474).

Остатки S385, S386, S396, S398, S402, T404 и S405 в С-терминальном домене IRF -3 фосфорилированы после вирусной инфекции, индуцируя конформационное изменение, которое приводит к активации IRF -3. Активация IRF -3 индуцируется не только вирусной инфекцией, но и липополисахаридом (LPS) и поли (I:C).

Из семиаллелей, которые могут быть фосфорилированы в С-терминальном кластере IRF -3, одноточечная мутация, S396D, достаточна для генерации конститутивно активной формы IRF -3. IRF -3 (S396D), усиливает трансактивацию промоторов IFNal, IFN-beta и RANTES в 13, 14 и 11 раз, соответственно, по сравнению с IF -3 дикого типа.Другой мутант IRF -3 (S396D/S398D) усиливает трансактивациюIFNal, IFN-beta и RANTES промоторами по 13 -, 12-и 12-кратно, соответственно, по сравнению с IRF -3 дикого типа.

Другой конституитивно активный мутант IRF3 представляет собой IRF -3 (5D), в котором сериновые или треониновыеостатки в положениях 396,398,402, 404 и 405

заменены на фосфомиметические остатки аспарагиновой кислоты (IRF -3 (S396D/S398D/S402D/T404D/S405D)).

Аналогичные мутации с функцией усиления, приводящие к конститутивной активности медиаторов иммунного ответа, таких как индукция интерферона типа I, могут быть достигнуты путем мутации сериновых остатков в фосфомиметрическую аспарагиновую кислоту в других белках, таких как RIG-I, MDA5 и STING, которые находятся в сигнальных путях иммунного ответа.

IRF -3 (5D) отображает конститутивную активность связывания и трансактивации ДНК, образование димера, ассоциацию с коактиваторами транскрипции p300 (также называемую EP300 или E1A-связывающим белком p300)/CBP (также известную как CREB-связывающий белок или CREBBP), и ядерную локализацию. Ее трансактивизационная активность не индуцируется далее вирусной инфекцией. IRF -3 (5D) является очень сильным активатором экспрессии гена IFN-13 и ISG15; IRF -3 (5D) отдельно стимулирует экспрессию IFN-13 так сильно как вирусная инфекция, и усиливает трансактивациюIFNal, IFN-fl и RANTES промоторами в 9 раз, 5,5 и 8 раз, соответственно, по сравнению с IRF -3 дикого типа (см. например, Linetal (2000) J Biol. Chem 275 (44): 34320-34327; Lin et al (1998) Mol. Cell Biol. 18(5):2986-2996; Servant *et al.* (2003)1 *Biol. Chem.* 278(11):9441-9447).

Любые из положений S385, S386, S396, S398, S402, T404 и S405 могут быть мутированы, по отдельности или в комбинации, для получения конститутивно активных мутантов IRF -3 в иммуностимулирующих бактериях, онколитических вирусах и других агентах доставки, таких как экзосомы, представленные здесь. Конститутивно активные формы IRF -7 включают мутанты, в которых различные С-концевые серины замещены фосформиметическимAsp, включая IRF -7 (S477D/S479D), IRF -7 (S475D/S477D/S477D), и IRF -7 (S475D/S476D/S477D/S477D/S483D/S487D). IRF -7 (S477D/S479D) представляет собой сильный трансактиватор экспрессии гена IFNA и RANTES и стимулирует экспрессию генов, даже при отсутствии вирусной инфекции. IRF -7 (S475D/S477D/S479D) и IRF -7 (S475D/S476D/S477DS483D/S487D) не дополнительно увеличивают активность трансактивации IRF -7 (S477D/S479D), но трансактивизационную активность всех 3 мутантов стимулируют далее вирусной инфекцией.

Мутант IRF -7 (A247-467), который локализуется в ядре в неинфицированных клетках, представляет собой очень сильную конститутивную форму IRF -7; активирует транскрипцию более чем в 1500 раз выше чем для IF -7 дикого типа в нестимулированных и вирус-инфицированных клетках (Linetal.(2000) J Biol. Chem 275 (44): 34320-34327).

Иммуностимулирующие бактерии, вирусы и другие агенты доставки, такие как экзосомы, представленные в данном документе, могут кодировать и экспрессировать конститутивно активные мутанты IRF -7, в том числе с заменами по остаткам 475-477,

479, 483 и 487, и с делециями аминокислот.Иммуностимулирующие бактерии кодируют эти белки на плазмидах под контролем промоторов и любые другие требуемые регуляторные сигналы, распознаваемые в млекопитающих, включая человека.

8. Другие регуляторные белки IFN типаI

Другие белки, участвующие в распознавании ДНК/РНК, которые активируют IFN типа I, могут быть мутированы для выработки конститутивного типа I IFN. Немодифицированные и/или модифицированные белки могут быть кодированы в иммуностимулирующих бактериях, онколитических вирусах и других носителях таких как экзосомы и липосомы, предусмотренные в данном документе, для использования для доставки белка к микросреде опухоли, такой как опухоль-резидентные иммунные клетки, для повышения экспрессии IFN типа I.

Эти белки включают, но не ограничиваются ими, белки, обозначенные как TRIM56,RIP1, Sec5, TRAF2, TRAF3, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, и SNRNP200.

Ген	Кодированный белок	Активность/Функция
TRIM56	Тройнойсодержащий	ПромотируетдимеризациюSTINGв ответ
	убикитин-белоклигаза TRIM56	ПотенциализируетвнеклеточнуюdsРНК-индуцированнуюэкспрессиюIFNB1 иIFN-
RIP 1/RIPK1	Взаимодействующий с рецептором	Передает сигналы воспалительные и гибели (программированный некроз) после лигации рецепторов гибели, активация
Sec5 (EXOC2)	Exocystкомплексном понент 2	Компоненткомплекса, включенного встыковкувезикулс сайтами слияния на
TRAF2	TNFсвязанный с	типа 1 получение Регулирует активацию NF-
TRAF3	TNFсвязанный с рецептором фактор 3	Регулирует активациюNF-KBиMAPкиназ; Опосредует активациюIRF-3;
TRAF6	TNFсвязанный с рецептором фактор 6	АктивируетNF-KB, JUNи AP-1; индуцируеттипаIIFNполучениев ответ

STAT1	Передатчик сигнала и активатор	Образует часть фактора транскрипции ISGF3, которыйприсоединяет элементы
LGP2 (DHX58)	Лаборатория генетики и	Регулирует опосредованную RIG-I/DDX58 иIFIH1/MDASантивирусную
DDX3 (DDX3X)	АТР-зависимая геликаза DDX3X	Промотирует полученииетипа IIFN; действует как вирусный сенсор РНК;

Ген	Кодированный белок	Активность/Функция
		для индуцированиясигнализации на
DHX9/DDX9	DExD/H-boxгеликаза 9 / ATP-зависимаяРНКгеликаза А	Чувствителен к вирусным нуклеиновым кислотам; запускает ответ хозяина на не-selfДНКMyD88-зависимым способом; взаимодействует
DDX1	ATP-зависимаяРНКгеликазаDDX1	Компонент комплекса мультигеликаза-TRIFкоторый чувствителен к вирусной
DDX21	НуклеоларнаяРНКгеликаза 2	Компоненткомплексамультигеликаза-TRIF
DHX15 (DDX15)	Пре-mРНК-фактор сплайсингаATP-	Сенсор вирусной РНК, который взаимодействует с MAVS, индуцирует
DHX33 (DDX33)	ATP-зависимаяРНКгеликазаDHX33	Сенсор вирусной dsРНК, который взаимодействует с MAVSи запускает
DHX36 (DDX36)	ATP-зависимая ДНК/РНКгеликаза	Компонент комплекса мультигеликаза-TRIF который чувствителен к вирусной
DDX60	ВероятнаяATP-зависимаятРНКгеликазаDDX60	Чувствителен к вирусной РНК и ДНК;образует комплекс с RIG-I-подобными рецепторами, промотируя
SNRNP200	U5 малыйнуклеарн	Чувствителен к/присоединяетвирусную РНКивзаимоде

Сайт-направленный мутагенез может быть выполнен invitro для идентификации мутаций с повышенной активностью, что приводит к более высокому уровню и/или конститутивной экспрессии IFN типа I. Интактная геномная ДНК может быть получена из неродственных пациентов, испытывающих аутоиммунные и аутовоспалительные симптомы, и от здоровых индивидуумов, для наблюдения и идентификации других продуктов, экспрессия которых приводит к увеличению или конститутивной экспрессии IFN типа I. Может быть выполнено цельное секвенирование экзосом, а интроны и экзоны

могут быть проанализированы, так что идентифицируются белки с мутациями в путях, связанных с повышенной или конститутивной экспрессией интерферона типа I.

После идентификации мутаций молекулы кДНК, кодирующие полноразмерный ген, с идентифицированной мутацией (мутациями) трансфицируют в клеточную линию, измеряющую экспрессию интерферона типа I.Например, может быть создана клеточная линия, где экспрессия люциферазы размещена под промотором для IFN-beta.

Мутант с функцией усиления, который конститутивно активен, будет способствовать экспрессии IFN-f3, тогда как нестимулированный белок дикого типа не будет. Стимуляция может быть вирусной инфекцией, бактериальной инфекцией, бактериальными нуклеиновыми кислотами, LPS, dsPHK, поли (I: C) или путем увеличения экзогенных уровней лиганда белка (например. CDN).

Идентифицированные белки также включают те, которые усиливают иммунный ответ на представляющий интерес антиген (ы) у субъекта. Иммунный ответ содержит клеточный или гуморальный иммунный ответ, характеризующийся одним или более из: (i) стимуляции сигнального пути интерферона типа I; (ii) стимуляции сигнального пути NF-KB; (iii) стимуляции воспалительного ответа; (iv) стимуляции выработки цитокинов; (v) стимуляции развития дендритных клеток, активности или мобилизации; (vi) любые другие ответы, указывающие на продукт, экспрессия которого усиливает иммунный ответ; и (vii) комбинацию любого из (i)-(vi).

9. Другие терапевтические продукты

Иммуностимулирующие белки

Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, включая хемокины, которые усиливают или стимулируют или вызывают противоопухолевый иммунный ответ, особенно при экспрессии в опухолях, в опухолевой микросреде и/или в резидентных иммунных клетках. Иммуностимулирующие бактерии в настоящем документе могут быть модифицированы для кодирования иммуностимулирующего белка, который способствует или индуцирует или усиливает противоопухолевый ответ. Иммуностимулирующий белок может быть кодирован на плазмиде в бактериях, под контролем эукариотического промотора, такого как промотор, распознаваемый РНК-полимеразой II, для экспрессии в эукариотическом субъекте, в частности, у субъекта, для которого иммуностимулирующая бактерия предназначена для введения, например человека.

Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок, может включать в дополнение к эукариотическому промотору другие регуляторные сигналы для экспрессии или переноса в клетках, например, для секреции или экспрессии на поверхности клетки.

Иммуностимулирующие бактерии в настоящем документе могут быть модифицированы для кодирования иммуностимулирующего белка, который способствует или индуцирует или усиливает противоопухолевый ответ. Иммуностимулирующий белок может быть закодирован на плазмиде в бактериипод 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 клетках, например, для секреции или экспрессии на поверхности клетки.

Иммуностимулирующие белки представляют собой те, которые в соответствующей среде, такой как опухолевая микросреда (TME), могут способствовать или участвовать в или усиливать противоопухолевый ответ 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 этим, CD40, CD40L, 0X40, OX40L, 4-1BB, 4-1BBL, элементы суперсемейства TNF/TNFR и членов семейства B7-CD28.

Другие такие 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 техники, предполагаются для кодирования в иммуностимулирующих бактериях, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии в настоящем документе сконструированы для экспрессии цитокинов для стимуляции иммунной системы, в том числе, но не в качестве ограничения, IL -2, IL -7, IL -12 (IL -12 p70 (IL -12 p40 + IL -12 p35)), IL -15 (и IL -15: IL -15 R альфа-цепи) и IL -18. Цитокины стимулируют иммунные эффекторные клетки и стволовые клетки на участке 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 CXCL1 1.Примеры этих модификаций и бактерий представлены ниже.

Иммуностимулирующие бактерии, кодирующие цитокины и хемокины

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии в настоящем документе сконструированы для экспрессии цитокинов для стимуляции иммунной системы, в том числе, но не в качестве ограничения, IL -2, 1L -7, IL -12 (IL -12 p70 (IL -12 p40 + IL -12 p35)), IL -15 (и IL -15: IL-15R альфа-цепи) и IL -18.

Цитокины стимулируют иммунные эффекторные клетки и стволовые клетки на участке 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. Иммуностимулирующие белки представляют собой те, которые в соответствующей среде, такой как опухолевая микросреда (TME), могут способствовать или участвовать в или усиливать противоопухолевый ответ у субъекта, которому вводят иммуностимулирующую бактерию. Иммуностимулирующие белки включают, но не ограничиваются ими, цитокины, хемокины и костимулирующиемолекулы.

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 этим, CD40, CD40L, 0X40, OX40L, 4-IBB, 4-1 BBL, элементы суперсемейства TNF/TNFR и членов семейства B7-CD28.

Другие такие 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 техники, предполагаются для кодирования в иммуностимулирующих бактериях, представленных в данном документе.

Геном иммуностимулирующих бактерий, предусмотренных в настоящем документе, также может быть модифицирован для увеличения или усиления инфицирования иммунных клеток, в частности иммунных клеток в микроокружении опухоли, таких как фагоцитарные клетки. Бактерии также могут быть модифицированы для снижения пироптоза в иммунных клетках.Иммуностимулирующие бактерии включают такие, например, которые имеют модификации, которые нарушают/ингибируют путь SPI -1, такие как разрушение или делеция hilA, и/или разрушение/делеция генов флагеллина, стержневого белка, игольчатого белка и/или pagP, как подробно описано и проиллюстрировано в другом месте настоящего документа.

IL-2

Интерлейкин -2 (IL -2), который является первым цитокином, одобренным для лечения рака, вовлечен в активацию иммунной системы по несколькиммеханизмам, включающим активацию и стимулирование роста CTL, генерирование лимфокин-активированных киллерных (LAK) клеток, стимулирование роста клеток Treg и пролиферацию, стимуляцию ТЛ ипромотирование Т-клеток, В-клеток и NK-клеточной пролиферации и дифференцировку. Рекомбинантный IL -2 (rIL -2) является FDA-одобренным для лечения метастатической почечно-клеточной карциномы (ПКР) и метастатической меланомы (Sheikhi*etal.* (2016) *Iran J. Immunol.* 13(3):148-166).

IL-7

IL -7, являющийся членом суперсемействаIL -2, вовлечен в выживаемость, пролиферацию и гомеостаз Т-клеток. Было показано, что мутации в рецепторе IL -7 приводят к потере Т-клеток и развитию тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID), выделяя критическую роль, что IL -7 играет в развитии Т-клеток.IL -7 представляет собой гомеостатический цитокин, который обеспечивает непрерывные сигналы для поддержки Т-

клеток, и который накапливается в условиях лимфопении, что приводит к увеличению как пролиферации Т-клеток, так и Т-клеточного разнообразия.

По сравнению с IL -2 IL -7 является селективным для расширения $CD8^+$ Т-клеток над $CD4^+FOXP3^+$ регуляторными Т-клетками. Показано, что рекомбинантный IL -7 дополняет антиген-специфические ответы Т-клеток после вакцинации и адоптивной клеточной терапии у мышей. IL -7 также может играть роль в стимуляции восстановления Т-клеток после химиотерапии трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Ранние фазовые клинические испытания на пациентах с распространенным злокачественным новообразованием показали, что рекомбинантный IL -7 хорошо переносится и имеет ограниченную токсичность при биологически активных дозах (т.е. в которых число циркулирующих $CD4^+$ и $СД8^+$ Т-клеток увеличивается в 3-4 раза (Lee, S и Margolin, K (2011)Cancers 3: 3856-3893).

Показано, что IL -7 обладает противоопухолевыми эффектами в опухолях, таких как глиомы, меланомы, лимфомы, лейкоз, рак предстательной железы и глиобластома, а введение IL -7 invivo в мышиных моделях приводит к снижению роста раковых клеток.

Также было показано, что IL -7 усиливает противоопухолевые эффекты IFN-gamma в опухолях глиомы крыс и индуцирует продуцирование IL-la, IL-Ib и TNF-a моноцитами, что приводит к ингибированию роста меланомы.Кроме того, введение рекомбинантного IL -7 после лечения педиатрической саркомы приводит к стимулированию иммунного восстановления (Linetal. (2017) AnticancerResearch 37: 963-968).

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

Биоактивный IL -12 (IL -12 p70), который способствует клеточно-опосредованному иммунитету, представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц p35 и p40, в то время как мономеры IL -12 p40 и гомодимеры действуют как антагонисты IL -12. IL -12, секретируемый антигенпрезентирующими клетками, способствует секреции IFN-gamma из NK и Т-клеток, ингибирует опухолевый ангиогенез, приводя к активации и пролиферации NK-клеток, $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток, усиливает дифференцировку клеток $CD4^+$ ThO в клетки Th1 и способствует антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) против опухолевых клеток.

Показано, что IL -12 проявляет противоопухолевые эффекты в мышиных моделях меланомы, карциномы толстой кишки, карциномы молочной железы и саркомы (Kalinskietal. (2001) Blood 97: 3466-3469; Sheikhi et al (2016) Iran J Immunol. 13 (3): 148-166; Lee, S и Margolin, K (2011) Cancers 3: 3856-3893).

IL-15 иIL-15:IL-15Ra

IL -15 является структурно сходным с IL -2, и хотя и IL -2 и IL -15 обеспечивают раннюю стимуляцию пролиферации и активации Т клеток, IL -15 блокирует индуцированный апоптоз IL -2, который представляет собой процесс, который приводит к устранению стимулированных Т-клеток и индукции Т-клеточной толерантности, ограничивая ответы Т-клеток памяти и потенциально ограничивая терапевтическую эффективность только IL -2. IL -15 также поддерживает персистенцию $CD8^+$ Т-клеток памяти для поддержания длительного противоопухолевого иммунитета и продемонстрировали значительную противоопухолевую активность в предклинических мышиных моделях посредством прямой активации $CD8^+$ эффекторные Т-клетки независимо от антигена.

Дополнительно к $CD8^+$ Т-клеткам, IL -15 отвечает за развитие, пролиферацию и активацию эффекторных природных киллерных (NK) клеток (Lee, S и Margolin, K (2011) Cancers 3: 3856-3893; Hanetal (2011) Cytokine 56 (3): 804-810).

IL -15 и IL-15-рецептор альфа (IL -15 Ra) координационно экспрессируются антигенпрезентирующими клетками, такими как моноциты и дендритные клетки, и IL -15 представлен intrans посредством IL -15 Ra в комплекс IL -15nyc, экспрессируемый на поверхностях $CD8^+$ Т-клеток и NK-клеток.

Было показано, что растворимые комплексы 1L -15: IL15-Ra модулируют иммунные ответы через комплекс IL -15nyc, а биологическая активность IL -15 увеличивается в 50 раз путем введения его в предварительно сформированный комплекс ИЛ -15 и растворимого IL -15 Ra, который имеет увеличенный период полужизни по сравнению с самим ИЛ -15.

Это значительное повышение терапевтической эффективности IL -15 путем предварительной ассоциации с IL -15 Ra было продемонстрировано в мышиных моделях опухоли (Hanetal.(2011) Cytokine 56 (3): 804-810).

IL-18

IL -18 индуцирует секрецию IFN-гамма NK и CD8 Т-клетками, повышая их токсичность. IL -18 также активирует макрофаги и стимулирует развитие Th1 хелперныхCD4 $^{+}$ Т-клеток. IL -18 обладал перспективной противоопухолевой активностью в нескольких доклинических мышиных моделях. Например, введение рекомбинантного IL -18 (rIL -18) приводило к регрессии меланомы или саркомы у сингенных мышей путем активации CD4 $^{+}$ Т-клеток и/или NK-опосредованных клетками ответов.

Другие исследования показали, что противоопухолевые эффекты IL -18 опосредованы IFN-гамма и вовлечены в 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.

Клинические испытания I фазы у пациентов с развитыми солидными опухолями и лимфомами показали, что введение IL -18 было безопасным, и что приводит к иммуномодуляторной активности и увеличению уровней IFN-гамма и GM-CSF в сыворотке у пациентов и умеренных клинических реакций. Клинические испытания показали, что IL -18 можно комбинировать с другими противораковыми терапевтическими агентами, такими как моноклональные антитела, цитотоксические лекарственные средства или вакцины (Fabbietal (2015) JLeukoc. Biol. 97: 665-675; Lee, S и Margolin, K(2011) Cancers 3: 3856-3893).

Было обнаружено, что аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium, сконструированный для экспрессии IL -18, ингибировал рост подкожных (s.c.) опухолей или легочных метастаз у сингенных мышей без каких-либо токсических эффектов после системного введения. Лечение этой сконструированной бактерией вызывало накопление Т-клеток, NK-клеток

и гранулоцитов в опухолях, и приводит к внутриопухолевой продукции цитокинов (Fabbietal (2015) JLeukoc. Biol. 97: 665-675).

Хемокины

Хемокины представляют собой семейство малых цитокинов, которые опосредуют миграцию лейкоцитов в области повреждения или воспаления и участвуют в опосредовании иммунных и воспалительных реакций. Хемокины классифицируются на четыре подсемейства, исходя из положения остатков цистеина в их последовательностях, а именно XC -, CC -, CXC-и CX3C-хемокиновыелиганды, или XCL, CCL, CXCL и CX3CL. Хемокиновыелиганды связываются с их родственными рецепторами и регулируют циркуляцию, хоминг и удержание иммунных клеток, причем каждая пара хемокиновыйлиганд-рецептор избирательно регулирует определенный тип иммунной клетки. Различные хемокины притягивают разные лейкоциты популяции и образуют градиент концентрации invivo, с привлеченными иммунными клетками, движущимися через градиент в сторону более высокой концентрации хемокина(ArgyleD. andKitamura, T. (2018) *Front. Immunol.* 9:2629; Dubinet*etal.* (2010) *CancerJ.* 16(4):325-335). Хемокины могут улучшить противоопухолевый иммунный ответ за счет увеличения инфильтрации иммунных клеток в опухоль и облегчения перемещения антиген-презентирующих клеток (APC) в опухоль-дренирующие лимфатические узлы, которые являются Т-клетками и В-клетками (Lechneretal. (2011) Immunotherapy 3 (11): 1317-1340). Иммуностимулирующие бактерии в настоящем документе могут быть сконструированы для кодирования хемокинов, в том числе, но не в качестве ограничения, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11.

CCL3, CCL4, CCL5

CCL3, CCL4 и CCL5 имеют высокую степень гомологии, и связываются с CCR (CCL3, CCL4 и CCL5) и CCR1 (CCL3 и CCL5) на нескольких типах клеток, включая незрелые DC и Т-клетки, как у людей, так и мышей.

Было показано, что терапевтические Т-клетки индуцируют хемотаксис врожденных иммунных клеток на участки опухоли, через опухолеспецифическую секрецию CCL3, CCL4 и CCL5 (Dubinettetal. (2010) CancerJ 16 (4): 325-335).

Индукция реакции Т-хелперного типа 1 (Thl) высвобождает CCL3. Invivo и invitro исследования мышей показали, что CCL3 является хемотактическим для обоих нейтрофилов и моноцитов; в частности CCL3 может опосредовать мобилизацию миелоидного предшественника (MPC) из костного мозга и имеет регуляторные и стимулирующие эффекты MPC.

Клетки карциномы яичника человека, трансфицированные CCL3, продемонстрировали усиленную инфильтрацию Т-клеток и макрофагов в пределах опухоли, приводящую к улучшенной противоопухолевой реакции, и показали, что CCL3-опосредованный хемотаксис нейтрофилов подавлял рост опухоли.

DC, трансфицированныеопухолеассоциированным геном меланомы человека (MAGE)-1, которые были рекрутированы с помощью CCL3, проявляли превосходный антиопухолевые эффекты, включая повышенную пролиферацию лимфоцитов, цитолитическую способность, выживаемость и снижение роста опухоли в мышиной модели меланомы.

Также при лечении рака желудка используют комбинаторное применение CCL3 с антигенспецифической платформой для MAGE -1. CCL3-продуцирование CT26, высокоиммуногенная опухоль мышиной толстой кишки, замедляющая рост опухоли invivo; этот процесс был указан как приводимый в действие CCL3-зависимым накоплением естественных клеток-киллеров (NK), и, таким образом, IF гамма, в результате чего получают CXCL9 и CXCL10 (Allen*etal.* (2017) *Oncoimmunology*7(3):e1393598; Schaller*etal.* (2017) *ExpertRev. Clin. Immunol.* 13(11):1049-1060).

CCL3 используется в качестве адъюванта для лечения рака.

Введение активного варианта CCL3, ECI301, после радиочастотной абляции в гепатоцеллюлярной карциноме мыши увеличивает опухолеспецифические ответы, и этот механизм дополнительно показан в зависимости от экспрессии CCR1. CCL3 также продемонстрировал успех в качестве адъюванта при системных случаях рака, при этом мыши, вакцинированные CCL3 и IL -2 или гранулоцитарно-макрофаговымколониестимулирующим фактором (GM-CSF) в модели лейкоза/лимфомы, проявляли повышенную выживаемость (Schalleretal (2017) ExpertRev. Clin.Immunol. 13 (11): 1049-1060).

CCL3 и CCL4 играют роль в направлении инфильтрации $CD8^+$ Т-клеток в первичные участки опухоли при раке меланомы и толстой кишки. Образование опухоли CCL4 приводит к накоплению $CD103^+$ DC; подавление CCL4 через WNT/бета-катенин-зависимый путь предотвращает $CD103^+$ DC-инфильтрацию опухолей меланомы (Sprangeretal. (2015) Nature 523 (7559): 231-235). Также показано, что CCL3 усиливает $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточную инфильтрацию к первичному участку опухоли в мышиной 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 и клетки памяти и Т эффекторные клетки из циркуляции в участки воспаления или инфекции. Например, экспрессия CCL5 в колоректальных опухолях способствует хемопривлечению и выживанию Т-лимфоцитов. CCL3 и CCL5 используют отдельно или в комбинированной терапии для индукции регрессии опухоли и иммунитета в нескольких доклинических моделях.

Например, исследования показали, что подкожная инъекция клеток яичника китайского хомячка, генетически модифицированная для экспрессии CCL3, приводит к ингибированию опухоли и инфильтрации нейтрофилов. В другом исследовании рекомбинантная онколитическая аденовирусная экспрессия CCL5 (Ad-RANTES-E1A) привела к первичной регрессии опухоли и блокированному метастазированию в мышиной модели карциномы молочной железы (Lechneretal. (2011) Immunotherapy 3 (11): 1317-1340).

При поступательном исследовании колоректального рака, CCL5 индуцируют «противовирусную ответную картину» в макрофагах. В результате опосредованной CXCR3 миграции лимфоцитов на инвазивном краю метастазов в печень при колоректальном раке получают CCL5.

Блокада рецептора CCR5, рецептора CCL5, приводит к гибели опухоли, что приводится в действие макрофагами, продуцирующими IFN и реакционноспособные виды кислорода.В то время как макрофаги присутствуют в микроокружении опухоли, ингибирование CCR5 индуцирует фенотипический сдвиг от M2 к фенотипу Ml. Блокада CCR5 также приводит к клиническим ответам у больных колоректальным раком (Halamaetal. (2016) CancerCell 29 (4): 587-601).CCL3, CCL4 и CCL5 могут быть использованы для лечения состояний, в том числе лимфатических опухолей, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака легкого, меланомы, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака шейки матки или рака печени (патентная публикация США № 2015/0232880; международная патентная публикация WO 2015/059303, WO2017 /043815, WO 2017/156349 и WO 2018/191654).

CXCL9, CXCL10, CXCL11

CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10) и CXCL11 (ITAC) индуцируются продукцией IFN-гамма. Эти хемокины связывают CXCR3, предпочтительно экспрессируемые на активированных Т-клетках, и функционируют как ангиостатически, так и при рекрутинге и активации лейкоцитов. Прогноз колоректального рака сильно коррелирует с опухолеинфильтрационными Т-клетками, в частности Thl и $CD8^+$ эффекторными Т-клетками; внутриопухолевая экспрессия CXCL9, CXCL10 и CXCL11 свидетельствует о хорошем прогнозе. Например, в образцах от 163 пациентов с раком толстой кишки, у которых высокие уровни CXCL9 или CXCL11 показали повышенную послеоперационную выживаемость, и пациенты с высокой экспрессией CXC имели значительно большее количество $CD3^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-хелперные клеток и $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток.

При метастазах в печень у пациентов с колоректальным раком повышаются уровни CXCL9 и CXCL10 на инвазивном краю и коррелируют с плотностью эффекторных Т-клеток. Стимуляция миграции лимфоцитов через действие CXCL9 и CXCL10 на CXCR3 приводит к получению CCL5 на инвазивном краю (Halamaetal (2016) Cancer Cell 29 (4): 587-601; Kistneretal (2017) Oncotarget 8 (52): 89998-90012).

Invivo CXCL9 функционирует в качестве хемоаттрактанта для опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, активированных лимфоцитов периферической крови, натуральных киллерных (NK) клеток и лимфоцитов Thl. CXCL9 также является критическим для опосредованного Т-клетками подавления опухолей кожи.

Например, при сочетании с системным IL -2 было показано, что CXCL9 ингибирует рост опухоли через увеличенную внутриротовую инфильтрацию CXCR3 $^{+}$ мононуклеарных клеток. В мышиной модели карциномы толстой кишки использование комбинации слитого белка huKS1/4-IL -2 с генотерапией CXCL9 обеспечивает превосходный противоопухолевый эффект за счет хемоаттракции и активации CD8 $^{+}$ и CD4+ Т-лимфоцитов (Dubinettetal. (2010) Cancer J 16 (4): 325-335; Ruehlmannetal (2001) CancerRes 61 (23): 8498-8503).

CXCL10, продуцируемый активированными моноцитами, фибробластами, эндотелиальными клетками и кератиноцитами, является хемотаксическим для активированных Т-клеток и может действовать как ингибитор ангиогенеза invivo. Показано, что экспрессия CXCL10 в колоректальных опухолях способствует цитотоксической хемоаттракции Т-лимфоцитов и увеличению выживаемости.

Показано, что введение иммуностимулирующих цитокинов, таких как IL -12, усиливает противоопухолевые эффекты, генерируемые CXCL10.Вакцина DC, праймированнаялизатом опухолевых клеток и трансфицированная CXCL10, обладает повышенной иммунологической защитой и эффективностью у мышей; у животных наблюдается устойчивость к заражению опухоли, замедление роста опухоли и увеличение времени выживаемости.

Invivo и invitro исследования у мышей с использованием гибридного белка CXCL1O-муцин-GPI привели к опухолям с более высокими уровнями рекрутированных NK-клеток по сравнению с опухолями, не обработанными слитым белком.Интерфероны (которые могут быть получены плазмацитоидными дендритными клетками; эти клетки связаны с первичными поражениями меланомы и могут быть рекрутированы на участок опухоли через CCL20), могут действовать на опухолях CD, например, CD103 $^{+}$ DC, которые как было показано дают CXCL9/10 в модели меланомы мыши и были связаны с CXCL9/10 в человеческом заболевании. CXCL10 также обладает повышенной экспрессией в образцах метастатической меланомы человека относительно первичных образцов меланомы.Терапевтически, адъювантнаяIFN-терапия меланомы активирует продукцию CXCL10, тогда как химиотерапевтический агент цисплатин индуцирует CXCL9 и CXCL10 (Dubinett*etal.* (2010) *Cancer J.* 16(4):325-335; Kuo*et al.* (2018) *Front. Med. (Lausanne)* 5:271; Li *et al.* (2007) *Scand. J. Immunol.* 65(l):8-13; Muenchmeier*etal.* (2013) *PLoSOne*8(8):e72749).

CXCL10/11 и CXCR3-экспрессия была установлена в кератиноцитах человека, полученных из базальных клеточных карцином (BCC). CXCL11 также способен стимулировать экспрессию иммуносупрессорногоиндоламина 2,3-диоксигеназы (IDO) в базальной карциноме клеток человека, а также повышать пролиферацию кератиноцитов, что может снизить противоопухолевую активность любого инфильтративного CXCR3 $^{+}$ эффекторных Т-клеток (Kuoetal (2018) Front. Med. (Lausanne) 5: 271).CXCL9, CXCL10 и CXCL1 1 могут быть кодированы онколитическими вирусами для лечения рака (патентная публикация США № 2015/0232880; Международная патентная публикация № WO 2015/059303). Псевдотипированныеонколитические вирусы или генно-инженерная бактерия, кодирующая ген CXCL10, также могут быть использованы для лечения рака (публикация международной заявки WO 2018/006005 и WO 2018/129404).

Костимулирующие молекулы

Костимулирующие молекулы усиливают иммунный ответ против опухолевых клеток, а костимулирующие пути ингибируются опухолевыми клетками для ускорения онкогенеза.Иммуностимулирующие бактерии в настоящем документе могут быть сконструированы для экспрессии костимулирующих молекул, таких как, например, CD40, CD4OL, 4-1BB, 4-1BBL, 0X40 (CD134), OX4OL (CD252), другие члены суперсемейства TNFR *(m.e.,* CD27, GITR, CD30, рецепторы Fas, TRAIL-R, TNF-R, HVEM, RANK), B7 и CD28.

Иммуностимулирующие бактерии в настоящем документе также могут быть сконструированы для экспрессии агонистических антител против костимулирующих молекул для усиления противоопухолевого иммунного ответа.

Суперсемейство рецепторов TNF

СуперсемействолигандовTNF (TNFSF) и их рецепторы (TNFSF) вовлечены в пролиферацию,дифференцировку, активацию и выживание опухолевых и иммунных эффекторных клеток. Элементы этого семейства включают Cd30, Fas-L, TRAIL-R и

TNF-R, которые индуцируют апоптоз, и CD27, OX40L, CD40L, GITR-L и 4-1BBL, которыеиндуцируют апоптоз, и CD27, OX40L, CD40L, GITR-L и 4-1BBL, которые регулируют иммунные ответы B и T-клеток. Другие элементы включают в себя медиатор ввода герпесвируса (HVEM).

Экспрессия TNFSF и TNFRSF иммуностимулирующими бактериями в настоящем документе могут усиливать противоопухолевый иммунный ответ. Показано, например, что экспрессия 4-1 BBL в опухолях мыши повышает иммуногенность, а внутриопухолевая инъекция дендритных клеток (DC) с повышенной экспрессией OX40L может привести к отторжению опухоли в мышиных моделях. Исследования также показали, что введение аденовируса, экспрессирующего рекомбинантный GITR, в клетки меланомы B16 способствует инфильтрации T-клеток и уменьшает объем опухоли. Стимулирующие антитела к молекулам, таким как 4-IBB, 0X40 и GITR, также могут быть кодированы иммуностимулирующими бактериями для стимуляции иммунной системы.Например, было показано, что агонистические анти-4-1BB моноклональные антитела усиливают противоопухолевые CTL-ответы, и было показано, что агонистические анти-OX40 антитела повышают противоопухолевую активность в трансплантабельных моделяхопухолей.

Кроме того, было показано, что агонистические анти-GITR антитела усиливают противоопухолевые ответы и иммунитет (Lechneretal. (2011) Immunotherapy 3 (11): 1317-1340; Peggs et al (2009) Clinical and Experimental Immunology 157: 9-19).

CD40 и CD4OL

CD40, являющийся членом суперсемейства рецепторов TNF, экспрессируется APC и B-клетками, в то время как его лиганд, CD40L (CD 154) экспрессируется активированными T-клетками. Взаимодействие между CD40 и CD40L стимулирует B-клетки для получения цитокинов, приводящих к активации T-клеток и гибели опухолевых клеток. Исследования показали, что противоопухолевые иммунные ответы ухудшаются при снижении экспрессии CD40L на T-клетках или CD40 на дендритных клетках.

CD40 экспрессируется на поверхности нескольких B-клеточных опухолей, таких как фолликулярная лимфома, лимфома Burkitt, лимфобластный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз, и его взаимодействие с CD40L как было показано, увеличивает экспрессию молекул B7.1/CD80, B7.2/CD86 и HLA класса

II в CD40 $^{+}$ опухолевых клетках, а также усиливает их антигенпрезентирующие способности.

Трансгенная экспрессия CD40L в мышиной модели множественной миеломы приводит к индукции CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клеток, местных и системных противоопухолевых иммунных ответов и сниженному росту опухоли. Анти-CD40 агонистические антитела также индуцируют противоопухолевые Т-клеточные ответы (Marin-Acevedo*etal.* (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).

4-1BBи 4-1BBL

4 -1BB (CD137) представляет собой индуцируемый костимулирующий рецептор, который экспрессируется Т-клетками, NK-клетками и АПС, включая DC, В-клетки и моноциты, связывающими его лиганд, 4- 1BBL для запуска пролиферации и активации иммунных клеток. 4-1BB приводит к более длинному и более широкому распространению ответов активированных Т-клеток.

Показано, что анти-4-1BB агонисты и 4-1BBL слитые белки повышают иммуно-опосредованную противоопухолевую активность, например, против саркомы и опухолей мастоцитомы, опосредованных CD4 $^{+}$ и CD $^{+}$ Т-клетками и опухолеспецифическую CTL-активность(Lechner *et al.* (2011) *Immunotherapy* 3(11):1317-1340; Marin-Acevedo *et al.* (2018) *JournalofHematology&Oncology 11:39).*

OX40 иOX4OL

0X40 (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, B-клетки и макрофаги, после активации агонистами TLR и сигнализацией CD40-CD40L. Сигнализация OX40-OX40L приводит к активации, потенцированию, пролиферации и выживаемости Т-клеток, а также модуляции функции NK-клеток и ингибированию супрессивной активности Treg.
Сигнализация через 0X40 также приводит к секреции цитокинов (IL -2, IL -4, IL -5 и IFN-гамма), повышающих ответы Th1 и Th2 клеток. Распознавание опухолевых антигенов по TIL приводит к увеличению экспрессии 0X40 по TIL, которые были коррелированы с улучшенным прогнозом.
Исследования показали, что лечение агонистами анти-OX40 или Fc-OX40L слитыми белками приводит к усиленному опухолеспецифическому $CD4^+$ Т-клеточному ответу и повышенной выживаемости в мышиных моделях меланомы, саркомы, карциномы толстой кишки и рака молочной железы, в то время как Fc-OX40L включен в вакцины, защищающие мыши от последующего заражения клетками карциномы молочной железы (Lechner*etal.* (2011)*Immunotherapy* 3(11):1317-1340; Marin-Acevedo *et al.* (2018) *Journal of Hematology & Oncology 11:39).*

СемействоB7-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. Сигнализация CD28-B7 необходима для активации и выживаемости Т-клеток, а также для профилактики анергии Т-клеток и приводит к получению интерлейкинов, таких как IL-6.

Оптимальный прайминг Т-клеток требует двух сигналов: (1) Т-клеточного рецептора (TCR) распознавания WIC-представленных антигенов и (2)

костимулирующихсигналов, полученных в результате лигирования Т-клеток CD28 посредством B7-1 (CD80) или B7-2 (CD86), экспрессируемых на APC.

После активации Т-клеток индуцируются CTLA -4 рецепторы, которые затем конкурируют с CD28 для связывания с лигандами B7-1 и B7-2.

Представление антигена опухолевыми клетками является плохим из-за их отсутствия экспрессии костимулирующих молекул, таких как B7-1/CD80 и B7-2/CD86, что приводит к нарушению активации комплекса Т-клеточного рецептора. В результате повышающая регуляция этих молекул на поверхностях опухолевых клеток может повысить их иммуногенность. Иммунотерапия солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований успешно индуцируется B7, например, посредством экспрессии опухолевых клеток B7 или растворимых слитых белков B7-иммуноглобулина.

Вирусно-опосредованная экспрессия опухоли B7 в сочетании с другими костимулирующимилигандами, такими как ICAM -3 и LFA -3, была успешной в доклинических и клинических испытаниях для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза и метастатической меланомы. Кроме того, растворимые слитые белки B7 продемонстрировали перспективные результаты в иммунотерапии солидных опухолей в качестве единственного агента иммунотерапии (Lechner*etal.* (2011) *Immunotherapy*3(11):13171340; Dotti*etal.* (2002) *Blood*100(1):200-207).

F. ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, КОДИРУЮЩИЕ БЕЛКИ, И КОНСТРУКЦИЯ ПРИМЕРНЫХ ПЛАЗМИД И НОСИТЕЛЕЙ

Терапевтические продукты, в том числе описанные выше, кодируются в иммуностимулирующих бактериях, предусмотренных в данном документе на плазмиде и, как правило, под контролем распознанных регуляторных сигналов. Иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, модифицированы для увеличения накопления в опухолерезидентных иммунных клетках и микроокружения опухоли.Они включают модификации в бактериальном геноме, бактериальную экспрессию и инвазию клеток-хозяев, рассмотренные выше, такие как улучшение или увеличение нацеливания на или накопление в опухолях, опухоль-резидентных иммунных клетках и опухолевую микросреду, а также включает плазмиды, которые кодируют продукты, которые

экспрессируются в бактериях, включая бактериальный промотор, или в хозяине, включая соответствующий эукариотический промотор и другие регуляторные области по мере необходимости.

Иммуностимулирующие бактерии модифицированы, как описано выше, например, делецией флагелл, и другими модификациями, так что бактерии являются одним или более из asd -, ntsbB- и pagP- и являются аденозиновымиауксотрофами.

Для введения плазмид бактерии трансформируют стандартными методами, такими как электропорация с очищенными плазмидами ДНК, сконструированными с использованием методов и методов молекулярной биологии (синтез ДНК, ПЦР-амплификация, расщепление рестрикционными ферментами ДНК и лигирование совместимых связных концевых фрагментов с лигазы).Как обсуждается ниже и в других местах в настоящем документе, плазмиды кодируют белки, такие как иммуностимулирующие белки, такие как интерлейкины, и/или модифицированные белки, под контролем распознаваемых хозяином промоторов. Эти кодированные белки стимулируют иммунную систему, в частности, в микроокружении опухоли. Бактерии могут кодировать другие продукты на плазмидах, обычно экспрессируемых под контролем эукариотического промотора, такого как РНК-полимеразы (RNAP) II или III промотор.

Как правило, RNAPIII (также называемые POLIII) промоторы являются конститутивными, и RNAPII (также называемый POLII) может быть отрегулирован. В настоящем документе штаммы бактерий, такие как штаммы Salmonella, включая S typhimurium, модифицированы или идентифицированы как ауксотрофный для аденозина в микроокружении опухоли,

и для переноса плазмид, кодирующих терапевтические белки, такие как STING и другие иммуностимулирующие белки, которые являются частью сигнального пути цитозольной ДНК/РНК, приводящей к экспрессии IFN типа I, а также варианты этих белков, которые увеличивают экспрессию IFN типа I или что приводит к конститутивной экспрессии IFN типа I.

Кодированные терапевтические продукты, например, на плазмидах в иммуностимулирующих бактериях, предложенных в настоящем документе, включают

в себя цитозольные датчики ДНК/РНК, которые индуцируют IFN типа I, а также их конститутивно активные варианты. Они включают, например, STING, RIG-I, MDAS, IRF -3 и IRF -7, а также их варианты GOF, которые конститутивно индуцируют IFN типа I и/или активируются и индуцируют IFN типа I в отсутствие стимуляции лигандами, такими как цитозольная нуклеиновая кислота, включая CDN.

Кодированные белки STING включают в себя варианты GOF и дикого типа GOF человеческого STING (включая аллельные варианты), а также дикого типа или модифицированного STING (например. (варианты GOF) от других видов, таких как Tasmanandevil, marmodset, cattle, cat, ostrich, boar, bat, manifory, crestedibis, coelache, moose и ghostshark, которые могут проявлять более низкую активность NF-KB, и, необязательно, повышенную сигнализацию IRF3/INFтипа I.Другие терапевтические продукты включают иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы.

Бактерии, такие как S typhimurium, могут инфицировать множество типов клеток, включая опухолевые клетки и макрофаги. Для клеток, инфицированных иммуностимулирующими бактериями, такими как S typhimurium, плазмида высвобождается, и кодируемые белки транскрибируются полимеразами РНК-хозяина и секретируются в опухолевую микросреду и опухоли.

1. Начало репликации и число копий плазмиды

Плазмиды представляют собой автономно реплицирующиесявнехромосомные кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, которые поддерживаются в пределах бактерий посредством начала репликации. Число копий влияет на стабильность плазмиды.Большое число копий, как правило, приводит к большей стабильности плазмиды, когда случайное разделение происходит при разделении клеток.

Большое количество плазмид, как правило, снижает скорость роста, таким образом, возможно, позволяя клеткам с несколькими плазмидами доминировать в культуре, так как они растут быстрее.Начало репликации также определяет совместимость плазмиды: ее способность реплицироваться в сочетании с другой плазмидой в одной и той же бактериальной клетке.

Плазмиды, которые используют одну и ту же систему репликации, не могут присутствовать в одной и той же бактериальной клетке. Они относятся к одной и той же группе совместимости. Введение нового начала, в виде второй плазмиды из той же группы совместимости, имитирует результат репликации резидентной плазмиды. Таким образом, любая дополнительная репликация предотвращается до тех пор, пока две плазмиды не разделяются на различные клетки для создания правильного числа копий предварительной репликации.

Начало репликации	**Число**	**SEQ ID**
pMB1	15-20	254
pl5A	10-12	255
pSC101	—.5	256
pBR322	15-20	243
ColEl	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)	низкое	263
R1	низкое	264
pWSK	низкое	265
Co1E2	10-15	266
pUC (pMB1)	500-700	267
Fl	300-500	268

Многочисленные бактериальные начала репликации известны специалистам в данной области техники, включая перечисленные в таблице выше. Начало может быть выбрано для достижения требуемого числа копий. Начала репликации содержат последовательности, которые распознаются в качестве сайтов инициации репликации плазмиды посредством ДНК-зависимых ДНК-полимераз (delSolar*etal.(1998) MicrobiologyAndMolecularBiologyReviews*62(2):434-464).

Различные начала репликации обеспечивают варьирование уровней копий плазмиды в каждой клетке и могут находиться в диапазоне от одного до сотен копий на клетку. Обычно используемые бактериальные плазмидные начала репликации включают, но не ограничиваются ими, начала, происходящие от pMB1, которые имеют очень высокое число копию производных, начала ColE1, p15A, pSC101, pBR322 и другие, которые имеют низкие числа копий. Такие начала хорошо известны специалистам в данной области техники.

Начало pUC1 9 приводит к числу 500-700 копий на клетку. Начало pBR322 имеет известное число копий 15-20. Эти начала отличаются только одной парой оснований . Число копий начала ColE1 составляет 15-20, а производные, такие как pBluescript, имеют числа копий в диапазоне от 300 до 500. Начало p15A, которое находится в pACYC184, например, приводит к числу копий приблизительно 10. Начала pSC101 обеспечивают число копий приблизительно 5.

Другие векторы с низким числом копий, из которых могут быть получены начала, включают, например, pWSK29, pWKS30, pWKS129 и pWKS130 (см. Wangetal. (1991) Gene 100: 195-199). Среда с низким числом копий составляет менее 150, или менее 100, при этом низкое число копий составляет менее 20, 25 или 30. Специалисты в данной области могут идентифицировать плазмиды с низким или высоким числом копий.

Например, можно определить экспериментально, является ли число копий высоким или низким для выполнения миниподготовки.Высококопийная плазмида должна быть получена с 3-5 пг ДНК на 1 мл культуры LB; низкокопийная плазмида дает от 0,2 до 1 пг ДНК на мл культуры LB.

Последовательности бактериальных плазмид, включая идентификацию и последовательность начала репликации, хорошо известны (см. например,snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloningvectors/pBR322/). Плазмиды с высоким числом копий выбраны для гетерологичной экспрессии белков invitro, поскольку дозировка гена увеличивается относительно хромосомных генов и более высокие удельные выходы белка, а также для терапевтических бактерий, более высокие терапевтические дозы закодированных терапевтических средств.Однако здесь показано, что для

доставки плазмид, кодирующих терапевтические продукты посредством иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, более низкое число копий является более эффективным.

Потребность в бактериях для поддержания высокой копии плазмид может быть проблемой, если экспрессируемая молекула является токсичной для организма. Метаболические требования для поддержания этих плазмид могут приводить к повышению стоимости репликативного фитнеса invivo. Оптимальное количество копий плазмиды для доставки плазмид, кодирующих терапевтические продукты, может зависеть от механизма ослабления штамма, сконструированного для доставки плазмиды.При необходимости специалист, принимая во внимание описание в данном документе, может выбрать подходящее число копий для конкретного иммуностимулирующего вида и штамма бактерий. Здесьпоказано, чтонизкоечислокопийможетбытьпредпочтительным.

2. Компоненты для поодержания/отбора плазмид

Поддержание плазмид в лабораторных условиях обычно обеспечивается за счет включения гена устойчивости к антибиотику на плазмиде и использования антибиотиков в ростовых средах. Как описано выше, применение мутантного гена с делецией asd, дополненного функциональным asd-геном на плазмиде, позволяет проводить отбор плазмид invitro без применения антибиотиков и позволяет проводить отбор плазмид invivo. Система комплементации гена asd обеспечивает такой отбор (Galanetal. (1990) Gene 94 (1): 29-35).Применение системы комплементации гена asd для поддержания плазмид в микроокружении опухоли увеличивает активность S typhimurium, сконструированного для доставки плазмид, кодирующих терапевтические белки или интерферирующие РНК.

3. Промоторы РНК полимеразы

В эукариотических клетках ДНК транскрибируют тремя типами РНК-полимераз; РНК PolI, II и III. РНК PolI транскрибирует только гены рибосомной РНК (rРНК), РНК PolII транскрибирует ДНК в mРНК и небольшие ядерные РНК (snРНК), и РНК PolIII транскрибирует ДНК в рибосомную 5SrРНК (тип I), передаточную РНК (tРНК) (тип II) и

другие небольшие РНК, такие как U6 snРНК (тип III).Прокариотические промоторы, включая Т7, рВАД и repT, могут быть использованы, когда транскрипция происходит в бактериальной клетке (Guo*etal.* (2011) *Genetherapy*18:95-105; патентные публикации США 2012/0009153, 2016/0369282; WO 2015/032165, WO 2016/025582).

Так как бактерии, предложенные в настоящем документе, предназначены для доставки плазмиды в резидентные иммунные клетки для экспрессии с помощью механизмов транскрипции/трансляции клетки-хозяина, нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтические белки/продукты, функционально связаны с эукариотическими промоторами, такими как промоторы RNAPII и RNAPIII.

Промоторы РНК pol III обычно используют для конститутивной экспрессии. Для индуцибельной экспрессии используют промоторы РНК pol II. Примеры включают промотор pBAD, индуцируемый L-арабинозой; индуцибельные тетрациклиновые промоторы, такие как TRE-tight, IPT, TRE-CMV, Tet-ON и Tet-OFF; ретровирусные LTR; IPTG-индуцибельные промоторы, такие как промоторы LacI, Lac -0; промоторы системы LoxP-stop-LoxP (патент США № 8,426,675; публикация международной заявки № WO 2016/025582); и repT, который представляет собой индуцируемый гипоксией промотор (Yu*etal.* (2012)*ScientificReports*2:436).

Эти промоторы хорошо известны. Примерами этих промоторов являются человеческие U6 (SEQ ID NO: 73) и человеческие H1 (SEQ ID NO: 74).

SEQ **ID**	Название	Последовательность
73	человеческий pol III промотор	as ggtcgggcaggaagagggcc 721 tatttcccatgattccttcatatttgcatatacgatacaaggctgttagagagataa
74	человеческий pol III	atatttgcatgtcgctatg 721

Тканеспецифические промоторы включают промотор TRP2 для клеток меланомы и меланоциты; промотор MMTV или промотор WAP для клеток рака молочной железы и рака молочной железы, промотор Villin или промотор FABP для клеток кишечника,

промотор RIP для бета-клеток поджелудочной железы, промотор кератина для кератиноцитов, промотор Probasin проколота для эпителия простаты, промотор Nestin или промотор GFAP для клеток/рака CNS, промотор тирозингидроксилазыS100 или промотор нейрофиламента для нейронов, промотор секреторного белка клеток Клара для рака легкого и промотор Альфа миозина для клеток сердца (патент США № 8,426,675).

Другие промоторы для регулирования экспрессии кодируемых терапевтических продуктов, такие как варианты белков с усилением функции, которые индуцируют интерфероны I типа путем увеличения экспрессии или придания конститутивного характера, включают, например, промотор EF-альфа, промотор CMV, SV40, PGK, EIF4A1, CAG и CD68.

4. Последовательности ДНК мишени для нацеливания

ДНК-ядерные последовательности для нацеливания (DTS), такие как SV40 DTS, опосредуют транслокацию последовательностей ДНК через ядерный поровый комплекс. Сообщалось, что механизм этого транспорта зависит от связывания ДНК-связывающих белков, содержащих последовательности ядерной локализации. Было продемонстрировано включение DTS в плазмиду для увеличения ядерного транспорта и экспрессии (см. например. Dean,
D.A. *etal.* (1999) *Exp. CellRes.* 253(2):713-722), и использовано для увеличения экспрессии гена из плазмид, доставляемых S typhimurium (см. например, Kong*etal.* (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(47):19414-19419).

Независимые от Rho или транскрипционные класса I терминаторы, такие как терминатор Ti гена rrnB E. coli, содержат последовательности ДНК, которые образуют вторичные структуры, которые вызывают диссоциацию комплекса элонгации транскрипции.

Терминаторы транскрипции могут быть включены в плазмиду для предотвращения экспрессии кодируемых терапевтических продуктов транскрипционным механизмом S typhimurium. Это гарантирует, что экспрессия закодированных продуктов ограничена транскрипционным механизмом клетки хозяина.

Плазмиды, используемые для трансформации Salmonella, такой как S. typhimurium, для противораковой терапии, описанной в данном документе, содержат все или некоторые из следующих признаков: 1) CpG-остров, 2) бактериальное происхождение репликации, 3) маркерный ген asd для поддержания плазмиды, 4) одну или более экспрессионных кассет, 5) ДНК-ядерная последовательность (и) для нацеливания и 6) терминаторы транскрипции.

5. CRISPR

Иммуностимулирующая бактерия, кодирующая кассету CRISPR, может быть использована для инфицирования иммунной, миелоидной или гематопоэтической клеток человека для того, чтобы сайт-специфически выключать целевой ген, представляющий интерес. Используемый штамм может быть asst и может содержать плазмиду, которая не имеет комплементарной кассеты asd и содержит кассету kan. Для выращивания штамма invitro в жидких средах DAP добавляют к для дополнения генетического дефицита asst.

После инфицирования клеток человека штамм может больше не реплицироваться, и доставляется кодированная кассета CRISPR. Штамм также может быть hilA-или лишен одной или более частей SPI -1, или отсутствует флагеллин, или любая их комбинация, что снижает или предотвращает пироптоз (воспалительно-опосредованную гибель клеток) фагоцитарных клеток.

G. ДРУГИЕ НОСИТЕЛИ, КОДИРУЮЩИЕ НЕЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ БЕЛКИ, И МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БЕЛКИ С ФУНКЦИЕЙ УСИЛЕНИЯ, КОТОРЫЕ КОНСТИТУТИВНО ИНДУЦИРУЮТ ИНТЕРФЕРОН I ТИПА И ДРУГИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ

Как описано в настоящем документе, предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, онколитические вирусы и другие носители, такие как экзосомы, липосомы и наночастицы, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтические продукты, такие как белки, которые индуцируют, прямо или косвенно через пути, интерфероны типа I (IFN), включающие интерферон-бета и интерферон-альфа, такие белки включают человеческие и не человеческие белки, и другие, такие как белки RIG -1 и MD5, и их GOF мутанты, содержащие мутации что делает их конститутивно активными, так что интерферон типа Iконститутивно экспрессируется.

Другие терапевтические продукты, такие как цитокины и другие иммуностимулирующие белки также могут кодироваться и/или доставляться этими средствами доставки. Средства доставки накапливаются в опухолевых клетках или в микроокружении опухоли, например, в опухолерезидентных иммунных клетках.

1. Экзосомы, внеклеточные везикулы и другие везикулярные средства доставки

Многочисленные способы получения и применения и нацеливания экзосом и наночастиц известны специалистам в данной области (см. например, опубликованные заявки США № 2013/0337066, 2014/0093557, 2018/0104187, 2018/0193266 и 2018/0236104). Экзосомы являются небольшими, 30-100 нм везикулами, секретируемыми различными типами клеток. Они адаптированы в качестве средств для доставки нуклеиновых кислот. Они могут быть нацелены на опухоли. Например, они могут быть сконструированы для экспрессии нацеливающих на опухоль лигандов на их поверхностях.

Экзосомы представляют собой небольшие мембранные везикулы эндоцитарного происхождения, которые высвобождаются во внеклеточную среду после слияния мультивезикулярных тел с плазматической мембраной. Размер экзосом составляет от 30 до 100 нм в диаметре. Их поверхность состоит из липидного бислоя из клеточной мембраны донорской клетки, и они содержат цитозоль из клетки, продуцирующей экзосомы, и проявляют мембранные белки из родительского элемента на поверхности.

Экзосомы представляют собой наночастицы, которые секретируются эндогенно многими типами клеток invitro и invivo, и обычно могут быть выделены из биологических жидкостей, таких как кровь, моча и асциты. Экзосомы представляют собой чашеобразные многоигольчатые тела (MVB), которые могут быть образованы бутонизацией и расщеплением везикул из ограничительных мембран в эндосомныйпросвет.При формировании MVB трансмембранный и периферический мембранные белки абсорбируются в везикульную мембрану, и одновременно в везикулы также закладываются цитозольные компоненты. По мере продвижения этого процесса MVB в конечном счете сплавляется с клеточной мембраной, что инициирует высвобождение экзосом из клеток.

Экзосомы проявляют различные композиции и функции в зависимости от типа клеток, из которого они получены. Экзосомы продуцируются многими клетками, включая эпителиальные клетки, В и Т-лимфоциты, тучные клетки (МС) и дендритные клетки (DC). У людей экзосомы в плазме крови, моче, бронхоальвеолярной лаважной жидкости, эпителиальных клетках кишечника и опухолевых тканях.

Экзосомы использовались для переноса нуклеиновых кислот в клетки и могут быть нацелены на любую клетку в организме, включая клетки в иммунной системе. Экзосомы могут быть выделены из клеток различного происхождения, в том числе из клеток, растущих invitro, и в организме человека. Они могут быть получены таким образом, чтобы не хватало собственного генетического материала. Способы получения экзосом, лишенных генетического материала, известны специалистам в данной области техники.Они включают УФ-экспозицию, мутацию белков, несущих РНК в экзосомы, электропорацию и химическую обработку открытых пор в экзосомных мембранах. Способы включают мутацию/делецию любого белка, который может модифицировать загрузку любой нуклеиновой кислоты в экзосомы. Генетические конструкции РНК или ДНК могут быть введены в экзосомы с

использованием традиционных методов молекулярной биологии, таких как трансформация invitro, трансфекция и микроинъекция.

В настоящем документе предложены экзосомы и другие внеклеточные везикулы и другие подобные средства доставки, содержащие нуклеиновую кислоту, ДНК или РНК, которые кодируют белок с усилением функции, или которые содержат кодируемый белок, в клетке, которая приводит к конститутивной активации сигнальных путей цитозольногоINF/повышенной чувствительности к лигандамцитозольной нуклеиновой кислоты (например. мутаций с усилением функции в RIG-I, MDAS и STING, как описано в настоящем документе).Эти средства доставки могут кодировать дополнительные белки, такие как иммуностимулирующие белки, которые усиливают иммунный ответ, включая цитокины. Экзосомы и другие средствадоставки могут быть сконструированы для нацеливания или накопления в клетках в микроокружении опухоли, включая опухолерезидентные иммунные клетки и опухолевые клетки.

2. Онколитические вирусы

Онколитические вирусы накапливаются и реплицируются в опухолях, которые могут привести к лизису опухолевых клеток, и иммунные ответы на высвобожденные опухолевые антигены и на вирусные продукты приводят к регрессии опухоли. Онколитические вирусы действуют путем колонизации или накопления в опухолевых клетках, в том числе метастатических опухолевых клетках, таких как циркулирующие опухолевые клетки. Онколитические вирусы могут быть сконструированы для кодирования терапевтических продуктов, которые экспрессируются в опухолевых клетках.

Онколитические вирусы включают встречающиеся в природе и сконструированные рекомбинантные вирусы, такие как, но не ограничиваясь ими, поксвирус, такой как вирус осповакцины, вирус простого герпеса, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус кори, реовирус,вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус коксаки, вирус SemlikiForest, вирус SenecaValley,вируса NewcastleDisease, вирус Сендай, вирус Денге, пикорнавирус, полиовирус, парвовирус, ретровирус, лентивирус, альфавирус, флавивирус, рабивирус, вирус папилломы, вирус гриппа, вирус мумиса, вирус и вирус Синдбис, среди прочих. Во многих случаях селективность по опухоли является присущей вирусу, таким как вирусы осповакцины и другие онколитические вирусы.

Онколитические вирусы включают, но не ограничиваются ими, известные специалисту в данной области техники и включают, например, везикулярные

стоматиты (см. например, патенты США 7,731,974, 7,153,510, и 6,653,103; патентные публикации США 2010/0178684, 2010/0172877, 2010/0113567, 2007/0098743, 2005/0260601, и 2005/0220818; иевропейские патенты 1385466, 1606411 и 1520175); вирус простого герпеса (см. например, патенты США № № 7,897,146, 7,731,952, 7,550296,7,537,924,6,723,316 и 6,428,968; и патентные публикации США 2011 /0177032, 2011/0158948, 2010/0092515, 2009/0274728, 2009/0285860, 2009/0215147, 2009/0010889, 2007/0110720, 2006/0039894 и 2004/0009604); ретровирусы (см. например, патенты США № № 6689871,66354472,66399139, 5851, 529, 5716826 и 5716613; и публикация заявки на патент США № 2011/0212530); и аденоассоциированные вирусы (см. например, патенты США 8,007780,7968,340, 7,943,374, 7,906,1 11,7927,585, 7,811,814, 7,662,627, 7,241,447, 7,238,526, 7,172,893, 7,033,826, 7,001,765, 6,897,045 и 6,632,670).

Специалисты в данной области техники знают, как вырастить, выбрать и модифицировать онколитические вирусы для терапии.

Онколитические вирусы, предложенные в настоящем документе, модифицированы для кодирования продуктов, которые индуцируют экспрессию интерферонов I типа, таких как полипептиды, которые активируют сигнализацию пути интерферона I типа и/или сигнализацию NF-KB. Эти белки включают человеческие и нечеловеческие белки STING, а также мутанты STING с усилением функции и другие такие белки, включая RIG-I и MDA5, и их мутанты с усилением функции, включая те, которые описаны в данном документе.

Онколитические вирусы также могут кодировать иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, включая интерлейкин 2 (IL -2). Эти белки находятся под контролем вирусного промотора или могут находиться под контролем других промоторов РНК-полимеразы II. Онколитическиевиризы также могут кодировать другие терапевтические продукты, такие как РНК, такие как shРНК или microРНК, которые нацелены на рецептор или другую мишень, подавляющую иммунные ответы, такую как TREX1.

При этом вирусы вводят любым подходящим способом, в том числе, но не ограничиваясь ими, парентеральное введение, такое как внутривенное, внутриопухолевое и внутрибрюшинное введение. Вирусы могут быть любыми известными специалистам в данной области и могут кодировать дополнительные терапевтические продукты. Вирусы могут быть объединены с другими видами терапии, подходящими для опухолей, таких как цисплатин для опухолей яичников, или гемцитабин для опухолей поджелудочной железы. Иллюстративные онколитические вирусы описаны ниже.

a. Аденовирусы

Аденовирусы (Ads) являются безоболочечными вирусами ds-ДНК с линейным геномом. Человеческие Ads классифицируют на 57 серотипов (Ad1-Ad57) на основе перекрестной восприимчивости и 7 подгрупп (A-G) на основе вирулентности и тропизма ткани.

Аденовирус серотипа 5 (Ad5) является наиболее широко используемым аденовирусом для онколитическойвиротерапии. Инфекции у человека являются мягкими и приводят к холодно-подобным симптомам (Yokodaetal. (2018) Biomedicines 6, 33) и системное введение приводит к тропизму печени и может привести к гепатотоксичности (Yamamotoetal. (2017) CancerSci 108: 831-837), но Ads считается безопасным для терапевтических целей.

Ads вводятся в клетки путем прикрепления к коксакиевирусу и аденовирусному рецептору (CAR) с последующим взаимодействием между интегринами avf3 и avf5 на поверхности клеток и трипептидным звеном Arg-Gly-Asp (RGD) на основе аденовирусного пентона (Jiangetal (2015) Curr. Opin. Virol. 13: 33-39). CAR экспрессируется на поверхностях большинства нормальных клеток, но экспрессия сильно изменяется по типам раковых клеток.С другой стороны, RGD-связанные интегрины сильно экспрессируются раковыми клетками, но экспрессируются на значительно более низких уровнях в нормальных клетках (Jiangetal (2015)). В результате аденовирусы могут быть нацелены на раковые клетки через звено RGD .

Ads являются привлекательными в качестве онколитических вирусов за счет их высокой эффективности трансдукции в трансформированных клетках, отсутствия их интеграции

в геном хозяина/отсутствие инсерционного мутагенеза, их геномной стабильности, способности вставлять большие терапевтические гены в их геномы, и их способности к избирательности опухоли через генетическую манипуляцию, такую как замена вирусных промоторов раковыми тканеселективными промоторами (Yokodaetal. (2018) Biomedines 6, 33; Choietal (2015)1 J Control.Release 10 (219): 181-191).

Примеры онколитическихAds с опухолеспецифическими промоторами включают CV706 для лечения рака предстательной железы, с геном ранней области аденовируса 1 A (El A) под контролем промотора специфического антигена простаты, и OBP -301, который использует промотор обратной транскриптазы теломеразы (TERT) для регуляции экспрессии гена El A (Yamamotoetal. (2017) CancerSci 108: 831-837).

Другой способ индукции селективности опухоли представляет собой введение мутаций в областьEl генома Ad, где отсутствующие гены функционально дополнены генетическими мутациями, обычно встречающимися в опухолевых клетках, такие как аномалии в пути ретинобластомы (Rb) или мутации p53 (Yamamotoetal (2017) CancerSci 108: 831-837). НапримеронколитическиеAdsONYX -015 и H101 имеют делеции в гене E1B55K, который инактивирует p53.

Эти мутанты не могут блокировать нормальный путь апоптической защиты, что приводит к избирательности опухоли через инфицирование неопластических клеток с дефектными путями опухолевого супрессора p53 (Yamamotoetal. (2017) CancerSci 108: 831-837; Uusi-Kertlaetal(2015) Viruses 7: 6009-6042). E1 AA24 представляет собой онколитическуюAd, которая содержит мутацию 24-bp в гене E1A, нарушая домен Rb-связывающий домен и промотируя репликацию вируса в раковых клетках с мутациями пути Rb.

ICOVIR-5 представляет собой онколитическийAd, который сочетает E1A-транскрипционное управление промотором E2F, мутацию A24 E1A и введение RGD-4C в аденовирусное волокно (Yamamotoetal. (2017) CancerSci 108: 831-837; Uusi-Kerttulaetal (2015)).Delta-24-RGD, или DNX -2401, является онколитическимAd, в котором остов A24 модифицирован введением звена RGD, чтодемонстрирует усиленные онколитические эффекты invitro и invivo (Jiangetal. (2015)).

Альтернативная стратегия улучшения селективности опухоли включает преодоление физического барьера в солидных опухолях путем нацеливания внеклеточного матрикса (ECM). Например, онколитическаяAd, которая экспрессирует гиалуронидазу, такая как VCN -01, может быть использована для облегчения доставки закодированных продуктов и вируса в опухоль.

Также были разработаны Ad для экспрессии релаксина для нарушения ECM (Yamamotoetal. (2017) CancerSci 108: 831-837; ShawandSuzuki (2016) Curr. Opin. Virol. 21: 9-15).Ad, экспрессирующие суицидные гены, такие как цитозин деаминаза (CD) и тимидинкиназа HSV -1 (TK), показали повышенную противоопухолевую эффективность invivo, а также Ad, экспрессирующие иммуностимулирующие цитокины, такие как ONCOS -102, который экспрессирует GM-CSF (Yamamotoetal. (2017) CancerSci 108: 831-837; ShawandSuzuki (2016) Curr.Opin. Virol. 21: 9-15).

ОнколитическаяAd, экспрессирующая анти-CTLA4 антитело, перспективна в доклинических исследованиях (Jiang et al. (2015)).

Аденовирус H101 (доступный под торговой маркой Oncorine ®) является первым онколитическимAd, одобренным для клинического применения в Китае в сочетании с химиотерапией, для лечения пациентов с распространенным раком носоглотки в 2005. Клинические испытания показали применение онколитических аденовирусов для лечения широкого разнообразия видов рака. Например, существуют клинические испытания: онколитическийAd5, кодирующий IL -12 у пациентов с метастатическим раком поджелудочной железы (NCT03281382);иммуностимулирующий Ad5 (LOAd703), экспрессирующий TMX-CD40L и 41BBL у пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы, раком яичников, билиарным раком и колоректальным раком (NCT03225989); LOAd703 в сочетании с гемцитабином и nab-паклитакселом у пациентов с раком поджелудочной железы (NCT02705196); онколитический аденовирус, кодирующий гиалуронидазуPH20 человека (VCN -01) в сочетании с гемцитабином и Abraxane ® у пациентов с развитыми солидными опухолями, включая поджелудочной железы аденокарциному (NCT02045602; NCT02045589); Telomelysin® (OBP -301), онколитическийAd с селективностью опухоли, содержащий промотор обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT), у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (NCT02293850);

ген E1B, делетированный Ad5 в сочетании с трансартериальнойхимиоэмболизацией (TACE) у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (NCT01869088); CG0070, онколитическийAd, который экспрессирует GM-CSF, и содержит специфичный для рака E2F -1 промотор для приведения в действие экспрессии E1A, у пациентов с раком мочевого пузыря (NCT02365818; NCT01438112); Enadentuckirev (Colo-Adl), AdlIp/ad3 химерной группы B онколитический вирус, у пациентов с раком толстой кишки, немелкоклеточным раком легкого, раком мочевого пузыря и почечно-клеточной карциномой (NCT02053220); и DNX -2401(Ad5 E1AA24RGD) в сочетании с темозоломидом (NCT01956734)или в сочетании с IFNy (NCT02197169) у пациентов с глиобластомой.

b. Вирус простого герпеса

Вирус простого герпеса (HSV) принадлежит к семейству Herpesviridae и имеет большой линейный двухцепочечный геном ДНК, включающий множество генов,незаменимых для репликации вируса, делая его идеальным кандидатом на генетических манипуляций. Другие преимущества включают его способность инфицировать широкий диапазон типов клеток, его чувствительность к антивирусам, таким как ацикловир и ганцикловир, и отсутствие инсерционного мутагенеза (Sokolowski*etal.* (2015) *OncolyticVirotherapy*4:207-219; Yin*etal. (2017) Front. Oncol.* 7:136).

Имеются два вида HSV, HSV типа I (HSV -1) и типа II (HSV -2), причем большинство онколитических HSV получены из HSV -1. У людей HSV -1 вызывает лихорадку и инфицирует эпителиальные клетки, нейроны и иммунные клетки путем связывания с нектинами, гликопротеинами и медиатором входа герпесвируса (HVEM) на клеточной поверхности (KohlhappandKaufman (2016) Clin. CancerRes22 (5): 1048-1054).

Многие различные онколитические вирусы HSV -1 были сформированы до настоящего времени. Любой может быть дополнительно модифицирован для кодирования модифицированной ДНК/РНК белков с усилением функции, как описано в настоящем документе, так что при накоплении в опухолях и микроокружении опухоли, HSV, которые так модифицированы, экспрессируют кодируемый белок, чтобы конститутивно экспрессировать медиаторы иммунного ответа, такие как интерферон типа I. Например, HSV -1 был сконструирован для экспрессии анти-HER -2 антителатрастузумаб, нацеленные на опухоли, которые сверхэкспрессируют HER -2, такие как рак молочной железы и яичников, карциномы желудка и глиобластомы.

Ген, кодирующий трастузумаб, вводили в две области внутри гена гликопротеина HSV - 1 gD, генерируя два онколитических HSV, R-LM113 и R-LM249. R-LM113 и R-LM249 продемонстрировали доклиническую активность против рака молочной железы и яичников человека, а также против мышиной модели HER2 + глиобластомы. Другой онколитический HSV -1, dlsptk HSV -1, содержит делецию в уникальном длинном 23 (UL23) гене, который кодирует вирусный гомолог тимидинкиназы (TK), при этом мутант hrR3 HSV -1 содержит мутацию вставки LacZ большой субъединицы рибонуклеотидредуктазы (RR), также известной как ICP6, кодируемой геном UL39. В результате мутанты dlsptk и hrR3 HSV -1 могут реплицироваться только в раковых клетках, которые сверхэкспрессируют TK и RR, соответственно (Sokolowski*etal.* (2015) *OncolyticVirotherapy*4:207-219).

HF10 представляет собой спонтанно мутированный онколитический HSV -1, у которого отсутствуют гены, кодирующие UL43, UL49.5, UL55, UL56 и связанные с латентностью транскрипты, и сверхэкспрессирует UL53 и UL54. HF10 продемонстрировал перспективные результаты в доклинических исследованиях и продемонстрировал высокую селективность по опухоли, высокую вирусную репликацию, высокую противоопухолевую активность и благоприятный профиль безопасности (Eissa*etal. (2017) Front. Oncol.* 7:149).

Клинические исследования исследования HF10 включают: исследование фазы I у пациентов с рефрактерной головкой и раком шейки, плоскоклеточным раком кожи, карциномой молочной железы и злокачественной меланомой (NCT01017185), и исследование фазы I HF10 в сочетании с химиотерапией (гемцитабин, Nab-паклитаксел, TS -1) у пациентов с нерезектабельным раком поджелудочной железы (NCT03252808).

HF10 также был объединен с анти-CTLA -4 антителом ипилимумабом, что приводит к улучшенной терапевтической эффективности у пациентов со стадией IIIb, Мсили IV нерезектабельной или метастатической меланомы (NCT03153085).

При исследовании фазы II проводят исследование комбинации HF10 с анти-PD -1 антителом Ниволумаб у пациентов с резектабельной стадией IIIb, Inci IV меланомы (NCT03259425) и в сочетании с ипилимумабом у пациентов с нерезектабельной или метастатической меланомой (NCT02272855).Комбинированная терапия паклитаксела и HF10 приводит к повышению выживаемости в перитонеальныхколоректальных моделях рака по сравнению с любым лечением, в то время как комбинирование с HF10 и эрлотинибом приводит к улучшенной активности в отношении ксенотрансплантатов поджелудочной железы invitro и invivo по отдельности либо HF10, либо эрлотиниба(Eissa*etal.* (2017) *Front. Oncol.* 7:149).

Talimogenelaherpravec (Imlygin ®, T-VEC), ранее известный как OncoVEX $^{GM\,CSF}$, представляет собой одобренный FDA онколитический вирус простого герпеса для лечения развитой меланомы, которая была получена из штамма JS1 HSV -1 и генетически сконструирована для экспрессии гранулоцитарного макрофагального стимулирующего фактора (GM-CSF; Arefetal. (2016) Viruses 8: 294).

В T-VEC экспрессия GM-CSF усиливает противоопухолевый цитотоксический иммунный ответ, а делеция обеих копий инфицированного клеточного белка 34,5 (ICP34. 5) гена подавляет репликацию в нормальных тканях, и делеция гена ICP47 увеличивает экспрессию молекул MHC класса I, что позволяет презентацию антигена на инфицированных клетках (Eisaetal (2017)). t-VEC проявляет селективность по опухоли за счет связывания с нектинами на поверхности раковых клеток и предпочтительно реплицируется в опухолевых клетках за счет использования нарушенных онкогенных и противовирусных сигнальных путей, в частности протеинкиназы R (PKR) и путей IFN типа I.

В нормальных клетках PKR активируется вирусной инфекцией, которая затем фосфорилирует эукариотический фактор инициации -2A белка (eIF -2A), инактивирует его и, в свою очередь, ингибирует синтез клеточного белка, блокируя пролиферацию клеток и предупреждая репликацию вируса. HSV дикого типа прекращает противовирусную реакцию за счет экспрессии белка ICP34,5, который активирует

фосфатазу, которая дефосфорилируетеIF -2A, восстанавливая синтез белка в инфицированных клетках.

Таким образом, делеция ICP34. 5 исключает вирусную репликацию T-VEC в нормальных клетках. Однако путь PKR-eIF -2A в раковых клетках разрушается, позволяя непрерывный рост клеток и репликацию неингибированного вируса (KohlhappandKaufman (2016) *Clin. CancerRes.* 22(5):1048-1054; Yin*etal. (2017) Front. Oncol.* 7:136).

Экспрессия GM-CSF улучшает иммуногенность T-VEC, вызывая накопление дендритных клеток, стимулируя антиген-презентацию и прайминг Т-клеточных ответов (Kohlhapp и Kaufman (2016) Clin. CancerRes 22 (5): 1048-1054).

T-VEC продемонстрировал предпочтительную репликацию во множестве различных линий раковых клеток, включая рак молочной железы, колоректальную аденокарциномы, меланома, рак предстательной железы и глиобластому. Клинические испытания включают, например, исследования T-VEC при раке поджелудочной железы (NCT03086642, NCT00402025), рецидиве рака молочной железы (NCT02658812), продвинутых не-CNS-опухолей у детей (NCT02756845), немеланомного рака кожи (NCT03458117), немышечного инвазивного рака мочевого пузыря (NCT03430687) и злокачественной меланомы (NCT03064763), а также T-VEC в сочетании с атезолизимабом у пациентов с метастатическим тройным негативным раком молочной железы и метастатическим колоректальным раком с метастазами в печень (NCT03256344), в сочетании с паклитакселом у пациентов с тройным негативным раком молочной железы (NCT02779855), в сочетании с ниволумабом у пациентов с рефрактерными лимфомами или продвинутыми/рефрактерными раками кожи немеланомы (NCT02978625), в комбинации с цисплатином и лучевой терапией у пациентов с развитой головкой и раком шейки (NCT01161498), и в сочетании с пембролизумабом у пациентов с опухолями печени (NCT02509507), карциномы головы и шеи (NCT02626000), саркомы (NCT03069378) и меланомы (NCT02965716, NCT02263508).

В дополнение к GM-CSF, многочисленные другие иммуностимулирующие гены были вставлены в онколитические HSV, в том числе кодирующие IL -12, IL -15, IL -18, TNFa, IFNa/бета и fms-подобный лигандтирозинкиназы 3, что приводит к повышению терапевтической эффективности (Sokolowskietal. (2015); Yinetal. (2017)).

Другой онколитический HSV -1, R3616 содержит делеции в обеих копиях гена RL1 (также известный как g134,5) ген, который кодирует ICP34,5, нацеливаясь на раковые клетки с нарушениями PKR. NV1020 (или R7020) является мутантом HSV -1, который содержит делеции в генах UL55, UL56, ICP4, RLl и RL2, что приводит к снижению нейровирулентности и селективности рака.

NV1020 показывает перспективные результаты в мышиных моделях рака головы и шеи, эпидермоидной карциномы и аденокарциномы простаты (Sokolowskietal. (2015)). Дополнительно клинические испытания показали безопасность и эффективность NV1020 при колоректальном раке, метастатизированном до печени (NCT00149396 и NCT00012155).

G207 (или MGH -1) является другим мутантом HSV -1 с делецией RL1 (γ134,5) и инактивированиемLacZ в гене нейровирулентности UL39. Клинические исследования с использованием g207 включают исследование введения g207 отдельно или с разовой дозой облучения у детей с прогрессирующими или рецидивирующими супратенториальными опухолями головного мозга (NCT02457845), исследование безопасности и эффективности g207 у пациентов с рецидивирующим раком головного мозга (глиома, астроцитома, глиобластома) (NCT00028158)и исследование эффектов введения G207 с последующей лучевой терапией у пациентов со злокачественной глиомой (NCT00157703).

G207 использовали для генерации G47D, который содержит дополнительную делецию в гене, кодирующем ICP47. Другие онколитические вирусы HSV -1 включают HSV1716, который содержит делеции в RL1, но имеет интактный ген UL39 и реплицируется селективно в активно делящихся клетках, и мутант KM100, который имеет инсерции в генах UL48 и RL2, что приводит к потере экспрессии непосредственно ранних вирусных генов и избирательности раковых клеток (Sokolowskietal. (2015); Yinetal (2017) Front. Oncol. 7: 136).

Онколитические вирусы также были получены из HSV -2. Например, FusOn-H2 является HSV -2 онколитическим вирусом с делецией N-концевой области гена ICP10, которая кодирует домен серин/треонин протеинкиназы (PK). Этот PK отвечает за

фосфорилирование GTPазу-активирующего белка Ras-FAP, который активирует митогенный путь Ras/MEK/MAPK и индуцирует и стабилизирует c-Fos, который необходим для эффективной репликации HSV -2. Нормальные клетки обычно имеют инактивированный путь передачи сигналов Ras.

Таким образом, FusOn-H2 проявляет селективность по опухоли, реплицируясь только в опухолевых клетках с активированными путями передачи сигналов Ras (Fuetal (2006) Clin. CancerRes 12 (10): 3152-3157). FusOn-H2 продемонстрировала активность против ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы (Fuetal (2006) Clin. CancerRes 12 (10): 3152-3157), против ксенотрансплантатов карциномы легких Льюиса в комбинации с циклофосфамидом, и против сингенных мышиных опухолей молочной железы и нейробластомы (Lietal (2007) CancerRes 67: 7850-7855).

c. Поксвирусы

Вирусы осповакцины являются примерами поксвирусов. Вирус осповакцины представляет собой цитоплазматический вирус, таким образом, он не вкладывает свой геном в геном хозяина в течение его жизненного цикла. Вирус осповакцины имеет линейный двухцепочечный геном ДНК размером примерно 180 000 пар оснований в длину, который выполнена в виде одной непрерывной полинуклеотидной цепи (Baroudyetal. (1982) Cell 28: 315-324). Структура обусловлена присутствием 10000 пар оснований инвертированных концевых повторов (ITR). В процессе репликации генома ITR вовлечены в репликацию генома.Репликация генома включает самопрайминг, приводящий к образованию высокомолекулярных конкатемеров (выделенных из инфицированных клеток), которые впоследствии расщепляют и восстанавливают для получения геномов вируса (см. например, Traktman, P, Chapter 27, Poxvirus DNA replication, pp. 775-798, в DNA ReplicationinEukaryoticCells, ColdSpringHarborLaboratoryPress (1996)). Геном содержит приблизительно 250 генов.

В общем несегментированный неинфекционный геном расположен таким образом, что центрально расположенные гены являются существенными для репликации вируса (и, таким образом, являются консервативными), в то время как

гены вблизи двух концов влияют на более периферийные функции, такие как основной диапазон и вирулентность. Дифференциальная экспрессия генов на основе вирусов осповакцины с использованием открытых рамок считывания (ORF), расположенных в наборах, которые, как правило, не перекрываются.

Вирус осповакцины обладает множеством признаков для применения в генотерапии рака и вакцинации, в том числе широкого спектра хозяина и клеток, и низкой токсичностью. Например, в то время как большинство онколитических вирусов являются природными патогенами, вирус осповакцины имеет уникальную историю в его широко распространенном применении в качестве вакцины против оспы, которая привела к установленной безопасности у людей.

Токсичность, связанная с введением осповакцины, имеют место в менее 0. 1 % случаях и может быть эффективно решена введением иммуноглобулина. Кроме того, вирус осповакцины обладает большой несущей способностью для чужеродных генов (до 25 кб экзогенных фрагментов ДНК, приблизительно 12% размера генома вируса осповакцины) и высокой гомологией последовательностей среди различных штаммов для конструирования и создания модифицированных вирусов в других штаммах.

Хорошо установлены методики получения модифицированных штаммов вируса коровьей оспы генной инженерией (Moss (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 8690; Broder and Earl (1999) Mol. *Biotechnol.* 13: 223-245; Timiryasova*et al.* (2001) *Biotechniques*31: 534-540).

Показано, что штаммы вируса осповакцины специфически колонизируют солидные опухоли, не инфицируя другие органы (см. например, Zhang*etal.* (2007) *Cancer Res.* 67:10038-10046; Yu *et al.* (2004) *Nat. Biotech.* 22:313-320; Heo*et al.*(2011)Mol.*Ther.* 19:1170-1179; Liu *et al.* (2008) *Mol. Ther.* 16:1637-1642; Park *et al.* (2008) *Lancet Oncol.* 9:533-542).Примерывирусовосповакцинывключают, нонеограничиваютсяими, Lister (такжеизвестныйкак Elstree), New York City Board of Health (NYCBH), Dairen, Ikeda, LC16M8, Western Reserve (WR), Copenhagen (Cop), Tashkent, Tian Tan, Wyeth, Dryvax, IHD-J, IHD-W, Brighton, Ankara, Modified Vaccinia Ankara (MVA), Dairen I, LIPV, LC16M0, LIVP, WR 65-16, EM63, Bern, Paris, CVA382, NYVAC, ACAM2000 и Connaught штаммы. Вирусы осповакцины представляют собой онколитические вирусы, которые обладают множеством признаков, которые делают их особенно подходящими для применения в терапии ран и рака. Например, вирус осповакцины представляет собой цитоплазматический вирус, таким образом, он не вставляет свой геном в

геном хозяина в течение его жизненного цикла.В отличие от многих других вирусов, которые требуют механизма транскрипции хозяина, вирус осповакцины может поддерживать свою собственную экспрессию генов в цитоплазме клетки-хозяина с использованием ферментов, кодируемых в вирусном геноме. Вирусы осповакцины также имеют широкий диапазон хозяев и клеток. В частности, вирусы осповакцины могут накапливаться в иммунизированных клетках или иммунизированных тканях, включая опухоли и/или метастазы, а также включая раненые ткани и клетки.

Кроме того, в отличие от других онколитических вирусов, вирус осповакцины, как правило, может быть очищен от субъекта, которому вирусы вводят по активности иммунной системы субъекта, и, следовательно, менее токсичны, чем другие вирусы, такие как аденовирусы. Таким образом, хотя вирусы, как правило, могут быть очищены от субъекта, которому вирусы вводят по активности иммунной системы субъекта, вирусы могут, тем не менее, накапливаться, выживают и пролиферируют в иммунизированных клетках и тканях, таких как опухоли, поскольку такие иммунообласти выделяют из иммунной системы хозяина.

Вирусы осповакцины также могут быть легко модифицированы путем введения гетерологичных генов. Это может привести к ослаблению вируса и/или разрешать доставку терапевтических белков. Например, геном вируса осповакцины имеет большую несущую способность для чужеродных генов, где до 25 кб экзогенных фрагментов ДНК(примерно 12% размера генома вируса коровьей оспы) может быть вставлено. Геномы нескольких штаммов вируса коровьей оспы были полностью секвенированы, и идентифицированы многие существенные и несущественные гены.

Из-за высокой гомологии последовательностей среди различных штаммов геномная информация из одного штамма вируса осповакцины может быть использована для конструирования и создания модифицированных вирусов в других штаммах.

Наконец, хорошо известны способы получения модифицированных штаммов вируса осповакциныметодами генной инженерии (Moss (1993) *Curr. Opin. Genet.*

Dev. 3:86-90; Broder and Earl (1999) *Mol. Biotechnol.* 13:223245; Timiryasova*et al.* (2001) *Biotechniques*31:534-540).

Было показано, что различные вирусы осповакцины проявляют противоопухолевую активность. В одном исследовании, например, мышей, несущих неметастатические клетки аденокарциномы толстой кишки, системно инъецировали штаммом WR вируса осповакцины, модифицированным с помощью делеции фактора роста коровьей оспы и усиленного зеленого флуоресцентного белка, вставленного в локус тимидинкиназы.Наблюдали, что вирус обладает противоопухолевыми эффектами, включая один полный ответ, несмотря на отсутствие экзогенных терапевтических генов в модифицированном вирусе (Mckartetal (2001) CancerRes 1: 8751-8757).

В другом исследовании в участки вблизи меланомных позитивных лимфатических узлов вводят онколизат меланомы осповакцины (VMO) при клиническом исследовании меланомы III фазы. Пациенты с меланомой, обработанные VMO, имеют выживаемость лучше, чем у необработанных пациентов, но сходны с пациентами, обработанными с помощью VV-контроля (Kimetal (2001) SurgicalOncol. 10: 53-59).

Штаммы LIVP осповакцины также использовались для диагностики и терапии опухолей, а также для лечения раненых и воспаленных тканей и клеток (см. например, Lin*etal.* (2007) *Surgery* 142:976-983; Lin *et al.* (2008) *J. Clin.Endocrinol. Metab.* 93:4403-7; Kelly *et al.* (2008) *Hum. Gene Ther.* 19:774-782; Yu *et al.* (2009) *Mol. Cancer Ther.* 8:141-151; Yu *et al.* (2009) Mol. *Cancer*8:45; патент США No. 7,588,767; Патент СШАtNo. 8,052,968; и патентная публикация СШАNo. 2004/0234455).

Например, при внутривенном введении штаммы LIVP накапливаются во внутренних опухолях в различных локусах invivo и продемонстрированы для эффективного лечения опухолей человека различного происхождения, в том числе, но не в качестве ограничения, опухолей молочной железы, опухолей щитовидной железы, опухолей поджелудочной железы, метастатических опухолей плевральной мезотелиомы, плоскоклеточного рака, карциномы легкого и опухолей яичника.LIVP штаммов осповакцины, включая их аттенуированные формы, проявляют меньшую токсичность, чем штаммы WR осповакцины, и приводят к увеличению и более длительной выживаемости обработанных опухоленесущих моделей животных (см. например, публикацию США № 2011/0293527).

d. Вирус кори

Вирус кори (MV) представляет собой оболочечный одноцепочечный РНК вирус с геномом с отрицательным смыслом, который принадлежит к семейству Paramyxovirus. Его несегментированный геном стабилен, при низком риске мутации и возвращении в его патогенную форму, а за счет его репликации в цитоплазме не возникает риска инсерционного мутагенеза ДНК в инфицированных клетках.MV сначала выделели из пациента, называемого Edmonston в 1954, и разработали в живую вакцину с превосходным профилем безопасности, который успешно защищает миллиарды людей во всем мире в течение 50 лет, путем ослабления после множества проходенийinvitro(Arefetal. (2016) *Viruses* 8:294; Hutzenetal. (2015) *OncolyticVirotherapy*4:109-118). Производные этого штамма, обозначенные как MV-Edm, являются наиболее широко используемыми штаммами MV в исследованиях онколитической терапии.Вакцинный штамм Schwarz/Morration является более аттенуированным и иммуногенным, чем производные Edm, что делает его более безопасным и более иммуномодулирующим (Veinaldeetal. (2017) Oncoimmunology 6 (4): e 1285992).Описаны онколитические эффекты MV дикого типа в 1970-х, с отчетами улучшений у пациентов с острым лимфобластным лейкозом, лимфомой Burkitt и лимфомой Ходжкина (Arefetal. (2016)).

MV использует три основных рецептора для входа в клетки-мишени: CD46, нектин -4 и сигнальную молекулу активации лимфоцитов (SLAM) (Arefetal (2016); Hutzenetal (2015)). В то же время SLAM, который экспрессируется на активированных B и T-клетках, незрелых тимоцитах, моноцитах и дендритных клетках, является основным рецептором для штаммов дикого типа, аттенуированных и опухолеселективных штаммов MV-Edm, прежде всего мишени рецептора CD46, регулятора активации комплемента, сверхэкспрессированного во многих опухолевых клетках (Arefetal (2016); Hutzenetal (2015); (Arefetal. (2016); Hutzenet al. (2015); Jacobson *et al.* (2017) *Oncotarget*8(38):63096-63109; Msaouelet al. (2013) *ExpertOpin. Biol. Ther.* 13(4):483-502).

Нектин -4, который преимущественно экспрессируется в респираторном эпителии, используется как диким, так и аттенуированным штаммами MV (Arefetal. (2016); Msaueletal (2013) ExpertOpin. Biol. Ther. 13 (4): 483-502).Как и с другими онколитическими вирусами, дефекты в противовирусном ответе IFN опухолевых клеток также способствуют селективности по MV (Arefetal(2016); Jacobsonetal (2017) Oncotarget 8 (38): 63096-63109). Клинические исследования исследовали MV при лечении нескольких видов рака, включая множественную миелому (NCT02 192775, NCT00450814), рак головы и шеи (NCT01846091), мезотелиомы (NCTO 1503177) и рака яичников (NCT00408590, NCT02364713).

MV был генетически сконструирован для экспрессии иммуностимулирующих и иммуномодулирующих генов, в том числе кодирующих IL -13, IFN-бета, GM-CSF и Helicobacterpylori нейтрофил-активирующий белок (NAP), например (Arefetal (2016), Hutzenetal (2015); Msaoueletal (2013) ExpertOpin. Biol. Ther. 13 (4): 483-502). Комбинированная терапия, использующая онколитический MV с анти-CTLA -4 и анти-PD-L1 антителами, эффективна в мышиных моделях меланомы (Arefetal. (2016); Hutzenetal (2015)).

MV-CEA, которая генетически сконструирована для экспрессии опухолевого маркера раково-эмбрионального антигена (CEA), приводит к высвобождению CEA в кровоток пациентов после инфицирования раковых клеток, обеспечивая обнаружение уровней CEA и, таким образом, отслеживание вирусной инфекции invivo (Arefetal (2016); Hutzenetal (2015)).Для лечения рака яичников (NCT00408590) показано терапевтическое применение MV-CEA.

e. Реовирусы

Респираторно-энтеросолюбильныйорфан-вирус, общеизвестный как реовирус, представляет собой безоболочечныйдвухцепочечный РНК-вирус семейства Reoviridae, который является непатогенным для человека. Реовирус дикого типа повсеместно распространен в окружающей среде, что приводит к 70-100% серопозитивности в общей популяции (Gongetal (2016) World J Methodol. 6 (L): 25-42). имеются три серотипа реовируса, которые включают в себя тип 1 Lang, тип 2 Jones, тип 3 Abney и тип 3 Develing (T3D).T3D является наиболее часто используемым природным онколитическим реовирусным серотипом в доклинических и клинических исследованиях.Онколитическийреовирус является опухолеселективным за счет активированной сигнализации Ras, характерной для раковых клеток (Gongetal (2016)); Zhaoetal (2016) Mol. Cancer.Ther. 15 (5): 767-773). Активация сигнального пути Ras нарушает противовирусные ответы клеток, ингибируя фосфорилирование dsРНК-зависимой протеинкиназы (PKR), белка, который обычно отвечает за предотвращение синтеза вирусного белка (Zhaoetal (2016)).

Активация Ras также усиливает вирусное непокрытие и разделение, приводит к усилению выработки вирусного потомства и инфекционности и ускоряет высвобождение потомства через усиленный апоптоз (Zhaoetal (2016)). Оценивают,

что приблизительно 30% всех опухолей человека отображают аберрантную сигнализацию Ras (Zhaoetal. (2016)).

Например, большинство злокачественных глиом имеют активированные пути передачи сигналов Ras, с реовирусом, проявляющим противоопухолевую активность в 83% злокачественных глиомных клеток invitro, а также invivo в моделях злокачественной глиомы человека, и в 100% образцов глиомы exvivo (Gongetal (2016) World J. Methodol. 6 (1): 25-42).Кроме того, аденокарциномы поджелудочной железы проявляют очень высокую частоту встречаемости Ras мутаций (приблизительно 90%), а реовирус продемонстрировал сильную цитотоксичность в 100% тестируемых invitro клеточных линий поджелудочной железы и индуцированную регрессию в 100% модели подкожной опухоли invivo (Gongetal (2016)).

Реовирус продемонстрировал широкую противораковую активность, доклиническую по спектру злокачественных новообразований, включая толстую кишку, рак молочной железы, яичник, кожу (меланома), неврологические, гематологические, предстательной железы, мочевой пузырь (Gongetal (2016)). Проводили исследование реовирусной терапии в сочетании с лучевой терапией, химиотерапией, иммунотерапией и хирургическим вмешательством.Комбинация реовирусной и лучевой терапии оказалась полезной при лечении рака головы и шеи, колоректального и рака молочной железы invitro, а также колоректального рака и моделей меланомы invivo (Gongetal (2016)).

Комбинации реовируса и гемцитабина, а также реовируса, паклитаксела и цисплатина, оказались успешными в мышиных моделях опухоли (Zhaoetal. (2016)).Доклинические исследования на мышиных моделях меланомы B16 показали, что комбинация онколитическогореовируса и анти-PD -1 терапии продемонстрировала улучшенную противораковую эффективность по сравнению с реовирусом отдельно (Gongetal. (2016); Zhaoetal (2016); Kempetal (2015) Viruses 8, 4).

Перспективные предклинические результаты, демонстрируемые реовирусом, привели ко многим клиническим исследованиям. РеовирусReolysin® , разработанный канадской компанией OncoyneticsBiotechInc, является единственным терапевтическим реовирусом дикого типа в клиническом развитии и продемонстрировал противораковую активность во многих злокачественных опухолях, и в сочетании с другими лекарственными средствами.

Например, при исследовании фазы I реовирусаReolysin ® при лечении рецидивирующих злокачественных глиом (NCT00528684) было обнаружено, что реовирус хорошо переносится, в то время как исследование фазы I/II показало, что реовирусReolysin ® убивает опухолевые клетки без повреждения нормальных клеток у пациентов с раком яичника, первичным перитонеальным раком или фаллопиновым раком, которые не реагировали на проведение химиотерапии платины (NCT00602277).

При клиническом исследовании фазы II реовирусаRelysin ®

продемонстрирована безопасность и эффективность при лечении пациентов с костной и мягкой тканью сарком, метастатическими на легкое (NCT00503295). Проводили фазу I клинического испытания реовирусаReolysin ® в сочетании с FOLFIRI и бевацизумабом у пациентов с метастатическим колоректальным раком (NCTO 1274624). Проводили фазу II клинического испытания реовирусаReolysin ® в сочетании с химиотерапевтическим гемцитабином у пациентов с развитой аденокарциномой поджелудочной железы (NCT00998322), клиническое исследование фазы II, исследовался терапевтический потенциал Relysin ® в комбинации с доцетакселом в метастатическом кастрационно-устойчивом раке предстательной железы (NCT01619813), и клиническое исследование фазы II, исследовалась комбинацияреовирусаReolysin ® с паклитакселом у пациентов с распространенным/метастатическим раком молочной железы (NCT01656538).

При клиническом исследовании фазы III исследовали эффективность Relysin ® в комбинации с паклитакселом и карбоплатиной в платинорефрактерной головке и раке шеи (NCT01166542), в то время как клинические исследования фазы II, использующие эту комбинированную терапию, проводили у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (NCT00861627) и метастатической меланомой (NCT00984464).Проводили фазу I клинического испытания Relysin ® в сочетании с карфилзомибом и дексаметазоном у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой (NCT02101944).

f. Вирус везикулярного стоматитаVirus (VSV)

Вирус везикулярного стоматита (VSV) является членом рода везикуловирусов в семействе Rhabdoviridae. Его геном, который состоит из одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью состоит из 11,161 нуклеотидов и кодирует пять генов: нуклеокапсидный белок (N), фосфопротеин (P), матричный белок (M), гликопротеин (G) и большой полимеразный белок (Bishnoi*etal.* (2018) *Viruses*10(2), 90).

VSV передается векторами насекомых, а заболевание ограничивается его природными хозяевами, в том числе лошадей, крупного рогатого скота и свиней, с легкой и бессимптомной инфекцией у людей (Bishnoietal. (2018) Viruses 10 (2), 90).VSV является мощным и быстрым индуктором апоптоза в инфицированных клетках, и было показано, что сенсибилизирует химиотерапевтические опухолевые клетки. Показано,

что VSV инфицирует сосудистую сеть, что приводит к потере кровотока к опухоли, свертыванию крови и лизису неоваскулярной сети.

Данный вирус также способен к репликации и индукции цитопатических эффектов и клеточного лизиса в гипоксических тканях.Кроме того, WT VSV растет до высоких титров в различных линиях клеток тканевой культуры, что способствует получению крупномасштабного вируса, имеет малый и удобный в обращении геном, и он реплицируется в цитоплазме без риска трансформации клетки-хозяина (Bishnoi*etal.* (2018); FeltandGrdzelishvili (2017) *JournalofGeneralVirology*98:2895-2911).

Эти факторы вместе с тем фактом, что он не патогенен людям, и обычно нет уже существующего иммунитета человека к VSV, делают его хорошим кандидатом на вирусную онкотерапию.

Хотя VSV может прикрепляться к экспрессированным молекулам клеточной поверхности, делая его "пантропным", WTVSV чувствителен к реакциям IFN типа I и, таким образом, проявляет онкоизбирательность на основе дефектной или ингибированной сигнализации IFN типа I опухолей (FeltandGrdzelishvili (2017)). Вследствие инфекционности нормальных клеток VSV может вызывать нейропатогенность, но может быть аттенуирован путем модификации его матричного белка и/или гликопротеина.Например, матричный белок может быть удален или остаток метионина в положении 51 матричного белка может быть удален или замещен аргинином (Bishnoi*etal.* (2018); FeltandGrdzelishvili (2017)). Другой подход заменяет гликопротеин VSV на вирус лимфоцитарногохориоменингита (LCMV) (rVSV-GP) (Bishnoi*etal.* (2018); FeltandGrdzelishvili (2017)).

VSV также может быть генетически модифицирован для включения суицидных генов, таких как тимидинкиназа вируса герпеса (TK), или для экспрессии иммуностимулирующих цитокинов, таких как IL -4, IL -12, и IFNP, или костимулирующих агентов, таких как гранулоцитарно-макрофагально-колониестимулирующий фактор 1 (GM-CSF1), для усиления онколитической активности (Bishnoietal (2018)). VSV-IFNP-иодид натрия симпортер (VSV-IFN(3-NIS), который кодирует NIS и IFNP, тестирован в США в нескольких клинических испытаниях (см. подробности в ClinicalTrials.gov для испытаний NCT02923466, NCT03120624 и NCT03017820).

Вирус везикулярного стоматита (VSV) представляет собой эффективное онколитическое терапевтическое средство при введении внутривенно (IV) в различных моделях рака мыши. В одном исследовании rVSV-GP был успешным при внутриутробном лечении подкожно привитых клеток глиобластомы G62 человека, а также внутривенном лечении ортотопических клеток глиомы U87 человека, в иммунодефицитных мышиных моделях.

Внутриротовая инъекция rVSV-GP также была эффективной против внутричерепных клеток глиомы CT2A (Muiketal.(2014) CancerRes 74 (13): 3567-

3578). Было обнаружено, что rVSV-GP не вызывал детектируемого ответа нейтрализующего антитела, и что этот генетически модифицированный онколитический вирус был нечувствителен к комплементу человека, оставаясь стабильным при эксперименте (Muiketal. (2014)).

В другом примере было обнаружено, что внутриопухолевое введение rVSV-GP эффективно инфицирует и убивает опухолевые клетки меланомы человека A375, трансплантированные в мышиную модель, а также клеточную линию меланомы мыши B16 (Kimpeletal. (2018) Viruses 10, 108).

Внутривенная инъекция онколитического вируса не была успешной, и даже в - ввводимых в опухоль группах все, в конечном счете, росли, из-за реакций IFN типа I (Kimpeletal. (2018)).В другом исследовании подкожная модель ксенотрансплантата мыши с клетками рака яичника человека A2780 была обработана внутриопухолевой инъекцией rVSV-GP, и хотя ремиссия опухоли первоначально наблюдалась без нейротоксичности, ремиссия была временной, и опухоли рекурсировали. Было обнаружено, что это происходит из-за реакций IFN типа I, с наблюдаемым реверсом противовирусного состояния путем объединения rVSV-GP с ингибитором JAK1/2 руксолитиниба (Doldetal. (2016) MolecularTherapy-Onconetics 3, 16021).

g. Вирус болезни Ньюкастла

Вирус болезни Ньюкастла(NDV) представляет собой парамиксовирус птиц с одноцепочечным геномом РНК отрицательной полярности, который инфицирует домашнюю птицу и, как правило, является непатогенным для человека, но может вызывать гриппоподобные симптомы (Tayeb*etal.* (2015) *OncolyticVirotherapy*4:49-62; Cheng*etal.* (2016)*JVirol.* 90:5343-5352). Вследствие его цитоплазматической репликации, отсутствия интеграции и рекомбинации генома хозяина и высокой геномной стабильности, NDV и другие парамиксовирусы обеспечивают более безопасную и более привлекательную альтернативу другим онколитическим вирусам, таким как ретровирусы или некоторые ДНК-вирусы (Matveeva*etal.* (2015) *MolecularTherapy - Oncolytics*2, 150017).

Было показано, что NDV демонстрирует селективность по опухоли, в 10000 раз большую репликацию в опухолевых клетках, чем нормальные клетки, что приводит к онколизу за счет прямых цитопатических эффектов и индукции иммунных ответов (Tayeb*etal.* (2015); Lam*etal.* (2011) *JournalofBiomedicineandBiotechnology,* ID: 718710).

Хотя механизм селективности опухоли NDV не полностью ясен, продуцирование дефектного интерферона и ответы на сигнализацию IFN в опухолевых клетках позволяют вирусу реплицироваться и распространяться (Cheng*etal.* (2016); Ginting*etal.* (2017) *OncolyticVirotherapy*6:21-30).

Высокая аффинность парамиксовирусов к раковым клеткам также может быть обусловлена сверхэкспрессией вирусных рецепторов на поверхностях раковых клеток, включая сиаловую кислоту (Cheng*etal.* (2016);Matveeva*etal.* (2015); Tayeb*etal.* (2015)).

Несконструированные штаммы NDV классифицируют как лентогенные (авирулентные), мезогенные (промежуточные) или велогенные (вирулентные), основанные на их патогенности у кур, при этом велогенные и мезогенные штаммы способны к репликации в (и лизировании) множества линий раковых клеток человека, но не лентогенных штаммов (Chengetal. (2016); Matveevaetal. (2015)).

Штаммы NDV также классифицируются как литические или нелитические, при этом только литические штаммы способны продуцировать жизнеспособное и инфекционное потомство (Gintingetal. (2017); Matveevaetal. (2015)). с другой стороны, онколитические эффекты нелитических штаммов, главным образом, от их способности стимулировать иммунные ответы, приводят к противоопухолевой активности (Gintingetal. (2017) *OncolyticVirotherapy*6:21-30). Мезогенные литические штаммы, обычно используемые в онкотерапии, включают PV701 (MK107), M -68/H и 73-T, и лентогенныенелитические штаммы, обычно используемые, включают HUJ, Ulster и Hitchner-Bl (Tayebetal. (2015); Lametal (2011); Freemanetal (2006) Mol. Ther. 13 (1): 221-228).

Штамм NDV PV701 продемонстрировал активность против колоректального рака в испытании фазы 1 (Laurie*etal.* (2006) *Clin. CancerRes.* 12(8):2555-2562), и штамм NDV 73-T продемонстрировал онколитическую активность invitro против различных линий раковых клеток человека, включая фибросаркому, остеосаркому, нейробластому и рак шейки матки, а также invivo терапевтические эффекты у мышей, несущих нейробластомы человека, ксенотрансплантатыфибросаркомы и несколько ксенотрансплантатов карциномы, включая ободочную кишку, легкое, ксенотрансплантатов рака молочной железы и предстательной железы (Lametal (2011)).

Штамм NDV MTH -68/H привел к значительной регрессии линий опухолевых клеток, включая PC12, MCF7, HCT116, DU -145, HT -29, A431, HELA и PC3, и продемонстрированы благоприятные реакции у пациентов с развитым раком при введении ингаляцией (Lametal (2011)). Нелитический штамм Ulsterпродемонстрировал

цитотоксические эффекты против рака ободочной кишки, а литический штамм Italien эффективно убивал меланому человека (Lametal.(2011)).

Лентогенный NDV штамм HUJ продемонстрировал онколитическую активность против рецидива мультиформыглиобластомы при введении внутривенно больным, при этом лентогенный штамм LaSota пролонгирует выживание у колоректального рака у пациентов (Lametal. (2011); Freemanetal. (2006) Mol. Ther. 13 (1): 221-228) и ,был способен инфицировать и уничтожить немелкоклеточный рак легкого (A549), глиобластому (U87MG и T98G), аденокарциному молочной железы (MCF7 и MDA-MB -453) и клеточные линии гепатоцеллюлярной карциномы (Huh7) (Gintingetal. (2017) *OncolyticVirotherapy*6:21-30).

Генетически сконструированные штаммы NDV также были оценены для онколитической терапии.

Например, ген NS1 вируса гриппа, антагонист IFN был введен в геном NDV штамма Hitchner-Bl, что приводит к усиленному онколитическому эффекту во множестве линий опухолевых клеток человека и мышиной модели меланомы B16 (Tayebetal (2015)). противоопухолевые/иммуностимулирующие эффекты NDV были дополнены введением в вирусный геном генов IL -2 или GM-CSF (Lametal. (2011)). Комбинированная терапия, использующая внутриротовую инъекцию NDV с системным введением антитела CTLA -4, привела к эффективному отторжению предварительно установленных отдаленных опухолей (Matveevaetal. (2015)).

h. Парвовирус

ПарвовирусH-l (H -1 PV) представляет собой малый, не оболочечный одноцепочечный ДНК-вирус, принадлежащий семейству Parvoviridae, естественный хозяин которого является крысой (Angelovaetal.
(2017) Front. Oncol. 7:93; Angelovaet al. (2015) *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3:55).H -1 PV является непатогенным для человека и является привлекательным в качестве онколитического вируса из-за его благоприятного профиля безопасности, отсутствия предсуществующего иммунитета H -1 PV у человека, и отсутствия интеграции с геномом клетки-хозяина (Angelovaetal. (2015)).

H -1 PV обладает широкой онкосуппрессивной активностью против солидных опухолей, включая доклинические модели рака молочной железы, желудка, шейки матки, головного мозга, поджелудочной железы и колоректального рака, а также гематологические злокачественные опухоли, включая лимфому и лейкоз (Angelovaetal (2017)). H -1 PV стимулирует противоопухолевые ответы посредством увеличенного представления опухолеассоциированных антигенов, созревания дендритных клеток, а также высвобождения провоспалительных цитокинов (Moehler*etal.* (2014) *FrontiersinOncology*4:92).

H -1 PV также проявляет селективность по опухоли, которая, как полагают, обусловлена наличием клеток клеточной репликации и транскрипционных факторов, сверхэкспрессии клеточных белков, взаимодействующих с парвовирусным белком NS1, и активации метаболических путей, участвующих в функциональной регуляции NS1 в опухолевых клетках, но не нормальных клетках.Из-за безвредной природы H -1PV часто используют штамм дикого типа, устраняя необходимость в ослаблении генной инженерии (Angelovaetal. (2015)).

Исследования показали, что онколитическая H -1 PV инфекция клеток глиомы человека приводит к эффективному уничтожению клеток, и модели стволовых клеток глиомы высокой степени также являются допустимыми для литической инфекции H -1 PV. Улучшенное уничтожение клеток глиомы наблюдается, когда вирус применялся вскоре после облучения опухолевых клеток, что указывает на то, что этот протокол может быть полезен при нерезектабельной рекуррентной глиобластоме (Angelovaetal. (2017)).

Внутримозговое или системное введение H -1 PV привело к регрессии глиом без токсических побочных эффектов у иммунокомпетентных крыс с ортотопическими опухолями RG -2, а также у иммунодефицитных животных, имплантированных человеческими U87 глиомами (Angelovaetal (2015)). DelH -1 PV, вариант с повышенной инфекционностью и распространением в трансформированных клеточных линиях человека, продемонстрировал онколитические эффекты invivo в моделях ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы и рака шейки матки (Geissetal. (2017) Viruses 9, 301). H -1 PV также продемонстрировала онколитическую активность в отношении панели из пяти клеточных линий остеосаркомы человека (CAL 72, H-OS, MG -63, SaOS -2, U -20S) (Geissetal (2017) Viruses 9, 301) и против клеток меланомы человека (SK29-Mel -1, SK29-Mel -1,22) (Moehler*et al.* (2014) *FrontiersinOncology*4:92).

В другом исследовании бестимусных крыс, несущих ксенотрансплантаты рака шейки матки, продемонстрирована дозозависимая остановка роста опухоли и регрессия после лечения H -1 PV (Angelovaetal. (2015)).Интраопухолевое и внутривенное введение H -1 PV также продемонстрировало значительное подавление роста в ксенотрансплантатах карциномы молочной железы человека в иммунокомпромиссных мышах (Angelovaetal. (2015)).

Внутриопухолевая инъекция H -1 PV в карциномы желудка человека или у мышей, несущих лимфому Буркита человека, привела к регрессии опухоли и подавлению роста (Angelovaetal. (2015)).

Клиническое исследование онколитического H -1 PV (ParvOryxO1) на фазе I/IIa при рецидивирующих глиобластомумультиформных пациентах (клиническое исследование NCT013030), продемонстрировало без прогрессирования выживаемость, клиническую безопасность и переносимость у пациента с внутриротовой или внутривенной инъекцией (Angelova*etal.* (2017); Geiss*etal.* (2017) *Viruses*9, 301; Geletneky*etal.* (2017) *Mol. Ther.* 25(12):2620-2634).

Это исследование продемонстрировало способность H -1 PV пересекать гематоэнцефалический барьер дозозависимым образом и установить иммуногенную противоопухолевую реакцию, характеризующуюся лейкоцитарной инфильтрацией,

преимущественно $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-лимфоцитами и выявление в локально обработанных опухолях нескольких маркеров активации иммунных клеток, включающих перфорин, гранзим B, IFNy, IL -2, CD25 и CD40L (Geletneky*etal.* (2017) *Mol. Ther.* 25(12):2620-2634).

H -1 PV также продемонстрировал эффективное уничтожение высокоагрессивных клеток аденокарциномы протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (PD AC) invitro, в том числе устойчивых к гемцитабину и внутриопухолевая инъекция H -1 PV приводят к регрессии опухоли и длительному выживанию животных в ортотопической крысиной модели PD AC (Angelovaetal.(2017); Angelovaetal (2015)).

Аналогичные результаты, в том числе избирательное нацеливание на опухоль и отсутствие токсичности, наблюдаются в иммунодефицитной модели "бестимусная крысиная PDAC" (Angelovaetal. (2015)). Комбинация из H -1 PV и цитостатики (цисплатина, винкристин) или нацеленных (сунитиниб) лекарственных средств приводит к синергетической индукции апоптоза в клетках меланомы человека (Moehleretal. (2014)).

Сочетание H -1 PV и вальпроновой кислоты, ингибитора HDAC, приводило к синергетической цитотоксичности в отношении клеток рака шейки матки и поджелудочной железы (Angelovaetal. (2017)), в то время как терапевтическая эффективность гемцитабина была улучшена при объединении с H -1 PV в двухступенчатом протоколе (Angelovaetal (2015)). Как и другие вирусы, H -1 PV можно сконструировать для экспрессии противораковых молекул. Например, исследования показали, что вектор, происходящий из парвовируса-Hl, экспрессирующий апоптин, обладает большей способностью индуцировать апоптоз, чем H -1 PV дикого типа (Geissetal. (2017)).

i. Вирус Коксаки

Вирус Коксаки (CV) принадлежит к роду энтеровирусов и семействуPicornaviridae и имеет положительно- смысловой одноцепочечный геном РНК, который не интегрируется в геном клетки-хозяина. CV классифицируются на группы A и B, основанные на их эффектах у мышей, и могут вызывать слабые инфекции верхних дыхательных путей у людей (Bradley*etal.* (2014) *OncolyticVirotheraphy*3:47-55).

Обычно исследуемые вирусы Коксаки для онколитическойвиротерапии включают аттенуированныйКоксаки B3 (CV-B3), CV-B4, CV-A9 и CV-A21 (Yla-Pelto*etal.* (2016) *Viruses*8, 57).CV-A21 инфицируют клетки через рецепторы ICAM -1 (или CD54) и DAF (или CD55), которые экспрессируются на значительно более высоких уровнях в опухолевых клетках, в том числе меланомы, молочной железы, толстой кишки, эндометрия, головы и шеи, рака поджелудочной железы и легких, а также множественной миеломы и злокачественной глиомы.

CV-A21 показал перспективную доклиническую противоопухолевую активность invitro против злокачественной опухоли, меланомы и предстательной железы, легких, головы и шеи, и линий клеток рака молочной железы, и invivo у мышей, несущих ксенотрансплантаты меланомы человека, и от первичных опухолей рака молочной железы, а также их метастазов у мышей (Ylla-Peltoetal (2016); Bradleyetal (2014)).

Производное CV-A21, CV-A21-DAFv, также известное как CAVATAK ™, было получено из дикого типа штамма Kuykendall путем последовательного прохождения CV-A21 на клетки DAF-экспрессирующей, ICAM-1-негативной рабдомиосаркомы (RD) и было обнаружено, что обладает повышенными онколитическими свойствами по сравнению с родительским штаммом. CAVATAK ™ связывается только с рецептором DAF, который может вносить вклад в его повышенный тропизм к раковым клеткам (Ylla-Peltoetal. (2016)).

CV-A21 также изучали в сочетании с гидрохлоридом доксорубицина, проявляющим повышенную онколитическую эффективность по сравнению с обработкой отдельно от рака молочной железы человека, колоректального и панкреатического рака поджелудочной железы, а также в ксенотрансплантатной модели мыши рака молочной железы человека (Yla-Peltoetal (2016)). Поскольку значительная часть популяции уже развила нейтрализующие антитела против CV, терапия CV-A21 была объединена с иммунодепрессантами, такими как циклофосфамид (Bradleyetal.)(2014)) и является хорошим кандидатом для доставки через клетки носителя.

Клинические испытания исследовали использование CAVATAK ™ у пациентов со злокачественной меланомой стадии IIIc или IV (NCT01636882; NCT00438009; NCT01227551) и CAVATAK ™ по отдельности или в сочетании с низкой дозой митомицина C у пациентов с немышечным инвазивным раком мочевого пузыря (NCT02316171). Клинические испытания также изучали эффекты внутривенного введения CV-A21 при лечении солидных опухолей, включая меланому, рак молочной железы и предстательной железы (NCT00636558).Продолжающиеся клинические испытания включают исследование CAVATAK ™ по отдельности или в комбинации с пембролизумабом для лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого (NCT02824965, NCT02043665) и раком мочевого пузыря (NCT02043665); CAVATAK ™ в сочетании с ипилимумабом у пациентов с увеальной меланомой и метастазами

печени (NCT03408587) и у пациентов с развитой меланомой (NCT02307149); и CAVATAK ™ в сочетании с пембролизумабом у пациентов с развитой меланомой (NCT02565992).

j. Вирус SenecaValley

Вирус SenecaValley (SVV) является членом рода Senecavirus в пределах семейства Picornaviridae, который имеет положительно-смысловой одноцепочечный геном РНК и является селективным для нейроэндокринных рака, включая нейробластому, рабдомиосаркому, медуллобластому, опухоль Вильмса, глиобластому и мелкоклеточный рак легкого (Miles*etal.* (2017)1 *Clin. Invest.* 127(8):2957-2967; Qian *et al.* (2017)1 *Virol.* 91(16):e00823-17; Burke, M. *J.* (2016) *Oncolytic Virotherapy* 5:81-89).Исследования выявили рецептор 1 токсина сибирской язвы (ANTXR1) в качестве рецептора для SVV, который часто экспрессируется на поверхности опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками.

Исследования также показали, что сиаловая кислота может быть компонентом SVV-рецептора в педиатрических моделях глиомы (Miles и др. (2017)). SVV-изолят 001 (SVV -001) является мощным онколитическим вирусом, который может нацеливаться и проникать в твердые опухоли после внутривенного введения, и является привлекательным из-за отсутствия инсерционного мутагенеза, а также его селективного тропизма для раковых клеток и его непатогенности у людей и животных.Кроме того, предшествующее воздействие на человека редко, что приводит к низкой скорости предсуществующего иммунитета (Burke, M. **J.** (2016) *OncolyticVirotherapy*5:81-89).

SW -001 показана перспективной по invitro активности против мелкоклеточного рака легкого, коры надпочечников, нейробластомы, рабдомиосаркомы и клеточных линий саркомы Ewing, и активности invivo в ортотопическихксенотрансплантатных мышиных моделях педиатрического GBM, медуллобластомы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы и нейробластомы (Burke (2016)). NTX -010, онколитическийSVV -001, разработанный Neotropix®, предназначен для лечения педиатрических пациентов с рецидивирующими/рефрактерными солидными опухолями по отдельности или в сочетании с циклофосфамидом, но был ограничен в его

терапевтической эффективности за счет разработки нейтрализующих антител (Burkeetal (2015) Pediatr. BloodCancer 62 (5): 743-750).

Клинические исследования включают исследования с использованиемSV -001 у пациентов с солидными опухолями с нейроэндокринными признаками (NCT00314925),NTX -010/SVV -001 в комбинации с циклофосфамидом у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной нейробластомой, рабдомиосаркомы, опухоли Вильмса, ретинобластомы, адренокортикальной карциномы или карциноидных опухолей (NCT01048892) и NTX -010/SVV-001 у пациентов с мелкоклеточным раком легкого после химиотерапии (NCT01017601).

H. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО, КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

Предложены способы изготовления, фармацевтические композиции и составы, содержащие любые из иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемые эксципиенты или добавки. Фармацевтические композиции могут быть использованы при лечении заболеваний, таких как гиперпролиферативные заболевания или условия, такие как опухоль или рак.Иммуностимулирующие бактерии могут быть введены в однолучевую терапию или могут быть введены в комбинированной терапии с дополнительным агентом или обработкой. Композиции могут быть составлены для однократного дозированного введения или для многократного дозированного введения. Агенты могут быть составлены для непосредственного введения. Композиции могут быть представлены в виде жидкого или высушенного состава.

1. Изготовление

a. Изготовление банка клеток

В качестве активного ингредиента иммунотерапевтического средства, описанного в настоящем документе, используют сконструированные самореплицирующиеся бактерии, выбранная композиция будет расширяться в ряд клеточных банков, которые будут поддерживаться для длительного хранения и в качестве исходного материала для изготовления лекарственного вещества. Банки клеток вырабатываются при текущей хорошей технологичности производства

(cGMP) в соответствующем производственном объекте по Коду Федеральных Правил (CFR) 21 части 211 или другого релевантного регуляторного органа.

В качестве активного агента иммунотерапии используется живая бактерия, продукты, описанные в данном документе, по определению не являются стерильными и не могут быть полностью стерилизованы. Необходимо принять меры по обеспечению асептических процедур на протяжении всего процесса изготовления для предотвращения загрязнения.Таким образом, все сырье и растворы должны быть стерилизованы перед использованием в процессе производства.

Главный банк клеток (MCB) получают путем последовательного однократного выделения колонии выбранного бактериального штамма для обеспечения отсутствия загрязнений в исходном материале. Стерильную культуральную емкость, содержащую стерильные среды (могут представлять собой комплексные среды, например LB или MSBB или определенные среды, например, M9, дополненные соответствующими питательными веществами), инокулируют одной хорошо выделенной бактериальной колонией, и бактерии дают возможность реплицироваться, например, инкубацией при 37° C при встряхивании.Затем готовят бактерии для криоконсервации суспензии в растворе, содержащем криопротекторный агент или агенты.

Примеры криопротекторов включают: белки, такие как альбумин человека или бычий сывороточный альбумин, желатин и иммуноглобулины; углеводы, включающие моносахариды (галактозу, D-маннозу, сорбозу и тд) и их невосстанавливающие 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 трехатомный или высший сахарные спирты, например глицерин, эритрит, глицерин, арабит, ксилит, сорбит и маннит; пропиленгликоль; полиэтиленгликоль; поверхностно-активные вещества, например, плюроник; или сероорганика - как диметилсульфоксид (ДМСО), и их комбинации.

Криоконсервативные растворы могут включать один или более криопротекторов в растворе, который может также содержать соли (например. хлорид натрия, хлорид

калия, сульфат магния), и/или буферные агенты, такие как фосфат натрия,трис (гидроксиметил) аминометан (TRIS), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES) и другие подобные буферные агенты, известные специалистам в данной области.

Суспензия бактерий в криоконсервирующем растворе может быть получена либо добавлением концентрированного криогенного агента или агентов в культуральный материал 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 криоконсервантном растворе, содержащем соответствующую конечную концентрацию криопротекторного агента (ов). Затем суспензию бактерий в криоконсервационном растворе заполняют в соответствующие стерильные флаконы (пластик или стакан) с системой закрытия контейнера, которая способна поддерживать целостность укупорочного средства в замороженных условиях (например, бутильные пробки и обжимные уплотнения).

Затем флаконы из главного набора клеток замораживают (или медленно с помощью морозильной камеры с регулируемой скоростью, или быстро путем помещения непосредственно в морозильную камеру). Затем MCB хранят в замороженном состоянии при температуре, которая сохраняет долговременную жизнеспособность (например, при или ниже -60° C). Оттаявший материал тщательно характеризуют для обеспечения идентичности, чистоты и активности на регулирование соответствующими уполномоченными лицами.

Рабочие банки клеток (WCB) получают таким же образом, как и главный банк клеток, но исходный материал получают из MCB. Материал MCB может быть непосредственно перенесен в ферментационный сосуд, содержащий стерильные среды и расширяющийся, как описано выше. Затем бактерии суспендируют в криоконсервирующем растворе, заливают в контейнеры, герметизируют и замораживают при температуре или ниже -20° C. Множество WCB могут быть получены из материала MCB, и материал WCB может быть использован для изготовления дополнительных банков (например,, банк рабочий банк клеток производителя MWCB). WCB хранят в замороженном виде и характеризуют, чтобы обеспечить идентичность, чистоту и активность. Материал WCB, как правило,

представляет собой исходный материал, используемый в производстве лекарственного вещества из биоматериалов, таких как сконструированные бактерии.

Изготовление лекарственных веществ

Лекарственное вещество получают с использованием асептических процессов при cGMP, как описано выше. Материал банка рабочих клеток обычно используется в качестве исходного материала для изготовления лекарственного вещества в cGMP, однако могут быть использованы другие банки(например. MCB или MWCB). Асептическая обработка используется для производства всех клеточных терапий, включающих бактериальную терапию на клеточной основе. Бактерии из банка клеток размножаются ферментацией; это может быть достигнуто путем получения предкультуры (например,, во встряхиваемой колбе) или путем непосредственной инокуляции ферментера.

Ферментацию осуществляют в стерильном биореакторе или колбе, которая может быть одноразовой или повторно используемой. Бактерии собирают по концентрации (например, центрифугированием, непрерывным центрифугированием или тангенциальной фильтрацией потока). Концентрированные бактерии очищают от медиакомпонентов и бактериальных метаболитов путем обмена сред буфером (например, диафильтрацией).Сыпучий лекарственный продукт готовят и сохраняют в качестве промежуточного продукта (например, путем замораживания или сушки) или перерабатывают непосредственно в лекарственный продукт. Лекарственное вещество тестируют на идентичность, прочность, чистоту, эффективность и качество.

b. Изготовление лекарственного продукта

Лекарственное средство определяют как конечный состав активного вещества, содержащегося в его конечном контейнере. Лекарственное средство получают с использованием асептических процессов при cGMP. Лекарственное средство получают из лекарственного вещества. Осуществляют оттаивание или восстановление лекарственного вещества при необходимости, составление при

соответствующей целевой прочности. Поскольку активный компонент лекарственного средства представляет собой живые, сконструированные бактерии, прочность определяется количеством CFU, содержащихся в суспензии.Сыпучий продукт разбавляют в готовой препаративной форме, подходящей для хранения и использования, как описано ниже. Заполняют контейнеры и герметизируют с помощью системы закрытия контейнера и маркируют лекарственное средство. Лекарственное средство хранят при соответствующей температуре для сохранения стабильности и тестируют на идентичность, прочность, чистоту, активность и качество и высвобождают для использования человеком, если оно удовлетворяет заданным критериям приемлемости.

2. Композиции

Фармацевтически приемлемые композиции получают с учетом одобрений от регуляторного агентства или другого агентства, приготовленного в соответствии с общепризнанной фармакопеей для применения у животных и у людей. Композиции могут быть приготовлены в виде растворов, суспензий, порошков или составов с замедленным высвобождением.

Как правило, соединения формулируются в фармацевтические композиции с использованием методик и процедур, хорошо известных в данной области (см. например, AnselIntroductiontoPharmaceuticalDosageForms, FourthEdition, 1985, 126). Состав соответствует режиму введения.

Композиции могут быть составлены для введения любым способом, известным специалистам в данной области, включая внутримышечно, внутривенно, внутрикожно,внутрибрюшинно, подкожно, внутриротово, эпидурально, назально, орально, вагинально, ректально, местно, хаотически, ингаляционно, буккально (например, сублингвально), или для трансдермального введения или для любого пути введения.

Также рассматриваются другие режимы введения. Введение может быть локальным, местным или системным в зависимости от места проведения лечения.Локальное введение в область, нуждающуюся в лечении, может быть достигнуто, например, без ограничения, локальной инфузией во время операции, местного применения,

например, в сочетании с раневой повязкой после операции, посредством инъекции, посредством катетера, посредством суппозитория, или посредством имплантата. Композиции также могут вводиться с другими биологически активными агентами либо последовательно, периодически или в одном и том же составе.Введение также может включать в себя управляемые системы высвобождения, включающие составы с контролируемым высвобождением и контролируемое высвобождение устройства, например, с помощью насоса.

Наиболее подходящий маршрут в любом данном случае зависит от множества факторов, таких как характер заболевания, прогрессирование заболевания, тяжесть заболевания и конкретный состав, который используется. Фармацевтические композиции могут быть составлены в лекарственных формах, подходящих для каждого пути введения. В частности, композиции могут быть составлены в любые подходящие фармацевтические препараты для системного, местного внутрибрюшинного, перорального или прямого введения.Например, композиции могут быть составлены для введения подкожно, внутримышечно, внутривенно или внутрикожно. Способы введения могут быть использованы для снижения воздействия активного агента на деградативные процессы, такие как иммунологическое вмешательство через антигенные и иммуногенные реакции. Примеры таких способов включают местное введение в месте лечения или непрерывную инфузию. Иммуностимулирующие бактерии могут быть составлены в состав подходящих фармацевтических препаратов, таких как растворы, суспензии, таблетки, диспергируемые таблетки, пилюли, капсулы, порошки, составы с замедленным высвобождением или эликсиры, для перорального введения, а также трансдермальные пластыри и ингаляторы сухого порошка.

Как правило, соединения формулируются в фармацевтические композиции с использованием методик и процедур, хорошо известных в данной области (см. например, AnselIntroductiontoPharmaceuticalDosageForms, FourthEdition, 1985, 126). Как правило, режим состава является функцией пути введения.Композиции могут быть приготовлены в виде высушенных (лиофилизированных или других форм витрификации) или жидкой формы. В тех случаях, когда композиции поставляются в высушенной форме, они могут быть восстановлены непосредственно перед использованием посредством добавления соответствующего буфера, например стерильного солевого раствора.

3. Составы

a. Жидкости, составы для инъекций, эмульсии

Состав, как правило, выполнен с возможностью соответствия пути введения. Парентеральное введение, как правило, характеризуется инъекцией или инфузией, либо подкожно, внутримышечно, внутримышечно, внутривенно или внутрикожно. Препараты бактерий для парентерального введения включают суспензии, готовые для инъекций (непосредственное введение) или замороженные суспензии, которые оттаиваются перед использованием, сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для объединения с раствором ресуспендирования непосредственно перед использованием, и эмульсии.Высушенные термостабильные составы, такие как лиофилизированные составы, могут быть использованы для хранения единичных доз для последующего использования.

Фармацевтический препарат может находиться в замороженной жидкой форме, например суспензии. При наличии в замороженной жидкой форме продукт может быть выполнен в виде концентрированного препарата, который должен быть оттаян и разбавлен до терапевтически эффективной концентрации перед использованием.

Фармацевтические препараты также могут быть предоставлены в лекарственной форме, не требующей оттаивания или разбавления для использования. Такие жидкие препараты могут быть получены обычными средствами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие агенты (например, сорбит, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгирующие агенты (например, лецитин или аравийская камедь); неводные транспортные средства (например, миндальное масло, масляные эфиры или фракционированные растительные масла); и консерванты, подходящие для использования с микробными лекарственными средствами. Фармацевтические препараты могут быть представлены в высушенном виде таком как лиофилизированная или высушенная распылением форма, для восстановления водой или другим стерильным подходящим носителем перед использованием.

Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза или глицерин. Растворы могут быть либо водными, либо неводными. При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и другие буферные растворы, используемые для внутривенной гидратации.Для внутриротового введения растворы, содержащие загущающие агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и

полипропиленгликоль, масляные эмульсии и их смеси, могут быть подходящими для поддержания локализации вводимого.

Фармацевтические композиции могут включать носители или другие эксципиенты. Например, фармацевтические композиции, предложенные в настоящем документе, могут содержать любой один или более из разбавителей (ов), адъюванта (ов), антиадгезивов , связующего (их), покрытия (ий), наполнителя (ей), ароматизатора (ов), цвета (ов), смазывающего вещества (в), скользящего вещества (в), консерванта (ов), моющего средства (в), или сорбента (ов) и их комбинации или средства, с которым вводится модифицированная терапевтическая бактерия.Например, фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, используемые в парентеральных препаратах, включают водные средства, неводные носители, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, комплексообразующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Составы, в том числе жидкие препараты, могут быть получены обычными средствами с фармацевтически приемлемыми добавками или эксципиентами.

Фармацевтические композиции могут включать носители, такие как разбавитель, адъювант, эксципиент или средство, с которым вводят композиции. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington 's PharmaceuticalSciences" by E W Martin.Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения или агента, обычно в очищенной форме или частично очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя для обеспечения формы для правильного введения пациенту. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефти, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло.

Вода является типичным носителем.Растворы солевые и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности для растворов для инъекций. Композиции могут содержать наряду с активным ингредиентом: разбавитель, такой как лактоза, сахароза, дикальцийфосфат, или карбоксиметилцеллюлоза;смазывающее вещество, такое как стеарат магния,

стеарат кальция и тальк; и связующее, такое как крахмал, природные камеди, такие как гуммиарабик, желатин, глюкоза, меласса, поливинилпирролидин, целлюлозы и их производные, повидон, кросповидоны и другие такие связующие, известные специалистам в данной области. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду и этанол. Например, подходящие эксципиенты представляют собой, например, воду, физиологический раствор, декстрозу, глицерин или этанол.

При необходимости композиция также может содержать небольшие количества других нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, такие как, например, ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и циклодекстрины.
Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные средства, неводные носители, антимикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, комплексообразующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества.Примеры водных средств включают в себя инъекцию хлорида натрия, инъекцию Рингера, изотоническую инъекцию декстрозы, стерильную инъекцию воды, декстрозу . Неводные парентеральные носители 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 агенты включают, например, полисорбаты, такие как полисорбат 80 (TWEEN 80). Могут быть включены секвестрант или хелатирующие агенты ионов металлов, такие как ЭДТА. Фармацевтические носители также включают полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешиваемых с водой

средств и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH. Могут быть включены не антимикр Фармацевтические композиции также могут содержать небольшие количества других нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие агенты, такие как, например, ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и циклодекстрины.

Также рассматривается имплантация системы замедленного высвобождения, так что поддерживается постоянный уровень дозировки (см. например, патент США № 3710795). Процентное содержание активного соединения, содержащегося в таких парентеральных композициях, сильно зависит от его специфической природы, а также активности соединения и потребностей субъекта.

b. Высушенные термостойкие составы

Бактерии могут быть высушены. Высушенные термостабильные составы, такие как лиофилизированные или высушенные распылением порошки и стекловидные составы, могут быть восстановлены для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Высушенный термостабильный состав может быть приготовлен из любых жидких составов, таких как суспензии, описанные выше. Фармацевтические препараты могут быть представлены в лиофилизированной или остеклованной форме для восстановления водой или другим подходящим носителем перед использованием.

Термостабильный состав готовят для введения путем восстановления высушенного соединения стерильным раствором. Раствор может содержать эксципиент, который улучшает стабильность или другой фармакологический атрибут активного вещества или восстановленного раствора, приготовленного из порошка.Термостабильный состав получают растворением эксципиента, такого как декстроза, сорбит, фруктоза, сироп сом, 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 в полученную смесь добавляют лекарственное вещество и перемешивают до смешивания.

Полученную смесь помещают во флаконы для сушки.Каждый флакон будет содержать единичную дозу, содержащую 1×10^{5}-$1x10^{11}$ КОЕ на флакон. После сушки сосуд для продукта герметизируют с помощью системы закрывания

контейнера, которая предотвращает попадание влаги или загрязняющих веществ в герметичный флакон. Высушенный продукт может храниться в соответствующих условиях, таких как при -20° С, 4° С или комнатной температуре. Восстановление этой высушенной композиции водой или буферным раствором обеспечивает состав для применения при парентеральном введении. Точное количество зависит от показателя, обработанного и выбранного соединения.Такое количество может быть определено эмпирически.

4. Композиции для других путей введения

В зависимости от состояния, другие пути введения в дополнение к парентеральному, такие как местное применение, трансдермальные пластыри, пероральное и ректальное введение также рассматриваются здесь. Суспензии и порошки, описанные выше, могут быть введены перорально или могут быть восстановлены для перорального введения. Фармацевтические лекарственные формы для ректального введения представляют собой ректальные суппозитории, капсулы и таблетки и гелевые капсулы для системного действия.Ректальные суппозитории включают твердые тела для введения в прямую кишку, которые расплавляется или размягчается при температуре тела, высвобождая один или более фармакологически или терапевтически активных ингредиентов.

Фармацевтически приемлемые вещества в ректальных суппозиториях представляют собой основания или носители и средства для повышения температуры плавления. Примеры оснований включают масло какао (теобромальное масло), глицерин-желатин, карбовоск (полиоксиэтиленгликоль) и соответствующие смеси моно -, ди-и триглицеридов жирных кислот. Могут быть использованы комбинации различных оснований. Средства для повышения температуры плавления суппозиториев включают спермацет и воск.Ректальные суппозитории могут быть получены либо способом прессования, либо способои формования. Типичная масса ректального суппозитория составляет от примерно 2 до 3 г. Таблетки и капсулы для ректального введения изготовлены с использованием одного и того же фармацевтически приемлемого вещества и теми же способами, что и составы для перорального введения. Композиции, подходящие для ректального введения, могут быть представлены в виде суппозиториев единичной дозы.Они могут быть получены смешиванием 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 средствами 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); разрыхлители (крахмал картофельный или гликолят крахмала натрия); или смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты способами, хорошо известными в данной области техники.

Композиции, подходящие для буккального (сублингвального) введения, включают, например, пастилки, содержащие активное соединение в ароматизированной основе, обычно сахарозу и аравийскую камедь или трагакант; и пастилки, содержащие соединение в инертном основании, таком как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь.

Готовят местные смеси, как описано для местного и системного введения. Полученные смеси могут представлять собой растворы, суспензии, эмульсии или тому подобное и приготовлены в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, спреев, суппозиториев, бинтов, кожных пластырей или любые других составов, подходящих для местного применения.

Композиции могут быть приготовлены в виде аэрозолей для местного применения, например, путем ингаляции (см. например, патенты США № 4044126; 4414209 и 4364923, которые описывают аэрозоли для доставки стероида, пригодного для лечения заболеваний легких). Эти составы для введения в дыхательный тракт могут быть в виде аэрозоля или раствора для распылителя, или в виде очень мелкого порошка , отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза.В таком случае частицы состава обычно имеют диаметры менее 50 микрон или менее 10 микрон.

Соединения могут быть составлены для местного применения, например, для местного нанесения на кожу и слизистые оболочки, такие как в глазу, в виде гелей, кремов и лосьонов, и для нанесения на глаз или для интрацистернального или внутриспинального применения. Предложено местное применение для трансдермальной доставки, а также для введения в глаза или слизистую оболочку, или для ингаляционной терапии.Могут быть также введены назальные растворы активного соединения отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Предусмотрены составы, подходящие для трансдермального введения. Они могут быть обеспечены в любом подходящем формате, таком как дискретные пластыри, выполненные с возможностью оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение продолжительного периода времени. Такие пластыри содержат активное соединение в (необязательно) забуференном водном растворе, например, от 0,1 до 0,2 М концентрации по отношению к активному соединению.Препараты, подходящие для трансдермального введения, также могут быть доставлены с помощью ионофореза (см. например, Tyle, P, (1986) PharmaceuticalResearch 3 (6): 318-326) и обычно имеют форму (необязательно) забуференного водного раствора активного соединения.

Фармацевтические композиции также можно вводить с помощью составов с контролируемым высвобождением и/или устройств доставки (см. например. Патенты США № 3,536,809; 3,598,123; 3,630200; 3,845,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5120548; 5591767; 5639476; 5667433 и 5733566).

5. Дозировки и введение

Композиции могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций для однократной дозировки или многократного дозированного введения. Иммуностимулирующие бактерии могут быть включены в количестве, достаточном для оказания на пациента терапевтически полезного эффекта при отсутствии нежелательных побочных эффектов.

Например,концентрациюфармацевтическиактивного соединения регулируют таким образом, чтобы инъекция обеспечивала эффективное количество для получения желаемого фармакологического эффекта.

Терапевтически эффективная концентрация может быть определена эмпирически путем тестирования иммуностимулирующих бактерий в известных системах invitro и invivo, например, с использованием анализов, описанных в данном документе или известных в данной области техники. Например, можно использовать стандартные клинические методы.Для определения оптимальных диапазонов дозировки могут быть использованы анализы Invitro и модели животных. Точная доза, которая может быть определена эмпирически, может зависеть от возраста, веса, площади поверхности тела и состояния пациента или животного, конкретных иммуностимулирующих бактерий, пути введения, типа заболевания, подлежащего лечению, и тяжести заболевания.

Таким образом, понятно, что точная дозировка и продолжительность лечения являются функцией обрабатываемого заболевания и могут быть определены эмпирически с использованием известных протоколов тестирования или экстраполяцией из данных тестирования invivo или invitro. Концентрации и дозированные значения также могут варьироваться в зависимости от тяжести состояния, которое должно быть облегчено.Следует также понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования должны быть отрегулированы с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональной оценкой введения или контроля введения композиций, и что диапазоны концентраций, изложенные в данном документе, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или применения композиций и комбинаций, содержащих их.

Композиции можно вводить ежечасно, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно или однократно. Как правило, режимы дозирования выбирают для ограничения токсичности. Следует отметить, что лечащий врач должен знать, как и когда прекратить, прерывать или регулировать лечение к более низкой дозировке из-за токсичности, или костного мозга, печени или почек или других дисфункций ткани. И лечащий врач также должен знать, как и когда регулировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ не является адекватным (исключающим токсичные побочные эффекты).

Иммуностимулирующие бактерии включены в композицию в количестве, достаточном для оказания терапевтически полезного эффекта. Например, количество является таким, которое достигает терапевтического эффекта при лечении

гиперпролиферативного заболевания или состояния, такого как рак.Фармацевтически и терапевтически активные соединения и их производные, как правило, составляют и вводят в виде единичных дозированных форм или нескольких лекарственных форм. Каждая единичная доза содержит заданное количество терапевтически активного соединения, достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта, в связи с требуемым фармацевтическим носителем, транспортным средством или разбавителем.Единичные лекарственные формы включают, но не ограничиваются ими, таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, парентеральные суспензии и пероральные растворы или суспензии, и эмульсии масло-в-воде, содержащие подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых производных.

Формы единичной дозы могут содержаться во флаконах, ампулах и шприцах или отдельно упакованных таблетках или капсулах. Формы единичной дозы можно вводить фракциями или кратными им. Многократная форма представляет собой множество идентичных единичных дозированных форм, упакованных в один контейнер для введения в дозированную форму единичной дозы. Примеры множества дозированных форм включают флаконы, бутылки или капсулы, или бутылки, или галлоны. Таким образом, многократная форма представляет собой множество единичных доз, которые не разделены в упаковке. Как правило, лекарственные формы или композиции, содержат активный ингредиент в диапазоне 0. 005 % до 100%. Фармацевтические композиции могут быть составлены в лекарственных формах, подходящих для каждого пути введения.

Однодозовые парентеральные препараты упаковывают в ампулу, флакон или шприц с иглой. Объем жидкого раствора или восстановленного порошка, содержащего фармацевтически активное соединение, является функцией подлежащего обработке заболевания и конкретного изделия, выбранного для упаковки. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными, как известно и осуществлено на практике в данной области техники.

Как указано, композиции, предложенные в настоящем документе, могут быть составлены для любого способа, известного специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, подкожное, внутримышечное, внутривенное, интрадермальное, внутрибрюшинное введение, эпидуральное, вагинальное,

ректальное, местное, хаотическое, трансдермальное введение или любой путь введения. Составы, подходящие для таких маршрутов, известны специалисту в данной области техники.Композиции также могут вводиться с другими биологически активными агентами либо последовательно, периодически или в одном и том же составе.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью составов с контролируемым высвобождением и/или устройств доставки (см. например, патенты США № 3536809;3, 598,123; 3,630200; 3845,770; 3847770; 3916899; 4008719; 4687660; 4769027; 5059595; 507343; 5120548; 535456; 5591767; 5639476;и 57336566). Известны различные системы доставки и могут быть использованы для введения выбранных композиций, предполагаемых для использования в данном документе, и такие частицы могут быть легко изготовлены.

6. Упаковка и изделия

Также предложены изделия для изготовления, содержащие упаковочные материалы, любая фармацевтическая композиция, предусмотренная в данном документе, и этикетка, которая указывает на то, что композиции должны быть использованы для лечения заболеваний или состояний, как описано в настоящем документе. Например, метка может указывать на то, что лечение подвергается опухоль или рак.

Комбинации иммуностимулирующих бактерий, описанных в настоящем документе, и другой терапевтический агент также могут быть упакованы в изделие. В одном примере изделие для изготовления содержит фармацевтическую композицию, содержащую иммуностимулирующую бактериальную композицию без дополнительного агента или обработки. В других примерах изделие для изготовления содержит еще один дополнительный терапевтический агент, такой как другой противораковый агент.В этом примере агенты могут быть обеспечены вместе или отдельно, для упаковки в качестве изделий изготовления.

Изделия, предложенные в настоящем документе, содержат упаковочные материалы. Упаковочные материалы для использования в упаковочных фармацевтических продуктах хорошо известны специалистам в данной области. См. например, патенты США № 5,323,907, 5,052,558 и 5,033,252, каждая из которых полностью включена в

настоящий документ.Примеры фармацевтических упаковочных материалов включают, но не ограничиваются ими, блистерные упаковки, бутылки, трубки, ингаляторы, насосы, мешки, флаконы, контейнеры, шприцы, и любой упаковочный материал, пригодный для выбранного состава и предполагаемого режима введения и обработки.

Примерные изделия изготовления представляют собой контейнеры, включающие в себя одну камеру и двухкамерные контейнеры. Контейнеры включают, но не ограничиваются ими, трубки, бутылки и шприцы.Контейнеры могут дополнительно включать иглу для внутривенного введения.

Выбор упаковки зависит от агентов, и будут ли такие композиции будут упакованы вместе или отдельно. В целом, упаковка является нереакционноспособной с содержащимися в ней композициями. В других примерах некоторые из компонентов могут быть упакованы в виде смеси. В других примерах все компоненты упакованы отдельно. Таким образом, например, компоненты могут быть упакованы в виде отдельных композиций, которые при смешивании непосредственно перед введением могут быть непосредственно введены вместе. Альтернативно, компоненты могут быть упакованы в виде отдельных композиций для введения по отдельности.

Выбранные композиции, включающие в себя изделия для их изготовления, также могут быть обеспечены в качестве наборов. Наборы могут включать фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и изделие для введения, предусмотренное в качестве изделия для изготовления. Композиции могут содержаться в изделии для введения или могут быть обеспечены отдельно для добавления позже. Набор может, необязательно, включать в себя инструкции для применения, включающие дозы, режимы дозирования и инструкции для режимов введения.Наборы также могут включать фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и изделие для диагностики.

I. СПОСОБЫ ОБРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ

Способы, предложенные в настоящем документе, включают способы введения или использования иммуностимулирующих бактерий, для лечения субъектов, имеющих заболевание или состояние такое как опухоль или рак, симптомы которого могут быть

облегчены или уменьшены посредством введения таких бактерий. В конкретных примерах заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак.

Также предложены способы комбинированной терапии с одним или более дополнительными агентами для лечения, такими как противораковый агент или антигиалуронановый агент. Бактерии могут быть введены любым подходящим способом, включая, но не ограничиваясь ими, парентеральное, системное, местное и местное, такое как внутриопухолевое, внутривенное, ректальное, пероральное, внутримышечное, слизистое и другие пути. Предложены составы, подходящие для каждого.Специалист в данной области техники может установить подходящие режимы и дозы и выбирать пути.

1. Опухоли

Иммуностимулирующие бактерии, комбинации, применения и способы, предложенные в настоящем документе, применимы для лечения всех типов опухолей, в том числе рака, в частности солидных опухолей, включая рак легкого, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак головы и шеи, рак яичников, рак печени, рак поджелудочной железы, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак и рак предстательной железы. Способы также могут быть использованы для гематологических злокачественных опухолей.

Опухоли и рак, подлежащие лечению применением и способами, представленными в настоящем документе, 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, соединительные тканевые системы, включая суставы, жировые ткани и кровеносную систему, включая стенки кровеносного сосуда.Примеры опухолей, которые могут быть обработаны иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе, включают карциномы, глиомы, саркомы (включая липосаркому), аденокарциному, аденому и аденомы. Такие опухоли могут происходить практически во всех частях тела, в том числе, например, молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, яичника, предстательной железы, головного мозга,

поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки или печени.

Опухоли скелетной системы включают, например, саркомы и бластомы, такие как остеосаркома, хондросаркома и хондробластома. Опухоли и опухоли сердца включают опухоли как скелетных, так и гладких мышц, например лейомиомы (доброкачественные опухоли гладкой мускулатуры), лейомиоосармы, рабдомиомы (доброкачественные опухоли скелетной мышцы), рабдомиосаркомы и кардиальные саркомы. Опухоли желудочно-кишечного тракта включают, например,, опухоли устья, пищевода, желудка, тонкой кишки, ободочные и колоректальные опухоли, а также опухоли желудочно-кишечных секреторных органов, таких как слюнных желез, печени, поджелудочной железы, желчевыводящих путей. Опухоли центральной нервной системы включают опухоли головного мозга, сетчатки и спинного мозга, а также могут быть в ассоциированной соединительной ткани, кости, кровеносных сосудах или нервной ткани.

Также рассмотрены лечение опухолей периферической нервной системы.Опухоли периферической нервной системы включают злокачественные опухоли периферических нервов. Опухоли почечной системы включают опухоли почек, например почечно-клеточный рак, а также опухоли мочеточников и мочевого пузыря. Опухоли репродуктивной системы включают опухоли шейки матки, матки, яичника, предстательной железы, семенников и родственных секреторных желез. Опухоли иммунной системы включают как опухоли на основе крови, так и солидные опухоли, включая лимфомы, например, как ходжкинские, так и неходжкинские. Опухоли дыхательной системы включают опухоли носовых ходов, бронхов и легких. Опухоли молочной железы включают, например, как дольковый, так и протоковый рак.

Другие примеры опухолей, которые могут быть обработаны иммуностимулирующими бактериями, и способы, предложенные в настоящем документе, включают саркому Капоши, новообразования ЦНС, нейробластомы, капиллярные гемангиобластомы, менингиомы и церебральные метастазы, меланомы, желудочно-кишечные и почечные карциномы и саркомы, рабдомиосаркому, глиобластому илейомиоосаркому. Примеры других видов рака, которые могут быть обработаны, как представлено в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, лимфому, бластому, нейроэндокринные опухоли, мезотелиому, менингиому, меланому и лейкоз или лимфоидные злокачественные опухоли.

Примеры таких видов рака включают гематологические злокачественные опухоли, такие как лимфома Ходжкина; неходжкинские лимфомы (лимфома Burkitt, малая лимфома/хронический лимфоцитарный лейкоз, грибовидный микоз, лимфома мантии, фолликулярная лимфома, диффузная крупная В-клеточная лимфома, лимфомы маргинальной зоны, волосистой клеточной лейкемии и лимфоплазмоцитолитического лейкоза), опухоли клеток-предшественников лимфоцитов, в том числе В-клеточного острого лимфобластного лейкоза/лимфомы, и Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза/лимфомы, тимомы, опухоли зрелых Т- и NK-клеток, включая периферические Т-клеточные лейкемию, Т-клеточный лейкоз/Т-клеточные лимфомы и крупный гранулированный лимфоцитарный лейкоз, лейкоз Лангерганса, включая AML с созреванием, AML без дифференцировки, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз, и острые моноцитарные лейкемии, миелодиспластические синдромы и хронические миелопролиферативные нарушения, включая хронический миелогенный лейкоз; опухоли центральной нервной системы, такие как глиома, глиобластома, нейробластома, астроцитома, медуллобластома, эпидиммома и ретинобластома; солидные опухоли головы и шеи (рак носоглотки, рак слюнной железы и рак пищевода), легкого (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого и плоскоклеточный рак легкого), пищеварительной системы (например, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак желчного протока или желчного тракта, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак и рак анальной карциномы), репродуктивной системы (например. , яичка, полового члена, или рак предстательной железы, матки, влагалища, вульвы, цервикального, яичника и эндометриального рака), кожи (например, меланома, базальная клеточная карцинома, плоскоклеточный рак, меланома кожи), печени (например, рак печени, карциномы печени, гепатоцеллюлярный рак, и гепатомы), кости (например, остеокластомы, и остеолитические виды рака) дополнительных тканей и органов (например, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак почки, рак щитовидной железы, рак молочной железы, рак брюшины и саркома Капоши), опухоли сосудистой системы (например, ангиоосаркома и гемангиоперицима), опухоли Вильмса, ретинобластомы, остеосаркомы и саркомаЭвинга.

2. Введение

При практическом применении и способах в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, могут вводиться субъекту, включая субъект, имеющий опухоль или имеющий неопластические клетки, или субъект, подлежащий иммунизации. Один или несколько этапов могут быть выполнены до, одновременно с, или после введения иммуностимулирующих бактерий субъекту, включая, но не ограничиваясь этим, диагностику субъекта с условием, подходящим для введения иммуностимулирующих бактерий, определение иммунокомпетентности субъекта, иммунизацию субъекта, лечение субъекта химиотерапевтическим агентом, обработку субъекта излучением или хирургическую обработку субъекта.

Для вариантов осуществления, которые включают введение иммуностимулирующих бактерий в опухоленесущий субъект для терапевтических целей, субъект, как правило, ранее был диагностирован с неопластическим состоянием. Диагностические способы также могут включать определение типа неопластического состояния, определение стадии неопластических состояний, определение размера одной или более опухолей, у субъекта определяют наличие или отсутствие метастатических или неопластических клеток в лимфатических узлах субъекта или определяют наличие метастазов у субъекта.

Некоторые варианты осуществления терапевтических способов введения иммуностимулирующих бактерий субъекту могут включать стадию определения размера первичной опухоли или стадии неопластического заболевания, и если размер первичной опухоли равен или выше порогового объема, или если стадия заболевания неопластическое заболевание находится на или выше пороговой стадии, вводят иммуностимулирующую бактерию 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 вводится субъекту; такие способы могут включать контроль субъекта до тех пор, пока размер опухоли или стадия неопластического заболевания не достигнет порогового количестваи затем вводят иммуностимулирующую бактерию субъекту. Пороговые размеры могут изменяться в соответствии с несколькими факторами, включая скорость роста опухоли, способность иммуностимулирующих бактерий т инфицировать опухоль и

иммунокомпетентность субъекта. Как правило, пороговый размер будет иметь размер, достаточный для иммуностимулирующих бактерий для накопления и репликации в или вблизи опухоли, не полностью удаляемой иммунной системой хозяина, и, как правило, также является размером, достаточным для поддержания бактериальной инфекции в течение времени, достаточного для того, чтобы хозяин обеспечивал иммунный ответ против опухолевых клеток, как правило, около одной недели или более, около десяти дней или более, или около двух недель или более.

Типовые пороговые стадии представляют собой любую ступень за самой низкой ступенью (например., стадии I или эквивалента), или любую стадию, где первичная опухоль больше, чем пороговый размер, или любой этап, на котором выявляют метастатические клетки.

Может быть использован любой режим введения микроорганизма субъекту, при условии, что режим введения обеспечивает возможность введения иммуностимулирующих бактерий в опухоль или метастазирование. Режимы введения могут включать, но не ограничиваются ими, внутривенное, внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное, местное, многопункционное, ингаляционное, интраназальное, пероральное, внутриполостное (например,введение в мочевой пузырь через катетер, введение в кишечник суппозиториями или клизмом), слуховое, ректальное и окулярное введение.
Специалист в данной области может выбрать любой режим введения, совместимый с субъектом и бактериями, и который также, вероятно, приводит 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 характер заболевания, вид опухоли и конкретные бактерии, содержащиеся в фармацевтической композиции.Введение в целевой участок может быть выполнено, например, через баллистическую доставку, как коллоидную дисперсионную систему, или системное введение можно осуществлять путем инъекции в артерию.

Режим дозирования может быть любым из множества способов и количеств и может быть определен специалистом в данной области техники в соответствии с известными клиническими факторами. Однократная доза может быть терапевтически эффективной для лечения заболевания или расстройства, при котором лечение вызывает иммунную стимуляцию.Примером такой стимуляции является иммунный ответ, который включает, но не ограничивается этим, один или оба из

специфического иммунного ответа и неспецифического иммунного ответа, как специфических, так и неспецифических реакций, врожденного ответа, первичного иммунного ответа, адаптивного иммунитета, вторичного иммунного ответа, иммунного ответа памяти, активации иммунной клетки, пролиферации иммунных клеток, дифференциации иммунных клеток и экспрессии цитокинов.

Как известно в области медицины, дозировки для субъекта могут зависеть от многих факторов, включая виды, размер, площадь поверхности тела, возраст, пол, иммунокомпетентность и общее состояние здоровья, конкретных бактерий, подлежащих введению, продолжительности и пути введения, вида и стадии заболевания, например размера опухоли, и других соединений, таких как лекарственные средства, вводимые одновременно. В дополнение к указанным факторам такие уровни могут влиять на инфективность бактерий и характер бактерий, как может быть определено специалистом в данной области техники.В настоящих способах соответствующие минимальные уровни дозировки бактерий могут быть уровнями, достаточными для выживаемости бактерий, роста и репликации в опухоли или метастазах.

Примерные минимальные уровни для введения бактерий в 65 кг человека могут включать по меньшей мере примерно 5×10^{6} колониеобразующих единиц (КОЕ), по меньшей мере, около 1×10^{7} КОЕ, по меньшей мере, около 5×10^{7} КОЕ, по меньшей мере, около 1×10^{8} КОЕ, или, по меньшей мере, приблизительно 1×10^{9} КОЕ. В настоящих способах соответствующие максимальные уровни дозировки бактерий могут представлять собой уровни, которые не токсичны для хозяина, уровни, которые не вызывают спленомегалии 3х или более, и/или уровни, которые не приводят к образованию колоний или бляшек в нормальных тканях или органах через приблизительно 1 день или через приблизительно 3 дня или через приблизительно 7 дней. Примерные максимальные уровни для введения бактерий в 65 кг человека могут включать не более чем приблизительно 5×10^{11} КОЕ, не более чем около 1×10^{11} КОЕ не более 5×10^{10} КОЕ не более чем около 1×10^{10} КОЕ, или не более чем около 1×10^{9} КОЕ.

Способы и применения, предложенные в настоящем документе, могут включать однократное введение иммуностимулирующих бактерий субъекту или множество введений иммуностимулирующих бактерий субъекту или другим из множества

режимов, включая комбинированные терапии с другими противоопухолевыми лекарственными средствами и/или обработками.

В некоторых вариантах осуществления однократное введение является достаточным для установления иммуностимулирующих бактерий в опухоли, где бактерии могут колонизироваться и могут вызывать или усиливать противоток или ответ у субъекта. В других вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные для использования в способах в данном документе, могут быть введены в различных случаях, разделенных во времени, как правило, по меньшей мере в течение одного дня.

Отдельные введения могут увеличивать вероятность доставки бактерии к опухоли или метастазированию, где предыдущее введение может быть неэффективным при доставке бактерии к опухоли или метастазированию. В вариантах осуществления отдельные введения могут увеличивать места на опухоли или метастазе, где может происходить бактериальная колонизация/пролиферация, или может иным образом увеличиваться титр бактерий, накопленных в опухоли, которые могут увеличивать или усиливать противоопухолевый иммунный ответ хозяина.

При выполнении отдельных введений каждое введение может быть в дозированном количествоме, которое является одинаковым или различным относительно других доз введения. В одном варианте осуществления все дозы введения являются одинаковыми. В других вариантах осуществления первая дозированная величина может представлять собой большую дозированную величину, чем одна 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 дозированные количества.В одном примере способа раздельного введения, в котором первая дозированная величина больше, чем одна или более последующих дозированных количеств, все последующие дозированные количества могут быть одинаковыми, или меньшими относительно первого введения.

Отдельные введения могут включать любое количество 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 способов и другого мониторинга способов, предложенных в настоящем документе. Соответственно, способы, предложенные в настоящем документе, включают способы предоставления субъекту одного или более введений иммуностимулирующих бактерий, где количество введений может быть определено путем мониторинга субъекта, и на основании результатов мониторинга определяют, обеспечивают ли одно или более дополнительных введений.Решение, может ли или нет обеспечить одно или более дополнительных введений, может быть основано на многообразии результатов мониторинга, в том числе, но не в качестве ограничения, индикации роста опухоли или ингибирования роста опухоли, появления новых метастазов или ингибирования метастазирования, титра антибактериального антитела субъекта, титра противоопухолевого антитела субъекта, общего состояния здоровья субъекта и веса субъекта.

Период времени между введениями может быть любым из множества периодов времени. Период времени между введениями может быть функцией любого из множества факторов, включая этапы мониторинга, как описано в отношении количества введений, периода времени для субъекта для установки иммунного ответа, периода времени для субъекта для очистки бактерий от нормальной ткани, или периода времени для бактериальной колонизации/пролиферации в опухоли или метастазирования.В одном примере период времени может быть функцией периода времени для субъекта для установки иммунного ответа; например, период времени может быть больше периода времени для субъекта для установки иммунного ответа, такого как более чем приблизительно одной недели, более чем приблизительно десяти дней, более чем приблизительно двух недель, или более чем приблизительно месяц; в другом примере период времени может быть меньше периода времени для субъекта, чтобы установить иммунный ответ, такой как менее чем приблизительно одной недели, менее чем приблизительно 10 дней, менее чем приблизительно две недели, или менее чем приблизительно месяц. В другом примере период времени может быть функцией периода времени для бактериальной колонизации/пролиферации в опухоли или метастазирования; например, период времени может быть больше, чем количество времени для детектируемого сигнала для возникновения в опухоли или метастазе после введения микроорганизма, экспрессирующего детектируемый маркер, такое как примерно 3 дня, примерно 5

дней, примерно неделю, примерно десять дней, примерно две недели или примерно месяц.

Как описано выше, применение и способы, предложенные в настоящем документе, также могут включать введение одного или более терапевтических соединений, таких как противоопухолевые соединения или другие раковые лекарственные средства, субъекту в дополнение к введению иммуностимулирующих бактерий субъекту. Терапевтические соединения могут действовать независимо, или совместно с иммуностимулирующими бактериями, для противоопухолевых терапевтических эффектов. Терапевтические соединения, которые могут действовать независимо, включают любое из множества известных химиотерапевтических соединений, которые могут ингибировать рост опухоли, ингибировать рост и/или образование метастазов, уменьшить размер опухоли или метастазирования, или устранить опухоль или метастазирование, без снижения способности иммуностимулирующих бактерий накапливаются 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 бусульфан, импросульфан и пипосульфурон; андрогены, такие как каустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитистан, и тестолактон; анти-адреналы, такие как аминоглютемид, митотан, и триклострид; антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид, и гозерелин; антибиотики, такие как ациламицин, актиномицин, антромицин, азасеин, блеомицин, актиномицин, калихеамицин, карцирубицин, карминомицин, карцинеонол, хроминомицин, дактиномицин, даунорубицин, детрубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзобицин, идарубицин, боломицин, митомицины, микофенольная кислота, ногамицин, оливомицин, порфирицин, ромидоцин, стрептозоцирин, стрептозоцин, тубуцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиэстрогены, включающие, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующую ароматазу 4 (5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триксифен, кифоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (фарестон); антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птериоптерин и триметотрексат; азиридины, такие как бензодепсин,

карбоквин, меутудеа и уредеа; этиленимины и метил-меламины, включающие альбезамин, триэтиленэмпамин, триэтиленфосфориламид, триэтиленэтилфосфорамимид и триметилолмеламин; фолиевая кислота; хлорамбуцил, шалоксазин, хлорофос-фамид, эструмустин, ифосфамид, мелодеэтанамин, мектилометаминоксид гидрохлорид, мелфалан, новокаин, фенэстерин, преднизостин, трофоэлемид, урацил горчичный; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фомистин, ломустин, нимустин и ранимустин; цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; белки, такие как аргинин деиминаза и аспарагиназа; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиампипран и тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анацитабин, азацитидин, 6-азаридин, кармепурин, цитарабин, дидезоксиуридин, диоксифлуридин, энцитабин, флоксуридин и 5-FU; таксаны, таких как паклитаксел и доцетаксел и их альболюминированные формы (то есть наб-паклитаксел и наб-доцетаксел), ингибитор топоизомеразыRFS 2000; ингибитор тимилидатсинтазы (такой как Tomudex); и дополнительные химиотерапевтические средства, включающие ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновую кислоту; амасакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефосфамид; демеколцин; диазикон; дифторметилорнитин (ДМФО); элфлорнитин; эллиптиниумацетат; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лондиамин; митогун; митоксантрон; мопиранол; нитродакрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK ®; разоксан; триазахинон; 2,2', 2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин;манномустин; митобронитол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ara-C); циклофосфамид; тиотепа; хлорамбуцил; гемицитабин; 6-тиогуанин;меркаптопурин; метотрексат; этопозид (ВП-16); ифосфамид; митомицин С;митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид;дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT -11; ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и ингибиторы топоизомеразы, такие как иринотекан.

Также могут быть использованы фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из них.

Терапевтические соединения, которые действуют совместно с иммуностимулирующими бактериями, включают, например, соединения, повышающие иммунный ответ, проявляющий свойства бактерий. Например, ген, изменяющий экспрессию гена, может индуцировать или увеличивать транскрипцию

гена в бактерии, такой как экзогенный ген, такой как белок STING. Любое из разнообразных соединений, которые могут изменять экспрессию генов, известных в данной области техники, включая IPTG и RU486.Иллюстративные гены, экспрессию которых можно регулировать, включают в себя белки и молекулы РНК, включая токсины, ферменты, которые могут превращать пролекарство в противоопухолевое лекарственное средство, цитокины, регулирующие транскрипцию белки, shРНК, miРНК и рибозимы.

В других вариантах осуществления изобретения терапевтические соединения, которые могут действовать совместно с иммуностимулирующими бактериями для увеличения колонизации/пролиферации или иммунного ответа, проявляющие свойства бактерий, представляют собой соединения, которые могут взаимодействовать с экспрессируемым бактериями генным продуктом, и такое взаимодействие может привести к увеличению гибели опухолевых клеток или к увеличению противоопухолевого иммунного ответа у субъекта.Терапевтическое соединение, которое может взаимодействовать с экспрессируемым бактериями генным продуктом, может включать, например, пролекарство или другое соединение, которое обладает небольшой или отсутствием токсичности или другой биологической активностью в его вводимой форме, но после взаимодействия с экспрессируемым бактериями генным продуктом соединение может проявлять свойство, которое приводит к гибели опухолевых клеток, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксичность, способность индуцировать апоптоз, или способность вызывать иммунный ответ. В данной области техники известны разнообразные подобные вещества, включающие ганцикловир, 5-фторурацил, 6-метилпурин дезоксирибозид, цефалоспорин-доксорубицин, 4-[(2-хлорэтил) (2-метоксиэтил) амино] бензоил-l-глутаминовую кислоту, ацетаминофен, индол-3-уксусную кислоту, CB1954, 7-этил-10-[4-(1-пиперидино)-1-пиперидино] карбонилоксикамптотецин, бис-(2-хлорэтил) амино-4-гидроксифениламинометанон 28, 1-хлорметил-5-гидрокси-1, 2-дигидро -3 Н-бенз [e] индол, эпирубицин-глюкуронид, 5'- дезокси5-фторуридин, цитозинарабинозид и лимарин.

3. Мониторинг

Способы, предложенные в настоящем документе, могут дополнительно включать в себя один или более этапов мониторинга субъекта, мониторинга опухоли и/или мониторинга иммуностимулирующих бактерий, вводимых субъекту. В способах, представленных в настоящем документе, могут быть включены любые из множества

этапов мониторинга, включая, но не ограничиваясь этим, мониторинг размера опухоли, мониторинг присутствия и/или размера метастазов, мониторинг лимфатических узлов субъекта, мониторинг веса субъекта или других показателей здоровья, включая маркеры крови или мочи, контроль титра антибактериального антитела, контроль бактериальной экспрессии обнаруживаемого продукта гена и непосредственный контроль титра бактерий в опухоли, ткани или органе субъекта.

Целью мониторинга может быть просто оценка состояния здоровья субъекта или хода терапевтического лечения субъекта или может быть использована для определения того, гарантировано или нет дополнительное введение одной и той же или другой иммуностимулирующей бактерии, или для определения того, требуется или нет введение соединения субъекту, где соединение может действовать для повышения эффективности терапевтического способа или соединение может действовать для снижения патогенности вводимых субъекту бактерий.

В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, могут включать мониторинг одного или более бактериально экспрессируемых генов. Бактерии, такие как те, которые представлены в настоящем документе или иным образом известные в данной области техники, могут экспрессировать один или более обнаруживаемых генных продуктов, включая, но не ограничиваясь этим, детектируемые белки.

Как представлено в настоящем документе, измерение детектируемого генного продукта, экспрессируемого в бактериях, может обеспечить точное определение уровня бактерий, присутствующих у субъекта. Как дополнительно описано в настоящем документе, измерение местоположения детектируемого генного продукта, например, методами визуализации, включая томографические способы, может определить локализацию бактерий у субъекта.Соответственно, способы, предложенные в настоящем документе, включают мониторинг детектируемого бактериального генного продукта, который может быть использован для определения присутствия или отсутствия бактерий в одном или более органах или тканях субъекта, и/или присутствие или отсутствие бактерий в опухоли или метастазах субъекта.Кроме того, способы, предложенные в настоящем документе, включают контроль детектируемого бактериального генного продукта, который может быть использован для определения титра бактерий, присутствующих в одном или более органах, тканях, опухолях или метастазах.

Способы, включающие мониторинг локализации и/или титра бактерий у субъекта, могут быть использованы для определения патогенности бактерий, поскольку бактериальная инфекция, и, в частности, уровень инфекции, нормальных тканей и органов может указывать патогенность бактерий.Способы, включающие мониторинг локализации и/или титра иммуностимулирующих бактерий у субъекта, могут быть выполнены в нескольких временных точках и, соответственно, могут определять скорость репликации бактерий у субъекта, включая скорость репликации бактерий в одном или более органах или тканях субъекта.

Соответственно, способы, включающие мониторинг бактериального генного продукта, могут быть использованы для определения компетентности репликации бактерий. Способы, предложенные в настоящем документе, также могут быть использованы для количественного определения иммуностимулирующих бактерий, присутствующих во множестве органов или тканей, и опухолей или метастазов, и может, таким образом, указывать степень преимущественного накопления бактерий у субъекта. При этом контроль продукции бактериального гена может быть использован в способах определения способности бактерий накапливаться в опухоли или метастазах в предпочтении к нормальным тканям или органам, поскольку иммуностимулирующие бактерии, используемые в способах, представленных в настоящем документе, могут накапливаться во всей опухоли или могут накапливаться на множестве участков в опухоли и также могут накапливаться в метастазах.

Способ мониторинга бактериального генного продукта может быть использован для определения размера опухоли или количества метастазов, присутствующих у субъекта. Контроль такого присутствия бактериального генного продукта в опухоли или метастазировании в течение интервала времени может быть использован для оценки изменений в опухоли или метастазах, включая рост или усадку опухоли, или развитие новых метастазов или исчезновения метастазов, а также может быть использован для определения скорости роста или усадки опухоли, или развития новых метастазов или исчезновения метастазов, или изменения скорости роста или усадки опухоли, или развития новых метастазов или исчезновения метастазов.

Соответственно, контроль бактериального генного продукта может быть использован для мониторинга неопластического заболевания у субъекта или для определения эффективности лечения неопластического заболевания, путем определения скорости роста или усадки опухоли, или развития новых метастазов или исчезновения

метастазов, или изменения скорости роста или усадки опухоли, или развития новых метастазов или исчезновения метастазов.

Соответственно, контроль бактериального генного продукта может быть использован для мониторинга неопластического заболевания у субъекта или для определения эффективности лечения неопластического заболевания, путем определения скорости роста или усадки опухоли, или развития новых метастазов или исчезновения метастазов, или изменения скорости роста или усадки опухоли, или развития новых метастазов или исчезновения метастазов.

Любой из множества детектируемых белков может быть обнаружен путем мониторинга, примеры которого представляют собой любой из множества флуоресцентных белков (например. зеленые флуоресцентные белки), любой из множества люцифераз, трансферрин или другие связывающие железо белки; или рецепторы, связывающие белки и антитела, где соединение, которое специфически связывает рецептор, связывающий белок или антитело, может быть детектируемым агентом или может быть меченым детектируемым веществом (например, радионуклидом или визуализирующим агентом).

Размер опухоли и/или метастазирования можно контролировать любым из множества способов, известных в данной области техники, включая методы внешней оценки или способы томографической или магнитной визуализации. В дополнение к способам, известным в данной области техники, способы, предложенные в настоящем документе, например, контроль экспрессии генов бактерий, могут быть использованы для мониторинга размера опухоли и/или метастазирования.

Размер мониторинга за несколько моментов времени может предоставлять информацию относительно увеличения или уменьшения размера опухоли или метастазирования, а также может предоставлять информацию относительно присутствия дополнительных опухолей и/или метастазов у субъекта. Мониторинг размера опухоли в течение нескольких временных точек может предоставить информацию о развитии неопластического заболевания у субъекта, включая эффективность лечения неопластического заболевания у субъекта.

Способы, предложенные в настоящем документе, также могут включать контроль титра антител у субъекта, включая антитела, полученные в ответ на введение иммуностимулирующих бактерий субъекту. Бактерии, вводимые в способах,

представленных в настоящем документе, могут вызывать иммунный ответ на эндогенные бактериальные антигены. Бактерии, вводимые в способах, представленных в настоящем документе, также могут вызывать иммунный ответ на экзогенные гены, экспрессируемые бактериями. Бактерии, вводимые в способах, представленных в настоящем документе, также могут вызывать иммунный ответ на опухолевые антигены.Контроль титра антител против бактериальных антигенов, бактериально экспрессируемых экзогенных генных продуктов или опухолевых антигенов может быть использован для контроля токсичности бактерий, эффективности способов лечения или уровня генного продукта или антител. Контроль титра антител может быть использован для контроля токсичности бактерий. Титр антител против бактерий может изменяться в течение периода времени после введения бактерий субъекту, где в некоторых конкретных временных точках титр антител с низким анти-(бактериальным антигеном) может указывать на более высокую токсичность, тогда как в другие моменты времени высокий титр антител против бактериального антигена может указывать на более высокую токсичность. Бактерии, используемые в способах, представленных в настоящем документе, могут быть иммуногенными и, следовательно, могут вызывать иммунный ответ вскоре после введения бактерий субъекту. В общем, иммуностимулирующие бактерии, против которых иммунная система субъекта могут установить сильный иммунный ответ, могут представлять собой бактерии, которые имеют низкую токсичность, когда иммунная система субъекта может удалять 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 изобретения мониторинг титра антител может быть использован для мониторинга эффективности способов лечения. В способах, представленных в настоящем документе, титр антител, такой как анти-(опухолевый антиген) титр антител, может указывать на эффективность терапевтического способа, такого как терапевтический способ лечения неопластического заболевания. Терапевтические способы, предложенные в настоящем документе, могут включать в себя инициирование или усиление иммунного ответа против опухоли и/или метастазирования.Таким образом, путем мониторинга титра антител против опухолевого антигена можно контролировать эффективность терапевтического

способа, вызывая или усиливая иммунный ответ против опухоли и/или метастазирования.

В других вариантах осуществления изобретения мониторинг титра антител может быть использован для мониторинга уровня генного продукта или антител для получения и/или сбора продукта. В настоящем документе способы могут быть использованы для получения белков, молекул РНК, таких как shРНК или других соединений, путем экспрессии экзогенного гена в микроорганизме, который накапливается в опухоли.Контроль титра антител против белка, молекулы РНК или другого соединения может указывать уровень продукции белка, молекулы РНК или другого соединения опухолеаккумулированным микроорганизмом, а также может непосредственно указывать уровень антител, специфичных для такого белка, молекулы РНК или другого соединения.

Способы, предложенные в настоящем документе, также могут включать способы мониторинга состояния здоровья субъекта. Некоторые из способов, представленных в настоящем документе, представляют собой терапевтические способы, в том числе терапевтические способы неопластических заболеваний. Мониторинг здоровья субъекта может быть использован для определения эффективности терапевтического способа, как известно в данной области техники. Способы, предложенные в настоящем документе, также могут включать стадию введения субъекту иммуностимулирующей бактерии, как описано в настоящем документе. Контроль состояния здоровья субъекта может быть использован для определения патогенности иммуностимулирующей бактерии, вводимой субъекту. Любой из множества способов диагностики состояния здоровья для мониторинга заболевания, такого как неопластическое заболевание, инфекционное заболевание или заболевание, связанное с иммунной системой, может контролироваться, как известно в данной области техники. Например, вес, кровяное давление, импульс, дыхание, цвет, температура или другое наблюдаемое состояние субъекта могут указывать на здоровье субъекта.Кроме того, присутствие 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 могут быть определены путем выполнения, например, исследования крови или проведение диагностического теста на панели мочи. Примеры компонентов, характеризующих здоровье субъекта,

включают, но не ограничиваются ими, количество лейкоцитов, гематокрита и с-реактивного белка.

Способы, предложенные в настоящем документе, могут включать в себя мониторинг терапии, где терапевтические решения могут быть основаны на результатах мониторинга. Терапевтические способы, предложенные в настоящем документе, могут включать введение субъекту иммуностимулирующих бактерий, где бактерии могут предпочтительно накапливаться в опухоли и/или метастазах, и где бактерии могут вызывать или усиливать противоопухолевый иммунный ответ.Такие терапевтические способы могут включать множество стадий, включая многократное введение 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 более результатах мониторинга субъекта.Например, титр антител у субъекта может быть использован для определения, является ли желательным вводить иммуностимулирующую бактерию и, (необязательно), соединение, количество бактерий и/или соединения для введения, и тип бактерий и/или соединения для введения, где, например, низкий титр антител может указывать желательность введения дополнительной иммуностимулирующей бактерии, другой иммуностимулирующей бактериии/или терапевтическое соединение, такое как соединение, которое индуцирует экспрессию бактериального гена или терапевтическое соединение, которое является эффективным независимым от иммуностимулирующей бактерии.

В другом примере общее состояние здоровья субъекта может быть использовано для определения, является ли желательным вводить иммуностимулирующую бактерию и, (необязательно), соединение, количество бактерий или соединения для введения, и тип бактерии и/или соединения для введения, где, например, определение того, что субъект является здоровым, может указывать желательность введения дополнительных бактерий, различных бактерий или терапевтическое соединение, такое как соединение, которое индуцирует экспрессию бактериального гена. В другом примере контроль детектируемого бактериально экспрессируемого генного продукта может быть использован для определения, является ли желательным вводить иммуностимулирующую бактерию и, (необязательно), соединение, количество

бактерий и/или соединения для введения, и тип бактерии и/или соединение для введения, где, например, определение того, что субъект является здоровым, может указывать желательность введения дополнительных бактерий, различных бактерий или терапевтического соединения, такого как соединение, которое индуцирует экспрессию бактериального гена.

Такие способы мониторинга могут быть использованы для определения, является ли терапевтический способ эффективным, независимо от того, является ли терапевтический способ патогенным для субъекта, независимо от того, накапливаются ли бактерии в опухоли или метастазе, и независимо от того, накапливаются или нет бактерии в нормальных тканях или органах. На основе таких определений может быть получена желательность и форма дополнительных терапевтических способов.

J. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены только для иллюстрации и не ограничивают сферу изобретения.

Примеры сконструированных штаммов иммуностимулирующих бактерий и номенклатура:

Штамм	Плазмида	Основа	Цели РНК	Альтернативное
AST-100	None	YS1646	нет	VNP20009
AST-101	None	YS1646-ASD	нет	ASD (*asd*нокаут)
AST-102	pEQU6	YS1646	нет	YS1646 (pEQU6 —
AST-103	pEQU6	YS1646	YS1646	(pEQU6-shSCR)
AST-104	pEQU6	YS1646	muTREX1 (shРНК)	YS1646 (pEQU6-
AST-105	pEQU6	YS1646	muPD-L1 (shРНК)	YS1646 (pEQU6-
AST-106	pEQU6	YS1646	muTREX1 (microРНК)	YS1646 (pEQU6-
AST-107	pATI-U6	YS1646-ASD	Скрамблирован	ASD (pATI-shSCR)
AST-108	pATI-U6	YS1646-ASD	muTREX1 (shРНК)	ASD (pATI-shTREX1)

Штамм	Плазмида	Основа	Цели РНК	Альтернативное
AST-109	pATIKAN-U6	YS1646-ASD	Скрамблирован	ASD (pATIKan-shSCR)
AST-110	pATIKAN-U6	YS1646-ASD	muTREX1 (shPHK)	ASD (pATIKan-
AST-111	Нет	YS1646-ASD-	Нет	ASD/FLG(*asd*и
AST-112	pATI-U6	YS1646-ASD-	muTREX1 (shPHK)	ASD/FLG (pATI-
AST-113	pATI-U6	YS1646-ASD-	muTREX1 (shPHK)	ASD/FLG (pATI-U6
AST-114	Нет	YS1646-ASD-	Нет	ASD/LLO(*asd*нокаут /
AST-115	pATI-U6	YS1646-ASD-	muTREX1 (shPHK)	ASD/LLO (pATIKan-
AST-116	pATIKanpBRor	YS1646-ASD	Скрамблирован	ASD (pATIKanLow-
AST-117	pATIKanpBRor ;	YS1646-ASD	muTREX1 (shPHK)	ASD (pATIKanLow-
AST-118	pATIKanpBRor ;	YS1646-ASD-	muTREX1 (shPHK)	ASD/FLG
AST-119	pATIKanpBRor ;	YS1646-ASD-	muTREX1 (shPHK)	ASD/LLO
AST-120	pEQU6	YS1646-ASD-	muTREX1 (microPHK)	ASD/LLO(pEQU6-
AST-121	pEQU6	YS1646	muVISTA	YS1646 (pEQU6-
AST-122	pEQU6	YS1646	muTGF-бета	YS1646 (pEQU6-TGF-
AST-123	pEQU6	YS1645	muбета-Катенин	YS1646 (pEQU6-бета-

Пример 1

Ауксотрофные штаммы*S. typhimurium*

Штамм*Salmonella*YS1646 является ауксотрофным по аденозину

Штаммы, предложенные в настоящем документе, сконструированы таким образом, чтобы быть ауксотрофными для аденозина. В результате они ослаблены invivo,

поскольку они не способны реплицироваться при низких концентрациях аденозина в нормальной ткани, и колонизация происходит главным образом в твердой опухолевой микросреде (TME), где уровни аденозина являются высокими.Штамм Salmonella YS1646 представляет собой производное штамма дикого типа ATCC # 14028 и сконструирован так, чтобы быть ауксотрофными для пуринов за счет нарушения гена purl (синоним purM) (Lowetal (2004) MethodsMol. Med 90: 47-60).

Последующий анализ всего генома YS 1646 продемонстрировал, что ген purl не был фактически удален, но вместо этого разрушался хромосомной инверсией (Broadwayetal. (2014) J Biotechnol. 192: 177-178), Причем весь ген все еще содержится в пределах двух частей хромосомы YS1646, фланкированной встраиваемыми последовательностями, одна из которых имеет активную транспозазу.Наличие полной генетической последовательности гена purl, нарушенной с помощью хромосомнойперестройки, оставляет открытую возможность реверсии до гена дикого типа. Несмотря на то, что ранее было продемонстрировано, что пуриновые ауксотрофы YS 1646 были стабильными после > 140 последовательных прохожденийinvitro, не ясно, какова скорость реверсии (Clairmont*etal.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002).

Здесь показано, что при снабжении аденозином YS 1646 способен реплицироваться в минимальной среде, тогда как родительский штамм дикого типа, ATCC # 14028 может расти в минимальной среде, не дополненной аденозином. YS1646 выращивают в течение ночи в среде лизогенного бульона (LB), промывают минимальной средой M9 и разбавляют в минимальной среде M9, не содержащей аденозина, или повышают концентрации аденозина.Рост измеряли с использованием спектрофотометра SpectraMax ® M3 (MolecularDevices) при 37° C, отсчитывая OD600 каждые 15 минут.

Результаты показали, что в отличие от штамма дикого типа (ATCC # 14028), который был способен расти во всех концентрациях аденозина, штамм YS1646 был способен реплицироваться, когда аденозин был обеспечен в концентрациях в диапазоне от 11 до 300 микромоль, но полностью не способен реплицироваться в M9 по отдельности или M9, дополненной 130 наномолярным аденозином. Эти данные демонстрируют, что мутанты purl способны реплицироваться при концентрациях аденозина, которые находятся в микросреде опухоли, но не в концентрациях, находящихся в нормальных тканях. Сконструированные аденозиновыеауксотрофные штаммы, представленные в

настоящем документе, включают штаммы, в которых все или части purl открытой рамки считывания удалены из хромосомы для предотвращения реверсии к дикому типу. Такие делеции генов могут быть достигнуты любым способом, известным специалисту в данной области, включая систему лямбда-красную, как описано ниже.

Штамм Salmonella YS1646 является ауксотрофным для ATP

В дополнение к пуриновой и аденозиновойауксотрофии определяют, может ли делетированный по purl штамм также удалить ATP. ATP накапливается до высоких уровней в микроокружении опухоли, вследствие утечки из окрашивающих опухолевых клеток. Здесь показано, что при наличии ATP штамм YS1646 способен реплицироваться в минимальных средах, но не способен расти, когда не дополняется ATP.Для демонстрации этого штамма YS1646 выращивают в течение ночи в среде LB, промывают минимальной средой M9 и разбавляют в минимальной среде M9, не содержащей ATP, или увеличивают концентрации ATP (Fisher). Рост измеряли с использованием спектрофотометра SpectraMax ® M3 (MolecularDevices) при 37° C, отсчитывая OD600 каждые 15 минут. Результаты показали, что штамм YS1646 способен реплицироваться, когда ATP обеспечивается в концентрациях 0,012 ммолей или только в M9.

Пример 2

Дефекты во внутриклеточной репликации относят к мутации msbB

Штамм YS1646 содержит мутации в purl, которые ограничивают репликацию сайтами, содержащими высокие концентрации пуринов, аденозина или АТФ, и в msbB, которые изменяют поверхностное покрытие липополисахарида (LPS), чтобы уменьшить опосредованную TLR4 провоспалительную сигнализацию. Было установлено, что в отличие от Salmonella дикого типа штамм YS1646 не способен реплицироваться в макрофагах.Проводили эксперименты для определения того, какая из этих генетических мутаций отвечает за представление этого фенотипа в штамме дикого типа ATCC 14028.

В этом анализе клетки-макрофаги мыши (InvivoGen, SanDiego, Ca.) Были инфицированы штаммами Salmonella дикого типа, содержащими делеции в purl, msbB, или и то, и другое, при множественности заражения (MOI) приблизительно 5 бактерий на клетку в течение 30 минут, затем клетки промывали PBS, и среду, содержащую гентамицин, добавляли для уничтожения внеклеточных бактерий.

Внутриклеточные бактерии не убивают гентамицином, поскольку он не может пересекать клеточную мембрану.В различные моменты времени после инфицирования монослои клеток лизировали осмотическим шоком с водой, и клеточные лизаты разводили и высевали на агар LB для подсчета выживших колониеобразующих единиц (CFU).

Как показано в таблице ниже, штаммы Salmonella дикого типа, содержащие только мутации purl, все еще были способны реплицироваться. Это объясняет, почему есть лишь умеренное улучшение переносимости, наблюдаемое только с делецией purl, при достижении высокой степени специфичности к микроокружению опухоли. Штаммы, содержащие только msbB-мутацию, а также штаммы, содержащие purl-и msbB-мутации, неспособны реплицироваться и быстро очищались от клеток в течение 48 часов.

	CFUs/VVell					
Часы	**ATCC 14028** *Apurl*		**ATCC 14028**		**ATCC 14028** *AmsbB*	
1	104000	108000	68000	68000	88000	40000
2.5	5600	6000	760	960	3200	3200
5	5600	4000	1120	880	800	680
27	11200	5600	4	4	20	4

Пример 3

Инженерия и характеристика штамма Salmonella с нокаутом гена *asd*

Был получен штамм YS1646 Aasd. Он представляет собой аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium, полученный из штамма YS1646 (который можно приобрести у ATCC, Catalog # 202165), который был сконструирован так, чтобы иметь делецию в гене asd. В этом примере штамм Salmonellatyphimurium YS1646 Dasd был сконструирован с использованием модификаций способа Даценко и Ваннера (ProcNatlAcadSci USA 97: 6640-6645(2000)

(2000)), как описано ниже.

Введение хелперной плазмиды Лямбда Красный в штамм YS1646

Штамм YS1646 был получен электрокомпетентным, как описано ранее (SambrookJ (1998) MolecularCloning, aLaboratoryManual, 2-ndedn. ColdSpringHarbor, NY: ColdSpringHarborLaboratory), путем выращивания культуры в LB и концентрированием в 100 раз, а затем трехкратной промывкой ледяным 10%-ным глицерином.

Электрокомпетентный штамм электропорируют лямбда-хелперной плазмидой pKD46 (SEQ ID NO: 218) с использованием кюветы с зазором 0,2 см при следующих настройках: 2,5 кВ, 186 Ом, 50 мФ Трансформанты, несущие pKD46, выращивают в 5 мл среды SOC с ампициллином и 1 мМ L-арабинозой при 30° С и выбирают на агаровых пластинах LB, содержащих ампициллин.Клон YS1646, содержащий лямбда красную хелперную плазмиду pKD46, затем был выполнен электрокомпетентным, как описано выше для штамма YS1646.

Конструирование кассеты с нокаутом гена Asd

asd-ген из генома штамма YS1646 (Broadwayetal. (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 DH5-альфа-компетентные клетки (ThermoFisherScientific). В эту плазмиду клонировали кассету гена канамицина, фланкированную сайтами lox P. Затем кассету с нокаутом гена asdамплифицировали с использованием праймеровasd -1 и asd -2 (таблица 1) и очищали гель.

Делеция гена *asd*

Штамм YS1646, несущий плазмиду pKD46, электропорируют с помощью кассеты для выбивания гена asd. Электропорированные клетки выделяли в среде SOC и высевали на чашки с агаром LB, дополненнымиканамицином (20 пг/мл) и диаминопимелиновой кислотой (DAP, 50 мг/мл) Во время этой стадии, лямбда-красная рекомбиназа индуцирует гомологичную рекомбинацию хромосомного гена asd с кассетой (из-за наличия гомологичных фланкирующих последовательностей

выше и ниже хромосомного гена asd), и происходит нокаунт хромосомной копии гена asd.

Присутствие нарушенного гена asd в отобранных устойчивых к канамицину клонах подтверждается PCR-амплификацией, с праймерами из генома YS1646, фланкирующим участки нарушения (праймерasd -3) и из сайта множественного клонирования (праймерscFv -3) (таблица 1). Колонии также реплицируют на пластины LB с дополнительной DAP для демонстрации ауксотрофности DAP. Все клоны с делецией гена asd не были неспособны расти в отсутствие дополнительного DAP, демонстрируя DAP ауксотрофию.

Table 1. Информация о праймерах

Имя	Последоватерьностьпраймера	SEQ. ID NO
asd-1	ccttcctaacgcaaattccctg	219
asd-2	ccaatgctctgcttaactcctg	220
asd-3	gcctcgccatgtttcagtacg	221
asd-4	ggtctggtgcattccgagtac	222
scFv-3	cataatctgggtccttggtctgc	223
APR-001	AAAAAAGCTTGCAGCTCTGGCCCGTG	226
APR-002	AAAAAAGCTTTTAGAAAAACTCATCGAGCATC	227
APR-003	ACACTAGAAGgACAGTATTTGGTATCTG	228
APR-004	AGCCGTAGTTAGGCCACC	229
flic-1	CGTTATCGGCAATCTGGAGGC	232
flic-2	CCAGCCCTTACAACAGTGGTC	233
flic-3	GTCTGTCAACAACTGGTCTAACGG	234
flic-4	AGACGGTCCTCATCCAGATAAGG	235

Имя	Последовательность праймера	SEQ. ID NO
fljb -1	TTCCAGACGACAAGAGTATCGC	236
fljb -2	CCTTTAGGTTTATCCGAAGCCAGAATC	237
fljb -3	CACCAGGTTTTTCACGCTGC	238
fljb -4	ACACGCATTTACGCCTGTCG	239
pagp-1	Gcgtgacggttctgagtgct	321
pagp-2	Cgtctttgctgccatcttccg	322
pagp-3	Acaataacgacgactccgataagg	323
pagp-4	Ctgctgaatgtgctgattaacctg	324
ansb -1	Accttagaagatagccgcaaagc	372
ansb -2	Cagagacatgacacccacgattatc	373
ansb -3	Gcaaaccgctatccagaacga	374
ansb -4	Agtttaagtatgccgtggtactgc	375
csgd-1	Cacttgctttaagatttgtaatggctag	317
csgd-2	Ggtgtattcgctttcccatttgtc	318
csgd-3	Tgtgctgtccaggttaatgcc	319
csgd-4	Gacgacggttttctcgaagtctc	320

Удаление кассеты с геном канамицина

Селективный маркер kan удаляли с использованием системы сайт-специфической рекомбинации Cre / loxP. Мутант Kan ^{R} гена YS1646Aasd трансформировали pJW168, термочувствительной плазмидой, экспрессирующей рекомбиназуcre (SEQ ID NO: 224). Колонии Amp ^{R} отбирали при 30 ° C; Затем pJW168 удаляли ростом при 42 ° C. Выбранный клон был протестирован на потерю kan путем посева реплик на чашки с агаром LB с канамицином и без него и подтвержден с помощью проверки PCR с использованием праймеров из генома YS1646, фланкирующих сайты разрушения (праймеры asd-3 и asd-4, последовательность праймеров см. в таблице 1).

Подтверждение функционального мутантного штамма с asd-делецией YS1646Aasd (также обозначенного как AST-101)

Мутант Aasd не мог расти на чашках с агаром LB при 37 ° C, но был способен расти на чашках LB, содержащих 50 мг / мл диаминопимелиновой кислоты (DAP). Скорость роста мутанта Aasd оценивали в жидкой среде LB; он не мог расти в

жидком LB, но был способен расти в LB с добавлением 50 мг / мл DAP, как было определено путем измерения оптической плотности при 600 нМ.

Подтверждение последовательности локуса asd в штамме YS1646Aasd после удаления гена asd

Штамм с делецией гена asd был подтвержден секвенированием ДНК с использованием праймеровasd-3 и asd-4. Было выполнено секвенирование области, фланкирующей локус asd, и последовательность подтвердила, что ген asd был удален из хромосомы YS1646.

Дополнение удаления asd экспрессией asd из плазмид

Плазмиду (pATIU6) синтезировали и собрали химическим путем (SEQ ID NO: 225). Плазмида содержала следующие особенности: начало репликации с высокой копией (pUC19), промотор U6 для управления экспрессией, ген устойчивости к ампициллину, фланкированный сайтами рестрикции HindIII для последующего удаления, и ген asd, содержащий 85 пар оснований последовательности перед стартовым кодоном (SEQ ID NO: 246). В этот вектор вводили shРНК, нацеленные на мышиный TREX1, рестрикционным расщеплением с помощью Spel и Xhol, а также лигированием и клонированием в клетки DH5-альфа E. coli. Полученная плазмида была обозначена как pATI-shTREX1.

Электропорация плазмид в штаммы иммуностимулирующих бактерий

Отобранные плазмиды, содержащие кассеты экспрессии, кодирующие иммуностимулирующие белки и функциональный ген asd были электропорированы в штаммы S. typhimurium, лишенные гена asd, с помощью электропоратора BTX600 с использованием кюветы с зазором 0,2 см (BTX, Сан-Диего, Калифорния) при следующих настройках: 2,5 кВ, 186 Ом, 50 mFЭлектропорированные клетки добавляли к 1 мл SOC с добавлением 50 мМ диаминопимелиновой кислоты (DAP), инкубировали в течение 1 часа при 37 ° C, а затем наносили на чашки с агаром, не содержащие DAP, для отбора штаммов, которые получали плазмиды с функциональным asd геном.

После выделения одной колонии банки клеток получали путем инокуляции колбы со стерильным лизогеническим бульоном (LB) с одной изолированной колонией S.

typhimurium и инкубирования при 37 ° C с перемешиванием со скоростью 250 об / мин. После выращивания культуры до стационарной фазы бактерии промывали PBS, содержащим 10% глицерина.

Плазмиду pATI-shTREX1 амплифицировали в E.coli и очищали для трансформации в штамм YS1646Aasd электропорацией и клональной селекцией на планшетах LBamp, чтобы получить штамм YS1646Dasd-shTREX1. Мутанты YS1646Aasd, дополненные плазмидами, производными от pATIU6, были способны расти на агаре LB и жидкой среде в отсутствие DAP.

В следующей итерации ген устойчивости к ампициллину (AmpR) из pATI-shTREX1 был заменен геном устойчивости к канамицину. Это выполняли расщеплением плазмиды pATI-shTREX1 с помощью HindIII с последующей очисткой в геле для удаления гена AmpR. Ген устойчивости к канамицину (KanR) амплифицировали с помощью PCR с использованием праймеров APR-001 и APR-002 (SEQ ID NO: 226 и SEQ ID NO: 227, соответственно) с последующим расщеплением HindIII и лигированием в гель,очищенной, расщепленной плазмиды pATIU6.

В последующих итерациях одноточечная мутация была введена в плазмиду pATIKan в точке начала репликации pUC19 с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза Q5® (NewEnglandBiolabs) и праймеров APR-003 (SEQ ID NO: 228) и APR-004 (SEQ ID NO: 229), чтобы изменить нуклеотид T в положении 148 на C. Эта мутация делает точку начала репликации гомологичной точке начала репликации pBR322, которая является точкой начала репликации с низким числом копий, чтобы уменьшить количество копий плазмиды.

Поддержание плазмиды продемонстрировано invivo с использованием системы комплементацииasd.

В этом примере мышей с опухолью CT26 лечили штаммом YS1646, содержащим плазмиду, экспрессирующую shRNA, нацеленную на TREX1 (YS1646-shTREX1), или штамм YS1646 с делецией asd, содержащий плазмиду с функциональным геном asd и shRNA, нацеленную на TREX1 (YS1646Aasd-shTREXl).

CT26 (опухоль толстой кишки № 26) представляет собой модель опухоли, возникшую в результате воздействия на BALB / c мышей N-нитро-N-метилуретана (NMU), что приводит к высокометастатической карциноме, которая повторяет агрессивную, недифференцированную и устойчивую к контрольным точкам колоректальную карциному человека (Castleetal. (2014) BMC Genomics 15 (1): 190). При подкожной имплантации в бок, в отличие от ортотопической в толстую кишку,

иммунофенотипопухоли является гораздо более иммунодепрессивным и устойчивым к контрольным точкам. Несмотря на то, что опухоль в значительной степени лишена инфильтрации Т-клеток, она богата миелоидными клетками, такими как макрофаги и миелоидные супрессорные клетки (MDSC) (Zhaoetal. (2017) Oncotarget 8 (33): 54775-54787). Поскольку эта модель больше похожа на микросателлитно-стабильный (MSS) колоректальный рак человека, она является идеальной моделью для оценки терапевтического подхода, представленного в настоящем документе.

Для этого эксперимента самкам мышей BALB / c в возрасте 6-8 недель (3 мыши в группе) подкожно (SC) в правый бок инокулировали опухолевые клетки CT26 (приобретенные в ATCC) ($2 \times {}^{10}{}^{5}$ клеток в 100 мл PBS). Мышам, несущим 8-дневные сформировавшиеся опухоли на боках, внутривенно инъецировали три дозы 5×10^{6} КОЕ штамма YS1646Dasd-shTREX1 или родительского штамма YS1646 на 8, 15 и 23 дни. Плазмида кодирует shTREX1 в качестве примерного терапевтического продукта; можно заменить любым другим желаемым терапевтическим продуктом или продуктами.

Вес тела и опухоли измеряли дважды в неделю. Измерения опухолей проводились с помощью электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывали по модифицированной формуле эллипсоида, 1/2 (длина x ширина). Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал> 20% веса тела или становился некротическим, в соответствии с правилами IACUC.

Через 12 дней после последней инъекции сальмонеллы опухоли гомогенизировали, и гомогенаты последовательно разбавляли и высевали на чашки с агаром LB для подсчета общего количества присутствующих колониеобразующих единиц (КОЕ) или на чашки с LB, содержащие канамицин, для подсчета количества колоний, устойчивых к канамицину.

Результаты продемонстрировали, что S. typhimurium YS1646-shTREX1 не обладал селективным давлением для поддержания плазмиды shRNA и продемонстрировал значительную потерю плазмид, поскольку процент колоний, устойчивых к канамицину (KanR), составлял менее 10%. Штамм, который использовал систему комплементации гена asd для поддержания плазмиды, YS1646Aasd-shTREX1, имел почти одинаковое количество КОЕ, устойчивых к канамицину, и чувствительных к канамицину. Эти данные демонстрируют, что ген asd системы комплементации достаточен для поддержания плазмиды в контексте микроокружения опухоли у мышей.

Повышение противоопухолевой эффективности с использованием системы комплементациииasd

Система комплементациииasd предназначена для предотвращения потери плазмид и усиления противоопухолевой эффективности доставки терапевтического продукта S.typhimuriuminvivo. Чтобы проверить это, штаммы YS1646 Aasd, содержащие плазмиду shTREX1 (YS1646Aasd-shTREXl) или скремблированный контроль (YS16460asd-shSCR), которые содержат функциональную кассету гена asd, сравнивали на противоопухолевую эффективность на модели рака толстой кишки мышей с штаммом YS1646, содержащим pEQU646 -shTREXl (YS1646-shTREX1), плазмида, в которой отсутствует кассета гена asd и, следовательно, отсутствует механизм поддержания плазмиды. shTREXl является образцовым терапевтическим продуктом.

Для этого эксперимента самкам мышей BALB / c в возрасте 6-8 недель (8 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки CT26 ($2 \times {}^{10}{}^{5}$ клеток в 100 мкл PBS). Мышам с установленными опухолями на боках дважды, на 8 и 18 день, вводили внутривенно 5×10^{6} КОЕ YS1646Aasd-shTREX1 или YS1646-shTREX1 и сравнивали с контролем PBS.

Штамм YS1646-shTREX1 продемонстрировал улучшенный контроль опухоли по сравнению с PBS (70% ингибирование роста опухоли (TGI), день 28), несмотря на продемонстрированную потерю плазмид с течением времени. Штамм Aasd, содержащий плазмиду с системойкомплементациигена asdi shTREX1 (YS1646Aasd-shTREX1) продемонстрировал лучшее ингибирование роста опухоли по сравнению с PBS (82% TGI, p = 0,002, день 25).

Эти данные демонстрируют, что улучшенная эффективность достигается за счет предотвращения потери плазмид с использованием системы комплементациииasd и доставки shTREX1 по сравнению с плазмидами, содержащими YS1646, без системы комплементации гена asd. Таким образом, штаммы с системами комплементациииasd являются лучшими противораковыми терапевтическими средствами.

Пример 4

Модифицированные штаммы S. typhimurium с плазмидами, содержащими элементы CpG, демонстрируют повышенную противоопухолевую активность по сравнению с исходным YS1646

Рецепторы TLR являются ключевыми рецепторами для определения молекулярных паттернов, связанных с патогенами (PAMP), и активации врожденного иммунитета против патогенов (Akiraetal. (2001) Nat. Immunol. 2 (8): 675-680). Из них TLR9 отвечает за распознавание гипометилированных звеньев CpG в патогенной ДНК, которые не встречаются в природе в ДНК млекопитающих (McKelveyetal. (2011) J. Autoimmunity 36:76). Распознавание звеньев CpG при фагоцитозе патогенов в эндосомы в субпопуляциях иммунных клеток индуцирует IFR7-зависимую передачу сигналов интерферона I типа и активирует врожденный и адаптивный иммунитет. В данном документе показано, что штамм S. typhimurium YS 1646, несущий модифицированные плазмиды Salmonellatyphimurium, содержащие звенья CpG (YS 1646 pEQU6 Scramble), аналогичным образом активирует TLR9 и индуцирует опосредованный IFN I врожденный и адаптивный иммунитет, по сравнению с YS 1646 без плазмиды.

Звенья CpG в использованных здесь сконструированных плазмидах показаны в таблице 2.

Плазмида pEQU6 shSCR (не родственная shRNA) в штамме AST-103 содержит 362 звена CpG, что указывает на то, что доставка плазмиды на основе сальмонелл может быть иммуностимулирующей и обладают противоопухолевым действием по сравнению с той же сальмонеллой, не трансформируемой этой плазмидой.

Для оценки способности CpG-содержащих плазмид в YS1646 индуцировать ингибирование роста опухоли на модели карциномы толстой кишки у мышей самкам BALB / c в возрасте 6-8 недель (9 мышей на группу) подкожно инокулировали клетки CT26 на правом фланге. (2 x 10^5 клеток в 100 мл PBS). Мышам, несущим сформировавшиеся опухоли на боках, еженедельно внутривенно вводили три дозы 5×10^6 КОЕ YS1646 (AST-100) или YS1646, содержащего скремблированную плазмиду shRNA со звеньями CpG (AST-103), и сравнивали с контролем PBS.

Table 2. Звенья CpGв сконструированных плазмидах

Имя	Числозвеньев CpG	SEQ ID NO.
pBR322 начало	80	243
pEQU6 (shSCR)	362	244
Asdген ORF	234	242
pATI-2.0	538	245

Штамм YS1646 (AST-100) продемонстрировал умеренный контроль опухоли (32% TGI, p = ns, день 28) по сравнению с PBS. Штамм AST-103, который отличается от YS1646 только добавлением CpG-содержащей плазмиды, кодирующей неродственную скремблированную shРНК, продемонстрировал очень значительное ингибирование роста опухоли по сравнению с одним YS1646, нетрансформированным и, следовательно, лишенным плазмиды (p = 0,004, день 32).

Ген asd содержит 234 звена CpG (см. Таблицу 2), что указывает на то, что содержащая его плазмида может обладать иммуностимулирующими свойствами. AST-109 (YS1646-ASD со скремблированной shRNA) имел 51% ингибирования роста опухоли по сравнению с одним PBS, что свидетельствует о сильном иммуностимулирующем эффекте.

Эти данные демонстрируют сильные иммуностимулирующие свойства плазмидной ДНК, содержащей TLR9-активирующие звенья CpG, в аттенуированном штамме S. typhimurium, направленном на опухоль.

Пример 5

Синтез вектора

Комплементация делеции asd экспрессией asd из плазмид

Плазмиду (pATIU6) синтезировали и собрали химическим путем (SEQ ID: 225). Плазмида содержит следующие особенности: начало репликации с высоким числом копий (pUC19), промотор U6 для управления экспрессией короткой шпильки, ген устойчивости к ампициллину, фланкированный сайтами рестрикции HindIII для последующего удаления, и ген asd, содержащий 85 пар оснований, перед стартовым кодоном (SEQ ID NO: 246).

В этот вектор вводили shРНК, нацеленные на мышиный TREX1, или скремблированную, не родственную последовательность shРНК путем рестрикционногорасщепления с помощью Spel и Xhol, а также лигирования и клонирования в E.coli DH5-альфа. Полученные плазмиды, обозначенные pATI-shTREX1 и pATI-shSCR, соответственно, были амплифицированы в E. coli и очищены для трансформации в штамм AST-101, нокаутированный по asd, путем электропорации и клональной селекции на планшетах LB amp для получения штаммов AST-108, и ACT-107 соответственно.

В следующей итерации ген устойчивости к ампициллину (AmpR) из pATI-shTREX1 был заменен геном устойчивости к канамицину. Это было достигнуто путем расщепления плазмиды pATI-shTREX1 с помощью HindIII с последующей очисткой в геле для удаления гена AmpR, PCR-амплификации гена устойчивости к канамицину (KanR) с использованием праймеров APR-001 и APR-002 (SEQ ID NO: 226 и SEQ ID NO: 227, соответственно), расщепления HindIII и лигирования в очищенной в геле расщепленной плазмиды pATIU6.

В последующих итерациях одноточечная мутация была введена в плазмиду pATIKan в точке начала репликации pUC19 с использованием Q5® Site-DirectedMutagenesisKit (NewEnglandBiolabs) и праймеров APR-003 (SEQ ID NO: 228) и APR-004 (SEQ ID NO: 229) для изменения нуклеотида T в положении 148 на C. Эта мутация делает начало репликации гомологичным началу репликации pBR322, чтобы уменьшить количество копий плазмиды.

Прайм	Описание	Последовательность	SEQ
APR-	Kan	AAAAAAGCTTGCAGCT CT GGC CCGTG	226

APR-	Kan	AAAAAAGCTTTTAGAAAAACTCATCG	227
APR-	pATIori	ACACTAGAAGgACAGTATTTGGTATCTG	228
APR-	pATIori	AGCCGTAGTTAGGCCACC	229

pATI2.0

Была сконструирована и синтезирована плазмида, которая содержит следующие особенности: начало репликации pBR322, последовательность ядерного нацеливания ДНК SV40 (DTS), терминатор rrnB, промотор U6 для управления экспрессией shРНК с последующими фланкирующими сайтами рестрикции для клонирования промотора и shРНК или микроРНК, ген asd, терминатор rrnG, ген устойчивости к канамицину, фланкированный сайтами HindIII, и сайт мультиклонирования (SEQ ID NO: 247). Кроме того, была разработана и синтезирована плазмида для экспрессии двух отдельных shРНК или микроРНК. Эта плазмида содержит следующие особенности: начало репликации pBR322, последовательность ядерного нацеливания ДНК SV40 (DTS), терминатор rrnB, промотор U6 для управления экспрессией shРНК с последующим фланкированием сайтов рестрикции для клонирования промотора и shРНК или микроРНК, shRNA или микроРНК, 450 п.н. случайным образом генерированная последовательность размещенная между промоторами H1 и U6, ген ASD, терминатор rrnG, ген устойчивости к канамицину в окружении сайтов Hind III, а также сайт мультиклонирования (SEQ ID NO : 245).

Пример 6

Нокаут флагеллина S. typhimurium путем удаления генов fliC и fljB Разработка и характеристика штаммов

В приведенном здесь примере живой аттенуированный штамм S. typhimurium YS1646, содержащий делецию гена asd, был дополнительно сконструирован для удаления генов fliC и fljB с целью удаления обеих субъединиц флагеллина. Это устраняет провоспалительную активацию TLR5, чтобы уменьшить провоспалительную передачу сигналов и улучшить противоопухолевый адаптивный иммунитет.

Делеция гена*fliC*

В этом примере ген fliC был удален из хромосомы штамма YS1646Aasd с использованием модификаций метода Даценко и Ваннера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645 (2000)), как подробно описано выше. Вкратце, синтетические последовательности плеч гомологии гена fliC, которые содержат 224 и 245 оснований гомологичной последовательности, фланкирующей ген fliC, клонировали в плазмиду, названную pSL0147 (SEQ ID NO: 230). Кассета гена канамицина, фланкированная сайтами cre / loxP, затем была клонирована в pSL0147, и кассета для нокаута гена fliC была затем / CR амплифицирована с праймером flic-1 (SEQ ID NO: 232) и flic-2 (SEQ ID NO: 233) , очищали в геле и затем вводили в штамм YS1646Aasd, несущий термочувствительную плазмиду рекомбинации лямбда-красного pKD46, путем электропорации.

Электропорированные клетки выделяли 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 проверяли на включение нокаутного фрагмента с помощью PCR с использованием праймеров flic-3 (SEQ ID NO: 234) и flic-4 (SEQ ID NO: 235). Затем pKD46 обрабатывали путем культивирования выбранного устойчивого к канамицину штамма при 42 ° C и скрининга на потерю устойчивости к ампициллину. Затем маркер устойчивости к канамицину обрабатывали электропорацией термочувствительной плазмиды, экспрессирующей рекомбиназуCre (pJW168) и Amp ^{R} колонии отбирали при 30 ° C; Затем pJW168 удаляли выращиванием культур при 42 ° C. Отобранные клоны с нокаутом fliC затем тестировали на потерю маркера канамицина с помощью PCR с использованием праймеров, фланкирующих сайты разрушения (flic-3 и flic-4), и оценки электрофоретической подвижности на агарозных гелях.

Удаление гена fljB

Затем fljB был удален в штамме YS 1646 Aasd / fliC с использованием модификаций методов, описанных выше. Синтетические последовательности плеч гомологии гена fljB, которые содержат 249 и 213 оснований левой и правой последовательности соответственно, фланкирующих ген tefljB, были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0148 (SEQ ID NO: 231). Кассету гена канамицина,

фланкированную сайтами cre / loxP, затем клонировали в pSL0148, а кассету для нокаута гена fljBамплифицировали с помощью PCR с праймерами fljb-1 (SEQ ID NO: 236) и fljb-2 (SEQ ID NO: 237) (см., Таблица 1), очищали в геле и вводили в штамм YS1646Aasd, несущий термочувствительную плазмиду рекомбинации лямбда-красного pKD46, путем электропорации. Затем ген устойчивости к канамицину был излечен с помощью cre-опосредованной рекомбинации, как описано выше. и термочувствительные плазмиды обрабатывали путем выращивания при недопустимой температуре. Нокаутные последовательности генов fliC и fljBамплифицировали с помощью PCR с использованием праймеров flic-3 и flic-4 или fljb-3 (SEQ ID NO: 238) и fljb-4 (SEQ ID NO: 239), соответственно, и проверяли с помощью секвенирования ДНК. Это мутантное производное YS 1646 было обозначено как YS 1646 Aasd / AfliC / AfljB или для краткости YS 1646Aasd / AFLG.

***Invitro* характеристика сконструированного штамма S. typhimurium с нокаутом флагеллина**

Произведенный из YS1646 asd-мутантный штамм, несущий делеции как fliC, так и fljB, в настоящем документе обозначаемый как YS 1646Aasd / AFLG, оценивали на подвижность путем внесения 10 микролитров культур в плавательные чашки (LB, содержащий 0,3% агара и 50 мг / мл DAP). В то время как подвижность наблюдалась для штамма YS1646Aasd, подвижность не была очевидна для штамма YS 1646Aasd / AFLG. Затем штамм YS1646 Aasd / AFLG подвергали электропорации с плазмидой, содержащей ген asd, и оценивали скорость его роста в отсутствие DAP.

Штамм YS1646Aasd / AFLG с плазмидой, комплементированнойasd, был способен реплицироваться в LB в отсутствие дополнительного DAP и рос со скоростью, сравнимой со штаммом YS1646Aasd, содержащим плазмиду, комплементированнуюasd. Эти данные демонстрируют, что удаление флагеллина не снижает приспособленность S. typhimuriuminvitro.

Устранение флагелл снижает пироптоз в макрофагах мышей

$5x10^5$ мышиных RAW-макрофаговых клеток (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния) инфицировали штаммом YS 1646Aasd / AFLG или родительским штаммом YS 1646Aasd, оба несли плазмиду, комплементированнуюasd, при MOI приблизительно 100 в анализе защиты от гентамицина. Через 24 часа после инфицирования собирали культуральныесупернатанты и оценивали высвобождение лактатдегидрогеназы в качестве маркера гибели клеток с использованием набора для анализа цитотоксичности Pierce ™ LDH (ThermoFisherScientific, Waltham, MA). Штамм 1646Aasd индуцировал 75% максимального высвобождения LDH, в то время как штамм YS 1646Aasd / AFLG индуцировал 54% максимального высвобождения LDH, демонстрируя, что делеция генов флагеллина снижает индуцированный S. typhimuriumпироптоз инфицированных макрофагов.

Мутанты с удаленными флагеллами приводят к уменьшению пироптоза в инфицированных моноцитах человека

Чтобы продемонстрировать, что штаммы YS 1646Aasd / AFLG обладают пониженной способностью вызывать гибель клеток в макрофагах, клетки макрофагов человека THP-1 (каталог ATCC № 202165) были инфицированы штаммами S. typhimurium YS1646 иYS 1646Aasd / AFLG, со штаммами Aasd, содержащими плазмиды, кодирующие функциональный ген asd для обеспечения поддержания плазмиды. 5×10^4 клеток помещали в 96-луночный планшет с DMEM и 10% FBS.

Клетки инфицировали промытыми культурами S. typhimurium в лог-фазе в течение 1 часа при MOI 100 КОЕ на клетку, затем клетки промывали PBS и среду заменяли средой, содержащей 50 пг / мл гентамицина для уничтожения внеклеточных бактерий,и 50 нг / мл IFNγ для преобразования моноцитов в фенотип макрофагов. Через 24 часа клетки THP-1 окрашивали CellTiter-Glo ®реагентом (Promega), и процент жизнеспособных клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток с использованием планшет-ридера SpectraMax® для количественной оценки люминесценции. Клетки, инфицированные штаммом YS 1646, имели жизнеспособность только 38%, в то время как клетки, инфицированные штаммом YS 1646Aasd / AFLG, имели жизнеспособность 51%, что указывает на то, что делеция генов флагеллина вызывает

меньшую гибель клеток макрофагов человека, несмотря на очень высокий и супрафизиологический MOI.

Флагеллы не требуются для колонизации опухоли после системного введения.

Чтобы оценить влияние штаммов, нокаутированных по флагеллину, вводимых на мышиной модели карциномы толстой кишки, самкам мышей BALB / c в возрасте 6-8 недель (5 мышей на группу) подкожно инокулировали правый бок клетками CT26 ($2 \times {}^{10}{}^{5}$ клеток в 100 мл PBS). Мышам с 10-дневной установленной опухолью на боках внутривенно вводили однократную дозу 3×10^{5} КОЕ штамма YS1646Aasd / AFLG-shTREX1 или родительского штамма YS1646 Aasd-shTREX1. На 35 день после имплантации опухоли мышей умерщвляли, опухоли гомогенизировали и высевали на чашки LB для подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм опухолевой ткани.

Штамм YS1646Aasd-shTREX1 колонизировал опухоли в среднем $5,9 \times 10^{7}$ КОЕ на грамм опухолевой ткани, в то время как штамм YS1646Aasd / AFLG-shTREX1 с удаленными флагеллами колонизировал опухоли с почти двукратным увеличением среднего значения $1,1 \times 10^{8}$ КОЕ / г опухолевой ткани. Колонизация селезенки штаммом YS1646Aasd / AFLG-s была рассчитана как среднее значение $1,5 \times 10^{3}$ КОЕ / г ткани селезенки, тогда как колонизация селезенки штаммом YS1646Aasd / AFLG-shTREX1 с удаленными флагеллами была немного ниже, в среднем $1,2 \times 10^{3}$ КОЕ / г ткани селезенки.

Эти данные демонстрируют, что отсутствие фдагелл не только не оказывает отрицательного воздействия на колонизацию опухоли после внутривенного введения, но и усиливает колонизацию опухоли по сравнению со штаммом с интактными флагеллами. Важно отметить, что удаление флагелл немного снижает колонизацию селезенки, в результате чего соотношение опухоли к селезенке составляет 100000 раз. Эти данные демонстрируют, что, вопреки ожиданиям в данной области, не только флагеллы не требуются для

колонизации опухолью, но и их удаление усиливает колонизацию опухолью при одновременном снижении колонизации селезенки.

Штамм с удаленными флагеллами демонстрирует повышенную противоопухолевую активность у мышей

Чтобы оценить влияние штаммов с нокаутом флагеллина, вводимых на мышиной модели карциномы толстой кишки, самкам мышей BALB / c в возрасте 6-8 недель (5 мышей на группу) подкожно инокулировали в правый бок клетки CT26 (2×10^5 клеток). в 100 мл PBS). Мышам с установленными опухолями на боках внутривенно вводили однократную дозу 3×10^5 КОЕ штамма YS164Aasd / AFLG-shTREX1 или штамма YS1646Aasd-shTREX1 и сравнивали с контролем PBS. За мышами наблюдали с помощью штангенциркуля на предмет роста опухоли.

Результаты показали, что штамм YS 1646Aasd /AFLG-shTREX 1, неспособный к образованию флагелл, показал улучшенный контроль опухоли по сравнению с родительским штаммом YS1646Aasd-shTREX 1 (27% TGI, сутки 24) и значительный контроль опухоли по сравнению с контролем PBS. (73% TGI, p = 0,04, 24 день). Эти данные демонстрируют, что не только флагеллы не требуются для колонизации опухоли, но и их потеря может повысить противоопухолевую эффективность.

Штаммы с удаленными флагеллами демонстрируют усиленный адаптивный иммунитет на модели опухоли мышей

Было оценено, что активация STING от опухолевых миелоидных клеток shРНК к гену TREX1 контрольной точки STING будет способствовать формированию адаптивной иммунной сигнатуры IFN типа I. Использовали мышиную модель карциномы толстой кишки CT26, где самкам мышей BALB / c в возрасте 6-8 недель (5 мышей на группу) подкожно инокулировали в правый бок клетки CT26 (2×10^5 клеток в 100 мл PBS). Мышам, несущим сформировавшиеся боковые опухоли, через 11 дней после имплантации опухоли внутривенно вводили 5×10^6 КОЕ либо штамма YS1646Aasd / AFLG-shTREX1, либо родительского штамма YS1646Aasd-shTREX1, либо

контрольного штамма скремблированной плазмиды YS1646Aasd-shSCR, и сравнивали с контролем PBS.

У мышей брали кровь через 7 дней после введения дозы в пробирки, покрытые натрий-гепарином (BecktonDickinson). Затем несвернувшуюся кровь разбавляли в том же объеме PBS и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) отделяли от межфазного слоя цельной крови с использованием реагента для разделения клеток Lympholyte®-M (Cedarlane).

Выделенные PBMC промывали PBS + 2% FBS центрифугированием при 1300 об / мин в течение 3 минут при комнатной температуре и ресуспендировали в проточном буфере. Один миллион PBMC засевали на лунку 96-луночного планшета с V-образным дном. Клетки центрифугировали при 1300 об / мин в течение 3 минут при комнатной температуре (RT) и ресуспендировали в 100 мл проточного буфера, содержащего конъюгированный с флуорохромом пептид AH1: тетрамеры MHC класса I (MBL International), и антитела, полученные для проточной цитометрии клеточной поверхности, CD4 FITC clone RM4-5; CD8a BV421 клон 53-6,7; клон F4 / 80 APC BM8; CD1 lb клон PE-Cy7 M1 / 70; CD45 BV570 клон 30-F11; CD3 PE клон 145-2C11; Ly6C BV785 клон HK1.4; IA / IE APC-Cy7 клон M5 / 114.15.2; Ly6G BV605 клон 1A8; и CD24 PercP-Cy5.5 клон M1 / 69 (все от BioLegend) в течение 45 минут при комнатной температуре и в темноте. Через 45 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS центрифугированием при 1200 об / мин в течение 3 минут. Затем клетки ресуспендировали в PBS + 2% FBS, содержащем DAPI (мертвое / живое окрашивание), и данные немедленно получали с использованием проточного цитометраNovoCyte® (ACEA Biosciences, Inc.) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo ™ (TreeStar, Inc.).

Следующие типы клеток были подсчитаны как процент от общего количества живых клеток: CD 11b $^{+}$ Grl $^{+}$ нейтрофилы (возможно, MDSC, хотя потребуется дальнейшее фенотипирование в функциональном анализе exvivo), CD11b $^{+}$ F4 / 80 $^{+}$ макрофаги, CD8 $^{+}$ T -клетки и CD8 $^{+}$ T-клетки, которые распознают антиген отторжения опухоли CT26 gp70 (AH1), продукт гена оболочки антигена клеточной поверхности, связанного с вирусом лейкемии мышей (MuLV) (Castleetal. (2014) BMC Genomics 15 (1): 190).

Результаты, обобщенные в таблице ниже, показывают, что штамм YS 1646Aasd-shSCR, содержащий плазмиду, кодирующую неспецифическую скремблированную shPHK, вызывает типичный антибактериальный иммунный профиль со значительным увеличением количества нейтрофилов по сравнению с PBS (p = 0,02), штамму YS 1646Aasd-shTREX1 с интактными флагеллами (p = 0,02) и штамму YS1646Aasd / AFLG-shTREX1 с удаленными флагеллами (p = 0,01), который имел самые низкие уровни циркулирующих нейтрофилов. Точно так же бактериально-индуцированные макрофаги также были значительно увеличены в ответ на штамм YS1646Aasd-shSCR по сравнению с PBS (p = 0,01), штаммом YS1646Aasd-shTREX1 (p = 0,01) и штаммом YS1646Aasd / AFLG-shTREX1. (p = 0,01).

Таким образом, оба штамма, несущие полезные нагрузки, индуцирующие IFN I типа, были способны перезаписывать нормальный антибактериальный иммунный ответ, который устраняет бактериальные инфекции через нейтрофилы и макрофаги и не вызывает адаптивный Т-клеточный иммунитет.

Однако, хотя общие уровни циркулирующих $CD8^+$ Т-клеток были сходными во всех группах, штамм YS1646Aasd / AFLG-shTREX1 с удаленными флагеллами продемонстрировал значительно повышенное процентное содержание AH1-тетрамера $^+$ $CD8^+$ Т-клеток по сравнению с PBS (p = 0,04).

Эти данные демонстрируют возможность создания бактерий для доставки вирусоподобных плазмид, индуцирующих IFN типа I, в опухолерезидентные миелоидные клетки. Это приводит к резкому перепрограммированию иммунного ответа в сторону более вирусного и менее бактериального иммунного профиля. Делеция флагелл еще больше усилила сдвиг от бактериально рекрутируемых нейтрофилов и макрофагов к значительному увеличению опухолевых антиген-специфичных $CD8^+$ Т-клеток. Таким образом, устранение бактериального TLRS-опосредованного воспаления может повысить адаптивный иммунитет.

	% живых клеток средний ± SD			
Иммунные	**PBS**	**YS1646Aasd-**	**YS1646Aasd-**	**YS1646Aas**

Нейтрофил	6.27 ± 2.62	19.21 ± 9.46	5.87 ± 3.94	4.01 ± 1.65
Макрофаги	10.08 ± 2.11	23.14 ± 9.04	9.12 ± 3.84	7.39 ± 2.11
$CD8^+$ T-	6.64 ± 0.56	7.17 ± 0.60	7.14 ± 2.30	6.44 ± 1.43
$AH1^+$ $CD8^+$	0.83 ± 0.12	1.06 ± 1.11	2.27 ± 1.44	4.12 ± 3.08

Штаммы с удаленными флагеллами ограничиваются компартментом фагоцитарных миелоидных иммунных клеток invivo

Согласно литературным данным, штаммы AfljB / AfliC демонстрируют подавление многих нижестоящих генов, связанных с SPI-1-опосредованным проникновением в нефагоцитарные клетки. Чтобы определить, является ли штамм YS1646Aasd / AFLG также дефицитным для поглощения нефагоцитарными клетками, штамм YS 1646Aasd / AFLG, конститутивно экспрессирующему mCherry под бактериальным промотором rpsM, внутривенно вводили мышам MC38 с опухолью на боку подкожно.

Модель MC38 (аденокарцинома толстой кишки # 38 мыши) была получена аналогично модели CT26 с использованием мутагенеза, но с диметилгидразином и в штамм мышей C57BL / 6 (Corbettetal. (1975) CancerRes. 35 (9): 2434-9). Подобно CT26, подкожная имплантация приводит к исключению большего количества Т-клеток и более иммуносупрессивному микроокружению опухоли, чем при ортотопической имплантации в толстую кишку (Zhaoetal. (2017) Oncotarget 8 (33): 54775-54787). MC38 имеет более высокий мутационную нагрузку, чем у CT26, и аналогичный вирусный антиген gp70 (p15E) может быть обнаружен $CD8^+$ Т-клетками, хотя он не считается отторгающим антигеном.

Хотя было обнаружено, что варианты MC38 частично чувствительны к терапии контрольных точек, большинство вариантов клеточной линии считаются невосприимчивыми к контрольным точкам и исключенные Т-клетки (Mariathasanetal. (2018) Nature 555: 544-548), включая клетки MC38. используются здесь.

Самкам мышей C57BL / 6 в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки MC38 (5×10^5 клеток в 100 мл PBS). Мышам с крупными укоренившимися боковыми опухолями на 34 день внутривенно вводили 1×10^6 КОЕ штамм YS 1646Aasd / AFLG-mCherry.

Опухоли резецировали через 7 дней после внутривенного введения и разрезали на кусочки 2-3 мм в пробирки MACS ™ C (MiltenyiBiotec), заполненные 2,5 мл смеси ферментов (RPMI-1640 10% FBS с 1 мг / мл коллагеназы IV и 20 мкг / мл ДНКазы I). Кусочки опухоли диссоциировали с использованием специальной программы диссоциации OctoMACS ™ (MiltenyiBiotec) (опухоли, имплантированные мышам), и весь препарат клеток инкубировали при перемешивании в течение 45 минут при 37 ° C.

После 45-минутной инкубации проводили второй раунд диссоциации с использованием OctoMACS ™ (программа для имплантации опухолей мышам), и полученные суспензии отдельных клеток фильтровали через нейлоновую сетку 70 мкМ в пробирку на 50 мл. Нейлоновую сетку один раз промывали 5 мл 10% FBS RPMI-1640, и клетки отфильтровали второй раз, используя новую нейлоновую сетку 70 мкМ в новую пробирку на 50 мл. Нейлоновую сетку промывали 5 мл 10% FBS RPMI-1640 и затем отфильтрованные клетки центрифугировали при 1000 об / мин в течение 7 минут. Полученные диссоциированные клетки ресуспендировали в PBS и хранили на льду перед процессом окрашивания.

Для окрашивания проточной цитометрией 100 мкл суспензий отдельных клеток высевали в лунки 96-луночного планшета с V-образным дном. PBS, содержащий мертвое / живое пятно (ZombieAqua ™, BioLegend) и реагенты для блокирования Fc (BD Biosciences) добавляли в количестве 100 мл на лунку и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS центрифугированием при 1300 об / мин в течение 3 минут.

Затем клетки ресуспендировали в PBS + 2% FBS, содержащем антитела, конъюгированные с флуорохромом (CD4 FITC клон RM4-5; CD8a BV421 клон 53-6.7; F4 / 80 APC клон BM8; CD1 lb PE-Cy7 клон Ml / 70; CD45 BV570 клон 30-FI 1; CD3 PE клон 145-2C1 1; Ly6C BV785 клон HK1 .4; IA / IE APC-Cy7 клон M5 / 1 14.15.2; Ly6G BV605 клон 1A8; и CD24 PercP-Cy5.5 клон M1 / 69, все от BioLegend), и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте.

Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS центрифугированием при 1300 об / мин в течение 3 минут и ресуспендировали в фиксирующем буфере для проточной цитометрии (ThermoFisherScientific). Данные проточной цитометрии были получены с использованием проточного цитометраNovoCyte® (ACEA Biosciences, Inc.) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo ™ (TreeStar, Inc.).

Результаты показывают, что 7,27% инфильтрирующих опухоль моноцитов поглотили штамм mCherry с удаленными флагеллами в микроокружении опухоли. Точно так же 8,96% популяции ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) и 3,33% инфильтрирующих опухоль дендритных клеток (ДК) поглотили штамм mCherry с удаленными флагеллами. Напротив, в популяции CD45, соответствующей стромальным и опухолевым клеткам, только 0,076% показали положительную экспрессию mCherry (по сравнению с 0,067% фоновым окрашиванием). Эти данные демонстрируют, что флагеллы и их последующее сигнальное воздействие на SPI-1 необходимы для обеспечения инфекционности эпителиальных клеток, и что их отсутствие ограничивает поглощение бактерий только компартментом фагоцитарных иммунных клеток микроокружения опухоли (т.е. иммунные / миелоидные клетки).

Удаление флагелл дает иммуностимулирующему штамму S. typhimurium множество преимуществ, включая устранение индуцированных TLR5 воспалительных цитокинов, которые подавляют адаптивный иммунитет, уменьшение пироптоза макрофагов, а также поддержание (или усиление) опухолеспецифического обогащения при системном введении, при котором поглощение ограничено резидентными в опухоли фагоцитарными клетками.

Пример 7

S. typhimurium, сконструированный для экспрессии cytoLLO для улучшенной доставки плазмиды

В этом примере штамм YS 1646 с делецией asd, описанный в примере 3 (AST-101), был дополнительно модифицирован для экспрессии белка листериолизинаО (LLO), лишенного сигнальной последовательности, которая накапливается в цитоплазме штамма Salmonella (называемого в настоящем документе как cytoLLO). LLO представляет собой холестерин-зависимый порообразующий цитолизин, который секретируется Listeriamonocytogenes и опосредует фагосомный выход бактерий. Ген,

кодирующий LLO с удаленными кодонами 2-24, был синтезирован с кодонами, оптимизированными для экспрессии в Salmonella.

Последовательность открытой рамки считывания (ORF) cytoLLO показана в SEQ ID NO: 240. Ген cytoLLO был помещен под контроль промотора, который индуцирует транскрипцию в S. typhimurium (SEQ ID NO: 241, воспроизводится ниже). Кассета экспрессии cytoLLO была вставлена в единственной копии в нокаутный локус asd штамма AST-101 с удаленным asd с использованием модификаций метода Даценко и Ваннера (ProcNatlAcadSci USA (2000) 97: 6640-6645). как описано выше.

Последовательностьпромотораиндуцирующего экспрессиюcytoLLO

LLO	attatgtettgacatgtagtgagtgggctggtataat	SEQ ID NO:

Штамм с делецией asd с кассетой экспрессии cytoLLO, вставленной в локус asd (называемый здесь ASD / LLO или AST-114), был дополнительно модифицирован электропорацией плазмидой pATI, кодирующей ген asd, что позволяет штамму расти в отсутствие экзогенный DAP и выбирает для поддержания плазмиды, а также содержит промотор U6, управляющий экспрессией shTREX1, как описано выше (называемый здесь ASD / LLO (pATI-shTREX1) или AST-115). Штамм ASD / LLO (pATI-shTREX1), AST-115, рос со скоростью, сравнимой со штаммом с удаленным asd, содержащим ту же плазмиду (pATI-shTREX1), AST-110, демонстрируя, что нокаут LLO не влияет на бактериальную пригодность invitro.

S. typhimurium, созданный для производства cytoLLO, демонстрирует сильную противоопухолевую активность.

Чтобы определить, обеспечивает ли включение гена cytoLLO противоопухолевую эффективность, штамм ASD / LLO (pATI-shTREX1) AST-115 оценивали на мышиной модели карциномы толстой кишки. Для этого исследования самкам мышей BALB / c в возрасте 6-8 недель (8 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки CT26 ($2 \times {}^{10}5$ клеток в 100 мл PBS). Мышам с установленными боковыми опухолями внутривенно вводили однократную дозу 5×10^{6} КОЕ AST-115 и сравнивали с контролем PBS.

Добавление гена cytoLLO к штамму ASD / LLO (pATI-shTREX1) продемонстрировало высоко значимый контроль опухоли по сравнению с контролем PBS (76% TGI, p= 0,002, день 28), и эффективность после однократной дозы

сравнимую с предыдущими исследованиями, в которых штаммы, содержащие плазмиду TREX1 shRNA, вводили в нескольких дозах. Эти данные демонстрируют цитоLLO-опосредованное преимущество доставки большего количества плазмиды в цитозоль, что приводит к большему нокдауну гена, тем самым улучшая терапевтическую эффективность РНК против мишеней, таких как TREX1.

Пример 8

Ауксотрофные по аденозину штаммы S. typhimurium

Предлагаемые здесь штаммы разработаны так, чтобы быть ауксотрофными по аденозину. В результате они ослабляются invivo, поскольку они не могут реплицироваться при низких концентрациях аденозина в нормальной ткани, поэтому колонизация происходит в основном в микросреде солидной опухоли, где уровни аденозина высоки. Штамм SalmonellaYS1646 (AST-100) является производным штамма дикого типа ATCC 14028 и был сконструирован так, чтобы быть ауксотрофным по пурину из-за нарушения гена purl (Lowetal., (2004) MethodsMol. Med 90:47 - 60).

Последующий анализ всего генома YS 1646 показал, что ген purl (синонимичный purM) на самом деле не был удален, а вместо этого был разрушен хромосомной инверсией (Broadwayetal. (2014) J.Biotechnol.192: 177-178), и что весь ген все еще содержится в двух частях хромосомы YS 1646, которые фланкированы вставленными последовательностями (одна из которых имеет активную транспозазу). Присутствие полной генетической последовательности гена purl, удаленной посредством повторного вовлечения хромосомы, оставляет открытой возможность реверсии к гену дикого типа. Хотя ранее было продемонстрировано, что пуриновая ауксотрофияYS 1646 была стабильной после серийного пассажа invitro, не было ясно, какова скорость реверсии (Clairmontetal. (2000) J. Infect. Dis. 181: 1996-2002).

В данном документе показано, что при наличии аденозина YS1646 способен реплицироваться в минимальной среде; тогда как родительский штамм дикого типа ATCC 14028 может расти в минимальных средах, которые не содержат аденозина. YS 1646 выращивали в течение ночи в среде LB, промытой минимальной средой M9 и разбавленной минимальной средой M9, не содержащей аденозина, или увеличивающейся концентрацией аденозина. Рост измеряли с использованием спектрофотометра SpectraMax® M3 (MolecularDevices) при 37 ° C, считывая OD600 каждые 15 минут. YS1646 был способен реплицироваться, когда аденозин предоставлялся в концентрациях от 11 до 300 микромолей, но был полностью неспособен реплицироваться в одном только M9 или M9 с добавлением 130

наномолярного аденозина. Эти данные демонстрируют, что мутанты purlспособны реплицироваться в концентрациях аденозина, которые обнаруживаются в микроокружении опухоли, но не в концентрациях, обнаруживаемых в нормальных тканях.

Сконструированные ауксотрофные штаммы по аденозину, приведенные здесь в качестве примеров, включают штаммы, в которых вся или часть purl удалены из хромосомы для предотвращения возврата к дикому типу. Такие делеции генов могут быть достигнуты с использованием системы лямбда-красного, как описано выше.

Штаммы сальмонелл, содержащие разрушение purl, дополнительно сконструированные так, чтобы они содержали делецию гена asd (ASD), как описано выше, или содержали делецию гена asd, и дополнительно сконструированные так, чтобы иметь делеции fliC и fljB (ASD / FLG) (как описано в Примере 6), или мутанты asd, дополнительно сконструированные для экспрессии cytoLLO (ASD / LLO) (как описано в примере 7) и дополненные плазмидой с низким числом копий (pATIlow), экспрессирующей asd (штаммы AST-117, AST-118 и AST-1 19, соответственно), также оценивали на рост в минимальной среде M9. Данные показывают, что каждый штамм был способен реплицироваться, когда аденозин предоставлялся в концентрациях от 11 до 300 микромоль, но был полностью неспособен реплицироваться в одном только M9 или M9 с добавлением 130 наномолярного аденозина.

Пример 9

Характеристика и использование системы комплементации генов asdinvitro

Рост штаммов с комплементацией генов asd

Для оценки пригодности бактериальных штаммов, содержащих плазмиды, строили кривые роста в жидкой среде LB с использованием планшет-ридера SpectraMax® при 37 ° C, считывая OD600 каждые 15 минут. YS1646, содержащий низкокопийную плазмиду pEQU6-shTREX1 (AST-104), рос сравнительно с YS1646, который не содержал плазмиду (AST-100). Мутантный штамм по asd, несущий высококопийную плазмиду shTREX1 с геном asd, который может дополнять ауксотрофиюasd (AST-110), был способен реплицироваться в LB в отсутствие DAP, но рос медленнее, чем YS 1646.

Штамм с удаленным asd, содержащий экспрессионную плазмиду shTREX-1 с низким числом копий начала репликации и геном asd, который может дополнять ауксотрофиюasd (pATIlow-shTREX1), штамм AST-117, рос быстрее, чем AST-1 10. Эти данные демонстрируют, что плазмиды с низким числом копий, которые дополняют ауксотрофию гена asd, превосходят плазмиды с большим числом копий, поскольку они обеспечивают более высокую скорость репликации S. typhimuriuminvitro.

Внутриклеточный рост штаммов, дополненных asd

Чтобы измерить приспособленность мутантов asd, дополненных asd, на плазмидах с высоким и низким числом копий, способность бактериальных штаммов реплицироваться внутриклеточно в линиях опухолевых клеток мышей оценивали с использованием анализа защиты от гентамицина. В этом анализе клетки меланомы B16.F10 мыши или клетки CT26 рака толстой кишки мыши инфицировали мутантными asd штаммами Salmonella, содержащими плазмиды, которые содержат комплементарный ген asd и имеют либо высококопийное начало репликации, AST-110 (ASD pATI-shTREX1)), или начало репликации с низким чмслом копий, AST-117 (ASD pATIlow copy-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. Гентамицин не убивает внутриклеточные бактерии, поскольку он не может пересекать клеточную мембрану. В различные моменты времени после инфицирования монослои клеток лизировали осмотическим шоком с водой, лизаты клеток разбавляли и высевали на агар LB для подсчета выживших колониеобразующих единиц (КОЕ).

У мутантного штамма asd, дополненного высококопийной плазмидой, AST-110, было начальное снижение КОЕ, но он был способен расти в клетках B16.F10, но не в клетках CT26, демонстрируя, что системы комплементации гена asd достаточно для поддержки роста внутри опухолевых клеток млекопитающих. Мутантный штамм asd, содержащий низкокопийную плазмиду, AST-117, был способен проникать и реплицироваться в обоих типах клеток, демонстрируя, что комплементация гена asd на низкокопийной плазмиде обеспечивает устойчивый рост мутанта asd внутри клеток млекопитающих. Штамм с низкокопийными плазмидами реплицировался в большем количестве в обоих типах опухолевых клеток по сравнению со штаммом с

высококопийными плазмидами. Это демонстрирует, что штаммы Salmonella с низкокопийными плазмидами обладают повышенной приспособленностью по сравнению со штаммами с высококопийными плазмидами.

Поддержание плазмид в опухолях с помощью системы комплементацииasd

В этом примере мышей с опухолью CT26 лечили YS1646, содержащим плазмиду, которая экспрессирует shRNA, нацеленную на TREX1 (pEQU6-TREX1), штамм AST-104 или штамм YS1646 с делецией asd, содержащий плазмиду с функциональным геном asd и shRNA, нацеленную на TREX1 (pATI-shTREX1), штамм AST-110. Через 12 дней после последней инъекции сальмонеллы опухоли гомогенизировали, и гомогенаты последовательно разбавляли и высевали на чашки с агаром LB для подсчета общего количества присутствующих КОЕ или на чашки с LB, содержащие канамицин, для подсчета количества колоний, устойчивых к канамицину.

S. typhimurium, который не обладал селективным давлением для поддержания плазмиды shRNA, AST-104, демонстрировал потерю плазмиды, поскольку процент колоний, устойчивых к канамицину (KanR), составлял менее 10%. Штамм, использовавший систему комплементации гена asd для поддержания плазмиды, AST-110, имел почти одинаковое количество КОЕ, устойчивых к канамицину, и чувствительных к канамицину. Эти данные демонстрируют, что системы комплементации гена asd достаточно для поддержания плазмиды в контексте микроокружения опухоли у мышей.

Повышенная противоопухолевая эффективность с использованием системы комплементацииasd

Система комплементацииasd предназначена для предотвращения потери плазмиды и усиления противоопухолевой эффективности доставки ингибирующей РНК штаммами S. typhimuriuminvivo. Чтобы проверить это, штаммы с делецией asd, содержащие плазмиду shTREX1 (AST-110) или скремблированный контроль (AST-109), которые содержат функциональную кассету гена asd, сравнивали со штаммом YS1646, содержащим pEQU6-shTREX1 (AST-104, плазмида, не содержащая кассету гена asd и, следовательно, не имеет механизма для поддержания плазмиды), для противоопухолевой эффективности в модели рака толстой кишки мышей. Для этого эксперимента самкам мышей BALB / c в возрасте 6-8 недель (8 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки CT26 ($2 \times {}^{10}5$ клеток в 100 мл PBS). Мышам с установленными опухолями на боковых сторонах делали

внутривенную инъекцию дважды, на 8-й и 18-й день, 5×10^{6} КОЕ AST-109 (ASD, трансформированный pATI-shScramble), AST-110 (ASD, трансформированный pATI-shTREX1) или AST-104 (YS1646, трансформированный pEQU6-shTREX1) и сравнивали с контролем PBS.

Штамм YS1646 AST-104 продемонстрировал контроль над опухолью по сравнению с PBS (70% TGI, день 28), несмотря на продемонстрированную потерю плазмиды с течением 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 плазмид CpG стимулирует противоопухолевый ответ.

Штамм asd-, содержащий плазмиду с системой комплементации гена asd и shTREX1 (AST-110), демонстрировал самое высокое ингибирование роста опухоли по сравнению с PBS (82% TGI, p = 0,002, день 25). Эти данные демонстрируют, что улучшенная эффективность достигается за счет предотвращения потери плазмид с использованием системы комплементацииasd и доставки shTREX1 по сравнению с плазмидами, содержащими YS1646, без систем комплементации генов или shTREX1 (терапевтический продукт).

Штаммы S. typhimurium с низкокопийными плазмидами демонстрируют превосходную противоопухолевую эффективность и колонизацию опухолей по сравнению со штаммами с высококопийными плазмидами.

Чтобы сравнить противоопухолевую эффективность низкокопийной плазмиды shTREX1 с системой комплементацииasd относительно высококопийной плазмиды shTREX1 на мышиной модели карциномы толстой кишки, самки мышей BALB / c в возрасте 6-8 недель (10 мышей на группу) подкожно инокулировали в правый бок клетки CT26 ($2 \times {}^{10}5$ клеток в 100 мл PBS). Мышам с установленными опухолями на боках внутривенно вводили две еженедельные дозы 5×10^{6} КОЕ AST-117 (ASD (pATI Low-shTREX1)) или AST-110 (ASD (pATI-shTREX1), и сравнивали с инъекциями PBS как отрицательный контроль. Штамм с низкокопийной плазмидой, AST-117, продемонстрировал превосходную противоопухолевую эффективность по сравнению со штаммом с высококопийной плазмидой, AST-110 (высокий, 59% TGI; низкий 79% TGI, p = 0,042, день 25).

В конце этого исследования ингибирования роста опухоли 4 мыши из каждой группы были умерщвлены, и опухоли и селезенки были гомогенизированы, как описано выше, для оценки колонизации опухоли и соотношения колонизации опухоли и селезенки. Штамм, содержащий низкокопийную плазмиду, AST-117, колонизировал опухоли на уровне более чем в 100 раз выше, чем штамм с высококопийной плазмидой, AST-110. После расчета соотношения колоний, выделенных из опухоли и селезенки, AST -117 имел более чем в 10 раз более высокое отношение колонизации опухолью к селезенке по сравнению с AST-110, демонстрируя, что штаммы с низкокопийными плазмидами обладают большей специфичностью в отношении колонизации опухолей, чем штаммы с высококопийными плазмидами.

Эти данные демонстрируют ранее неизвестный признак того, что S. typhimurium, сконструированный для доставки плазмид, обладает улучшенными способностями к колонизации опухолей и противоопухолевой активностью.

Пример 10

Примеры штаммов, сконструированных для повышенной переносимости делеции adrA или csgD

В этом примере живой аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium, содержащий делецию purl, делецию msbB, делецию гена asd и сконструированный для доставки плазмид, кодирующих интерферирующую РНК, дополнительно модифицируется для удаления adrA, гена, необходимого для образования биопленки Salmonellatyphimurium.

Сальмонеллы, которые не могут образовывать биопленки, быстрее поглощаются фагоцитарными клетками хозяина и быстрее выводятся. Это увеличение внутриклеточной локализации увеличивает эффективность доставки плазмиды и нокдауна гена за счет РНК-интерференции. Повышенная скорость выведения из опухолей / тканей увеличивает переносимость терапии, а отсутствие образования биопленок предотвращает колонизацию протезов и желчного пузыря у пациентов.

В другом примере живой аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium, который содержит делецию purl, делецию msbB, делецию гена asd и сконструирован для доставки плазмид, кодирующих терапевтический продукт, также модифицирован для удаления csgD (описана инженерия штаммов с делецией csgD. ниже). Этот ген отвечает за активацию adrA, а также индуцирует экспрессию бордовых фимбрий, агониста TLR2. Потеря csgD также предотвращает образование биопленок с дополнительным преимуществом ингибирования активации TLR2, тем самым дополнительно снижая активность бактерий и улучшая доставку закодированных терапевтических продуктов.

Делеция*pagP*

В этом примере живой аттенуированный штамм. S 'typhimurium, который содержит делецию purl, делецию msbB и делецию гена asd, и который сконструирован для доставки плазмид, кодирующих интерферирующую РНК, дополнительно модифицируется для удаления pagP. Ген pagP индуцируется во время инфекционного жизненного цикла S. typhimurium и кодирует фермент, который пальмитоилирует липид А. В S. typhimurium дикого типа экспрессия pagP приводит к образованию липида А, который является гепта-ацилированным. В мутанте msbB -, в котором терминальная ацильная цепь липида А не может быть добавлена, экспрессия pagP приводит к гексаацилированному LPS. Гексаацилированный ЛПС оказался наиболее провоспалительным. В этом примере штамм, удаленный из pagP и msbB, может продуцировать только пентаацилированный ЛПС, что обеспечивает более низкий уровень провоспалительных цитокинов, улучшенную переносимость, и повышенный адаптивный иммунитет, когда бактерия сконструирована для доставки интерферирующих РНК или других терапевтических продуктов.

Пример 11

Мутанты с делецией pagP имеют пентаацилированный ЛПС и индуцируют снижение воспалительных цитокинов

Разработка и характеристика штамма Salmonella с нокаутом гена pagP

Ген pagP был удален из штамма YS1646Dasd / DFLG с использованием модификаций способов, описанных в предыдущих примерах. Ген pagP индуцируется во время инфекционного жизненного цикла S. typhimurium и кодирует фермент (липид А пальмитоилтрансфераза), который модифицирует липид А пальмитатом. У S. typhimurium дикого типа экспрессия pagP приводит к образованию липида А, который является гепта-ацилированным. В мутанте msbB-, в котором терминальная ацильная цепь липида А не может быть добавлена, экспрессия pagP приводит к гексаацилированному LPS. Было показано, что гексаацилированный ЛПС обладает высокой провоспалительной способностью и высоким сродством к TLR4 (гептаацилированный ЛПС, обнаруженный у дикого типа, имеет самое высокое сродство к TLR4). В этом примере штамм с удаленным pagP и msbB может продуцировать только пентаацилированный LPS, позволяя более низкие провоспалительные цитокины из-за низкой афинностиTLR4, повышенную

переносимость, и повышенный адаптивный иммунитет, когда бактерии сконструированы для доставки плазмид, кодирующих иммуномодулирующие белки.

Конструкция штамма ApagP

Синтетические последовательности плеч гомологии гена pagP, которые содержат 203 и 279 оснований левой и правой последовательностей, соответственно, фланкирующих ген pagP, были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0191 (SEQ ID NO: 315). Кассета гена канамицина, фланкированная сайтами cre / loxP, затем была клонирована в pSL0191, а кассета для нокаута гена pagPамплифицирована ПЦР с праймерами pagp-1 (SEQ ID NO: 321) и pagp-2 (SEQ ID NO: 322) (см., Таблица 1), очищали в геле и вводили в штамм YS 1646Dasd, несущий термочувствительную плазмиду рекомбинации лямбда-красного pKD46, путем электропорации. Затем ген устойчивости к канамицинуобрабатываликре-опосредованной рекомбинацией, как описано выше, и термочувствительные плазмиды обрабатывали путем роста при недопустимой температуре. Нокаутные последовательности гена pagPамплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров pagp-3 (SEQ ID NO: 323) и pagp-4 (SEQ ID NO: 324) и подтверждали секвенированием ДНК. Полученное мутантное производное YS1646 было обозначено YS1646Aasd / AFLG / ApagP.

Мутанты с делецией pagP имеют пента-ацилированныйLPS и индуцируют снижение воспалительных цитокинов

Ген pagP также был удален из штамма YS 1646 Aasd с использованием системы рекомбинации на основе лямбда красного, как описано у Даценко и Ваннера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645 (2000)) и выше, чтобы получить штамм YS1646 Aasd / ApagP.

Затем этот штамм подвергали электропорации с плазмидой, содержащей функциональный ген asd, чтобы дополнить удаленный ген asd и гарантировать поддержание плазмиды invivo. Затем липид А экстрагировали из этого штамма и оценивали с помощью матричной лазерной десорбции / ионизационной масс-спектрометрии (MALDIMS) и сравнивали с липидом А из штамма S. typhimurium дикого типа ATCC 14028, штамма YS1646 (в котором удалены msbB и purl) и штамм YS1646 Aasd. Сальмонелла дикого типа имела минорный пик липида А с массой 2034

и главный пик с массой 1796, соответствующие гептаацилированным и гексаацилированным видам, соответственно, из-за присутствия функционального гена msbB. У штаммов YS1646 и YS1646 с делецией msbB основные пики Dasd были при 1828 и 1585, что соответствует смеси гексаацилированного и пентаацилированного ЛПС.

Штамм с делецией msbB и pagP, YS1646 Aasd / ApagP, имел только один пик с массой 1585, соответствующий пентаацилированному ЛПС. Эти данные демонстрируют, что делеция pagP предотвращает пальмитоилированиеLPS, тем самым ограничивая его одним пента-ацилированным видом. Эти данные демонстрируют, что делеция pagP предотвращает пальмитоилированиеLPS, тем самым ограничивая его одним пента-ацилированным видом.

Чтобы показать, что пентаацилированный ЛПС из мутантных штаммов ApagP снижал передачу сигналов TLR4, к моноцитарным клеткам человека THP-1 добавляли 4 мг очищенного LPS из штамма дикого типа, штамма YS1646 или штамма YS1646 Aasd / ApagP, и супернатанты оценивали через 24 часа на наличие воспалительных цитокинов с использованием набора CytometricBeadArray (CBA) (BDBiosciences). Результаты показывают, что LPS из штамма YS1646 Aasd / ApagP индуцировал 25% количества TNFa по сравнению с LPS дикого типа и индуцировал в 7 раз меньше IL-6, чем LPS дикого типа. LPS из штамма YS1646 Aasd / ApagP индуцировал в 22 раза меньше IL-6, чем штамм YS1646, демонстрируя, что пента-ацилированные виды LPS из мутанта ApagP значительно менее воспалительные в клетках человека, и указывает на то, что мутант ApagP будет лучше переносится людьми.

Делеция pagP значительно меньше индуцирует IL-6 в первичных макрофагах человека M2

Чтобы продемонстрировать, что штамм YS1646Aasd / AFLG/ ApagP также вызывает меньше воспалительного и ограничивающего дозу IL-6 из первичных макрофагов M2 человека, штамм оценивали и сравнивали с YS 1646 Aasd / AFLG и родительскими штаммами YS1646. Макрофаги M2, полученные от

доноров-людей, являются репрезентативными для иммуносупрессивныхфенотипов, которые сильно обогащены солидными опухолями, за исключением Т-клеток.

Замороженные PBMC человека, выделенные от здоровых доноров-людей, размораживали в полной среде (RPMI-1640 + IX заменимые аминокислоты + 5% сыворотка AB человека) и промывали центрифугированием в течение 10 минут при 800 об / мин при комнатной температуре. PBMCресуспендировали в PBS + 2% FBS, и моноциты выделяли с использованием набора CD 16 (StemCellTechnologies). Затем изолированные моноциты промывали центрифугированием в PBS + 2% FBS и ресуспендировали в полной среде, содержащей 100 нг / мл фактора стимуляции колоний макрофагов человека (M-CSF) и 10 нг / мл человеческого IL-4. Затем изолированные моноциты (3e5 на лунку) высевали в 24-луночный планшет с конечным объемом 750 мкл.

Через два дня после посева среду для культивирования клеток полностью аспирировали и заменяли свежей полной средой, содержащей 100 нг / мл человеческого M-CSF и 10 нг / мл человеческого IL-4. Двумя днями позже (на 4 день) в лунку добавляли 500 мкл полной среды, содержащей цитокины, на 48 часов. На 6 день среду для культивирования клеток полностью аспирировали и заменяли свежей полной средой без цитокинов или средой, содержащей культуры штаммов S. typhimurium в лог-фазе при MOI 20.

Клетки инфицировали в течение 1 часа. затем промывали PBS и среду заменяли свежей средой, содержащей 50 пг / мл гентамицина для уничтожения внеклеточных бактерий. Затем лунки промывали и заменяли свежей средой и позволяли инкубироваться при 37 ° C и 5% CO2. Через 48 часов супернатанты собирали и анализировали на цитокины с использованием набора цитометрических гранул человеческого IL-6 (CBA) в соответствии с инструкциями производителя (BDBiosciences).

Результаты демонстрируют, что уровни секретируемого IL-6 из первичных макрофагов M2 человека, инфицированных родительским штаммом YS1646, составляли в среднем 14839 ± 926 пг / мл, в то время как уровни IL-6 из штамма YS 1646Aasd / AFLG были значительно ниже, 2075 ± 723 пг / мл (p = 0,004). Это дополнительно подтверждает влияние, которое делеция флагелл и устранение передачи сигналов TLRS оказывает на индукцию IL-6. Штамм YS1646Aasd / AFLG / ApagP вызывал самые низкие уровни IL-6, 332 ± 100 пг / мл, демонстрируя пониженную способность этого модифицированного покрытия

LPS стимулировать TLR4 и, как следствие, резко сниженную продукцию воспалительного IL-6.

Комбинированные делеции флагелл и pagP значительно повышают переносимость у мышей

Чтобы показать, что модифицированные штаммы, описанные выше, более аттенуированы, чем родительский штамм YS1646, было проведено исследование средней летальной дозы (LD_{50}). 6-8-недельным мышам B ALB / c (5 мышей в группе) внутривенно вводили дозу от 3e5 до 3e7 КОЕ штамма YS1646 или производных штаммов YS 1646 Aasd / AFLG, YS1646 Aasd / ApagP и YS 1646 Aasd / AFLG / ApagP. В отличие от штамма YS1646 производные штаммы также несли плазмиду, кодирующую мышиный IL-2, цитокин, одобренный FDA, который продемонстрировал значительную токсичность при системном введении.

Было обнаружено, что LD_{50} для штамма YS1646 составляет 4,4 x 10^6 КОЕ (среднее значение двух исследований), что соответствует ранее опубликованным отчетам о LD_{50} для YS1646, и более чем в 1000 раз выше по сравнению с S. typhimurium дикого типа (Clairmont и др. (2000) J. Infect. Dis. 181: 1996-2002). Было определено, что LD_{50} для штамма YS1646Aasd / AFLG составляет 2,07 x 10^7 КОЕ, демонстрирующие более чем 4,5-кратное снижение вирулентности по сравнению со штаммом YS1646.

Было определено, что LD_{50} для штамма YS1646 Aasd / ApagP составляет 1,39 x 10^6 КОЕ, что демонстрирует снижение вирулентности в 3,2 раза, что ожидается, учитывая, что у штамма все еще есть сильно воспалительные флагеллы. LD_{50} для штамма YS1646Aasd / AFLG / ApagP не может быть установлен, так как ни одна мышь не погибла при введенной максимальной дозе, но была> 6,2 × 10^7 КОЕ.

Таким образом, штамм YS1646Aasd /AFLG / ApagP демонстрирует> 14-кратное снижение вирулентности по сравнению с родительским штаммом YS1646. Эти данные демонстрируют, что описанные выше генетические модификации снижают вирулентность клинического S.typhimurium YS1646, и, следовательно, приводят к повышенной переносимости у человека.

В клиническом испытании фазы I VNP20009 (Tosoetal. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (1): 142-152) присутствие бактерий в опухолях пациентов наблюдалось лишь частично при двух самых высоких протестированных дозах, 3 x 10^8 КОЕ / м ^{2} (присутствие 33%) и 1 x 10^9 КОЕ / м ^{2} (присутствие 50%), что указывает на то, что переносимая доза VNP20009 была слишком низкой для достижения колонизации опухоли. Путем

улучшения переносимости штаммов посредством описанных выше модификаций, при необходимости можно вводить более чем в 14 раз более высокие дозы, улучшая процент пациентов, чьи опухоли будут колонизированы, и повышая уровень терапевтической колонизации на опухоль, тем самым решая наблюдаемые проблемы с VNP20009.

Комбинированные делеции флагелл и PagP существенно ограничивают генерацию Anti-S. typhimurium антител у мышей

Выживших мышей из группы дозирования 3 x 10^6 КОЕ (N = 5, за исключением N = 4 в группе дозирования YS1646) содержали в течение 40 дней после внутривенного введения, после чего у них брали кровь на сыворотку и оценивали титры антител к S. typhimurium с помощью модифицированной проточной системы титрования антител.

Ночные культуры штамма YS 1646Aasd / AFLG-mCherry промывали и фиксировали фиксирующим буфером для проточной цитометрии. Сыворотки от ранее обработанных мышей и от исходных контрольных мышей высевали в 96-луночный планшет и проводили серийные разведения в PBS. Затем 25 пл культур YS 1646Aasd / AFLG-mCherry, содержащих 1 x 10^6КОЕ добавляли к сывороткам и инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре. Затем бактерии дважды промывали PBS, вращая их со скоростью 4000 об / мин в течение 5 минут. После последней промывки бактерии ресуспендировали в PBS, содержащем вторичное козье антитело против мыши FcAF488 Ab (разведение 1/400 от исходного раствора), и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Затем бактерии трижды промывали PBS, вращая их со скоростью 4000 об / мин в течение 5 минут. После последней промывки бактерии ресуспендировали в PBS, и данные получали с помощью проточного цитометраNovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и анализировали с помощью программного обеспечения MFIFlowJo ™ (TreeStar, Inc.).

Для оценки результатов с помощью проточной цитометрии было выбрано наивысшее разведение с сигналом во всех группах (1250-кратное разведение сыворотки) и построены соответствующие значения средней интенсивности флуоресценции (MFI). Предел обнаружения (LOD) был выбран при MFI, равном 1000, поскольку это MFI, полученный без окрашивания, а также с фоновым окрашиванием только козьими антителами против мыши FcAF488. Следовательно, значение MFI больше

1000 считалось положительным сигналом, а все, что равнялось или меньше этого значения, считалось отрицательным результатом, несмотря на наличие значения MFI.

Результаты этого анализа показывают высокий титр MFI анти-S. typhimurium сывороточных антител мышей, получавших 3 x 10^6 КОЕ штамма YS1646 (29196,3 ± 20730), в соответствии с ранее опубликованными данными о том, что YS 1646 способен генерировать сывороточные антитела (которые не нейтрализуют). Меньшее количество антител было обнаружено у мышей, обработанных штаммом YS1646 Aasd/AFLG (11257 ± 9290), что может быть связано с отсутствием адъювантной активности со стороны флагелл. У мышей, получавших штаммYS1646 Aasd / ApagP было образовано значительно меньше антител (4494 ± 3861) по сравнению со штаммом YS1646 (p = 0,033), что может быть связано с изменением покрытия поверхности LPS.

Наиболее значительное снижение уровня сывороточных антител было продемонстрировано в группе обработки YS1646Aasd / AFLG / ApagP (1930 ± 2445), где у нескольких мышей титры MFI были ниже 1000, и поэтому они считались отрицательными по сывороточным антителам (p = 0,021, vs. штамм YS1646). Таким образом, комбинированные делеции флагелл и гена pagP обеспечивают повышенную безопасность, а также значительно снижают иммуногенность, что делает возможным повторное введение высоких КОЕ людям.

Штаммы с удаленными pagP и флагеллами, и их комбинация демонстрируют значительно более высокую жизнеспособность в сыворотке крови человека по сравнению с YS1646

Штамм YS1646 (VNP20009) демонстрирует ограниченную колонизацию опухолью у людей после системного введения. Здесь показано, что штамм YS1646 инактивирован факторами комплемента в крови человека. Чтобы продемонстрировать это, штаммы YS1646 и E. coli DI0B сравнивали с типичными иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе, которые содержат дополнительные мутации, которые изменяют поверхность бактерий. Этими типичными модифицированными штаммами были YS1646 Aasd / ApagP, YS1646Aasd / AFLG и YS1646Aasd / AFLG / ApagP.

Эти три штамма, в дополнение к культурам YS1646 и E. coli DI0B, инкубировали с сывороткой или инактивированной нагреванием (HI) сывороткой либо из объединенной крови мышей, либо из объединенных здоровых доноров-людей (n = 3) в течение 3 часов при 37 ° C. C. После инкубации с сывороткой бактерии серийно разводили и высевали на чашки с агаром LB и определяли колониеобразующие единицы (КОЕ).

В сыворотке мышей все штаммы оставались 100% жизнеспособными и были полностью устойчивы к инактивации комплемента. В сыворотке человека все штаммы были на 100% жизнеспособны в сыворотке, инактивированной нагреванием. Штамм E. coli DI0B полностью элиминировался через 3 часа в цельной сыворотке человека. В цельной сыворотке человека штамм YS1646 показал только 6,37% живых колоний, демонстрируя, что колонизация опухолью клинического штамма YS1646 была ограничена из-за инактивации комплемента в крови человека. Для штамма YS1646Aasd / AFLG осталось 31,47% живых колоний, а для штамма YS1646 Aasd / ApagP осталось 72,9% живых колоний после инкубации с сывороткой человека в

течение 3 часов. Комбинированный штамм YS1646Aasd / AFLG / ApagP был полностью устойчив к комплементу в сыворотке крови человека.

Эти данные объясняют, почему штамм YS1646 (VNP20009) имеет очень низкую колонизацию опухолью при системном введении.

Здесь показано, что штамм YS1646 очень чувствителен к инактивации комплемента в сыворотке крови человека, но не сыворотки мыши. Эти данные объясняют, почему у людей наблюдалась ограниченная колонизация опухолями, в то время как опухоли мышей были колонизированы на высоком уровне. Делеции fljB / fliC или pagP или комбинация этих мутаций частично или полностью устраняют этот фенотип. Таким образом, повышенная стабильность, наблюдаемая в сыворотке человека с YS1646 Aasd / ApagP, YS1646Aasd / AFLG и YS1646Aasd / AFLG / ApagP обеспечивает повышенную колонизацию опухолей человека.

Эти и другие данные, представленные в данном документе, показывают, что делеция флагелл и / или pagP увеличивает колонизацию опухоли, улучшает переносимость и увеличивает противоопухолевую активность иммуностимулирующих бактерий. Например, здесь показано, что LPS из иммуностимулирующих бактерий, которые индуцируют pagP- в 22 раза меньше IL-6, чем LPS из YS1646, являются менее воспалительными в клетках человека. Кроме того, все без исключения мутанты с делецией FLG, hilA и pagP более аттенуированы, чем YS1646 (см. Пример 12 ниже). Иммуностимулирующие бактерии, такие как штаммы Salmonella, включая штаммы дикого типа, которые являются одним или обоими с делецией флагеллина и pagP, проявляют свойства, которые увеличивают колонизацию опухоли / микроокружения опухоли и повышают противоопухолевую активность.

Такие штаммы могут быть использованы для доставки терапевтического продукта, такого 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 и другие свойства, как описано в другом месте в настоящем документе. Полученные штаммы более эффективно нацелены на микроокружение опухоли / опухоль благодаря модификациям, которые изменяют инфекционность, токсичность для определенных клеток и потребность в питании, такие как ауксотрофия пуринов, которые содержатся в среде опухоли.

Пример 12

Мутанты с делецией FLG и PagP более аттенуированы, чем YS1646, у мышей.

Чтобы определить, являются ли модифицированные штаммы, описанные выше, более аттенуированными, чем YS1646, было проведено исследование средней летальной дозы (LD_{50}). Мышам C57BL / 6 внутривенно вводили возрастающие концентрации YS1646, FLG / ASD (pATI-TREX1), HilA / ASD (pATI-TREX1) или PagP / ASD (pATI-TREX1). Было обнаружено, что LD_{50} для YS1646 составляет $1,6 \times 10^6$ КОЕ, что согласуется с опубликованными отчетами об этом штамме. LD_{50} для HilA / ASD (pATI-TREXI) штамма был определен как $5,3 \times 10^6$ КОЕ, демонстрируя 3-кратное снижение вирулентности. Было определено, что LD_{50} для штамма PagP / ASD (pATI-TREX1) составляет $6,9 \times 10^6$ КОЕ, что свидетельствует о 4-кратном снижении вирулентности.

Было определено, что штамм FLG / ASD (pATI-TREX1) имел> 7×10^6 КОЕ, демонстрируя> 4,4-кратное снижение вирулентности по сравнению с YS1646. Эти данные показывают, что описанные выше генетические модификации снижают вирулентность терапии S. typhimurium и приведут к повышенной переносимости у людей. В клиническом испытании фазы I VNP20009 (Tosoetal. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (1): 142-152) присутствие бактерий в опухолях пациентов наблюдалось лишь частично при двух самых высоких тестированных дозах, 3E8 КОЕ / м ^{2} (присутствие 33%) и 1E9 КОЕ / м ^{2}(присутствие 50%), что указывает на то, что переносимая доза VNP20009 была слишком низкой для достижения колонизации. Путем улучшения переносимости штаммов посредством описанных выше модификаций можно вводить более высокие дозы, чем VNP20009. Это улучшает процент пациентов, у которых будут колонизированы опухоли, и уровень терапевтического воздействияколонизации на опухоль.

Пример 13

Иммуномодулирующие штаммы S. typhimurium демонстрируют экспрессию гетерологичных белков в моноцитах человека

Как описано выше, ген hilA и гены флагеллинafljB и fliC были удалены из штамма YS1646 S. typhimurium с удаленным геном asd, в результате чего были получены штамм HilA / ASD и штамм FLG / ASD, соответственно. Кроме того, штамм FLG / ASD был дополнительно модифицирован для экспрессии белка листериолизина O

(LLO), лишенного сигнальной последовательности, которая накапливается в цитоплазме штамма Salmonella (FLG / ASD / cLLO). Эти штаммы подвергали электропорации с плазмидой, содержащей кассету экспрессии для промотора EF-la и мышиного цитокина IL-2. Кроме того, штамм FLG / ASD подвергали электропорации с плазмидой экспрессии для IL-156 в качестве контроля для не родственного цитокина. Дополнительные конструкции были созданы с использованием промотора CMV.

Чтобы определить, могут ли эти штаммы, содержащие экспрессионные плазмиды, инфицировать человеческие моноциты и индуцировать выработку ими мышиного IL-2, человеческие моноцитарные клетки THP-1 высевали в дозе 50000 клеток / лунку в RPMI + 10% NuSerum (Gibco) за один день до заражения. Клетки были инфицированы при MOI 50 для одного часав RPMI, затем 3 раза промывали PBS и ресуспендировали в RPMI + 100 мкг/ мл гентамицина (Sigma). Супернатанты собирали через 48 часов из 96-луночного планшета и оценивали концентрацию мышиного IL-2 с помощью ELISA (R&D Systems). Концентрация IL-2, обнаруженная в контрольных лунках FLG / ASD-IL155, оказалась очень низкой, как и ожидалось, и, вероятно, отражает некоторую перекрестную реактивность с эндогенным человеческим IL-2 (6,52 пг / мл). Напротив, штамм FLG / ASD-IL-2 индуцировал в среднем 35,1 пг / мл, а у штамма FLG / ASD / cLLO - 59,8 пг / мл. Самые высокие уровни были обнаружены в штамме HilA / ASD-IL-2, 103,4 пг / мл. Эти данные демонстрируют возможность экспрессии и секретирования функциональных гетерологичных белков, таких как IL-2, из штаммов платформы иммуномодулятора S. typhimurium.

Пример 14

Заражение клеток мутантом AhilA снижает инфицирование эпителиальных клеток человека

Чтобы продемонстрировать, что штаммы S. typhimurium с удаленным hilA обладают пониженной способностью инфицировать эпителиальные клетки, клетки карциномы шейки матки HeLa инфицировали следующими штаммами S. typhimurium: YS1646, YS 1646Aasd и YS 1646 Aasd / AhilA, содержащими плазмиды, кодирующие функциональные asd-ген для поддержания плазмиды. 1x10 ^{6} клеток HeLa помещали в 24-луночный планшет с DMEM и 10% FBS. Клетки инфицировали культурами S. typhimurium в лог-фазе в течение 1 часа, затем клетки промывали PBS и среду заменяли средой, содержащей 50 мкл / мг гентамицина, для уничтожения внеклеточных бактерий. Через 4 часа монослои клеток HeLa промывали PBS и

лизировали 1% буфером для лизиса Triton X 100 для высвобождения внутриклеточных бактерий. Лизаты серийно разводили и высевали на чашки с агаром LB для количественного определения внутриклеточных бактерий. Штамм с делецией hilA имел 90% снижение восстановленных КОЕ по сравнению со штаммами с функциональным геном hilA, демонстрируя, что делеция hilA значительно снижает инфицирование S. typhimurium клеток, происходящих из эпителия.

Пример 15

Заражение клеток мутантами AhilA или AfljB / fliC снижает уровень пироптоза у человеческих макрофагов

Чтобы продемонстрировать, что у штаммов S. typhimuriumAhilA или AfljB / AfliC снижена их способность вызывать гибель клеток в макрофагах, клетки макрофагов человека THP-1 были инфицированы следующими штаммами S. typhimurium: YS1646 и YS 1646Aasd,YS1646 Aasd / AfljB / AfliC и YS1646 Aasd / AhilA, содержащими плазмиды, кодирующие функциональный ген asd для обеспечения поддержания плазмиды. 5×10^4 клеток помещали в 96-луночный планшет с DMEM и 10% FBS.

Клетки инфицировали промытыми культурами S. typhimurium в лог-фазе в течение 1 часа при MOI 100 КОЕ на клетку, затем клетки промывали PBS и среду заменяли средой, содержащей 50 / ммг гентамицина, для уничтожения внеклеточных бактерий, и 50 нг / мл гамма-интерферона. Через 24 часа клетки THP-1 окрашивали CellTiter-Glo ®реагент (Promega), и процент жизнеспособных клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток с использованием планшет-ридера SpectraMax® для количественной оценки люминесценции. Клетки, инфицированные штаммом с делецией hilA, имели приблизительно 72% жизнеспособных клеток, тогда как клетки, инфицированные YS1646, имели жизнеспособность только 38%, демонстрируя, что делеция hilA предотвращает гибель клеток макрофагов человека. Клетки, инфицированные штаммами, содержащими плазмиду YS 1646Aasd, YS 1646 Aasd / AfljB / AfliC, имели жизнеспособность 40% и 51% соответственно, что указывает на то, что делеция генов флагеллина также предотвращает гибель клеток макрофагов человека.

Пример 16

Заражение макрофагов человека иммуностимулирующим штаммом S. typhimurium, содержащим плазмиду, кодирующую кассету экспрессии IL-2, приводит к секреции IL-2

Человеческие макрофаги THP-1 были инфицированы следующими S.typhimurium: YS 1646 Aasd / AfljB / AfliC, YS1646Aasd-cytoLLO и YS 1646Aasd / AhilA, содержащими плазмиды, кодирующие кассету экспрессии для мышиного IL-2 под эукариотическим промотором, и функциональный ген asd для обеспечения поддержания плазмиды.

5×10^4 клеток помещали в 96-луночный планшет с DMEM и 10% FBS. Клетки инфицировали промытыми культурами S. typhimurium в лог-фазе в течение 1 часа при MOI 50 КОЕ на клетку, затем клетки промывали PBS и среду заменяли средой, содержащей 50 мкг / мл гентамицина, для уничтожения внеклеточных бактерий. Через 48 часов клеточные супернатанты удаляли и тестировали на IL-2 мыши с использованием набора R&D Systems ™ Mouse IL-2 Quantikine® ELISA Kit.

Оставшиеся клетки окрашивали CellTiter-Glo ®реагентом (Promega), и процент жизнеспособных клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток с использованием планшет-ридера SpectraMax® для количественной оценки люминесценции. Штаммы YS1646Aasd / AfljB / AfliC, YS 1646Aasd-cytoLLO и YS1646 Aasd / AhilA, содержащие плазмиды, кодирующие кассету экспрессии для мышиного IL-2, экспрессировали 35 пг / мл, 60 пг / мл и 103 пг / мл IL-2, соответственно.

Пример 17

Штаммы S. typhimurium, экспрессирующие мышиный IL-2, демонстрируют сильное подавление роста опухоли invivo

Иммуностимулирующие штаммы S. typhimurium, содержащие делеции в hilA или генах флагеллинafljB и fliC в штамме YS1646 S. typhimurium, были объединены с делецией гена asd с образованием штаммов Aasd / AhilA и Aasd / AfljB /AfliC соответственно. Эти штаммы подвергали электропорации с плазмидой, содержащей кассету экспрессии для промотора EF1a и мышиного цитокина IL-2.

Чтобы показать, что штаммы S. typhimurium, содержащие плазмиды экспрессии IL-2, вызывают противоопухолевую эффективность, штаммы Aasd / AhilA, содержащие плазмиду muIL-2, или штаммы Aasd / AfljB / AfliC, содержащие плазмиду muIL-2, сравнивали с контрольным носителем. Самкам мышей C57BL / 6 в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки MC38 (5×10^5 клеток в 100 мкл PBS). Мышам с установленными боковыми опухолями на 8 день внутривенно вводили 5×10^5 КОЕ Aasd/AhilA (pATI-muIL-2), Aasd / AfljB / AfliC

(pATI-muIL-2) или контрольный носитель PBS. Вес тела и опухоли измеряли дважды в неделю. Измерения опухолей проводились с помощью электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывали по модифицированной формуле эллипсоида, 1/2 (длина x ширина ^{2}). Мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал> 20% веса тела или становился некротическим, в соответствии с правилами IACUC.

Эксперимент продемонстрировал, что штамм Aasd / AhilA (pATI-muIL-2) вызывал значительный контроль опухоли по сравнению с PBS (P = 0,003, D21). Эти данные были сопоставимы с данными, полученными для штамма Aasd / AfljB / AfliC (pATI-muIL-2), который также продемонстрировал значительное ингибирование роста опухоли по сравнению с PBS (P = 0,005, D21). Таким образом, оба штамма демонстрируют способность экспрессированного IL-2 эффективно ингибировать рост опухоли на модели колоректальной карциномы.

Пример 18

Разработка и характеристика штамма Salmonella с нокаутом гена csgD

Конструирование штамма *AcsgD*

Ген ansB, кодирующий L-аспарагиназуII, был удален из штамма YS1646 Aasd/AFLG /ApagP с использованием модификаций методов, описанных в предыдущих примерах. Синтетические последовательности плеч гомологии гена ansB, которые содержат 236 и 251 основание левой и правой последовательности, соответственно, фланкирующих ген ansB, были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0230 (SEQIDNO: 377). Кассета гена канамицина, фланкированная сайтами cre / loxP, затем была клонирована в pSL0230, и кассета для нокаута гена ansB была амплифицирована с помощью ПЦР с праймерамиansb-1 (SEQIDNO: 372) и ansb-2 (SEQIDNO: 373), очищена на геле. и введена в штамм YS1646Aasd, несущий термочувствительную плазмиду рекомбинации лямбда-красного pKD46, путем электропорации. Затем ген устойчивости к канамицину был излечен с помощью cre-опосредованной рекомбинации, как описано выше. и термочувствительные плазмиды обрабатывали путем выращивания при недопустимой температуре. Нокаутные последовательности гена ansBамплифицировали с помощью PCR с использованием праймеровansb-3 (SEQIDNO: 374) и ansb-4 (SEQIDNO:

375) (см. Таблицу 1) и подтверждали секвенированием ДНК. Полученное мутантное производное YS 1646 было обозначено *YS1646AasdIAFLGIApagPlAansB.*

Штамм YS1646Aasd/AFLG / ApagP / AansB был дополнительно модифицирован для удаления csgD, главного гена, который контролирует образование фимбрийS. typhimuriumcurli, продукцию целлюлозы и продукцию c-di-GMP. Делеция csgD устраняет возможность опосредованного целлюлозой образования биопленок, снижает провоспалительную передачу сигналов и увеличивает захват фагоцитарными клетками хозяина. Это увеличение внутриклеточной локализации могло бы, таким образом, повысить эффективность доставки плазмиды и продукции иммуномодулирующего белка.

Конструирование штамма *AcsgD*

Ген csgD был удален из штамма YS1646Aasd/AFLG/ApagP/AansBc использованием модификаций методов, описанных в предыдущих примерах.Синтетические последовательности плеч гомологии гена csgD, содержащие 207 и 209 оснований левой и правой последовательности, соответственно, фланкирующие ген csgD, были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0196 (SEQIDNO: 316). Кассетагенаканамицина, фланкированнаясайтамиcre / loxP, затембылаклонированав pSL0196, акассетадлянокаутагенаcsgDамплифицирована PCR спраймерами csgd-1 (SEQ ID NO: 317) и csgd-2 (SEQ ID NO: 318), очищенанагеле.ивведенавштаммYS1646Aasd, несущийтермочувствительнуюплазмидурекомбинациилямбда-красного pKD46 путемэлектропорации. Затем ген устойчивости к канамицину обрабатывали cre-опосредованной рекомбинацией, как описано выше, и термочувствительные плазмиды обрабатывали путем роста при недопустимой температуре. Нокаутные последовательности гена csgDамплифицировали с помощью PCR с использованием праймеровcsgd-3 (SEQIDNO: 319) и csgd-4 (SEQIDNO: 320) и подтверждали секвенированием ДНК. Полученное мутантное производное родительского штамма YS1646 было обозначено*YS16466,asdIAFLGIApagPlAansBlAcsgD.*

Информация о последовательности праймера

Имя	Последовательность	SEQ ID NO
csgd-1	cacttgctttaagatttgtaatggctag	317
csgd-2	ggtgtattcgctttcccatttgtc	318
csgd-3	tgtgctgtccaggttaatgcc	319
csgd-4	gacgacggttttctcgaagtctc	320

Способность образовывать колонии RoughDryAndRed (RDAR) после роста в чашках CongoRed- это хорошо проверенный тест на образование бактериальной биопленки. Шероховатая и сухая текстура возникает в результате производства целлюлозы, а красный цвет - из-за накопления пигмента поверхностными структурами завитков и фимбрий. Для этого анализа штамм YS1646Aasd / AFLG/ApagP / AansB сравнивали со штаммом YS 1646 Aasd / AFLG/ApagP / AansB / AcsgD на способность формировать фенотип RDAR после инкубации на чашках с агаром CongoRed.

Были приготовлены чашки с агаром CongoRed (Конго Красный) с сойтоном (10 г / л) и дрожжевым экстрактом (5 г / л) (модифицированный LB без NaCl) и дополнены Конго красным (40 мг / л) и Кумасси бриллиантовым синим G-250 (20 мг / л). Пять микролитров бактериальной культуры стационарной фазы наносили на чашки с CongoRed и инкубировали при 37 ° C в течение 16 часов, затем переносили до 30 ° C и инкубировали в течение дополнительных 120 часов. Визуальный анализ морфологии и цвета колонии выполнялся и регистрировался ежедневно для подтверждения наличия или отсутствия морфотипа колонии RDAR.

При сравнении морфотипов колоний двух штаммов,штамм YS 1646 Aasd / AFLG / ApagP / AansB / AcsgD имел гладкий фенотип, а в колониях отсутствовал пигмент. Для сравнения, штамм YS1646Aasd / AFLG / ApagP / AansB, все еще содержащий ген csgD, демонстрировал классический грубый и сухой внешний вид и явное свидетельство поглощения пигмента. Таким образом, функциональный анализ подтверждает, что штамм AcsgD не может образовывать биопленки.

Штаммы с удаленным csgD демонстрируют превосходную противоопухолевую эффективность на мышиной модели тройного отрицательного рака молочной железы с высокой резистентностью

Было оценено влияние делеции csgD на модели, где иммуностимулирующая бактериальная терапия колонизирует опухоли, но показала ограниченную эффективность. Это может указывать на присутствие продуцируемой бактериями целлюлозы, которая может ограничивать поглощение опухолерезидентными миелоидными клетками, тем самым ограничивая терапевтический эффект (Crulletal. (2011) CellularMicrobiology 13 (8): 1223-1233). Была использована трудно поддающаяся лечению модель EMT6, которая является репрезентативной моделью тройного отрицательного рака груди человека (Yuetal. (2018) PLoS ONE 13 (11): e0206223). Когда опухолевые клетки EMT6 вводятся ортотопически в жировую подушку молочной железы, а не подкожно в бок, модель исключает Т-клетки, имеет высокую метастатичность и очень резистентна к иммунотерапии, в том числе ко всем утвержденным антителам контрольных точек (Mariathasanetal. (2018) Nature 554: 544-548).

Для этого эксперимента самкам мышей BALB / c в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) инокулировали в жировую подушечку левой молочной железы опухолевые клетки EMT6 (2×10^5 клеток в 100 пл PBS). Мышам с установленными опухолями молочной железы 13-дневного возраста (~ 55 мм ^{3}) внутривенно вводили однократную дозу 1×10^7 КОЕ штамма с удаленным csgD YS 1646 Aasd / AFLG / ApagP/AansB / AcsgD или родительский

YS1646Aasd / AFLG / ApagP / AansB и сравнивали с контролем PBS. Бактериальные штаммы содержали плазмиду, экспрессирующую конститутивно активный мышиный STING (EFla muSTING R283G, подробности см. в примерах ниже).

Опухоли у мышей, получавших PBS, росли равномерно, достигая максимального объема опухоли на 35 день (1199,0 ± 298,1 мм ^{3}). Мыши, получавшие csgD-интактный штамм, YS1646Aasd / AFLG / ApagP / AansB, не продемонстрировали доказательств противоопухолевой эффективности в этой модели, также достигнув максимального объема опухоли на 35 день (1689,1 + 537,0). Посев этих опухолей exvivo на LB показал, что все опухоли колонизированы. Однако штамм с удаленным csgD, YS1646Aasdl *AFLGI ApagPIAansB/AcsgD* , привел к полному излечению 3 из 5 мышей как от их основного, так и от любых метастатических заболеваний (день 60+). Общий TGI составил 45,7%, при этом одна из двух других опухолей частично отреагировала, прежде чем в конечном итоге выросла. Два бактериальных штамма содержали одинаковую плазмидную нагрузку, но только один продемонстрировал значительную эффективность. Таким образом, в одной из наиболее трудноизлечимых и высокометастатических моделей сингенной опухоли, ортотопической EMT6, штамм

с делецией csgD был способен вызывать системную противоопухолевую эффективность и приводить к полному ответу на 60%.

Штаммы с удаленным csgD демонстрируют повышенное внутриклеточное поглощение invivo

Чтобы определить, продемонстрировал ли штамм с удаленным csgD улучшенную эффективность из-за большего бактериального поглощения опухолерезидентными миелоидными клетками, был проведен анализ защиты гентамицина exvivo (см. Crulletal. (2011) CellularMicrobiology 13 (8): 1223—1233). Для этого эксперимента самкам мышей C57BL/ 6 в возрасте 6-8 недель (4 мыши в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки MC38 (5×10^5 клеток в 100 мл PBS). Мышам, несущим большие установившиеся опухоли на боках, на 17-й день внутривенно вводили 1×10^7 КОЕ штамма YS1646AasdIAFLGIApagP1 *AansB/AcsgD* с удаленным csgD (N = 12) или родительский штамм YS1646 (N = 4). Опухоли резецировали через 7 дней после внутривенного введения, взвешивали и измельчали в RPMI с добавлением 1 мг / мл коллагеназы IV и 20 мг / мл ДНКазы I и инкубировали при встряхивании при 37 ° C в течение 30 минут для получения суспензии отдельных клеток. Через 30 минут суспензию пропускали через фильтр диаметром 70 мм, и извлеченный объем разделяли на два отдельных идентичных образца. Гентамицин (ThermoFisherScientific) добавляли в концентрации 200 мг / мл к одному из каждого из парных образцов для уничтожения внеклеточных бактерий, и образцы инкубировали при встряхивании при 37 ° C в течение 90 минут. Затем образцы клеточной суспензии промывали и лизировали 0,05% тритоном X и высевали на чашки для определения КОЕ.

Результаты демонстрируют, что по сравнению с КОЕ опухолей, обработанных YS 1646 без лечения гентамицином (11925 ± 19859 КОЕ), лечение гентамицином привело к очень небольшому количеству КОЕ, обнаруженных в опухолях (51 ± 45 КОЕ). Это указывает на то, что бактерии обитают в этих опухолях в значительной степени внеклеточно и, таким образом, чувствительны к элиминации гентамицина. В штамме с удаленным csgD YS1646 Aasd / AFLG / ApagP / AansB / AcsgD опухоли, не обработанные гентамицином, дали высокие КОЕ, как и ожидалось от хорошо колонизированных опухолей, а лечение гентамицином дало меньше КОЕ (1276 ± 2410 КОЕ) и намного больше, чем в опухоли, обработанные родительским штаммом YS1646. Это связано с тем, что большее количество бактерий с удаленным csgD находится внутри клетки и, таким образом, защищено от гентамицина. Эти данные демонстрируют, что делеция csgD улучшает внутриклеточное поглощение

бактериями, что может усиливать плазмидную доставку иммуномодулирующих белков invivo.

Пример 19

Конструирование плазмид

Была сконструирована и синтезирована плазмида, обозначенная pATI-1,75; она содержит следующие признаки: начало репликации pBR322, ген asd, ген устойчивости к канамицину, фланкированный сайтами HindIII для лечения, и сайт мультиклонирования для вставки кассеты экспрессии. Вектор был обозначен pATI-1.75. Кассета экспрессии состоит из множества элементов, включая эукариотические промоторы, открытые рамки считывания, посттранскрипционные регуляторные элементы и сигналы полиаденилирования, которые собраны в различных конфигурациях.

Типичные промоторы включают промотор цитомегаловируса человека (CMV), кодируемый непосредственно ниже последовательности энхансера CMV, и промотор фактора элонгации-1 альфа (EF-la). Открытые рамки считывания (ORF) могут включать одну или несколько последовательностей, каждая из которых транслируется в белок, и могут быть разделены на отдельные полипептиды путем вставки последовательности 2A, в результате чего эукариотические рибосомы не могут вставить пептидную связь между остатками Gly и Pro в пределах 2A последовательности. Примерами последовательностей 2A являются пептид T2A из капсидного белка вируса Thoseaasigna (TaV) и пептид P2A из тешовируса свиньи (PTV). Сайты расщепления фурина выше (RRKR) и другие элементы энхансера размещаются выше, чтобы облегчить расщепление экспрессируемых белков.

Примеры посттранскрипционных регуляторных элементов (PRE) включают PRE вируса флепатита сурка (WPRE) и PRE вируса гепатита B (HPRE), которые увеличивают накопление цитоплазматической мРНК гена, способствуя ядерному экспорту мРНК в цитоплазму, увеличивая 3 ' конец обработки и стабильности. Примеры сигнальных последовательностей полиаденилирования включают сигнал полиаденилирования SV40 и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста, оба из которых являются 3'-регуляторными элементами, которые служат для стимуляции терминации транскрипции и содержат звено последовательности, распознаваемое комплексом расщепления РНК.

Пример 20

Идентификация мутаций с усилением функции в генах, способствующих интерферонопатии

Случаи субъектов, поступающих с тяжелыми аутовоспалительными состояниями и васкулопатиями неизвестной этиологии, часто возникают в результате мутаций. Причину этих состояний можно определить. Шаги по выявлению мутационной основы такой патологии заключаются в следующем. На первом этапе интактная геномная ДНК получается у пациентов, испытывающих симптомы, и у здоровых людей. Выполняется полное секвенирование экзома, затем анализируются интроны и экзоны. Выполняется анализ генов и идентификация мутаций в продуктах путей, связанных с экспрессией интерферона I типа (IFN). В таблице ниже (и в подробном описании) перечислены мутации в генах, которые, как известно, приводят к конститутивной функциональной активации кодируемых белков и последующей устойчивой экспрессии IFN типа I. После выявления мутаций сДНК, кодирующей полноразмерный ген, с идентифицированной мутацией (ами) или без нее, трансфицируют в линию репортерных клеток, которая измеряет экспрессию IFN типа I. Например, может быть создана линия репортерных клеток, в которой экспрессия люциферазы находится под контролем промотора IFN-13.

Мутант с усилением функции, который является конститутивно активным, будет способствовать экспрессии IFN-13, тогда как нестимулированный белок дикого типа (WT) - нет. В случае известных мутантов STING SAVI (STING-ассоциированная васкулопатия с началом в младенчестве) для стимуляции WT-STING IFN-13 требуется добавление повышающихся экзогенных уровней cGAMP для непосредственной активации WT-STING. Конститутивно активные мутации стимулируют экспрессию IFN-13 независимым от cGAMPобразом.

Примеры мутаций с усилением функции в каждом из STING, RIG-I, MDAS, IRF3 и IRF7 приведены ниже. Другие такие гены, в которых мутации с усилением функции могут быть идентифицированы у субъектов или получены с помощью мутаций и скрининга invitro, включают, но не ограничиваются ими, STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, и SNRNP200.

Мутации с усилением функции, приводящие к стойкой экспрессии IFN типа I

STIN	RIG-I	MDA	IRF3	IRF7
V147L	E373	T3311	S396D	S477D/S479D
N154S	C268	T331	S396D/S398	S475D/S476D/S477D/S479D/S483

STIN	RIG-I	MDA5	IRF3	IRF7
V155		A489T	S396D/S398 D/	A247-467
G166E		R822Q		S475D/S477D/S479D
C206Y		G821S		
G207E		A452T		
R281Q		A946T		
R284G		R337G		
R284S		D393V		
R284		G495R		
R284K		R720Q		
R284T		R779H		
S102P,		R779C		
R197A,		L372F		
S272A,				
R310A		E316A		
E316A				
E316N				
E316Q				
S272A				
R375A				
R293A, T294A.				
D231				
R232A				
K236				
Q273				
S358A, E360A.				
D231A. R232A,				
R238A				
V147				
S324A,				

Аминокислотные остатки R197, D205, R310, R293, T294, E296, S272, Q273, E316, D231, R232, K236, S358, E360, S366 и R238 со ссылкой на последовательность STING человека, как указано в SEQ. ID No: 305-309, соответствуют аминокислотным остаткам R196, D204, R309, R292, T293, E295, S271, Q272, E315, D230, R231, K235, S357, E359, S365 и R237, соответственно, со ссылкой на последовательность мышиного STING, как указано в SEQ ID NO: 351.

Также включены консервативные замены каждой из замен (см. Таблицу в разделе определений, в которой перечислены примеры консервативных мутаций для каждой аминокислоты, т.е. Ser на Ala, где дикий тип не является Ser).

После идентификации мутаций кДНК, кодирующая полноразмерный ген, с идентифицированной мутацией (ами) и без нее, трансфицируют в линию репортерных клеток, которая измеряет экспрессию IFN типа I. Например, может быть создана линия репортерных клеток, в которой экспрессия люциферазы находится под контролем промотора IFN-13.

Мутант с усилением функции (GOF), который является конститутивно активным, будет способствовать экспрессии IFN-P, в то время как нестимулированный белок дикого типа (WT) - нет. В случае известных мутантов STING SAVI (STING-ассоциированная васкулопатия с началом в младенчестве) для стимуляции WT-STING IFN-13 требуется добавление повышающихся экзогенных уровней cGAMP для непосредственной активации WT-STING. Конститутивно активные мутации стимулируют экспрессию IFN-13 независимым от cGAMP образом.

Типичные мутации с увеличением функции в каждом из STING, RIG-I, MDA5, IRF3 и IRF7 изложены выше и обсуждаются в другом месте в настоящем документе. Другие такие гены, в которых мутации увеличения функции могут быть идентифицированы у субъектов или получены с помощью мутаций и скрининга invitro, включают, но не ограничиваются ими, STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5. , IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2,DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 и SNRNP200. Мутации с усилением функции увеличивают экспрессию INF типа I или делают экспрессию конститутивной.

Экспрессия функциональных конститутивных мутантов IFN типа I в клетках человека

Специфические человеческие мутанты STING (аллель R232) и IRF3 с усилением функции (GOF) клонировали в вектор pATI-1.75, и последовательности подтверждали с помощью PCR. Чтобы определить, могут ли плазмиды экспрессии STING и IRF3 GOF индуцировать функциональный IFN типа I в клетках человека, плазмиды оценивали с использованием HEK293T STING нулевых репортерных клеток (InvivoGen), не содержащих эндогенного STING. Эти клетки экспрессируют секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), находящуюся под контролем промотора эндогенного IFN-стимулированного ответного элемента (ISRE), где кодирующая последовательность ISRE заменена ORF SEAP с использованием технологии knock-in. Активность интерферона I типа можно оценить путем мониторинга продукции SEAP, стимулированной IFN I типа, в клеточных супернатантах.

Чтобы проверить относительную продукцию IFN типа I мутантами GOF, $1x10^5$ нулевых клеток 293T-Dual ™ высевали за день до этого на планшеты, покрытые поли-L-лизином, для достижения 80% слияния в 24-луночном планшете. В день трансфекции 200 нг плазмид, кодирующих панель мутантов STING и IRF3 GOF, включая STING дикого типа (WT) и контроль IRF3 WT, а также мутацию отрицательного контроля (NC), о которой сообщалось в литературе как нефункциональной в клетках человека (V155R, в STING), разводили бессывороточной средой и добавляли к реагенту для трансфекции FuGENE® (Promega) в надлежащем соотношении реагент: ДНК. Супернатанты клеточных культур из каждого образца собирали после инкубации в течение ночи, и 10 мклсупернатантов клеточных культур добавляли к 50 мл реагента QUANTI-Blue ™ (InvivoGen) (который используется для измерения SEAP).

Как показано в таблице ниже, все мутанты GOF были способны индуцировать активность IFN типа I независимым от лиганда STING образом в человеческих клетках, по сравнению с диким типом и отрицательными контролями, которые не индуцировали активность IFN типа I. Самые высокие уровни индукции IFN типа I наблюдались с вариантами фосфомиметиков STING R284G и IRF3 S396D человека. Эти данные подтверждают способность плазмид, кодирующих мутанты GOF, продуцировать функциональный, конститутивный STING и конститутивный фосфомиметик IRF3, который может индуцировать IFN типа I независимым от cGAMP образом.

Мутант GOF	**Среднее**	**Стандартное**

Plasmid control	0.049	0.002
huSTING WT	0.144	0.004
huSTING V147L	1.399	0.015
huSTING N154S	1.382	0.008
huSTING V155M	1.360	0.048
huSTING C206Y	1.566	0.121
huSTING R281Q	1.546	0.132

Мутант GOF	Среднее	Стандартное
huSTING R284G	1.831	0.039
huSTING V155R	0.181	0.014
huIRF3 WT	0.781	0.073
huIRF3 S396D	1.922	0.131

Инфекция штаммами, лишенными флагелл, содержащими плазмиды, кодирующие конститутивные мутанты IFN I типа, превращает макрофаги M2 человека в макрофаги M1, продуцирующие IFN I типа

Было определено, могут ли первичные макрофаги M2 человека, инфицированные штаммами с удаленными флагеллами, содержащими плазмиды, кодирующие конститутивные варианты IFN GOF типа I, быть преобразованы в продуценты IFN типа I и последующих хемокинов, таких как CXCL10 (также известный как IP-10).

Замороженные PBMC человека, выделенные от здоровых доноров-людей, размораживали в полной среде (RPMI-1640 + IX заменимых аминокислот + 5% сыворотки AB человека) и промывали центрифугированием в течение 10 минут при 800 об / мин при комнатной температуре. PBMC ресуспендировали в PBS + 2% FBS, и моноциты выделяли с использованием набора CD 16 (StemCellTechnologies). Затем изолированные нетронутые моноциты промывали центрифугированием в PBS + 2% FBS и ресуспендировали в полной среде, содержащей 100 нг / мл человеческого M-CSF и 10 нг / мл человеческого IL-4. Затем изолированные моноциты (3e5 на лунку) высевали в 24-луночный планшет с конечным объемом 750 микролитров.

Через два дня после посева среду для культивирования клеток полностью аспирировали и заменяли свежей полной средой, содержащей 100 нг / мл человеческого M-CSF и 10 нг / мл человеческого IL-4. Двумя днями позже (на 4-й день) 500 мл полной среды, содержащей цитокины, добавляли на лунку и инкубировали в течение 48 часов. На 6 день среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой без цитокинов. Двойные

лунки инфицировали при MOI 450 в течение одного часа в RPMI следующими штаммами: YS1646Aasd / AFLG, содержащим плазмиду, кодирующую STING дикого типа (WT) человека (hu); YS1646Aasd / AFLG, содержащий плазмиду, кодирующую вариант huSTING R284G; YS1646Aasd / AFLG, содержащий плазмиду, кодирующую WT huIRF3; YS1646Aasd / AFLG, содержащий плазмиду, кодирующую вариант huIRF3 S396D; или штамм, содержащий контроль плазмиды. Затем клетки промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в RPMI + 100 мг / мл гентамицина. Среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой без цитокинов.

В качестве контроля к клеткам добавляли агонист STING 3 '5' RpRp c-di-AMP (InvivoGen), аналог клинического соединения ADU-S100 в концентрации 10 пг / мл.

Через 24 часа клетки лизировали 350 мл буфера RLT с I3-ME (Qiagen) и проводили экстракцию РНК с использованием набора QiagenRNeasyMiniKit со следующей модификацией. Стадия удаления геномной ДНК с использованием набора ДНКазы, свободной от РНКазы (Qiagen), была включена для удаления геномной ДНК из общей РНК. Концентрацию общей РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop ™ One ^{c} UV-Vis (ThermoScientific).

Чистоту каждого образца также оценивали по коэффициенту поглощения A260 / A230. РНК хранили при -80 ° C без замораживания-оттаивания до выполнения обратной транскрипции. Синтез сДНК выполняли из 0,4–1 мг матричной РНК с использованием термоциклера C1000 Touch (Bio-Rad) и Superscript ™ VILO ™ MasterMix (Invitrogen) в реакционной смеси объемом 30 мл в соответствии с инструкциями производителя.

qPCR выполняли с помощью системы реального времени CFX96 (Bio-Rad). Праймеры SYBR® для huCXCL1O (qHsaCED0046619), huIRF3 (qHsaCID0013122), huSTING (qHsaCIDOO10565) и huIFNBl (qHsaCED0046851) были приобретены у Bio-Rad. Реакцию qPCR (20 мл) проводили согласно протоколу с использованием программы iTaqUniversal SYBR® GreenSupermix (Bio-Rad).

Стандартная программа термоциклирования в системе реального времени BioRad CFX96 состояла из денатурации при 95 ° C в течение 30 секунд с последующими 40 циклами при 95 ° C в течение 5 секунд и 60 ° C в течение 30 секунд. Реакции с контролем без матрицы включали для каждого набора праймеров на каждом планшете. Все образцы были проанализированы в двух экземплярах, и были рассчитаны средние значения C_q . Количественное определение целевой мРНК нормализовали с использованием эталонной мРНК Gapdh (Bio-Rad, qMmuCED0027497).

AC_q рассчитывали как разницу между целевым и контрольным генами. AAC_q получали путем нормализации значений AC_q обработок к значениям AC_q для контроля без обработки. Увеличение кратности рассчитывалось

как 2A-AAC $_{q}$. Значения показаны в таблице ниже как среднее значение для повторяющихся лунок.

Как показано в таблице ниже, по сравнению с инфицированием контрольной плазмиды штаммы YS1646Aasd / AFLG, содержащие плазмиды, кодирующие huSTING WT и huSTING R284G, индуцировали высокие уровни экспрессии STING, которые были значительно выше по сравнению с низкомолекулярным агонистом STING. Точно так же штаммы, содержащие плазмиды, кодирующие huIRF3 WT и huIRF3-S396D, индуцировали высокие уровниэкспрессии IRF3, которая была значительно выше, чем у контрольной плазмиды или низкомолекулярного агониста STING. Бактериальный штамм, содержащий плазмиду, кодирующую вариант huSTING R284G, индуцировал гораздо более высокую экспрессию ITF3 и CXCL10 по сравнению со штаммом, содержащим плазмиду, кодирующую huSTING WT. Это демонстрирует способность штамма, содержащего плазмиду, кодирующую конститутивный вариант STING GOF, преобразовывать человеческий первичный иммуносупрессивный макрофаг M2 в клетку, продуцирующую IFN типа I. Хотя штаммы, содержащие плазмиды, кодирующие huIRF3 WT и huIRF3-5396D, оба индуцировали больше IFN13, они индуцировали меньше CXCL10, чем вариант huSTING-R284G.

	Кратность экспресии по сравнению с			
Мутант GOF	**STING**	**IRF3**	**IFNI3**	**CXCL10**
Контрольплазмид	22.3	0	ND	ND
huSTING WT	24017.1	ND	3.4	3934.5
huSTING R284G	36542.7	ND	20	23484.5
huIRF3 WT	22.7	478.9	17.5	10766.2
huIRF3-S396D	30.8	346.4	26.3	15696.1
3'5' RpRp c-di-	244.8	1.11	1.77	594.1

ND = нет данных

Эти данные демонстрируют экспрессию конститутивных вариантов IFN типа I GOF в первичных макрофагах M2 человека и превращение этих клеток в M1- подобные клетки, продуцирующие INF типа I.

Пример 21

Скрининг белковой инженерии для выявления мутаций с улучшенным усилением функции в STING, RIG-I, MDA5, IRF3, IRF7 и других генах путей интерферона

Мутанты с получением функции (GOF) аминокислот, которые являются конститутивно активными и способствуют интерферонопатиям, идентифицированы у людей, как указано в примере 20. Многие мутации GOF возникают из-за изменений нуклеотидов одной пары оснований, которые изменяют кодон аминокислоты в этом конкретном положении в гене. Например, в STING мутация V147L возникает из-за мутации c.439G4C; N154S возникает из-за мутации c.461A4G; и V155M возникает из-за мутации c.463G4A. Целью скрининга является выявление конститутивно активных мутантов, которые приводят к высоким уровням экспрессии интерферона I типа. Разработанные мутации в сайтах, которые, как известно, способствуют развитию интерферонопатий при мутации, позволяют тестировать большее количество аминокислотных замен. В этом примерепраймеры для PCR генерируют с разработанными заменами, фланкированными на 5'- и 3'-концах гомологичными последовательностями кДНК из гена.

Набор QuikChange® Site-DirectedMutagenesisKit (Agilent) или другой сопоставимый коммерчески доступный набор используется для создания продукта PCR, включающего разработанную мутацию. Плазмиды, амплифицированные с помощью PCR, обрабатывают Dpnl, затем подвергают электропорации в компетентных клетках E. coli. Отдельные клоны выделяют, проводят мини-препарирование плазмид и подтверждают идентичность последовательности желаемой мутации. Затем осуществляют подготовку плазмид в более крупном масштабе (с использованием набора Qiagen), и ДНК трансфицируют в репортерные клетки HEK293T STING (InvivoGen), которые не содержат эндогенного STING. Эти клетки экспрессируют люциферазуLucia ™, секретируемую люциферазу, находящуюся под контролем эндогенного промотора IFN-13; кодирующая последовательность IFN-p была заменена ORF люциферазыLucia ™ с использованием технологии knock-in. Затем идентифицируются конститутивно активированные мутанты и ранжируются путем измерения индуцированной промотором IFN-13 экспрессии люциферазной активности.

Пример 22

Трансформация плазмид, кодирующих постоянно активные иммуностимулирующие белки, в иммуностимулирующие штаммы бактерий

Отобранные плазмиды, содержащие кассеты экспрессии, кодирующие иммуностимулирующие белки и функциональный ген asdэлектропорируют в штаммы S. typhimurium, лишенные гена asd, с помощью электропоратора BTX600 с использованием кюветы с зазором 0,2 см (BTX, Сан-Диего, Калифорния) при следующих настройках: 2,5 кВ, 186 Ом, 50 мкФ. Электропорированные клетки добавляют к 1 мл SOC с добавлением 50 мкМ диаминопимелиновой кислоты (DAP), инкубируют в течение 1 часа при 37 ° C, а затем распределяют по чашкам с агаром, не содержащим DAP, для отбора штаммов, которые получали плазмиды с функциональным геном asd. После выделения одной колонии банки клеток получают путем инокуляции колбы со стерильным лизогеническим бульоном (LB) с одной ячейкой изолированной колонии S. typhimurium и инкубирования при 37 ° C с перемешиванием со скоростью 250 об / мин. После того, как культура вырастет до стационарной фазы, бактерии промывают в PBS, содержащем 10% глицерина, и хранят замороженными при -60 C.

Пример 23

Плазмиды демонстрируют экспрессию мутантов STINGс усилением функции в клетках человека

Иммуностимулирующие бактериальные штаммы электропорируют с плазмидой, содержащей комплементарный ген asd, и кассетой экспрессии с эукариотическим промотором, контролирующим экспрессию мутантов с усилением функции STING (GOF).

Чтобы определить, могут ли плазмиды экспрессии STING GOF трансфицироваться в клетки человека и экспрессировать функциональный белок STING, используются репортерные клетки HEK293T STING (Invivogen), которые не содержат эндогенного STING. Эти клетки экспрессируют люциферазуLucia ™, секретируемую люциферазу, находящуюся под контролем эндогенного промотора IFN-13; кодирующая последовательность IFN-13 была заменена ORF люциферазыLucia ™ с использованием технологии knock-in. Стимуляцию циклическим

динуклеотидом(CDN) можно оценить в клетках 293T-Dual ™ STING (ISG / KI-IFNb) (Invivogen) путем мониторинга продукции секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), индуцированной IFN-стимулированным элементом ответа (ISRE), и / или IFN-13 -зависимой экспрессиейлюциферазыLucia ™. Два репортерных белка, SEAP и люциферазаLucia ™, исследовали в супернатанте клеточной культуры с использованием соответственно QUANTI-BlueTMи QUANTI-LucTM.

Для этого 5x10 ^{5} клеток HEK293T-Dual, содержащих huSTING (человеческий STINGWT), huSTING-null (человеческий NullSTING) или WTSTING (мышиный STING), высевают за день до этого на планшеты, покрытые поли-L-лизином, для достижения 80% слияния. В день трансфекции плазмиды, кодирующие панель вариантов STING (обозначенных в Примере 20 или письменном описании или разработанные, как в Примере 21), разводят в бессывороточной среде и добавляют к реагенту для трансфекции FuGENE® (Promega) в надлежащем порядке, и клетки инкубируют в присутствии или в отсутствие cGAMP, чтобы непосредственно активировать передачу сигналов STING.

Супернатанты клеточных культур из каждого образца собирают после инкубации в течение ночи, и 10 мклсупернатантов клеточных культур добавляют к 50 мл реагента QUANTI-Luc ™ (Invivogen). Активацию интерферона I типа определяют путем измерения уровней секретируемой люциферазы на спектрофотометре SpectraMax® M3 (MolecularDevices). Эти данные подтверждают способность трансфицированных плазмид продуцировать функциональный конститутивный STING, который может индуцировать IFN типа I независимым от cGAMP образом.

Пример 24

Штаммы кодирования с усилением функции (GOF) mSTING демонстрируют значительную противоопухолевую активность у мышей

Штаммы mSTINGGOF, которые кодируют конститутивный мутант цитозольного сенсора ДНК / РНК, приводящий к конститутивной экспрессии IFN типа I, повышают противоопухолевую эффективность содержащих плазмиду штаммов-мишеней invivo. Чтобы продемонстрировать это, штамм S. typhimurium, содержащий экспрессионные плазмиды для мутантов mSTINGGOF, испытанных в примере 23, сравнивают с контрольным штаммом плазмидного вектора S. typhimurium и контролем-носителем для определения опухолевой эффективности на модели

карциномы толстой кишки мышей. Самкам мышей C57BL / 6 в возрасте 6-8 недель (9 мышей в группе) подкожно инокулируют в правый бок клетки MC38 (5×10^{5} клеток в 100 мклPBS).

Мышам с установленными опухолями на боках на 8-й день вводят внутривенную инъекцию 5×10^{5} KOE S. typhimurium, трансформированные вариантами, кодирующими mSTING GOF, контрольной плазмидой S. typhimurium или контрольным носителем PBS. Вес тела и опухоли измеряются два раза в неделю. Измерения опухолей выполняются с помощью электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывают по модифицированной формуле эллипсоида, 1/2 (длина x ширина ^{2}). Мышей умерщвляют, когда размер опухоли достигает> 20% веса тела или становится некротическим, в соответствии с правилами IACUC.

Эксперимент демонстрирует, что иммуностимулирующие бактерии, такие как Salmonella, такие как S. typhimurium, которые кодируют продукты с усилением функции STING, вызывают мощный контроль опухоли по сравнению с контролями, которые не выражают усиление функции mSTING, и по сравнению с PBS.

Пример 25

Системно введенные бактерии, кодирующие конститутивно активный вариант STING ингибируют рост опухолей толстой кишки MC38 invivo

Чтобы продемонстрировать, что иммуностимулирующие бактериальные штаммы, содержащие плазмиды экспрессии, кодирующие конститутивно активный STING, вызывают противоопухолевую эффективность, штамм YS1646-Aasd / AFLG (нокаут обоих генов флагеллинafljB и fliC) подвергали электропорации с плазмидой, содержащей кассету экспрессии для человеческого STING с аллелемR232 и мутацитqGOFV155M (STINGR232-V155M) за промотором человеческого фактора элонгации-1 альфа (EF-1 альфа), и сравнивали с YS1646 только и контрольным носителем PBS.

Ген, кодирующий STINGR232-V155M, был создан с использованием синтеза ДНК.

Самкам мышей C57BL / 6 в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки MC38 (5×10^{5} клеток в 100 мл PBS). Мышам (n = 5) с установленными опухолями на боках вводили внутривенные инъекции на 8-й день следующим образом: (1) PBS; (2) 5x 10^{5}KOE YS1646; и (3) 5x10^{5} KOE YS1646-Aasd / AFLG STING R232-V155M. Измерения опухоли выполняли с помощью штангенциркуля, и объем опухоли рассчитывали с использованием модифицированной формулы эллипсоида, 1/2 (длина x ширина ^{2}).

Результаты, представленные в таблице ниже, показали, что штамм YS1646-Aasd / AFLG STING R232-V155M человека вызывал значительный контроль опухоли (60% TGI) по сравнению с PBS ($p < 0,05$) и имел немедленный полный ответ на 20%. . Таким образом, иммуностимулирующий бактериальный штамм, который доставляет конститутивно активный вариант STING, может эффективно ингибировать рост опухоли и демонстрировать 20% процент излечения на модели колоректальной карциномы.

	Среднийобъем	Ингибирование	p-	%
PBS	188.9	0%		0%
YS1646	122.2	35%	N.S.	0%
YS1646-Aasd/AFLG huSTING	75.5	60%	<0.05	20%

N.S. = незначительно

Пример 26

Иммуностимулирующие бактерии, кодирующие постоянно активный STING

Варианты стимулируют усиленную экспрессию регулирующего фактора интерферона (IRF) промоутера

Факторы регуляции интерферона (IRF), такие как IRF-3 и IRF-7, представляют собой белки, которые регулируют транскрипцию IFN. Чтобы продемонстрировать эффекты иммуностимулирующих бактерий, кодирующих конститутивно активный STING, на активацию IRF, была создана линия репортерных клеток мыши с двойной IRF-Lucia и

MIP-2-SEAP (секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза) (RAW-Dual ™; InvivoGen) из RAW 264,7 мышиных макрофагов.

Эти макрофаги экспрессируют несколько рецепторов распознавания образов (PRR), включая Toll-подобные рецепторы (TLR), cGAS и STING. Репортерные клетки стабильно экспрессируют два репортерных гена, кодирующих SEAP (секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу) и люциферазуLucia. Репортерный ген люциферазыLucia находится под контролем минимального промотора ISRE (интерферон-стимулированный ген 54) в сочетании с пятью IFN-стимулированными ответными элементами (ISRE). Когда IRF, такие как IRF-3 и IRF-7, активируются, они связываются с ISRE, чтобы вызвать ответы IFN типа I. Таким образом, экспрессия люциферазыLucia сообщает об активации IRF.

Репортерные клетки RAW-Dual ™ (IRF-Lucia / KI- [MIP-2] SEAP) (InvivoGen, каталожный код: rawd-ismip) высевали в 96-луночный планшет для культивирования тканей при 2 $\times 10^5$ клеток на лунку в среде (DMEM, содержащей глюкозу, L-глутамин и 10% FBS) без антибиотика и инкубировали при 37 ° C в 5% CO2 в течение ночи. 3 мл модифицированных культур LB (триптон, замещенный сойтоном), содержащих 50 мкг / мл канамицина, инокулировали бактериальными штаммами непосредственно из глицерина и инкубировали в течение ночи при встряхивании при 37 ° C. Штаммы YS 1646-Aasd / AFLG и YS1646-Aasd / AhilA были трансформированы плазмидами, кодирующими человеческий STING с аллелем R232 (huSTING) или вариантами STING с мутацией GOF V147L (huSTING V147L) или V155M (huSTING V155M), за человеческим промотором фактора элонгации-1 альфа (EF-1 альфа). Кассеты экспрессии были созданы путем синтеза ДНК.

На следующий день ночные культуры анализировали на OD600 нм, и объемы культур доводили до концентрации 4 $\times$ 10^8 КОЕ / мл путем разведения в среде для эукариотических клеток (DMEM, содержащая глюкозу, L-глутамин и 10% FBS без антибиотика). Заражение бактериальными штаммами проводили при MOI 200 путем добавления 100 мл разведенной культуры на лунку и центрифугирования в течение 5 минут при 1000 отсчетов с последующей инкубацией в течение 1 часа при 37 ° C. Затем инфекции дважды промывали 100 мл / лунку стерильным PBS и добавляли свежую среду, содержащую 50 мкг / мл гентамицина, для уничтожения внеклеточных бактерий. Циклический динуклеотид, 2'3'-c-di-AM(PS)2(Rp, Rp) (InvivoGen,

каталожный код: tlrl-nacda2r-01, tlrl-nacda2r) добавляли в неинфицированные лунки в качестве положительного контроля для индукции фактора регуляции интерферона (IRF) (положительный контроль CDN). 1 мг циклического динуклеотида добавляли на лунку путем добавления 10 мл исходного раствора 100 мкг / мл. Заражение продолжалось 48 часов при 37 ° C.

Индукцию пути IRF анализировали через 48 часов после инфицирования. На лунку собирали 20 мл супернатанта и смешивали с 50 мл свежеприготовленной среды для обнаружения QUANTI-Luc ™ (реагент для обнаружения люциферазыLucia; InvivoGen, код по каталогу: rep-q1c1, rep-q1c2) 96 -луночный планшет с черным плоским прозрачным дном, и люминесценцию детектировали на считывающем устройстве для микропланшетовSpectraMax® M5 (MolecularDevices). Результаты представлены в таблице ниже. Неинфицированные клетки и клетки, инфицированные YS1646-Aasd / AFLG, кодирующим mu-IL-2 (отрицательные контроли), показали наименьшее количество свечения IRF. Неинфицированные клетки с добавленным CDN (положительный контроль CDN) показали наивысшее количество свечения IRF. В штамме YS1646-Aasd / AFLG huSTING с мутацией V147L имел 258% увеличение освещенности IRF по сравнению с huSTING, а huSTING с мутацией V155M увеличился на 282% по сравнению с huSTING. В штамме YS1646-Aasd / AhilAhuSTING с мутацией V147L имел 1086% увеличение освещенности IRF по сравнению с huSTING, а huSTING с мутацией V155M имел увеличение на 201% по сравнению с huSTING.

Таким образом,конститутивно активные варианты STING могут быть доставлены к макрофагам через инфекцию иммуностимулирующими бактериями для активации передачи сигналов нижестоящего пути IRF.

Освещение IRF клеток Raw-Dual ™ через 48 часов после заражения

			Комбинация штамм YS1646 + плазмида						
			Aasd/AFLG				*AasdlAhilA*		
Измерение	Неинфицир	CDN полож.	mu-IL-2	Hu-STING	Hu-STING V147L	Hu-STING	HuSTING	HuSTING V147L	HuSTING V155
1	53	1407	84	146	414	473	81	1204	190
2	31	1401	84	146	364	355	93	1164	187

3	37	1537	90	121	289	339	134	977	243
Среднее	40.3	1448.	86.0	137.7	355.7	389.0	102.7	1115.0	206.7
Станд. откл.	11.4	76.8	3.5	14.4	62.9	73.2	27.8	121.2	31.5

Пример27

Иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиды, кодирующие конститутивные варианты IFN типа I, демонстрируют мощный противоопухолевый иммунитет на мышиной модели

Колоректальный рак

Мутанты человеческих GOFSTING демонстрируют противоопухолевую активность на моделях мышей.

Чтобы продемонстрировать, что иммуностимулирующие бактериальные штаммы, содержащие плазмиды экспрессии, кодирующие конститутивно активные варианты STING, вызывают противоопухолевую эффективность, штамм YS1646Aasd / AFLG (нокаут обоих генов флагеллинafljB и fliC) подвергали электропорации с помощью плазмид, содержащих кассету экспрессии для человеческого STING с аллелемR232 и мутацией GOFV155M (huSTINGV155M), за промотором человеческого фактора элонгации-1 (EF-la), и сравнивали с штаммом YS1646 и контрольным носителем PBS.

Ген, кодирующий huSTING V155M, был создан с использованием синтеза ДНК и клонирован в вектор pATI-1.75. Чтобы оценить, может ли конститутивный вариант STING человека демонстрировать противоопухолевую активность у мышей, 6-8 недельным самкам мышей C57BL (5 мышей в группе) вводили SC в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы ($5x10^5$ клеток в 100 мл PBS). Мышам, несущим опухоли на боках, на 8 день внутривенно вводили 5×10^5 КОЕ штамма YS 1646Aasd / AFLG huSTING V155M, штамма YS1646 или контроль PBS.

Результаты показали, что родительский штамм YS1646 был лишь умеренно эффективен в качестве противоопухолевой терапии и не был лечебным (35% TGI, p = NS, день 28), в соответствии с ранее опубликованными данными. Более

аттенуированный штамм, содержащий плазмиду, кодирующую конститутивно активный человеческий STING, YS1646Aasd / AFLG huSTING V155M, однако, вызывал значительный контроль опухоли (60% TGI, p <0,05, день 28) по сравнению с PBS и имел показатель излечения 20%. . Таким образом, иммуностимулирующий бактериальный штамм, который доставляет конститутивно активный вариант STING, сильно ингибирует рост опухоли и демонстрирует лечебные эффекты на модели колоректальной аденокарциномы.

Мышиный фосфомиметик IRF3 проявляет лечебный эффект invivo

Мышиный вариант фосфомиметического варианта IRF3 человека был разработан, обозначен как muIRF3-S388D, и оценен на мышиной модели колоректальной аденокарциномы. Штамм YS 1646Aasd / AFLG подвергали электропорации с плазмидой, содержащей кассету экспрессии для мышиного IRF3 с мутацией GOF S388D (muIRF3-S388D), за промотором человеческого фактора элонгации-1 альфа (EF-la), и сравнивали с контрольным носителем PBS. Ген, кодирующий muIRF3-S388D, был создан с использованием синтеза ДНК и клонирован в вектор pATI-1.75. Самкам мышей C57BL / 6 в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^{5} клеток в 100 мл PBS). Мышам, несущим опухоли на боках, на 10 день внутривенно вводили $^{5} \times 10$ 5 КОЕ штамма YS 1646Aasd / AFLG-EF-1a-muIRF3-S388D и сравнивали с контрольным носителем PBS.

Терапия очень хорошо переносилась, начальная потеря веса составила всего 0,3%. По сравнению с PBS, бактериальный штамм, содержащий плазмиду, кодирующую мутант muIRF3-5388D GOF, был высокоэффективным и лечебным (81,8% TGI, 60% процент излечения, 42 день). Эти данные демонстрируют эффективность и безопасность доставки конститутивных вариантов, индуцирующих IFN типа I, опухолеспецифическим образом.

Мышиные варианты STINGGOF демонстрируют сильную и лечебную противоопухолевую активность.

Была разработана панель мышиных ортологов человеческих вариантов STING, обнаруженных у людей. Эти ортологи отличаются на один кодон от человеческих вариантов и были клонированы в вектор pATI-1.75 под контролем промотора EF-la с получением следующего набора мутантов: muSTINGN153S, V154M, R280Q, V146L, R283G и C205Y и другие. Варианты STING оценивали на модели аденокарциномы мыши MC38 на противоопухолевую эффективность.

Для исследований самкам мышей C57BL / 6 в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^{5} клеток в 100 мл PBS). Мышам с установленными боковыми опухолями на 10-й день вводили внутривенную инъекцию $5 \times {}^{10}5$ КОЕ штамма YS1646Aasd / AFLG, содержащего плазмиду с EF-la, управляющую экспрессией muSTING N153 S, V154M, R280Q, V146L или R283G, или контрольную плазмиду скремблированной shPHK, и сравнивали с контрольным носителем PBS.

В этом эксперименте контрольная плазмида YS1646Aasd / AFLG EF-la (shSCR) продемонстрировала противоопухолевую эффективность по сравнению с контролем PBS (73% TGI, день 26), который был намного более мощным, чем исторически показал исходный штамм YS1646. Это может быть связано с иммуностимулирующими элементами плазмиды, такими как стимулирующие элементы CpG и РНК. Эта терапия была наименее хорошо переносимой из группы, продемонстрировав низший уровень потери веса 9,9%, который разрешился только в самом конце исследования. Напротив, конститутивные мышиные мутанты STING приводили к более низкой потере веса, которая была временной и исчезла в течение нескольких дней. Относительная противоопухолевая эффективность этих вариантов выявила интересные различия в активности, при этом только два варианта продемонстрировали лечебные эффекты и повышенную эффективность по сравнению с контролем плазмиды, N153S и R283G.

Мутант GOF	**TGI vs. PBS,**	**Полный**	**Потерявеса**
Контроль	73.0%	0/5	9.9%, день 19
muSTING N153S	81.7%	1/5	6.2%, день 12

muSTING	69.4%	0/5	4.3%, день 12
muSTING R280Q	68.7%	0/5	5.4%, день12
muSTING V146L	63.4%	0/5	2.8%, день 12
muSTING R283G	81.2%	1/5	6.9%, день 12

В последующем исследовании мышиный вариант STING C205 Y был протестирован вместе с вариантами R283G и N153S для сравнения их противоопухолевой эффективности. Самкам мышей C57BL / 6 в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^{5} клеток в 100 мкл PBS). Мышам с установленными боковыми опухолями на 9-й день вводили внутривенную инъекцию 5×10^{5} КОЕ штамма YS1646Aasd / AFLG, содержащего плазмиду с EF-la, управляющую экспрессией muSTING N153S, R283G или C205Y, и сравнивали с контрольным носителем PBS. Как и прежде, варианты STING хорошо переносились, и наблюдалось только кратковременное снижение потери веса, которое быстро разрешилось. Вероятно, это связано с целевой терапией, как это также наблюдается с низкомолекулярными агонистами STING. Эффективность двух конститутивно активных мышиных вариантов STING, N153S и R283G, была почти идентична предыдущему исследованию, хотя потеря веса была намного меньше по неясным причинам.Вариант C205Y также оказался высокоэффективным, хотя и не лечебным.

Мутант GOF	TGI vs. PBS, День 29	Полный ответ	Потеря веса и день
muSTING C205Y	79.4%	0/5	2.6%, день 13
muSTING N153S	79.3%	1/5	2.2%, день 13
muSTING R283G	85.1%	1/5	1.8%, день 13

Излеченных мышей из этих исследований повторно заражали на 40 день после первоначальной имплантации опухоли на противоположном боку, подкожно, клетками колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^{5} клеток в 100 мкл PBS). По сравнению с мышами (N = 5), у которых все опухоли выросли, все мыши, излеченные, отторгали опухоли, демонстрируя задействование адаптивного иммунитета.

Эти данные подтверждают безопасность и эффективность мышиных версий конститутивных вариантов STING человека на мышиной модели колоректальной карциномы и показывают небольшую подгруппу, которая имеет повышенную эффективность по сравнению с другими вариантами STING. Эти высокоактивные варианты также вызывают защитный иммунитет, демонстрируя эффективность опухолевой продукции интерферона I типа.

Мышиные варианты STING GOF демонстрируют значительное ремоделирование опухоли после внутривенного введения

Затем было определено, демонстрируют ли бактериальные штаммы, содержащие плазмиды, кодирующие конститутивные варианты STING, различия в их способности ремоделировать микроокружение опухоли (TME) после внутривенного введения. Для проверки этого самкам мышей C57BL / 6 в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^{5} клеток в 100 мкл PBS). Мышам, несущим опухоли на боках, на 8 день внутривенно вводили 5×10^{5} КОЕ штамма YS1646Aasd / AFLG, содержащего плазмиду с EF-la, управляющую экспрессией muSTING N153 S, V154M, R280Q, V146L, R283G или контрольной плазмиды, и по сравнению с контролем с носителем PBS.

На 28 день после имплантации опухоли, ее иссекали для анализа. Опухоли разрезали на кусочки размером 2–3 мм в пробирки MACS ™ C (MiltenyiBiotec), заполненные 2,5 мл смеси ферментов (RPMI-1640 + 10% FBS с 1 мг / мл коллагеназы IV и 20 мг / мл ДНКазы I). Кусочки опухоли диссоциировали с использованием специальной программы диссоциации OctoMACS ™ (MiltenyiBiotec) (опухоли, имплантированные мышам), и весь препарат клеток инкубировали при перемешивании в течение 45 минут при 37 ° C. После 45 минут инкубации проводили второй раунд диссоциации с использованием OctoMACS ™ (программа для имплантации опухолей мышам), и полученные суспензии отдельных клеток фильтровали через нейлоновую сетку 70 мкМ в пробирку на 50 мл.

Нейлоновую сетку один раз промыли 5 мл 10% FBS RPMI-1640, и клетки отфильтровали второй раз, используя новую нейлоновую сетку 70 мкМ в новую пробирку на 50 мл. Нейлоновую сетку промывали 5 мл RPMI-1640 с 10% FBS, а затем отфильтрованные клетки центрифугировали при 1000 об / мин в течение 7 минут. Полученные диссоциированные клетки ресуспендировали в PBS и хранили на льду перед процессом окрашивания.

Процент живых лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), включая $CD4^{+}$ Treg, $CD4^{+}$ Thl-клетки, $CD8^{+}$T-клетки, нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки (DC), макрофаги M1 и макрофаги M2 после введения штамма YS1646Aasd / AFLG,

содержащего плазмиды, кодирующие различные мутанты GOF muSTING, определяли с помощью проточной цитометрии. Для окрашивания проточной цитометрией 100 мл суспензий отдельных клеток высевали в лунки 96-луночного планшета с V-образным дном. PBS, содержащий мертвое / живое пятно (ZombieAqua ™, BioLegend) и реагенты для блокирования Fc (BD Biosciences), добавляли в количестве 100 мл на лунку и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS центрифугированием при 1300 об / мин в течение 3 минут.

Затемклеткиресуспендировали в PBS + 2% FBS, содержащемантитела, конъюгированные с флуорохромом (CD4 FITC клон RM4-5; CD8a BV421 клон 53-6.7; F4 / 80 APC клон BM8; CD1 lb PE-Cy7 клон M1 / 70; CD45 BV570 клон 30-F11; CD3 PE клон 145-2C1 1; Ly6C BV785 клон HK1.4; IA / IE APC-Cy7 клон M5 / 1 14.15.2; Ly6G BY605 клон 1A8; и CD24 PercP-Cy5.5 клон M1 / 69; всеотBioLegend)иинкубировалинальдувтечение 30 минутвтемноте. Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS центрифугированием при 1300 об / мин в течение 3 минут и ресуспендировали в фиксирующем буфере для проточной цитометрии (ThermoFisherScientific). Данные проточной цитометрии получали с использованием проточного цитометраACEANovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo ™ (TreeStar, Inc.). клетки дважды промывали PBS + 2% FBS центрифугированием при 1300 об / мин в течение 3 минут и ресуспендировали в фиксирующем буфере для проточной цитометрии (ThermoFisherScientific).

Как показано в таблицах ниже, штамм YS1646Aasd/ AFLG с контрольной плазмидой EF-1a продемонстрировал преимущественно высокую инфильтрацию нейтрофилов, несмотря на некоторое привлечение $CD8^+$ Т-клеток, вероятно, из-за иммуностимулирующих элементов в плазмиде.

Напротив, разные варианты muSTING имели уникальные сигнатуры проникающих в опухоль иммунных клеток, причем некоторые из них, такие как muSTINGV146L и muSTINGR283G, приводили к меньшему количеству иммунодепрессивных нейтрофилов, чем контроль PBS. Наиболее благоприятные иммунные профили наблюдались в опухолях мышей, которым вводили мутанты muSTINGR283G и N153S, с высоким количеством $CD4^+$ Thi-клеток и $CD8^+$ Т-клеток и низкое количество нейтрофилов, что указывает на очень благоприятные условия для генерации адаптивного иммунного ответа. Эти тенденции также были отражены в общем количестве клеток, как показано ниже. Таким образом, доставка конститутивно активных вариантов STING к опухолерезидентным миелоидным клеткам приводит к полному ремоделированиюиммуносупрессивного микроокружения опухоли в сторону адаптивного противоопухолевого фенотипа и от бактериального фенотипа, который характеризуется стимулированием врожденного иммунитета. и подавление адаптивного иммунитета.

% живых лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL)

% среди	Мутанты GOFmuSTINGкодированные на плазмидах введенного						
	PBS	Плазмид	muSTIN	muSTIN	muSTIN	muSTIN	muSTIN
CD4+Treg	2.9 ± 1.7	1.8 ± 0.5	3.3 ± 2.6	1.5 ± 0.5	2 ± 0.9	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.4
CD4+Thl	6.6 ± 3.2	13 ± 4.3	20.7 ±	13.2 ± 6.1	22.6 ± 7.4	19.5 ± 4.9	25.6 ± 7.8
CD8+ T	16.2 +	24.5 +	25.8 + 9.2	16.5 + 4.4	20.2 + 7.2	20.8 + 3.6	27.8 + 8.7
Нейтрофи	11.3 +	30.6 +	13.5 +	21.4 +	15.9 +	9.1 + 6.5	6.6 + 5.9
Моноцит	16.6 + 3.5	12.7 + 2.7	13.7 + 3.9	16.4 + 5.4	15.8 + 6.5	15.6 + 2.2	13.5 + 1.3
DC	1.4 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.9 ± 0.7	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3
M1	10.2 + 6.2	3.1 + 2.1	4.6 + 2.1	9.4 + 5	5.6 + 4.2	8.6 + 3.7	5.4 + 2
M2	14.9 +	4.6 + 2.6	7.3 + 3.1	11.6 + 5.2	8.6 + 6.3	12.8 + 5	9.2 + 4

Общее количество клеток

	PBS	Плазмид	muSTING	muSTING	muSTING	muSTIN	muSTIN
CD4+	437 +	148 + 102	530 + 117	310 + 114	520 + 169	297 + 207	438 + 176
CD4+Thl	1108 +	1059 +	3765 + 917	3349 +	5864 +	2961 +	7463 +
CD8+ T	2948 +	1571 +	6152 +	3898 +	5446 +	3266 +	7566 +
Нейтро	1531 +	2604 +	3699 +	4815 +	4301 +	1240 +	1698 +
Моноци	2871 +	912 + 369	3182 +	3350 +	4132 +	2524 +	3811 +
DC	23,3 ±	28 + 18	161 + 45	82 + 31	130 + 90	78 + 48	135 + 90
M1	2163 +	227 ± 213	881 ± 316	1797 + 750	1421 + 910	1325 +	1524 +
M2	3046 +	334 + 275	1391 + 373	2183 + 608	2189 +	2043 +	2612

Пример 28

Инминостимуляторные бактерии, модифицированные для экспрессии вариантов STING позвоночных, которые вызывают более сильную передачу сигналов IFN типа I и / или более слабую передачу сигналов NF-KB, чем человеческийSTING

Передача сигналов STING активирует два сигнальных пути. Первый - это осьTANK-связывающей киназы (TBK1) / IRF3, что приводит к индукции IFN типа I, активации дендритных клеток (DC) и перекрестной презентации опухолевых антигенов для

активации CD8 $^{+}$ Т-клеточно опосредованный противоопухолевый иммунитет. Второй - ядерный фактор каппа-легкой цепи-энхансер сигнальной оси активированных В-клеток (NF-KB), приводящий к провоспалительному ответу, но не к активации DC и CD8 $^{+}$ Т-клеток, что необходимо для противоопухолевого иммунитета.

Иммунотерапия рака на основе бактерий ограничена в своей способности индуцировать IFN типа I для набора и активации CD8 $^{+}$ Т-клеток необходимых для обеспечения перекрестной презентации опухолевого антигена и устойчивого противоопухолевого иммунитета. Следовательно, в настоящем документе представлены иммуностимулирующие бактерии, которые индуцируют и / или усиливают передачу сигналов IFN типа I и которые имеют пониженную передачу сигналов NF-KB, тем самым увеличивая индукцию опосредованного CD8 $^{+}$ Т-клетками противоопухолевого иммунитета и повышение терапевтической эффективности бактерий. Описанные выше иммуностимулирующие бактерии кодируют модифицированные белки STING, которые являются мутантами STING с усилением функции, которые могут увеличивать индукцию IFN типа I по сравнению с STING дикого типа или делать экспрессию IFN типа I конститутивной.

В этом примере (и также описанном в подробном описании) белок STING модифицирован для снижения или устранения сигнальной активности NF-KB и сохранения способности индуцировать IFN типа I, и / или модифицирован для повышения или экспрессии конститутивного IFN типа I. Это приводит к появлению иммуностимулирующих бактерий, которые индуцируют противоопухолевый иммунитет и не индуцируют (или вызывают меньшую) передачу сигналов NF-KB, которая обычно возникает в результате инфицирования бактериальными патогенами.

Белки STING разных видов проявляют разные уровни активности передачи сигналов IFN I типа и NF-KB. Например, передача сигналов STING в клетках человека и мыши приводит к сильному ответу IFN типа I и слабому провоспалительному ответу NF-KB. Передача сигналов STING у рыб с луговыми плавниками, таких как лосось и рыбок данио, по сравнению с этим, вызывает устойчивую активацию ответа, в основном управляемого NF-KB, что более чем в 100 раз выше по сравнению с управляемым IRF3 (то есть, тип I IFN-индуцирующий) ответ.

У других видов, таких как тасманский дьявол, передача сигналов STING приводит к IFN-ответу I типа, но по существу нет ответа NF-KB. Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, кодируют STING от

нечеловеческих видов, таких как STING тасманского дьявола, чтобы использовать способность STING вызывать ответ IFN типа I, но без сопутствующей индукции ответа NF-KB. Как описано в данном документе, эти нечеловеческие белки STING также модифицируются мутацией для увеличения ответа IFN типа I или для того, чтобы сделать его конститутивным. Выявленные мутации, которые оказывают такое влияние на STING человека, вводятся в белки STING, не относящиеся к человеку. Соответствующие остатки идентифицируют сравнением.

Также предусмотрены химеры, в которых С-концевой хвост (CTT) STING заменен у одного вида, такого как человек, на CTT другого вида (например, не человеческие виды, которые проявляют небольшую сигнальную активность NF-KB или не проявляют ее.

CTT представляет собой неструктурированный участок из примерно 40 аминокислот, который содержит звенья последовательности, необходимые для фосфорилирования STING и рекрутирования IRF3. Он может формировать иммунитет, изменяя баланс между передачей сигналов IFN типа I и NF-KB. Это контролируется с помощью независимых модулей в CTT, в том числе связывающих модулей IRF3, TBK1 и TRAF6.

Например, остаток S366 STING человека (см., например, SEQ ID NO: 305-309) является первичным сайтом фосфорилирования TBK1, который является частью звена LxIS в CTT, которое необходимо для связывания IRF3, в то время как второе звено PxPLR , включая остаток L374, необходимо для связывания TBK1. ЗвеньяLxIS и PxPLR высоко консервативны во всех аллелях STING позвоночных. ЗаменаCTT STING человека с STING, например, на STING тасманского дьявола, производит STING, который вызывает ответ IFN I типа, но не ответ NF-KB.

В этом примере иммуностимулирующие бактерии сконструированы для экспрессии варианта STING с усиленной передачей сигнала IFN типа I и / или пониженной передачей сигнала NF-KB по сравнению с STING человека дикого типа (WT) (SEQ ID NO: 305-309). Варианты STING могут происходить от позвоночных животных, кроме человека, таких как млекопитающие, птицы, рептилии, амфибии или виды рыб. Виды, от которых происходят нечеловеческие белки STING, включают, помимо прочего, тасманского дьявола (Sarcophilusharrisii; SEQ ID NO: 331), мартышку (Callithrixjacchus, SEQ ID NO: 341), крупный рогатый скот (Bostaurus; SEQ ID NO: 342), кошку (Feliscatus; SEQ ID NO: 338), страуса (Struthiocamelusaustralis; SEQ ID NO: 343), хохлатого ибиса (Nipponianippon; SEQ ID NO: 344), целаканта (Latimeriachalumnae; SEQ ID NO: 345 и 346), кабана (Susscrofa SEQ ID NO: 347),

летучую мышь (Rousettusaegyptiacus; SEQ ID NO: 348), ламантина (Trichechusmanatuslatirostris; SEQ ID NO: 349), акулу (Callorhinchusmilir, SEQ ID NO: 350) и мышь (Musmusculus; SEQ ID NO: 351).

Эти белки STING позвоночных легко активируют иммунную передачу сигналов в клетках человека, указывая на то, что молекулярный механизм передачи сигналов STING является общим для позвоночных (см., Например, deOliveiraMann и др. (2019) CellReports 27: 1165-1175). Белки STING этих видов индуцируют меньшую активацию сигнала NF-KB и / или большую активацию сигнала IFN типа I, чем STING человека (см., Например, deOliveiraMannetal. (2019) CellReports 27: 1165-1175, Fig. 1A). Белки STING дикого типа или модифицированные могут быть экспрессированы приведенными здесь иммуностимулирующими бактериями.

Различные нечеловеческие белки STING модифицируются таким образом, что нечеловеческий STING имеет более низкую активацию NF-KB и, (необязательно), более высокую активацию интерферона типа I, чем человеческий STING. Эти нечеловеческие белки STING модифицированы для включения мутации или мутаций, так что они обладают повышенной активностью IFN типа I или действуют конститутивно в отсутствие лигандовцитозольных нуклеиновых кислот (например, CDN). Мутации обычно представляют собой аминокислотные мутации, такие как мутации с увеличением функции, которые связаны с интерферонопатиями у людей. Соответствующие мутации вводятся в белки STING, не относящиеся к человеческому виду, где соответствующие аминокислотные остатки идентифицируются путем сравнения. Например, мутациивключают, нонеограничиваютсяими, S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A,R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, и S324A/S326A,соссылкойнапоследовательность STING человека, какуказанов ID N0: 305-309. Соответствующие мутации STING от других видов перечислены в таблицах ниже. Полученные варианты нечеловеческих белков STING включают одну или несколько из этих мутаций и, необязательно, замену CTT и необязательно делецию в сайте связывания TRAF6.

Варианты STING включают одну или несколько замен аминокислот серина (S) или треонина (T) в сайте фосфорилирования аспарагиновой кислотой (D), которая является фосфомиметиком, что приводит к повышенной или конститутивной активности. Другие мутации включают делецию или замену сайта или сайтов фосфорилирования, например 324-326.SLS ->ALAвSTING, и другие замены для устранения сайта фосфорилирования для уменьшения передачи сигналов NF-KB в STING. Кроме того, представлены химеры STING человека на STING других видов, в которых С-концевой хвост (CTT) STING человека заменен CTTSTING другого вида, который имеет более низкую сигнальную активность NF-KB и / или более высокую сигнальную активность IFN типа I. Варианты белков STING могут включать делецию в сайте связывания TRAF6 CTT для снижения передачи сигналов NF-KB.

Человек STING	Тасманский	Мартышка	Крупный	Кот STING	Страус STING	Хохлатый ибис	Целакант STING
S102P	SI02P	SL02P	S102P	SL02P	C107P	V106P	A102P
V147L	V147L	V145L	1147L	V146L	M152L	M151L	I147L
VI47M	V147M	V145M	1147M	V146M	-	-	I147M
N154S	N154S	N152S	N154S	N153S	NL59S	NL58S	GJ54S
V155	V155M	V153M	V155M	V154M	V160M	V159M	V155M
G166E	G166E	G164E	G166E	G165E	G171E	G170E	G166E
C206Y	C206Y	C204Y	C206Y	C205Y	C211Y	C210Y	C206Y
G207E	S207E	G205E	G207E	G206E	N212E	D211E	S207E
S102P/	SI02P/	SI	S102P/	S102P/F	C107P/	V106P/F	A102P/F
E279L	E279L	E277L	E279L	E278L	E283L	E283L	E279L
R281Q	R281Q	R279Q	R281Q	R280Q	R285Q	R285Q	1(281Q
R284G	R284G	R282G	R284G	R283G	R288G	R288G	R284G
R284S	R284S	R282S	R284S	R283S	R288S	R288S	R284S
R284	R284M	R282M	R284M	R283M	R288M	R288M	R284M
R284K	R284K	R282K	R284K	R283K	R288K	R288K	R284K
R284T	R284T	R282T	R2841	R283T	R288T	R288T	R284T
R197A	R197A	R195A	R197A	R196A	K202A	K201A	R197A
D205A	D205A	D203A	D205A	D204A	S210A	S209A	S205A
R310A	R310A	R308A	R310A	R309A	R314A	R314A	R310A
R293A	R293A	• R2	R293A	R292A	R297A	R297A	R293A
T294A	T294A	T291A	T294A	1293A	T298A	T298A	T294A
E296A	E296A	E294A	E296A	E295A	E300A	E300A	K296A
R197A	R197A/	R195A/	RI	R196A/	K202A/	K201A/S	RI
S272A/	S272A/	S270A/Q	S272A/Q	S271A/	S276A/	S276A/Q	S272A/K
R310A	R310A/	R308A/E	R310A/E	R309A/E	.R314A/	R3 1	R310A/E
E316A	E316A	E314A	E316A	E315A	E320A	E320A	E318A
E316N	E316N	E314N	E316N	E315N	E320N	E320N	E318N
E3 L	E316Q	E314Q	E316Q	E315Q	E320Q	E320Q	E318Q
S272A	S272A	S270A	S272A	S27IA	S276A	S276A	S272A
R375A	R377A	R373A	R374A	R373A	R371A	R379A	K376A
R293A /T	R293A/T	R291A/T	R293A/T	R292A/ 1293A /	R297A/ T298A /	R297A/T	R293A/T
D231A	D231A	D229A	D23 I A	D230A	T236A	T235A	N231A

R232A	R232A	R230A	R232A	R231A	R237A	R236A	R232A
K236A	K236A	K234A	K236A	1(235A	K241A	K240A	K236A
Q273A	Q273A	Q271A	Q273A	Q272A	Q277A	Q277A	1073A
S358A/E	S360A/E	S356A/E	S357A/E359A/	S356A/E358A/	S354A/D356A/	S362A/E	S359A/E
D231A/R232A/S358A	D23 I A/R2 S360A	D229A/R2 S356A	D231A/R23 S357A	D23 OA/R231A/S356A	T236A/R2 S354A	T235A/R236 S362A	N231A/R23 S359A
E360A	E362A	E358A	E359A	E358A	D356A	E364A	E361A
S366A	S368A	S364A	S365A	S364A	S362A	S370A	S367A
R238A	R238A	R236A	R238A	R237A	R243A	R242A	R238A
S324A/	S326A/S	L322A/S	S324A/	S323A/S	F328A/	S328A/	S327A

Человек STING	Кабан STING	Летучаямышь STING	Лама нтин	Акула STIN	Мышь STING
S102P	SI02P	SIQ3P	S105P	S98P	S102P
V147L	I147L	V148L	1150I	1148I	V146I
V147M	I147M	V148M	1150M	I148M	V146M
N154S	N154S	N155S	N157S	N155S	N153S
V155M	V155M	V156M	V158M	V156S	V154M
G166E	G166E	G167E	G169E	G167E	G165E
C206Y	C206Y	C207Y	C209Y	C206Y	C205Y
G207E	G207E	G208E	G210E	K207E	G206E
S102P/E27	S102P/E279I	SIQ3P/E280	S105P/E28	S98P/E280	S102P/E278
E279I	E279I	E280I	E282I	E280I	E278I
R281Q	R281Q	-	R284Q	1(282Q	R280Q
R284G	R284G	R285G	R287G	R285G	R283G
R284S	R284S	R285S	R287S	R285S	R283S
R284M	R284M	R285M	R287M	R285M	R283M
R284K	R284K	R285K	R287K	R285K	R283K
R284T	R284T	R285T	R284T	R285T	R283T
R197A	R197A	R198A	R200A	K197A	R196A
D205A	D205A	D206A	D208A	S205A	D204A
R310A	R310A	R311A	R313A	R311A	R309A
R293A	R293A	R294A	R296A	R294A	R292A
T294A	T294A	T295A	T297A	T295A	T293A
E296A	E296A		E299A	K297A	E295A
R197A/D2	R197A/D205	RI	R200/D208	K197A/S20	R196A/D20
S272A/Q27	S272A/Q273	S273A/Q27	S275A/Q27	T273A/N27	S271A/Q272
R310A/E31	R310A/E316	R311 A/E3 I	R313A/E31	R3 I	R309A/E315
E316A	E316A	E317A	E319A	D317A	E315A
E316N	E316N	E317N	E319N	D317N	E315N
E316Q	E316Q	E3 I 7Q	E319Q	D3 I 7Q	E315Q
S272A	S272A	S273A	S275A	T273A	S271A
R375A	S374A	R376A	R383A	R374A	R374A
R293A/T29	R293AfT294	R294A/T29	R296A/T29	R294A/T29	R292A/T29
D231A	D231A	D232A	D234A	D231A	D230A
R232A	R232A	R233A	C235A	R232A	R231A
K236A	K236A	K237A	K239A	K236A	K235A
Q273A	Q273A	Q274A	Q276A	N274A	Q272A
S358A/E36	S357A/E359	H359A/E36	S366A/E36	S359A/	S357A/E359
D231A/R232A /K2	D23IA/R232	D232A/R23	D234A/C235A	D231A/R232A	D230A/R23
S358A	S357A	H359A	S366A	S359A	S357A
E360A	E359A	E361A	E368A	E361A	E359A
S366A	S365A	S367A	S374A	S367A	S365A
R238A	R238A	R239A	R241A	R238A	R237A
S324A/S32	S324A/S326	S325A/S327	S327A/S32	G325A/S33	S323A/S325

Например, модифицированныеварианты STING включают STING тасманскогодьявола с мутациями C206Y (SEQ ID NO:332) или R284G (SEQ ID NO:333); вариант, в котором CTT STING человеказамененна CTT STING тасманскогодьявола (SEQ ID NO:334); человеческий STING с мутацией

C206Y (SEQ ID NO:335) или R284G (SEQ ID NO:336), и где CTT замененна CTT тасманскогодьявола STING; STING человекадикоготипа с делецией в

связывающемдомене TRAF6 (соответствуетостаткам 377-379, DFS)) (SEQ ID NO:337); STING кошки с мутациями C205Y (SEQ ID NO:339) или R283G (SEQ ID NO:340); и другиеподобныемодифицированныевариантыSTING.

Чтобы определить соответствующие аминокислотные остатки для мутаций STING, каждую последовательность STING дикого типа от различных видов, отличных от человека, сравнивали с последовательностью STING человека дикого типа (аллельных вариантов SEQIDNO:305 (аллель R232) или SEQIDNO:306 (аллель H232)). Сравнение выполняли с помощью инструмента сравнения последовательностей Kalign, доступного на веб-сайте ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/, или инструмента сравнения последовательностей EMBOSS, доступного на сайте ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.

Примеры сравнения последовательностей STING человека с белками STING видов тасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, хохлатого ибиса, данио, кабана, летучей мыши, ламантина, акулы и мыши представлены на фиг. 1-13.

Гибридные варианты STINGGOF демонстрируют значительно повышенное соотношение интерферона типа I к NF-КВ в дендритных клетках

Чтобы определить оптимальный мутант STINGGOF, который будет вызывать самые высокие уровни $CD8^+$ Т-клеточного хемокинаCXCLI0 у мышей, группа мутантов была протестирована на мышиных первичных дендритных клетках костного мозга (BMDC). Онивключали STING тасманийскогодьявола с конститутивнымимутациями GOF человека C206Y (SEQ ID NO:332) или R284G (SEQ ID NO:333); мышиныемутанты STING GOF C205Y или R283G; а такжеварианты, в которых CTT STING человекаазамененна CTT STING тасманийскогодьявола (SEQ ID NO:334) и содержатлибо STING дикоготипачеловека, либомутации C206Y STING человека (SEQ ID NO:335) или R284G (SEQ ID NO:336). Также были включены STING кошки с мутациями C205Y (SEQIDNO:339) или R283G (SEQIDNO:340) и STING человека с мутациями C206Y или R284G.

Чтобы проверить это, мышиный костный мозг выделяли и помещали в пробирки Эппендорфа на 1,5 мл и центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 минут для сбора клеток костного мозга. Клетки однократно промывали в RPMI-1640 + 10% FBS, затем высевали в 6-луночные планшеты, обработанные ТС, в RPMI-1640 + 10% FBS с

20 нг/мл GM-CSF. Каждые 2 дня 50% среды заменяли свежей полной средой. Через шесть дней неадгезивные клетки удаляли пипеткой из лунок и повторно высевали по 1e5 клеток на лунку в RPMI-1640 + 10% FBS в 96-луночном планшете для трансфекции. Клетки трансфицировали с использованием Viromer® RED в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 200 нгплазмидной ДНК из панели мутантов STINGGOF, а также нетрансфицированный контроль разводили в предоставленном буфере и смешивали с 0.08 ptViromer® RED и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут для образования комплексов Viromer®. Затем комплексы ДНК/Viromer® RED медленно добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета (с повторами) и планшет инкубировали при 37 °C в CO2-инкубаторе.

Супернатанты собирали через 48 часов и анализировали на мышиный CXCL10 (IP-10) с использованием массива цитокиновых шариков (CBA) на основе проточной цитометрии в соответствии с протоколом производителя.

Как показано в таблице ниже, конструкция, которая индуцировала самую высокую экспрессию мышиного CXCL10, содержала CTT STING человека, замененного CTT STING тасманского дьявола, и содержала мутацию R284GGOFSTING человека (huSTINGR284GtazCTT). Следующим по величине был STING человека с мутацией GOFC206Y (huSTINGC206Y) и STING тасманийского дьявола, содержащего мутацию R284GGOF человека STING (tazSTINGR284G). Интересно, что мутанты STINGGOF человека были более активны, чем мышиные мутанты STINGGOF (muSTINGC205Y и muSTINGR283G), которые были даже менее активны, чем STING кошки, содержащие мутации C205Y и R283GGOF, в первичных мышиных дендритных клетках.

Конструкция	**CXCL10 пг/мл**
Нетрансфектировано	11.4 + 3.889
huSTING C206Y	861. + 58.48
huSTING R284G	769. + 95.16
mSTING C205Y	194 + 27.15
mSTING R283G	230. + 1.018
huSTING C206Y taz CTT	366. + 42.61
huSTING R284G taz CTT	1326 + 137.9
tazSTING C206Y	808. + 95.78
tazSTING R284G	831. + 30.15
catSTING C205Y	480. + 24.94
catSTING R283G	376. + 6.682

Эти данные демонстрируют возможность использования STING, полученного от других видов, таких как тасманский дьявол, и объединения их с конститутивными мутациями STINGGOF человека, для вызова мощных хемокинов, рекрутирующих Т-клетки.

Гибридные варианты STINGGOF демонстрируют значительно повышенное соотношение интерферона I типа к NF-KB в моноцитах человека

Чтобы продемонстрировать, что отношение STING-индуцированного интерферона типа I к передаче сигналов NF-KB может быть изменено с использованием гибридных вариантов STINGGOF от других видов, панель была протестирована на клеточной линии моноцитов человека. Панель включала STING человека дикого типа или STING человека с конститутивными мутациями GOFC206Y или R284G; STING тасманский дьявол дикого типа или STING тасманский дьявол с конститутивными мутациями GOFC206Y или R284G; варианты, в которых CTT STING человека был заменен на CTT STING тасманского дьявола, и содержащие либо STING человека дикого типа, либо STING человека с мутациями C206Y или R284G; и мышиный STING с мутациями C205Y или R283G. Также были включены STING дикого типа человека с делецией в связывающем домене TRAF6 (соответствует остаткам 377-379, DFS), STING дикого типа кошки и STING дикого типа рыбок данио.

Для этого эксперимента использовали клетки THP1-Dual™ KOSTING, которые были изменены для отсутствия эндогенного STING, а также для экспрессии люциферазыLucia™, секретируемой люциферазы, помещенной под контроль эндогенного промотора IFN-13. Конститутивно активные мутанты STINGGOF затем идентифицировали и ранжировали путем измерения индуцированной промотором IFN-13 экспрессии активности люциферазы. Эти клетки также экспрессируют секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), помещенную под контроль эндогенного промотора NF-KB, где кодирующая последовательность NF-KB заменена SEAPORF с использованием технологии нокаута. Активность NF-KB, индуцированную мутантами STINGGOF, можно оценить путем мониторинга продукции SEAP в супернатантах клеток.

Для этого эксперимента клетки THP1-Dual™ KOSTINGтрансфицировали с использованием Viromer® RED в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 200 нгплазмидной ДНК из панели мутантов STINGGOF, а также нетрансфицированный контроль разводили в предоставленном буфере,

смешивали с 0,08 плViromer® RED и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут, чтобы позволить комплексам Viromer® образовываться. Затем в каждую лунку медленно добавляли комплексы ДНК/Виромер® RED.

96-луночный планшет (с повторами) инкубировали при 37°C в инкубаторе с CO2. Кроме того, варианты STING дикого типа обрабатывали агонистом STING 3'5' RpRpc-di-AMP (CDN, InvivoGen), аналогом клинического соединения ADU-S100, добавленным к клеткам через 24 часа инкубации при 10 м/мг. Супернатанты собирали через 48 часов и анализировали на наличие репортерных сигналов NF-KB-SEAP и IFN-Lucia в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, 10 мклсупернатантов клеточной культуры добавляли к 50 мл реагента QUANTI-Blue™ (InvivoGen)(который используется для измерения SEAP). Активацию NF-KB определялинаспектрофотометреSpectraMax® M3 (Molecular Devices) приабсорбции (Abs) 650 нм. Для измерения активности интерферона типа I от IFN-Lucia 10 мл супернатантов клеточной культуры добавляли к 50 мл QUANTI-Luc™, содержащему коэлентеразиновый субстрат для люциферазной реакции, которая дает световой сигнал, который количественно определяют с помощью SpectraMax® M3 люминометра и выражается в относительных световых единицах (RLU).

Как показано в таблице ниже, самые высокие ответы IFN типа I наблюдались для варианта, в котором CTT STING человека был заменен на CTT STING тасманского дьявола, и который содержал мутацию R284GSTINGGOF человека (huSTINGR284GtazCTT), а также от STING рыбки данио дикого типа с агонистом STINGCDN (zfSTINGWT + CDN). Однако, в отличие от STING рыбок данио дикого типа, у которых была очень высокая передача сигналов NF-KB, вариант huSTINGR284GtazCTT имел высокую передачу сигналов IFNI типа с гораздо более низкой активностью передачи сигналов NF-KB. Наилучшее соотношение более высокого уровня IFNI типа и более низкого уровня передачи сигналов NF-KB было обнаружено с вариантом STING тасманского дьявола, содержащим мутацию R284G STING GOF человека (tazSTING R284G).

Вариант STING	**ISRE-**	**± SD**	**NF-kI3-**	**± SD**
Нетрансфектировано	47.96	33.91	0.065	0.007
huSTING WT + CDN	170.8	38.15	0.100	0.014

huSTING WT	164.8	8.48	0.120	0.014
huSTING WT tazCTT +	31.47	10.59	0.060	0.000
tazST1NG WT + CDN	143.9	4.24	0.090	0.014
zfSTING WT + CDN	310.2	23.31	0.690	0.028

CMV catSTING WT WPRE	202.3	6.36	0.125	0.007
huSTING C206Y	175.3	36.03	0.105	0.007
huST1NG R284G	143.9	29.67	0.100	0.000
huSTING C206Y tazCTT	137.9	21.19	0.095	0.007
huSTING R284G tazCTT	301.2	61.46	0.250	0.127
tazST1NG C206Y	199.3	2.12	0.120	0.000
tazSTING R284G	217.3	19.08	0.105	0.007
muSTING C205Y	43.46	2.12	0.070	0.000
muSTING R283G	32.97	4.24	0.070	0.000
catSTING C205Y	202.3	23.31	0.135	0.007
catSTING R283G	157.4	10.60	0.120	0.000

Эти данные дополнительно демонстрируют возможность использования белков STING, отличных от человека, таких как белок STING тасманского дьявола, и комбинирования белков с конститутивными мутациями STING с приобретением функции у человека, чтобы повысить полезную активность интерферона типа I при минимизации иммуносупрессивной активности NF-KB в моноцитах человека.

Поскольку специалистам в данной области техники будут очевидны модификации, предполагается, что это изобретение ограничено только объемом прилагаемой формулы изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Тсанос Кристофер Д.
Гликман Лаура Хикс
Скобли Джустин
Ианелло Александр Чарльз Майкл
Кихои Хэксинг

<120> ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, СОЗДАННЫЕ ДЛЯ КОЛОНИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ, НАХОДЯЩИЕСЯ В ОПУХОЛИ ИММУННЫЕ КЛЕТКИ, И МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ

<130> 62131-1706PC

<140> Not Yet Assigned
<141> Herewith

<150> 62/962,140
<151> 2020-01-16

<150> 62/934,478
<151> 2019-11-12

<150> 62/828,990
<151> 2019-04-03

<150> 62/811,521
<151> 2019-02-27

<160> 377

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human PD-L1 shRNA target 1

<400> 1
gtagagtatg gtagcaata 19

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human PD-L1 shRNA target 2

<400> 2
gccgactaca agcgaatta 19

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human PD-L1 shRNA target 3

<400> 3
gacaagcagt gaccatcaa 19

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human PD-L1 shRNA target 4

<400> 4
gaatcaacac aacaactaa 19

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human PD-L1 shRNA target 5

<400> 5
gcacatcctc caaatgaaa 19

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human PD-L1 shRNA target 6

<400> 6
gtagcactga cattcatct 19

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human CTNNB1 shRNA target 1

<400> 7
gacagactgc cttcaaatt 19

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human CTNNB1 shRNA target 2

<400> 8
gcagctggaa ttctttcta 19

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human CTNNB1 shRNA target 3

<400> 9
gactaccagt tgtggttaa 19

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human CTNNB1 shRNA target 4

<400> 10
ggacacagca gcaatttgt 19

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human CTNNB1 shRNA target 5

<400> 11
ggatgttcac aaccgaatt 19

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human CTNNB1 shRNA target 6

<400> 12
gccacaagat tacaagaaa 19

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human SIRP-alpha shRNA target 1

<400> 13
gccaggtgag gaagttcta 19

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human SIRP-alpha shRNA target 2

<400> 14
gagctggctc ctggtgaat 19

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human SIRP-alpha shRNA target 3

<400> 15
gctgagaaca ctggatcta 19

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human SIRP-alpha shRNA target 4

<400> 16
gaagaatgcc agagaaata 19

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human SIRP-alpha shRNA target 5

<400> 17
ggacacaaat gatatcaca 19

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human SIRP-alpha shRNA target 6

<400> 18
ggagtatgcc agcattcag 19

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human Trex1 shRNA target 1

<400> 19
gcagcgcatg ggcgtcaat 19

<210> 20

<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human Trex1 shRNA target 2

<400> 20
ggcccaagga agagctata 19

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human Trex1 shRNA target 3

<400> 21
gcaccatcag gcccatgta 19

<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human Trex1 shRNA target 4

<400> 22
gccacaacca ggaacacta 19

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human Trex1 shRNA target 5

<400> 23
gcaggggtac caaggatct 19

<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human Trex1 shRNA target 6

<400> 24
gccacactgt atggactat 19

<210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VISTA shRNA target 1

<400> 25
gatgtgacct tctacaaga 19

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VISTA shRNA target 2

<400> 26
gaccaccatg gcaacttct 19

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VISTA shRNA target 3

<400> 27
ggtgcagaca ggcaaagat 19

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VISTA shRNA target 4

<400> 28
gtgcctgcat cgtaggaat 19

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VISTA shRNA target 5

<400> 29
gcaacattca agggattga 19

<210> 30
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VISTA shRNA target 6

<400> 30
gtccctgact ctccaaact 19

<210> 31
<211> 870

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> programmed death-ligand 1 (PD-L1), isoform 1

<400> 31
atgaggatat ttgctgtctt tatattcatg acctactggc atttgctgaa cgcatttact 60
gtcacggttc ccaaggacct atatgtggta gagtatggta gcaatatgac aattgaatgc 120
aaattcccag tagaaaaaca attagacctg gctgcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180
gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaaggttca gcatagtagc 240
tacagacaga gggcccggct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag 300
atcacagatg tgaaattgca ggatgcaggg gtgtaccgct gcatgatcag ctatggtggt 360
gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaaat caaccaaaga 420
attttggttg tggatccagt cacctctgaa catgaactga catgtcaggc tgagggctac 480
cccaaggccg aagtcatctg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540
accaccaatt ccaagagaga ggagaagctt ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600
acaacaacta atgagatttt ctactgcact tttaggagat tagatcctga ggaaaaccat 660
acagctgaat tggtcatccc agaactacct ctggcacatc ctccaaatga aaggactcac 720
ttggtaattc tgggagccat cttattatgc cttggtgtag cactgacatt catcttccgt 780
ttaagaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aaatgtggca tccaagatac aaactcaaag 840
aagcaaagtg atacacattt ggaggagacg 870

<210> 32
<211> 2343
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CTNNB1 (Beta-catenin), isoform 1

<400> 32
atggctactc aagctgattt gatggagttg gacatggcca tggaaccaga cagaaaagcg 60
gctgttagtc actggcagca acagtcttac ctggactctg gaatccattc tggtgccact 120
accacagctc cttctctgag tggtaaaggc aatcctgagg aagaggatgt ggatacctcc 180
caagtcctgt atgagtggga acagggattt tctcagtcct tcactcaaga acaagtagct 240
gatattgatg gacagtatgc aatgactcga gctcagaggg tacgagctgc tatgttccct 300
gagacattag atgagggcat gcagatccca tctacacagt ttgatgctgc tcatcccact 360
aatgtccagc gtttggctga accatcacag atgctgaaac atgcagttgt aaacttgatt 420
aactatcaag atgatgcaga acttgccaca cgtgcaatcc ctgaactgac aaaactgcta 480
aatgacgagg accaggtggt ggttaataag gctgcagtta tggtccatca gctttctaaa 540
aaggaagctt ccagacacgc tatcatgcgt tctcctcaga tggtgtctgc tattgtacgt 600
accatgcaga atacaaatga tgtagaaaca gctcgttgta ccgctgggac cttgcataac 660
ctttcccatc atcgtgaggg cttactggcc atctttaagt ctggaggcat tcctgccctg 720
gtgaaaatgc ttggttcacc agtggattct gtgttgtttt atgccattac aactctccac 780
aacctttttat tacatcaaga aggagctaaa atggcagtgc gtttagctgg tgggctgcag 840
aaaatggttg ccttgctcaa caaaacaaat gttaaattct tggctattac gacagactgc 900
cttcaaattt tagcttatgg caaccaagaa agcaagctca tcatactggc tagtggtgga 960
ccccaagctt tagtaaatat aatgaggacc tatacttacg aaaaactact gtggaccaca 1020
agcagagtgc tgaaggtgct atctgtctgc tctagtaata agccggctat tgtagaagct 1080
ggtggaatgc aagctttagg acttcacctg acagatccaa gtcaacgtct tgttcagaac 1140
tgtctttgga ctctcaggaa tctttcagat gctgcaacta aacaggaagg gatggaaggt 1200
ctccttggga ctcttgttca gcttctgggt tcagatgata taaatgtggt cacctgtgca 1260
gctggaattc tttctaacct cacttgcaat aattataaga acaagatgat ggtctgccaa 1320
gtgggtggta tagaggctct tgtgcgtact gtccttcggg ctggtgacag ggaagacatc 1380
actgagcctg ccatctgtgc tcttcgtcat ctgaccagcc gacaccaaga agcagagatg 1440
gcccagaatg cagttcgcct tcactatgga ctaccagttg tggttaagct cttacaccca 1500
ccatcccact ggcctctgat aaaggctact gttggattga ttcgaaatct tgccctttgt 1560
cccgcaaatc atgcaccttt gcgtgagcag ggtgccattc cacgactagt tcagttgctt 1620
gttcgtgcac atcaggatac ccagcgccgt acgtccatgg gtgggacaca gcagcaattt 1680
gtggaggggg tccgcatgga agaaatagtt gaaggttgta ccggagccct tcacatccta 1740

gctcgggatg ttcacaaccg aattgttatc agaggactaa ataccattcc attgtttgtg 1800
cagctgcttt attctcccat tgaaaacatc caaagagtag ctgcaggggt cctctgtgaa 1860
cttgctcagg acaaggaagc tgcagaagct attgaagctg agggagccac agctcctctg 1920
acagagttac ttcactctag gaatgaaggt gtggcgacat atgcagctgc tgttttgttc 1980
cgaatgtctg aggacaagcc acaagattac aagaaacggc tttcagttga gctgaccagc 2040
tctctcttca gaacagagcc aatggcttgg aatgagactg ctgatcttgg acttgatatt 2100
ggtgcccagg gagaacccct tggatatcgc caggatgatc ctagctatcg ttcttttcac 2160
tctggtggat atggccagga tgccttgggt atggacccca tgatggaaca tgagatgggt 2220
ggccaccacc ctggtgctga ctatccagtt gatgggctgc cagatctggg gcatgcccag 2280
gacctcatgg atgggctgcc tccaggtgac agcaatcagc tggcctggtt tgatactgac 2340
ctg 2343

<210> 33
<211> 1512
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> signal regulatory protein alpha (SIRP-alpha)
isoform 1

<400> 33
atggagcccg ccggcccggc ccccggccgc ctcgggccgc tgctctgcct gctgctcgcc 60
gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac 120
aagtccgtgt tggttgcagc tggagagaca gccactctgc gctgcactgc gacctctctg 180
atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac caggccggga attaatctac 240
aatcaaaaag aaggccactt cccccgggta acaactgttt cagacctcac aaagagaaac 300
aacatggact tttccatccg catcggtaac atcaccccag cagatgccgg cacctactac 360
tgtgtgaagt tccggaaagg gagccccgat gacgtggagt ttaagtctgg agcaggcact 420
gagctgtctg tgcgcgccaa accctctgcc cccgtggtat cgggccctgc ggcgagggcc 480
acacctcagc acacagtgag cttcacctgc gagtcccacg gcttctcacc cagagacatc 540
accctgaaat ggttcaaaaa tgggaatgag ctctcagact tccagaccaa cgtggacccc 600
gtaggagaga gcgtgtccta cagcatccac agcacagcca aggtggtgct gacccgcgag 660
gacgttcact ctcaagtcat ctgcgaggtg gcccacgtca ccttgcaggg ggaccctctt 720
cgtgggactg ccaacttgtc tgagaccatc cgagttccac ccaccttgga ggttactcaa 780
cagcccgtga gggcagagaa ccaggtgaat gtcacctgcc aggtgaggaa gttctacccc 840
cagagactac agctgacctg gttggagaat ggaaacgtgt cccggacaga aacggcctca 900
accgttacag agaacaagga tggtacctac aactggatga gctggctcct ggtgaatgta 960
tctgcccaca gggatgatgt gaagctcacc tgccaggtgg agcatgacgg gcagccagcg 1020
gtcagcaaaa gccatgacct gaaggtctca gcccacccga aggagcaggg ctcaaatacc 1080
gccgctgaga acactggatc taatgaacgg aacatctata ttgtggtggg tgtggtgtgc 1140
accttgctgg tggccctact gatggcggcc ctctacctcg tccgaatcag acagaagaaa 1200
gcccagggct ccacttcttc tacaaggttg catgagcccg agaagaatgc cagagaaata 1260
acacaggaca caaatgatat cacatatgca gacctgaacc tgcccaaggg gaagaagcct 1320
gctccccagg ctgcggagcc caacaaccac acggagtatg ccagcattca gaccagcccg 1380
cagcccgcgt cggaggacac cctcacctat gctgacctgg acatggtcca cctcaaccgg 1440
acccccaagc agccggcccc caagcctgag ccgtccttct cagagtacgc cagcgtccag 1500
gtcccgagga ag 1512

<210> 34
<211> 1108
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TREX1 isoform 1

<400> 34
aatgggccct ggagctcgca gacagggcag gattgtgcag ggaaggcctg agatgtgctt 60
ctgcccaccc cctaccccac tccctccct tcggatctta acactgggca ctcacacacc 120
caccccatgc tcctctccag gctcagcagc aggtacgtac ccaaccatgg gctcgcaggc 180

cctgcccccg gggcccatgc agaccctcat ctttttcgac atggaggcca ctggcttgcc 240
cttctcccag cccaaggtca cggagctgtg cctgctggct gtccacagat gtgccctgga 300
gagccccccc acctctcagg ggccacctcc cacagttcct ccaccaccgc gtgtggtaga 360
caagctctcc ctgtgtgtgg ctccggggaa ggcctgcagc cctgcagcca gcgagatcac 420
aggtctgagc acagctgtgc tggcagcgca tgggcgtcaa tgttttgatg acaacctggc 480
caacctgctc ctagccttcc tgcggcgcca gccacagccc tggtgcctgg tggcacacaa 540
tggtgaccgc tacgacttcc ccctgctcca agcagagctg gctatgctgg gcctcaccag 600
tgctctggat ggtgccttct gtgtggatag catcactgcg ctgaaggccc tggagcgagc 660
aagcagcccc tcagaacacg gcccaaggaa gagctatagc ctaggcagca tctacactcg 720
cctgtatggg cagtcccctc cagactcgca cacggctgag ggtgatgtcc tggccctgct 780
cagcatctgt cagtggagac cacaggccct gctgcggtgg gtggatgctc acgccaggcc 840
tttcggcacc atcaggccca tgtatggggt cacagcctct gctaggacca agccaagacc 900
atctgctgtc acaaccactg cacacctggc cacaaccagg aacactagtc ccagccttgg 960
agagagcagg ggtaccaagg atcttcctcc agtgaaggac cctggagccc tatccaggga 1020
ggggctgctg gccccactgg gtctgctggc catcctgacc ttggcagtag ccacactgta 1080
tggactatcc ctggccacac ctggggag 1108

<210> 35
<211> 933
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> V-domain Ig suppressor of T cell activation
(VISTA)

<400> 35
atgggcgtcc ccacggccct ggaggccggc agctggcgct ggggatccct gctcttcgct 60
ctcttcctgg ctgcgtccct aggtccggtg gcagccttca aggtcgccac gccgtattcc 120
ctgtatgtct gtcccgaggg gcagaacgtc accctcacct gcaggctctt gggccctgtg 180
gacaaagggc acgatgtgac cttctacaag acgtggtacc gcagctcgag gggcgaggtg 240
cagacctgct cagagcgccg gcccatccgc aacctcacgt tccaggacct tcacctgcac 300
catggaggcc accaggctgc caacaccagc cacgacctgg ctcagcgcca cgggctggag 360
tcggcctccg accaccatgg caacttctcc atcaccatgc gcaacctgac cctgctggat 420
agcggcctct actgctgcct ggtggtggag atcaggcacc accactcgga gcacagggtc 480
catggtgcca tggagctgca ggtgcagaca ggcaaagatg caccatccaa ctgtgtggtg 540
tacccatcct cctcccagga tagtgaaaac atcacggctg cagccctggc tacgggtgcc 600
tgcatcgtag gaatcctctg cctccccctc atcctgctcc tggtctacaa gcaaaggcag 660
gcagcctcca accgccgtgc ccaggagctg gtgcggatgg acagcaacat tcaagggatt 720
gaaaaccccg gctttgaagc ctcaccacct gcccagggga tacccgaggc caaagtcagg 780
caccccctgt cctatgtggc ccagcggcag ccttctgagt ctgggcggca tctgctttcg 840
gagcccagca ccccccctgtc tcctccaggc cccggagacg tcttcttccc atccctggac 900
cctgtccctg actctccaaa ctttgaggtc atc 933

<210> 36
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNA-encoding sequence for huPD-L1

<400> 36
gtagagtatg gtagcaatat ctagagtatt gctaccatac tctac 45

<210> 37
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shRNA-encoding sequence for huCTNNB1

<400> 37
gacagactgc cttcaaattt ctagagaatt tgaaggcagt ctgtc 45

<210> 38
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNA-encoding sequence for huSIRPalpha

<400> 38
gccaggtgag gaagttctat ctagagtaga acttcctcac ctggc 45

<210> 39
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNA-encoding sequence for huTREX1

<400> 39
gcagcgcatg ggcgtcaatt ctagagattg acgcccatgc gctgc 45

<210> 40
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNA-encoding sequence for huVISTA

<400> 40
gaccaccatg gcaacttctt ctagagagaa gttgccatgg tggtc 45

<210> 41
<211> 3220
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pEQU6 vector

<400> 41
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720
tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780
gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840

aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900
ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960
agtttttttct cgagtagcta gagaattcat ggtaatagcg atgactaata cgtagatgta 1020
ctgccaagta ggaaagtccc ataaggtcat gtactgggca taatgccagg cgggccattt 1080
accgtcattg acgtcaatag ggggcgtact tggcatatga tacacttgat gtactgccaa 1140
gtgggcagtt taccgtaaat agtccaccca ttgacgtcaa tggaaagtcc ctattggcgt 1200
tactatggga acatacgtca ttattgacgt caatgggcgg gggtcgttgg gcggtcagcc 1260
aggcgggcca tttaccgtaa gttatgtaac gcggaactcc atatatgggc tatgaactaa 1320
tgaccccgta attgattact attaataact agacccagct ttcttgtaca aagttggcat 1380
tataagaaag cattgcttat caatttgttg caacgaacag gtcactatca gtcaaaataa 1440
aatcattatt tgccatccag ctgatatccc ctatagtgag tcgtattaca tggtcatagc 1500
tgtttcctgg cagctctggc ccgtgtctca aaatctctga tgttacattg cacaagataa 1560
aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata caaggggtgt 1620
tatgagccat attcaacggg aaacgtcgag gccgcgatta aattccaaca tggatgctga 1680
tttatatggg tataaatggg ctcgcgataa tgtcgggcaa tcaggtgcga caatctatcg 1740
cttgtatggg aagcccgatg cgccagagtt gtttctgaaa catggcaaag gtagcgttgc 1800
caatgatgtt acagatgaga tggtcagact aaactggctg acggaattta tgcctcttcc 1860
gaccatcaag cattttatcc gtactcctga tgatgcatgg ttactcacca ctgcgatccc 1920
cggaaaaaca gcattccagg tattagaaga atatcctgat tcaggtgaaa atattgttga 1980
tgcgctggca gtgttcctgc gccggttgca ttcgattcct gtttgtaatt gtccttttaa 2040
cagcgatcgc gtatttcgtc tcgctcaggc gcaatcacga atgaataacg gtttggttga 2100
tgcgagtgat tttgatgacg agcgtaatgg ctggcctgtt gaacaagtct ggaaagaaat 2160
gcataaactt ttgccattct caccggattc agtcgtcact catggtgatt tctcacttga 2220
taaccttatt tttgacgagg ggaaattaat aggttgtatt gatgttggac gagtcggaat 2280
cgcagaccga taccaggatc ttgccatcct atggaactgc ctcggtgagt tttctccttc 2340
attacagaaa cggctttttc aaaaatatgg tattgataat cctgatatga ataaattgca 2400
gtttcatttg atgctcgatg agtttttcta atcagaattg gttaattggt tgtaacactg 2460
gcagagcatt acgctgactt gacgggacgg cgcaagctca tgaccaaaat cccttaacgt 2520
gagttacgcg tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 2580
agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc 2640
ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag 2700
cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 2760
gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag tggctgctgc 2820
cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 2880
gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 2940
caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag 3000
aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct 3060
tccagggggа aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga 3120
gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 3180
ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 3220

<210> 42
<211> 3802
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pEQU6-H1 Vector

<400> 42
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720
tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780
gtatgagacc actccctagg tttttgtcga cagatctggc gcgccatagt ggccagcggc 840
cgcaggtaag ccagcccagg cctcgccctc cagctcaagg cgggacaggt gccctagagt 900
agcctgcatc cagggacagg ccccagccgg gtgctgacac gtccacctcc atctcttcct 960
caggtctgcc cgggtggcat ccctgtgacc cctccccagt gcctctcctg gccctggaag 1020
ttgccactcc agtgcccacc agccttgtcc taataaaatt aagttgcatc attttgtctg 1080
actaggtgtc cttctataat attatggggt ggaggggggt ggtatggagc aaggggccca 1140
agttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt 1200
cacaaataaa gcatttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt 1260
atcttatcat gtctggatcc aaggtcgggc aggaagaggg cctatttccc atgattcctt 1320
catatttgca tatacgatac aaggctgtta gagagataat tagaattaat ttgactgtaa 1380
acacaaagat attagtacaa aatacgtgac gtagaaagta ataatttctt gggtagtttg 1440
cagttttaaa attatgtttt aaaatggact atcatatgct taccgtaact tgaaagtatt 1500
tcgatttctt ggctttatat atcttgtgga aaggacgaaa ctagtttttt ctcgagtagc 1560
tagagaattc atggtaatag cgatgactaa tacgtagatg tactgccaag taggaaagtc 1620
ccataaggtc atgtactggg cataatgcca ggcgggccat ttaccgtcat tgacgtcaat 1680
aggggggcgta cttggcatat gatacacttg atgtactgcc aagtgggcag tttaccgtaa 1740
atagtccacc cattgacgtc aatggaaagt ccctattggc gttactatgg gaacatacgt 1800
cattattgac gtcaatgggc gggggtcgtt gggcggtcag ccaggcgggc catttaccgt 1860
aagttatgta acgcggaact ccatatatgg gctatgaact aatgaccccg taattgatta 1920
ctattaataa ctagacccag ctttcttgta caaagttggc attataagaa agcattgctt 1980
atcaatttgt tgcaacgaac aggtcactat cagtcaaaat aaaatcatta tttgccatcc 2040
agctgatatc ccctatagtg agtcgtatta catggtcata gctgtttcct ggcagctctg 2100
gcccgtgtct caaaatctct gatgttacat tgcacaagat aaaaatatat catcatgaac 2160
aataaaactg tctgcttaca taaacagtaa tacaaggggt gttatgagcc atattcaacg 2220
ggaaacgtcg aggccgcgat taaattccaa catggatgct gatttatatg ggtataaatg 2280
ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgcttgtatg ggaagcccga 2340
tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga 2400
gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca agcattttat 2460
ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgatc cccggaaaaa cagcattcca 2520
ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatattgtt gatgcgctgg cagtgttcct 2580
gcgccggttg cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc gcgtatttcg 2640
tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga 2700
cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataaac ttttgccatt 2760
ctcaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataacctta tttttgacga 2820
ggggaaatta ataggttgta ttgatgttgg acgagtcgga atcgcagacc gataccagga 2880
tcttgccatc ctatggaact gcctcggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt 2940
tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga 3000
tgagtttttc taatcagaat tggttaattg gttgtaacac tggcagagca ttacgctgac 3060
ttgacgggac ggcgcaagct catgaccaaa atcccttaac gtgagttacg cgtcgttcca 3120
ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 3180
cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga 3240
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa 3300
tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 3360
tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 3420
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cgggctgaac 3480
gggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 3540
acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc 3600
ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg 3660
gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 3720
ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 3780
ggccttttgc tggccttttg ct 3802

<210> 43
<211> 3263
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pEQU6-shPDL1-shRNA Vector

<400> 43
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720
tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780
gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840
aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900
ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960
aggtagagta tggtagcaat atctagagta ttgctaccat actctacttt tttcgagtag 1020
ctagagaatt catggtaata gcgatgacta atacgtagat gtactgccaa gtaggaaagt 1080
cccataaggt catgtactgg gcataatgcc aggcgggcca tttaccgtca ttgacgtcaa 1140
taggggcgt acttggcata tgatacactt gatgtactgc caagtgggca gtttaccgta 1200
aatagtccac ccattgacgt caatggaaag tccctattgg cgttactatg ggaacatacg 1260
tcattattga cgtcaatggg cgggggtcgt tgggcggtca gccaggcggg ccatttaccg 1320
taagttatgt aacgcggaac tccatatatg ggctatgaac taatgacccc gtaattgatt 1380
actattaata actagaccca gctttcttgt acaaagttgg cattataaga aagcattgct 1440
tatcaatttg ttgcaacgaa caggtcacta tcagtcaaaa taaaatcatt atttgccatc 1500
cagctgatat cccctatagt gagtcgtatt acatggtcat agctgtttcc tggcagctct 1560
ggcccgtgtc tcaaaatctc tgatgttaca ttgcacaaga taaaaatata tcatcatgaa 1620
caataaaact gtctgcttac ataaacagta atacaagggg tgttatgagc catattcaac 1680
gggaaacgtc gaggccgcga ttaaattcca acatggatgc tgatttatat gggtataaat 1740
gggctcgcga taatgtcggg caatcaggtg cgacaatcta tcgcttgtat gggaagcccg 1800
atgcgccaga gttgtttctg aaacatggca aaggtagcgt tgccaatgat gttacagatg 1860
agatggtcag actaaactgg ctgacggaat ttatgcctct tccgaccatc aagcatttta 1920
tccgtactcc tgatgatgca tggttactca ccactgcgat ccccggaaaa acagcattcc 1980
aggtattaga agaatatcct gattcaggtg aaaatattgt tgatgcgctg gcagtgttcc 2040
tgcgccggtt gcattcgatt cctgtttgta attgtccttt taacagcgat cgcgtatttc 2100
gtctcgctca ggcgcaatca cgaatgaata acggtttggt tgatgcgagt gattttgatg 2160
acgagcgtaa tggctggcct gttgaacaag tctggaaaga aatgcataaa cttttgccat 2220
tctcaccgga ttcagtcgtc actcatggtg atttctcact tgataacctt atttttgacg 2280
aggggaaatt aataggttgt attgatgttg gacgagtcgg aatcgcagac cgataccagg 2340
atcttgccat cctatggaac tgcctcggtg agttttctcc ttcattacag aaacggcttt 2400
ttcaaaaata tggtattgat aatcctgata tgaataaatt gcagtttcat ttgatgctcg 2460
atgagttttt ctaatcagaa ttggttaatt ggttgtaaca ctggcagagc attacgctga 2520
cttgacggga cggcgcaagc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagttac gcgtcgttcc 2580
actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc 2640
gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg 2700
atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa 2760
atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc 2820
ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt 2880
gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa 2940
cgggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc 3000
tacagcgtga gcattgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc 3060
cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct 3120
ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat 3180
gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc 3240
tggccttttg ctggcctttt gct 3263

<210> 44
<211> 3888
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pEQU6-shPDL1-H1-shCTNNB1 Vector

<400> 44
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720
tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780
gtatgagacc actccctagg acagactgcc ttcaaatttc tagagaattt gaaggcagtc 840
tgtctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900
aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960
aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020
catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080
accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140
aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260
tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320
tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380
tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440
caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500
tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560
tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta gcaatatcta gagtattgct 1620
accatactct actttttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680
tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740
ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800
actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860
attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920
ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980
tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040
gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100
caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160
gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220
caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280
aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340
gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400
atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460
agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520
cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580
gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640
attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700
ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760
ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820
aaagaaatgc ataaacttttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880
tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940
gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000
tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060
aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120
taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180
cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240
tcttcttgag atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300

ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctcttttttcc gaaggtaact 3360
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 45
<211> 3888
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pEQU6-shPDL1-H1-shSIRPalpha Vector

<400> 45
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720
tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780
gtatgagacc actccctagg ccaggtgagg aagttctatc tagagtagaa cttcctcacc 840
tggctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900
aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960
aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020
catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080
accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140
aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260
tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320
tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380
tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440
caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500
tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560
tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta gcaatatcta gagtattgct 1620
accatactct actttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680
tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740
ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800
actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860
attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920
ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980
tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040
gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100
caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160
gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220
caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280
aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340
gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400
atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460

agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520
cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580
gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640
attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700
ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760
ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820
aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880
tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940
gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000
tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060
aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120
taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180
cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240
tcttcttgag atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctcttttttcc gaaggtaact 3360
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 46
<211> 3888
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pEQU6-shPDL1-H1-shTREX1

<400> 46
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720
tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780
gtatgagacc actccctagg cagcgcatgg gcgtcaattc tagagattga cgcccatgcg 840
ctgctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900
aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960
aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020
catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080
accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140
aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260
tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320
tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380
tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440
caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500
tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560
tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta gcaatatcta gagtattgct 1620

accatactct acttttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680
tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740
ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800
actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860
attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920
ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980
tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040
gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100
caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160
gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220
caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280
aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340
gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400
atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460
agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520
cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580
gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640
attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700
ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760
ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820
aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880
tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940
gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000
tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060
aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120
taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180
cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 47
<211> 3888
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pEQU6-shPDL1-H1-shVISTA

<400> 47
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720
tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780

gtatgagacc actccctagg accaccatgg caacttcttc tagagagaag ttgccatggt 840
ggtctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900
aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960
aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020
catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080
accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140
aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260
tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320
tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380
tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440
caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500
tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560
tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta gcaatatcta gagtattgct 1620
accatactct actttttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680
tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740
ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800
actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860
attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920
ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980
tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040
gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100
caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160
gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220
caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280
aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340
gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400
atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460
agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520
cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580
gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640
attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700
ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760
ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820
aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880
tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940
gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000
tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060
aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120
taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180
cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240
tcttcttgag atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctcttttttcc gaaggtaact 3360
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 48
<211> 1104
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> Strain LT2 Aspartate-semialdehyde dehydrogenase
(asd)

<400> 48
atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggaatggtcg gctctgttct catgcaacgc 60
atggtagagg agcgcgattt cgacgctatt cgccctgttt tcttttctac ctcccagttt 120
ggacaggcgg cgcccacctt cggcgacacc tccaccggca cgctacagga cgcttttgat 180
ctggatgcgc taaaagcgct cgatatcatc gtgacctgcc agggcggcga ttataccaac 240
gaaatttatc caaagctgcg cgaaagcgga tggcagggtt actggattga tgcggcttct 300
acgctgcgca tgaaagatga tgccattatt attctcgacc cggtcaacca ggacgtgatt 360
accgacggcc tgaacaatgg cgtgaagacc tttgtgggcg gtaactgtac cgttagcctg 420
atgttgatgt cgctgggcgg tctctttgcc cataatctcg ttgactgggt atccgtcgcg 480
acctatcagg ccgcctccgg cggcggcgcg cgccatatgc gcgagctgtt aacccagatg 540
ggtcagttgt atggccatgt cgccgatgaa ctggcgacgc cgtcttccgc aattcttgat 600
attgaacgca aagttacggc attgacccgc agcggcgagc tgccggttga taactttggc 660
gtaccgctgg cgggaagcct gatcccctgg atcgacaaac agctcgataa cggccagagc 720
cgcgaagagt ggaaaggcca ggcggaaacc aacaagattc tcaatactgc ctctgtgatt 780
ccggttgatg gtttgtgtgt gcgcgtcggc gcgctgcgct gtcacagcca ggcgttcacc 840
atcaagctga aaaaagaggt atccattccg acggtggaag aactgctggc ggcacataat 900
ccgtgggcga aagtggtgcc gaacgatcgt gatatcacta tgcgcgaatt aaccccggcg 960
gcggtgaccg gcacgttgac tacgccggtt ggtcgtctgc gtaagctgaa catggggcca 1020
gagttcttgt cggcgtttac cgtaggcgac cagttgttat ggggcgccgc cgagccgctg 1080
cgtcgaatgc tgcgccagtt ggcg 1104

<210> 49
<211> 861
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> Strain LT2 TSX

<400> 49
atgaaaaaaa ctttactcgc agtcagcgca gcgctggcgc tcacctcatc ttttactgct 60
aacgcagcag aaaatgatca gccgcagtat ttgtccgact ggtggcacca gagcgtaaac 120
gtggtaggca gctaccatac ccgtttctcg ccgaaattga acaacgacgt ctatctggaa 180
tatgaagcat ttgccaaaaa agactggttt gatttctacg gctatatcga tattcccaaa 240
acctttgatt ggggtaacgg caacgataaa ggtatctggt ccgacggttc tccgctgttc 300
atggaaatcg aaccgcgttt ctcaattgat aagctgaccg gcgcagacct gagcttcggc 360
ccgtttaaag agtggtattt cgccaacaac tacatctacg atatgggcga taacaaagcc 420
agccgccaga gcacgtggta tatgggtctg gggaccgata tcgacaccgg cctgccgatg 480
ggtctgtcgc tgaacgtgta tgcgaaatat cagtggcaaa actacggcgc gtccaatgaa 540
aacgaatggg acggctaccg tttcaaagtg aaatacttcg tccccatcac cgatctgtgg 600
ggcggtaaac tgagctatat cggctttacc aactttgact ggggatctga tttaggcgac 660
gatccgaacc gtaccagcaa ctccatcgct tccagccata tcctggcgct gaactacgat 720
cactggcact actcggtcgt tgcgcgttac ttccataacg gcggacagtg gcagaatggc 780
gcaaaactga actggggcga cggcgatttc agcgcgaaat ctaccggctg gggcggctac 840
ctggtcgtgg gttacaactt c 861

<210> 50
<211> 864
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> programmed cell death protein 1 (PD-1)

<400> 50
atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60
ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300

cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 480
aggccagccg gccagttcca aaccctggtg gttggtgtcg tgggcggcct gctgggcagc 540
ctggtgctgc tagtctgggt cctggccgtc atctgctccc gggccgcacg agggacaata 600
ggagccaggc gcaccggcca gcccctgaag gaggacccct cagccgtgcc tgtgttctct 660
gtggactatg gggagctgga tttccagtgg cgagagaaga ccccggagcc ccccgtgccc 720
tgtgtccctg agcagacgga gtatgccacc attgtctttc ctagcggaat gggcacctca 780
tcccccgccc gcaggggctc agctgacggc cctcggagtg cccagccact gaggcctgag 840
gatggacact gctcttggcc cctc 864

<210> 51
<211> 933
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> programmed cell death protein 2 (PD-2), isoform 1

<400> 51
atggctgccg ccggggccag gcctgtggag ctgggcttcg ccgagtcggc gccggcgtgg 60
cgactgcgca gcgagcagtt ccccagcaag gtgtatgcgc cgctgcctgg ccgcccggac 120
gccttccacc gctgcatctt cctcttctgc tgccgcgagc agccgtgctg tgccggcctg 180
cgagttttta ggaatcaact acccaggaaa aacgattttt actcatatga gccaccttct 240
gagaatcctc ccccagaaac aggagaatca gtgtgtctcc agcttaagtc tggtgctcat 300
ctctgcaggg tttgtggctg tttaggcccc aaaacgtgct ccagatgcca caaagcatat 360
tactgcagca aggagcatca gaccctagac tggagattgg gacataagca ggcttgtgca 420
caaccagatc atctggacca tataattcca gaccacaact tccttttttcc agaatttgaa 480
attgtaatag aaacagaaga tgagattatg cctgaggttg tggaaaagga agattactca 540
gagattatag ggagcatggg tgaagcactt gaggaagaac tggattccat ggcaaaacat 600
gaatccaggg aagataaaat ttttcagaag tttaaaactc agatagccct tgaaccagaa 660
cagattctta gatatggcag aggtattgcc cccatctgga tttctggtga aaatattcct 720
caagaaaagg atattccaga ttgcccctgt ggtgccaaga gaatattgga attccaggtc 780
atgcctcagc tcctaaacta cctgaaggct gacagactgg gcaagagcat tgactggggc 840
atcctggctg tcttcacctg tgctgagagc tgcagcttgg gtactggcta tacagaagaa 900
tttgtgtgga agcaggatgt aacagataca ccg 933

<210> 52
<211> 819
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> programmed death-ligand 2 (PD-L2), isoform 1

<400> 52
atgatcttcc tcctgctaat gttgagcctg gaattgcagc ttcaccagat agcagcttta 60
ttcacagtga cagtccctaa ggaactgtac ataatagagc atggcagcaa tgtgaccctg 120
gaatgcaact ttgacactgg aagtcatgtg aaccttggag caataacagc cagtttgcaa 180
aaggtggaaa atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg 240
cccctaggga aggcctcgtt ccacatacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac 300
caatgcataa tcatctatgg ggtcgcctgg gactacaagt acctgactct gaaagtcaaa 360
gcttcctaca ggaaaataaa cactcacatc ctaaaggttc cagaaacaga tgaggtagag 420
ctcacctgcc aggctacagg ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcgtt 480
cctgccaaca ccagccactc caggacccct gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540
cgcctaaagc caccccctgg cagaaacttc agctgtgtgt tctggaatac tcacgtgagg 600
gaacttactt tggccagcat tgaccttcaa agtcagatgg aacccaggac ccatccaact 660
tggctgcttc acattttcat cccctcctgc atcattgctt tcattttcat agccacagtg 720
atagccctaa gaaaacaact ctgtcaaaag ctgtattctt caaaagacac aacaaaaaga 780
cctgtcacca caacaaagag ggaagtgaac agtgctatc 819

<210> 53
<211> 669
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
(CTLA-4), isoform 1

<400> 53
atggcttgcc ttggatttca gcggcacaag gctcagctga acctggctac caggacctgg 60
ccctgcactc tcctgttttt tcttctcttc atccctgtct tctgcaaagc aatgcacgtg 120
gcccagcctg ctgtggtact ggccagcagc cgaggcatcg ccagctttgt gtgtgagtat 180
gcatctccag gcaaagccac tgaggtccgg gtgacagtgc ttcggcaggc tgacagccag 240
gtgactgaag tctgtgcggc aacctacatg atggggaatg agttgacctt cctagatgat 300
tccatctgca cgggcacctc cagtggaaat caagtgaacc tcactatcca aggactgagg 360
gccatggaca cgggactcta catctgcaag gtggagctca tgtacccacc gccatactac 420
ctgggcatag gcaacggaac ccagatttat gtaattgatc cagaaccgtg cccagattct 480
gacttcctcc tctggatcct tgcagcagtt agttcggggt tgtttttta tagctttctc 540
ctcacagctg tttctttgag caaaatgcta aagaaaagaa gccctcttac aacaggggtc 600
tatgtgaaaa tgcccccaac agagccagaa tgtgaaaagc aatttcagcc ttattttatt 660
cccatcaat 669

<210> 54
<211> 969
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD47 transcript variant 1

<400> 54
atgtggcccc tggtagcggc gctgttgctg ggctcggcgt gctgcggatc agctcagcta 60
ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc acgttttgta atgacactgt cgtcattcca 120
tgctttgtta ctaatatgga ggcacaaaac actactgaag tatacgtaaa gtggaaattt 180
aaaggaagag atatttacac ctttgatgga gctctaaaca agtccactgt ccccactgac 240
tttagtagtg caaaaattga agtctcacaa ttactaaaag gagatgcctc tttgaagatg 300
gataagagtg atgctgtctc acacacagga aactacactt gtgaagtaac agaattaacc 360
agagaaggtg aaacgatcat cgagctaaaa tatcgtgttg tttcatggtt ttctccaaat 420
gaaaatattc ttattgttat tttcccaatt tttgctatac tcctgttctg gggacagttt 480
ggtattaaaa cacttaaata tagatccggt ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt 540
gttgctggac tagtgatcac tgtcattgtc attgttggag ccattctttt cgtcccaggt 600
gaatattcat taaagaatgc tactggcctt ggtttaattg tgacttctac agggatatta 660
atattacttc actactatgt gtttagtaca gcgattggat taacctcctt cgtcattgcc 720
atattggtta ttcaggtgat agcctatatc ctcgctgtgg ttggactgag tctctgtatt 780
gcggcgtgta taccaatgca tggccctctt ctgatttcag gtttgagtat cttagctcta 840
gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa tttgtggctt ccaatcagaa gactatacaa 900
cctcctagga aagctgtaga ggaacccctt aatgcattca aagaatcaaa aggaatgatg 960
aatgatgaa 969

<210> 55
<211> 1209
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 1

<400> 55
atggcacacg ctatggaaaa ctcctggaca atcagtaaag agtaccatat tgatgaagaa 60
gtgggctttg ctctgccaaa tccacaggaa aatctacctg atttttataa tgactggatg 120

ttcattgcta aacatctgcc tgatctcata gagtctggcc agcttcgaga aagagttgag 180
aagttaaaca tgctcagcat tgatcatctc acagaccaca agtcacagcg ccttgcacgt 240
ctagttctgg gatgcatcac catggcatat gtgtggggca aaggtcatgg agatgtccgt 300
aaggtcttgc caagaaatat tgctgttcct tactgccaac tctccaagaa actggaactg 360
cctcctattt tggtttatgc agactgtgtc ttggcaaact ggaagaaaaa ggatcctaat 420
aagcccctga cttatgagaa catggacgtt ttgttctcat ttcgtgatgg agactgcagt 480
aaaggattct tcctggtctc tctattggtg gaaatagcag ctgcttctgc aatcaaagta 540
attcctactg tattcaaggc aatgcaaatg caagaacggg acactttgct aaaggcgctg 600
ttggaaatag cttcttgctt ggagaaagcc cttcaagtgt ttcaccaaat ccacgatcat 660
gtgaacccaa aagcattttt cagtgttctt cgcatatatt tgtctggctg gaaaggcaac 720
ccccagctat cagacggtct ggtgtatgaa aggttctggg aagacccaaa ggagtttgca 780
gggggcagtg caggccaaag cagcgtcttt cagtgctttg acgtcctgct gggcatccag 840
cagactgctg gtggaggaca tgctgctcag ttcctccagg acatgagaag atatatgcca 900
ccagctcaca ggaacttcct gtgctcatta gagtcaaatc cctcagtccg tgagtttgtc 960
ctttcaaaag gtgatgctgg cctgcgggaa gcttatgacg cctgtgtgaa agctctggtc 1020
tccctgagga gctaccatct gcaaatcgtg actaagtaca tcctgattcc tgcaagccag 1080
cagccaaagg agaataagac ctctgaagac ccttcaaaac tggaagccaa aggaactgga 1140
ggcactgatt taatgaattt cctgaagact gtaagaagta caactgagaa atccctttg 1200
aaggaaggt 1209

<210> 56
<211> 1260
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 2

<400> 56
atgttgcatt ttcattatta tgatacttca aacaaaataa tggagcccca cagaccgaat 60
gtgaagacag cagtgccatt gtctttggaa agctatcaca tatctgaaga gtatggcttt 120
cttcttccag attctctgaa agaacttcca gatcattata ggccttggat ggaaattgcc 180
aacaaacttc ctcaattgat tgatgctcac cagcttcaag ctcatgtgga caagatgccc 240
ctgctgagct gccagttcct gaagggtcac cgggagcagc gcctggccca cctggtcctg 300
agcttcctca ccatgggtta tgtctggcag gaaggagagg cgcagcctgc agaggtcctg 360
ccaaggaatc ttgcccttcc atttgtcgaa gtctccagga acttggggct ccctcctatc 420
ctggtccact cagacttggt gctgacgaac tggaccaaaa aagatccaga cggattcctg 480
gaaattggga acctggagac catcatctca tttcctgggg gagagagcct gcatggtttt 540
atactggtga ctgctttggt agagaaagaa gcagtgcctg ggataaaggc tcttgttcag 600
gccacgaatg ctatcttgca gcccaaccag gaggccctgc tccaagccct gcagcgactg 660
agactgtcta ttcaggacat caccaaaacc ttaggacaga tgcatgatta tgtagatcca 720
gacatatttt atgcaggcat ccggatcttt ctctctggat ggaaagacaa cccagcaatg 780
cctgcagggc tgatgtatga aggagtttcc caagagcccc tgaaatactc cggcgggagt 840
gcagctcaga gcacagtgct tcatgccttt gatgagttct taggcattcg tcatagcaag 900
gaaagtggtg actttctgta cagaatgagg gattacatgc ctccttccca taaggccttc 960
atagaagaca tccactcagc accttccctg agggactaca tcctgtcatc tggacaggac 1020
cacttgctga cagcttataa ccagtgtgtg caggccctgg cagagctgcg gagctatcac 1080
atcaccatgg tcaccaaata cctcatcaca gctgcagcca aggcaaagca tgggaagcca 1140
aaccatctcc cagggcctcc tcaggcttta aaagacaggg gcacaggtgg aaccgcagtt 1200
atgagctttc ttaagagtgt cagggataag accttggagt caatccttca cccacgtggt 1260

<210> 57
<211> 2310
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> signal transducer and activator of transcription 3
(STAT3)

<400> 57

atggcccaat ggaatcagct acagcagctt gacacacggt acctggagca gctccatcag 60
ctctacagtg acagcttccc aatggagctg cggcagtttc tggccccttg gattgagagt 120
caagattggg catatgcggc cagcaaagaa tcacatgcca ctttggtgtt tcataatctc 180
ctgggagaga ttgaccagca gtatagccgc ttcctgcaag agtcgaatgt tctctatcag 240
cacaatctac gaagaatcaa gcagtttctt cagagcaggt atcttgagaa gccaatggag 300
attgcccgga ttgtggcccg gtgcctgtgg gaagaatcac gccttctaca gactgcagcc 360
actgcggccc agcaaggggg ccaggccaac caccccacag cagccgtggt gacggagaag 420
cagcagatgc tggagcagca ccttcaggat gtccggaaga gagtgcagga tctagaacag 480
aaaatgaaag tggtagagaa tctccaggat gactttgatt tcaactataa aaccctcaag 540
agtcaaggag acatgcaaga tctgaatgga aacaaccagt cagtgaccag gcagaagatg 600
cagcagctgg aacagatgct cactgcgctg gaccagatgc ggagaagcat cgtgagtgag 660
ctggcggggc ttttgtcagc gatggagtac gtgcagaaaa ctctcacgga cgaggagctg 720
gctgactgga agaggcggca acagattgcc tgcattggag gcccgcccaa catctgccta 780
gatcggctag aaaactggat aacgtcatta gcagaatctc aacttcagac ccgtcaacaa 840
attaagaaac tggaggagtt gcagcaaaaa gtttcctaca aaggggaccc cattgtacag 900
caccggccga tgctggagga gagaatcgtg gagctgttta gaaacttaat gaaaagtgcc 960
tttgtggtgg agcggcagcc ctgcatgccc atgcatcctg accggcccct cgtcatcaag 1020
accggcgtcc agttcactac taaagtcagg ttgctggtca aattccctga gttgaattat 1080
cagcttaaaa ttaaagtgtg cattgacaaa gactctgggg acgttgcagc tctcagagga 1140
tcccggaaat ttaacattct gggcacaaac acaaaagtga tgaacatgga agaatccaac 1200
aacggcagcc tctctgcaga attcaaacac ttgaccctga gggagcagag atgtgggaat 1260
gggggccgag ccaattgtga tgcttccctg attgtgactg aggagctgca cctgatcacc 1320
tttgagaccg aggtgtatca ccaaggcctc aagattgacc tagagaccca ctccttgcca 1380
gttgtggtga tctccaacat ctgtcagatg ccaaatgcct gggcgtccat cctgtggtac 1440
aacatgctga ccaacaatcc caagaatgta aacttttta ccaagccccc aattggaacc 1500
tgggatcaag tggccgaggt cctgagctgg cagttctcct ccaccaccaa gcgaggactg 1560
agcatcgagc agctgactac actggcagag aaactcttgg gacctggtgt gaattattca 1620
gggtgtcaga tcacatgggc taaattttgc aaagaaaaca tggctggcaa gggcttctcc 1680
ttctgggtct ggctggacaa tatcattgac cttgtgaaaa agtacatcct ggccctttgg 1740
aacgaagggt acatcatggg ctttatcagt aaggagcggg agcgggccat cttgagcact 1800
aagcctccag gcaccttcct gctaagattc agtgaaagca gcaaagaagg aggcgtcact 1860
ttcacttggg tggagaagga catcagcggt aagacccaga tccagtccgt ggaaccatac 1920
acaaagcagc agctgaacaa catgtcattt gctgaaatca tcatgggcta taagatcatg 1980
gatgctacca atatcctggt gtctccactg gtctatctct atcctgacat tcccaaggag 2040
gaggcattcg gaaagtattg tcggccagag agccaggagc atcctgaagc tgacccaggt 2100
agcgctgccc catacctgaa gaccaagttt atctgtgtga caccaacgac ctgcagcaat 2160
accattgacc tgccgatgtc cccccgcact ttagattcat tgatgcagtt tggaaataat 2220
ggtgaaggtg ctgaaccctc agcaggaggg cagtttgagt ccctcacctt tgacatggag 2280
ttgacctcgg agtgcgctac ctcccccatg 2310

<210> 58
<211> 1575
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> lymphocyte-activation gene 3 (LAG3)

<400> 58
atgtgggagg ctcagttcct gggcttgctg tttctgcagc cgctttgggt ggctccagtg 60
aagcctctcc agccaggggc tgaggtcccg gtggtgtggg cccaggaggg ggctcctgcc 120
cagctccccc gcagccccac aatccccctc caggatctca gccttctgcg aagagcaggg 180
gtcacttggc agcatcagcc agacagtggc ccgcccgctg ccgcccccgg ccatcccctg 240
gcccccggcc ctcacccggc ggcgccctcc tcctgggggc ccaggccccg ccgctacacg 300
gtgctgagcg tgggtcccgg aggcctgcgc agcgggaggc tgcccctgca gccccgcgtc 360
cagctggatg agcgcggccg gcagcgcggg gacttctcgc tatggctgcg cccagcccgg 420
cgcgcggacg ccggcgagta ccgcgccgcg gtgcacctca gggaccgcgc cctctcctgc 480
cgcctccgtc tgcgcctggg ccaggcctcg atgactgcca gccccccagg atctctcaga 540
gcctccgact gggtcatttt gaactgctcc ttcagccgcc ctgaccgccc agcctctgtg 600
cattggttcc ggaaccgggg ccagggccga gtccctgtcc gggagtcccc ccatcaccac 660
ttagcggaaa gcttcctctt cctgccccaa gtcagcccca tggactctgg gccctggggc 720

tgcatcctca cctacagaga tggcttcaac gtctccatca tgtataacct cactgttctg 780
ggtctggagc ccccaactcc cttgacagtg tacgctggag caggttccag ggtggggctg 840
ccctgccgcc tgcctgctgg tgtggggacc cggtctttcc tcactgccaa gtggactcct 900
cctgggggag gccctgacct cctggtgact ggagacaatg gcgactttac ccttcgacta 960
gaggatgtga gccaggccca ggctgggacc tacacctgcc atatccatct gcaggaacag 1020
cagctcaatg ccactgtcac attggcaatc atcacagtga ctcccaaatc ctttgggtca 1080
cctggatccc tggggaagct gctttgtgag gtgactccag tatctggaca agaacgcttt 1140
gtgtggagct ctctggacac cccatcccag aggagtttct caggaccttg gctggaggca 1200
caggaggccc agctcctttc ccagccttgg caatgccagc tgtaccaggg ggagaggctt 1260
cttggagcag cagtgtactt cacagagctg tctagcccag gtgcccaacg ctctgggaga 1320
gccccaggtg ccctcccagc aggccacctc ctgctgtttc tcatccttgg tgtcctttct 1380
ctgctccttt tggtgactgg agcctttggc tttcaccttt ggagaagaca gtggcgacca 1440
agacgatttt ctgccttaga gcaagggatt caccctccgc aggctcagag caagatagag 1500
gagctggagc aagaaccgga gccggagccg gagccggaac cggagcccga gcccgagccc 1560
gagccggagc agctc 1575

<210> 59
<211> 903
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T cell immunoglobulin and mucin-domain
containing-3 (TIM-3)

<400> 59
atgttttcac atcttccctt tgactgtgtc ctgctgctgc tgctgctact acttacaagg 60
tcctcagaag tggaatacag agcggaggtc ggtcagaatg cctatctgcc ctgcttctac 120
accccagccg ccccagggaa cctcgtgccc gtctgctggg gcaaaggagc ctgtcctgtg 180
tttgaatgtg gcaacgtggt gctcaggact gatgaaaggg atgtgaatta ttggacatcc 240
agatactggc taaatgggga tttccgcaaa ggagatgtgt ccctgaccat agagaatgtg 300
actctagcag acagtgggat ctactgctgc cggatccaaa tcccaggcat aatgaatgat 360
gaaaaattta acctgaagtt ggtcatcaaa ccagccaagg tcacccctgc accgactcgg 420
cagagagact tcactgcagc ctttccaagg atgcttacca ccaggggaca tggcccagca 480
gagacacaga cactggggag cctccctgat ataaatctaa cacaaatatc cacattggcc 540
aatgagttac gggactctag attggccaat gacttacggg actctggagc aaccatcaga 600
ataggcatct acatcggagc agggatctgt gctgggctgg ctctggctct tatcttcggc 660
gctttaattt tcaaatggta ttctcatagc aaagagaaga tacagaattt aagcctcatc 720
tctttggcca acctccctcc ctcaggattg gcaaatgcag tagcagaggg aattcgctca 780
gaagaaaaca tctataccat tgaagagaac gtatatgaag tggaggagcc caatgagtat 840
tattgctatg tcagcagcag gcagcaaccc tcacaacctt tgggttgtcg ctttgcaatg 900
cca 903

<210> 60
<211> 732
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
(TIGIT), isoform 1

<400> 60
atgcgctggt gtctcctcct gatctgggcc caggggctga ggcaggctcc cctcgcctca 60
ggaatgatga caggcacaat agaaacaacg gggaacattt ctgcagagaa aggtggctct 120
atcatcttac aatgtcacct ctcctccacc acggcacaag tgacccaggt caactgggag 180
cagcaggacc agcttctggc catttgtaat gctgacttgg ggtggcacat ctccccatcc 240
ttcaaggatc gagtggcccc aggtcccggc ctgggcctca ccctccagtc gctgaccgtg 300
aacgatacag gggagtactt ctgcatctat cacacctacc ctgatgggac gtacactggg 360
agaatcttcc tggaggtcct agaaagctca gtggctgagc acggtgccag gttccagatt 420
ccattgcttg gagccatggc cgcgacgctg gtggtcatct gcacagcagt catcgtggtg 480

gtcgcgttga ctagaaagaa gaaagccctc agaatccatt ctgtggaagg tgacctcagg 540
agaaaatcag ctggacagga ggaatggagc cccagtgctc cctcaccccc aggaagctgt 600
gtccaggcag aagctgcacc tgctgggctc tgtggagagc agcggggaga ggactgtgcc 660
gagctgcatg actacttcaa tgtcctgagt tacagaagcc tgggtaactg cagcttcttc 720
acagagactg gt 732

<210> 61
<211> 1065
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GALECTIN-9/LGALS9, isoform 1

<400> 61
atggccttca gcggttccca ggctccctac ctgagtccag ctgtcccctt ttctgggact 60
attcaaggag gtctccagga cggacttcag atcactgtca atgggaccgt tctcagctcc 120
agtggaacca ggtttgctgt gaactttcag actggcttca gtggaaatga cattgccttc 180
cacttcaacc ctcggtttga agatggaggg tacgtggtgt gcaacacgag gcagaacgga 240
agctgggggc ccgaggagag gaagacacac atgcctttcc agaaggggat gcccctttgac 300
ctctgcttcc tggtgcagag ctcagatttc aaggtgatgg tgaacgggat cctcttcgtg 360
cagtacttcc accgcgtgcc cttccaccgt gtggacacca tctccgtcaa tggctctgtg 420
cagctgtcct acatcagctt ccagaacccc cgcacagtcc ctgttcagcc tgccttctcc 480
acggtgccgt tctcccagcc tgtctgtttc ccacccaggc ccaggggcg cagacaaaaa 540
cctcccggcg tgtggcctgc caacccggct cccattaccc agacagtcat ccacacagtg 600
cagagcgccc ctggacagat gttctctact cccgccatcc cacctatgat gtacccccac 660
cccgcctatc cgatgccttt catcaccacc attctgggag ggctgtaccc atccaagtcc 720
atcctcctgt caggcactgt cctgcccagt gctcagaggt tccacatcaa cctgtgctct 780
gggaaccaca tcgccttcca cctgaacccc cgttttgatg agaatgctgt ggtccgcaac 840
acccagatcg acaactcctg ggggtctgag gagcgaagtc tgccccgaaa aatgcccttc 900
gtccgtggcc agagcttctc agtgtggatc ttgtgtgaag ctcactgcct caaggtggcc 960
gtggatggtc agcacctgtt tgaatactac catcgcctga ggaacctgcc caccatcaac 1020
agactggaag tgggggggcga catccagctg acccatgtgc agaca 1065

<210> 62
<211> 720
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> LIGHT/TNSF14

<400> 62
atggaggaga gtgtcgtacg gccctcagtg tttgtggtgg atggacagac cgacatccca 60
ttcacgaggc tgggacgaag ccaccggaga cagtcgtgca gtgtggcccg ggtgggtctg 120
ggtctcttgc tgttgctgat gggggccggg ctggccgtcc aaggctggtt cctcctgcag 180
ctgcactggc gtctaggaga gatggtcacc cgcctgcctg acggacctgc aggctcctgg 240
gagcagctga tacaagagcg aaggtctcac gaggtcaacc cagcagcgca tctcacaggg 300
gccaactcca gcttgaccgg cagcgggggg ccgctgttat gggagactca gctgggcctg 360
gccttcctga ggggcctcag ctaccacgat ggggcccttg tggtcaccaa agctggctac 420
tactacatct actccaaggt gcagctgggc ggtgtgggct gcccgctggg cctggccagc 480
accatcaccc acggcctcta caagcgcaca ccccgctacc ccgaggagct ggagctgttg 540
gtcagccagc agtcaccctg cggacgggcc accagcagct cccgggtctg gtgggacagc 600
agcttcctgg gtggtgtggt acacctggag gctggggaga aggtggtcgt ccgtgtgctg 660
gatgaacgcc tggttcgact gcgtgatggt acccggtctt acttcggggc tttcatggtg 720

<210> 63
<211> 849
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HVEM/TNSFR14 (receptor for LIGHT ligand)

<400> 63
atggagcctc ctggagactg ggggcctcct ccctggagat ccacccccaa aaccgacgtc 60
ttgaggctgg tgctgtatct caccttcctg ggagccccct gctacgcccc agctctgccg 120
tcctgcaagg aggacgagta cccagtgggc tccgagtgct gccccaagtg cagtccaggt 180
tatcgtgtga aggaggcctg cggggagctg acgggcacag tgtgtgaacc ctgccctcca 240
ggcacctaca ttgcccacct caatggccta agcaagtgtc tgcagtgcca aatgtgtgac 300
ccagccatgg gcctgcgcgc gagccggaac tgctccagga cagagaacgc cgtgtgtggc 360
tgcagcccag gccacttctg catcgtccag gacggggacc actgcgccgc gtgccgcgct 420
tacgccacct ccagcccggg ccagagggtg cagaagggag gcaccgagag tcaggacacc 480
ctgtgtcaga actgcccccc ggggaccttc tctcccaatg ggaccctgga ggaatgtcag 540
caccagacca agtgcagctg gctggtgacg aaggccggag ctgggaccag cagctcccac 600
tgggtatggt ggtttctctc agggagcctc gtcatcgtca ttgtttgctc cacagttggc 660
ctaatcatat gtgtgaaaag aagaaagcca aggggtgatg tagtcaaggt gatcgtctcc 720
gtccagcgga aaagacagga ggcagaaggt gaggccacag tcattgaggc cctgcaggcc 780
cctccggacg tcaccacggt ggccgtggag gagacaatac cctcattcac ggggaggagc 840
ccaaaccac 849

<210> 64
<211> 660
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD28

<400> 64
atgctcaggc tgctcttggc tctcaactta ttcccttcaa ttcaagtaac aggaaacaag 60
attttggtga agcagtcgcc catgcttgta gcgtacgaca atgcggtcaa ccttagctgc 120
aagtattcct acaatctctt ctcaagggag ttccgggcat cccttcacaa aggactggat 180
agtgctgtgg aagtctgtgt tgtatatggg aattactccc agcagcttca ggtttactca 240
aaaacggggt tcaactgtga tgggaaattg ggcaatgaat cagtgacatt ctacctccag 300
aatttgtatg ttaaccaaac agatatttac ttctgcaaaa ttgaagttat gtatcctcct 360
ccttacctag acaatgagaa gagcaatgga accattatcc atgtgaaagg gaaacacctt 420
tgtccaagtc ccctatttcc cggaccttct aagccctttt gggtgctggt ggtggttggt 480
ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta acagtggcct ttattatttt ctgggtgagg 540
agtaagagga gcaggctcct gcacagtgac tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg 600
cccacccgca agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgctcc 660

<210> 65
<211> 1578
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> carcinoembryonic antigen-related cell adhesion
molecule 1 (CEACAM1, or CD66a)

<400> 65
atggggcacc tctcagcccc acttcacaga gtgcgtgtac cctggcaggg gcttctgctc 60
acagcctcac ttctaacctt ctggaacccg cccaccactg cccagctcac tactgaatcc 120
atgccattca atgttgcaga ggggaaggag gttcttctcc ttgtccacaa tctgccccag 180
caacttttg gctacagctg gtacaaaggg gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattgta 240
ggatatgcaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg caaacagcgg tcgagagaca 300
atatacccca atgcatccct gctgatccag aacgtcaccc agaatgacac aggattctac 360
accctacaag tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggaca gttccatgta 420
tacccggagc tgcccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaccctgt ggaggacaag 480
gatgctgtgg ccttcacctg tgaacctgag actcaggaca caacctacct gtggtggata 540

aacaatcaga gcctcccggt cagtcccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc 600
actctactca gtgtcacaag gaatgacaca ggaccctatg agtgtgaaat acagaaccca 660
gtgagtgcga accgcagtga cccagtcacc ttgaatgtca cctatggccc ggacaccccc 720
accatttccc cttcagacac ctattaccgt ccaggggcaa acctcagcct ctcctgctat 780
gcagcctcta acccacctgc acagtactcc tggcttatca atggaacatt ccagcaaagc 840
acacaagagc tctttatccc taacatcact gtgaataata gtggatccta tacctgccac 900
gccaataact cagtcactgg ctgcaacagg accacagtca agacgatcat agtcactgag 960
ctaagtccag tagtagcaaa gccccaaatc aaagccagca agaccacagt cacaggagat 1020
aaggactctg tgaacctgac ctgctccaca aatgacactg gaatctccat ccgttggttc 1080
ttcaaaaacc agagtctccc gtcctcggag aggatgaagc tgtcccaggg caacaccacc 1140
ctcagcataa accctgtcaa gagggaggat gctgggacgt attggtgtga ggtcttcaac 1200
ccaatcagta agaaccaaag cgaccccatc atgctgaacg taaactataa tgctctacca 1260
caagaaaatg gcctctcacc tggggccatt gctggcattg tgattggagt agtggccctg 1320
gttgctctga tagcagtagc cctggcatgt tttctgcatt tcgggaagac cggcagggca 1380
agcgaccagc gtgatctcac agagcacaaa ccctcagtct ccaaccacac tcaggaccac 1440
tccaatgacc cacctaacaa gatgaatgaa gttacttatt ctaccctgaa ctttgaagcc 1500
cagcaaccca cacaaccaac ttcagcctcc ccatccctaa cagccacaga aataatttat 1560
tcagaagtaa aaaagcag 1578

<210> 66
<211> 864
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD80/B7-1

<400> 66
atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720
gataacctgc tcccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 780
tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
agaagggaaa gtgtacgccc tgta 864

<210> 67
<211> 995
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD86/B7-2

<400> 67
cagccaaaat ggatccccag tgcactatgg gactgagtaa cattctcttt gtgatggcct 60
tcctgctctc tggtgctgct cctctgaaga ttcaagctta tttcaatgag actgcagacc 120
tgccatgcca atttgcaaac tctcaaaacc aaagcctgag tgagctagta gtattttggc 180
aggaccagga aaacttggtt ctgaatgagg tatacttagg caaagagaaa tttgacagtg 240
ttcattccaa gtatatgggc cgcacaagtt ttgattcgga cagttggacc ctgagacttc 300
acaatcttca gatcaaggac aagggcttgt atcaatgtat catccatcac aaaaagccca 360
caggaatgat tcgcatccac cagatgaatt ctgaactgtc agtgcttgct aacttcagtc 420
aacctgaaat agtaccaatt tctaatataa cagaaaatgt gtacataaat ttgacctgct 480

catctataca cggttaccca gaacctaaga agatgagtgt tttgctaaga accaagaatt 540
caactatcga gtatgatggt attatgcaga aatctcaaga taatgtcaca gaactgtacg 600
acgtttccat cagcttgtct gtttcattcc ctgatgttac gagcaatatg accatcttct 660
gtattctgga aactgacaag acgcggcttt tatcttcacc tttctctata gagcttgagg 720
accctcagcc tcccccagac cacattcctt ggattacagc tgtacttcca acagttatta 780
tatgtgtgat ggttttctgt ctaattctat ggaaatggaa gaagaagaag cggcctcgca 840
actcttataa atgtggaacc aacacaatgg agagggaaga gagtgaacag accaagaaaa 900
gagaaaaaat ccatatacct gaaagatctg atgaagccca gcgtgttttt aaaagttcga 960
agacatcttc atgcgacaaa agtgatacat gtttt 995

<210> 68
<211> 1095
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD244/2B4

<400> 68
atgctggggc aagtggtcac cctcatactc ctcctgctcc tcaaggtgta tcagggcaaa 60
ggatgccagg gatcagctga ccatgtggtt agcatctcgg gagtgcctct tcagttacaa 120
ccaaacagca tacagacgaa ggttgacagc attgcatgga agaagttgct gccctcacaa 180
aatggatttc atcacatatt gaagtgggag aatggctctt tgccttccaa tacttccaat 240
gatagattca gttttatagt caagaacttg agtcttctca tcaaggcagc tcagcagcag 300
gacagtggcc tctactgcct ggaggtcacc agtatatctg gaaaagttca gacagccacg 360
ttccaggttt ttgtatttga taaagttgag aaaccccgcc tacaggggca ggggaagatc 420
ctggacagag ggagatgcca agtggctctg tcttgcttgg tctccaggga tggcaatgtg 480
tcctatgctt ggtacagagg gagcaagctg atccagacag cagggaacct cacctacctg 540
gacgaggagg ttgacattaa tggcactcac acatatacct gcaatgtcag caatcctgtt 600
agctgggaaa gccacaccct gaatctcact caggactgtc agaatgccca tcaggaattc 660
agattttggc cgtttttggt gatcatcgtg attctaagcg cactgttcct tggcaccctt 720
gcctgcttct gtgtgtggag gagaaagagg aaggagaagc agtcagagac cagtcccaag 780
gaatttttga caatttacga agatgtcaag gatctgaaaa ccaggagaaa tcacgagcag 840
gagcagactt ttcctggagg ggggagcacc atctactcta tgatccagtc ccagtcttct 900
gctcccacgt cacaagaacc tgcatataca ttatattcat taattcagcc ttccaggaag 960
tctggatcca ggaagaggaa ccacagccct tccttcaata gcactatcta tgaagtgatt 1020
ggaaagagtc aacctaaagc ccagaaccct gctcgattga gccgcaaaga gctggagaac 1080
tttgatgttt attcc 1095

<210> 69
<211> 1251
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD155/PVR

<400> 69
atggcccgag ccatggccgc cgcgtggccg ctgctgctgg tggcgctact ggtgctgtcc 60
tggccacccc caggaaccgg ggacgtcgtc gtgcaggcgc ccacccaggt gcccggcttc 120
ttgggcgact ccgtgacgct gccctgctac ctacaggtgc ccaacatgga ggtgacgcat 180
gtgtcacagc tgacttgggc gcggcatggt gaatctggca gcatggccgt cttccaccaa 240
acgcagggcc ccagctattc ggagtccaaa cggctggaat tcgtggcagc cagactgggc 300
gcggagctgc ggaatgcctc gctgaggatg ttcgggttgc gcgtagagga tgaaggcaac 360
tacacctgcc tgttcgtcac gttcccgcag ggcagcagga gcgtggatat ctggctccga 420
gtgcttgcca agccccagaa cacagctgag gttcagaagg tccagctcac tggagagcca 480
gtgcccatgg cccgctgcgt ctccacaggg ggtcgcccgc cagcccaaat cacctggcac 540
tcagacctgg gcgggatgcc caatacgagc caggtgccag ggttcctgtc tggcacagtc 600
actgtcacca gcctctggat attggtgccc tcaagccagg tggacggcaa gaatgtgacc 660
tgcaaggtgg agcacgagag ctttgagaag cctcagctgc tgactgtgaa cctcaccgtg 720
tactaccccc cagaggtatc catctctggc tatgataaca actggtacct tggccagaat 780

gaggccaccc tgacctgcga tgctcgcagc aacccagagc ccacaggcta taattggagc 840
acgaccatgg gtcccctgcc acccttttgct gtggcccagg gcgcccagct cctgatccgt 900
cctgtggaca aaccaatcaa cacaacttta atctgcaacg tcaccaatgc cctaggagct 960
cgccaggcag aactgaccgt ccaggtcaaa gagggacctc ccagtgagca ctcaggcatg 1020
tcccgtaacg ccatcatctt cctggttctg ggaatcctgg tttttctgat cctgctgggg 1080
atcgggattt atttctattg gtccaaatgt tcccgtgagg tcctttggca ctgtcatctg 1140
tgtccctcga gtacagagca tgccagcgcc tcagctaatg ggcatgtctc ctattcagct 1200
gtgagcagag agaacagctc ttcccaggat ccacagacag agggcacaag g 1251

<210> 70
<211> 1614
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD122/nectin-2

<400> 70
atggcccggg ccgctgccct cctgccgtcg agatcgccgc cgacgccgct gctgtggccg 60
ctgctgctgc tgctgctcct ggaaaccgga gcccaggatg tgcgagttca agtgctaccc 120
gaggtgcgag gccagctcgg gggcaccgtg gagctgccgt gccacctgct gccacctgtt 180
cctggactgt acatctccct ggtgacctgg cagcgcccag atgcacctgc gaaccaccag 240
aatgtggccg ccttccaccc taagatgggt cccagcttcc ccagcccgaa gcctggcagc 300
gagcggctgt ccttcgtctc tgccaagcag agcactgggc aagacacaga ggcagagctc 360
caggacgcca cgctggccct ccacgggctc acggtggagg acgagggcaa ctacacttgc 420
gagtttgcca ccttccccaa ggggtccgtc cgagggatga cctggctcag agtcatagcc 480
aagcccaaga accaagctga ggcccagaag gtcacgttca gccaggaccc tacgacagtg 540
gccctctgca tctccaaaga gggccgccca cctgcccgga tctcctggct ctcatccctg 600
gactgggaag ccaaagagac tcaggtgtca gggaccctgg ccggaactgt cactgtcacc 660
agccgcttca ccttggtgcc ctcgggccga gcagatggtg tcacggtcac ctgcaaagtg 720
gagcatgaga gcttcgagga accagccctg atacctgtga ccctctctgt acgctaccct 780
cctgaagtgt ccatctccgg ctatgatgac aactggtacc tcggccgtac tgatgccacc 840
ctgagctgtg acgtccgcag caacccagag cccacgggct atgactggag cacgacctca 900
ggcaccttcc cgacctccgc agtggcccag ggctcccagc tggtcatcca cgcagtggac 960
agtctgttca ataccacctt cgtctgcaca gtcaccaatg ccgtgggcat gggccgcgct 1020
gagcaggtca tctttgtccg agagaccccc aacacagcag gcgcaggggc cacaggcggc 1080
atcatcgggg gcatcatcgc cgccatcatt gctactgctg tggctgccac gggcatcctt 1140
atctgccggc agcagcggaa ggagcagacg ctgcaggggg cagaggagga cgaagacctg 1200
gagggacctc cctcctacaa gccaccgacc ccaaaagcga agctggaggc acaggagatg 1260
ccctcccagc tcttcactct gggggcctcg gagcacagcc cactcaagac cccctacttt 1320
gatgctggcg cctcatgcac tgagcaggaa atgcctcgat accatgagct gcccaccttg 1380
gaagaacggt caggaccctt gcaccctgga gccacaagcc tggggtcccc catcccggtg 1440
cctccagggc cacctgctgt ggaagacgtt tccctggatc tagaggatga ggagggggag 1500
gaggaggaag agtatctgga caagatcaac cccatctatg atgctctgtc ctatagcagc 1560
ccctctgatt cctaccaggg caaaggcttt gtcatgtccc gggccatgta tgtg 1614

<210> 71
<211> 1008
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD226 antigen

<400> 71
atggattatc ctactttact tttggctctt cttcatgtat acagagctct atgtgaagag 60
gtgctttggc atacatcagt tccctttgcc gagaacatgt ctctagaatg tgtgtatcca 120
tcaatgggca tcttaacaca ggtggagtgg ttcaagatcg ggacccagca ggattccata 180
gccatttttca gccctactca tggcatggtc ataaggaagc cctatgctga gagggtttac 240
tttttgaatt caacgatggc ttccaataac atgactcttt tctttcggaa tgcctctgaa 300
gatgatgttg gctactattc ctgctctctt tacacttacc cacagggaac ttggcagaag 360

gtgatacagg tggttcagtc agatagtttt gaggcagctg tgccatcaaa tagccacatt 420
gtttcggaac ctggaaagaa tgtcacactc acttgtcagc ctcagatgac gtggcctgtg 480
caggcagtga ggtgggaaaa gatccagccc cgtcagatcg acctcttaac ttactgcaac 540
ttggtccatg gcagaaattt cacctccaag ttcccaagac aaatagtgag caactgcagc 600
cacggaaggt ggagcgtcat cgtcatcccc gatgtcacag tctcagactc ggggctttac 660
cgctgctact tgcaggccag cgcaggagaa aacgaaacct tcgtgatgag attgactgta 720
gccgagggta aaaccgataa ccaatatacc ctctttgtgg ctggagggac agttttattg 780
ttgttgtttg ttatctcaat taccaccatc attgtcattt tccttaacag aaggagaagg 840
agagagagaa gagatctatt tacagagtcc tgggatacac agaaggcacc caataactat 900
agaagtccca tctctaccag tcaacctacc aatcaatcca tggatgatac aagagaggat 960
atttatgtca actatccaac cttctctcgc agaccaaaga ctagagtt 1008

<210> 72
<211> 545
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD160 antigen

<400> 72
ggatgctgtt ggaacccggc agaggctgct gtgccctggc catcctgctg gcaattgtgg 60
acatccagtc tggtggatgc attaacatca ccagctcagc ttcccaggaa ggaacgcgac 120
taaacttaat ctgtactgta tggcataaga aagaagaggc tgaggggttt gtagtgtttt 180
tgtgcaagga caggtctgga gactgttctc ctgagaccag tttaaaacag ctgagactta 240
aaagggatcc tgggatagat ggtgttggtg aaatatcatc tcagttgatg ttcaccataa 300
gccaagtcac accgttgcac agtgggacct accagtgttg tgccagaagc cagaagtcag 360
gtatccgcct tcagggccat tttttctcca ttctattcac agagacaggg aactacacag 420
tgacgggatt gaaacaaaga caacaccttg agttcagcca taatgaaggc actctcagtt 480
caggcttcct acaagaaaag gtctgggtaa tgctggtcac cagccttgtg gcccttcaag 540
ctttg 545

<210> 73
<211> 264
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> human U6 RNA Pol III promoter

<400> 73
aaggtcgggc aggaagaggg cctatttccc atgattcctt catatttgca tatacgatac 60
aaggctgtta gagagataat tagaattaat ttgactgtaa acacaaagat attagtacaa 120
aatacgtgac gtagaaagta ataatttctt gggtagtttg cagttttaaa attatgtttt 180
aaaatggact atcatatgct taccgtaact tgaaagtatt tcgatttctt ggctttatat 240
atcttgtgga aaggacgaaa ctag 264

<210> 74
<211> 99
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> human H1 RNA Pol III promoter

<400> 74
atatttgcat gtcgctatgt gttctgggaa atcaccataa acgtgaaatg tctttggatt 60
tgggaatctt ataagttctg tatgagacca ctccctagg 99

<210> 75
<211> 58

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNA-encoding sequence targeting muPD-L1

<400> 75
ccggccgaaa tgatacacaa ttcgactcga gtcgaattgt gtatcatttc ggtttttg 58

<210> 76
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNA-encoding sequence targeting muSIRPA

<400> 76
ccggccacaa ctggaatgtc ttcatctcga gatgaagaca ttccagttgt ggttttt 57

<210> 77
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNA-encoding sequence targeting muTREX1, clone 1

<400> 77
ccggacaacc aacctaaggc cacatctcga gatgtggcct taggttggtt gttttttg 58

<210> 78
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNA-encoding sequence targeting muTREX1, clone 2

<400> 78
ccggcctaga tggtaccttc tgtgtctcga gacacagaag gtaccatcta ggtttttg 58

<210> 79
<211> 3966
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Vector1-human shTREX1-1_shPDL1-1

<400> 79
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac 600

catatttgca tgtcgctatg tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat 660
ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actccctagg cagcgcatgg gcgtcaattc 720
tagagattga cgcccatgcg ctgctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc 780
ggccgcaggt aagccagccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag 840
agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt 900
cctcaggtct gcccgggtgg catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg 960
aagttgccac tccagtgccc accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt 1020
ctgactaggt gtccttctat aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc 1080
ccaagttaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 1140
tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa 1200
tgtatcttat catgtctgga tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc 1260
cttcatattt gcatatacga tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg 1320
taaacacaaa gatattagta caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt 1380
ttgcagtttt aaaattatgt tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt 1440
atttcgattt cttggcttta tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggta gagtatggta 1500
gcaatatcta gagtattgct accatactct actttttttcg agtagctaga gaattcatgg 1560
taatagcgat gactaatacg tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt 1620
actgggcata atgccaggcg ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg 1680
gcatatgata cacttgatgt actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt 1740
gacgtcaatg gaaagtccct attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca 1800
atgggcgggg gtcgttgggc ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc 1860
ggaactccat atatgggcta tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag 1920
ccatccagct gatatcccat ggtcatagct gtttcctggc agctctggcc cgtgtctcaa 1980
aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat catgaacaat aaaactgtct 2040
gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc 2100
ggaatggtcg gctctgttct catgcaacgc atggtagagg agcgcgattt cgacgctatt 2160
cgccctgttt tcttttctac ctcccagttt ggacaggcgg cgcccacctt cggcgacacc 2220
tccaccggca cgctacagga cgcttttgat ctggatgcgc taaaagcgct cgatatcatc 2280
gtgacctgcc agggcggcga ttataccaac gaaatttatc caaagctgcg cgaaagcgga 2340
tggcagggtt actggattga tgcggcttct acgctgcgca tgaaagatga tgccattatt 2400
attctcgacc cggtcaacca ggacgtgatt accgacggcc tgaacaatgg cgtgaagacc 2460
tttgtgggcg gtaactgtac cgttagcctg atgttgatgt cgctgggcgg tctctttgcc 2520
cataatctcg ttgactgggt atccgtcgcg acctatcagg ccgcctccgg cggcggcgcg 2580
cgccatatgc gcgagctgtt aacccagatg ggtcagttgt atggccatgt cgccgatgaa 2640
ctggcgacgc cgtcttccgc aattcttgat attgaacgca aagttacggc attgacccgc 2700
agcggcgagc tgccggttga taactttggc gtaccgctgg cgggaagcct gatcccctgg 2760
atcgacaaac agctcgataa cggccagagc cgcgaagagt ggaaaggcca ggcggaaacc 2820
aacaagattc tcaatactgc ctctgtgatt ccggttgatg gtttgtgtgt gcgcgtcggc 2880
gcgctgcgct gtcacagcca ggcgttcacc atcaagctga aaaaagaggt atccattccg 2940
acggtggaag aactgctggc ggcacataat ccgtgggcga aagtggtgcc gaacgatcgt 3000
gatatcacta tgcgcgaatt aaccccggcg gcggtgaccg gcacgttgac tacgccggtt 3060
ggtcgtctgc gtaagctgaa catggggcca gagttcttgt cggcgtttac cgtaggcgac 3120
cagttgttat ggggcgccgc cgagccgctg cgtcgaatgc tgcgccagtt ggcgtagtca 3180
gaattggtta attggttgta acactggcag agcattacgc tgacttgacg ggacggcgca 3240
agctcatgac caaaatccct taacgtgagt tacgcgtcgt tccactgagc gtcagacccc 3300
gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg 3360
caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 3420
ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg 3480
tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg 3540
ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac 3600
tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca 3660
cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga 3720
gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 3780
ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct 3840
gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg 3900
agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct 3960
tttgct 3966

<210> 80
<211> 3972
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Vector2-mouse shTREX1-1_shPDL1-1

<400> 80
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccttaaaggaacca attcagtcga gaattggtac 600
catatttgca tgtcgctatg tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat 660
ttgggaatct tataagttct gtatgagacc actccctaga caaccaacct aaggccacat 720
ctcgagatgt ggccttaggt tggttgtttt tttcgacaga tctggcgcgc catagtggcc 780
agcggccgca ggtaagccag cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgccc 840
tagagtagcc tgcatccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct 900
cttcctcagg tctgcccggg tggcatccct gtgacccctc cccagtgcct ctcctggccc 960
tggaagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaat aaaattaagt tgcatcattt 1020
tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tggggtggag gggggtggta tggagcaagg 1080
ggcccaagtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac 1140
aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat 1200
caatgtatct tatcatgtct ggatccaagg tcgggcagga agagggccta tttcccatga 1260
ttccttcata tttgcatata cgatacaagg ctgttagaga gataattaga attaatttga 1320
ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata cgtgacgtag aaagtaataa tttcttgggt 1380
agtttgcagt tttaaaatta tgttttaaaa tggactatca tatgcttacc gtaacttgaa 1440
agtatttcga tttcttggct ttatatatct tgtggaaagg acgaaactag ccgaaatgat 1500
acacaattcg actcgagtcg aattgtgtat catttcggtt ttttcgagta gctagagaat 1560
tcatggtaat agcgatgact aatacgtaga tgtactgcca agtaggaaag tcccataagg 1620
tcatgtactg ggcataatgc caggcgggcc atttaccgtc attgacgtca ataggggggcg 1680
tacttggcat atgatacact tgatgtactg ccaagtgggc agtttaccgt aaatagtcca 1740
cccattgacg tcaatggaaa gtccctattg gcgttactat gggaacatac gtcattattg 1800
acgtcaatgg gcgggggtcg ttgggcggtc agccaggcgg gccatttacc gtaagttatg 1860
taacgcggaa ctccatatat gggctatgaa ctaatgaccc cgtaattgat tactattaat 1920
aactagccat ccagctgata tcccatggtc atagctgttt cctggcagct ctggcccgtg 1980
tctcaaaatc tctgatgtta cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa 2040
ctgtctgctt acataaacag taatacaagg ggtgttatga aaaatgttgg ttttatcggc 2100
tggcgcggaa tggtcggctc tgttctcatg caacgcatgg tagaggagcg cgatttcgac 2160
gctattcgcc ctgttttctt ttctacctcc cagtttggac aggcggcgcc caccttcggc 2220
gacacctcca ccggcacgct acaggacgct tttgatctgg atgcgctaaa agcgctcgat 2280
atcatcgtga cctgccaggg cggcgattat accaacgaaa tttatccaaa gctgcgcgaa 2340
agcggatggc agggttactg gattgatgcg gcttctacgc tgcgcatgaa agatgatgcc 2400
attattattc tcgacccggt caaccaggac gtgattaccg acggcctgaa caatggcgtg 2460
aagacctttg tgggcggtaa ctgtaccgtt agcctgatgt tgatgtcgct gggcggtctc 2520
tttgcccata atctcgttga ctgggtatcc gtcgcgacct atcaggccgc ctccggcggc 2580
ggcgcgcgcc atatgcgcga gctgttaacc cagatgggtc agttgtatgg ccatgtcgcc 2640
gatgaactgg cgacgccgtc ttccgcaatt cttgatattg aacgcaaagt tacggcattg 2700
acccgcagcg gcgagctgcc ggttgataac tttggcgtac cgctggcggg aagcctgatc 2760
ccctggatcg acaaacagct cgataacggc cagagccgcg aagagtggaa aggccaggcg 2820
gaaaccaaca agattctcaa tactgcctct gtgattccgg ttgatggttt gtgtgtgcgc 2880
gtcggcgcgc tgcgctgtca cagccaggcg ttcaccatca agctgaaaaa agaggtatcc 2940
attccgacgg tggaagaact gctggcggca cataatccgt gggcgaaagt ggtgccgaac 3000
gatcgtgata tcactatgcg cgaattaacc ccggcggcgg tgaccggcac gttgactacg 3060
ccggttggtc gtctgcgtaa gctgaacatg gggccagagt tcttgtcggc gtttaccgta 3120
ggcgaccagt tgttatgggg cgccgccgag ccgctgcgtc gaatgctgcg ccagttggcg 3180
tagtcagaat tggttaattg gttgtaacac tggcagagca ttacgctgac ttgacgggac 3240
ggcgcaagct catgaccaaa atcccttaac gtgagttacg cgtcgttcca ctgagcgtca 3300

gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc 3360
tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta 3420
ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt 3480
ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc 3540
gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 3600
ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cgggctgaac gggggttcg 3660
tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 3720
cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc 3780
agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 3840
agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg 3900
gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc 3960
tggccttttg ct 3972

<210> 81
<211> 1281
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> aroA

<400> 81
atggaatccc tgacgttaca acccatcgcg cgggtcgatg gcgccattaa tttacctggc 60
tccaaaagtg tttcaaaccg tgctttgctc ctggcggctt tagcttgtgg taaaaccgct 120
ctgacgaatc tgctggatag cgatgacgtc cgccatatgc tcaatgccct gagcgcgttg 180
gggatcaatt acacccttc tgccgatcgc acccgctgtg atatcacggg taatggcggc 240
gcattacgtg cgccaggcgc tctggaactg tttctcggta atgccggaac cgcgatgcgt 300
ccgttagcgg cagcgctatg tctggggcaa aatgagatag tgttaaccgg cgaaccgcgt 360
atgaaagagc gtccgatagg ccatctggtc gattcgctgc gtcagggcgg ggcgaatatt 420
gattacctgg agcaggaaaa ctatccgccc ctgcgtctgc gcggcggttt taccggcggc 480
gacattgagg ttgatggtag cgtttccagc cagttcctga ccgctctgct gatgacggcg 540
ccgctggccc ctaaagacac aattattcgc gttaaaggcg aactggtatc aaaaccttac 600
atcgatatca cgctaaattt aatgaaaacc tttggcgtgg agatagcgaa ccaccactac 660
caacaatttg tcgtgaaggg aggtcaacag tatcactctc caggtcgcta tctggtcgag 720
ggcgatgcct cgtcagcgtc ctattttctc gccgctgggg cgataaaagg cggcacggta 780
aaagtgaccg gaattggccg caaaagtatg cagggcgata ttcgttttgc cgatgtgctg 840
gagaaaatgg gcgcgaccat tacctggggc gatgatttta ttgcctgcac gcgcggtgaa 900
ttgcacgcca tagatatgga tatgaaccat attccggatg cggcgatgac gattgccacc 960
acggcgctgt ttgcgaaagg aaccacgacg ttgcgcaata tttataactg gcgagtgaaa 1020
gaaaccgatc gcctgttcgc gatggcgacc gagctacgta aagtgggcgc tgaagtcgaa 1080
gaagggcacg actatattcg tatcacgccg ccggcgaagc tccaacacgc ggatattggc 1140
acgtacaacg accaccgtat ggcgatgtgc ttctcactgg tcgcactgtc cgatacgcca 1200
gttacgatcc tggaccctaa atgtaccgca aaaacgttcc ctgattattt cgaacaactg 1260
gcgcgaatga gtacgcctgc c 1281

<210> 82
<211> 1094
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> aroC

<400> 82
acggagccgt gatggcagga aacacaattg gacaactctt tcgcgtaacc actttcggcg 60
aatcacacgg gctggcgctt gggtgtatcg tcgatggcgt gccgcccggc atcccgttga 120
cggaggccga tctgcaacac gatctcgaca gacgccgccc cggcacctcg cgctatacta 180
cccagcgccg cgaaccggac caggtaaaaa ttctctccgg cgtgtttgat ggcgtgacga 240
ccggcaccag cattggccta ctgattgaaa acaccgatca gcgctcgcag gactacagcg 300
cgattaaaga tgtttttcgt ccgggacacg cggattacac ctatgagcag aaatacggcc 360
tgcgcgatta ccgtggcggt ggacgttctt ccgcgcgtga aaccgcgatg cgcgtagcgg 420

caggggcgat cgccaagaaa tacctggcgg aaaagttcgg catcgaaatc cgcggctgcc 480
tgacccagat gggcgacatt ccgctggaga ttaaagactg gcgtcaggtt gagcttaatc 540
cgttcttttg tcccgatgcg gacaaacttg acgcgctgga cgaactgatg cgcgcgctga 600
aaaaagaggg tgactccatc ggcgcgaaag tgacggtgat ggcgagcggc gtgccggcag 660
ggcttggcga accggtattt gaccgactgg atgcggacat cgcccatgcg ctgatgagca 720
ttaatgcggt gaaaggcgtg gagatcggcg aaggatttaa cgtggtggcg ctgcgcggca 780
gccagaatcg cgatgaaatc acggcgcagg gttttcagag caaccacgct ggcggcatcc 840
tcggtggcat cagtagcggg caacacattg tggcgcatat ggcgctgaaa cctacctcca 900
gcattaccgt gccgggacgt acgatcaacc gggcaggtga agaagtcgaa atgatcacca 960
aagggcgcca cgatccgtgt gtggggattc gcgcagtgcc gatcgcagaa gccatgctgg 1020
cgatcgtgct gatggatcac ctgctgcgcc atcgggcaca gaatgcggat gtaaagacag 1080
agattccacg ctgg 1094

<210> 83
<211> 767
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> aroD

<400> 83
aagggtacca aatgaaaacc gtaactgtaa gagatctcgt ggttggcgaa ggcgcgccaa 60
agatcattgt gtcgctaatg ggaaaaacca ttaccgatgt gaaatcggaa gcactcgcct 120
accgtgaagc ggatttcgat attctggagt ggcgcgttga ccattttgcc aacgtgacaa 180
cggcggaaag cgtacttgag gccgccggcg ccatccggga gattattacc gataaaccct 240
tgctatttac cttccgcagc gcgaaagaag gcggcgaaca ggcgctaacc accggacagt 300
atatcgatct gaatcgtgca gcggttgaca gcggtctggt cgatatgatc gatcttgagc 360
tttttaccgg cgacgatgag gtgaaagcca ccgtcggcta tgctcatcaa cacaatgttg 420
cggtgatcat gtctaaccat gattttcata aaacgcccgc agcggaagag attgttcagc 480
gtctgcgtaa aatgcaggaa ctgggcgctg atattccgaa gatcgccgtc atgccacaga 540
ctaaagccga tgtcctgacc ttacttaccg ccactgtaga aatgcaggag cgctatgcgg 600
atcgtccgat tattaccatg tcgatgtcga aaaccggggt aatatctcgt cttgccggcg 660
aagtgttcgg ttctgcggca acgtttggcg cggtgaaaaa agcatctgcg ccgggacaaa 720
tatcggtagc cgatctgcgt accgtattaa ctatattgca ccaggcg 767

<210> 84
<211> 684
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> PhoP

<400> 84
aagggagaag agatgatgcg cgtactggtt gtagaggata atgcattatt acgccaccac 60
ctgaaggttc agctccagga ttcaggtcac caggtcgatg ccgcagaaga tgccagggaa 120
gctgattact accttaatga acaccttccg gatatcgcta ttgtcgattt aggtctgccg 180
gatgaagacg gcctttcctt aatacgccgc tggcgcagca gtgatgtttc actgccggtt 240
ctggtgttaa ccgcgcgcga aggctggcag gataaagtcg aggttctcag ctccggggcc 300
gatgactacg tgacgaagcc attccacatc gaagaggtaa tggcgcgtat gcaggcgtta 360
atgcgccgta atagcggtct ggcctcccag gtgatcaaca tcccgccgtt ccaggtggat 420
ctctcacgcc gggaattatc cgtcaatgaa gaggtcatca aactcacggc gttcgaatac 480
accattatgg aaacgcttat ccgtaacaac ggtaaagtgg tcagcaaaga ttcgctgatg 540
cttcagctgt atccggatgc ggaactgcgg gaaagtcata ccattgatgt tctcatgggg 600
cgtctgcgga aaaaaataca ggcccagtat ccgcacgatg tcattaccac cgtacgcgga 660
caaggatatc tttttgaatt gcgc 684

<210> 85
<211> 1461
<212> DNA

<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> PhoQ

<400> 85
atgaataaat ttgctcgcca ttttctgccg ctgtcgctgc gggttcgttt tttgctggcg 60
acagccggcg tcgtgctggt gctttctttg gcatatggca tagtggcgct ggtcggctat 120
agcgtaagtt ttgataaaac cacctttcgt ttgctgcgcg gcgaaagcaa cctgttttat 180
accctcgcca aatgggaaaa taataaaatc agcgttgagc tgcctgaaaa tctggacatg 240
caaagcccga ccatgacgct gatttacgat gaaacgggca aattattatg gacgcagcgc 300
aacattccct ggctgattaa aagcattcaa ccggaatggt taaaaacgaa cggcttccat 360
gaaattgaaa ccaacgtaga cgccaccagc acgctgttga gcgaagacca ttccgcgcag 420
gaaaaactca aagaagtacg tgaagatgac gatgatgccg agatgaccca ctcggtagcg 480
gtaaatattt atcctgccac ggcgcggatg ccgcagttaa ccatcgtggt ggtcgatacc 540
attccgatag aactaaaacg ctcctatatg gtgtggagct ggttcgtata cgtgctggcc 600
gccaatttac tgttagtcat tcctttactg tggatcgccg cctggtggag cttacgccct 660
atcgaggcgc tggcgcggga agtccgcgag cttgaagatc atcaccgcga aatgctcaat 720
ccggagacga cgcgtgagct gaccagcctt gtgcgcaacc ttaatcaact gctcaaaagc 780
gagcgtgaac gttataacaa ataccgcacg accctgaccg acctgacgca cagtttaaaa 840
acgccgctcg cggttttgca gagtacgtta cgctctttac gcaacgaaaa gatgagcgtc 900
agcaaagctg aaccggtgat gctggaacag atcagccgga tttcccagca gatcggctat 960
tatctgcatc gcgccagtat gcgcggtagc ggcgtgttgt taagccgcga actgcatccc 1020
gtcgcgccgt tgttagataa cctgatttct gcgctaaata aagtttatca gcgtaaaggg 1080
gtgaatatca gtatggatat ttcaccagaa atcagttttg tcggcgagca aaacgacttt 1140
gtcgaagtga tgggcaacgt actggacaac gcttgtaaat attgtctgga gtttgtcgag 1200
atttcggctc gccagaccga cgatcatttg catattttcg tcgaagatga cggcccaggc 1260
attccccaca gcaaacgttc cctggtgttt gatcgcggtc agcgcgccga taccctacga 1320
ccaggacaag gcgtggggct ggctgtcgcg cgcgagatta cggaacaata cgccgggcag 1380
atcattgcca gcgacagtct gctcggtggc gcccgtatgg aggtcgtttt tggccgacag 1440
catcccacac agaaagagga a 1461

<210> 86
<211> 2731
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> Adenylate cyclase (cyaA)

<400> 86
tctttcttta cggtcaatga gcaaggtgtt aaattgatca cgttttagac catttttcg 60
tcggtattag ataaaaatat gcaggcgaga aagggtaacg gttatttttg acatacggtt 120
tatcccgaat ggcgacggtc aagtactgac ctgcaccatg acgggtagca acatcaggcg 180
atacgtcttg tacctctata ttgagactct gaaacagaga ctggatgcca taaatcaact 240
gcgtgtggat cgcgcgcttg ctgccatggg acccgctttt cagcaggttt acagtcttct 300
gccgacatta ttgcactatc accatccact gatgccgggt taccttgatg gtaacgttcc 360
cagcggtatt tgcttctaca cgcctgatga aacccaacgc cactatctga acgaacttga 420
gctgtaccgc ggtatgacgc cgcaggaccc gccgaagggc gagctgccga ttaccggcgt 480
ttacaccatg ggcagcacct cctcggtcgg gcagagctgc tcgtccgacc tggatatctg 540
ggtgtgccat cagtcctggc tcgacggcga agagcgtcag ttgctgcaac gtaagtgtag 600
cctgctggaa agctgggccg cctcgcttgg cgttgaggtg agcttcttcc tgatcgacga 660
gaaccgtttc cgccataacg aaagcggcag tctgggcggg gaagactgtg gttctacgca 720
gcatatcctg ttgcttgatg agttttatcg taccgctgtg cgcctggccg ggaagcgtat 780
cctgtggagt atggtgccgt gcgacgaaga agagcattac gacgactatg tcatgacgct 840
ctatgcgcag ggcgtattaa cgccaaacga atggctggat ctgggggggct taagctcgct 900
ctccgccgaa gagtactttg gcgccagcct gtggcagcta tacaagagca ttgactcgcc 960
gtacaaagcg gtgctgaaaa cgctgctgct ggaagcctat tcatgggaat atcctaaccc 1020
acgtctgctg gcgaaagata ttaaacaacg tctgcatgac ggtgaaatcg tatcgtttgg 1080
actcgatccc tactgcatga tgctggaacg ggtcactgaa tacctgacgg cgattgaaga 1140
tccgacgcgg ctggatttag tccgccgctg cttttacctg aaagtgtgcg agaaattaag 1200

tcgcgagcgt gcctgcgtag gctggcgtcg ggaagtatta agccagttag tcagcgagtg 1260
gggatgggac gacgcgcgtc tgaccatgct cgataatcgc gcaaactgga aaatcgatca 1320
ggtgcgcgaa gcccacaacg aattgctcga cgccatgatg caaagctatc gtaatctgat 1380
tcgctttgcg cggcgcaaca acctcagcgt gagtgccagc ccgcaggata tcggcgtact 1440
gacgcgtaag ctgtacgcgg cttttgaagc gttgccgggt aaagtcacgc tggtgaaccc 1500
gcagatatcg ccggatctgt ccgagccgaa tttaaccttt atccatgtgc cgccgggacg 1560
cgccaaccgt tcaggctggt atctctacaa ccgcgcgccg aacatggatt ccatcatcag 1620
ccatcagccg ctggaatata accgttatct taataagctg gtcgcgtggg cgtggttcaa 1680
cggcctgctg acgtcgcgaa cgcatctgtt tattaagggc aacggtattg tcgacctgcc 1740
taagttacag gagatggtcg ccgatgtttc gcaccatttc ccgctgcgct tgcctgctcc 1800
gacgccgaaa gcgctctaca gcccctgtga aattcgccat ctggcgatta tcgttaacct 1860
cgaatatgac ccgacggcgg cgtttcgcaa taaagtggtc cattttgact tccgtaagct 1920
ggacgttttc agctttggcg aagagcaaaa ctgtctgata ggcagtatcg acttgttata 1980
tcgcaactcg tggaacgaag tgcgtactct gcactttaac ggcgagcagg cgatgatcga 2040
agcgctgaaa acgattctgg ggaaaatgca ccaggatgcc gcgccgccgg atagcgtgga 2100
ggtgttctgc tacagtcagc atcttcgcgg cctgattcgc acccgtgtgc agcaactggt 2160
ctccgaatgt attgagctac gtctttccag cacccgtcag gagaccggtc gcttcaaggc 2220
gctgcgggtt tccgggcaga cgtgggggct attcttcgaa cgcttgaatg tctcggtgca 2280
gaagctggag aacgctatcg aattctacgg cgcgatttcg cataacaagc tgcacgggct 2340
gtcggtacag gtggaaacca accaggtgaa attgccgtca gtggtggatg gcttcgccag 2400
cgaagggatt atccagttct tctttgaaga aacaggcgat gagaaaggct ttaacattta 2460
tattctggat gaaagtaacc gggcggaagt atatcaccac tgcgaaggta gcaaggaaga 2520
actggtgcgc gacgtcagtc gcttctattc gtcatcgcac gatcgcttca cgtatggctc 2580
cagttttatc aactttaacc tgccgcagtt ctaccagata gtgaaaaccg atggccgcgc 2640
gcaggtgatc ccattccgta cgcagcctat caacaccgtg ccgccagcaa accaggatca 2700
tgacgcgccg ctattgcagc agtatttttc g 2731

<210> 87
<211> 826
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> cAMP-activated global transcriptional regulator
(crp)

<400> 87
aagctatgct aaaacagaca agatgctaca gtaatacatt gacgtactgc atgtatgcag 60
aggacatcac attacaggct acaatctatt ttcgtagccc ccttcccagg tagcgggaag 120
tatatttttg caaccccaga gacagtgccg ttttctggct ctggagacag cttataacag 180
aggataaccg cgcatggtgc ttggcaaacc gcaaacagac ccgactcttg aatggttctt 240
gtctcattgc cacattcata agtacccgtc aaagagcacg ctgattcacc agggtgaaaa 300
agcagaaacg ctgtactaca tcgttaaagg ctccgtggca gtgctgatca aagatgaaga 360
agggaaagaa atgatccttt cttatctgaa tcagggtgat tttattggtg aactgggcct 420
gtttgaagaa ggccaggaac gcagcgcctg ggtacgtgcg aaaaccgcat gtgaggtcgc 480
tgaaatttcc tacaaaaaat ttcgccaatt aatccaggtc aacccggata ttctgatgcg 540
cctctcttcc cagatggctc gtcgcttaca agtcacctct gaaaaagtag gtaacctcgc 600
cttccttgac gtcaccgggc gtatcgctca gacgctgctg aatctggcga aacagcccga 660
tgccatgacg cacccggatg ggatgcagat caaaatcact cgtcaggaaa tcggccagat 720
cgtcggctgc tcccgcgaaa ccgttggtcg tattttgaaa atgctggaag atcaaaacct 780
gatctccgcg catggcaaga ccatcgtcgt ctacggcacc cgttaa 826

<210> 88
<211> 1566
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase (cGAS), isoform 1

<400> 88

atgcagcctt ggcacggaaa ggccatgcag agagcttccg aggccggagc cactgccccc 60
aaggcttccg cacggaatgc caggggcgcc ccgatggatc ccaccgagtc tccggctgcc 120
cccgaggccg ccctgcctaa ggcgggaaag ttcggccccg ccaggaagtc gggatcccgg 180
cagaaaaaga gcgccccgga cacccaggag aggccgcccg tccgcgcaac tggggcccgc 240
gccaaaaagg cccctcagcg cgcccaggac acgcagccgt ctgacgccac cagcgccccc 300
ggggcagagg ggctggagcc tcctgcggct cgggagccgg ctctttccag ggctggttct 360
tgccgccaga ggggcgcgcg ctgctccacg aagccaagac ctccgcccgg gccctgggac 420
gtgcccagcc ccggcctgcc ggtctcggcc cccattctcg tacggaggga tgcggcgcct 480
ggggcctcga agctccgggc ggttttggag aagttgaagc tcagccgcga tgatatctcc 540
acggcggcgg ggatggtgaa aggggttgtg gaccacctgc tgctcagact gaagtgcgac 600
tccgcgttca gaggcgtcgg gctgctgaac accgggagct actatgagca cgtgaagatt 660
tctgcaccta atgaatttga tgtcatgttt aaactggaag tccccagaat tcaactagaa 720
gaatattcca acactcgtgc atattacttt gtgaaattta aaagaaatcc gaaagaaaat 780
cctctgagtc agtttttaga aggtgaaata ttatcagctt ctaagatgct gtcaaagttt 840
aggaaaatca ttaaggaaga aattaacgac attaaagata cagatgtcat catgaagagg 900
aaaagaggag ggagccctgc tgtaacactt cttattagtg aaaaaatatc tgtggatata 960
accctggctt tggaatcaaa aagtagctgg cctgctagca cccaagaagg cctgcgcatt 1020
caaaactggc tttcagcaaa agttaggaag caactacgac taaagccatt ttaccttgta 1080
cccaagcatg caaaggaagg aaatggtttc caagaagaaa catggcggct atccttctct 1140
cacatcgaaa aggaaatttt gaacaatcat ggaaaatcta aaacgtgctg tgaaaacaaa 1200
gaagagaaat gttgcaggaa agattgttta aaactaatga aataccttt agaacagctg 1260
aaagaaaggt ttaaagacaa aaaacatctg gataaattct cttcttatca tgtgaaaact 1320
gccttctttc acgtatgtac ccagaaccct caagacagtc agtgggaccg caaagacctg 1380
ggcctctgct ttgataactg cgtgacatac tttcttcagt gcctcaggac agaaaaactt 1440
gagaattatt ttattcctga attcaatcta ttctctagca acttaattga caaaagaagt 1500
aaagaatttc tgacaaagca aattgaatat gaaagaaaca atgagtttcc agtttttgat 1560
gaattt 1566

<210> 89
<211> 1137
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Stimulator of Interferon Genes (STING)(H232 Allele)

<400> 89
atgccccact ccagcctgca tccatccatc ccgtgtccca ggggtcacgg ggcccagaag 60
gcagccttgg ttctgctgag tgcctgcctg gtgacccttt gggggctagg agagccacca 120
gagcacactc tccggtacct ggtgctccac ctagcctccc tgcagctggg actgctgtta 180
aacggggtct gcagcctggc tgaggagctg cgccacatcc actccaggta ccggggcagc 240
tactggagga ctgtgcgggc ctgcctgggc tgccccctcc gccgtggggc cctgttgctg 300
ctgtccatct atttctacta ctccctccca aatgcggtcg gcccgccctt cacttggatg 360
cttgccctcc tgggcctctc gcaggcactg aacatcctcc tgggcctcaa gggcctggcc 420
ccagctgaga tctctgcagt gtgtgaaaaa gggaatttca acgtggccca tgggctggca 480
tggtcatatt acatcggata tctgcggctg atcctgccag agctccaggc ccggattcga 540
acttacaatc agcattacaa caacctgcta cggggtgcag tgagccagcg gctgtatatt 600
ctcctcccat tggactgtgg ggtgcctgat aacctgagta tggctgaccc caacattcgc 660
ttcctggata aactgcccca gcagaccggt gaccatgctg gcatcaagga tcgggtttac 720
agcaacagca tctatgagct tctggagaac gggcagcggg cgggcacctg tgtcctggag 780
tacgccaccc ccttgcagac tttgtttgcc atgtcacaat acagtcaagc tggctttagc 840
cgggaggata ggcttgagca ggccaaactc ttctgccgga cacttgagga catcctggca 900
gatgcccctg agtctcagaa caactgccgc ctcattgcct accaggaacc tgcagatgac 960
agcagcttct cgctgtccca ggaggttctc cggcacctgc ggcaggagga aaaggaagag 1020
gttactgtgg gcagcttgaa gacctcagcg gtgcccagta cctccacgat gtcccaagag 1080
cctgagctcc tcatcagtgg aatggaaaag cccctccctc tccgcacgga tttctct 1137

<210> 90
<211> 972
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> lipid A biosynthesis myristoyltransferase (msbB)

<400> 90
ttatttgatg ggataaagat ctttacgctt atacggctga atctcgcctg gcttgcgggt 60
tttgagcagc ttcaggatcc aggtgtactg ttccggatgc gggccgacaa aaatttcgac 120
ctcttcgttc atccgtctgg cgatagtgtg gtcgtcagcc gtgagcagat cgtccattgg 180
cgggcgaatc tggatagtca ggcgatgcgt tttaccatta tacaccggga aaagcggtat 240
cacgcgtgcg cggcacactt tcatcagccg accaattgca ggcagcgtcg ctttgtatgt 300
cgcaaagaaa tcaacgaatt cactatgctc cgggccgtga tcctggtccg gcaggtagta 360
accccagtag ccctgacgaa cagactgaat aaagggttta atcccgtcat tacgcgcatg 420
caaacgtccg ccgaaacgcc gacgcactgt gttccagata tagtcaaaaa ccggattacc 480
ctgattatga aacatcgccg ccatttttttg cccctgagag gccatcagca tggctggaat 540
gtcgacgccc cagccatgcg gtacgagaaa aatgactttt tcgtcgttac gacgcatctc 600
ctcgataatc tccagacctt cccagtcaac acgctgttga attttttttcg gaccgcgcat 660
cgccaactca gccatcatcg ccattgcctg tggcgcggtg gcgaacatct catcgacaat 720
cgcttcgcgc tcagcttcgc tacgctgcgg aaagcacaac gacagattaa ttagcgcccg 780
gcgacgagaa ctcttcccca gccgtccggc aaaacgcccc agcgtcgcca gcaaagggtc 840
gcggaatgat gccggtgtta atgcgatccc cgccattgcc gccgcgccca accaggcgcc 900
ccaatactgt ggatagcgaa aggatttttc gaattcaggg atatactcac tattattttt 960
tttggtttcc at 972

<210> 91
<211> 1038
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> Phosphoribosylaminoimidazole synthetase (purI)

<400> 91
ttattcaata accacacgct gttcggaatc agaggctttg atgataccga ttttccatgc 60
gttttcacct ttctcgttta gcagagcaag cgctttgtcc gcttccggag cggagagcgc 120
aatcaccatg ccgacgccgc agttaaaggt acggtacatt tcatgtcggc tgacattacc 180
ggcggtttgc agccaggtaa agatggcggg ccactgccag gacgactcat taattaccgc 240
ctgggtattc tccggcagaa cgcgcggaat attttcccaa aagcccccgc cggtgaggtg 300
ggcgatagcg tgtacatcga cgttttcaat cagttccaga accgatttta cgtagatacg 360
ggtcggttca agcagatgat cggccagcgg cttcccttcc agcagagtgg tttgtgggtc 420
gcagccgcta acgtcaataa ttttccgcac cagcgaatat ccattcgagt gcgggccgct 480
ggagccgagt gcaatcagca cgtcgccttc ggcaacccgg gagccgtcga tgatttctga 540
tttttcgact acgccgacgc agaaacccgc cacatcgtaa tcttcgccgt gatacatgcc 600
cggcatttcc gccgtctcgc cgccgaccag cgcgcagccg gattgcaggc agccttcggc 660
aataccgttg atcacgctgg cggcggtatc gacatccagt ttacccgtgg catagtaatc 720
gaggaaaaac agcggttccg cgccctgaac gaccagatcg tttacgcaca ttgccaccag 780
atcaataccg atagcgtcgt gacgctttaa gtccatcgcc aggcgaagtt tggtacctac 840
gccgtcagtg ccggaaacca gtaccggttc acgatatttt tgcggcaacg cgcacagcgc 900
accgaaaccg cccagaccgc ccataacctc cgggcggcga gttttcttca ctacgccttt 960
gattcgatca accagagcgt tacccgcatc aatatcgacg ccggcatctt tatagctaag 1020
agaggtctta tcggtcac 1038

<210> 92
<211> 426
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Survivin (SVN)/BIRC5, isoform 1

<400> 92
atgggtgccc cgacgttgcc ccctgcctgg cagcccttc tcaaggacca ccgcatctct 60

acattcaaga actggccctt cttggagggc tgcgcctgca ccccggagcg gatggccgag 120
gctggcttca tccactgccc cactgagaac gagccagact tggcccagtg tttcttctgc 180
ttcaaggagc tggaaggctg ggagccagat gacgacccca tagaggaaca taaaaagcat 240
tcgtccggtt gcgctttcct ttctgtcaag aagcagtttg aagaattaac ccttggtgaa 300
tttttgaaac tggacagaga aagagccaag aacaaaattg caaaggaaac caacaataag 360
aagaaagaat ttgaggaaac tgcggagaaa gtgcgccgtg ccatcgagca gctggctgcc 420
atggat 426

<210> 93
<211> 285
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> araBAD promoter (pBAD)

<400> 93
aagaaaccaa ttgtccatat tgcatcagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct 60
tctcgctaac caaaccggta accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca 120
aagccatgac aaaaacgcgt aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180
attatttgca cggcgtcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240
atcttacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccat 285

<210> 94
<211> 459
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Interleukin 2 (IL-2)

<400> 94
atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 120
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 180
acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 240
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 300
agacccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 360
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 420
tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactgact 459

<210> 95
<211> 567
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Interferon (IFN) alpha

<400> 95
atggcctcgc cctttgcttt actgatggtc ctggtggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60
tctctgggct gtgatctccc tgagacccac agcctggata acaggaggac cttgatgctc 120
ctggcacaaa tgagcagaat ctctccttcc tcctgtctga tggacagaca tgactttgga 180
tttccccagg aggagtttga tggcaaccag ttccagaagg ctccagccat ctctgtcctc 240
catgagctga tccagcagat cttcaacctc tttaccacaa aagattcatc tgctgcttgg 300
gatgaggacc tcctagacaa attctgcacc gaactctacc agcagctgaa tgacttggaa 360
gcctgtgtga tgcaggagga gagggtggga gaaactcccc tgatgaatgc ggactccatc 420
ttggctgtga agaaatactt ccgaagaatc actctctatc tgacagagaa gaaatacagc 480
ccttgtgcct gggaggttgt cagagcagaa atcatgagat ccctctcttt atcaacaaac 540
ttgcaagaaa gattaaggag gaaggaa 567

<210> 96
<211> 729
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD48, isoform 1

<400> 96
atgtgctcca gaggttggga ttcgtgtctg gctctggaat tgctactgct gcctctgtca 60
ctcctggtga ccagcattca aggtcacttg gtacatatga ccgtggtctc cggcagcaac 120
gtgactctga acatctctga gagcctgcct gagaactaca aacaactaac ctggttttat 180
actttcgacc agaagattgt agaatgggat tccagaaaat ctaagtactt tgaatccaaa 240
tttaaaggca gggtcagact tgatcctcag agtggcgcac tgtacatctc taaggtccag 300
aaagaggaca acagcaccta catcatgagg gtgttgaaaa agactgggaa tgagcaagaa 360
tggaagatca agctgcaagt gcttgaccct gtacccaagc ctgtcatcaa aattgagaag 420
atagaagaca tggatgacaa ctgttatctg aaactgtcat gtgtgatacc tggcgagtct 480
gtaaactaca cctggtatgg ggacaaaagg cccttcccaa aggagctcca gaacagtgtg 540
cttgaaacca cccttatgcc acataattac tccaggtgtt atacttgcca agtcagcaat 600
tctgtgagca gcaagaatgg cacggtctgc ctcagtccac cctgtaccct ggcccggtcc 660
tttggagtag aatggattgc aagttggcta gtggtcacgg tgcccaccat tcttggcctg 720
ttacttacc 729

<210> 97
<211> 1602
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD276/B7-H3, isoform 1

<400> 97
atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtggtggca 120
ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 240
gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300
gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 360
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgctgccg tcagcctgca ggtggccgct 420
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480
gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540
gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 660
ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 720
agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg 780
ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tcccccgagc ctggcttcag cctggcacag 840
ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc 900
cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacaa 960
ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc 1020
ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgct gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac 1080
tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 1140
atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg tgttctggca ggatgggcag 1200
ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt 1260
gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg 1320
cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1380
acattccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg 1440
ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1500
gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1560
aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cc 1602

<210> 98

<211> 846
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> B7-H4/VTCN1

<400> 98
atggcttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct 60
ggagcaattg cactcatcat tggctttggt atttcaggga gacactccat cacagtcact 120
actgtcgcct cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct 180
gacatcaaac tttctgatat cgtgatacaa tggctgaagg aaggtgtttt aggcttggtc 240
catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tcggagcagg atgaaatgtt cagaggccgg 300
acagcagtgt ttgctgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggct gaaaaacgtg 360
caactcacag atgctggcac ctacaaatgt tatatcatca cttctaaagg caaggggaat 420
gctaaccttg agtataaaac tggagccttc agcatgccgg aagtgaatgt ggactataat 480
gccagctcag agaccttgcg gtgtgaggct ccccgatggt tcccccagcc cacagtggtc 540
tgggcatccc aagttgacca gggagccaac ttctcggaag tctccaatac cagctttgag 600
ctgaactctg agaatgtgac catgaaggtt gtgtctgtgc tctacaatgt tacgatcaac 660
aacacatact cctgtatgat tgaaaatgac attgccaaag caacagggga tatcaaagtg 720
acagaatcgg agatcaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaaa ggcttctctg 780
tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg 840
ctaaaa 846

<210> 99
<211> 867
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> BTLA/CD272, isoform 1

<400> 99
atgaagacat tgcctgccat gcttggaact gggaaattat tttgggtctt cttcttaatc 60
ccatatctgg acatctggaa catccatggg aaagaatcat gtgatgtaca gctttatata 120
aagagacaat ctgaacactc catcttagca ggagatccct ttgaactaga atgccctgtg 180
aaatactgtg ctaacaggcc tcatgtgact tggtgcaagc tcaatggaac aacatgtgta 240
aaacttgaag atagacaaac aagttggaag gaagagaaga acatttcatt tttcattcta 300
cattttgaac cagtgcttcc taatgacaat gggtcatacc gctgttctgc aaattttcag 360
tctaatctca ttgaaagcca ctcaacaact ctttatgtga cagatgtaaa aagtgcctca 420
gaacgaccct ccaaggacga aatggcaagc agaccctggc tcctgtatag tttacttcct 480
ttgggggggat tgcctctact catcactacc tgtttctgcc tgttctgctg cctgagaagg 540
caccaaggaa agcaaaatga actctctgac acagcaggaa gggaaattaa cctggttgat 600
gctcacctta agagtgagca aacagaagca agcaccaggc aaaattccca agtactgcta 660
tcagaaactg gaatttatga taatgaccct gacctttgtt tcaggatgca ggaagggtct 720
gaagtttatt ctaatccatg cctggaagaa aacaaaccag gcattgttta tgcttccctg 780
aaccattctg tcattggacc gaactcaaga ctggcaagaa atgtaaaaga agcaccaaca 840
gaatatgcat ccatatgtgt gaggagt 867

<210> 100
<211> 276
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4)

<400> 100
atgaagctct gcgtgactgt cctgtctctc ctcatgctag tagctgcctt ctgctctcca 60
gcgctctcag caccaatggg ctcagaccct cccaccgcct gctgcttttc ttacaccgcg 120
aggaagcttc ctcgcaactt tgtggtagat tactatgaga ccagcagcct ctgctcccag 180

ccagctgtgg tattccaaac caaaagaagc aagcaagtct gtgctgatcc cagtgaatcc 240
tgggtccagg agtacgtgta tgacctggaa ctgaac 276

<210> 101
<211> 3537
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD103/ITGAE

<400> 101
atgtggctct tccacactct gctctgcata gccagcctgg ccctgctggc cgctttcaat 60
gtggatgtgg cccggccctg gctcacgccc aagggaggtg ccccttttcgt gctcagctcc 120
cttctgcacc aagaccccag caccaaccag acctggctcc tggtcaccag ccccagaacc 180
aagaggacac cagggcccct ccatcgatgt tcccttgtcc aggatgaaat cctttgccat 240
cctgtagagc atgtccccat ccccaagggg aggcaccggg gagtgaccgt tgtccggagc 300
caccacggtg ttttgatatg cattcaagtg ctggtccggc ggcctcacag cctcagctca 360
gaactcacag gcacctgtag cctcctgggc cctgacctcc gtccccaggc tcaggccaac 420
ttcttcgacc ttgaaaatct cctggatcca gatgcacgtg tggacactgg agactgctac 480
agcaacaaag aaggcggtgg agaagacgat gtgaacacag ccaggcagcg ccgggctctg 540
gagaaggagg aggaggaaga caaggaggag gaggaagacg aggaggagga ggaagctggc 600
accgagattg ccatcatcct ggatggctca ggaagcattg atcccccaga ctttcagaga 660
gccaaagact tcatctccaa catgatgagg aacttctatg aaaagtgttt tgagtgcaac 720
tttgccttgg tgcagtatgg aggagtgatc cagactgagt ttgaccttcg ggacagccag 780
gatgtgatgg cctccctcgc cagagtccag aacatcactc aagtggggag tgtcaccaag 840
actgcctcag ccatgcaaca cgtcttagac agcatcttca cctcaagcca cggctccagg 900
agaaaggcat ccaaggtcat ggtggtgctc accgatggtg gcatattcga ggacccccctc 960
aaccttacga cagtcatcaa ctcccccaaa atgcagggtg ttgagcgctt tgccattggg 1020
gtgggagaag aatttaagag tgctaggact gcgagggaac tgaacctgat cgcctcagac 1080
ccggatgaga cccatgcttt caaggtgacc aactacatgg cgctggatgg gctgctgagc 1140
aaactgcggt acaacatcat cagcatggaa ggcacggttg gagacgccct tcactaccag 1200
ctggcacaga ttggcttcag tgctcagatc ctggatgagc ggcaggtgct gctcggcgcc 1260
gtcggggcct ttgactggtc cggaggggcg ttgctctacg acacacgcag ccgccggggc 1320
cgcttcctga accagacagc ggcggcggcg gcagacgcgg aggctgcgca gtacagctac 1380
ctgggttacg ctgtggccgt gctgcacaag acctgcagcc tctcctacat cgcgggggct 1440
ccacggtaca aacatcatgg ggccgtgttt gagctccaga aggagggcag agaggccagc 1500
ttcctgccag tgctggaggg agagcagatg gggtcctatt ttggctctga gctgtgccct 1560
gtggacattg acatggatgg aagcacggac ttcttgctgg tggctgctcc attttaccac 1620
gttcatggag aagaaggcag agtctacgtg taccgtctca gcgagcagga tggttctttc 1680
tccttggcac gcatactgag tgggcacccc gggttcacca atgcccgctt tggctttgcc 1740
atggcggcta tgggggatct cagtcaggat aagctcacag atgtggccat cggggccccc 1800
ctggaaggtt ttggggcaga tgatggtgcc agcttcggca gtgtgtatat ctacaatgga 1860
cactgggacg gcctctccgc cagcccctcg cagcggatca gagcctccac ggtggcccca 1920
ggactccagt acttcggcat gtccatggct ggtggctttg atattagtgg cgacggcctt 1980
gccgacatca ccgtgggcac tctgggccag gcggttgtgt tccgctcccg gcctgtggtt 2040
cgcctgaagg tctccatggc cttcaccccc agcgcactgc ccatcggctt caacggcgtc 2100
gtgaatgtcc gtttatgttt tgaaatcagc tctgtaacca cagcctctga gtcaggcctc 2160
cgcgaggcac ttctcaactt cacgctggat gtggatgtgg ggaagcagag gagacggctg 2220
cagtgttcag acgtaagaag ctgtctgggc tgcctgaggg agtggagcag cggatcccag 2280
ctttgtgagg acctcctgct catgcccaca gagggagagc tctgtgagga ggactgcttc 2340
tccaatgcca gtgtcaaagt cagctaccag ctccagaccc ctgagggaca gacggaccat 2400
ccccagccca tcctggaccg ctacactgag ccctttgcca tcttccagct gccctatgag 2460
aaggcctgca agaataagct gttttgtgtc gcagaattac agttggccac caccgtctct 2520
cagcaggagt tggtggtggg tctcacaaag gagctgaccc tgaacattaa cctaactaac 2580
tccggggaag attcctacat gacaagcatg gccttgaatt accccagaaa cctgcagttg 2640
aagaggatgc aaaagcctcc ctctccaaac attcagtgtg atgaccctca gccggttgct 2700
tctgtcctga tcatgaactg caggattggt caccccgtcc tcaagaggtc atctgctcat 2760
gtttcagtcg tttggcagct agaggagaat gcctttccaa acaggacagc agacatcact 2820
gtgactgtca ccaattccaa tgaaagacgg tctttggcca acgagaccca cacccttcaa 2880
ttcaggcatg gcttcgttgc agttctgtcc aaaccatcca taatgtacgt gaacacaggc 2940

caggggcttt ctcaccacaa agaattcctc ttccatgtac atggggagaa cctctttgga 3000
gcagaatacc agttgcaaat ttgcgtccca accaaattac gaggtctcca ggttgtagca 3060
gtgaagaagc tgacgaggac tcaggcctcc acggtgtgca cctggagtca ggagcgcgct 3120
tgtgcgtaca gttcggttca gcatgtggaa gaatggcatt cagtgagctg tgtcatcgct 3180
tcagataaag aaaatgtcac cgtggctgca gagatctcct gggatcactc tgaggagtta 3240
ctaaaagatg taactgaact gcagatcctt ggtgaaatat ctttcaacaa atctctatat 3300
gagggactga atgcagagaa ccacagaact aagatcactg tcgtcttcct gaaagatgag 3360
aagtaccatt ctttgcctat catcattaaa ggcagcgttg gtggacttct ggtgttgatc 3420
gtgattctgg tcatcctgtt caagtgtggc ttttttaaaa gaaaatatca acaactgaac 3480
ttggagagca tcaggaaggc ccagctgaaa tcagagaatc tgctcgaaga agagaat 3537

<210> 102
<211> 1671
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD19, isoform 1

<400> 102
atgccacctc ctcgcctcct cttcttcctc ctcttcctca cccccatgga agtcaggccc 60
gaggaacctc tagtggtgaa ggtggaagag ggagataacg ctgtgctgca gtgcctcaag 120
gggacctcag atggccccac tcagcagctg acctggtctc gggagtcccc gcttaaaccc 180
ttcttaaaac tcagcctggg gctgccaggc ctgggaatcc acatgaggcc cctggccatc 240
tggcttttca tcttcaacgt ctctcaacag atgggggget tctacctgtg ccagccgggg 300
ccccctctg agaaggcctg gcagcctggc tggacagtca atgtggaggg cagcggggag 360
ctgttccggt ggaatgtttc ggacctaggt ggcctgggct gtggcctgaa gaacaggtcc 420
tcagagggcc ccagctcccc ttccgggaag ctcatgagcc ccaagctgta tgtgtgggcc 480
aaagaccgcc ctgagatctg ggagggagag cctccgtgtc tcccaccgag ggacagcctg 540
aaccagagcc tcagccagga cctcaccatg gcccctggct ccacactctg gctgtcctgt 600
ggggtacccc ctgactctgt gtccaggggc cccctctcct ggacccatgt gcaccccaag 660
gggcctaagt cattgctgag cctagagctg aaggacgatc gcccggccag agatatgtgg 720
gtaatggaga cgggtctgtt gttgccccgg gccacagctc aagacgctgg aaagtattat 780
tgtcaccgtg gcaacctgac catgtcattc cacctggaga tcactgctcg gccagtacta 840
tggcactggc tgctgaggac tggtggctgg aaggtctcag ctgtgacttt ggcttatctg 900
atcttctgcc tgtgttccct tgtgggcatt cttcatcttc aaagagccct ggtcctgagg 960
aggaaaagaa agcgaatgac tgaccccacc aggagattct tcaaagtgac gcctcccccа 1020
ggaagcgggc cccagaacca gtacgggaac gtgctgtctc tccccacacc cacctcaggc 1080
ctcggacgcg cccagcgttg ggccgcaggc ctgggggggca ctgccccgtc ttatggaaac 1140
ccgagcagcg acgtccaggc ggatggagcc ttggggtccc ggagcccgcc gggagtgggc 1200
ccagaagaag aggaagggga gggctatgag gaacctgaca gtgaggagga ctccgagttc 1260
tatgagaacg actccaacct tgggcaggac cagctctccc aggatggcag cggctacgag 1320
aaccctgagg atgagcccct gggtcctgag gatgaagact ccttctccaa cgctgagtct 1380
tatgagaacg aggatgaaga gctgacccag ccggtcgcca ggacaatgga cttcctgagc 1440
cctcatgggt cagcctggga ccccagccgg gaagcaacct ccctggcagg gtcccagtcc 1500
tatgaggata tgagaggaat cctgtatgca gccccccagc tccgctccat tcggggccag 1560
cctggaccca atcatgagga agatgcagac tcttatgaga acatggataa tcccgatggg 1620
ccagacccag cctggggagg agggggccgc atgggcacct ggagcaccag g 1671

<210> 103
<211> 579
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Interleukin 18 (IL-18), isoform 1

<400> 103
atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac 60
aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag 120
cttgaatcta aattatcagt cataagaaat ttgaatgacc aagttctctt cattgaccaa 180

ggaaatcggc ctctatttga agatatgact gattctgact gtagagataa tgcaccccgg 240
accatattta ttataagtat gtataaagat agccagccta gaggtatggc tgtaactatc 300
tctgtgaagt gtgagaaaat ttcaactctc tcctgtgaga acaaaattat ttcctttaag 360
gaaatgaatc ctcctgataa catcaaggat acaaaaagtg acatcatatt ctttcagaga 420
agtgtcccag gacatgataa taagatgcaa tttgaatctt catcatacga aggatacttt 480
ctagcttgtg aaaaagagag agacctttt aaactcattt tgaaaaaaga ggatgaattg 540
ggggatagat ctataatgtt cactgttcaa aacgaagac 579

<210> 104
<211> 1005
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Fas ligand

<400> 104
atgctgggca tctggaccct cctacctctg gttcttacgt ctgttgctag attatcgtcc 60
aaaagtgtta atgcccaagt gactgacatc aactccaagg gattggaatt gaggaagact 120
gttactacag ttgagactca gaacttggaa ggcctgcatc atgatggcca attctgccat 180
aagccctgtc ctccaggtga aaggaaagct agggactgca cagtcaatgg ggatgaacca 240
gactgcgtgc cctgccaaga agggaaggag tacacagaca aagcccattt ttcttccaaa 300
tgcagaagat gtagattgtg tgatgaagga catggcttag aagtggaaat aaactgcacc 360
cggacccaga ataccaagtg cagatgtaaa ccaaactttt tttgtaactc tactgtatgt 420
gaacactgtg acccttgcac caaatgtgaa catggaatca tcaaggaatg cacactcacc 480
agcaacacca agtgcaaaga ggaaggatcc agatctaact tggggtggct ttgtcttctt 540
cttttgccaa ttccactaat tgtttgggtg aagagaaagg aagtacagaa aacatgcaga 600
aagcacagaa aggaaaacca aggttctcat gaatctccaa ctttaaatcc tgaaacagtg 660
gcaataaatt tatctgatgt tgacttgagt aaatatatca ccactattgc tggagtcatg 720
acactaagtc aagttaaagg ctttgttcga aagaatggtg tcaatgaagc caaaatagat 780
gagatcaaga atgacaatgt ccaagacaca gcagaacaga aagttcaact gcttcgtaat 840
tggcatcaac ttcatggaaa gaaagaagcg tatgacacat tgattaaaga tctcaaaaaa 900
gccaatcttt gtactcttgc agagaaaatt cagactatca tcctcaagga cattactagt 960
gactcagaaa attcaaactt cagaaatgaa atccaaagct tggtc 1005

<210> 105
<211> 1023
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> firA/SSC

<400> 105
atgccttcaa ttcgactggc tgacttagca gaacagttgg atgcagaatt acacggtgat 60
ggcgatatcg tcatcaccgg cgttgcgtcc atgcaatctg caacaacagg ccacattacg 120
tttatggtga atcctaagta ccgtgaacac ttaggtttat gccaggcttc tgcggttgtc 180
atgacgcagg acgatcttcc ttttgctaag agtgcggcgc tggtagttaa aaatccctac 240
ctgacctacg cgcgcatggc gcaaatttta gatactacgc cgcagcccgc gcagaatatc 300
gcgccaagcg ccgtgattga tgcgacggca acgctgggta gcaatgtttc agtcggcgcg 360
aatgcggtga ttgaatctgg cgtacaactg ggcgataacg tggttatcgg cgcaggctgt 420
ttcgtcggaa aaaatagcaa aatcggggcg ggttcacgct tgtgggcgaa cgtaacgatt 480
taccacgaca ttcagatcgg tgagaattgc ctgatccagt ccagtacggt gatcggcgcg 540
gacggttttg gctacgctaa cgatcgtggc aactgggtga agatcccaca actgggccgg 600
gtcattattg gcgatcgtgt cgagatcggc gcttgtacca ccattgaccg tggcgcgttg 660
gatgatactg ttattggcaa tggcgtgatt attgataatc agtgccagat tgcacataac 720
gtcgtgattg gcgacaatac ggcagttgcc ggtggcgtca ttatggcggg tagcctgaag 780
attggccgtt actgcatgat tggcggcgcc agcgtgatca atgggcatat ggaaatatgc 840
gacaaagtca cggtaactgg catgggtatg gtgatgcgtc ccatcacgga accgggcgtc 900
tactcctcag gcattccgct gcaacccaac aaagtatggc gtaaaactgc tgcactggtg 960
atgaacattg atgatatgag caagcgtctc aaagcgattg agcgcaaggt taatcaacaa 1020

gac 1023

<210> 106
<211> 918
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> htrB

<400> 106
atgacgaatc tacccaagtt ctccaccgca ctgcttcatc cgcgttattg gttaacctgg 60
ttgggtattg gcgtactttg gttagtcgtg caattgccct acccggttat ctaccgcctc 120
ggttgtggat taggaaaact ggcgttacgt tttatgaaac gacgcgcaaa aattgtgcat 180
cgcaacctgg aactgtgctt cccggaaatg agcgaacaag aacgccgtaa aatggtggtg 240
aagaatttcg aatccgttgg catgggcctg atggaaaccg gcatggcgtg gttctggccg 300
gaccgccgaa tcgcccgctg gacggaagtg atcggcatgg aacacattcg tgacgtgcag 360
gcgcaaaaac gcggcatcct gttagttggc atccattttc tgacactgga gctgggtgcg 420
cggcagtttg gtatgcagga accgggtatt ggcgtttatc gcccgaacga taatccactg 480
attgactggc tacaaacctg gggccgtttg cgctcaaata aatcgatgct cgaccgcaaa 540
gatttaaaag gcatgattaa agccctgaaa aaaggcgaag tggtctggta cgcaccggat 600
catgattacg gcccgcgctc aagcgttttc gtcccgttgt ttgccgttga gcaggctgcg 660
accacgaccg gaacctggat gctggcacgg atgtccggcg catgtctggt gcccttcgtt 720
ccacgccgta agccagatgg caaagggtat caattgatta tgctgccgcc agagtgttct 780
ccgccactgg atgatgccga aactaccgcc gcgtggatga acaaagtggt cgaaaaatgc 840
atcatgatgg caccagagca gtatatgtgg ttacaccgtc gctttaaaac acgcccggaa 900
ggcgttcctt cacgctat 918

<210> 107
<211> 717
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> ompR

<400> 107
atgcaagaga attataagat tctggtggtt gatgacgata tgcgtctgcg ggcgctactg 60
gaacgttatc tgaccgagca gggcttccag gttcgaagcg tcgctaacgc tgagcagatg 120
gatcgtctgc tgacccgtga atctttccat ctcatggtac tggatttaat gctgccaggt 180
gaagatggtc tgtcgatttg tcgtcgcctg cgtagtcaaa gtaatccaat gccgatcatt 240
atggtcacgg cgaagggtga agaggttgac cgtatcgtcg ggctggaaat cggcgccgat 300
gactacattc ctaaaccgtt taacccgcgc gagctgttgg cgcgtattcg gcccgtgtta 360
cgtcgtcagg caaacgaact gcccggcgcg ccgtcgcagg aagaggccgt tatcgcgttc 420
ggtaagttta aactgaacct cggtacgcgc gagatgttcc gtgaagatga accgatgccg 480
ctgaccagcg gggagtttgc ggtactgaaa gcgttagtca gccatccgcg cgagccgctc 540
tctcgcgata agctgatgaa tctggcccgt ggccgcgagt attccgcgat ggaacgctcc 600
atcgacgtcc agatctcccg cctgcgccgt atggtggaag aagatccggc acatccgcgt 660
tatattcaga ccgtctgggg cctgggctac gtctttgtac cggacggttc taaagca 717

<210> 108
<211> 498
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Inteferon (IFN) gamma

<400> 108
atgaaatata caagttatat cttggctttt cagctctgca tcgttttggg ttctcttggc 60
tgttactgcc aggacccata tgtaaaagaa gcagaaaacc ttaagaaata ttttaatgca 120

ggtcattcag atgtagcgga taatggaact cttttcttag gcattttgaa gaattggaaa 180
gaggagagtg acagaaaaat aatgcagagc caaattgtct ccttttactt caaacttttt 240
aaaaacttta aagatgacca gagcatccaa aagagtgtgg agaccatcaa ggaagacatg 300
aatgtcaagt ttttcaatag caacaaaaag aaacgagatg acttcgaaaa gctgactaat 360
tattcggtaa ctgacttgaa tgtccaacgc aaagcaatac atgaactcat ccaagtgatg 420
gctgaactgt cgccagcagc taaaacaggg aagcgaaaaa ggagtcagat gctgtttcga 480
ggtcgaagag catcccag 498

<210> 109
<211> 699
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Tumor necrosis factor (TNF) alpha

<400> 109
atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctggccg aggaggcgct ccccaagaag 60
acaggggggc cccagggctc caggcggtgc ttgttcctca gcctcttctc cttcctgatc 120
gtggcaggcg ccaccacgct cttctgcctg ctgcactttg gagtgatcgg cccccagagg 180
gaagagttcc ccagggacct ctctctaatc agccctctgg cccaggcagt cagatcatct 240
tctcgaaccc cgagtgacaa gcctgtagcc catgttgtag caaaccctca agctgagggg 300
cagctccagt ggctgaaccg ccgggccaat gccctcctgg ccaatggcgt ggagctgaga 360
gataaccagc tggtggtgcc atcagagggc ctgtacctca tctactccca ggtcctcttc 420
aagggccaag gctgcccctc cacccatgtg ctcctcaccc acaccatcag ccgcatcgcc 480
gtctcctacc agaccaaggt caacctcctc tctgccatca agagcccctg ccagagggag 540
accccagagg gggctgaggc caagccctgg tatgagccca tctatctggg aggggtcttc 600
cagctggaga agggtgaccg actcagcgct gagatcaatc ggcccgacta tctcgacttt 660
gccgagtctg ggcaggtcta ctttgggatc attgccctg 699

<210> 110
<211> 825
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Atg5 long isoform

<400> 110
atgacagatg acaaagatgt gcttcgagat gtgtggtttg gacgaattcc aacttgtttc 60
acgctatatc aggatgagat aactgaaagg gaagcagaac catactattt gcttttgcca 120
agagtaagtt atttgacgtt ggtaactgac aaagtgaaaa agcactttca gaaggttatg 180
agacaagaag acattagtga gatatggttt gaatatgaag gcacaccact gaaatggcat 240
tatccaattg gtttgctatt tgatcttctt gcatcaagtt cagctcttcc ttggaacatc 300
acagtacatt ttaagagttt tccagaaaaa gaccttctgc actgtccatc taaggatgca 360
attgaagctc attttatgtc atgtatgaaa gaagctgatg ctttaaaaca taaaagtcaa 420
gtaatcaatg aaatgcagaa aaaagatcac aagcaactct ggatgggatt gcaaaatgac 480
agatttgacc agttttgggc catcaatcgg aaactcatgg aatatcctgc agaagaaaat 540
ggatttcgtt atatcccctt tagaatatat cagacaacga ctgaaagacc tttcattcag 600
aagctgtttc gtcctgtggc tgcagatgga cagttgcaca cactaggaga tctcctcaaa 660
gaagtttgtc cttctgctat tgatcctgaa gatggggaaa aaaagaatca agtgatgatt 720
catggaattg agccaatgtt ggaaacacct ctgcagtggc tgagtgaaca tctgagctac 780
ccggataatt ttcttcatat tagtatcatc ccacagccaa cagat 825

<210> 111
<211> 1350
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Beclin1

<400> 111
atggaagggt ctaagacgtc caacaacagc accatgcagg tgagcttcgt gtgccagcgc 60
tgcagccagc ccctgaaact ggacacgagt ttcaagatcc tggaccgtgt caccatccag 120
gaactcacag ctccattact taccacagcc caggcgaaac caggagagac ccaggaggaa 180
gagactaact caggagagga gccatttatt gaaactcctc gccaggatgg tgtctctcgc 240
agattcatcc ccccagccag gatgatgtcc acagaaagtg ccaacagctt cactctgatt 300
ggggaggcat ctgatggcgg caccatggag aacctcagcc gaagactgaa ggtcactggg 360
gacctttttg acatcatgtc gggccagaca gatgtggatc acccactctg tgaggaatgc 420
acagatactc ttttagacca gctggacact cagctcaacg tcactgaaaa tgagtgtcag 480
aactacaaac gctgtttgga gatcttagag caaatgaatg aggatgacag tgaacagtta 540
cagatggagc taaaggagct ggcactagag gaggagaggc tgatccagga gctggaagac 600
gtggaaaaga accgcaagat agtggcagaa aatctcgaga aggtccaggc tgaggctgag 660
agactggatc aggaggaagc tcagtatcag agagaataca gtgaatttaa acgacagcag 720
ctggagctgg atgatgagct gaagagtgtt gaaaaccaga tgcgttatgc ccagacgcag 780
ctggataagc tgaagaaaac caacgtcttt aatgcaacct tccacatctg gcacagtgga 840
cagtttggca caatcaataa cttcaggctg ggtcgcctgc ccagtgttcc cgtggaatgg 900
aatgagatta atgctgcttg gggccagact gtgttgctgc tccatgctct ggccaataag 960
atgggtctga aatttcagag ataccgactt gttccttacg gaaaccattc atatctggag 1020
tctctgacag acaaatctaa ggagctgccg ttatactgtt ctgggggttt gcggtttttc 1080
tgggacaaca agtttgacca tgcaatggtg gctttcctgg actgtgtgca gcagttcaaa 1140
gaagaggttg agaaaggcga gacacgtttt tgtcttccct acaggatgga tgtggagaaa 1200
ggcaagattg aagacacagg aggcagtggc ggctcctatt ccatcaaaac ccagtttaac 1260
tctgaggagc agtggacaaa agctctcaag ttcatgctga cgaatcttaa gtggggtctt 1320
gcttgggtgt cctcacaatt ttataacaaa 1350

<210> 112
<211> 2352
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Toll-like receptor 2 (TLR2)

<400> 112
atgccacata ctttgtggat ggtgtgggtc ttgggggtca tcatcagcct ctccaaggaa 60
gaatcctcca atcaggcttc tctgtcttgt gaccgcaatg gtatctgcaa gggcagctca 120
ggatctttaa actccattcc ctcagggctc acagaagctg taaaaagcct tgacctgtcc 180
aacaacagga tcacctacat tagcaacagt gacctacaga ggtgtgtgaa cctccaggct 240
ctggtgctga catccaatgg aattaacaca atagaggaag attcttttttc ttccctgggc 300
agtcttgaac atttagactt atcctataat tacttatcta atttatcgtc ttcctggttc 360
aagccccttt cttctttaac attcttaaac ttactgggaa atccttacaa aaccctaggg 420
gaaacatctc ttttttctca tctcacaaaa ttgcaaatcc tgagagtggg aaatatggac 480
accttcacta agattcaaag aaaagatttt gctggactta ccttccttga ggaacttgag 540
attgatgctt cagatctaca gagctatgag ccaaaaagtt tgaagtcaat tcagaatgta 600
agtcatctga tccttcatat gaagcagcat attttactgc tggagatttt tgtagatgtt 660
acaagttccg tggaatgttt ggaactgcga gatactgatt tggacacttt ccatttttca 720
gaactatcca ctggtgaaac aaattcattg attaaaaagt ttacatttag aaatgtgaaa 780
atcaccgatg aaagtttgtt tcaggttatg aaacttttga atcagatttc tggattgtta 840
gaattagagt ttgatgactg tacccttaat ggagttggta attttagagc atctgataat 900
gacagagtta tagatccagg taaagtggaa acgttaacaa tccggaggct gcatattcca 960
aggttttact tattttatga tctgagcact ttatattcac ttacagaaag agttaaaaga 1020
atcacagtag aaaacagtaa agtttttctg gttccttgtt tactttcaca acatttaaaa 1080
tcattagaat acttggatct cagtgaaaat ttgatggttg aagaatactt gaaaaattca 1140
gcctgtgagg atgcctggcc ctctctacaa actttaattt taaggcaaaa tcatttggca 1200
tcattggaaa aaaccggaga gactttgctc actctgaaaa acttgactaa cattgatatc 1260
agtaagaata gttttcattc tatgcctgaa acttgtcagt ggccagaaaa gatgaaatat 1320
ttgaacttat ccagcacacg aatacacagt gtaacaggct gcattcccaa gacactggaa 1380
attttagatg ttagcaacaa caatctcaat ttatttttctt tgaatttgcc gcaactcaaa 1440
gaactttata tttccagaaa taagttgatg actctaccag atgcctccct cttacccatg 1500
ttactagtat tgaaaatcag taggaatgca ataactacgt tttctaagga gcaacttgac 1560

tcatttcaca cactgaagac tttggaagct ggtggcaata acttcatttg ctcctgtgaa 1620
ttcctctcct tcactcagga gcagcaagca ctggccaaag tcttgattga ttggccagca 1680
aattacctgt gtgactctcc atcccatgtg cgtggccagc aggttcagga tgtccgcctc 1740
tcggtgtcgg aatgtcacag gacagcactg gtgtctggca tgtgctgtgc tctgttcctg 1800
ctgatcctgc tcacgggggt cctgtgccac cgtttccatg gcctgtggta tatgaaaatg 1860
atgtgggcct ggctccaggc caaaaggaag cccaggaaag ctcccagcag gaacatctgc 1920
tatgatgcat ttgtttctta cagtgagcgg gatgcctact gggtggagaa ccttatggtc 1980
caggagctgg agaacttcaa tccccccttc aagttgtgtc ttcataagcg ggacttcatt 2040
cctggcaagt ggatcattga caatatcatt gactccattg aaaagagcca caaaactgtc 2100
tttgtgcttt ctgaaaactt tgtgaagagt gagtggtgca agtatgaact ggacttctcc 2160
catttccgtc tttttgatga gaacaatgat gctgccattc tcattcttct ggagcccatt 2220
gagaaaaaag ccattcccca gcgcttctgc aagctgcgga agataatgaa caccaagacc 2280
tacctggagt ggcccatgga cgaggctcag cgggaaggat tttgggtaaa tctgagagct 2340
gcgataaagt cc 2352

<210> 113
<211> 2517
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TLR4, isoform 1

<400> 113
atgatgtctg cctcgcgcct ggctgggact ctgatcccag ccatggcctt cctctcctgc 60
gtgagaccag aaagctggga gccctgcgtg gaggtggttc ctaatattac ttatcaatgc 120
atggagctga atttctacaa aatccccgac aacctcccct tctcaaccaa gaacctggac 180
ctgagcttta atcccctgag gcatttaggc agctatagct tcttcagttt cccagaactg 240
caggtgctgg atttatccag gtgtgaaatc cagacaattg aagatggggc atatcagagc 300
ctaagccacc tctctacctt aatattgaca ggaaacccca tccagagttt agccctggga 360
gccttttctg gactatcaag tttacagaag ctggtggctg tggagacaaa tctagcatct 420
ctagagaact tccccattgg acatctcaaa actttgaaag aacttaatgt ggctcacaat 480
cttatccaat ctttcaaatt acctgagtat ttttctaatc tgaccaatct agagcacttg 540
gacctttcca gcaacaagat tcaaagtatt tattgcacag acttgcgggt tctacatcaa 600
atgcccctac tcaatctctc tttagacctg tccctgaacc ctatgaactt tatccaacca 660
ggtgcattta aagaaattag gcttcataag ctgactttaa gaaataattt tgatagttta 720
aatgtaatga aaacttgtat tcaaggtctg gctggtttag aagtccatcg tttggttctg 780
ggagaattta gaaatgaagg aaacttggaa aagtttgaca aatctgctct agagggcctg 840
tgcaatttga ccattgaaga attccgatta gcatacttag actactacct cgatgatatt 900
attgacttat ttaattgttt gacaaatgtt tcttcatttt ccctggtgag tgtgactatt 960
gaaagggtaa aagacttttc ttataatttc ggatggcaac atttagaatt agttaactgt 1020
aaatttggac agtttcccac attgaaactc aaatctctca aaaggcttac tttcacttcc 1080
aacaaaggtg ggaatgcttt ttcagaagtt gatctaccaa gccttgagtt tctagatctc 1140
agtagaaatg gcttgagttt caaaggttgc tgttctcaaa gtgattttgg gacaaccagc 1200
ctaaagtatt tagatctgag cttcaatggt gttattacca tgagttcaaa cttcttgggc 1260
ttagaacaac tagaacatct ggatttccag cattccaatt tgaaacaaat gagtgagttt 1320
tcagtattcc tatcactcag aaacctcatt taccttgaca tttctcatac tcacaccaga 1380
gttgctttca atggcatctt caatggcttg tccagtctcg aagtcttgaa aatggctggc 1440
aattctttcc aggaaaactt ccttccagat atcttcacag agctgagaaa cttgaccttc 1500
ctggacctct ctcagtgtca actggagcag ttgtctccaa cagcatttaa ctcactctcc 1560
agtcttcagg tactaaatat gagccacaac aacttctttt cattggatac gtttccttat 1620
aagtgtctga actccctcca ggttcttgat tacagtctca atcacataat gacttccaaa 1680
aaacaggaac tacagcattt tccaagtagt ctagctttct taaatcttac tcagaatgac 1740
tttgcttgta cttgtgaaca ccagagtttc ctgcaatgga tcaaggacca gaggcagctc 1800
ttggtggaag ttgaacgaat ggaatgtgca acaccttcag ataagcaggg catgcctgtg 1860
ctgagtttga atatcacctg tcagatgaat aagaccatca ttggtgtgtc ggtcctcagt 1920
gtgcttgtag tatctgttgt agcagttctg gtctataagt tctattttca cctgatgctt 1980
cttgctggct gcataaagta tggtagaggt gaaaacatct atgatgcctt tgttatctac 2040
tcaagccagg atgaggactg ggtaaggaat gagctagtaa agaatttaga agaaggggtg 2100
cctccatttc agctctgcct tcactacaga gactttattc ccggtgtggc cattgctgcc 2160
aacatcatcc atgaaggttt ccataaaagc cgaaaggtga ttgttgtggt gtcccagcac 2220

ttcatccaga gccgctggtg tatctttgaa tatgagattg ctcagacctg gcagtttctg 2280
agcagtcgtg ctggtatcat cttcattgtc ctgcagaagg tggagaagac cctgctcagg 2340
cagcaggtgg agctgtaccg ccttctcagc aggaacactt acctggagtg ggaggacagt 2400
gtcctggggc ggcacatctt ctggagacga ctcagaaaag ccctgctgga tggtaaatca 2460
tggaatccag aaggaacagt gggtacagga tgcaattggc aggaagcaac atctatc 2517

<210> 114
<211> 2574
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TLR5

<400> 114
atgggagacc acctggacct tctcctagga gtggtgctca tggccggtcc tgtgtttgga 60
attccttcct gctcctttga tggccgaata gccttttatc gtttctgcaa cctcacccag 120
gtcccccagg tcctcaacac cactgagagg ctcctgctga gcttcaacta tatcaggaca 180
gtcactgctt catccttccc ctttctggaa cagctgcagc tgctggagct cgggagccag 240
tataccccct tgactattga caaggaggcc ttcagaaacc tgcccaacct tagaatcttg 300
gacctgggaa gtagtaagat atacttcttg catccagatg cttttcaggg actgttccat 360
ctgtttgaac ttagactgta tttctgtggt ctctctgatg ctgtattgaa agatggttat 420
ttcagaaatt taaaggcttt aactcgcttg gatctatcca aaaatcagat tcgtagcctt 480
taccttcatc cttcatttgg gaagttgaat tccttaaagt ccatagattt ttcctccaac 540
caaatattcc ttgtatgtga acatgagctc gagcccctac aagggaaaac gctctccttt 600
tttagcctcg cagctaatag cttgtatagc agagtctcag tggactgggg aaaatgtatg 660
aacccattca gaaacatggt gctggagata ctagatgttt ctggaaatgg ctggacagtg 720
gacatcacag gaaactttag caatgccatc agcaaaagcc aggccttctc tttgattctt 780
gcccaccaca tcatgggtgc cgggtttggc ttccataaca tcaaagatcc tgaccagaac 840
acatttgctg gcctggccag aagttcagtg agacacctgg atctttcaca tgggtttgtc 900
ttctccctga actcacgagt ctttgagaca ctcaaggatt tgaaggttct gaaccttgcc 960
tacaacaaga taaataagat tgcagatgaa gcattttacg gacttgacaa cctccaagtt 1020
ctcaatttgt catataacct tctgggggaa ctttacagtt cgaatttcta tggactacct 1080
aaggtagcct acattgattt gcaaaagaat cacattgcaa taattcaaga ccaaacattc 1140
aaattcctgg aaaaattaca gaccttggat ctccgagaca atgctcttac aaccattcat 1200
tttattccaa gcatacccga tatcttcttg agtggcaata aactagtgac tttgccaaag 1260
atcaacctta cagcgaacct catccactta tcagaaaaca ggctagaaaa tctagatatt 1320
ctctactttc tcctacgggt acctcatctc cagattctca ttttaaatca aaatcgcttc 1380
tcctcctgta gtggagatca aacccttca gagaatccca gcttagaaca gcttttcctt 1440
ggagaaaata tgttgcaact tgcctgggaa actgagctct gttgggatgt ttttgaggga 1500
ctttctcatc ttcaagttct gtatttgaat cataactatc ttaattccct tccaccagga 1560
gtatttagcc atctgactgc attaagggga ctaagcctca actccaacag gctgacagtt 1620
ctttctcaca atgatttacc tgctaattta gagatcctgg acatatccag gaaccagctc 1680
ctagctccta atcctgatgt atttgtatca cttagtgtct tggatataac tcataacaag 1740
ttcatttgtg aatgtgaact tagcacttt atcaattggc ttaatcacac caatgtcact 1800
atagctgggc ctcctgcaga catatattgt gtgtaccctg actcgttctc tggggtttcc 1860
ctcttctctc tttccacgga aggttgtgat gaagaggaag tcttaaagtc cctaaagttc 1920
tccctttca ttgtatgcac tgtcactctg actctgttcc tcatgaccat cctcacagtc 1980
acaaagttcc ggggcttctg ttttatctgt tataagacag cccagagact ggtgttcaag 2040
gaccatcccc agggcacaga acctgatatg tacaaatatg atgcctattt gtgcttcagc 2100
agcaaagact tcacatgggt gcagaatgct ttgctcaaac acctggacac tcaatacagt 2160
gaccaaaaca gattcaacct gtgctttgaa gaaagagact ttgtcccagg agaaaaccgc 2220
attgccaata tccaggatgc catctggaac agtagaaaga tcgtttgtct tgtgagcaga 2280
cacttcctta gagatggctg gtgccttgaa gccttcagtt atgcccaggg caggtgctta 2340
tctgacctta acagtgctct catcatggtg gtggttgggt ccttgtccca gtaccagttg 2400
atgaaacatc aatccatcag aggctttgta cagaaacagc agtatttgag gtggcctgag 2460
gatctccagg atgttggctg gtttcttcat aaactctctc aacagatact aaagaaagaa 2520
aaagaaaaga agaaagacaa taacattccg ttgcaaactg tagcaaccat ctcc 2574

<210> 115
<211> 2712

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TLR3, isoform 1

<400> 115
atgagacaga ctttgccttg tatctacttt tgggggggcc ttttgccctt tgggatgctg 60
tgtgcatcct ccaccaccaa gtgcactgtt agccatgaag ttgctgactg cagccacctg 120
aagttgactc aggtacccga tgatctaccc acaaacataa cagtgttgaa ccttacccat 180
aatcaactca gaagattacc agccgccaac ttcacaaggt atagccagct aactagcttg 240
gatgtaggat ttaacaccat ctcaaaactg gagccagaat tgtgccagaa acttcccatg 300
ttaaaagttt tgaacctcca gcacaatgag ctatctcaac tttctgataa aacctttgcc 360
ttctgcacga atttgactga actccatctc atgtccaact caatccagaa aattaaaaat 420
aatccctttg tcaagcagaa gaatttaatc acattagatc tgtctcataa tggcttgtca 480
tctacaaaat taggaactca ggttcagctg gaaaatctcc aagagcttct attatcaaac 540
aataaaattc aagcgctaaa aagtgaagaa ctggatatct ttgccaattc atctttaaaa 600
aaattagagt tgtcatcgaa tcaaattaaa gagttttctc cagggtgttt tcacgcaatt 660
ggaagattat ttggcctctt tctgaacaat gtccagctgg gtcccagcct tacagagaag 720
ctatgtttgg aattagcaaa cacaagcatt cggaatctgt ctctgagtaa cagccagctg 780
tccaccacca gcaatacaac tttcttggga ctaaagtgga caaatctcac tatgctcgat 840
ctttcctaca acaacttaaa tgtggttggt aacgattcct ttgcttggct tccacaacta 900
gaatatttct tcctagagta taataatata cagcatttgt tttctcactc tttgcacggg 960
cttttcaatg tgaggtacct gaatttgaaa cggtctttta ctaaacaaag tatttccctt 1020
gcctcactcc ccaagattga tgatttttct tttcagtggc taaaatgttt ggagcacctt 1080
aacatggaag ataatgatat tccaggcata aaaagcaata tgttcacagg attgataaac 1140
ctgaaatact taagtctatc caactccttt acaagtttgc gaactttgac aaatgaaaca 1200
tttgtatcac ttgctcattc tcccttacac atactcaacc taaccaagaa taaaatctca 1260
aaaatagaga gtgatgcttt ctcttggttg ggccacctag aagtacttga cctgggcctt 1320
aatgaaattg ggcaagaact cacaggccag gaatggagag gtctagaaaa tattttcgaa 1380
atctatcttt cctacaacaa gtacctgcag ctgactagga actcctttgc cttggtccca 1440
agccttcaac gactgatgct ccgaagggtg gcccttaaaa atgtggatag ctctccttca 1500
ccattccagc ctcttcgtaa cttgaccatt ctggatctaa gcaacaacaa catagccaac 1560
ataaatgatg acatgttgga gggtcttgag aaactagaaa ttctcgattt gcagcataac 1620
aacttagcac ggctctggaa acacgcaaac cctggtggtc ccatttattt cctaaagggt 1680
ctgtctcacc tccacatcct taacttggag tccaacggct ttgacgagat cccagttgag 1740
gtcttcaagg atttatttga actaaagatc atcgatttag gattgaataa tttaaacaca 1800
cttccagcat ctgtctttaa taatcaggtg tctctaaagt cattgaacct tcagaagaat 1860
ctcataacat ccgttgagaa gaaggttttc gggccagctt tcaggaacct gactgagtta 1920
gatatgcgct ttaatccctt tgattgcacg tgtgaaagta ttgcctggtt tgttaattgg 1980
attaacgaga cccataccaa catccctgag ctgtcaagcc actacctttg caacactcca 2040
cctcactatc atgggttccc agtgagactt tttgatacat catcttgcaa agacagtgcc 2100
ccctttgaac tctttttcat gatcaatacc agtatcctgt tgatttttat ctttattgta 2160
cttctcatcc actttgaggg ctggaggata tctttttatt ggaatgtttc agtacatcga 2220
gttcttggtt tcaaagaaat agacagacag acagaacagt ttgaatatgc agcatatata 2280
attcatgcct ataaagataa ggattgggtc tgggaacatt tctcttcaat ggaaaaggaa 2340
gaccaatctc tcaaattttg tctggaagaa agggactttg aggcgggtgt ttttgaacta 2400
gaagcaattg ttaacagcat caaaagaagc agaaaaatta tttttgttat aacacaccat 2460
ctattaaaag acccattatg caaaagattc aaggtacatc atgcagttca acaagctatt 2520
gaacaaaatc tggattccat tatattggtt ttccttgagg agattccaga ttataaactg 2580
aaccatgcac tctgtttgcg aagaggaatg tttaaatctc actgcatctt gaactggcca 2640
gttcagaaag aacggatagg tgcctttcgt cataaattgc aagtagcact tggatccaaa 2700
aactctgtac at 2712

<210> 116
<211> 3096
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TLR9

<400> 116
atgggtttct gccgcagcgc cctgcacccg ctgtctctcc tggtgcaggc catcatgctg 60
gccatgaccc tggccctggg taccttgcct gccttcctac cctgtgagct ccagccccac 120
ggcctggtga actgcaactg gctgttcctg aagtctgtgc cccacttctc catggcagca 180
ccccgtggca atgtcaccag cctttccttg tcctccaacc gcatccacca cctccatgat 240
tctgactttg cccacctgcc cagcctgcgg catctcaacc tcaagtggaa ctgcccgccg 300
gttggcctca gccccatgca cttcccctgc cacatgacca tcgagcccag caccttcttg 360
gctgtgccca ccctggaaga gctaaacctg agctacaaca acatcatgac tgtgcctgcg 420
ctgcccaaat ccctcatatc cctgtccctc agccatacca acatcctgat gctagactct 480
gccagcctcg ccggcctgca tgccctgcgc ttcctattca tggacggcaa ctgttattac 540
aagaacccct gcaggcaggc actggaggtg gccccgggtg ccctccttgg cctgggcaac 600
ctcacccacc tgtcactcaa gtacaacaac ctcactgtgg tgccccgcaa cctgccttcc 660
agcctggagt atctgctgtt gtcctacaac cgcatcgtca aactggcgcc tgaggacctg 720
gccaatctga ccgccctgcg tgtgctcgat gtgggcggaa attgccgccg ctgcgaccac 780
gctcccaacc cctgcatgga gtgccctcgt cacttccccc agctacatcc cgataccttc 840
agccacctga gccgtcttga aggcctggtg ttgaaggaca gttctctctc ctggctgaat 900
gccagttggt tccgtgggct gggaaacctc cgagtgctgg acctgagtga gaacttcctc 960
tacaaatgca tcactaaaac caaggccttc cagggcctaa cacagctgcg caagcttaac 1020
ctgtccttca attaccaaaa gagggtgtcc tttgcccacc tgtctctggc cccttccttc 1080
gggagcctgg tcgccctgaa ggagctggac atgcacggca tcttcttccg ctcactcgat 1140
gagaccacgc tccggccact ggcccgcctg cccatgctcc agactctgcg tctgcagatg 1200
aacttcatca accaggccca gctcggcatc ttcagggcct tccctggcct gcgctacgtg 1260
gacctgtcgg acaaccgcat cagcggagct tcggagctga cagccaccat gggggaggca 1320
gatggagggg agaaggtctg gctgcagcct ggggaccttg ctccggcccc agtggacact 1380
cccagctctg aagacttcag gcccaactgc agcaccctca acttcacctt ggatctgtca 1440
cggaacaacc tggtgaccgt gcagccggag atgtttgccc agctctcgca cctgcagtgc 1500
ctgcgcctga gccacaactg catctcgcag gcagtcaatg gctcccagtt cctgccgctg 1560
accggtctgc aggtgctaga cctgtcccac aataagctgg acctctacca cgagcactca 1620
ttcacggagc taccgcgact ggaggccctg gacctcagct acaacagcca gccctttggc 1680
atgcagggcg tgggccacaa cttcagcttc gtggctcacc tgcgcaccct gcgccacctc 1740
agcctggccc acaacaacat ccacagccaa gtgtcccagc agctctgcag tacgtcgctg 1800
cgggccctgg acttcagcgg caatgcactg ggccatatgt gggccgaggg agacctctat 1860
ctgcacttct tccaaggcct gagcggtttg atctggctgg acttgtccca gaaccgcctg 1920
cacaccctcc tgccccaaac cctgcgcaac ctccccaaga gcctacaggt gctgcgtctc 1980
cgtgacaatt acctggcctt ctttaagtgg tggagcctcc acttcctgcc caaactggaa 2040
gtcctcgacc tggcaggaaa ccagctgaag gccctgacca atggcagcct gcctgctggc 2100
acccggctcc ggaggctgga tgtcagctgc aacagcatca gcttcgtggc ccccggcttc 2160
ttttccaagg ccaaggagct gcgagagctc aaccttagcg ccaacgccct caagacagtg 2220
gaccactcct ggtttgggcc cctggcgagt gccctgcaaa tactagatgt aagcgccaac 2280
cctctgcact gcgcctgtgg ggcggccttt atggacttcc tgctggaggt gcaggctgcc 2340
gtgcccggtc tgcccagccg ggtgaagtgt ggcagtccgg gccagctcca gggcctcagc 2400
atctttgcac aggacctgcg cctctgcctg gatgaggccc tctcctggga ctgtttcgcc 2460
ctctcgctgc tggctgtggc tctgggcctg ggtgtgccca tgctgcatca cctctgtggc 2520
tgggacctct ggtactgctt ccacctgtgc ctggcctggc ttccctggcg ggggcggcaa 2580
agtgggcgag atgaggatgc cctgccctac gatgccttcg tggtcttcga caaaacgcag 2640
agcgcagtgg cagactgggt gtacaacgag cttcgggggc agctggagga gtgccgtggg 2700
cgctgggcac tccgcctgtg cctggaggaa cgcgactggc tgcctggcaa aaccctcttt 2760
gagaacctgt gggcctcggt ctatggcagc cgcaagacgc tgtttgtgct ggcccacacg 2820
gaccgggtca gtggtctctt gcgcgccagc ttcctgctgg cccagcagcg cctgctggag 2880
gaccgcaagg acgtcgtggt gctggtgatc ctgagccctg acggccgccg ctcccgctac 2940
gtgcggctgc gccagcgcct ctgccgccag agtgtcctcc tctggcccca ccagcccagt 3000
ggtcagcgca gcttctgggc ccagctgggc atggccctga ccagggacaa ccaccacttc 3060
tataaccgga acttctgcca gggacccacg gccgaa 3096

<210> 117
<211> 3147
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<223> TLR7

<400> 117
atggtgtttc caatgtggac actgaagaga caaattctta tccttttaa cataatccta 60
atttccaaac tccttggggc tagatggttt cctaaaactc tgccctgtga tgtcactctg 120
gatgttccaa agaaccatgt gatcgtggac tgcacagaca agcatttgac agaaattcct 180
ggaggtattc ccacgaacac cacgaacctc accctcacca ttaaccacat accagacatc 240
tccccagcgt cctttcacag actggaccat ctggtagaga tcgatttcag atgcaactgt 300
gtacctattc cactggggtc aaaaaacaac atgtgcatca agaggctgca gattaaaccc 360
agaagcttta gtggactcac ttatttaaaa tccctttacc tggatggaaa ccagctacta 420
gagataccgc agggcctccc gcctagctta cagcttctca gccttgaggc caacaacatc 480
ttttccatca gaaaagagaa tctaacagaa ctggccaaca tagaaatact ctacctgggc 540
caaaactgtt attatcgaaa tccttgttat gtttcatatt caatagagaa agatgccttc 600
ctaaacttga caaagttaaa agtgctctcc ctgaaagata acaatgtcac agccgtccct 660
actgttttgc catctacttt aacagaacta tatctctaca acaacatgat tgcaaaaatc 720
caagaagatg attttaataa cctcaaccaa ttacaaattc ttgacctaag tggaaattgc 780
cctcgttgtt ataatgcccc atttccttgt gcgccgtgta aaaataattc tcccctacag 840
atccctgtaa atgcttttga tgcgctgaca gaattaaaag ttttacgtct acacagtaac 900
tctcttcagc atgtgccccc aagatggttt aagaacatca acaaactcca ggaactggat 960
ctgtcccaaa acttcttggc caaagaaatt ggggatgcta aatttctgca ttttctcccc 1020
agcctcatcc aattggatct gtctttcaat tttgaacttc aggtctatcg tgcatctatg 1080
aatctatcac aagcattttc ttcactgaaa agcctgaaaa ttctgcggat cagaggatat 1140
gtctttaaag agttgaaaag ctttaacctc tcgccattac ataatcttca aaatcttgaa 1200
gttcttgatc ttggcactaa ctttataaaa attgctaacc tcagcatgtt taaacaattt 1260
aaaagactga aagtcataga tctttcagtg aataaaatat caccttcagg agattcaagt 1320
gaagttggct tctgctcaaa tgccagaact tctgtagaaa gttatgaacc ccaggtcctg 1380
gaacaattac attatttcag atatgataag tatgcaagga gttgcagatt caaaaacaaa 1440
gaggcttctt tcatgtctgt taatgaaagc tgctacaagt atgggcagac cttggatcta 1500
agtaaaaata gtatattttt tgtcaagtcc tctgattttc agcatctttc tttcctcaaa 1560
tgcctgaatc tgtcaggaaa tctcattagc caaactctta atggcagtga attccaacct 1620
ttagcagagc tgagatattt ggacttctcc aacaaccggc ttgatttact ccattcaaca 1680
gcatttgaag agcttcacaa actggaagtt ctggatataa gcagtaatag ccattatttt 1740
caatcagaag gaattactca tatgctaaac tttaccaaga acctaaaggt tctgcagaaa 1800
ctgatgatga acgacaatga catctcttcc tccaccagca ggaccatgga gagtgagtct 1860
cttagaactc tggaattcag aggaaatcac ttagatgttt tatggagaga aggtgataac 1920
agatacttac aattattcaa gaatctgcta aaattagagg aattagacat ctctaaaaat 1980
tccctaagtt tcttgccttc tggagttttt gatggtatgc ctccaaatct aaagaatctc 2040
tctttggcca aaaatgggct caaatctttc agttggaaga aactccagtg tctaaagaac 2100
ctggaaactt tggacctcag ccacaaccaa ctgaccactg tccctgagag attatccaac 2160
tgttccagaa gcctcaagaa tctgattctt aagaataatc aaatcaggag tctgacgaag 2220
tattttctac aagatgcctt ccagttgcga tatctggatc tcagctcaaa taaaatccag 2280
atgatccaaa agaccagctt cccagaaaat gtcctcaaca atctgaagat gttgcttttg 2340
catcataatc ggtttctgtg cacctgtgat gctgtgtggt ttgtctggtg ggttaaccat 2400
acggaggtga ctattcctta cctggccaca gatgtgactt gtgtggggcc aggagcacac 2460
aagggccaaa gtgtgatctc cctggatctg tacacctgtg agttagatct gactaacctg 2520
attctgttct cactttccat atctgtatct ctctttctca tggtgatgat gacagcaagt 2580
cacctctatt tctgggatgt gtggtatatt taccatttct gtaaggccaa gataaagggg 2640
tatcagcgtc taatatcacc agactgttgc tatgatgctt ttattgtgta tgacactaaa 2700
gacccagctg tgaccgagtg ggttttggct gagctggtgg ccaaactgga agacccaaga 2760
gagaaacatt ttaatttatg tctcgaggaa agggactggt taccagggca gccagttctg 2820
gaaaaccttt cccagagcat acagcttagc aaaaagacag tgtttgtgat gacagacaag 2880
tatgcaaaga ctgaaaattt taagatagca ttttacttgt cccatcagag gctcatggat 2940
gaaaaagttg atgtgattat cttgatattt cttgagaagc cctttcagaa gtccaagttc 3000
ctccagctcc ggaaaaggct ctgtgggagt tctgtccttg agtggccaac aaacccgcaa 3060
gctcacccat acttctggca gtgtctaaag aacgccctgg ccacagacaa tcatgtggcc 3120
tatagtcagg tgttcaagga aacggtc 3147

<210> 118
<211> 3177
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TLR8, isoform 1

<400> 118
atgaaggagt catctttgca aaatagctcc tgcagcctgg gaaaggagac taaaaaggaa 60
aacatgttcc ttcagtcgtc aatgctgacc tgcattttcc tgctaatatc tggttcctgt 120
gagttatgcg ccgaagaaaa tttttctaga agctatcctt gtgatgagaa aaagcaaaat 180
gactcagtta ttgcagagtg cagcaatcgt cgactacagg aagttcccca aacggtgggc 240
aaatatgtga cagaactaga cctgtctgat aatttcatca cacacataac gaatgaatca 300
tttcaagggc tgcaaaatct cactaaaata aatctaaacc acaaccccaa tgtacagcac 360
cagaacggaa atcccggtat acaatcaaat ggcttgaata tcacagacgg ggcattcctc 420
aacctaaaaa acctaaggga gttactgctt gaagacaacc agttacccca aataccctct 480
ggtttgccag agtctttgac agaacttagt ctaattcaaa acaatatata caacataact 540
aaagagggca tttcaagact tataaacttg aaaaatctct atttggcctg gaactgctat 600
tttaacaaag tttgcgagaa aactaacata gaagatggag tatttgaaac gctgacaaat 660
ttggagttgc tatcactatc tttcaattct ctttcacacg tgccacccaa actgccaagc 720
tccctacgca aacttttttct gagcaacacc cagatcaaat acattagtga agaagatttc 780
aagggattga taaatttaac attactagat ttaagcggga actgtccgag gtgcttcaat 840
gccccatttc catgcgtgcc ttgtgatggt ggtgcttcaa ttaatataga tcgttttgct 900
tttcaaaact tgacccaact tcgataccta aacctctcta gcacttccct caggaagatt 960
aatgctgcct ggtttaaaaa tatgcctcat ctgaaggtgc tggatcttga attcaactat 1020
ttagtgggag aaatagcctc tggggcattt ttaacgatgc tgccccgctt agaaatactt 1080
gacttgtctt ttaactatat aaaggggagt tatccacagc atattaatat ttccagaaac 1140
ttctctaaac ttttgtctct acgggcattg catttaagag gttatgtgtt ccaggaactc 1200
agagaagatg atttccagcc cctgatgcag cttccaaact tatcgactat caacttgggt 1260
attaatttta ttaagcaaat cgatttcaaa cttttccaaa atttctccaa tctggaaatt 1320
atttacttgt cagaaaacag aatatcaccg ttggtaaaag atacccggca gagttatgca 1380
aatagttcct cttttcaacg tcatatccgg aaacgacgct caacagattt tgagtttgac 1440
ccacattcga acttttatca tttcacccgt cctttaataa agccacaatg tgctgcttat 1500
ggaaaagcct tagatttaag cctcaacagt attttcttca ttgggccaaa ccaatttgaa 1560
aatcttcctg acattgcctg tttaaatctg tctgcaaata gcaatgctca agtgttaagt 1620
ggaactgaat tttcagccat tcctcatgtc aaatatttgg atttgacaaa caatagacta 1680
gactttgata atgctagtgc tcttactgaa ttgtccgact tggaagttct agatctcagc 1740
tataattcac actatttcag aatagcaggc gtaacacatc atctagaatt tattcaaaat 1800
ttcacaaatc taaaagtttt aaacttgagc cacaacaaca tttatacttt aacagataag 1860
tataacctgg aaagcaagtc cctggtagaa ttagttttca gtggcaatcg ccttgacatt 1920
ttgtggaatg atgatgacaa caggtatatc tccattttca aaggtctcaa gaatctgaca 1980
cgtctggatt tatcccttaa taggctgaag cacatcccaa atgaagcatt ccttaatttg 2040
ccagcgagtc tcactgaact acatataaat gataatatgt taaagttttt taactggaca 2100
ttactccagc agtttcctcg tctcgagttg cttgacttac gtggaaacaa actactcttt 2160
ttaactgata gcctatctga ctttacatct tcccttcgga cactgctgct gagtcataac 2220
aggatttccc acctaccctc tggctttctt tctgaagtca gtagtctgaa gcacctcgat 2280
ttaagttcca atctgctaaa aacaatcaac aaatccgcac ttgaaactaa gaccaccacc 2340
aaattatcta tgttggaact acacggaaac ccctttgaat gcacctgtga cattggagat 2400
ttccgaagat ggatggatga acatctgaat gtcaaaattc ccagactggt agatgtcatt 2460
tgtgccagtc ctggggatca aagagggaag agtattgtga gtctggagct aacaacttgt 2520
gtttcagatg tcactgcagt gatattattt ttcttcacgt tctttatcac caccatggtt 2580
atgttggctg ccctggctca ccatttgttt tactgggatg tttggtttat atataatgtg 2640
tgtttagcta aggtaaaagg ctacaggtct ctttccacat cccaaacttt ctatgatgct 2700
tacatttctt atgacaccaa agatgcctct gttactgact gggtgataaa tgagctgcgc 2760
taccaccttg aagagagccg agacaaaaac gttctccttt gtctagagga gagggattgg 2820
gacccgggat tggccatcat cgacaacctc atgcagagca tcaaccaaag caagaaaaca 2880
gtatttgttt taaccaaaaa atatgcaaaa agctggaact ttaaaacagc tttttacttg 2940
gctttgcaga ggctaatgga tgagaacatg gatgtgatta tatttatcct gctggagcca 3000
gtgttacagc attctcagta tttgaggcta cggcagcgga tctgtaagag ctccatcctc 3060
cagtggcctg acaacccgaa ggcagaaggc ttgttttggc aaactctgag aaatgtggtc 3120
ttgactgaaa atgattcacg gtataacaat atgtatgtcg attccattaa gcaatac   3177

<210> 119
<211> 636

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Interleukin 6 (IL-6)

<400> 119
atgaactcct tctccacaag cgccttcggt ccagttgcct tctccctggg gctgctcctg 60
gtgttgcctg ctgccttccc tgccccagta cccccaggag aagattccaa agatgtagcc 120
gccccacaca gacagccact cacctcttca gaacgaattg acaaacaaat tcggtacatc 180
ctcgacggca tctcagccct gagaaaggag acatgtaaca agagtaacat gtgtgaaagc 240
agcaaagagg cactggcaga aaacaacctg aaccttccaa agatggctga aaaagatgga 300
tgcttccaat ctggattcaa tgaggagact tgcctggtga aaatcatcac tggtcttttg 360
gagtttgagg tatacctaga gtacctccag aacagatttg agagtagtga ggaacaagcc 420
agagctgtgc agatgagtac aaaagtcctg atccagttcc tgcagaaaaa ggcaaagaat 480
ctagatgcaa taaccacccc tgacccaacc acaaatgcca gcctgctgac gaagctgcag 540
gcacagaacc agtggctgca ggacatgaca actcatctca ttctgcgcag ctttaaggag 600
ttcctgcagt ccagcctgag ggctcttcgg caaatg 636

<210> 120
<211> 951
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> MyD88, isoform 1

<400> 120
atgcgacccg accgcgctga ggctccagga ccgcccgcca tggctgcagg aggtcccggc 60
gcggggtctg cggccccggt ctcctccaca tcctcccttc ccctggctgc tctcaacatg 120
cgagtgcggc gccgcctgtc tctgttcttg aacgtgcgga cacaggtggc ggccgactgg 180
accgcgctgg cggaggagat ggactttgag tacttggaga tccggcaact ggagacacaa 240
gcggacccca ctggcaggct gctggacgcc tggcagggac gccctggcgc ctctgtaggc 300
cgactgctcg agctgcttac caagctgggc cgcgacgacg tgctgctgga gctgggaccc 360
agcattgagg aggattgcca aaagtatatc ttgaagcagc agcaggagga ggctgagaag 420
cctttacagg tggccgctgt agacagcagt gtcccacgga cagcagagct ggcgggcatc 480
accacacttg atgacccccc ggggcatatg cctgagcgtt tcgatgcctt catctgctat 540
tgccccagcg acatccagtt tgtgcaggag atgatccggc aactggaaca gacaaactat 600
cgactgaagt tgtgtgtgtc tgaccgcgat gtcctgcctg gcacctgtgt ctggtctatt 660
gctagtgagc tcatcgaaaa gaggttggct agaaggccac ggggtgggtg ccgccggatg 720
gtggtggttg tctctgatga ttacctgcag agcaaggaat gtgacttcca gaccaaattt 780
gcactcagcc tctctccagg tgcccatcag aagcgactga tccccatcaa gtacaaggca 840
atgaagaaag agttccccag catcctgagg ttcatcactg tctgcgacta caccaacccc 900
tgcaccaaat cttggttctg gactcgcctt gccaaggcct tgtccctgcc c 951

<210> 121
<211> 807
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Interleukin 1-beta (IL-1beta)

<400> 121
atggcagaag tacctgagct cgccagtgaa atgatggctt attacagtgg caatgaggat 60
gacttgttct ttgaagctga tggccctaaa cagatgaagt gctccttcca ggacctggac 120
ctctgccctc tggatggcgg catccagcta cgaatctccg accaccacta cagcaagggc 180
ttcaggcagg ccgcgtcagt tgttgtggcc atggacaagc tgaggaagat gctggttccc 240
tgcccacaga ccttccagga gaatgacctg agcaccttct ttcccttcat ctttgaagaa 300
gaacctatct tcttcgacac atgggataac gaggcttatg tgcacgatgc acctgtacga 360
tcactgaact gcacgctccg ggactcacag caaaaaagct tggtgatgtc tggtccatat 420

gaactgaaag ctctccacct ccagggacag gatatggagc aacaagtggt gttctccatg 480
tcctttgtac aaggagaaga aagtaatgac aaaatacctg tggccttggg cctcaaggaa 540
aagaatctgt acctgtcctg cgtgttgaaa gatgataagc ccactctaca gctggagagt 600
gtagatccca aaaattaccc aaagaagaag atggaaaagc gatttgtctt caacaagata 660
gaaatcaata acaagctgga atttgagtct gcccagttcc ccaactggta catcagcacc 720
tctcaagcag aaaacatgcc cgtcttcctg ggagggacca aaggcggcca ggatataact 780
gacttcacca tgcaatttgt gtcttcc 807

<210> 122
<211> 3075
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> MDA5/IFIH1, isoform 1

<400> 122
atgtcgaatg ggtattccac agacgagaat ttccgctatc tcatctcgtg cttcagggcc 60
agggtgaaaa tgtacatcca ggtggagcct gtgctggact acctgacctt tctgcctgca 120
gaggtgaagg agcagattca gaggacagtc gccacctccg ggaacatgca ggcagttgaa 180
ctgctgctga gcaccttgga gaagggagtc tggcaccttg gttggactcg ggaattcgtg 240
gaggccctcc ggagaaccgg cagccctctg gccgcccgct acatgaaccc tgagctcacg 300
gacttgccct ctccatcgtt tgagaacgct catgatgaat atctccaact gctgaacctc 360
cttcagccca ctctggtgga caagcttcta gttagagacg tcttggataa gtgcatggag 420
gaggaactgt tgacaattga agacagaaac cggattgctg ctgcagaaaa caatggaaat 480
gaatcaggtg taagagagct actaaaaagg attgtgcaga aagaaaactg gttctctgca 540
tttctgaatg ttcttcgtca aacaggaaac aatgaacttg tccaagagtt aacaggctct 600
gattgctcag aaagcaatgc agagattgag aatttatcac aagttgatgg tcctcaagtg 660
gaagagcaac ttctttcaac cacagttcag ccaaatctgg agaaggaggt ctggggcatg 720
gagaataact catcagaatc atcttttgca gattcttctg tagtttcaga atcagacaca 780
agtttggcag aaggaagtgt cagctgctta gatgaaagtc ttggacataa cagcaacatg 840
ggcagtgatt caggcaccat gggaagtgat tcagatgaag agaatgtggc agcaagagca 900
tccccggagc cagaactcca gctcaggcct taccaaatgg aagttgccca gccagccttg 960
gaagggaaga atatcatcat ctgcctccct acagggagtg gaaaaaccag agtggctgtt 1020
tacattgcca aggatcactt agacaagaag aaaaaagcat ctgagcctgg aaaagttata 1080
gttcttgtca ataaggtact gctagttgaa cagctcttcc gcaaggagtt ccaaccattt 1140
ttgaagaaat ggtatcgtgt tattggatta agtggtgata cccaactgaa aatatcattt 1200
ccagaagttg tcaagtcctg tgatattatt atcagtacag ctcaaatcct tgaaaactcc 1260
ctcttaaact tggaaaatgg agaagatgct ggtgttcaat tgtcagactt ttccctcatt 1320
atcattgatg aatgtcatca caccaacaaa gaagcagtgt ataataacat catgaggcat 1380
tatttgatgc agaagttgaa aaacaataga ctcaagaaag aaaacaaacc agtgattccc 1440
cttcctcaga tactgggact aacagcttca cctggtgttg gaggggccac gaagcaagcc 1500
aaagctgaag aacacatttt aaaactatgt gccaatcttg atgcatttac tattaaaact 1560
gttaaagaaa accttgatca actgaaaaac caaatacagg agccatgcaa gaagtttgcc 1620
attgcagatg caaccagaga agatccattt aaagagaaac ttctagaaat aatgacaagg 1680
attcaaactt attgtcaaat gagtccaatg tcagattttg gaactcaacc ctatgaacaa 1740
tgggccattc aaatggaaaa aaaagctgca aaagaaggaa atcgcaaaga acgtgtttgt 1800
gcagaacatt tgaggaagta caatgaggcc ctacaaatta atgacacaat tcgaatgata 1860
gatgcgtata ctcatcttga aactttctat aatgaagaga aagataagaa gtttgcagtc 1920
atagaagatg atagtgatga gggtggtgat gatgagtatt gtgatggtga tgaagatgag 1980
gatgatttaa agaaaccttt gaaactggat gaaacagata gatttctcat gactttattt 2040
tttgaaaaca ataaaatgtt gaaaaggctg gctgaaaacc cagaatatga aaatgaaaag 2100
ctgaccaaat taagaaatac cataatggag caatatacta ggactgagga atcagcacga 2160
ggaataatct ttacaaaaac acgacagagt gcatatgcgc tttcccagtg gattactgaa 2220
aatgaaaaat ttgctgaagt aggagtcaaa gcccaccatc tgattggagc tggacacagc 2280
agtgagttca aacccatgac acagaatgaa caaaaagaag tcattagtaa atttcgcact 2340
ggaaaaataa atctgcttat cgctaccaca gtggcagaag aaggtctgga tattaaagaa 2400
tgtaacattg ttatccgtta tggtctcgtc accaatgaaa tagccatggt ccaggcccgt 2460
ggtcgagcca gagctgatga gagcacctac gtcctggttg ctcacagtgg ttcaggagtt 2520
atcgaacatg agacagttaa tgatttccga gagaagatga tgtataaagc tatacattgt 2580
gttcaaaata tgaaaccaga ggagtatgct cataagattt tggaattaca gatgcaaagt 2640

ataatggaaa agaaaatgaa aaccaagaga aatattgcca agcattacaa gaataaccca 2700
tcactaataa ctttccttta caaaaactgc agtgtgctag cctgttctgg ggaagatatc 2760
catgtaattg agaaaatgca tcacgtcaat atgaccccag aattcaagga actttacatt 2820
gtaagagaaa acaaagcact gcaaaagaag tgtgccgact atcaaataaa tggtgaaatc 2880
atctgcaaat gtggccaggc ttggggaaca atgatggtgc acaaaggctt agatttgcct 2940
tgtctcaaaa taaggaattt tgtagtggtt ttcaaaaata attcaacaaa gaaacaatac 3000
aaaaagtggg tagaattacc tatcacattt cccaatcttg actattcaga atgctgttta 3060
tttagtgatg aggat 3075

<210> 123
<211> 1620
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IPS-1/MAVS, isoform 1

<400> 123
atgccgtttg ctgaagacaa gacctataag tatatctgcc gcaatttcag caatttttgc 60
aatgtggatg ttgtagagat tctgccttac ctgccctgcc tcacagcaag agaccaggat 120
cgactgcggg ccacctgcac actctcaggg aaccgggaca ccctctggca tctcttcaat 180
acccttcagc ggcggcccgg ctgggtggag tacttcattg cggcactgag gggctgtgag 240
ctagttgatc tcgcggacga agtggcctct gtctaccaga gctaccagcc tcggacctcg 300
gaccgtcccc cagacccact ggagccaccg tcacttcctg ctgagaggcc agggcccccc 360
acacctgctg cggcccacag catcccctac aacagctgca gagagaagga gccaagttac 420
cccatgcctg tccaggagac ccaggcgcca gagtccccag gagagaattc agagcaagcc 480
ctgcagacgc tcagccccag agccatccca aggaatccag atggtggccc cctggagtcc 540
tcctctgacc tggcagccct cagccctctg acctccagcg ggcatcagga gcaggacaca 600
gaactgggca gtacccacac agcaggtgcg acctccagcc tcacaccatc ccgtgggcct 660
gtgtctccat ctgtctcctt ccagcccctg gcccgttcca cccccagggc aagccgcttg 720
cctggaccca cagggtcagt tgtatctact ggcacctcct tctcctcctc atcccctggc 780
ttggcctctg caggggctgc agagggtaaa cagggtgcag agagtgacca ggccgagcct 840
atcatctgct ccagtggggc agaggcacct gccaactctc tgccctccaa agtgcctacc 900
accttgatgc ctgtgaacac agtggccctg aaagtgcctg ccaacccagc atctgtcagc 960
acagtgccct ccaagttgcc aactagctca aagccccctg gtgcagtgcc ttctaatgcg 1020
ctcaccaatc cagcaccatc caaattgccc atcaactcaa cccgtgctgg catggtgcca 1080
tccaaagtgc ctactagcat ggtgctcacc aaggtgtctg ccagcacagt ccccactgac 1140
gggagcagca gaaatgagga gaccccagca gctccaacac ccgccggcgc cactggaggc 1200
agctcagcct ggctagacag cagctctgag aataggggcc ttgggtcgga gctgagtaag 1260
cctggcgtgc tggcatccca ggtagacagc ccgttctcgg gctgcttcga ggatcttgcc 1320
atcagtgcca gcacctcctt gggcatgggg ccctgccatg gcccagagga gaatgagtat 1380
aagtccgagg gcacctttgg gatccacgtg gctgagaacc ccagcatcca gctcctggag 1440
ggcaaccctg ggccacctgc ggacccggat ggcggcccca ggccacaagc cgaccggaag 1500
ttccaggaga gggaggtgcc atgccacagg ccctcacctg gggctctgtg gctccaggtg 1560
gctgtgacag gggtgctggt agtcacactc ctggtggtgc tgtaccggcg gcgtctgcac 1620

<210> 124
<211> 2775
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> RIG-1/DDX58, isoform 1

<400> 124
atgaccaccg agcagcgacg cagcctgcaa gccttccagg attatatccg gaagaccctg 60
gaccctacct acatcctgag ctacatggcc ccctggttta gggaggaaga ggtgcagtat 120
attcaggctg agaaaaacaa caagggccca atggaggctg ccacactttt tctcaagttc 180
ctgttggagc tccaggagga aggctggttc cgtggctttt tggatgccct agaccatgca 240
ggttattctg gactttatga agccattgaa agttgggatt tcaaaaaaat tgaaaagttg 300

gaggagtata gattactttt aaaacgttta caaccagaat ttaaaaccag aattatccca 360
accgatatca tttctgatct gtctgaatgt ttaattaatc aggaatgtga agaaattcta 420
cagatttgct ctactaaggg gatgatggca ggtgcagaga aattggtgga atgccttctc 480
agatcagaca aggaaaactg gcccaaaact ttgaaacttg ctttggagaa agaaaggaac 540
aagttcagtg aactgtggat tgtagagaaa ggtataaaag atgttgaaac agaagatctt 600
gaggataaga tggaaacttc tgacatacag attttctacc aagaagatcc agaatgccag 660
aatcttagtg agaattcatg tccaccttca gaagtgtctg atacaaactt gtacagccca 720
tttaaaccaa gaaattacca attagagctt gctttgcctg ctatgaaagg aaaaaacaca 780
ataatatgtg ctcctacagg ttgtggaaaa acctttgttt cactgcttat atgtgaacat 840
catcttaaaa aattcccaca aggacaaaag gggaaagttg tctttttttgc gaatcagatc 900
ccagtgtatg aacagcagaa atctgtattc tcaaaatact ttgaaagaca tgggtataga 960
gttacaggca tttctggagc aacagctgag aatgtcccag tggaacagat tgttgagaac 1020
aatgacatca tcattttaac tccacagatt cttgtgaaca accttaaaaa gggaacgatt 1080
ccatcactat ccatctttac tttgatgata tttgatgaat gccacaacac tagtaaacaa 1140
cacccgtaca atatgatcat gtttaattat ctagatcaga aacttggagg atcttcaggc 1200
ccactgcccc aggtcattgg gctgactgcc tcggttggtg ttggggatgc caaaaacaca 1260
gatgaagcct tggattatat ctgcaagctg tgtgcttctc ttgatgcgtc agtgatagca 1320
acagtcaaac acaatctgga ggaactggag caagttgttt ataagcccca gaagtttttc 1380
aggaaagtgg aatcacggat tagcgacaaa tttaaataca tcatagctca gctgatgagg 1440
gacacagaga gtctggcaaa gagaatctgc aaagacctcg aaaacttatc tcaaattcaa 1500
aatagggaat ttggaacaca gaaatatgaa caatggattg ttacagttca gaaagcatgc 1560
atggtgttcc agatgccaga caaagatgaa gagagcagga tttgtaaagc cctgttttta 1620
tacacttcac atttgcggaa atataatgat gccctcatta tcagtgagca tgcacgaatg 1680
aaagatgctc tggattactt gaaagacttc ttcagcaatg tccgagcagc aggattcgat 1740
gagattgagc aagatcttac tcagagattt gaagaaaagc tgcaggaact agaaagtgtt 1800
tccagggatc ccagcaatga gaatcctaaa cttgaagacc tctgcttcat cttacaagaa 1860
gagtaccact taaacccaga gacaataaca attctctttg tgaaaaccag agcacttgtg 1920
gacgctttaa aaaattggat tgaaggaaat cctaaactca gttttctaaa acctggcata 1980
ttgactggac gtggcaaaac aaatcagaac acaggaatga ccctcccggc acagaagtgt 2040
atattggatg cattcaaagc cagtggagat cacaatattc tgattgccac ctcagttgct 2100
gatgaaggca ttgacattgc acagtgcaat cttgtcatcc tttatgagta tgtgggcaat 2160
gtcatcaaaa tgatccaaac cagaggcaga ggaagagcaa gaggtagcaa gtgcttcctt 2220
ctgactagta atgctggtgt aattgaaaaa gaacaaataa acatgtacaa agaaaaaatg 2280
atgaatgact ctattttacg ccttcagaca tgggacgaag cagtatttag ggaaaagatt 2340
ctgcatatac agactcatga aaaattcatc agagatagtc aagaaaaacc aaaacctgta 2400
cctgataagg aaaataaaaa actgctctgc agaaagtgca aagccttggc atgttacaca 2460
gctgacgtaa gagtgataga ggaatgccat tacactgtgc ttggagatgc ttttaaggaa 2520
tgctttgtga gtagaccaca tcccaagcca aagcagtttt caagttttga aaaaagagca 2580
aagatattct gtgcccgaca gaactgcagc catgactggg gaatccatgt gaagtacaag 2640
acatttgaga ttccagttat aaaaattgaa agttttgtgg tggaggatat tgcaactgga 2700
gttcagacac tgtactcgaa gtggaaggac tttcattttg agaagatacc atttgatcca 2760
gcagaaatgt ccaaa 2775

<210> 125
<211> 1494
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IRF5, transcript variant 2

<400> 125
atgaaccagt ccatcccagt ggctcccacc ccaccccgcc gcgtgcggct gaagccctgg 60
ctggtggccc aggtgaacag ctgccagtac ccagggcttc aatgggtcaa cggggaaaag 120
aaattattct gcatcccctg gaggcatgcc acaaggcatg gtcccagcca ggacggagat 180
aacaccatct tcaaggcctg ggccaaggag acagggaaat acaccgaagg cgtggatgaa 240
gccgatccgg ccaagtggaa ggccaacctg cgctgtgccc ttaacaagag ccgggacttc 300
cgcctcatct acgacgggcc ccgggacatg ccacctcagc cctacaagat ctacgaggtc 360
tgctccaatg gccctgctcc cacagactcc cagccccctg aggattactc ttttggtgca 420
ggagaggagg aggaagaaga ggaagagctg cagaggatgt tgccaagcct gagcctcaca 480
gaggatgtca agtggccgcc cactctgcag ccgcccactc tgcggccgcc tactctgcag 540

ccgcccactc tgcagccgcc cgtggtgctg ggtccccctg ctccagaccc cagccccctg 600
gctcctcccc ctggcaaccc tgctggcttc agggagcttc tctctgaggt cctggagcct 660
gggcccctgc ctgccagcct gcccccctgca ggcgaacagc tcctgccaga cctgctgatc 720
agcccccaca tgctgcctct gaccgacctg gagatcaagt ttcagtaccg ggggcggcca 780
ccccgggccc tcaccatcag caacccccat ggctgccggc tcttctacag ccagctggag 840
gccacccagg agcaggtgga actcttcggc cccataagcc tggagcaagt gcgcttcccc 900
agccctgagg acatccccag tgacaagcag cgcttctaca cgaaccagct gctggatgtc 960
ctggaccgcg ggctcatcct ccagctacag ggccaggacc tttatgccat ccgcctgtgt 1020
cagtgcaagg tgttctggag cgggccttgt gcctcagccc atgactcatg ccccaacccc 1080
atccagcggg aggtcaagac caagcttttc agcctggagc attttctcaa tgagctcatc 1140
ctgttccaaa agggccagac caacacccca ccacccttcg agatcttctt ctgctttggg 1200
gaagaatggc ctgaccgcaa accccgagag aagaagctca ttactgtaca ggtggtgcct 1260
gtagcagctc gactgctgct ggagatgttc tcaggggagc tatcttggtc agctgatagt 1320
atccggctac agatctcaaa cccagacctc aaagaccgca tggtggagca attcaaggag 1380
ctccatcaca tctggcagtc ccagcagcgg ttgcagcctg tggcccaggc ccctcctgga 1440
gcaggccttg gtgttggcca ggggccctgg cctatgcacc cagctggcat gcaa 1494

<210> 126
<211> 1284
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IRF3, isoform 1

<400> 126
accatgggaa ccccaaagcc acggatcctg ccctggctgg tgtcgcagct ggacctgggg 60
caactggagg gcgtggcctg ggtgaacaag agccgcacgc gcttccgcat cccttggaag 120
cacggcctac ggcaggatgc acagcaggag gatttcggaa tcttccaggc ctgggccgag 180
gccactggtg catatgttcc cgggagggat aagccagacc tgccaacctg gaagaggaat 240
ttccgctctg ccctcaaccg caaagaaggg ttgcgtttag cagaggaccg gagcaaggac 300
cctcacgacc cacataaaat ctacgagttt gtgaactcag gagttgggga cttttcccag 360
ccagacacct ctccggacac caatggtgga ggcagtactt ctgataccca ggaagacatt 420
ctggatgagt tactgggtaa catggtgttg gccccactcc cagatccggg acccccaagc 480
ctggctgtag cccctgagcc ctgccctcag cccctgcgga gccccagctt ggacaatccc 540
actcccttcc caaacctggg gccctctgag aacccactga agcggctgtt ggtgccgggg 600
gaagagtggg agttcgaggt gacagccttc taccggggcc gccaagtctt ccagcagacc 660
atctcctgcc cggagggcct gcggctggtg gggtccgaag tgggagacag gacgctgcct 720
ggatggccag tcacactgcc agaccctggc atgtccctga cagacagggg agtgatgagc 780
tacgtgaggc atgtgctgag ctgcctgggt gggggactgg ctctctggcg ggccgggcag 840
tggctctggg cccagcggct ggggcactgc cacacatact gggcagtgag cgaggagctg 900
ctccccaaca gcgggcatgg gcctgatggc gaggtcccca aggacaagga aggaggcgtg 960
tttgacctgg ggcccttcat tgtagatctg attaccttca cggaaggaag cggacgctca 1020
ccacgctatg ccctctggtt ctgtgtgggg gagtcatggc cccaggacca gccgtggacc 1080
aagaggctcg tgatggtcaa ggttgtgccc acgtgcctca gggccttggt agaaatggcc 1140
cgggtagggg gtgcctcctc cctggagaat actgtggacc tgcacatttc caacagccac 1200
ccactctccc tcacctccga ccagtacaag gcctacctgc aggacttggt ggagggcatg 1260
gatttccagg gccctgggga gagc 1284

<210> 127
<211> 1275
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TANK

<400> 127
atggataaaa acattggcga gcaactcaat aaagcgtatg aagccttccg gcaggcatgc 60
atggatagag attctgcagt aaaagaatta cagcaaaaga ctgagaacta tgagcagaga 120
atacgtgaac aacaggaaca gctgtcactt caacagacta ttattgacaa gctaaaatct 180

cagttacttc ttgtgaattc cactcaagat aacaattatg gctgtgttcc tctgcttgaa 240
gacagtgaaa caagaaagaa taatttgact cttgatcagc cacaagataa agtgatttca 300
ggaatagcaa gagaaaaact accaaaggta agaagacaag aggtttcttc tcctagaaaa 360
gaaacttcag caaggagtct tggcagtcct ttgctccatg aaaggggtaa tatagagaag 420
actttctggg atctgaaaga agaatttcat aaaatatgca tgctagcaaa agcacagaaa 480
gaccacttaa gcaaacttaa tataccagac actgcaactg aaacacagtg ctctgtgcct 540
atacagtgta cggataaaac agataaacaa gaagcgctgt ttaagcctca ggctaaagat 600
gatataaata gaggtgcacc atccatcaca tctgtcacac caagaggact gtgcagagat 660
gaggaagaca cctcttttga atcactttct aaattcaatg tcaagtttcc acctatggac 720
aatgactcaa ctttcttaca tagcactcca gagagacccg gcatccttag tcctgccacg 780
tctgaggcag tgtgccaaga gaaatttaat atggagttca gagacaaccc agggaacttt 840
gttaaaacag aagaaacttt atttgaaatt cagggaattg accccatagc ttcagctata 900
caaaacctta aaacaactga caaaacaaag ccctcaaatc tcgtaaacac ttgtatcagg 960
acaactctgg atagagctgc gtgtttgcca cctggagacc ataatgcatt atatgtaaat 1020
agcttcccac ttctggaccc atctgatgca ccttttccct cactcgattc cccgggaaaa 1080
gcaatccgag gaccacagca gcccatttgg aagccctttc ctaatcaaga cagtgactcg 1140
gtggtactaa gtggcacaga ctcagaactg catatacctc gagtatgtga attctgtcaa 1200
gcagttttcc caccatccat tacatccagg ggggatttcc ttcggcatct taattcacac 1260
ttcaatggag agact 1275

<210> 128
<211> 2136
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TRIF/TICAM1

<400> 128
atggcctgca caggcccatc acttcctagc gccttcgaca ttctaggtgc agcaggccag 60
gacaagctct tgtatctgaa gcacaaactg aagaccccac gcccaggctg ccaggggcag 120
gacctcctgc atgccatggt tctcctgaag ctgggccagg aaactgaggc caggatctct 180
ctagaggcat tgaaggccga tgcggtggcc cggctggtgg cccgccagtg ggctggcgtg 240
gacagcaccg aggacccaga ggagccccca gatgtgtcct gggctgtggc ccgcttgtac 300
cacctgctgg ctgaggagaa gctgtgcccc gcctcgctgc gggacgtggc ctaccaggaa 360
gccgtccgca ccctcagctc cagggacgac caccggctgg gggaacttca ggatgaggcc 420
cgaaaccggt gtgggtggga cattgctggg gatccaggga gcatccggac gctccagtcc 480
aatctgggct gcctcccacc atcctcggct ttgccctctg ggaccaggag cctcccacgc 540
cccattgacg gtgtttcgga ctggagccaa gggtgctccc tgcgatccac tggcagccct 600
gcctccctgg ccagcaactt ggaaatcagc cagtccccta ccatgccctt cctcagcctg 660
caccgcagcc cacatgggcc cagcaagctc tgtgacgacc cccaggccag cttggtgccc 720
gagcctgtcc ccggtggctg ccaggagcct gaggagatga gctggccgcc atcgggggag 780
attgccagcc caccagagct gccaagcagc ccacctcctg ggcttcccga agtggcccca 840
gatgcaacct ccactggcct ccctgatacc cccgcagctc cagaaaccag caccaactac 900
ccagtggagt gcaccgaggg gtctgcaggc ccccagtctc tccccttgcc tattctggag 960
ccggtcaaaa acccctgctc tgtcaaagac cagacgccac tccaactttc tgtagaagat 1020
accacctctc caaataccaa gccgtgccca cctactccca ccaccccaga aacatccccc 1080
cctcctcctc ctcctcctcc ttcatctact ccttgttcag ctcacctgac cccctcctcc 1140
ctgttccctt cctccctgga atcatcatcg gaacagaaat tctataactt tgtgatcctc 1200
cacgccaggg cagacgaaca catcgccctg cgggttcggg agaagctgga ggcccttggc 1260
gtgcccgacg gggccacctt ctgcgaggat ttccaggtgc cggggcgcgg ggagctgagc 1320
tgcctgcagg acgccataga ccactcagct ttcatcatcc tacttctcac ctccaacttc 1380
gactgtcgcc tgagcctgca ccaggtgaac caagccatga tgagcaacct cacgcgacag 1440
gggtcgccag actgtgtcat ccccttcctg cccctggaga gctccccggc ccagctcagc 1500
tccgacacgg ccagcctgct ctccgggctg gtgcggctgg acgaacactc ccagatcttc 1560
gccaggaagg tggccaacac cttcaagccc cacaggcttc aggcccgaaa ggccatgtgg 1620
aggaaggaac aggacacccg agccctgcgg gaacagagcc aacacctgga cggtgagcgg 1680
atgcaggcgg cggcactgaa cgcagcctac tcagcctacc tccagagcta cttgtcctac 1740
caggcacaga tggagcagct ccaggtggct tttgggagcc acatgtcatt tgggactggg 1800
gcgccctatg gggctcgaat gccctttggg ggccaggtgc ccctgggagc cccgccaccc 1860
tttcccactt ggccggggtg cccgcagccg ccacccctgc acgcatggca ggctggcacc 1920

```
cccccaccgc cctccccaca gccagcagcc tttccacagt cactgccctt cccgcagtcc 1980
ccagccttcc ctacggcctc acccgcaccc cctcagagcc cagggctgca acccctcatt 2040
atccaccacg cacagatggt acagctgggg ctgaacaacc acatgtggaa ccagagaggg 2100
tcccaggcgc ccgaggacaa gacgcaggag gcagaa                           2136
```

<210> 129
<211> 381
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Batf3

<400> 129
```
atgtcgcaag ggctcccggc cgccggcagc gtcctgcaga ggagcgtcgc ggcgcccggg 60
aaccagccgc agccgcagcc gcagcagcag agccctgagg atgatgacag gaaggtccga 120
aggagagaaa aaaaccgagt tgctgctcag agaagtcgga agaagcagac ccagaaggct 180
gacaagctcc atgaggaata tgagagcctg gagcaagaaa acaccatgct gcggagagag 240
atcgggaagc tgacagagga gctgaagcac ctgacagagg cactgaagga gcacgagaag 300
atgtgcccgc tgctgctctg ccctatgaac tttgtgccag tgcctccccg gccggaccct 360
gtggccggct gcttgccccg a                                           381
```

<210> 130
<211> 459
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL-4, isoform 1

<400> 130
```
atgggtctca cctcccaact gcttcccccc ctgttcttcc tgctagcatg tgccggcaac 60
tttgtccacg gacacaagtg cgatatcacc ttacaggaga tcatcaaaac tttgaacagc 120
ctcacagagc agaagactct gtgcaccgag ttgaccgtaa cagacatctt tgctgcctcc 180
aagaacacaa ctgagaagga aaccttctgc agggctgcga ctgtgctccg gcagttctac 240
agccaccatg agaaggacac tcgctgcctg ggtgcgactg cacagcagtt ccacaggcac 300
aagcagctga tccgattcct gaaacggctc gacaggaacc tctggggcct ggcgggcttg 360
aattcctgtc ctgtgaagga agccaaccag agtacgttgg aaaacttctt ggaaaggcta 420
aagacgatca tgagagagaa atattcaaag tgttcgagc                        459
```

<210> 131
<211> 534
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL-10

<400> 131
```
atgcacagct cagcactgct ctgttgcctg gtcctcctga ctggggtgag ggccagccca 60
ggccagggca cccagtctga gaacagctgc acccacttcc caggcaacct gcctaacatg 120
cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga gtgaagactt tctttcaaat gaaggatcag 180
ctggacaact tgttgttaaa ggagtccttg ctggaggact ttaagggtta cctgggttgc 240
caagccttgt ctgagatgat ccagttttac ctggaggagg tgatgcccca agctgagaac 300
caagacccag acatcaaggc gcatgtgaac tccctggggg agaacctgaa gaccctcagg 360
ctgaggctac ggcgctgtca tcgatttctt ccctgtgaaa acaagagcaa ggccgtggag 420
caggtgaaga atgcctttaa taagctccaa gagaaaggca tctacaaagc catgagtgag 480
tttgacatct tcatcaacta catagaagcc tacatgacaa tgaagatacg aaac       534
```

<210> 132
<211> 759

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL-12 alpha

<400> 132
atgtggcccc ctgggtcagc ctcccagcca ccgccctcac ctgccgcggc cacaggtctg 60
catccagcgg ctcgccctgt gtccctgcag tgccggctca gcatgtgtcc agcgcgcagc 120
ctcctccttg tggctaccct ggtcctcctg gaccacctca gtttggccag aaacctcccc 180
gtggccactc cagacccagg aatgttccca tgccttcacc actcccaaaa cctgctgagg 240
gccgtcagca acatgctcca gaaggccaga caaactctag aattttaccc ttgcacttct 300
gaagagattg atcatgaaga tatcacaaaa gataaaacca gcacagtgga ggcctgttta 360
ccattggaat taaccaagaa tgagagttgc ctaaattcca gagagacctc tttcataact 420
aatgggagtt gcctggcctc cagaaagacc tcttttatga tggccctgtg ccttagtagt 480
atttatgaag acttgaagat gtaccaggtg gagttcaaga ccatgaatgc aaagcttctg 540
atggatccta agaggcagat ctttctagat caaaacatgc tggcagttat tgatgagctg 600
atgcaggccc tgaatttcaa cagtgagact gtgccacaaa aatcctccct tgaagaaccg 660
gatttttata aaactaaaat caagctctgc atacttcttc atgctttcag aattcgggca 720
gtgactattg atagagtgat gagctatctg aatgcttcc 759

<210> 133
<211> 986
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL-12 beta

<400> 133
agatgtgtca ccagcagttg gtcatctctt ggttttccct ggtttttctg gcatctcccc 60
tcgtggccat atgggaactg aagaaagatg tttatgtcgt agaattggat tggtatccgg 120
atgcccctgg agaaatggtg gtcctcacct gtgacacccc tgaagaagat ggtatcacct 180
ggaccttgga ccagagcagt gaggtcttag gctctggcaa aaccctgacc atccaagtca 240
aagagtttgg agatgctggc cagtacacct gtcacaaagg aggcgaggtt ctaagccatt 300
cgctcctgct gcttcacaaa aaggaagatg gaatttggtc cactgatatt ttaaaggacc 360
agaaagaacc caaaaataag acctttctaa gatgcgaggc caagaattat tctggacgtt 420
tcacctgctg gtggctgacg acaatcagta ctgatttgac attcagtgtc aaaagcagca 480
gaggctcttc tgaccccaa ggggtgacgt gcggagctgc tacactctct gcagagagag 540
tcagagggga caacaaggag tatgagtact cagtggagtg ccaggaggac agtgcctgcc 600
cagctgctga ggagagtctg cccattgagg tcatggtgga tgccgttcac aagctcaagt 660
atgaaaacta caccagcagc ttcttcatca gggacatcat caaacctgac ccacccaaga 720
acttgcagct gaagccatta aagaattctc ggcaggtgga ggtcagctgg gagtaccctg 780
acacctggag tactccacat tcctacttct ccctgacatt ctgcgttcag gtccagggca 840
agagcaagag agaaaagaaa gatagagtct tcacggacaa gacctcagcc acggtcatct 900
gccgcaaaaa tgccagcatt agcgtgcggg cccaggaccg ctactatagc tcatcttgga 960
gcgaatgggc atctgtgccc tgcagt 986

<210> 134
<211> 276
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> MIP-1 alpha/ CCL3

<400> 134
atgcaggtct ccactgctgc ccttgctgtc ctcctctgca ccatggctct ctgcaaccag 60
ttctctgcat cacttgctgc tgacacgccg accgcctgct gcttcagcta cacctcccgg 120
cagattccac agaatttcat agctgactac tttgagacga gcagccagtg ctccaagccc 180
ggtgtcatct tcctaaccaa gcgaagccgg caggtctgtg ctgaccccag tgaggagtgg 240

gtccagaaat atgtcagcga cctggagctg agtgcc 276

<210> 135
<211> 1530
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD39/ENTPD1, isoform 1

<400> 135
atggaagata caaaggagtc taacgtgaag acattttgct ccaagaatat cctagccatc 60
cttggcttct cctctatcat agctgtgata gctttgcttg ctgtggggtt gacccagaac 120
aaagcattgc cagaaaacgt taagtatggg attgtgctgg atgcgggttc ttctcacaca 180
agtttataca tctataagtg gccagcagaa aaggagaatg acacaggcgt ggtgcatcaa 240
gtagaagaat gcagggttaa aggtcctgga atctcaaaat ttgttcagaa agtaaatgaa 300
ataggcattt acctgactga ttgcatggaa agagctaggg aagtgattcc aaggtcccag 360
caccaagaga cacccgttta cctgggagcc acggcaggca tgcggttgct caggatggaa 420
agtgaagagt tggcagacag ggttctggat gtggtggaga ggagcctcag caactacccc 480
tttgacttcc agggtgccag gatcattact ggccaagagg aaggtgccta tggctggatt 540
actatcaact atctgctggg caaattcagt cagaaaacaa ggtggttcag catagtccca 600
tatgaaacca ataatcagga aacctttgga gctttggacc ttgggggagc ctctacacaa 660
gtcacttttg taccccaaaa ccagactatc gagtccccag ataatgctct gcaatttcgc 720
ctctatggca aggactacaa tgtctacaca catagcttct tgtgctatgg gaaggatcag 780
gcactctggc agaaactggc caaggacatt caggttgcaa gtaatgaaat tctcagggac 840
ccatgctttc atcctggata taagaaggta gtgaacgtaa gtgaccttta caagaccccc 900
tgcaccaaga gatttgagat gactcttcca ttccagcagt ttgaaatcca gggtattgga 960
aactatcaac aatgccatca aagcatcctg gagctcttca acaccagtta ctgcccttac 1020
tcccagtgtg ccttcaatgg gattttcttg ccaccactcc agggggattt tggggcattt 1080
tcagcttttt actttgtgat gaagttttta aacttgacat cagagaaagt ctctcaggaa 1140
aaggtgactg agatgatgaa aaagttctgt gctcagcctt gggaggagat aaaaacatct 1200
tacgctggag taaaggagaa gtacctgagt gaatactgct tttctggtac ctacattctc 1260
tccctccttc tgcaaggcta tcatttcaca gctgattcct gggagcacat ccatttcatt 1320
ggcaagatcc agggcagcga cgccggctgg actttgggct acatgctgaa cctgaccaac 1380
atgatcccag ctgagcaacc attgtccaca cctctctccc actccaccta tgtcttcctc 1440
atggttctat tctccctggt ccttttcaca gtggccatca taggcttgct tatctttcac 1500
aagccttcat atttctggaa agatatggta 1530

<210> 136
<211> 1722
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD73/NT5E, isoform 1

<400> 136
atgtgtcccc gagccgcgcg ggcgcccgcg acgctactcc tcgccctggg cgcggtgctg 60
tggcctgcgg ctggcgcctg ggagcttacg attttgcaca ccaacgacgt gcacagccgg 120
ctggagcaga ccagcgagga ctccagcaag tgcgtcaacg ccagccgctg catgggtggc 180
gtggctcggc tcttcaccaa ggttcagcag atccgccgcg ccgaacccaa cgtgctgctg 240
ctggacgccg gcgaccagta ccagggcact atctggttca ccgtgtacaa gggcgccgag 300
gtggcgcact tcatgaacgc cctgcgctac gatgccatgg cactgggaaa tcatgaattt 360
gataatggtg tggaaggact gatcgagcca ctcctcaaag aggccaaatt tccaattctg 420
agtgcaaaca ttaaagcaaa ggggccacta gcatctcaaa tatcaggact ttatttgcca 480
tataaagttc ttcctgttgg tgatgaagtt gtgggaatcg ttggatacac ttccaaagaa 540
acccctttc tctcaaatcc agggacaaat ttagtgtttg aagatgaaat cactgcatta 600
caacctgaag tagataagtt aaaaactcta aatgtgaaca aaattattgc actgggacat 660
tcgggttttg aaatggataa actcatcgct cagaaagtga ggggtgtgga cgtcgtggtg 720
ggaggacact ccaacacatt tctttacaca ggcaatccac cttccaaaga ggtgcctgct 780
gggaagtacc cattcatagt cacttctgat gatgggcgga aggttcctgt agtccaggcc 840

tatgcttttg gcaaatacct aggctatctg aagatcgagt ttgatgaaag aggaaacgtc 900
atctcttccc atggaaatcc cattcttcta aacagcagca ttcctgaaga tccaagcata 960
aaagcagaca ttaacaaatg gaggataaaa ttggataatt attctaccca ggaattaggg 1020
aaaacaattg tctatctgga tggctcctct caatcatgcc gctttagaga atgcaacatg 1080
ggcaacctga tttgtgatgc aatgattaac aacaacctga gacacacgga tgaaatgttc 1140
tggaaccacg tatccatgtg cattttaaat ggaggtggta tccggtcgcc cattgatgaa 1200
cgcaacaatg gcacaattac ctgggagaac ctggctgctg tattgccctt tggaggcaca 1260
tttgacctag tccagttaaa aggttccacc ctgaagaagg cctttgagca tagcgtgcac 1320
cgctacggcc agtccactgg agagttcctg caggtgggcg gaatccatgt ggtgtatgat 1380
ctttcccgaa aacctggaga cagagtagtc aaattagatg ttctttgcac caagtgtcga 1440
gtgcccagtt atgaccctct caaaatggac gaggtatata aggtgatcct cccaaacttc 1500
ctggccaatg gtggagatgg gttccagatg ataaaagatg aattattaag acatgactct 1560
ggtgaccaag atatcaacgt ggtttctaca tatatctcca aaatgaaagt aatttatcca 1620
gcagttgaag gtcggatcaa gttttccaca ggaagtcact gccatggaag cttttcttta 1680
atatttcttt cactttgggc agtgatcttt gttttatacc aa 1722

<210> 137
<211> 297
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL-8 (CXCL8)

<400> 137
atgacttcca agctggccgt ggctctcttg gcagccttcc tgatttctgc agctctgtgt 60
gaaggtgcag ttttgccaag gagtgctaaa gaacttagat gtcagtgcat aaagacatac 120
tccaaacctt tccaccccaa atttatcaaa gaactgagag tgattgagag tggaccacac 180
tgcgccaaca cagaaattat tgtaaagctt tctgatggaa gagagctctg tctggacccc 240
aaggaaaact gggtgcagag ggttgtggag aagtttttga agagggctga gaattca 297

<210> 138
<211> 1596
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ICAM1

<400> 138
atggctccca gcagcccccg gcccgcgctg cccgcactcc tggtcctgct cggggctctg 60
ttcccaggac ctggcaatgc ccagacatct gtgtcccccct caaaagtcat cctgccccgg 120
ggaggctccg tgctggtgac atgcagcacc tcctgtgacc agcccaagtt gttgggcata 180
gagaccccgt tgcctaaaaa ggagttgctc ctgcctggga acaaccggaa ggtgtatgaa 240
ctgagcaatg tgcaagaaga tagccaacca atgtgctatt caaactgccc tgatgggcag 300
tcaacagcta aaaccttcct caccgtgtac tggactccag aacgggtgga actggcaccc 360
ctcccctctt ggcagccagt gggcaagaac cttaccctac gctgccaggt ggagggtggg 420
gcaccccggg ccaacctcac cgtggtgctg ctccgtgggg agaaggagct gaaacgggag 480
ccagctgtgg gggagcccgc tgaggtcacg accacggtgc tggtgaggag agatcaccat 540
ggagccaatt tctcgtgccg cactgaactg gacctgcggc cccaagggct ggagctgttt 600
gagaacacct cggcccccta ccagctccag acctttgtcc tgccagcgac tcccccacaa 660
cttgtcagcc cccgggtcct agaggtggac acgcagggga ccgtggtctg ttccctggac 720
gggctgttcc cagtctcgga ggcccaggtc cacctggcac tgggggacca gaggttgaac 780
cccacagtca cctatggcaa cgactccttc tcggccaagg cctcagtcag tgtgaccgca 840
gaggacgagg gcacccagcg gctgacgtgt gcagtaatac tggggaacca gagccaggag 900
acactgcaga cagtgaccat ctacagcttt ccggcgccca acgtgattct gacgaagcca 960
gaggtctcag aagggaccga ggtgacagtg aagtgtgagg cccaccctag agccaaggtg 1020
acgctgaatg gggttccagc ccagccactg ggcccgaggg cccagctcct gctgaaggcc 1080
accccagagg acaacgggcg cagcttctcc tgctctgcaa ccctggaggt ggccggccag 1140
cttatacaca agaaccagac ccgggagctt cgtgtcctgt atggcccccg actggacgag 1200
agggattgtc cgggaaactg gacgtggcca gaaaattccc agcagactcc aatgtgccag 1260

gcttggggga acccattgcc cgagctcaag tgtctaaagg atggcacttt cccactgccc 1320
atcggggaat cagtgactgt cactcgagat cttgagggca cctacctctg tcgggccagg 1380
agcactcaag gggaggtcac ccgcaaggtg accgtgaatg tgctctcccc ccggtatgag 1440
attgtcatca tcactgtggt agcagccgca gtcataatgg gcactgcagg cctcagcacg 1500
tacctctata accgccagcg gaagatcaag aaatacagac tacaacaggc ccaaaaaggg 1560
acccccatga aaccgaacac acaagccacg cctccc 1596

<210> 139
<211> 1488
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> angiopoietin 2, isoform 1

<400> 139
atgtggcaga ttgttttctt tactctgagc tgtgatcttg tcttggccgc agcctataac 60
aactttcgga agagcatgga cagcatagga aagaagcaat atcaggtcca gcatgggtcc 120
tgcagctaca ctttcctcct gccagagatg gacaactgcc gctcttcctc cagcccctac 180
gtgtccaatg ctgtgcagag ggacgcgccg ctcgaatacg atgactcggt gcagaggctg 240
caagtgctgg agaacatcat ggaaaacaac actcagtggc taatgaagct tgagaattat 300
atccaggaca acatgaagaa agaaatggta gagatacagc agaatgcagt acagaaccag 360
acggctgtga tgatagaaat agggacaaac ctgttgaacc aaacagcgga gcaaacgcgg 420
aagttaactg atgtggaagc ccaagtatta aatcagacca cgagacttga acttcagctc 480
ttggaacact ccctctcgac aaacaaattg gaaaaacaga ttttggacca gaccagtgaa 540
ataaacaaat tgcaagataa gaacagtttc ctagaaaaga aggtgctagc tatggaagac 600
aagcacatca tccaactaca gtcaataaaa gaagagaaag atcagctaca ggtgttagta 660
tccaagcaaa attccatcat tgaagaacta gaaaaaaaaa tagtgactgc cacggtgaat 720
aattcagttc ttcagaagca gcaacatgat ctcatggaga cagttaataa cttactgact 780
atgatgtcca catcaaactc agctaaggac cccactgttg ctaaagaaga acaaatcagc 840
ttcagagact gtgctgaagt attcaaatca ggacacacca cgaatggcat ctacacgtta 900
acattcccta attctacaga agagatcaag gcctactgtg acatggaagc tggaggaggc 960
gggtggacaa ttattcagcg acgtgaggat ggcagcgttg attttcagag gacttggaaa 1020
gaatataaag tgggatttgg taacccttca ggagaatatt ggctgggaaa tgagtttgtt 1080
tcgcaactga ctaatcagca acgctatgtg cttaaaatac accttaaaga ctgggaaggg 1140
aatgaggctt actcattgta tgaacatttc tatctctcaa gtgaagaact caattatagg 1200
attcacctta aaggacttac agggacagcc ggcaaaataa gcagcatcag ccaaccagga 1260
aatgatttta gcacaaagga tggagacaac gacaaatgta tttgcaaatg ttcacaaatg 1320
ctaacaggag gctggtggtt tgatgcatgt ggtccttcca acttgaacgg aatgtactat 1380
ccacagaggc agaacacaaa taagttcaac ggcattaaat ggtactactg gaaaggctca 1440
ggctattcgc tcaaggccac aaccatgatg atccgaccag cagatttc 1488

<210> 140
<211> 2766
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> NLRP3, isoform 2

<400> 140
atgaagatgg caagcacccg ctgcaagctg gccaggtacc tggaggacct ggaggatgtg 60
gacttgaaga aatttaagat gcacttagag gactatcctc cccagaaggg ctgcatcccc 120
ctcccgaggg gtcagacaga gaaggcagac catgtggatc tagccacgct aatgatcgac 180
ttcaatgggg aggagaaggc gtgggccatg gccgtgtgga tcttcgctgc gatcaacagg 240
agagaccttt atgagaaagc aaaaagagat gagccgaagt ggggttcaga taatgcacgt 300
gtttcgaatc ccactgtgat atgccaggaa gacagcattg aagaggagtg gatgggttta 360
ctggagtacc tttcgagaat ctctatttgt aaaatgaaga aagattaccg taagaagtac 420
agaaagtacg tgagaagcag attccagtgc attgaagaca ggaatgcccg tctgggtgag 480
agtgtgagcc tcaacaaacg ctacacacga ctgcgtctca tcaaggagca ccggagccag 540
caggagaggg agcaggagct tctggccatc ggcaagacca agacgtgtga gagccccgtg 600

agtcccatta agatggagtt gctgtttgac cccgatgatg agcattctga gcctgtgcac 660
accgtggtgt tccagggggc ggcagggatt gggaaaacaa tcctggccag gaagatgatg 720
ttggactggg cgtcggggac actctaccaa gacaggtttg actatctgtt ctatatccac 780
tgtcgggagg tgagccttgt gacacagagg agcctggggg acctgatcat gagctgctgc 840
cccgacccaa acccacccat ccacaagatc gtgagaaaac cctccagaat cctcttcctc 900
atggacggct tcgatgagct gcaaggtgcc tttgacgagc acataggacc gctctgcact 960
gactggcaga aggccgagcg gggagacatt ctcctgagca gcctcatcag aaagaagctg 1020
cttcccgagg cctctctgct catcaccacg agacctgtgg ccctggagaa actgcagcac 1080
ttgctggacc atcctcggca tgtggagatc ctgggtttct ccgaggccaa aaggaaagag 1140
tacttcttca agtacttctc tgatgaggcc caagccaggg cagccttcag tctgattcag 1200
gagaacgagg tcctcttcac catgtgcttc atccccctgg tctgctggat cgtgtgcact 1260
ggactgaaac agcagatgga gagtggcaag agccttgccc agacatccaa gaccaccacc 1320
gcggtgtacg tcttcttcct ttccagtttg ctgcagcccc ggggagggag ccaggagcac 1380
ggcctctgcg cccacctctg ggggctctgc tctttggctg cagatggaat ctggaaccag 1440
aaaatcctgt ttgaggagtc cgacctcagg aatcatggac tgcagaaggc ggatgtgtct 1500
gctttcctga ggatgaacct gttccaaaag gaagtggact gcgagaagtt ctacagcttc 1560
atccacatga ctttccagga gttctttgcc gccatgtact acctgctgga agaggaaaag 1620
gaaggaagga cgaacgttcc agggagtcgt ttgaagcttc ccagccgaga cgtgacagtc 1680
cttctggaaa actatggcaa attcgaaaag gggtatttga tttttgttgt acgtttcctc 1740
tttggcctgg taaaccagga gaggacctcc tacttggaga agaaattaag ttgcaagatc 1800
tctcagcaaa tcaggctgga gctgctgaaa tggattgaag tgaaagccaa agctaaaaag 1860
ctgcagatcc agcccagcca gctggaattg ttctactgtt tgtacgagat gcaggaggag 1920
gacttcgtgc aaagggccat ggactatttc cccaagattg agatcaatct ctccaccaga 1980
atggaccaca tggtttcttc cttttgcatt gagaactgtc atcgggtgga gtcactgtcc 2040
ctggggtttc tccataacat gcccaaggag gaagaggagg aggaaaagga aggccgacac 2100
cttgatatgg tgcagtgtgt cctcccaagc tcctctcatg ctgcctgttc tcatgggttg 2160
gggcgctgtg gcctctcgca tgagtgctgc ttcgacatct ccttggtcct cagcagcaac 2220
cagaagctgg tggagctgga cctgagtgac aacgccctcg gtgacttcgg aatcagactt 2280
ctgtgtgtgg gactgaagca cctgttgtgc aatctgaaga agctctggtt ggtgaattct 2340
ggccttacgt cagtctgttg ttcagctttg tcctcggtac tcagcactaa tcagaatctc 2400
acgcaccttt acctgcgagg caacactctc ggagacaagg ggatcaaact actctgtgag 2460
ggactcttgc accccgactg caagcttcag gtgttggaat tagacaactg caacctcacg 2520
tcacactgct gctgggatct ttccacactt ctgacctcca gccagagcct gcgaaagctg 2580
agcctgggca acaatgacct gggcgacctg ggggtcatga tgttctgtga agtgctgaaa 2640
cagcagagct gcctcctgca gaacctgggg ttgtctgaaa tgtatttcaa ttatgagaca 2700
aaaagtgcgt tagaaacact tcaagaagaa aagcctgagc tgaccgtcgt ctttgagcct 2760
tcttgg 2766

<210> 141
<211> 831
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD40, isoform 1

<400> 141
atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca 60
gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg 120
tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt 180
ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac 240
aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac 300
accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc 360
ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat 420
accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgtcatctgc tttcgaaaaa 480
tgtcaccctt ggacaagctg tgagaccaaa gacctggttg tgcaacaggc aggcacaaac 540
aagactgatg ttgtctgtgg tccccaggat cggctgagag ccctggtggt gatccccatc 600
atcttcggga tcctgtttgc catcctcttg gtgctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag 660
aagccaacca ataaggcccc ccaccccaag caggaacccc aggagatcaa ttttcccgac 720
gatcttcctg gctccaacac tgctgctcca gtgcaggaga ctttacatgg atgccaaccg 780
gtcacccagg aggatggcaa agagagtcgc atctcagtgc aggagagaca g 831

<210> 142
<211> 783
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD40 ligand (CD40L)

<400> 142
atgatcgaaa catacaacca aacttctccc cgatctgcgg ccactggact gcccatcagc 60
atgaaaattt ttatgtattt acttactgtt tttcttatca cccagatgat tgggtcagca 120
ctttttgctg tgtatcttca tagaaggttg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat 180
gaagattttg tattcatgaa aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccttatcc 240
ttactgaact gtgaggagat taaaagccag tttgaaggct ttgtgaagga tataatgtta 300
aacaaagagg agacgaagaa agaaaacagc tttgaaatgc aaaaaggtga tcagaatcct 360
caaattgcgg cacatgtcat aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg 420
gctgaaaaag gatactacac catgagcaac aacttggtaa ccctggaaaa tgggaaacag 480
ctgaccgtta aaagacaagg actctattat atctatgccc aagtcacctt ctgttccaat 540
cgggaagctt cgagtcaagc tccatttata gccagcctct gcctaaagtc ccccggtaga 600
ttcgagagaa tcttactcag agctgcaaat acccacagtt ccgccaaacc ttgcgggcaa 660
caatccattc acttgggagg agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgtcaat 720
gtgactgatc caagccaagt gagccatggc actggcttca cgtcctttgg cttactcaaa 780
ctc 783

<210> 143
<211> 579
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD-70 antigen, isoform 1

<400> 143
atgccggagg agggttcggg ctgctcggtg cggcgcaggc cctatgggtg cgtcctgcgg 60
gctgctttgg tcccattggt cgcgggcttg gtgatctgcc tcgtggtgtg catccagcgc 120
ttcgcacagg ctcagcagca gctgccgctc gagtcacttg ggtgggacgt agctgagctg 180
cagctgaatc acacaggacc tcagcaggac cccaggctat actggcaggg gggcccagca 240
ctgggccgct ccttcctgca tggaccagag ctggacaagg ggcagctacg tatccatcgt 300
gatggcatct acatggtaca catccaggtg acgctggcca tctgctcctc cacgacggcc 360
tccaggcacc accccaccac cctggccgtg ggaatctgct ctcccgcctc ccgtagcatc 420
agcctgctgc gtctcagctt ccaccaaggt tgtaccattg cctcccagcg cctgacgccc 480
ctggcccgag gggacacact ctgcaccaac ctcactggga cacttttgcc ttcccgaaac 540
actgatgaga ccttctttgg agtgcagtgg gtgcgcccc 579

<210> 144
<211> 765
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD137 (4-1BB, TNFRSF9)

<400> 144
atgggaaaca gctgttacaa catagtagcc actctgttgc tggtcctcaa ctttgagagg 60
acaagatcat tgcaggatcc ttgtagtaac tgcccagctg gtacattctg tgataataac 120
aggaatcaga tttgcagtcc ctgtcctcca aatagtttct ccagcgcagg tggacaaagg 180
acctgtgaca tatgcaggca gtgtaaaggt gttttcagga ccaggaagga gtgttcctcc 240
accagcaatg cagagtgtga ctgcactcca gggtttcact gcctgggggc aggatgcagc 300
atgtgtgaac aggattgtaa acaaggtcaa gaactgacaa aaaaaggttg taaagactgt 360
tgctttggga catttaacga tcagaaacgt ggcatctgtc gaccctggac aaactgttct 420

ttggatggaa agtctgtgct tgtgaatggg acgaaggaga gggacgtggt ctgtggacca 480
tctccagccg acctctctcc gggagcatcc tctgtgaccc cgcctgcccc tgcgagagag 540
ccaggacact ctccgcagat catctccttc tttcttgcgc tgacgtcgac tgcgttgctc 600
ttcctgctgt tcttcctcac gctccgtttc tctgttgtta aacggggcag aaagaaactc 660
ctgtatatat tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc 720
tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactg 765

<210> 145
<211> 807
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD200, isoform 1

<400> 145
atggagaggc tggtgatcag gatgcccttc tctcatctgt ctacctacag cctggtttgg 60
gtcatggcag cagtggtgct gtgcacagca caagtgcaag tggtgaccca ggatgaaaga 120
gagcagctgt acacacctgc ttccttaaaa tgctctctgc aaaatgccca ggaagccctc 180
attgtgacat ggcagaaaaa gaaagctgta agcccagaaa acatggtcac cttcagcgag 240
aaccatgggg tggtgatcca gcctgcctat aaggacaaga taaacattac ccagctggga 300
ctccaaaact caaccatcac cttctggaat atcaccctgg aggatgaagg gtgttacatg 360
tgtctcttca ataccttttgg ttttgggaag atctcaggaa cggcctgcct caccgtctat 420
gtacagccca tagtatccct tcactacaaa ttctctgaag accacctaaa tatcacttgc 480
tctgccactg cccgcccagc ccccatggtc ttctggaagg tccctcggtc agggattgaa 540
aatagtacag tgactctgtc tcacccaaat gggaccacgt ctgttaccag catcctccat 600
atcaaagacc ctaagaatca ggtggggaag gaggtgatct gccaggtgct gcacctgggg 660
actgtgaccg actttaagca aaccgtcaac aaaggctatt ggttttcagt tccgctattg 720
ctaagcattg tttccctggt aattcttctc gtcctaatct caatcttact gtactggaaa 780
cgtcaccgga atcaggaccg agagccc 807

<210> 146
<211> 1236
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A2aR (ADORA2A)

<400> 146
atgcccatca tgggctcctc ggtgtacatc acggtggagc tggccattgc tgtgctggcc 60
atcctgggca atgtgctggt gtgctgggcc gtgtggctca acagcaacct gcagaacgtc 120
accaactact ttgtggtgtc actggcggcg gccgacatcg cagtgggtgt gctcgccatc 180
ccctttgcca tcaccatcag caccgggttc tgcgctgcct gccacggctg cctcttcatt 240
gcctgcttcg tcctggtcct cacgcagagc tccatcttca gtctcctggc catcgccatt 300
gaccgctaca ttgccatccg catcccgctc cggtacaatg gcttggtgac cggcacgagg 360
gctaagggca tcattgccat ctgctgggtg ctgtcgtttg ccatcggcct gactcccatg 420
ctaggttgga acaactgcgg tcagccaaag gagggcaaga accactccca gggctgcggg 480
gagggccaag tggcctgtct ctttgaggat gtggtcccca tgaactacat ggtgtacttc 540
aacttctttg cctgtgtgct ggtgcccctg ctgctcatgc tgggtgtcta tttgcggatc 600
ttcctggcgg cgcgacgaca gctgaagcag atggagagcc agcctctgcc gggggagcgg 660
gcacggtcca cactgcagaa ggaggtccat gctgccaagt cactggccat cattgtgggg 720
ctctttgccc tctgctggct gcccctacac atcatcaact gcttcacttt cttctgcccc 780
gactgcagcc acgcccctct ctggctcatg tacctggcca tcgtcctctc ccacaccaat 840
tcggttgtga atcccttcat ctacgcctac cgtatccgcg agttccgcca gaccttccgc 900
aagatcattc gcagccacgt cctgaggcag caagaacctt tcaaggcagc tggcaccagt 960
gcccgggtct tggcagctca tggcagtgac ggagagcagg tcagcctccg tctcaacggc 1020
cacccgccag gagtgtgggc caacggcagt gctccccacc ctgagcggag gcccaatggc 1080
tatgccctgg ggctggtgag tggagggagt gcccaagagt cccaggggaa cacgggcctc 1140
ccagacgtgg agctccttag ccatgagctc aagggagtgt gcccagagcc ccctggccta 1200
gatgaccccc tggcccagga tggagcagga gtgtcc 1236

<210> 147
<211> 723
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> GITR/TNFRSF18, isoform 1

<400> 147
atggcacagc acggggcgat gggcgcgttt cgggccctgt gcggcctggc gctgctgtgc 60
gcgctcagcc tgggtcagcg ccccaccggg ggtcccgggt gcggccctgg gcgcctcctg 120
cttgggacgg gaacggacgc gcgctgctgc cgggttcaca cgacgcgctg ctgccgcgat 180
tacccgggcg aggagtgctg ttccgagtgg gactgcatgt gtgtccagcc tgaattccac 240
tgcggagacc cttgctgcac gacctgccgg caccaccctt gtcccccagg ccaggggtta 300
cagtcccagg ggaaattcag ttttggcttc cagtgtatcg actgtgcctc ggggaccttc 360
tccgggggcc acgaaggcca ctgcaaacct tggacagact gcacccagtt cgggtttctc 420
actgtgttcc ctgggaacaa gacccacaac gctgtgtgcg tcccagggtc cccgccggca 480
gagccgcttg ggtggctgac cgtcgtcctc ctggccgtgg ccgcctgcgt cctcctcctg 540
acctcggccc agcttggact gcacatctgg cagctgagga gtcagtgcat gtggccccga 600
gagacccagc tgctgctgga ggtgccgccg tcgaccgaag acgccagaag ctgccagttc 660
cccgaggaag agcggggcga gcgatcggca gaggagaagg ggcggctggg agacctgtgg 720
gtg   723

<210> 148
<211> 1362
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> B7-H6 (NCR3LG1)

<400> 148
atgacgtgga gggctgccgc ctccacgtgc gcggcgctcc tgattctgct gtgggcgctg 60
acgaccgaag gtgatctgaa agtagagatg atggcagggg ggactcagat cacacccctg 120
aatgacaatg tcaccatatt ctgcaatatc ttttattccc aacccctcaa catcacgtct 180
atgggtatca cctggttttg gaagagtctg acgtttgaca aagaagtcaa agtctttgaa 240
ttttttggag atcaccaaga ggcattccga cctggagcca ttgtgtctcc atggaggctg 300
aagagtgggg acgcctcact gcggctgcct ggaatccagc tggaggaagc aggagagtac 360
cgatgtgagg tggtggtcac ccctctgaag gcacagggaa cagtccagct tgaagttgtg 420
gcttccccag ccagcagatt gttgctggat caagtgggca tgaaagagaa tgaagacaaa 480
tatatgtgtg agtcaagtgg gttctaccca gaggctatta atataacatg ggagaagcag 540
acccagaagt ttccccatcc catagagatt tctgaggatg tcatcactgg tcccaccatc 600
aagaatatgg atggcacatt taatgtcact agctgcttga agctgaactc ctctcaggaa 660
gaccctggga ctgtctacca gtgtgtggta cggcatgcgt ccttgcatac ccccttgagg 720
agcaacttta ccctgactgc tgctcggcac agtctttctg aaactgagaa gacagataat 780
ttttccattc attggtggcc tatttcattc attggtgttg gactggtttt attaattgtt 840
ttgattcctt ggaaaaagat atgtaacaaa tcatcttcag cctatactcc tctcaagtgc 900
attctgaaac actggaactc ctttgacact cagactctga agaaagagca cctcatattc 960
ttttgcactc gggcatggcc gtcttaccag ctgcaggatg gggaggcttg gcctcctgag 1020
ggaagtgtta atattaatac tattcaacaa ctagatgttt tctgcagaca ggagggcaaa 1080
tggtccgagg ttccttatgt gcaagccttc tttgccttgc gagacaaccc agatctttgt 1140
cagtgttgta gaattgaccc tgctctccta acagttacat caggcaagtc catagatgat 1200
aattccacaa agtctgagaa acaaacccct agggaacact cggatgcagt tccggatgcc 1260
ccaatccttc ctgtctcccc tatctgggaa cctcctccag ccacaacatc aacaactcca 1320
gttctatcct cccaaccccc aactttactg ttacccctac ag   1362

<210> 149
<211> 597
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ICOS, isoform 1

<400> 149
atgaagtcag gcctctggta tttctttctc ttctgcttgc gcattaaagt tttaacagga 60
gaaatcaatg gttctgccaa ttatgagatg tttatatttc acaacggagg tgtacaaatt 120
ttatgcaaat atcctgacat tgtccagcaa tttaaaatgc agttgctgaa agggggggcaa 180
atactctgcg atctcactaa gacaaaagga agtggaaaca cagtgtccat taagagtctg 240
aaattctgcc attctcagtt atccaacaac agtgtctctt tttttctata caacttggac 300
cattctcatg ccaactatta cttctgcaac ctatcaattt ttgatcctcc tccttttaaa 360
gtaactctta caggaggata tttgcatatt tatgaatcac aactttgttg ccagctgaag 420
ttctggttac ccataggatg tgcagccttt gttgtagtct gcattttggg atgcatactt 480
atttgttggc ttacaaaaaa gaagtattca tccagtgtgc acgaccctaa cggtgaatac 540
atgttcatga gagcagtgaa cacagccaaa aaatctagac tcacagatgt gacccta   597

<210> 150
<211> 906
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ICOS ligand, isoform 1

<400> 150
atgcggctgg gcagtcctgg actgctcttc ctgctcttca gcagccttcg agctgatact 60
caggagaagg aagtcagagc gatggtaggc agcgacgtgg agctcagctg cgcttgccct 120
gaaggaagcc gttttgattt aaatgatgtt tacgtatatt ggcaaaccag tgagtcgaaa 180
accgtggtga cctaccacat cccacagaac agctccttgg aaaacgtgga cagccgctac 240
cggaaccgag ccctgatgtc accggccggc atgctgcggg gcgacttctc cctgcgcttg 300
ttcaacgtca ccccccagga cgagcagaag tttcactgcc tggtgttgag ccaatccctg 360
ggattccagg aggttttgag cgttgaggtt acactgcatg tggcagcaaa cttcagcgtg 420
cccgtcgtca gcgcccccca cagcccctcc caggatgagc tcaccttcac gtgtacatcc 480
ataaacggct accccaggcc caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg 540
gaccaggctc tgcagaatga caccgtcttc ttgaacatgc ggggcttgta tgacgtggtc 600
agcgtgctga ggatcgcacg gacccccagc gtgaacattg gctgctgcat agagaacgtg 660
cttctgcagc agaacctgac tgtcggcagc cagacaggaa atgacatcgg agagagagac 720
aagatcacag agaatccagt cagtaccggc gagaaaaacg cggccacgtg gagcatcctg 780
gctgtcctgt gcctgcttgt ggtcgtggcg gtggccatag gctgggtgtg cagggaccga 840
tgcctccaac acagctatgc aggtgcctgg gctgtgagtc cggagacaga gctcactggc 900
cacgtt   906

<210> 151
<211> 1344
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> gp49B/LILRB4, isoform 1

<400> 151
atgatcccca ccttcacggc tctgctctgc ctcgggctga gtctgggccc caggacccac 60
atgcaggcag ggcccctccc caaacccacc ctctgggctg agccaggctc tgtgatcagc 120
tgggggaact ctgtgaccat ctggtgtcag gggaccctgg aggctcggga gtaccgtctg 180
gataaagagg aaagcccagc accctgggac agacagaacc cactggagcc caagaacaag 240
gccagattct ccatcccatc catgacagag gactatgcag ggagataccg ctgttactat 300
cgcagccctg taggctggtc acagcccagt gacccccctgg agctggtgat gacaggagcc 360
tacagtaaac ccacccctttc agccctgccg agtcctcttg tgacctcagg aaagagcgtg 420
accctgctgt gtcagtcacg gagcccaatg gacacttttc ttctgatcaa ggagcgggca 480
gcccatcccc tactgcatct gagatcagag cacggagctc agcagcacca ggctgaattc 540
cccatgagtc ctgtgacctc agtgcacggg gggacctaca ggtgcttcag ctcacacggc 600

ttctcccact acctgctgtc acaccccagt gacccccctgg agctcatagt ctcaggatcc 660
ttggagggtc ccaggccctc acccacaagg tccgtctcaa cagctgcagg ccctgaggac 720
cagcccctca tgcctacagg gtcagtcccc cacagtggtc tgagaaggca ctgggaggta 780
ctgatcgggg tcttggtggt ctccatcctg cttctctccc tcctcctctt cctcctcctc 840
caacactggc gtcagggaaa acacaggaca ttggcccaga gacaggctga tttccaacgt 900
cctccagggg ctgccgagcc agagcccaag gacgggggcc tacagaggag gtccagccca 960
gctgctgacg tccagggaga aaacttctgt gctgccgtga agaacacaca gcctgaggac 1020
ggggtggaaa tggacactcg gcagagccca cacgatgaag acccccaggc agtgacgtat 1080
gccaaggtga aacactccag acctaggaga gaaatggcct ctcctccctc cccactgtct 1140
ggggaattcc tggacacaaa ggacagacag gcagaagagg acagacagat ggacactgag 1200
gctgctgcat ctgaagcccc ccaggatgtg acctacgccc ggctgcacag ctttaccctc 1260
agacagaagg caactgagcc tcctccatcc caggaagggg cctctccagc tgagcccagt 1320
gtctatgcca ctctggccat ccac 1344

<210> 152
<211> 1896
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PIR-B/LILRB3, isoform 1

<400> 152
atgacgcccg ccctcacagc cctgctctgc cttgggctga gtctgggccc caggacccgc 60
atgcaggcag ggcccttccc caaacccacc ctctgggctg agccaggctc tgtgatcagc 120
tgggggagcc ccgtgaccat ctggtgtcag gggagcctgg aggcccagga gtaccaactg 180
gataaagagg gaagcccaga gccctgggac agaaataacc cactggaacc caagaacaag 240
gccagattct ccatcccatc catgacacag caccatgcag ggagataccg ctgccactat 300
tacagctctg caggctggtc agagcccagc gacccccctgg agctggtgat gacaggattc 360
tacaacaaac ccaccctctc agccctgccc agccctgtgg tggcctcagg ggggaatatg 420
accctccgat gtggctcaca gaagggatat caccattttg ttctgatgaa ggaaggagaa 480
caccagctcc cccggaccct ggactcacag cagctccaca gtgggggttt ccaggccctg 540
ttccctgtgg gccccgtgac ccccagccac aggtggaggt tcacatgcta ttactattat 600
acaaacaccc cctgggtgtg gtcccacccc agtgaccccc tggagattct gccctcaggc 660
gtgtctagga agccctccct cctgaccctg cagggccctg tcctggcccc tgggcagagc 720
ctgaccctcc agtgtggctc tgatgtcggc tacgacagat ttgttctgta taaggagggg 780
gaacgtgact tcctccagcg ccctggccag cagccccagg ctgggctctc ccaggccaac 840
ttcaccctgg gccctgtgag ccgctcctac gggggccagt acaggtgcta tggtgcacac 900
aacctctcct ccgagtggtc ggcccccagt gacccccctgg acatcctgat cacaggacag 960
atctatgaca ccgtctccct gtcagcacag ccgggcccca cagtggcctc aggagagaac 1020
atgaccctgc tgtgtcagtc acgggggtat tttgacactt tccttctgac caaagaaggg 1080
gcagcccatc ccccactgcg tctgagatca atgtacggag ctcataagta ccaggctgaa 1140
ttccccatga gtcctgtgac ctcagcccac gcggggacct acaggtgcta cggctcacgc 1200
agctccaacc cccacctgct gtctttcccc agtgagcccc tggaactcat ggtctcagga 1260
cactctggag gctccagcct cccacccaca gggccgccct ccacacctgg tctgggaaga 1320
tacctggagg ttttgattgg ggtctcggtg gccttcgtcc tgctgctctt cctcctcctc 1380
ttcctcctcc tcctccgtca gcgtcacagc aaacacagga catctgacca gagaaagact 1440
gatttccagc gtcctgcagg ggctgcggag acagagccca aggacagggg cctgctgagg 1500
aggtccagcc cagctgctga cgtccaggaa gaaaacctct atgctgctgt gaaggacaca 1560
cagtctgagg acagggtgga gctggacagt cagcagagcc cacacgatga agacccccag 1620
gcagtgacgt atgccccggt gaaacactcc agtcctagga gagaaatggc ctctcctccc 1680
tcctcactgt ctggggaatt cctggacaca aaggacagac aggtggaaga ggacaggcag 1740
atggacactg aggctgctgc atctgaagcc tcccaggatg tgacctacgc ccagctgcac 1800
agcttgaccc ttagacggaa ggcaactgag cctcctccat cccaggaagg ggaacctcca 1860
gctgagccca gcatctacgc cactctggcc atccac 1896

<210> 153
<211> 1014
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HLA-G alpha chain

<400> 153
atggtggtca tggcgccccg aaccctcttc ctgctgctct cgggggccct gaccctgacc 60
gagacctggg cgggctccca ctccatgagg tatttcagcg ccgccgtgtc ccggcccggc 120
cgcggggagc cccgcttcat cgccatgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc 180
gacagcgact cggcgtgtcc gaggatggag ccgcgggcgc cgtgggtgga gcaggagggg 240
ccggagtatt gggaagagga gacacggaac accaaggccc acgcacagac tgacagaatg 300
aacctgcaga ccctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccagttctca caccctccag 360
tggatgattg gctgcgacct ggggtccgac ggacgcctcc tccgcgggta tgaacagtat 420
gcctacgatg gcaaggatta cctcgccctg aacgaggacc tgcgctcctg gaccgcagcg 480
gacactgcgg ctcagatctc caagcgcaag tgtgaggcgg ccaatgtggc tgaacaaagg 540
agagcctacc tggagggcac gtgcgtggag tggctccaca gatacctgga gaacgggaag 600
gagatgctgc agcgcgcgga ccccccccaag acacacgtga cccaccaccc tgtctttgac 660
tatgaggcca ccctgaggtg ctgggccctg ggcttctacc ctgcggagat catactgacc 720
tggcagcggg atggggagga ccagacccag gacgtggagc tcgtggagac caggcctgca 780
ggggatggaa ccttccagaa gtgggcagct gtggtggtgc cttctggaga ggagcagaga 840
tacacgtgcc atgtgcagca tgaggggctg ccggagcccc tcatgctgag atggaagcag 900
tcttccctgc ccaccatccc catcatgggt atcgttgctg gcctggttgt ccttgcagct 960
gtagtcactg gagctgcggt cgctgctgtg ctgtggagaa agaagagctc agat 1014

<210> 154
<211> 1092
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TIM1/HAVCR1

<400> 154
atgcatcctc aagtggtcat cttaagcctc atcctacatc tggcagattc tgtagctggt 60
tctgtaaagg ttggtggaga ggcaggtcca tctgtcacac taccctgcca ctacagtgga 120
gctgtcacat ccatgtgctg gaatagaggc tcatgttctc tattcacatg ccaaaatggc 180
attgtctgga ccaatggaac ccacgtcacc tatcggaagg acacacgcta taagctattg 240
ggggaccttt caagaaggga tgtctctttg accatagaaa atacagctgt gtctgacagt 300
ggcgtatatt gttgccgtgt tgagcaccgt gggtggttca atgacatgaa aatcaccgta 360
tcattggaga ttgtgccacc caaggtcacg actactccaa ttgtcacaac tgttccaacc 420
gtcacgactg ttcgaacgag caccactgtt ccaacgacaa cgactgttcc aatgacgact 480
gttccaacga caactgttcc aacaacaatg agcattccaa cgacaacgac tgttctgacg 540
acaatgactg tttcaacgac aacgagcgtt ccaacgacaa cgagcattcc aacaacaaca 600
agtgttccag tgacaacaac tgtctctacc tttgttcctc caatgccttt gcccaggcag 660
aaccatgaac cagtagccac ttcaccatct tcacctcagc cagcagaaac ccaccctacg 720
acactgcagg gagcaataag gagagaaccc accagctcac cattgtactc ttacacaaca 780
gatgggaatg acaccgtgac agagtcttca gatggccttt ggaataacaa tcaaactcaa 840
ctgttcctag aacatagtct actgacggcc aataccacta aaggaatcta tgctggagtc 900
tgtatttctg tcttggtgct tcttgctctt ttgggtgtca tcattgccaa aaagtatttc 960
ttcaaaaagg aggttcaaca actaagtgtt tcatttagca gccttcaaat taaagctttg 1020
caaaatgcag ttgaaaagga agtccaagca gaagacaata tctacattga gaatagtctt 1080
tatgccacgg ac 1092

<210> 155
<211> 1134
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TIM4/TIMD4, isoform 1

<400> 155
atgtccaaag aacctctcat tctctggctg atgattgagt tttggtggct ttacctgaca 60

ccagtcactt cagagactgt tgtgacggag gttttgggtc accgggtgac tttgccctgt 120
ctgtactcat cctggtctca caacagcaac agcatgtgct gggggaaaga ccagtgcccc 180
tactccggtt gcaaggaggc gctcatccgc actgatggaa tgagggtgac ctcaagaaag 240
tcagcaaaat atagacttca ggggactatc ccgagaggtg atgtctcctt gaccatctta 300
aaccccagtg aaagtgacag cggtgtgtac tgctgccgca tagaagtgcc tggctggttc 360
aacgatgtaa agataaacgt gcgcctgaat ctacagagag cctcaacaac cacgcacaga 420
acagcaacca ccaccacacg cagaacaaca acaacaagcc ccaccaccac ccgacaaatg 480
acaacaaccc cagctgcact tccaacaaca gtcgtgacca cacccgatct cacaaccgga 540
acaccactcc agatgacaac cattgccgtc ttcacaacag caaacacgtg cctttcacta 600
accccaagca cccttccgga ggaagccaca ggtcttctga ctcccgagcc ttctaaggaa 660
gggcccatcc tcactgcaga atcagaaact gtcctcccca gtgattcctg gagtagtgtt 720
gagtctactt ctgctgacac tgtcctgctg acatccaaag agtccaaagt ttgggatctc 780
ccatcaacat cccacgtgtc aatgtggaaa acgagtgatt ctgtgtcttc tcctcagcct 840
ggagcatctg atacagcagt tcctgagcag aacaaaacaa caaaaacagg acagatggat 900
ggaataccca tgtcaatgaa gaatgaaatg cccatctccc aactactgat gatcatcgcc 960
ccctccttgg gatttgtgct cttcgcattg tttgtggcgt ttctcctgag agggaaactc 1020
atggaaacct attgttcgca gaaacacaca aggctagact acattggaga tagtaaaaat 1080
gtcctcaatg acgtgcagca tggaagggaa gacgaagacg gccttttttac cctc 1134

<210> 156
<211> 831
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> OX-40/CD134/TNFRSF4

<400> 156
atgtgcgtgg gggctcggcg gctgggccgc gggccgtgtg cggctctgct cctcctgggc 60
ctggggctga gcaccgtgac ggggctccac tgtgtcgggg acacctaccc cagcaacgac 120
cggtgctgcc acgagtgcag gccaggcaac gggatggtga gccgctgcag ccgctcccag 180
aacacggtgt gccgtccgtg cgggccgggc ttctacaacg acgtggtcag ctccaagccg 240
tgcaagccct gcacgtggtg taacctcaga agtgggagtg agcggaagca gctgtgcacg 300
gccacacagg acacagtctg ccgctgccgg gcgggcaccc agcccctgga cagctacaag 360
cctggagttg actgtgcccc ctgccctcca gggcacttct ccccaggcga caaccaggcc 420
tgcaagccct ggaccaactg caccttggct gggaagcaca ccctgcagcc ggccagcaat 480
agctcggacg caatctgtga ggacagggac cccccagcca cgcagcccca ggagacccag 540
ggcccccccgg ccaggcccat cactgtccag cccactgaag cctggcccag aacctcacag 600
ggaccctcca cccggcccgt ggaggtcccc gggggccgtg cggttgccgc catcctgggc 660
ctgggcctgg tgctggggct gctgggcccc ctggccatcc tgctggccct gtacctgctc 720
cggagggacc agaggctgcc ccccgatgcc cacaagcccc ctgggggagg cagtttccgg 780
acccccatcc aagaggagca ggccgacgcc cactccaccc tggccaagat c 831

<210> 157
<211> 549
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> OX-40L/CD252/TNFSF4, isoform 1

<400> 157
atggaaaggg tccaacccct ggaagagaat gtgggaaatg cagccaggcc aagattcgag 60
aggaacaagc tattgctggt ggcctctgta attcagggac tggggctgct cctgtgcttc 120
acctacatct gcctgcactt ctctgctctt caggtatcac atcggtatcc tcgaattcaa 180
agtatcaaag tacaatttac cgaatataag aaggagaaag gtttcatcct cacttcccaa 240
aaggaggatg aaatcatgaa ggtgcagaac aactcagtca tcatcaactg tgatgggttt 300
tatctcatct ccctgaaggg ctacttctcc caggaagtca acattagcct tcattaccag 360
aaggatgagg agcccctctt ccaactgaag aaggtcaggt ctgtcaactc cttgatggtg 420
gcctctctga cttacaaaga caaagtctac ttgaatgtga ccactgacaa tacctccctg 480
gatgacttcc atgtgaatgg cggagaactg attcttatcc atcaaaatcc tggtgaattc 540

tgtgtcctt 549

<210> 158
<211> 1950
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ILT-2/LILRB1, isoform 1

<400> 158
atgaccccca tcctcacggt cctgatctgt ctcgggctga gtctgggccc ccggacccac 60
gtgcaggcag ggcacctccc caagcccacc ctctgggctg aaccaggctc tgtgatcacc 120
caggggagtc ctgtgaccct caggtgtcag gggggccagg agacccagga gtaccgtcta 180
tatagagaaa agaaaacagc accctggatt acacggatcc cacaggagct tgtgaagaag 240
ggccagttcc ccatcccatc catcacctgg gaacacacag ggcggtatcg ctgttactat 300
ggtagcgaca ctgcaggccg ctcagagagc agtgaccccc tggagctggt ggtgacagga 360
gcctacatca aacccaccct ctcagcccag cccagccccg tggtgaactc aggagggaat 420
gtaaccctcc agtgtgactc acaggtggca tttgatggct tcattctgtg taaggaagga 480
gaagatgaac acccacaatg cctgaactcc cagccccatg cccgtgggtc gtcccgcgcc 540
atcttctccg tgggccccgt gagcccgagt cgcaggtggt ggtacaggtg ctatgcttat 600
gactcgaact ctccctatga gtggtctcta cccagtgatc tcctggagct cctggtccta 660
ggtgtttcta agaagccatc actctcagtg cagccaggtc ctatcgtggc ccctgaggag 720
accctgactc tgcagtgtgg ctctgatgct ggctacaaca gatttgttct gtataaggac 780
ggggaacgtg acttccttca gctcgctggc gcacagcccc aggctgggct ctcccaggcc 840
aacttcaccc tgggccctgt gagccgctcc tacgggggcc agtacagatg ctacggtgca 900
cacaacctct cctccgagtg gtcggccccc agcgaccccc tggacatcct gatcgcagga 960
cagttctatg acagagtctc cctctcggtg cagccgggcc ccacggtggc ctcaggagag 1020
aacgtgaccc tgctgtgtca gtcacaggga tggatgcaaa ctttccttct gaccaaggag 1080
ggggcagctg atgacccatg gcgtctaaga tcaacgtacc aatctcaaaa ataccaggct 1140
gaattcccca tgggtcctgt gacctcagcc catgcgggga cctacaggtg ctacggctca 1200
cagagctcca aaccctacct gctgactcac cccagtgacc ccctggagct cgtggtctca 1260
ggaccgtctg ggggccccag ctccccgaca acaggcccca cctccacatc tggccctgag 1320
gaccagcccc tcacccccac cgggtcggat ccccagagtg gtctgggaag gcacctgggg 1380
gttgtgatcg gcatcttggt ggccgtcatc ctactgctcc tcctcctcct cctcctcttc 1440
ctcatcctcc gacatcgacg tcagggcaaa cactggacat cgacccagag aaaggctgat 1500
ttccaacatc ctgcaggggc tgtggggcca gagcccacag acagaggcct gcagtggagg 1560
tccagcccag ctgccgatgc ccaggaagaa aacctctatg ctgccgtgaa gcacacacag 1620
cctgaggatg gggtggagat ggacactcgg agcccacacg atgaagaccc ccaggcagtg 1680
acgtatgccg aggtgaaaca ctccagacct aggagagaaa tggcctctcc tccttcccca 1740
ctgtctgggg aattcctgga cacaaaggac agacaggcgg aagaggacag gcagatggac 1800
actgaggctg ctgcatctga agccccccag gatgtgacct acgcccagct gcacagcttg 1860
accctcagac gggaggcaac tgagcctcct ccatcccagg aagggccctc tccagctgtg 1920
cccagcatct acgccactct ggccatccac 1950

<210> 159
<211> 1794
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ILT-4/LILRB2, isoform 1

<400> 159
atgaccccca tcgtcacagt cctgatctgt ctcgggctga gtctgggccc caggacccgc 60
gtgcagacag ggaccatccc caagcccacc ctgtgggctg agccagactc tgtgatcacc 120
caggggagtc ccgtcaccct cagttgtcag gggagccttg aagcccagga gtaccgtcta 180
tatagggaga aaaaatcagc atcttggatt acacggatac gaccagagct tgtgaagaac 240
ggccagttcc acatcccatc catcacctgg gaacacacag ggcgatatgg ctgtcagtat 300
tacagccgcg ctcggtggtc tgagctcagt gacccccctgg tgctggtgat gacaggagcc 360
tacccaaaac ccaccctctc agcccagccc agccctgtgg tgacctcagg aggaagggtg 420

accctccagt gtgagtcaca ggtggcattt ggcggcttca ttctgtgtaa ggaaggagaa 480
gatgaacacc cacaatgcct gaactcccag ccccatgccc gtgggtcgtc ccgcgccatc 540
ttctccgtgg gccccgtgag cccgaatcgc aggtggtcgc acaggtgcta tggttatgac 600
ttgaactctc cctatgtgtg gtcttcaccc agtgatctcc tggagctcct ggtcccaggt 660
gtttctaaga agccatcact ctcagtgcag ccgggtcctg tcatggcccc tggggaaagc 720
ctgaccctcc agtgtgtctc tgatgtcggc tatgacagat ttgttctgta caaggagggg 780
gaacgtgacc ttcgccagct ccctggccgg cagccccagg ctgggctctc ccaggccaac 840
ttcaccctgg gccctgtgag ccgctcctac gggggccagt acagatgcta cggtgcacac 900
aacctctcct ctgagtgctc ggcccccagc gacccccctgg acatcctgat cacaggacag 960
atccgtggca cacccttcat ctcagtgcag ccaggcccca cagtggcctc aggagagaac 1020
gtgaccctgc tgtgtcagtc atggcggcag ttccacactt tccttctgac caaggcggga 1080
gcagctgatg ccccactccg tctaagatca atacacgaat atcctaagta ccaggctgaa 1140
ttccccatga gtcctgtgac ctcagcccac gcggggacct acaggtgcta cggctcactc 1200
aactccgacc cctacctgct gtctcacccc agtgagcccc tggagctcgt ggtctcagga 1260
ccctccatgg gttccagccc cccacccacc ggtcccatct ccacacctgc aggccctgag 1320
gaccagcccc tcacccccac tgggtcggat ccccaaagtg gtctgggaag gcacctgggg 1380
gttgtgatcg gcatcttggt ggccgtcgtc ctactgctcc tcctcctcct cctcctcttc 1440
ctcatcctcc gacatcgacg tcagggcaaa cactggacat cgacccagag aaaggctgat 1500
ttccaacatc ctgcaggggc tgtggggcca gagcccacag acagaggcct gcagtggagg 1560
tccagcccag ctgccgacgc ccaggaagaa aacctctatg ctgccgtgaa ggacacacag 1620
cctgaagatg gggtggagat ggacactcgg gctgctgcat ctgaagcccc ccaggatgtg 1680
acctacgccc agctgcacag cttgaccctc agacggaagg caactgagcc tcctccatcc 1740
caggaaaggg aacctccagc tgagcccagc atctacgcca ccctggccat ccac 1794

<210> 160
<211> 717
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> BCL-2 isoform alpha

<400> 160
atggcgcacg ctgggagaac agggtacgat aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat 60
tataagctgt cgcagagggg ctacgagtgg gatgcgggag atgtgggcgc cgcgcccccg 120
ggggccgccc ccgcaccggg catcttctcc tcccagcccg ggcacacgcc ccatccagcc 180
gcatcccggg acccggtcgc caggacctcg ccgctgcaga ccccggctgc ccccggcgcc 240
gccgcggggc ctgcgctcag cccggtgcca cctgtggtcc acctgaccct ccgccaggcc 300
ggcgacgact tctcccgccg ctaccgccgc gacttcgccg agatgtccag ccagctgcac 360
ctgacgccct tcaccgcgcg gggacgcttt gccacggtgg tggaggagct cttcagggac 420
ggggtgaact gggggaggat tgtggccttc tttgagttcg gtggggtcat gtgtgtggag 480
agcgtcaacc gggagatgtc gcccctggtg gacaacatcg ccctgtggat gactgagtac 540
ctgaaccggc acctgcacac ctggatccag gataacggag gctgggatgc ctttgtggaa 600
ctgtacggcc ccagcatgcg gcctctgttt gatttctcct ggctgtctct gaagactctg 660
ctcagtttgg ccctggtggg agcttgcatc accctgggtg cctatctggg ccacaag 717

<210> 161
<211> 4050
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> MDR1/ABCB1, isoform 1

<400> 161
atgagtgtca acttgcaagg ggaccagaga ggtgcaacgg aagccagaac attcctcctg 60
gaaattcaac ctgtttcgca gtttctcgag gaatcagcat tcagtcaatc cgggccggga 120
gcagtcatct gtggtctttc cactaaagtc ggagtatctt cttccaaaat ttcacgtctt 180
ggtggccgtt ccaaggagcg cgaggtcgga atggatcttg aaggggaccg caatggagga 240
gcaaagaaga agaacttttt taaactgaac aataaaagtg aaaaagataa gaaggaaaag 300
aaaccaactg tcagtgtatt ttcaatgttt cgctattcaa attggcttga caagttgtat 360

atggtggtgg gaactttggc tgccatcatc catggggctg gacttcctct catgatgctg 420
gtgtttggag aaatgacaga tatctttgca aatgcaggaa atttagaaga tctgatgtca 480
aacatcacta atagaagtga tatcaatgat acagggttct tcatgaatct ggaggaagac 540
atgaccaggt atgcctatta ttacagtgga attggtgctg gggtgctggt tgctgcttac 600
attcaggttt cattttggtg cctggcagct ggaagacaaa tacacaaaat tagaaaacag 660
ttttttcatg ctataatgcg acaggagata ggctggtttg atgtgcacga tgttggggag 720
cttaacaccc gacttacaga tgatgtctcc aagattaatg aaggaattgg tgacaaaatt 780
ggaatgttct ttcagtcaat ggcaacattt ttcactgggt ttatagtagg atttacacgt 840
ggttggaagc taacccttgt gattttggcc atcagtcctg ttcttggact gtcagctgct 900
gtctgggcaa agatactatc ttcatttact gataaagaac tcttagcgta tgcaaaagct 960
ggagcagtag ctgaagaggt cttggcagca attagaactg tgattgcatt tggaggacaa 1020
aagaaagaac ttgaaaggta caacaaaaat ttagaagaag ctaaaagaat tgggataaag 1080
aaagctatta cagccaatat ttctataggt gctgctttcc tgctgatcta tgcatcttat 1140
gctctggcct tctggtatgg gaccaccttg gtcctctcag gggaatattc tattggacaa 1200
gtactcactg tattcttttc tgtattaatt ggggctttta gtgttggaca ggcatctcca 1260
agcattgaag catttgcaaa tgcaagagga gcagcttatg aaatcttcaa gataattgat 1320
aataagccaa gtattgacag ctattcgaag agtgggcaca aaccagataa tattaaggga 1380
aatttggaat tcagaaatgt tcacttcagt tacccatctc gaaaagaagt taagatcttg 1440
aagggtctga acctgaaggt gcagagtggg cagacggtgg ccctggttgg aaacagtggc 1500
tgtgggaaga gcacaacagt ccagctgatg cagaggctct atgaccccac agaggggatg 1560
gtcagtgttg atggacagga tattaggacc ataaatgtaa ggtttctacg ggaaatcatt 1620
ggtgtggtga gtcaggaacc tgtattgttt gccaccacga tagctgaaaa cattcgctat 1680
ggccgtgaaa atgtcaccat ggatgagatt gagaaagctg tcaaggaagc caatgcctat 1740
gactttatca tgaaactgcc tcataaattt gacaccctgg ttggagagag aggggcccag 1800
ttgagtggtg ggcagaagca gaggatcgcc attgcacgtg ccctggttcg caaccccaag 1860
atcctcctgc tggatgaggc cacgtcagcc ttggacacag aaagcgaagc agtggttcag 1920
gtggctctgg ataaggccag aaaaggtcgg accaccattg tgatagctca tcgtttgtct 1980
acagttcgta atgctgacgt catcgctggt ttcgatgatg gagtcattgt ggagaaagga 2040
aatcatgatg aactcatgaa agagaaaggc atttacttca aacttgtcac aatgcagaca 2100
gcaggaaatg aagttgaatt agaaaatgca gctgatgaat ccaaaagtga aattgatgcc 2160
ttggaaatgt cttcaaatga ttcaagatcc agtctaataa gaaaaagatc aactcgtagg 2220
agtgtccgtg gatcacaagc ccaagacaga aagcttagta ccaaagaggc tctggatgaa 2280
agtatacctc cagtttcctt ttggaggatt atgaagctaa atttaactga atggccttat 2340
tttgttgttg gtgtattttg tgccattata aatggaggcc tgcaaccagc atttgcaata 2400
atattttcaa agattatagg ggtttttaca agaattgatg atcctgaaac aaaacgacag 2460
aatagtaact tgttttcact attgtttcta gcccttggaa ttatttcttt tattacattt 2520
ttccttcagg gtttcacatt tggcaaagct ggagagatcc tcaccaagcg gctccgatac 2580
atggttttcc gatccatgct cagacaggat gtgagttggt ttgatgaccc taaaaacacc 2640
actggagcat tgactaccag gctcgccaat gatgctgctc aagttaaagg ggctataggt 2700
tccaggcttg ctgtaattac ccagaatata gcaaatcttg ggacaggaat aattatatcc 2760
ttcatctatg gttggcaact aacactgtta ctcttagcaa ttgtacccat cattgcaata 2820
gcaggagttg ttgaaatgaa aatgttgtct ggacaagcac tgaaagataa gaaagaacta 2880
gaaggttctg ggaagatcgc tactgaagca atagaaaact tccgaaccgt tgtttctttg 2940
actcaggagc agaagtttga acatatgtat gctcagagtt tgcaggtacc atacagaaac 3000
tctttgagga aagcacacat ctttggaatt acattttcct tcacccaggc aatgatgtat 3060
ttttcctatg ctggatgttt ccggtttgga gcctacttgg tggcacataa actcatgagc 3120
tttgaggatg ttctgttagt attttcagct gttgtctttg gtgccatggc cgtggggcaa 3180
gtcagttcat ttgctcctga ctatgccaaa gccaaaatat cagcagccca catcatcatg 3240
atcattgaaa aaaccccttt gattgacagc tacagcacgg aaggcctaat gccgaacaca 3300
ttggaaggaa atgtcacatt tggtgaagtt gtattcaact atcccacccg accggacatc 3360
ccagtgcttc agggactgag cctggaggtg aagaagggcc agacgctggc tctggtgggc 3420
agcagtggct gtgggaagag cacagtggtc cagctcctgg agcggttcta cgaccccttg 3480
gcagggaaag tgctgcttga tggcaaagaa ataaagcgac tgaatgttca gtggctccga 3540
gcacacctgg gcatcgtgtc ccaggagccc atcctgtttg actgcagcat tgctgagaac 3600
attgcctatg gagacaacag ccgggtggtg tcacaggaag agattgtgag ggcagcaaag 3660
gaggccaaca tacatgcctt catcgagtca ctgcctaata aatatagcac taaagtagga 3720
gacaaaggaa ctcagctctc tggtggccag aaacaacgca ttgccatagc tcgtgccctt 3780
gttagacagc ctcatatttt gcttttggat gaagccacgt cagctctgga tacagaaagt 3840
gaaaaggttg tccaagaagc cctggacaaa gccagagaag gccgcacctg cattgtgatt 3900
gctcaccgcc tgtccaccat ccagaatgca gacttaatag tggtgtttca gaatggcaga 3960
gtcaaggagc atggcacgca tcagcagctg ctggcacaga aaggcatcta tttttcaatg 4020

gtcagtgtcc aggctggaac aaagcgccag 4050

<210> 162
<211> 990
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Arginase1, isoform 1

<400> 162
atgagcgcca agtccagaac catagggatt attggagctc ctttctcaaa gggacagcca 60
cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt 120
aaagaacaag taactcaaaa ctttttaatt ttagagtgtg atgtgaagga ttatggggac 180
ctgccctttg ctgacatccc taatgacagt ccctttcaaa ttgtgaagaa tccaaggtct 240
gtgggaaaag caagcgagca gctggctggc aaggtggcag aagtcaagaa gaacggaaga 300
atcagcctgg tgctgggcgg agaccacagt ttggcaattg gaagcatctc tggccatgcc 360
agggtccacc ctgatcttgg agtcatctgg gtggatgctc acactgatat caacactcca 420
ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga caacctgtat ctttcctcct gaaggaacta 480
aaaggaaaga ttcccgatgt gccaggattc tcctgggtga ctccctgtat atctgccaag 540
gatattgtgt atattggctt gagagacgtg gaccctgggg aacactacat tttgaaaact 600
ctaggcatta aatacttttc aatgactgaa gtggacagac taggaattgg caaggtgatg 660
gaagaaacac tcagctatct actaggaaga aagaaaaggc caattcatct aagttttgat 720
gttgacggac tggacccatc tttcacacca gctactggca caccagtcgt gggaggtctg 780
acatacagag aaggtctcta catcacagaa gaaatctaca aaacagggct actctcagga 840
ttagatataa tggaagtgaa cccatccctg gggaagacac cagaagaagt aactcgaaca 900
gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct tgtttcggac ttgctcggga gggtaatcac 960
aagcctattg actaccttaa cccacctaag 990

<210> 163
<211> 3459
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> nitric oxide synthase, inducible (iNOS/NOS2),
isoform 1

<400> 163
atggcctgtc cttggaaatt tctgttcaag accaaattcc accagtatgc aatgaatggg 60
gaaaaagaca tcaacaacaa tgtggagaaa gccccctgtg ccacctccag tccagtgaca 120
caggatgacc ttcagtatca caacctcagc aagcagcaga atgagtcccc gcagcccctc 180
gtggagacgg gaaagaagtc tccagaatct ctggtcaagc tggatgcaac cccattgtcc 240
tccccacggc atgtgaggat caaaaactgg ggcagcggga tgactttcca agacacactt 300
caccataagg ccaaagggat tttaacttgc aggtccaaat cttgcctggg gtccattatg 360
actcccaaaa gtttgaccag aggacccagg gacaagccta cccctccaga tgagcttcta 420
cctcaagcta tcgaatttgt caaccaatat tacggctcct tcaaagaggc aaaaatagag 480
gaacatctgg ccagggtgga agcggtaaca aaggagatag aaacaacagg aacctaccaa 540
ctgacgggag atgagctcat cttcgccacc aagcaggcct ggcgcaatgc cccacgctgc 600
attgggagga tccagtggtc caacctgcag gtcttcgatg cccgcagctg ttccactgcc 660
cgggaaatgt ttgaacacat ctgcagacac gtgcgttact ccaccaacaa tggcaacatc 720
aggtcggcca tcaccgtgtt cccccagcgg agtgatggca agcacgactt ccgggtgtgg 780
aatgctcagc tcatccgcta tgctggctac cagatgccag atggcagcat cagaggggac 840
cctgccaacg tggaattcac tcagctgtgc atcgacctgg gctggaagcc caagtacggc 900
cgcttcgatg tggtcccccc ggtcctgcag gccaatggcc gtgaccctga gctcttcgaa 960
atcccacctg accttgtgct tgaggtggcc atggaacatc ccaaatacga gtggtttcgg 1020
gaactggagc taaagtggta cgccctgcct gcagtggcca acatgctgct tgaggtgggc 1080
ggcctggagt tcccagggtg ccccttcaat ggctggtaca tgggcacaga gatcggagtc 1140
cgggacttct gtgacgtcca gcgctacaac atcctggagg aagtgggcag gagaatgggc 1200
ctggaaacgc acaagctggc ctcgctctgg aaagaccagg ctgtcgttga gatcaacatt 1260
gctgtgctcc atagtttcca gaagcagaat gtgaccatca tggaccacca ctcggctgca 1320

gaatccttca tgaagtacat gcagaatgaa taccggtccc gtgggggctg cccggcagac 1380
tggatttggc tggtccctcc catgtctggg agcatcaccc ccgtgtttca ccaggagatg 1440
ctgaactacg tcctgtcccc tttctactac tatcaggtag aggcctggaa aacccatgtc 1500
tggcaggacg agaagcggag acccaagaga agagagattc cattgaaagt cttggtcaaa 1560
gctgtgctct ttgcctgtat gctgatgcgc aagacaatgg cgtcccgagt cagagtcacc 1620
atcctctttg cgacagagac aggaaaatca gaggcgctgg cctgggacct gggggcctta 1680
ttcagctgtg ccttcaaccc caaggttgtc tgcatggata agtacaggct gagctgcctg 1740
gaggaggaac ggctgctgtt ggtggtgacc agtacgtttg gcaatggaga ctgccctggc 1800
aatggagaga aactgaagaa atcgctcttc atgctgaaag agctcaacaa caaattcagg 1860
tacgctgtgt ttggcctcgg ctccagcatg taccctcggt tctgcgcctt tgctcatgac 1920
attgatcaga agctgtccca cctgggggcc tctcagctca ccccgatggg agaaggggat 1980
gagctcagtg ggcaggagga cgccttccgc agctgggccg tgcaaacctt caaggcagcc 2040
tgtgagacgt ttgatgtccg aggcaaacag cacattcaga tccccaagct ctacacctcc 2100
aatgtgacct gggacccgca ccactacagg ctcgtgcagg actcacagcc tttggacctc 2160
agcaaagccc tcagcagcat gcatgccaag aacgtgttca ccatgaggct caaatctcgg 2220
cagaatctac aaagtccgac atccagccgt gccaccatcc tggtggaact ctcctgtgag 2280
gatggccaag gcctgaacta cctgccgggg gagcaccttg gggtttgccc aggcaaccag 2340
ccggccctgg tccaaggtat cctggagcga gtggtggatg gccccacacc ccaccagaca 2400
gtgcgcctgg aggccctgga tgagagtggc agctactggg tcagtgacaa gaggctgccc 2460
ccctgctcac tcagccaggc cctcacctac ttcctggaca tcaccacacc cccaacccag 2520
ctgctgctcc aaaagctggc ccaggtggcc acagaagagc ctgagagaca gaggctggag 2580
gccctgtgcc agccctcaga gtacagcaag tggaagttca ccaacagccc cacattcctg 2640
gaggtgctag aggagttccc gtccctgcgg gtgtctgctg gcttcctgct ttcccagctc 2700
cccattctga agcccaggtt ctactccatc agctcctccc gggatcacac gcccacagag 2760
atccacctga ctgtggccgt ggtcacctac cacacccgag atggccaggg tcccctgcac 2820
cacggcgtct gcagcacatg gctcaacagc ctgaagcccc aagacccagt gccctgcttt 2880
gtgcggaatg ccagcggctt ccacctcccc gaggatccct cccatccttg catcctcatc 2940
gggcctggca caggcatcgc gcccttccgc agtttctggc agcaacggct ccatgactcc 3000
cagcacaagg gagtgcgggg aggccgcatg accttggtgt ttgggtgccg ccgcccagat 3060
gaggaccaca tctaccagga ggagatgctg gagatggccc agaaggggct gctgcatgcg 3120
gtgcacacag cctattcccg cctgcctggc aagcccaagg tctatgttca ggacatcctg 3180
cggcagcagc tggccagcga ggtgctccgt gtgctccaca aggagccagg ccacctctat 3240
gtttgcgggg atgtgcgcat ggcccgggac gtggcccaca ccctgaagca gctggtggct 3300
gccaagctga aattgaatga ggagcaggtc gaggactatt tctttcagct caagagccag 3360
aagcgctatc acgaagatat ctttggtgct gtatttcctt acgaggcgaa gaaggacagg 3420
gtggcggtgc agcccagcag cctggagatg tcagcgctc 3459

<210> 164
<211> 3765
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Her2

<400> 164
atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctcctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60
gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120
acccacctgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg 180
gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240
cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300
attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360
gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420
cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaaccccccag 480
ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540
ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600
ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660
gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt 720
gctgccggct gcacgggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780
agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840
tccatgccca atcccgaggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc 900

tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg tctgccccct gcacaaccaa 960
gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020
gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat 1080
atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140
tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200
gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260
gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320
tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380
ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg 1440
ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500
gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560
tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620
gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt 1680
ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740
gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 1800
cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860
ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920
ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtggttggc 1980
attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040
aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg 2100
acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg 2160
aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220
cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc 2280
cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca 2340
tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt 2400
atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag 2460
gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg 2520
ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa 2580
attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat 2640
gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc 2700
caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760
aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg 2820
ctgccccagc cccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa atgttggatg 2880
attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc 2940
agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc cagtcccttg 3000
gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060
gaggagtatc tggtacccca gcagggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg 3120
ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca 3180
ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc cactggcacc ctccgaaggg 3240
gctggctccg atgtatttga tggtgacctg ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc 3300
ctccccacac atgaccccag ccctctacag cggtacagtg aggaccccac agtaccctg 3360
ccctctgaga ctgatggcta cgttgccccc ctgacctgca gcccccagcc tgaatatgtg 3420
aaccagccag atgttcggcc ccagcccccct tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc 3480
cgacctgctg gtgccactct ggaaaggccc aagactctct ccccagggaa gaatggggtc 3540
gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacaccccag 3600
ggaggagctg cccctcagcc ccaccctcct cctgccttca gcccagcctt cgacaacctc 3660
tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca 3720
cctacggcag agaacccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtg 3765

<210> 165
<211> 567
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> KRAS

<400> 165
atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctggtggcg taggcaagag tgccttgacg 60
atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgatc caacaataga ggattcctac 120
aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt 180

caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt 240
gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt 300
aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg 360
ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaattcct 420
tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag agagtggagg atgcttttta tacattggtg 480
agggagatcc gacaatacag attgaaaaaa atcagcaaag aagaaaagac tcctggctgt 540
gtgaaaatta aaaaatgcat tataatg 567

<210> 166
<211> 1809
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PLK1

<400> 166
atgagtgctg cagtgactgc agggaagctg gcacgggcac cggccgaccc tgggaaagcc 60
ggggtccccg gagttgcagc tcccggagct ccggcggcgg ctccaccggc gaaagagatc 120
ccggaggtcc tagtggaccc acgcagccgg cggcgctatg tgcggggccg ctttttgggc 180
aagggcggct ttgccaagtg cttcgagatc tcggacgcgg acaccaagga ggtgttcgcg 240
ggcaagattg tgcctaagtc tctgctgctc aagccgcacc agagggagaa gatgtccatg 300
gaaatatcca ttcaccgcag cctcgcccac cagcacgtcg taggattcca cggcttttc 360
gaggacaacg acttcgtgtt cgtggtgttg gagctctgcc gccggaggtc tctcctggag 420
ctgcacaaga ggaggaaagc cctgactgag cctgaggccc gatactacct acggcaaatt 480
gtgcttggct gccagtacct gcaccgaaac cgagttattc atcgagacct caagctgggc 540
aacctttcc tgaatgaaga tctggaggtg aaaatagggg attttggact ggcaaccaaa 600
gtcgaatatg acggggagag gaagaagacc ctgtgtggga ctcctaatta catagctccc 660
gaggtgctga gcaagaaagg gcacagtttc gaggtggatg tgtggtccat tgggtgtatc 720
atgtatacct tgttagtggg caaaccacct tttgagactt cttgcctaaa agagacctac 780
ctccggatca agaagaatga atacagtatt cccaagcaca tcaaccccgt ggccgcctcc 840
ctcatccaga agatgcttca gacagatccc actgcccgcc caaccattaa cgagctgctt 900
aatgacgagt tctttacttc tggctatatc cctgcccgtc tccccatcac ctgcctgacc 960
attccaccaa ggttttcgat tgctcccagc agcctggacc ccagcaaccg gaagcccctc 1020
acagtcctca ataaaggctt ggagaacccc ctgcctgagc gtccccggga aaaagaagaa 1080
ccagtggttc gagagacagg tgaggtggtc gactgccacc tcagtgacat gctgcagcag 1140
ctgcacagtg tcaatgcctc caagccctcg gagcgtgggc tggtcaggca agaggaggct 1200
gaggatcctg cctgcatccc catcttctgg gtcagcaagt gggtggacta ttcggacaag 1260
tacggccttg ggtatcagct ctgtgataac agcgtggggg tgctcttcaa tgactcaaca 1320
cgcctcatcc tctacaatga tggtgacagc ctgcagtaca tagagcgtga cggcactgag 1380
tcctacctca ccgtgagttc ccatcccaac tccttgatga agaagatcac cctccttaaa 1440
tatttccgca attacatgag cgagcacttg ctgaaggcag gtgccaacat cacgccgcgc 1500
gaaggtgatg agctcgcccg gctgccctac ctacggacct ggttccgcac ccgcagcgcc 1560
atcatcctgc acctcagcaa cggcagcgtg cagatcaact tcttccagga tcacaccaag 1620
ctcatcttgt gcccactgat ggcagccgtg acctacatcg acgagaagcg ggacttccgc 1680
acataccgcc tgagtctcct ggaggagtac ggctgctgca aggagctggc cagccggctc 1740
cgctacgccc gcactatggt ggacaagctg ctgagctcac gctcggccag caaccgtctc 1800
aaggcctcc 1809

<210> 167
<211> 876
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> dapA, strain LT2

<400> 167
atgttcacgg gaagtattgt cgcgcttgtt acgccgatgg atgagaaagg taacgtcagt 60
aggtcttgcc tgaaaaaact cattgattat catgtcgcca acggtacctc ggcgattgtt 120
tcggttggca ctaccggcga gtctgccacg ctaagccatg atgaacatgg cgatgtcgtg 180

atgatgacgc tggaactggc tgacggacgt attccggtta tcgccggcac gggcgcaaac 240
gcgaccgcgg aagcgattag cctgacgcag cgttttaacg atagcggtat tgtaggctgc 300
ctgacggtaa cgccgtacta caatcgcccc acgcaggaag gtttgttcca gcatttcaaa 360
gccatcgcgg aacacactga cttgccgcaa attctgtata atgtgccgtc ccgtaccggt 420
tgcgatatgt tgccggaaac cgtgggtcgt ctggcggaaa taaaaaatat tatcgctatc 480
aaagaggcga cagggaactt aacccgcgtt caccagatca aagagctggt ttcagacgat 540
tttattctgc ttagcggcga tgacgcgtct gcgctggact ttatgcaact gggtggtcat 600
ggcgtgattt ccgttacggc taacgtagcg gcgcgcgaga tggctgacat gtgcaaactg 660
gcggcggaag ggcaatttgc cgaggcgcgc gctatcaacc agcgtctgat gccgttacac 720
aacaaactat ttgtcgaacc caatcctatc ccggtgaaat gggcatgtaa ggcattgggt 780
cttgtggcga ccgacacgct gcgcctgcca atgacgccta tcacggacca tggtcgtgac 840
atcgtcaaag cagcgcttca gcatgctggc ctgctg 876

<210> 168
<211> 819
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> dapB, strain LT2

<400> 168
atgcatgaag cacaaatccg cgtcgccatt gccggcgccg gtggccgcat gggacggcag 60
ttaatccagg ccgccatggc gatggaaggt gttcagctgg gtgccgcgct ggagcgcgaa 120
ggctcttcct tgctgggcag cgatgctggc gaactggcag gggcgggaaa gtccggcgtg 180
atcgttcaaa gcagccttga ggcggtaaaa gatgattttg acgttttcat cgattttacc 240
cgtccggaag gcacgttgac gcatctggcg ttttgccgcc agcatggtaa agggatggtg 300
attggtacta ccggctttga cgacgccggt aaacaagcca ttcgcgaggc gtcacaagag 360
attgcgatcg ttttcgccgc aaactttagc gtcggcgtta acgtcatgct caagctgctg 420
gagaaagccg cgaaggtaat gggcgactat agcgatattg aaattattga agcgcaccac 480
cgccataaag tggatgcacc gtcgggtacg gcgctggcaa tgggcgaggc aatcgccggg 540
gcgctggata aaaatctgaa ggactgcgcg gtctactcgc gtgaaggtta taccggcgag 600
cgcgtagcgg gcacgattgg ctttgcgacc gttcgggcgg gcgacatcgt cggcgaacat 660
accgcgatgt ttgccgatat tggcgagcgc gtagagatta cgcataaagc ttccagccgc 720
atgacgtttg caaatggcgc gttgcgatcg gcgttatggc taaaaacgaa gaaaaatggg 780
ctatttgaca tgcgggatgt gctggggctg gatgtatta 819

<210> 169
<211> 876
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> dapA

<400> 169
atgttcacgg gaagtattgt cgcgattgtt actccgatgg atgaaaaagg taatgtctgt 60
cgggctagct tgaaaaaact gattgattat catgtcgcca gcggtacttc ggcgatcgtt 120
tctgttggca ccactggcga gtccgctacc ttaaatcatg acgaacatgc tgatgtggtg 180
atgatgacgc tggatctggc tgatgggcgc attccggtaa ttgccgggac cggcgctaac 240
gctactgcgg aagccattag cctgacgcag cgcttcaatg acagtggtat cgtcggctgc 300
ctgacggtaa ccccttacta caatcgtccg tcgcaagaag gtttgtatca gcatttcaaa 360
gccatcgctg agcatactga cctgccgcaa attctgtata atgtgccgtc ccgtactggc 420
tgcgatctgc tcccggaaac ggtgggccgt ctggcgaaag taaaaaatat tatcggaatc 480
aaagaggcaa cagggaactt aacgcgtgta aaccagatca aagagctggt ttcagatgat 540
tttgttctgc tgagcggcga tgatgcgagc gcgctggact tcatgcaatt gggcggtcat 600
ggggttattt ccgttacgac taacgtcgca gcgcgtgata tggcccagat gtgcaaactg 660
gcagcagaag aacattttgc cgaggcacgc gttattaatc agcgtctgat gccattacac 720
aacaaactat ttgtcgaacc caatccaatc ccggtgaaat gggcatgtaa ggaactgggt 780

cttgtggcga ccgatacgct gcgcctgcca atgacaccaa tcaccgacag tggtcgtgag 840
acggtcagag cggcgcttaa gcatgccggt ttgctg 876

<210> 170
<211> 819
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> dapB

<400> 170
atgcatgatg caaacatccg cgttgccatc gcgggagccg gggggcgtat gggccgccag 60
ttgattcagg cggcgctggc attagagggc gtgcagttgg gcgctgcgct ggagcgtgaa 120
ggatcttctt tactgggcag cgacgccggt gagctggccg gagccgggaa aacaggcgtt 180
accgtgcaaa gcagcctcga tgcggtaaaa gatgattttg atgtgtttat cgattttacc 240
cgtccggaag gtacgctgaa ccatctcgct ttttgtcgcc agcatggcaa agggatggtg 300
atcggcacta cggggtttga cgaagccggt aaacaagcaa ttcgtgacgc cgctgccgat 360
attgcgattg tctttgcggc caattttagc gttggcgtta acgtcatgct taagctgctg 420
gagaaagcag ccaaagtgat gggtgactac accgatatcg aaattattga agcacatcat 480
agacataaag ttgatgcgcc gtcaggcacc gcactggcaa tgggagaggc gatcgcccac 540
gcccttgata aagatctgaa agattgcgcg gtctacagtc gtgaaggcca caccggtgaa 600
cgtgtgcctg gcaccattgg ttttgccacc gtgcgtgcag gtgacatcgt tggtgaacat 660
accgcgatgt ttgccgatat tggcgagcgt ctggagatca cccataaggc gtccagccgt 720
atgacatttg ctaacggcgc ggtaagatcg gctttgtggt tgagtggtaa ggaaagcggt 780
ctttttgata tgcgagatgt acttgatctc aataatttg 819

<210> 171
<211> 1218
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> dapC

<400> 171
atggcaattg aacaaacagc aattacacgc gcgactttcg atgaagtgat cctgccgatt 60
tatgctccgg cagagtttat tccggtaaaa ggtcagggca gccgaatctg ggatcagcaa 120
ggcaaggagt atgtcgattt cgcgggtggc attgcagtta cggcgttggg ccattgccat 180
cctgcgctgg tgaacgcgtt aaaaacccag ggcgaaactc tgtggcatat cagtaacgtt 240
ttcaccaatg aaccggcgct gcgtcttggg cgtaaactga ttgaggcaac gtttgccgaa 300
cgcgtggtgt ttatgaactc cggcacggaa gctaacgaaa ccgcctttaa actggcacgc 360
cattacgcct gtgtgcgtca tagcccgttc aaaaccaaaa ttattgcctt ccataacgct 420
tttcatggtc gctcgctgtt taccgtttcg gtgggtgggc agccaaaata ttccgacggc 480
tttgggccga aaccggcaga catcatccac gttcccttta acgatctcca tgcagtgaaa 540
gcggtgatgg atgatcacac ctgtgcggtg gtggttgagc cgatccaggg cgagggcggt 600
gtgacggcag cgacgccaga gtttttgcag ggcttgcgcg agctgtgcga tcaacatcag 660
gcattattgg tgtttgatga agtgcagtgc gggatggggc ggaccggcga tttgtttgct 720
tacatgcact acgcgttagc gccggatatt ctgacctctg cgaaagcgtt aggcggcggc 780
ttcccgatta gcgccatgct gaccacggcg gaaattgctt ctgcgtttca tcctggttct 840
cacggttcca cctacggcgg taatcctctg gcctgtgcag tagcgggggc ggcgtttgat 900
atcatcaata cccctgaagt gctggaaggc attcaggcga aacgccagcg ttttgttgac 960
catctgcaga agatcgatca gcagtacgat gtatttagcg atattcgcgg tatggggctg 1020
ttgattggcg cagagctgaa accacagtac aaaggtcggg cgcgtgattt cctgtatgcg 1080
ggcgcagagg ctggcgtaat ggtgctgaat gccggaccgg atgtgatgcg ttttgcaccg 1140
tcgctggtgg tggaagatgc ggatatcgat gaagggatgc aacgtttcgc ccacgcggtg 1200
gcgaaggtgg ttggggcg 1218

<210> 172
<211> 822
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> dapD

<400> 172
atgcagcagt tacagaacat tattgaaacc gcttttgaac gccgtgccga gatcacgcca 60
gccaatgcag acaccgttac ccgcgaagcg gataatcagg tgatcgccct gctggattcc 120
ggcgcactgc gtgtagcgga aaaaattgac ggtcagtggg tgacgcatca gtggttgaaa 180
aaagcggtgc tgctctcttt ccgtattaat gataatcagg tgatcgaagg ggcagaaagc 240
cgctacttcg acaaagtgcc gatgaaattc gccgactacg acgaagcacg tttccagaaa 300
gaaggcttcc gcgttgtgcc accagcggcg gtacgtcagg gtgcgtttat tgcccgtaac 360
accgtgctga tgccgtctta cgtcaacatc ggcgcatatg ttgatgaagg caccatggtt 420
gatacctggg cgaccgtcgg ttcttgtgcg cagattggta aaaacgttca cctttccggt 480
ggcgtgcgca tcggcggcgt gctggaaccg ctgcaggcta acccaaccat gattgaagat 540
aattgcttca tcggcgcgcg ctctgaactg gttgaagggg tgattgtcga agaaggttcc 600
gtcatttcca tgggcgtata cattggtcag agcacccgta tttacgaccg tgaaaccggc 660
gaaatccact acggtcgcgt tccggcgggg tctgtggttg tttcaggtaa tctgccgtca 720
aaagatggca aatacagcct ctactgtgcg gttatcgtta agaaagttga cgcgaaaact 780
cgcggcaaag tcggcattaa cgaactgctg cgtaccatcg ac 822

<210> 173
<211> 1125
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> dapE

<400> 173
atgtcgtgcc cggttattga gctgacacaa cagcttattc gccgcccttc cctgagtcct 60
gatgatgcag gatgccaggc tttgttgatt gaacgtttgc aggcgatcgg ttttaccgtt 120
gaacgcatgg actttgccga tacgcagaat ttttgggcat ggcgtgggca gggtgaaacg 180
ttagcctttg ccgggcatac cgacgtggtg ccgcctggcg acgccgatcg ttggatcaat 240
cccccgtttg aacccaccat tcgtgacggc atgttattcg ggcgcggtgc ggcagatatg 300
aaaggctcgc tggcggcgat ggtggtggcg gcagaacgtt ttgtcgcaca acatcccaac 360
catacggggc gactggcatt tctgatcacc tctgatgaag aagccagtgc ccacaacggt 420
acggtaaaag tcgtcgaagc gttaatggca cgtaatgagc gtctcgatta ctgcctggtt 480
ggcgaaccgt cgagtatcga agtggtaggt gatgtggtga aaaatggtcg tcgcggatca 540
ttaacctgca accttaccat tcatggcgtt caggggcatg ttgcctaccc acatctggct 600
gacaatccgg tacatcgcgc agcacctttc cttaatgaat tagtggctat tgagtgggat 660
cagggcaatg aattcttccc ggcgaccagt atgcagattg ccaatattca ggcgggaacg 720
ggcagtaaca acgttattcc gggtgaactg tttgtgcagt ttaacttccg cttcagcacc 780
gaactgactg atgagatgat caaagcgcag gtgcttgccc tgcttgaaaa acatcaactg 840
cgctatacgg tggattggtg gctttccggg cagccatttt tgaccgcgcg cggtaaactg 900
gtggatgcgg tcgttaacgc ggttgagcac tataatgaaa ttaaaccgca gctactgacc 960
acaggcggaa cgtccgacgg gcgctttatt gcccgcatgg gggcgcaggt ggtggaactc 1020
gggccggtca atgccactat tcataaaatt aatgaatgtg tgaacgctgc cgacctgcag 1080
ctacttgccc gtatgtatca acgtatcatg gaacagctcg tcgcc 1125

<210> 174
<211> 1179
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<223> p53

<400> 174
atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca 60
gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg 120
gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcactgaaga cccaggtcca 180
gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct ccccgcgtgg cccctgcacc agcagctcct 240
acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggcccctgt catcttctgt cccttcccag 300
aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag 360
tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt tttgccaact ggccaagacc 420
tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca cccccgcccg gcacccgcgt ccgcgccatg 480
gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccaccatgag 540
cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat 600
ttgcgtgtgg agtatttgga tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat 660
gagccgcctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt 720
tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcatcacact ggaagactcc 780
agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcatg tttgtgcctg tcctgggaga 840
gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc 900
ccagggagca ctaagcgagc actgtccaac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag 960
aaaccactgg atggagaata tttcaccctt cagatccgtg ggcgtgagcg cttcgagatg 1020
ttccgagagc tgaatgaggc cttggaactc aaggatgccc aggctgggaa ggagccaggg 1080
gggagcaggg ctcactccag ccacctgaag tccaaaaagg gtcagtctac ctcccgccat 1140
aaaaaactca tgttcaagac agaagggcct gactcagac 1179

<210> 175
<211> 1470
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ERBA

<400> 175
atggaacaga agccaagcaa ggtggagtgt gggtcagacc cagaggagaa cagtgccagg 60
tcaccagatg gaaagcgaaa aagaaagaac ggccaatgtt ccctgaaaac cagcatgtca 120
gggtatatcc ctagttacct ggacaaagac gagcagtgtg tcgtgtgtgg ggacaaggca 180
actggttatc actaccgctg tatcacttgt gagggctgca agggcttctt tcgccgcaca 240
atccagaaga acctccatcc cacctattcc tgcaaatatg acagctgctg tgtcattgac 300
aagatcaccc gcaatcagtg ccagctgtgc cgcttcaaga agtgcatcgc cgtgggcatg 360
gccatggact tggttctaga tgactcgaag cgggtggcca agcgtaagct gattgagcag 420
aaccgggagc ggcggcggaa ggaggagatg atccgatcac tgcagcagcg accagagccc 480
actcctgaag agtgggatct gatccacatt gccacagagg cccatcgcag caccaatgcc 540
cagggcagcc attggaaaca gaggcggaaa ttcctgcccg atgacattgg ccagtcaccc 600
attgtctcca tgccggacgg agacaaggtg gacctggaag ccttcagcga gtttaccaag 660
atcatcaccc cggccatcac ccgtgtggtg gactttgcca aaaaactgcc catgttctcc 720
gagctgcctt gcgaagacca gatcatcctc ctgaaggggt gctgcatgga gatcatgtcc 780
ctgcgggcgg ctgtccgcta cgaccctgag agcgacaccc tgacgctgag tggggagatg 840
gctgtcaagc gggagcagct caagaatggc ggcctgggcg tagtctccga cgccatcttt 900
gaactgggca agtcactctc tgcctttaac ctggatgaca cggaagtggc tctgctgcag 960
gctgtgctgc taatgtcaac agaccgctcg ggcctgctgt gtgtggacaa gatcgagaag 1020
agtcaggagg cgtacctgct ggcgttcgag cactacgtca accaccgcaa acacaacatt 1080
ccgcacttct ggcccaagct gctgatgaag gagagagaag tgcagagttc gattctgtac 1140
aaggggcag cggcagaagg ccggccgggc gggtcactgg gcgtccaccc ggaaggacag 1200
cagcttctcg gaatgcatgt tgttcagggt ccgcaggtcc ggcagcttga gcagcagctt 1260
ggtgaagcgg gaagtctcca agggccggtt cttcagcacc agagcccgaa gagcccgcag 1320
cagcgtctcc tggagctgct ccaccgaagc ggaattctcc atgcccgagc ggtctgtggg 1380
gaagacgaca gcagtgaggc ggactccccg agctcctctg aggaggaacc ggaggtctgc 1440
gaggacctgg caggcaatgc agcctctccc 1470

<210> 176
<211> 1317
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> myc

<400> 176
atgcccctca acgttagctt caccaacagg aactatgacc tcgactacga ctcggtgcag 60
ccgtatttct actgcgacga ggaggagaac ttctaccagc agcagcagca gagcgagctg 120
cagcccccgg cgcccagcga ggatatctgg aagaaattcg agctgctgcc caccccgccc 180
ctgtccccta gccgccgctc cgggctctgc tcgccctcct acgttgcggt cacacccttc 240
tcccttcggg gagacaacga cggcggtggc gggagcttct ccacggccga ccagctggag 300
atggtgaccg agctgctggg aggagacatg gtgaaccaga gtttcatctg cgacccggac 360
gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc caggactgta tgtggagcgg cttctcggcc 420
gccgccaagc tcgtctcaga gaagctggcc tcctaccagg ctgcgcgcaa agacagcggc 480
agcccgaacc ccgcccgcgg ccacagcgtc tgctccacct ccagcttgta cctgcaggat 540
ctgagcgccg ccgcctcaga gtgcatcgac ccctcggtgg tcttccccta ccctctcaac 600
gacagcagct cgcccaagtc ctgcgcctcg caagactcca gcgccttctc tccgtcctcg 660
gattctctgc tctcctcgac ggagtcctcc ccgcagggca gccccgagcc cctggtgctc 720
catgaggaga caccgcccac caccagcagc gactctgagg aggaacaaga agatgaggaa 780
gaaatcgatg ttgtttctgt ggaaaagagg caggctcctg gcaaaaggtc agagtctgga 840
tcaccttctg ctggaggcca cagcaaacct cctcacagcc cactggtcct caagaggtgc 900
cacgtctcca cacatcagca caactacgca gcgcctccct ccactcggaa ggactatcct 960
gctgccaaga gggtcaagtt ggacagtgtc agagtcctga gacagatcag caacaaccga 1020
aaatgcacca gccccaggtc ctcggacacc gaggagaatg tcaagaggcg aacacacaac 1080
gtcttggagc gccagaggag gaacgagcta aaacggagct tttttgccct gcgtgaccag 1140
atcccggagt tggaaaacaa tgaaaaggcc cccaaggtag ttatccttaa aaaagccaca 1200
gcatacatcc tgtccgtcca agcagaggag caaaagctca tttctgaaga ggacttgttg 1260
cggaaacgac gagaacagtt gaaacacaaa cttgaacagc tacggaactc ttgtgcg   1317

<210> 177
<211> 2283
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> MYB

<400> 177
atggcccgaa gaccccggca cagcatatat agcagtgacg aggatgatga ggactttgag 60
atgtgtgacc atgactatga tgggctgctt cccaagtctg gaaagcgtca cttggggaaa 120
acaaggtgga cccgggaaga ggatgaaaaa ctgaagaagc tggtggaaca gaatggaaca 180
gatgactgga aagttattgc caattatctc ccgaatcgaa cagatgtgca gtgccagcac 240
cgatggcaga aagtactaaa ccctgagctc atcaagggtc cttggaccaa agaagaagat 300
cagagagtga tagagcttgt acagaaatac ggtccgaaac gttggtctgt tattgccaag 360
cacttaaagg ggagaattgg aaaacaatgt agggagaggt ggcataacca cttgaatcca 420
gaagttaaga aaacctcctg gacagaagag gaagacagaa ttatttacca ggcacacaag 480
agactgggga acagatgggc agaaatcgca aagctactgc ctggacgaac tgataatgct 540
atcaagaacc actggaattc tacaatgcgt cggaaggtcg aacaggaagg ttatctgcag 600
gagtcttcaa aagccagcca gccagcagtg gccacaagct tccagaagaa cagtcatttg 660
atgggttttg ctcaggctcc gcctacagct caactccctg ccactggcca gcccactgtt 720
aacaacgact attcctatta ccacatttct gaagcacaaa atgtctccag tcatgttcca 780
taccctgtag cgttacatgt aaatatagtc aatgtccctc agccagctgc cgcagccatt 840
cagagacact ataatgatga agaccctgag aaggaaaagc gaataaagga attagaattg 900
ctcctaatgt caaccgagaa tgagctaaaa ggacagcagg tgctaccaac acagaaccac 960
acatgcagct accccgggtg gcacagcacc accattgccg accacaccag acctcatgga 1020
gacagtgcac ctgtttcctg tttgggagaa caccactcca ctccatctct gccagcggat 1080
cctggctccc tacctgaaga aagcgcctcg ccagcaaggt gcatgatcgt ccaccagggc 1140

accattctgg ataatgttaa gaacctctta gaatttgcag aaacactcca atttatagat 1200
tctgattctt catcatggtg tgatctcagc agttttgaat tctttgaaga agcagatttt 1260
tcacctagcc aacatcacac aggcaaagcc ctacagcttc agcaaagaga gggcaatggg 1320
actaaacctg caggagaacc tagcccaagg gtgaacaaac gtatgttgag tgagagttca 1380
cttgacccac ccaaggtctt acctcctgca aggcacagca caattccact ggtcatcctt 1440
cgaaaaaaac ggggccaggc cagcccctta gccactggag actgtagctc cttcatattt 1500
gctgacgtca gcagttcaac tcccaagcgt tcccctgtca aaagcctacc cttctctccc 1560
tcgcagttct taaacacttc cagtaaccat gaaaactcag acttggaaat gccttcttta 1620
acttccaccc ccctcattgg tcacaaattg actgttacaa caccatttca tagagaccag 1680
actgtgaaaa ctcaaaagga aaatactgtt tttagaaccc cagctatcaa aaggtcaatc 1740
ttagaaagct ctccaagaac tcctacacca ttcaaacatg cacttgcagc tcaagaaatt 1800
aaatacggtc ccctgaagat gctacctcag acacccctctc atctagtaga agatctgcag 1860
gatgtgatca aacaggaatc tgatgaatct ggaattgttg ctgagtttca agaaaatgga 1920
ccacccttac tgaagaaaat caaacaagag gtggaatctc caactgataa atcaggaaac 1980
ttcttctgct cacaccactg ggaaggggac agtctgaata cccaactgtt cacgcagacc 2040
tcgcctgtgg cagatgcacc gaatattctt acaagctccg ttttaatggc accagcatca 2100
gaagatgaag acaatgttct caaagcattt acagtaccta aaaacaggtc cctggcgagc 2160
cccttgcagc cttgtagcag tacctgggaa cctgcatcct gtggaaagat ggaggagcag 2220
atgacatctt ccagtcaagc tcgtaaatac gtgaatgcat tctcagcccg gacgctggtc 2280
atg 2283

<210> 178
<211> 993
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> JUN

<400> 178
atgactgcaa agatggaaac gaccttctat gacgatgccc tcaacgcctc gttcctcccg 60
tccgagagcg gaccttatgg ctacagtaac cccaagatcc tgaaacagag catgaccctg 120
aacctggccg acccagtggg gagcctgaag ccgcacctcc gcgccaagaa ctcggacctc 180
ctcacctcgc ccgacgtggg gctgctcaag ctggcgtcgc ccgagctgga gcgcctgata 240
atccagtcca gcaacgggca catcaccacc acgccgaccc ccacccagtt cctgtgcccc 300
aagaacgtga cagatgagca ggagggcttc gccgagggct tcgtgcgcgc cctggccgaa 360
ctgcacagcc agaacacgct gcccagcgtc acgtcggcgg cgcagccggt caacggggca 420
ggcatggtgg ctcccgcggt agcctcggtg gcaggggggca gcggcagcgg cggcttcagc 480
gccagcctgc acagcgagcc gccggtctac gcaaacctca gcaacttcaa cccaggcgcg 540
ctgagcagcg gcggcggggc gccctcctac ggcgcggccg gcctggcctt tcccgcgcaa 600
ccccagcagc agcagcagcc gccgcaccac ctgccccagc agatgcccgt gcagcacccg 660
cggctgcagg ccctgaagga ggagcctcag acagtgcccg agatgcccgg cgagacaccg 720
cccctgtccc ccatcgacat ggagtcccag gagcggatca aggcggagag gaagcgcatg 780
aggaaccgca tcgctgcctc caagtgccga aaaaggaagc tggagagaat cgcccggctg 840
gaggaaaaag tgaaaacctt gaaagctcag aactcggagc tggcgtccac ggccaacatg 900
ctcagggaac aggtggcaca gcttaaacag aaagtcatga accacgttaa cagtgggtgc 960
caactcatgc taacgcagca gttgcaaaca ttt 993

<210> 179
<211> 3633
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ERBB

<400> 179
atgcgaccct ccgggacggc cggggcagcg ctcctggcgc tgctggctgc gctctgcccg 60
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag 120

ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg 180
gtccttggga atttggaaat tacctatgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag 240
accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgccctca acacagtgga gcgaattcct 300
ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca 360
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccat gagaaattta 420
caggaaatcc tgcatggcgc cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag 480
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc 540
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg 600
ggtgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgccca gcagtgctcc 660
gggcgctgcc gtggcaagtc ccccagtgac tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc 720
acaggccccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc 780
aaggacacct gccccccact catgctctac aaccccacca cgtaccagat ggatgtgaac 840
cccgagggca aatacagctt tggtgccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg 900
gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa 960
gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata 1020
ggtattggtg aatttaaaga ctcactctcc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa 1080
aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc 1140
ttcacacata ctcctcctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa 1200
atcacagggt ttttgctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt 1260
gagaacctag aaatcatacg cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgcagtc 1320
gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat 1380
gtgataattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg 1440
tttgggacct ccggtcagaa aaccaaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500
gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tcccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560
agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgcaac 1620
cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccaccca 1680
gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740
cagtgtgccc actacattga cggcccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg 1800
ggagaaaaca acaccctggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860
catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggtcttg aaggctgtcc aacgaatggg 1920
cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtgggggccc tcctcttgct gctggtggtg 1980
gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgcgg 2040
aggctgctgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100
caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160
ggtgcgttcg gcacggtgta taagggactc tggatcccag aaggtgagaa agttaaaatt 2220
cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280
gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgcct gctgggcatc 2340
tgcctcacct ccaccgtgca gctcatcacg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac 2400
tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag 2460
atcgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgtcgcttgg tgcaccgcga cctggcagcc 2520
aggaacgtac tggtgaaaac accgcagcat gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa 2580
ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640
atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700
ggggtgactg tttgggagtt gatgaccttt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760
agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc 2820
atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgcccaaag 2880
ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccgag acccccagcg ctaccttgtc 2940
attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000
ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag 3060
cagggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tcctgagctc tctgagtgca 3120
accagcaaca attccaccgt ggcttgcatt gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc 3180
aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgcctt gactgaggac 3240
agcatagacg acaccttcct cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tcccaaaagg 3300
cccgctggct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaaccc cgcgcccagc 3360
agagacccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccga gtatctcaac 3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgcccactg ggcccagaaa 3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa 3540
gccaagccaa atggcatctt taagggctcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc 3600
gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

<210> 180
<211> 5589
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> BRCA1

<400> 180
atggatttat ctgctcttcg cgttgaagaa gtacaaaatg tcattaatgc tatgcagaaa 60
atcttagagt gtcccatctg tctggagttg atcaaggaac ctgtctccac aaagtgtgac 120
cacatatttt gcaaattttg catgctgaaa cttctcaacc agaagaaagg gccttcacag 180
tgtccttttat gtaagaatga tataaccaaa aggagcctac aagaaagtac gagatttagt 240
caacttgttg aagagctatt gaaaatcatt tgtgcttttc agcttgacac aggtttggag 300
tatgcaaaca gctataattt tgcaaaaaag gaaaataact ctcctgaaca tctaaaagat 360
gaagtttcta tcatccaaag tatgggctac agaaaccgtg ccaaaagact tctacagagt 420
gaacccgaaa atccttcctt gcaggaaacc agtctcagtg tccaactctc taaccttgga 480
actgtgagaa ctctgaggac aaagcagcgg atacaacctc aaaagacgtc tgtctacatt 540
gaattgggat ctgattcttc tgaagatacc gttaataagg caacttattg cagtgtggga 600
gatcaagaat tgttacaaat caccctcaa ggaaccaggg atgaaatcag tttggattct 660
gcaaaaaagg ctgcttgtga attttctgag acggatgtaa caaatactga acatcatcaa 720
cccagtaata atgatttgaa caccactgag aagcgtgcag ctgagaggca tccagaaaag 780
tatcagggta gttctgtttc aaacttgcat gtggagccat gtggcacaaa tactcatgcc 840
agctcattac agcatgagaa cagcagttta ttactcacta aagacagaat gaatgtagaa 900
aaggctgaat tctgtaataa aagcaaacag cctggcttag caaggagcca acataacaga 960
tgggctggaa gtaaggaaac atgtaatgat aggcggactc ccagcacaga aaaaaaggta 1020
gatctgaatg ctgatcccct gtgtgagaga aaagaatgga ataagcagaa actgccatgc 1080
tcagagaatc ctagagatac tgaagatgtt ccttggataa cactaaatag cagcattcag 1140
aaagttaatg agtggttttc cagaagtgat gaactgttag gttctgatga ctcacatgat 1200
ggggagtctg aatcaaatgc caaagtagct gatgtattgg acgttctaaa tgaggtagat 1260
gaatattctg gttcttcaga gaaaatagac ttactggcca gtgatcctca tgaggcttta 1320
atatgtaaaa gtgaaagagt tcactccaaa tcagtagaga gtaatattga agacaaaata 1380
tttgggaaaa cctatcggaa gaaggcaagc ctccccaact taagccatgt aactgaaaat 1440
ctaattatag gagcatttgt tactgagcca cagataatac aagagcgtcc cctcacaaat 1500
aaattaaagc gtaaaaggag acctacatca ggccttcatc ctgaggattt tatcaagaaa 1560
gcagatttgg cagttcaaaa gactcctgaa atgataaatc agggaactaa ccaaacggag 1620
cagaatggtc aagtgatgaa tattactaat agtggtcatg agaataaaac aaaaggtgat 1680
tctattcaga atgagaaaaa tcctaaccca atagaatcac tcgaaaaaga atctgctttc 1740
aaaacgaaag ctgaacctat aagcagcagt ataagcaata tggaactcga attaaatatc 1800
cacaattcaa aagcacctaa aaagaatagg ctgaggagga agtcttctac caggcatatt 1860
catgcgcttg aactagtagt cagtagaaat ctaagcccac ctaattgtac tgaattgcaa 1920
attgatagtt gttctagcag tgaagagata aagaaaaaaa agtacaacca aatgccagtc 1980
aggcacagca gaaacctaca actcatggaa ggtaaagaac ctgcaactgg agccaagaag 2040
agtaacaagc caaatgaaca gacaagtaaa agacatgaca gcgatacttt cccagagctg 2100
aagttaacaa atgcacctgg ttcttttact aagtgttcaa ataccagtga acttaaagaa 2160
tttgtcaatc ctagccttcc aagagaagaa aaagaagaga aactagaaac agttaaagtg 2220
tctaataatg ctgaagaccc caaagatctc atgttaagtg gagaaagggt tttgcaaact 2280
gaaagatctg tagagagtag cagtatttca ttggtacctg gtactgatta tggcactcag 2340
gaaagtatct cgttactgga agttagcact ctagggaagg caaaaacaga accaaataaa 2400
tgtgtgagtc agtgtgcagc atttgaaaac cccaagggac taattcatgg ttgttccaaa 2460
gataatagaa atgacacaga aggctttaag tatccattgg gacatgaagt taaccacagt 2520
cgggaaacaa gcatagaaat ggaagaaagt gaacttgatg ctcagtattt gcagaataca 2580
ttcaaggttt caaagcgcca gtcatttgct ccgttttcaa atccaggaaa tgcagaagag 2640
gaatgtgcaa cattctctgc ccactctggg tccttaaaga aacaaagtcc aaaagtcact 2700
tttgaatgtg aacaaaagga agaaaatcaa ggaaagaatg agtctaatat caagcctgta 2760
cagacagtta atatcactgc aggctttcct gtggttggtc agaaagataa gccagttgat 2820
aatgccaaat gtagtatcaa aggaggctct aggttttgtc tatcatctca gttcagaggc 2880
aacgaaactg gactcattac tccaaataaa catggacttt tacaaaaccc atatcgtata 2940
ccaccacttt ttcccatcaa gtcatttgtt aaaactaaat gtaagaaaaa tctgctagag 3000
gaaaactttg aggaacattc aatgtcacct gaaagagaaa tgggaaatga gaacattcca 3060
agtacagtga gcacaattag ccgtaataac attagagaaa atgtttttaa agaagccagc 3120

tcaagcaata ttaatgaagt aggttccagt actaatgaag tgggctccag tattaatgaa 3180
ataggttcca gtgatgaaaa cattcaagca gaactaggta gaaacagagg gccaaaattg 3240
aatgctatgc ttagattagg ggttttgcaa cctgaggtct ataaacaaag tcttcctgga 3300
agtaattgta agcatcctga aataaaaaag caagaatatg aagaagtagt tcagactgtt 3360
aatacagatt tctctccata tctgatttca gataacttag aacagcctat gggaagtagt 3420
catgcatctc aggtttgttc tgagacacct gatgacctgt tagatgatgg tgaaataaag 3480
gaagatacta gttttgctga aaatgacatt aaggaaagtt ctgctgtttt tagcaaaagc 3540
gtccagaaag gagagcttag caggagtcct agccctttca cccatacaca tttggctcag 3600
ggttaccgaa gaggggccaa gaaattagag tcctcagaag agaacttatc tagtgaggat 3660
gaagagcttc cctgcttcca acacttgtta tttggtaaag taaacaatat accttctcag 3720
tctactaggc atagcaccgt tgctaccgag tgtctgtcta agaacacaga ggagaattta 3780
ttatcattga agaatagctt aaatgactgc agtaaccagg taatattggc aaaggcatct 3840
caggaacatc accttagtga ggaaacaaaa tgttctgcta gcttgttttc ttcacagtgc 3900
agtgaattgg aagacttgac tgcaaataca aacacccagg atcctttctt gattggttct 3960
tccaaacaaa tgaggcatca gtctgaaagc cagggagttg gtctgagtga caaggaattg 4020
gtttcagatg atgaagaaag aggaacgggc ttggaagaaa ataatcaaga agagcaaagc 4080
atggattcaa acttaggtga agcagcatct gggtgtgaga gtgaaacaag cgtctctgaa 4140
gactgctcag ggctatcctc tcagagtgac attttaacca ctcagcagag ggataccatg 4200
caacataacc tgataaagct ccagcaggaa atggctgaac tagaagctgt gttagaacag 4260
catgggagcc agccttctaa cagctaccct tccatcataa gtgactcttc tgcccttgag 4320
gacctgcgaa atccagaaca aagcacatca gaaaaagcag tattaacttc acagaaaagt 4380
agtgaatacc ctataagcca gaatccagaa ggcctttctg ctgacaagtt tgaggtgtct 4440
gcagatagtt ctaccagtaa aaataaagaa ccaggagtgg aaaggtcatc cccttctaaa 4500
tgcccatcat tagatgatag gtggtacatg cacagttgct ctgggagtct tcagaataga 4560
aactacccat ctcaagagga gctcattaag gttgttgatg tggaggagca acagctggaa 4620
gagtctgggc cacacgattt gacggaaaca tcttacttgc caaggcaaga tctagaggga 4680
acccccttacc tggaatctgg aatcagcctc ttctctgatg accctgaatc tgatccttct 4740
gaagacagag ccccagagtc agctcgtgtt ggcaacatac catcttcaac ctctgcattg 4800
aaagttcccc aattgaaagt tgcagaatct gcccagagtc cagctgctgc tcatactact 4860
gatactgctg ggtataatgc aatggaagaa agtgtgagca gggagaagcc agaattgaca 4920
gcttcaacag aaagggtcaa caaaagaatg tccatggtgg tgtctggcct gaccccagaa 4980
gaatttatgc tcgtgtacaa gtttgccaga aaacaccaca tcactttaac taatctaatt 5040
actgaagaga ctactcatgt tgttatgaaa acagatgctg agtttgtgtg tgaacggaca 5100
ctgaaatatt ttctaggaat tgcgggagga aaatgggtag ttagctattt ctgggtgacc 5160
cagtctatta aagaaagaaa aatgctgaat gagcatgatt ttgaagtcag aggagatgtg 5220
gtcaatggaa gaaaccacca aggtccaaag cgagcaagag aatcccagga cagaaagatc 5280
ttcaggggggc tagaaatctg ttgctatggg cccttcacca acatgcccac agatcaactg 5340
gaatggatgg tacagctgtg tggtgcttct gtggtgaagg agctttcatc attcaccctt 5400
ggcacaggtg tccacccaat tgtggttgtg cagccagatg cctggacaga ggacaatggc 5460
ttccatgcaa ttgggcagat gtgtgaggca cctgtggtga cccgagagtg ggtgttggac 5520
agtgtagcac tctaccagtg ccaggagctg gacacctacc tgatacccca gatcccccac 5580
agccactac 5589

<210> 181
<211> 10254
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> BRCA2

<400> 181
atgcctattg gatccaaaga gaggccaaca ttttttgaaa tttttaagac acgctgcaac 60
aaagcagatt taggaccaat aagtcttaat tggtttgaag aactttcttc agaagctcca 120
ccctataatt ctgaacctgc agaagaatct gaacataaaa acaacaatta cgaaccaaac 180
ctatttaaaa ctccacaaag gaaaccatct tataatcagc tggcttcaac tccaataata 240
ttcaaagagc aagggctgac tctgccgctg taccaatctc ctgtaaaaga attagataaa 300
ttcaaattag acttaggaag gaatgttccc aatagtagac ataaaagtct tcgcacagtg 360
aaaactaaaa tggatcaagc agatgatgtt tcctgtccac ttctaaattc ttgtcttagt 420
gaaagtcctg ttgttctaca atgtacacat gtaacaccac aaagagataa gtcagtggta 480

tgtgggagtt tgtttcatac accaaagttt gtgaagggtc gtcagacacc aaaacatatt 540
tctgaaagtc taggagctga ggtggatcct gatatgtctt ggtcaagttc tttagctaca 600
ccacccaccc ttagttctac tgtgctcata gtcagaaatg aagaagcatc tgaaactgta 660
tttcctcatg atactactgc taatgtgaaa agctattttt ccaatcatga tgaaagtctg 720
aagaaaaatg atagatttat cgcttctgtg acagacagtg aaaacacaaa tcaaagagaa 780
gctgcaagtc atggatttgg aaaaacatca gggaattcat ttaaagtaaa tagctgcaaa 840
gaccacattg gaaagtcaat gccaaatgtc ctagaagatg aagtatatga aacagttgta 900
gatacctctg aagaagatag tttttcatta tgtttttcta aatgtagaac aaaaaatcta 960
caaaaagtaa gaactagcaa gactaggaaa aaaatttttcc atgaagcaaa cgctgatgaa 1020
tgtgaaaaat ctaaaaacca agtgaaagaa aaatactcat ttgtatctga agtggaacca 1080
aatgatactg atccattaga ttcaaatgta gcaaatcaga agccctttga gagtggaagt 1140
gacaaaatct ccaaggaagt tgtaccgtct ttggcctgtg aatggtctca actaaccctt 1200
tcaggtctaa atggagccca gatggagaaa ataccccctat tgcatatttc ttcatgtgac 1260
caaaatattt cagaaaaaga cctattagac acagagaaca aaagaaagaa agattttctt 1320
acttcagaga attctttgcc acgtatttct agcctaccaa aatcagagaa gccattaaat 1380
gaggaaacag tggtaaataa gagagatgaa gagcagcatc ttgaatctca tacagactgc 1440
attcttgcag taaagcaggc aatatctgga acttctccag tggcttcttc atttcagggt 1500
atcaaaaagt ctatattcag aataagagaa tcacctaaag agactttcaa tgcaagtttt 1560
tcaggtcata tgactgatcc aaactttaaa aaagaaactg aagcctctga aagtggactg 1620
gaaatacata ctgtttgctc acagaaggag gactccttat gtccaaattt aattgataat 1680
ggaagctggc cagccaccac cacacagaat tctgtagctt tgaagaatgc aggtttaata 1740
tccactttga aaaagaaaac aaataagttt atttatgcta tacatgatga aacatcttat 1800
aaaggaaaaa aaataccgaa agaccaaaaa tcagaactaa ttaactgttc agcccagttt 1860
gaagcaaatg cttttgaagc accacttaca tttgcaaatg ctgattcagg tttattgcat 1920
tcttctgtga aaagaagctg ttcacagaat gattctgaag aaccaacttt gtccttaact 1980
agctcttttg ggacaattct gaggaaatgt tctagaaatg aaacatgttc taataataca 2040
gtaatctctc aggatcttga ttataaagaa gcaaaatgta ataaggaaaa actacagtta 2100
tttattaccc cagaagctga ttctctgtca tgcctgcagg aaggacagtg tgaaaatgat 2160
ccaaaaagca aaaaagtttc agatataaaa gaagaggtct tggctgcagc atgtcaccca 2220
gtacaacatt caaaagtgga atacagtgat actgactttc aatcccagaa aagtctttta 2280
tatgatcatg aaaatgccag cactcttatt ttaactccta cttccaagga tgttctgtca 2340
aacctagtca tgatttctag aggcaaagaa tcatacaaaa tgtcagacaa gctcaaaggt 2400
aacaattatg aatctgatgt tgaattaacc aaaaatattc ccatggaaaa gaatcaagat 2460
gtatgtgctt taaatgaaaa ttataaaaac gttgagctgt tgccacctga aaaatacatg 2520
agagtagcat caccttcaag aaaggtacaa ttcaaccaaa acacaaatct aagagtaatc 2580
caaaaaaatc aagaagaaac tacttcaatt tcaaaaataa ctgtcaatcc agactctgaa 2640
gaacttttct cagacaatga gaataatttt gtcttccaag tagctaatga aaggaataat 2700
cttgctttag gaaatactaa ggaacttcat gaaacagact tgacttgtgt aaacgaaccc 2760
attttcaaga actctaccat ggttttatat ggagacacag gtgataaaca agcaacccaa 2820
gtgtcaatta aaaaagattt ggtttatgtt cttgcagagg agaacaaaaa tagtgtaaag 2880
cagcatataa aaatgactct aggtcaagat ttaaaatcgg acatctcctt gaatatagat 2940
aaaataccag aaaaaaataa tgattacatg aacaaatggg caggactctt aggtccaatt 3000
tcaaatcaca gttttggagg tagcttcaga acagcttcaa ataaggaaat caagctctct 3060
gaacataaca ttaagaagag caaaatgttc ttcaaagata ttgaagaaca atatcctact 3120
agtttagctt gtgttgaaat tgtaaatacc ttggcattag ataatcaaaa gaaactgagc 3180
aagcctcagt caattaatac tgtatctgca catttacaga gtagtgtagt tgtttctgat 3240
tgtaaaaata gtcatataac ccctcagatg ttattttcca agcaggattt taattcaaac 3300
cataatttaa cacctagcca aaaggcagaa attacagaac tttctactat attagaagaa 3360
tcaggaagtc agtttgaatt tactcagttt agaaaaccaa gctacatatt gcagaagagt 3420
acatttgaag tgcctgaaaa ccagatgact atcttaaaga ccacttctga ggaatgcaga 3480
gatgctgatc ttcatgtcat aatgaatgcc ccatcgattg gtcaggtaga cagcagcaag 3540
caatttgaag gtacagttga aattaaacgg aagtttgctg gcctgttgaa aaatgactgt 3600
aacaaaagtg cttctggtta tttaacagat gaaaatgaag tggggtttag gggcttttat 3660
tctgctcatg gcacaaaact gaatgtttct actgaagctc tgcaaaaagc tgtgaaactg 3720
tttagtgata ttgagaatat tagtgaggaa acttctgcag aggtacatcc aataagttta 3780
tcttcaagta aatgtcatga ttctgttgtt tcaatgttta agatagaaaa tcataatgat 3840
aaaactgtaa gtgaaaaaaa taataaatgc caactgatat tacaaaataa tattgaaatg 3900
actactggca cttttgttga agaaattact gaaaattaca agagaaatac tgaaaatgaa 3960
gataacaaat atactgctgc cagtagaaat tctcataact tagaatttga tggcagtgat 4020
tcaagtaaaa atgatactgt ttgtattcat aaagatgaaa cggacttgct atttactgat 4080
cagcacaaca tatgtcttaa attatctggc cagtttatga aggagggaaa cactcagatt 4140

aaagaagatt tgtcagattt aacttttttg gaagttgcga aagctcaaga agcatgtcat 4200
ggtaatactt caaataaaga acagttaact gctactaaaa cggagcaaaa tataaaagat 4260
tttgagactt ctgatacatt ttttcagact gcaagtggga aaaatattag tgtcgccaaa 4320
gagtcattta ataaaattgt aaatttcttt gatcagaaac cagaagaatt gcataacttt 4380
tccttaaatt ctgaattaca ttctgacata agaaagaaca aaatggacat tctaagttat 4440
gaggaaacag acatagttaa acacaaaata ctgaaagaaa gtgtcccagt tggtactgga 4500
aatcaactag tgaccttcca gggacaaccc gaacgtgatg aaaagatcaa agaacctact 4560
ctattgggtt ttcatacagc tagcgggaaa aaagttaaaa ttgcaaagga atctttggac 4620
aaagtgaaaa acctttttga tgaaaaagag caaggtacta gtgaaatcac cagttttagc 4680
catcaatggg caaagaccct aaagtacaga gaggcctgta aagaccttga attagcatgt 4740
gagaccattg agatcacagc tgccccaaag tgtaaagaaa tgcagaattc tctcaataat 4800
gataaaaacc ttgtttctat tgagactgtg gtgccaccta agctcttaag tgataattta 4860
tgtagacaaa ctgaaaatct caaaacatca aaaagtatct ttttgaaagt taaagtacat 4920
gaaaatgtag aaaaagaaac agcaaaaagt cctgcaactt gttacacaaa tcagtcccct 4980
tattcagtca ttgaaaattc agccttagct ttttacacaa gttgtagtag aaaaacttct 5040
gtgagtcaga cttcattact tgaagcaaaa aaatggctta gagaaggaat atttgatggt 5100
caaccagaaa gaataaatac tgcagattat gtaggaaatt atttgtatga aaataattca 5160
aacagtacta tagctgaaaa tgacaaaaat catctctccg aaaaacaaga tacttattta 5220
agtaacagta gcatgtctaa cagctattcc taccattctg atgaggtata taatgattca 5280
ggatatctct caaaaaataa acttgattct ggtattgagc cagtattgaa gaatgttgaa 5340
gatcaaaaaa acactagttt ttccaaagta atatccaatg taaaagatgc aaatgcatac 5400
ccacaaactg taaatgaaga tatttgcgtt gaggaacttg tgactagctc ttcaccctgc 5460
aaaaataaaa atgcagccat taaattgtcc atatctaata gtaataattt tgaggtaggg 5520
ccacctgcat ttaggatagc cagtggtaaa atcgtttgtg tttcacatga aacaattaaa 5580
aaagtgaaag acatatttac agacagtttc agtaaagtaa ttaaggaaaa caacgagaat 5640
aaatcaaaaa tttgccaaac gaaaattatg gcaggttgtt acgaggcatt ggatgattca 5700
gaggatattc ttcataactc tctagataat gatgaatgta gcacgcattc acataaggtt 5760
tttgctgaca ttcagagtga agaaatttta caacataacc aaaatatgtc tggattggag 5820
aaagtttcta aaatatcacc ttgtgatgtt agtttggaaa cttcagatat atgtaaatgt 5880
agtataggga agcttcataa gtcagtctca tctgcaaata cttgtgggat ttttagcaca 5940
gcaagtggaa aatctgtcca ggtatcagat gcttcattac aaaacgcaag acaagtgttt 6000
tctgaaatag aagatagtac caagcaagtc ttttccaaag tattgtttaa aagtaacgaa 6060
cattcagacc agctcacaag agaagaaaat actgctatac gtactccaga acatttaata 6120
tcccaaaaag gcttttcata taatgtggta aattcatctg ctttctctgg atttagtaca 6180
gcaagtggaa agcaagtttc cattttagaa agttccttac acaaagttaa gggagtgtta 6240
gaggaatttg atttaatcag aactgagcat agtcttcact attcacctac gtctagacaa 6300
aatgtatcaa aaatacttcc tcgtgttgat aagagaaacc cagagcactg tgtaaactca 6360
gaaatggaaa aaacctgcag taaagaattt aaattatcaa ataacttaaa tgttgaaggt 6420
ggttcttcag aaaataatca ctctattaaa gtttctccat atctctctca atttcaacaa 6480
gacaaacaac agttggtatt aggaaccaaa gtgtcacttg ttgagaacat tcatgttttg 6540
ggaaaagaac aggcttcacc taaaaacgta aaaatggaaa ttggtaaaac tgaaactttt 6600
tctgatgttc ctgtgaaaac aaatatagaa gtttgttcta cttactccaa agattcagaa 6660
aactactttg aaacagaagc agtagaaatt gctaaagctt ttatggaaga tgatgaactg 6720
acagattcta aactgccaag tcatgccaca cattctcttt ttacatgtcc cgaaaatgag 6780
gaaatggttt tgtcaaattc aagaattgga aaaagaagag gagagcccct tatcttagtg 6840
ggagaaccct caatcaaaag aaacttatta aatgaatttg acaggataat agaaaatcaa 6900
gaaaaatcct taaaggcttc aaaaagcact ccagatggca caataaaaga tcgaagattg 6960
tttatgcatc atgtttcttt agagccgatt acctgtgtac cctttcgcac aactaaggaa 7020
cgtcaagaga tacagaatcc aaattttacc gcacctggtc aagaatttct gtctaaatct 7080
catttgtatg aacatctgac tttggaaaaa tcttcaagca atttagcagt ttcaggacat 7140
ccattttatc aagtttctgc tacaagaaat gaaaaaatga gacacttgat tactacaggc 7200
agaccaacca aagtctttgt tccacctttt aaaactaaat cacattttca cagagttgaa 7260
cagtgtgtta ggaatattaa cttggaggaa aacagacaaa agcaaaacat tgatggacat 7320
ggctctgatg atagtaaaaa taagattaat gacaatgaga ttcatcagtt taacaaaaac 7380
aactccaatc aagcagcagc tgtaactttc acaaagtgtg aagaagaacc tttagattta 7440
attacaagtc ttcagaatgc cagagatata caggatatgc gaattaagaa gaaacaaagg 7500
caacgcgtct ttccacagcc aggcagtctg tatcttgcaa aaacatccac tctgcctcga 7560
atctctctga aagcagcagt aggaggccaa gttccctctg cgtgttctca taaacagctg 7620
tatacgtatg gcgtttctaa acattgcata aaaattaaca gcaaaaatgc agagtctttt 7680
cagtttcaca ctgaagatta ttttggtaag gaaagtttat ggactggaaa aggaatacag 7740
ttggctgatg gtggatggct cataccctcc aatgatggaa aggctggaaa agaagaattt 7800

tatagggctc tgtgtgacac tccaggtgtg gatccaaagc ttatttctag aatttgggtt 7860
tataatcact atagatggat catatggaaa ctggcagcta tggaatgtgc ctttcctaag 7920
gaatttgcta atagatgcct aagcccagaa agggtgcttc ttcaactaaa atacagatat 7980
gatacggaaa ttgatagaag cagaagatcg gctataaaaa agataatgga aagggatgac 8040
acagctgcaa aaacacttgt tctctgtgtt tctgacataa tttcattgag cgcaaatata 8100
tctgaaactt ctagcaataa aactagtagt gcagataccc aaaaagtggc cattattgaa 8160
cttacagatg ggtggtatgc tgttaaggcc cagttagatc ctccccctctt agctgtctta 8220
aagaatggca gactgacagt tggtcagaag attattcttc atggagcaga actggtgggc 8280
tctcctgatg cctgtacacc tcttgaagcc ccagaatctc ttatgttaaa gatttctgct 8340
aacagtactc ggcctgctcg ctggtatacc aaacttggat tctttcctga ccctagacct 8400
tttcctctgc ccttatcatc gcttttcagt gatggaggaa atgttggttg tgttgatgta 8460
attattcaaa gagcataccc tatacagtgg atggagaaga catcatctgg attatacata 8520
tttcgcaatg aaagagagga agaaaaggaa gcagcaaaat atgtggaggc ccaacaaaag 8580
agactagaag ccttattcac taaaattcag gaggaatttg aagaacatga agaaaacaca 8640
acaaaaccat atttaccatc acgtgcacta acaagacagc aagttcgtgc tttgcaagat 8700
ggtgcagagc tttatgaagc agtgaagaat gcagcagacc cagcttacct tgagggttat 8760
ttcagtgaag agcagttaag agccttgaat aatcacaggc aaatgttgaa tgataagaaa 8820
caagctcaga tccagttgga aattaggaag gccatggaat ctgctgaaca aaaggaacaa 8880
ggtttatcaa gggatgtcac aaccgtgtgg aagttgcgta ttgtaagcta ttcaaaaaaa 8940
gaaaaagatt cagttatact gagtatttgg cgtccatcat cagatttata ttctctgtta 9000
acagaaggaa agagatacag aatttatcat cttgcaactt caaaatctaa aagtaaatct 9060
gaaagagcta acatacagtt agcagcgaca aaaaaaactc agtatcaaca actaccggtt 9120
tcagatgaaa ttttatttca gatttaccag ccacgggagc cccttcactt cagcaaattt 9180
ttagatccag actttcagcc atcttgttct gaggtggacc taataggatt tgtcgtttct 9240
gttgtgaaaa aaacaggact tgccccttcc gtctatttgt cagacgaatg ttacaattta 9300
ctggcaataa agttttggat agaccttaat gaggacatta ttaagcctca tatgttaatt 9360
gctgcaagca acctccagtg gcgaccagaa tccaaatcag gccttcttac tttatttgct 9420
ggagattttt ctgtgttttc tgctagtcca aaagagggcc actttcaaga gacattcaac 9480
aaaatgaaaa atactgttga gaatattgac atactttgca atgaagcaga aaacaagctt 9540
atgcatatac tgcatgcaaa tgatcccaag tggtccaccc caactaaaga ctgtacttca 9600
gggccgtaca ctgctcaaat cattcctggt acaggaaaca agcttctgat gtcttctcct 9660
aattgtgaga tatattatca aagtccttta tcactttgta tggccaaaag gaagtctgtt 9720
tccacacctg tctcagccca gatgacttca aagtcttgta aaggggagaa agagattgat 9780
gaccaaaaga actgcaaaaa gagaagagcc ttggatttct tgagtagact gcctttacct 9840
ccacctgtta gtcccatttg tacatttgtt tctccggctg cacagaaggc atttcagcca 9900
ccaaggagtt gtggcaccaa atacgaaaca cccataaaga aaaaagaact gaattctcct 9960
cagatgactc catttaaaaa attcaatgaa atttctcttt tggaaagtaa ttcaatagct 10020
gacgaagaac ttgcattgat aaatacccaa gctcttttgt ctggttcaac aggagaaaaa 10080
caatttatat ctgtcagtga atccactagg actgctccca ccagttcaga agattatctc 10140
agactgaaac gacgttgtac tacatctctg atcaaagaac aggagagttc ccaggccagt 10200
acggaagaat gtgagaaaaa taagcaggac acaattacaa ctaaaaaata tatc 10254

<210> 182
<211> 2487
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> MCC

<400> 182
atgaattccg gagttgccat gaaatatgga aacgactcct cggccgagct gagtgagctc 60
cattcagcag ccctggcatc actaaaggga gatatagtgg aacttaataa acgtctccag 120
caaacagaga gggaacggga ccttctggaa aagaaattgg ccaaggcaca gtgcgagcag 180
tcccacctca tgagagagca tgaggatgtc caggagcgaa cgacgcttcg ctatgaggaa 240
cgcatcacag agctccacag cgtcattgcg gagctcaaca agaagataga ccgtctgcaa 300
ggcaccacca tcagggagga agatgagtac tcagaactgc gatcagaact cagccagagc 360
caacacgagg tcaacgagga ctctcgaagc atggaccaag accagacctc tgtctctatc 420
cccgaaaacc agtctaccat ggttactgct gacatggaca actgcagtga cctgaactca 480
gaactgcaga gggtgctgac agggctggag aatgttgtct gcggcaggaa gaagagcagc 540

tgcagcctct ccgtggccga ggtggacagg cacattgagc agctcaccac agccagcgag 600
cactgtgacc tggctattaa gacagtcgag gagattgagg gggtgcttgg ccgggacctg 660
tatcccaacc tggctgaaga gaggtctcgg tgggagaagg agctggctgg gctgagggaa 720
gagaatgaga gcctgactgc catgctgtgc agcaaagagg aagaactgaa ccggactaag 780
gccaccatga atgccatccg ggaagagcgg gaccggctcc ggaggcgggt cagagagctt 840
caaactcgac tacagagcgt gcaggccaca ggtccctcca gccctggccg cctcacttcc 900
accaaccgcc cgattaaccc cagcactggg gagctgagca caagcagcag cagcaatgac 960
attcccatcg ccaagattgc tgagagggtg aagctatcaa agacaaggtc cgaatcgtca 1020
tcatctgatc ggccagtcct gggctcagaa atcagtagca taggggtatc cagcagtgtg 1080
gctgaacacc tggcccactc acttcaggac tgctccaata tccaagagat tttccaaaca 1140
ctctactcac acggatctgc catctcagaa agcaagatta gagagtttga ggtggaaaca 1200
gaacggctga atagccggat tgagcacctc aaatcccaaa atgacctcct gaccataacc 1260
ttggaggaat gtaaaagcaa tgctgagagg atgagcatgc tggtgggaaa atacgaatcc 1320
aatgccacag cgctgaggct ggccttgcag tacagcgagc agtgcatcga agcctacgaa 1380
ctcctcctgg cgctggcaga gagtgagcag agcctcatcc tggggcagtt ccgagcggcg 1440
ggcgtggggt cctcccctgg agaccagtcg ggggatgaaa acatcactca gatgctcaag 1500
cgagctcatg actgccggaa gacagctgag aacgctgcca aggccctgct catgaagctg 1560
gacggcagct gtgggggagc ctttgccgtg gccggctgca gcgtgcagcc ctgggagagc 1620
ctttcctcca acagccacac cagcacaacc agctccacag ccagtagttg cgacaccgag 1680
ttcactaaag aagacgagca gaggctgaag gattatatcc agcagctcaa gaatgacagg 1740
gctgcggtca agctgaccat gctggagctg gaaagcatcc acatcgatcc tctcagctat 1800
gacgtcaagc ctcggggaga cagccagagg ctggatctgg aaaacgcagt gcttatgcag 1860
gagctcatgg ccatgaagga ggagatggcc gagttgaagg cccagctcta cctactggag 1920
aaagagaaga aggccctgga gctgaagctg agcacgcggg aggcccagga gcaggcctac 1980
ctggtgcaca ttgagcacct gaagtccgag gtggaggagc agaaggagca gcggatgcga 2040
tccctcagct ccaccagcag cggcagcaaa gataaacctg gcaaggagtg tgctgatgct 2100
gcctccccag ctctgtccct agctgaactc aggacaacgt gcagcgagaa tgagctggct 2160
gcggagttca ccaacgccat tcgtcgagaa aagaagttga aggccagagt tcaagagctg 2220
gtgagtgcct tggagagact caccaagagc agtgaaatcc gacatcagca atctgcagag 2280
ttcgtgaatg atctaaagcg ggccaacagc aacctggtgg ctgcctatga gaaagcaaag 2340
aaaaagcatc aaaacaaact gaagaagtta gagtcgcaga tgatggccat ggtggagaga 2400
catgagaccc aagtgaggat gctcaagcaa agaatagctc tgctagagga ggagaactcc 2460
aggccacaca ccaatgaaac ttcgctt 2487

<210> 183
<211> 2253
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> EZH2, isoform 1

<400> 183
atgggccaga ctgggaagaa atctgagaag ggaccagttt gttggcggaa gcgtgtaaaa 60
tcagagtaca tgcgactgag acagctcaag aggttcagac gagctgatga agtaaagagt 120
atgtttagtt ccaatcgtca gaaaattttg gaaagaacgg aaatcttaaa ccaagaatgg 180
aaacagcgaa ggatacagcc tgtgcacatc ctgacttctg tgagctcatt gcgcgggact 240
agggagtgtt cggtgaccag tgacttggat tttccaacac aagtcatccc attaaagact 300
ctgaatgcag ttgcttcagt acccataatg tattcttggt ctcccctaca gcagaatttt 360
atggtggaag atgaaactgt tttacataac attccttata tgggagatga agttttagat 420
caggatggta ctttcattga agaactaata aaaaattatg atgggaaagt acacggggat 480
agagaatgtg ggtttataaa tgatgaaatt tttgtggagt tggtgaatgc ccttggtcaa 540
tataatgatg atgacgatga tgatgatgga gacgatcctg aagaaagaga agaaaagcag 600
aaagatctgg aggatcaccg agatgataaa gaaagccgcc cacctcggaa atttccttct 660
gataaaattt ttgaagccat ttcctcaatg tttccagata agggcacagc agaagaacta 720
aaggaaaaat ataaagaact caccgaacag cagctcccag gcgcacttcc tcctgaatgt 780
acccccaaca tagatggacc aaatgctaaa tctgttcaga gagagcaaag cttacactcc 840
tttcatacgc ttttctgtag gcgatgtttt aaatatgact gcttcctaca tcgtaagtgc 900
aattattctt ttcatgcaac acccaacact tataagcgga agaacacaga aacagctcta 960
gacaacaaac cttgtggacc acagtgttac cagcatttgg agggagcaaa ggagtttgct 1020

gctgctctca ccgctgagcg gataaagacc ccaccaaaac gtccaggagg ccgcagaaga 1080
ggacggcttc ccaataacag tagcaggccc agcaccccca ccattaatgt gctggaatca 1140
aaggatacag acagtgatag ggaagcaggg actgaaacgg ggggagagaa caatgataaa 1200
gaagaagaag agaagaaaga tgaaacttcg agctcctctg aagcaaattc tcggtgtcaa 1260
acaccaataa agatgaagcc aaatattgaa cctcctgaga atgtggagtg gagtggtgct 1320
gaagcctcaa tgtttagagt cctcattggc acttactatg acaatttctg tgccattgct 1380
aggttaattg ggaccaaaac atgtagacag gtgtatgagt ttagagtcaa agaatctagc 1440
atcatagctc cagctcccgc tgaggatgtg gatactcctc caaggaaaaa gaagaggaaa 1500
caccggttgt gggctgcaca ctgcagaaag atacagctga aaaaggacgg ctcctctaac 1560
catgtttaca actatcaacc ctgtgatcat ccacggcagc cttgtgacag ttcgtgccct 1620
tgtgtgatag cacaaaattt ttgtgaaaag ttttgtcaat gtagttcaga gtgtcaaaac 1680
cgctttccgg gatgccgctg caaagcacag tgcaacacca agcagtgccc gtgctacctg 1740
gctgtccgag agtgtgaccc tgacctctgt cttacttgtg gagccgctga ccattgggac 1800
agtaaaaatg tgtcctgcaa gaactgcagt attcagcggg gctccaaaaa gcatctattg 1860
ctggcaccat ctgacgtggc aggctggggg atttttatca aagatcctgt gcagaaaaat 1920
gaattcatct cagaatactg tggagagatt atttctcaag atgaagctga cagaagaggg 1980
aaagtgtatg ataaatacat gtgcagcttt ctgttcaact tgaacaatga ttttgtggtg 2040
gatgcaaccc gcaagggtaa caaaattcgt tttgcaaatc attcggtaaa tccaaactgc 2100
tatgcaaaag ttatgatggt taacggtgat cacaggatag gtatttttgc caagagagcc 2160
atccagactg gcgaagagct gttttttgat tacagataca gccaggctga tgccctgaag 2220
tatgtcggca tcgaaagaga aatggaaatc cct 2253

<210> 184
<211> 1053
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> NIPP1/PPP1R8, isoform alpha

<400> 184
atggcggcag ccgcgaactc cggctctagc ctcccgctgt tcgactgccc aacctgggca 60
ggtaagcccc ctcccggttt acatctggat gtagtcaaag gagacaaact aattgagaaa 120
ctgattattg atgagaagaa gtattactta tttgggagaa accctgattt gtgtgacttt 180
accattgacc accagtcttg ctctcgggtc catgctgcac ttgtctacca caagcatctg 240
aagagagttt tcctgataga tctcaacagt acacacggca ctttcttggg tcacattcgg 300
ttggaacctc acaagcctca gcaaattccc atcgattcca cggtctcatt tggcgcatcc 360
acaagggcat acactctgcg cgagaagcct cagacattgc catcggctgt gaaaggagat 420
gagaagatgg gtggagagga tgatgaactc aagggcttac tggggcttcc agaggaggaa 480
actgagcttg ataacctgac agagttcaac actgcccaca acaagcggat ttctaccctt 540
accattgagg agggaaatct ggacattcaa agaccaaaga ggaagaggaa gaactcacgg 600
gtgacattca gtgaggatga tgagatcatc aacccagagg atgtggatcc ctcagttggt 660
cgattcagga acatggtgca aactgcagtg gtcccagtca agaagaagcg tgtggagggc 720
cctggctccc tgggcctgga ggaatcaggg agcaggcgca tgcagaactt tgccttcagc 780
ggaggactct acgggggcct gccccccaca cacagtgaag caggctccca gccacatggc 840
atccatggga cagcactcat cggtggcttg cccatgccat acccaaacct tgcccctgat 900
gtggacttga ctcctgttgt gccgtcagca gtgaacatga accctgcacc aaaccctgca 960
gtctataacc ctgaagctgt aaatgaaccc aagaagaaga aatatgcaaa agaggcttgg 1020
ccaggcaaga agcccacacc ttccttgctg att 1053

<210> 185
<211> 990
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> PPP1CA, isoform 1

<400> 185

atgtccgaca gcgagaagct caacctggac tcgatcatcg ggcgcctgct ggaagtgcag 60
ggctcgcggc ctggcaagaa tgtacagctg acagagaacg agatccgcgg tctgtgcctg 120
aaatcccggg agatttttct gagccagccc attcttctgg agctggaggc acccctcaag 180
atctgcggtg acatacacgg ccagtactac gaccttctgc gactatttga gtatggcggt 240
ttcccctccg agagcaacta cctctttctg ggggactatg tggacagggg caagcagtcc 300
ttggagacca tctgcctgct gctggcctat aagatcaagt accccgagaa cttcttcctg 360
ctccgtggga accacgagtg tgccagcatc aaccgcatct atggtttcta cgatgagtgc 420
aagagacgct acaacatcaa actgtggaaa accttcactg actgcttcaa ctgcctgccc 480
atcgcggcca tagtggacga aaagatcttc tgctgccacg gaggcctgtc cccggacctg 540
cagtctatgg agcagattcg gcggatcatg cggcccacag atgtgcctga ccagggcctg 600
ctgtgtgacc tgctgtggtc tgaccctgac aaggacgtgc agggctgggg cgagaacgac 660
cgtggcgtct cttttacctt tggagccgag gtggtggcca agttcctcca caagcacgac 720
ttggacctca tctgccgagc acaccaggtg gtagaagacg gctacgagtt ctttgccaag 780
cggcagctgg tgacactttt ctcagctccc aactactgtg gcgagtttga caatgctggc 840
gccatgatga gtgtggacga gaccctcatg tgctctttcc agatcctcaa gcccgccgac 900
aagaacaagg ggaagtacgg gcagttcagt ggcctgaacc ctggaggccg acccatcacc 960
ccaccccgca attccgccaa agccaagaaa 990

<210> 186
<211> 1818
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TAK1/MAP3K7, isoform 1B

<400> 186
atgtctacag cctctgccgc ctcctcctcc tcctcgtctt cggccggtga gatgatcgaa 60
gccccttccc aggtcctcaa ctttgaagag atcgactaca aggagatcga ggtggaagag 120
gttgttggaa gaggagcctt tggagttgtt tgcaaagcta agtggagagc aaaagatgtt 180
gctattaaac aaatagaaag tgaatctgag aggaaagcgt ttattgtaga gcttcggcag 240
ttatcccgtg tgaaccatcc taatattgta aagctttatg gagcctgctt gaatccagtg 300
tgtcttgtga tggaatatgc tgaagggggc tctttatata atgtgctgca tggtgctgaa 360
ccattgccat attatactgc tgcccacgca atgagttggt gtttacagtg ttcccaagga 420
gtggcttatc ttcacagcat gcaacccaaa gcgctaattc acagggacct gaaaccacca 480
aacttactgc tggttgcagg ggggacagtt ctaaaaattt gtgattttgg tacagcctgt 540
gacattcaga cacacatgac caataacaag gggagtgctg cttggatggc acctgaagtt 600
tttgaaggta gtaattacag tgaaaaatgt gacgtcttca gctggggtat tattctttgg 660
gaagtgataa cgcgtcggaa acccttttgat gagattggtg gcccagcttt ccgaatcatg 720
tgggctgttc ataatggtac tcgaccacca ctgataaaaa atttacctaa gcccattgag 780
agcctgatga ctcgttgttg gtctaaagat ccttcccagc gcccttcaat ggaggaaatt 840
gtgaaaataa tgactcactt gatgcggtac tttccaggag cagatgagcc attacagtat 900
ccttgtcagt attcagatga aggacagagc aactctgcca ccagtacagg ctcattcatg 960
gacattgctt ctacaaatac gagtaacaaa agtgacacta atatggagca agttcctgcc 1020
acaaatgata ctattaagcg cttagaatca aaattgttga aaaatcaggc aaagcaacag 1080
agtgaatctg gacgtttaag cttgggagcc tcccgtggga gcagtgtgga gagcttgccc 1140
ccaacctctg agggcaagag gatgagtgct gacatgtctg aaatagaagc taggatcgcc 1200
gcaaccacag cctattccaa gcctaaacgg ggccaccgta aaactgcttc atttggcaac 1260
attctggatg tccctgagat cgtcatatca ggcaacggac agccaagacg tagatccatc 1320
caagacttga ctgtaactgg aacagaacct ggtcaggtga gcagtaggtc atccagtccc 1380
agtgtcagaa tgattactac ctcaggacca acctcagaaa agccaactcg aagtcatcca 1440
tggacccctg atgattccac agataccaat ggatcagata actccatccc aatggcttat 1500
cttacactgg atcaccaact acagcctcta gcaccgtgcc caaactccaa agaatctatg 1560
gcagtgtttg aacagcattg taaaatggca caagaatata tgaaagttca aacagaaatt 1620
gcattgttat tacagagaaa gcaagaacta gttgcagaac tggaccagga tgaaaaggac 1680
cagcaaaata catctcgcct ggtacaggaa cataaaaagc ttttagatga aaacaaaagc 1740
ctttctactt actaccagca atgcaaaaaa caactagagg tcatcagaag tcagcagcag 1800
aaacgacaag gcacttca 1818

<210> 187
<211> 204
<212> DNA
<213> Unknown

<220>
<223> CMV promoter

<400> 187
gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt 60
ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac 120
tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg 180
tgggaggtct atataagcag agct 204

<210> 188
<211> 1212
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Caspase-1, isoform alpha

<400> 188
atggccgaca aggtcctgaa ggagaagaga aagctgttta tccgttccat gggtgaaggt 60
acaataaatg gcttactgga tgaattatta cagacaaggg tgctgaacaa ggaagagatg 120
gagaaagtaa aacgtgaaaa tgctacagtt atggataaga cccgagcttt gattgactcc 180
gttattccga aaggggcaca ggcatgccaa atttgcatca catacatttg tgaagaagac 240
agttacctgg cagggacgct gggactctca gcagatcaaa catctggaaa ttaccttaat 300
atgcaagact ctcaaggagt actttcttcc tttccagctc ctcaggcagt gcaggacaac 360
ccagctatgc ccacatcctc aggctcagaa gggaatgtca agctttgctc cctagaagaa 420
gctcaaagga tatggaaaca aaagtcggca gagatttatc caataatgga caagtcaagc 480
cgcacacgtc ttgctctcat tatctgcaat gaagaatttg acagtattcc tagaagaact 540
ggagctgagg ttgacatcac aggcatgaca atgctgctac aaaatctggg gtacagcgta 600
gatgtgaaaa aaaatctcac tgcttcggac atgactacag agctggaggc atttgcacac 660
cgcccagagc acaagacctc tgacagcacg ttcctggtgt tcatgtctca tggtattcgg 720
gaaggcattt gtgggaagaa acactctgag caagtcccag atatactaca actcaatgca 780
atctttaaca tgttgaatac caagaactgc ccaagtttga aggacaaacc gaaggtgatc 840
atcatccagg cctgccgtgg tgacagccct ggtgtggtgt ggtttaaaga ttcagtagga 900
gtttctggaa acctatcttt accaactaca gaagagtttg aggatgatgc tattaagaaa 960
gcccacatag agaaggattt tatcgctttc tgctcttcca caccagataa tgtttcttgg 1020
agacatccca caatgggctc tgtttttatt ggaagactca ttgaacatat gcaagaatat 1080
gcctgttcct gtgatgtgga ggaaattttc cgcaaggttc gattttcatt tgagcagcca 1140
gatggtagag cgcagatgcc caccactgaa agagtgactt tgacaagatg tttctacctc 1200
ttcccaggac at 1212

<210> 189
<211> 885
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> cyclin-D1/CCND1

<400> 189
atggaacacc agctcctgtg ctgcgaagtg gaaaccatcc gccgcgcgta ccccgatgcc 60
aacctcctca acgaccgggt gctgcgggcc atgctgaagg cggaggagac ctgcgcgccc 120
tcggtgtcct acttcaaatg tgtgcagaag gaggtcctgc cgtccatgcg gaagatcgtc 180
gccacctgga tgctggaggt ctgcgaggaa cagaagtgcg aggaggaggt cttcccgctg 240
gccatgaact acctggaccg cttcctgtcg ctggagcccg tgaaaaagag ccgcctgcag 300

ctgctggggg ccacttgcat gttcgtggcc tctaagatga aggagaccat ccccctgacg 360
gccgagaagc tgtgcatcta caccgacaac tccatccggc ccgaggagct gctgcaaatg 420
gagctgctcc tggtgaacaa gctcaagtgg aacctggccg caatgacccc gcacgatttc 480
attgaacact tcctctccaa aatgccagag gcggaggaga acaaacagat catccgcaaa 540
cacgcgcaga ccttcgttgc cctctgtgcc acagatgtga agttcatttc caatccgccc 600
tccatggtgg cagcggggag cgtggtggcc gcagtgcaag gcctgaacct gaggagcccc 660
aacaacttcc tgtcctacta ccgcctcaca cgcttcctct ccagagtgat caagtgtgac 720
ccggactgcc tccgggcctg ccaggagcag atcgaagccc tgctggagtc aagcctgcgc 780
caggcccagc agaacatgga ccccaaggcc gccgaggagg aggaagagga ggaggaggag 840
gtggacctgg cttgcacacc caccgacgtg cgggacgtgg acatc 885

<210> 190
<211> 996
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> A2b receptor (ADORA2B)

<400> 190
atgctgctgg agacacagga cgcgctgtac gtggcgctgg agctggtcat cgccgcgctt 60
tcggtggcgg gcaacgtgct ggtgtgcgcc gcggtgggca cggcgaacac tctgcagacg 120
cccaccaact acttcctggt gtccctggct gcggccgacg tggccgtggg gctcttcgcc 180
atccccttg ccatcaccat cagcctgggc ttctgcactg acttctacgg ctgcctcttc 240
ctcgcctgct tcgtgctggt gctcacgcag agctccatct tcagccttct ggccgtggca 300
gtcgacagat acctggccat ctgtgtcccg ctcaggtata aaagtttggt cacggggacc 360
cgagcaagag gggtcattgc tgtcctctgg gtccttgcct ttggcatcgg attgactcca 420
ttcctggggt ggaacagtaa agacagtgcc accaacaact gcacagaacc ctgggatgga 480
accacgaatg aaagctgctg ccttgtgaag tgtctctttg agaatgtggt ccccatgagc 540
tacatggtat atttcaattt ctttgggtgt gttctgcccc cactgcttat aatgctggtg 600
atctacatta agatcttcct ggtggcctgc aggcagcttc agcgcactga gctgatggac 660
cactcgagga ccaccctcca gcgggagatc catgcagcca agtcactggc catgattgtg 720
gggatttttg ccctgtgctg gttacctgtg catgctgtta actgtgtcac tcttttccag 780
ccagctcagg gtaaaaataa gcccaagtgg gcaatgaata tggccattct tctgtcacat 840
gccaattcag ttgtcaatcc cattgtctat gcttaccgga accgagactt ccgctacact 900
tttcacaaaa ttatctccag gtatcttctc tgccaagcag atgtcaagag tgggaatggt 960
caggctgggg tacagcctgc tctcggtgtg ggccta 996

<210> 191
<211> 1242
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> HHLA2, isoform 1

<400> 191
atgaaggcac agacagcact gtctttcttc ctcattctca taacatctct gagtggatct 60
caaggcatat tccctttggc tttcttcatt tatgttccta tgaatgaaca aatcgtcatt 120
ggaagacttg atgaagatat aattctccct tcttcatttg agaggggatc cgaagtcgta 180
atacactgga agtatcaaga tagctataag gttcacagtt actacaaagg cagtgaccat 240
ttggaaagcc aagatcccag atatgcaaac aggacatccc ttttctataa tgagattcaa 300
aatgggaatg cgtcgctatt tttcagaaga gtaagccttc tggacgaagg aatttacacc 360
tgctatgtag gaacagcaat tcaagtgatt acaaacaaag tggtgctaaa ggtgggagtt 420
tttctcacac ccgtgatgaa gtatgaaaag aggaacacaa acagcttctt aatatgcagc 480
gtgttaagtg tttatcctcg tccaattatc acgtggaaaa tggacaacac acctatctct 540
gaaaacaaca tggaagaaac agggtctttg gattcttttt ctattaacag cccactgaat 600
attacaggat caaattcatc ttatgaatgt acaattgaaa attcactgct gaagcaaaca 660
tggacagggc gctggacgat gaaagatggc cttcataaaa tgcaaagtga acacgtttca 720

ctctcatgtc aacctgtaaa tgattatttt tcaccaaacc aagacttcaa agttacttgg 780
tccagaatga aaagtgggac tttctctgtc ctggcttact atctgagctc ctcacaaaat 840
acaattatca atgaatcccg attctcatgg aacaaagagc tgataaacca gagtgacttc 900
tctatgaatt tgatggatct taatctttca gacagtgggg aatatttatg caatatttct 960
tcggatgaat atactttact taccatccac acagtgcatg tagaaccgag ccaagaaaca 1020
gcttcccata acaaaggctt atggattttg gtgccctctg cgattttggc agcttttctg 1080
ctgatttgga gcgtaaaatg ttgcagagcc cagctagaag ccaggaggag cagacaccct 1140
gctgatggag cccaacaaga aagatgttgt gtccctcctg gtgagcgctg tcccagtgca 1200
cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag ta 1242

<210> 192
<211> 1128
<212> DNA
<213> Herpes simplex

<220>
<223> herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK)

<400> 192
atggcttcgt acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc 120
cgcctggagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg 180
gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240
gtacccgagc cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc 300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta 360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
cctcatgtcg gggggggaggc tgggagttca catgccccgc ccccggccct caccctcatc 480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctcctg tgctacccgg ccgcgcgata ccttatgggc 540
agcatgaccc cccaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgccgac cttgcccggc 600
acaaacatcg tgttgggggc ccttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc 660
cagcgccccg gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg 720
ctgcttgcca atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggtggga ggattgggga 780
cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggccca 840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggccccc 900
aacggcgacc tgtataacgt gtttgcctgg gccttggacg tcttggccaa acgcctccgt 960
cccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccg ccggctgccg ggacgccctg 1020
ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca ccccaggctc cataccgacg 1080
atctgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaac 1128

<210> 193
<211> 1173
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform 1

<400> 193
atgccgccct ccgggctgcg gctgctgccg ctgctgctac cgctgctgtg gctactggtg 60
ctgacgcctg gccggccggc cgcgggacta tccacctgca agactatcga catggagctg 120
gtgaagcgga agcgcatcga ggccatccgc ggccagatcc tgtccaagct gcggctcgcc 180
agccccccga gccaggggga ggtgccgccc ggcccgctgc ccgaggccgt gctcgccctg 240
tacaacagca cccgcgaccg ggtggccggg gagagtgcag aaccggagcc cgagcctgag 300
gccgactact acgccaagga ggtcacccgc gtgctaatgg tggaaaccca caacgaaatc 360
tatgacaagt tcaagcagag tacacacagc atatatatgt tcttcaacac atcagagctc 420
cgagaagcgg tacctgaacc cgtgttgctc tcccgggcag agctgcgtct gctgaggctc 480
aagttaaaag tggagcagca cgtggagctg taccagaaat acagcaacaa ttcctggcga 540
tacctcagca accggctgct ggcacccagc gactcgccag agtggttatc ttttgatgtc 600
accggagttg tgcggcagtg gttgagccgt ggaggggaaa ttgagggctt tcgccttagc 660

gcccactgct cctgtgacag cagggataac acactgcaag tggacatcaa cgggttcact 720
accggccgcc gaggtgacct ggccaccatt catggcatga accggccttt cctgcttctc 780
atggccaccc cgctggagag ggcccagcat ctgcaaagct cccggcaccg ccgagccctg 840
gacaccaact attgcttcag ctccacggag aagaactgct gcgtgcggca gctgtacatt 900
gacttccgca aggacctcgg ctggaagtgg atccacgagc ccaagggcta ccatgccaac 960
ttctgcctcg ggccctgccc ctacatttgg agcctggaca cgcagtacag caaggtcctg 1020
gccctgtaca accagcataa cccgggcgcc tcggcggcgc cgtgctgcgt gccgcaggcg 1080
ctggagccgc tgcccatcgt gtactacgtg ggccgcaagc ccaaggtgga gcagctgtcc 1140
aacatgatcg tgcgctcctg caagtgcagc tga 1173

<210> 194
<211> 699
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VEGF

<400> 194
atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgcct tgctgctcta cctccaccat 60
gccaagtggt cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg 120
gtgaagttca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctggtggac 180
atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg 240
atgcgatgcg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgcccac tgaggagtcc 300
aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg 360
agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa 420
aaaaaatcag ttcgaggaaa gggaaagggg caaaaacgaa agcgcaagaa atcccggtat 480
aagtcctgga gcgtgtacgt tggtgcccgc tgctgtctaa tgccctggag cctccctggc 540
ccccatccct gtgggccttg ctcagagcgg agaaagcatt tgtttgtaca agatccgcag 600
acgtgtaaat gttcctgcaa aaacacagac tcgcgttgca aggcgaggca gcttgagtta 660
aacgaacgta cttgcagatg tgacaagccg aggcggtga 699

<210> 195
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform 1 shRNA target 1

<400> 195
gaaacccaca acgaaatct 19

<210> 196
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 2

<400> 196
gtacacacag catatatat 19

<210> 197
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 3

<400> 197
ctgctgaggc tcaagttaa 19

<210> 198
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 4

<400> 198
gtggagctgt accagaaat 19

<210> 199
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 5

<400> 199
gactcgccag agtggttat 19

<210> 200
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 6

<400> 200
gagccgtgga ggggaaatt 19

<210> 201
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 7

<400> 201
cctgtgacag cagggataa 19

<210> 202
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 8

<400> 202
gccctggaca ccaactatt 19

<210> 203
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human TGF-beta isoform1 shRNA target 9

<400> 203
ccctgtacaa ccagcataa 19

<210> 204
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VEGF shRNA target 1

<400> 204
gagatcgagt acatcttca 19

<210> 205
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VEGF shRNA target 2

<400> 205
gcagattatg cggatcaaa 19

<210> 206
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VEGF shRNA target 3

<400> 206
gatagagcaa gacaagaaa 19

<210> 207
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human VEGF shRNA target 4

<400> 207
ggagaaagca tttgtttgt 19

<210> 208
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VEGF shRNA target 5

<400> 208
gatccgcaga cgtgtaaat 19

<210> 209
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human VEGF shRNA target 6

<400> 209
gcgaggcagc ttgagttaa 19

<210> 210
<211> 3888
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ARI-134

<400> 210
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720
tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780
gtatgagacc actccctagg ccacactgta tggactattc tagagatagt ccatacagtg 840
tggctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900
aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960
aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020
catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080
accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140
aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260
tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320

tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380
tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440
caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500
tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560
tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggcc gactacaagc gaattatcta gagtaattcg 1620
cttgtagtcg gctttttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680
tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740
ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800
actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860
attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920
ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980
tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040
gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100
caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160
gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220
caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280
aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340
gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400
atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460
agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520
cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580
gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640
attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700
ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760
ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820
aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880
tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940
gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000
tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060
aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120
taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180
cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 211
<211> 3888
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ARI-135

<400> 211
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420

caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720
tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780
gtatgagacc actccctagg agctggctcc tggtgaattc tagagattca ccaggagcca 840
gctctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900
aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960
aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020
catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080
accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140
aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260
tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320
tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380
tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440
caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500
tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560
tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggcc gactacaagc gaattatcta gagtaattcg 1620
cttgtagtcg gctttttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680
tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740
ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800
actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860
attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920
ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980
tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040
gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100
caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160
gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220
caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280
aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340
gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400
atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460
agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520
cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580
gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640
attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700
ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760
ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820
aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880
tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940
gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000
tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060
aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120
taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180
cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240
tcttcttgag atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 212

<211> 3888
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ARI-136

<400> 212
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720
tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780
gtatgagacc actccctagg cagctggaat tctttctatc tagagtagaa agaattccag 840
ctgctttttt cgacagatct ggcgcgccat agtggccagc ggccgcaggt aagccagccc 900
aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac 960
aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcaggtct gcccgggtgg 1020
catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg aagttgccac tccagtgccc 1080
accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcattttgt ctgactaggt gtccttctat 1140
aatattatgg ggtggagggg ggtggtatgg agcaaggggc ccaagttaac ttgtttattg 1200
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 1260
tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 1320
tccaaggtcg ggcaggaaga gggcctattt cccatgattc cttcatattt gcatatacga 1380
tacaaggctg ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1440
caaaatacgt gacgtagaaa gtaataattt cttgggtagt ttgcagtttt aaaattatgt 1500
tttaaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta 1560
tatatcttgt ggaaaggacg aaactaggcc gactacaagc gaattatcta gagtaattcg 1620
cttgtagtcg gctttttttcg agtagctaga gaattcatgg taatagcgat gactaatacg 1680
tagatgtact gccaagtagg aaagtcccat aaggtcatgt actgggcata atgccaggcg 1740
ggccatttac cgtcattgac gtcaataggg ggcgtacttg gcatatgata cacttgatgt 1800
actgccaagt gggcagttta ccgtaaatag tccacccatt gacgtcaatg gaaagtccct 1860
attggcgtta ctatgggaac atacgtcatt attgacgtca atgggcgggg gtcgttgggc 1920
ggtcagccag gcgggccatt taccgtaagt tatgtaacgc ggaactccat atatgggcta 1980
tgaactaatg accccgtaat tgattactat taataactag acccagcttt cttgtacaaa 2040
gttggcatta taagaaagca ttgcttatca atttgttgca acgaacaggt cactatcagt 2100
caaaataaaa tcattatttg ccatccagct gatatcccct atagtgagtc gtattacatg 2160
gtcatagctg tttcctggca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2220
caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2280
aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 2340
gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 2400
atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 2460
agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 2520
cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 2580
gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 2640
attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 2700
ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 2760
ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 2820
aaagaaatgc ataaacttttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 2880
tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 2940
gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3000
tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3060
aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaat cagaattggt taattggttg 3120
taacactggc agagcattac gctgacttga cgggacggcg caagctcatg accaaaatcc 3180

cttaacgtga gttacgcgtc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3240
tcttcttgag atccttttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3300
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3360
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3420
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 3480
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 3540
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3600
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 3660
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3720
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3780
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3840
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgct 3888

<210> 213
<211> 3890
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ARI-137

<400> 213
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga gaattggtac catatttgca tgtcgctatg 720
tgttctggga aatcaccata aacgtgaaat gtctttggat ttgggaatct tataagttct 780
gtatgagacc actccctagg atgtgacctt ctacaagatt ctagagatct tgtagaaggt 840
cacatctttt ttcgacagat ctggcgcgcc atagtggcca gcggccgcag gtaagccagc 900
ccaggcctcg ccctccagct caaggcggga caggtgccct agagtagcct gcatccaggg 960
acaggcccca gccgggtgct gacacgtcca cctccatctc ttcctcaggt ctgcccgggt 1020
ggcatccctg tgacccctcc ccagtgcctc tcctggccct ggaagttgcc actccagtgc 1080
ccaccagcct tgtcctaata aaattaagtt gcatcatttt gtctgactag gtgtccttct 1140
ataatattat ggggtggagg ggggtggtat ggagcaaggg gcccaagtta acttgtttat 1200
tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 1260
tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg 1320
gatccaaggt cgggcaggaa gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac 1380
gatacaaggc tgttagagag ataattagaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag 1440
tacaaaatac gtgacgtaga aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat 1500
gttttaaaat ggactatcat atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt 1560
tatatatctt gtggaaagga cgaaactagg ccgactacaa gcgaattatc tagagtaatt 1620
cgcttgtagt cggcttttttt cgagtagcta gagaattcat ggtaatagcg atgactaata 1680
cgtagatgta ctgccaagta ggaaagtccc ataaggtcat gtactgggca taatgccagg 1740
cgggccattt accgtcattg acgtcaatag ggggcgtact tggcatatga tacacttgat 1800
gtactgccaa gtgggcagtt taccgtaaat agtccaccca ttgacgtcaa tggaaagtcc 1860
ctattggcgt tactatggga acatacgtca ttattgacgt caatgggcgg gggtcgttgg 1920
gcggtcagcc aggcgggcca tttaccgtaa gttatgtaac gcggaactcc atatatgggc 1980
tatgaactaa tgaccccgta attgattact attaataact agacccagct ttcttgtaca 2040
aagttggcat tataagaaag cattgcttat caatttgttg caacgaacag gtcactatca 2100
gtcaaaataa aatcattatt tgccatccag ctgatatccc ctatagtgag tcgtattaca 2160
tggtcatagc tgtttcctgg cagctctggc ccgtgtctca aaatctctga tgttacattg 2220
cacaagataa aaatatatca tcatgaacaa taaaactgtc tgcttacata aacagtaata 2280

caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaacgtcgag gccgcgatta aattccaaca 2340
tggatgctga tttatatggg tataaatggg ctcgcgataa tgtcgggcaa tcaggtgcga 2400
caatctatcg cttgtatggg aagcccgatg cgccagagtt gtttctgaaa catggcaaag 2460
gtagcgttgc caatgatgtt acagatgaga tggtcagact aaactggctg acggaattta 2520
tgcctcttcc gaccatcaag cattttatcc gtactcctga tgatgcatgg ttactcacca 2580
ctgcgatccc cggaaaaaca gcattccagg tattagaaga atatcctgat tcaggtgaaa 2640
atattgttga tgcgctggca gtgttcctgc gccggttgca ttcgattcct gtttgtaatt 2700
gtccttttaa cagcgatcgc gtatttcgtc tcgctcaggc gcaatcacga atgaataacg 2760
gtttggttga tgcgagtgat tttgatgacg agcgtaatgg ctggcctgtt gaacaagtct 2820
ggaaagaaat gcataaactt ttgccattct caccggattc agtcgtcact catggtgatt 2880
tctcacttga taaccttatt tttgacgagg ggaaattaat aggttgtatt gatgttggac 2940
gagtcggaat cgcagaccga taccaggatc ttgccatcct atggaactgc ctcggtgagt 3000
tttctccttc attacagaaa cggctttttc aaaaatatgg tattgataat cctgatatga 3060
ataaattgca gtttcatttg atgctcgatg agtttttcta atcagaattg gttaattggt 3120
tgtaacactg gcagagcatt acgctgactt gacgggacgg cgcaagctca tgaccaaaat 3180
cccttaacgt gagttacgcg tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 3240
gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac 3300
cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 3360
ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc 3420
accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag 3480
tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 3540
cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc 3600
gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc 3660
ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca 3720
cgagggagct tccagggggа aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc 3780
tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 3840
ccagcaacgc ggcctttttа cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 3890

<210> 214
<211> 3379
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1018)...(1038)
<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1060)...(1080)
<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> source
<222> (1)...(3379)
<223> ARI-205

<400> 214
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720
tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780
gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840
aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900
ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960
agtccggatc aacgccctag gtttatgttt ggatgaactg acatacgcgt atccgtcnnn 1020
nnnnnnnnnn nnnnnnngt agtgaaatat atattaaacn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1080
tacggtaacg cggaattcgc aactatttta tcaatttttt gcgtcgactc gagtagctag 1140
agaattcatg gtaatagcga tgactaatac gtagatgtac tgccaagtag gaaagtccca 1200
taaggtcatg tactgggcat aatgccaggc gggccattta ccgtcattga cgtcaatagg 1260
gggcgtactt ggcatatgat acacttgatg tactgccaag tgggcagttt accgtaaata 1320
gtccacccat tgacgtcaat ggaaagtccc tattggcgtt actatgggaa catacgtcat 1380
tattgacgtc aatgggcggg ggtcgttggg cggtcagcca ggcgggccat ttaccgtaag 1440
ttatgtaacg cggaactcca tatatgggct atgaactaat gaccccgtaa ttgattacta 1500
ttaataacta gacccagctt tcttgtacaa agttggcatt ataagaaagc attgcttatc 1560
aatttgttgc aacgaacagg tcactatcag tcaaaataaa atcattattt gccatccagc 1620
tgatatcccc tatagtgagt cgtattacat ggtcatagct gtttcctggc agctctggcc 1680
cgtgtctcaa aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat catgaacaat 1740
aaaactgtct gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt atgagccata ttcaacggga 1800
aacgtcgagg ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt ataaatgggc 1860
tcgcgataat gtcgggcaat caggtgcgac aatctatcgc ttgtatggga agcccgatgc 1920
gccagagttg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta cagatgagat 1980
ggtcagacta aactggctga cggaatttat gcctcttccg accatcaagc attttatccg 2040
tactcctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc ggaaaaacag cattccaggt 2100
attagaagaa tatcctgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag tgttcctgcg 2160
ccggttgcat tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg tatttcgtct 2220
cgctcaggcg caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt ttgatgacga 2280
gcgtaatggc tggcctgttg aacaagtctg gaaagaaatg cataaacttt tgccattctc 2340
accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctcacttgat aaccttattt ttgacgaggg 2400
gaaattaata ggttgtattg atgttggacg agtcggaatc gcagaccgat accaggatct 2460
tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac ggctttttca 2520
aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga tgctcgatga 2580
gtttttctaa tcagaattgg ttaattggtt gtaacactgg cagagcatta cgctgacttg 2640
acgggacggc gcaagctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttacgcgt cgttccactg 2700
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 2760
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 2820
agagctacca actcttttte cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 2880
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2940
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 3000
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 3060
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 3120
gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 3180
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 3240
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 3300
gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc 3360
cttttgctgg ccttttgct 3379

<210> 215
<211> 4744
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (3377)...(3398)
<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (3418)...(3439)

<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> source
<222> (1)...(4744)
<223> ARI-206

<400> 215
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 60
tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 120
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 180
cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 240
agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc 300
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt 360
aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact 420
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg 480
cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 540
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt 600
ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 660
ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgacg cgtaactcac gttaagggat 720
tttggtcatg agcttgcgcc gtcccgtcaa gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac 780
caattaacca attctgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc 840
atatcaggat tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac 900
tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat tccgactcgt 960
ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa 1020
tcaccatgag tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gtttatgcat ttctttccag 1080
acttgttcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaaccg 1140
ttattcattc gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa 1200
ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc aacaatattt 1260
tcacctgaat caggatattc ttctaatacc tggaatgctg tttttccggg gatcgcagtg 1320
gtgagtaacc atgcatcatc aggagtacgg ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata 1380
aattccgtca gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct 1440
ttgccatgtt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaagcg atagattgtc 1500
gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg 1560
ttggaattta atcgcggcct cgacgtttcc cgttgaatat ggctcataac acccccttgta 1620
ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg atatattttt atcttgtgca 1680
atgtaacatc agagattttg agacacgggc cagagctgcc aggaaacagc tatgaccatg 1740
taatacgact cactataggg gatatcagct ggatggcaaa taatgatttt attttgactg 1800
atagtgacct gttcgttgca acaaattgat aagcaatgct ttcttataat gccaactttg 1860
tacaagaaag ctgggtctag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 1920
ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc 1980
aacgacccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg 2040
actttccatt gacgtcaatg ggtggactat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat 2100
caagtgtatc atatgccaag tacgcccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc 2160
tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta 2220
ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag 2280
cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt 2340
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa 2400
atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctctctg gctaactaga 2460
gaacccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actataggga gacccaagct 2520
tagatctgtt tccggtcgcc accatgagcg agctgatcaa ggagaacatg cacatgaagc 2580
tgtacatgga gggcaccgtg aacaaccacc acttcaagtg cacatccgag ggcgaaggca 2640
agcccctacga gggcacccag accatgaaga tcaaggtggt cgagggcggc cctctcccct 2700
tcgccttcga catcctggct accagcttca tgtacggcag caaagccttc atcaaccaca 2760
cccagggcat ccccgacttc tttaagcagt ccttccctga gggcttcaca tgggagagaa 2820
tcaccacata cgaagacggg ggcgtgctga ccgctaccca ggacaccagc ttccagaacg 2880
gctgcatcat ctacaacgtc aagatcaacg gggtgaactt cccatccaac ggccctgtga 2940
tgcagaagaa aacacgcggc tgggaggcca acaccgagat gctgtacccc gctgacggcg 3000
gcctgagagg ccacagccag atggccctga agctcgtggg cgggggctac ctgcactgct 3060
ccttcaagac cacatacaga tccaagaaac ccgctaagaa cctcaagatg cccggcttcc 3120
acttcgtgga ccacagactg gaaagaatca aggaggccga caaagagacc tacgtcgagc 3180

agcacgagat ggctgtggcc aagtactgcg acctccctag caaactgggg cacagataat 3240
cgatagtttg tttgaatgag gcttcagtac tttacagaat cgttgcctgc acatcttgga 3300
aacacttgct gggattactt cttcaggtta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg 3360
ctgttgacag tgagcgnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnta gtgaagccac agatgtannn 3420
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnt gcctactgcc tcggaattca aggggctact ttaggagcaa 3480
ttatcttgtt tactaaaact gaataccttg ctatctcttt gatacatttt tacaaagctg 3540
aattaaaatg gtataaatta aatcactttt ttcaattctc tagaggtacc gcatgcgtac 3600
gtggccagcg gccgcaggta agccagccca ggcctcgccc tccagctcaa ggcgggacag 3660
gtgccctaga gtagcctgca tccagggaca ggccccagcc gggtgctgac acgtccacct 3720
ccatctcttc ctcaggtctg cccgggtggc atccctgtga cccctcccca gtgcctctcc 3780
tggccctgga agttgccact ccagtgccca ccagccttgt cctaataaaa ttaagttgca 3840
tcattttgtc tgactaggtg tccttctata atattatggg gtggaggggg gtggtatgga 3900
gcaaggggcc caagttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 3960
catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa 4020
actcatcaat gtatcttatc atgtctggat ccagtcgact gaattggttc ctttaaagcc 4080
tgctttttg tacaaagttg gcattataaa aaagcattgc tcatcaattt gttgcaacga 4140
acaggtcact atcagtcaaa ataaaatcat tatttggggc ccgagcttaa gactggccgt 4200
cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaacat ccatgctagc gttaacgcga gagtagggaa 4260
ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc agtcggaaga ctgggccttt cgttttatct 4320
gttgtttgtc ggtgaacgct ctcctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg 4380
ttgtgaagca acggcccgga gggtggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc 4440
aaactaagca gaaggccatc ctgacggatg gccttttgc gtttctacaa actcttcctg 4500
gctagcggta cgcgtattaa ttgcgttgcg ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct 4560
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 4620
gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 4680
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4740
aaag 4744

<210> 216
<211> 3377
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1018)...(1036)
<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1058)...(1078)
<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> source
<222> (1)...(3377)
<223> ARI-207

<400> 216
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660

agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720
tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780
gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840
aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900
ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960
agtccggatc aacgccctag gtttatgttt ggatgaactg acatacgcgt atccgtcnnn 1020
nnnnnnnnnn nnnnnngtag tgaaatatat attaaacnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnta 1080
cggtaacgcg gaattcgcaa ctattttatc aatttttttgc gtcgactcga gtagctagag 1140
aattcatggt aatagcgatg actaatacgt agatgtactg ccaagtagga aagtcccata 1200
aggtcatgta ctgggcataa tgccaggcgg gccatttacc gtcattgacg tcaatagggg 1260
gcgtacttgg catatgatac acttgatgta ctgccaagtg ggcagtttac cgtaaatagt 1320
ccacccattg acgtcaatgg aaagtcccta ttggcgttac tatgggaaca tacgtcatta 1380
ttgacgtcaa tgggcggggg tcgttgggcg gtcagccagg cgggccattt accgtaagtt 1440
atgtaacgcg gaactccata tatgggctat gaactaatga ccccgtaatt gattactatt 1500
aataactaga cccagctttc ttgtacaaag ttggcattat aagaaagcat tgcttatcaa 1560
tttgttgcaa cgaacaggtc actatcagtc aaaataaaat cattatttgc catccagctg 1620
atatccccta tagtgagtcg tattacatgg tcatagctgt ttcctggcag ctctggcccg 1680
tgtctcaaaa tctctgatgt tacattgcac aagataaaaa tatatcatca tgaacaataa 1740
aactgtctgc ttacataaac agtaatacaa ggggtgttat gagccatatt caacgggaaa 1800
cgtcgaggcc gcgattaaat tccaacatgg atgctgattt atatgggtat aaatgggctc 1860
gcgataatgt cgggcaatca ggtgcgacaa tctatcgctt gtatgggaag cccgatgcgc 1920
cagagttgtt tctgaaacat ggcaaaggta gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg 1980
tcagactaaa ctggctgacg gaatttatgc ctcttccgac catcaagcat tttatccgta 2040
ctcctgatga tgcatggtta ctcaccactg cgatccccgg aaaaacagca ttccaggtat 2100
tagaagaata tcctgattca ggtgaaaata ttgttgatgc gctggcagtg ttcctgcgcc 2160
ggttgcattc gattcctgtt tgtaattgtc cttttaacag cgatcgcgta tttcgtctcg 2220
ctcaggcgca atcacgaatg aataacggtt tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc 2280
gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga aagaaatgca taaacttttg ccattctcac 2340
cggattcagt cgtcactcat ggtgatttct cacttgataa ccttatttttt gacgagggga 2400
aattaatagg ttgtattgat gttggacgag tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg 2460
ccatcctatg gaactgcctc ggtgagtttt ctccttcatt acagaaacgg ctttttcaaa 2520
aatatggtat tgataatcct gatatgaata aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt 2580
ttttctaatc agaattggtt aattggttgt aacactggca gagcattacg ctgacttgac 2640
gggacggcgc aagctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttacgcgtcg ttccactgag 2700
cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa 2760
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag 2820
agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg 2880
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat 2940
acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 3000
ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg 3060
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc 3120
gtgagcattg agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa 3180
gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc 3240
tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 3300
caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct 3360
tttgctggcc ttttgct 3377

<210> 217
<211> 4738
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (3377)...(3395)
<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (3415)...(3433)

<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> source
<222> (1)...(4738)
<223> ARI-208

<400> 217
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 60
tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 120
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 180
cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 240
agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc 300
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt 360
aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact 420
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg 480
cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 540
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt 600
ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 660
ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgacg cgtaactcac gttaagggat 720
tttggtcatg agcttgcgcc gtcccgtcaa gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac 780
caattaacca attctgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc 840
atatcaggat tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac 900
tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat tccgactcgt 960
ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa 1020
tcaccatgag tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gtttatgcat ttctttccag 1080
acttgttcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaaccg 1140
ttattcattc gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa 1200
ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc aacaatattt 1260
tcacctgaat caggatattc ttctaatacc tggaatgctg tttttccggg gatcgcagtg 1320
gtgagtaacc atgcatcatc aggagtacgg ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata 1380
aattccgtca gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct 1440
ttgccatgtt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaagcg atagattgtc 1500
gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg 1560
ttggaattta atcgcggcct cgacgtttcc cgttgaatat ggctcataac acccccttgta 1620
ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg atatattttt atcttgtgca 1680
atgtaacatc agagattttg agacacgggc cagagctgcc aggaaacagc tatgaccatg 1740
taatacgact cactataggg gatatcagct ggatggcaaa taatgatttt attttgactg 1800
atagtgacct gttcgttgca acaaattgat aagcaatgct ttcttataat gccaactttg 1860
tacaagaaag ctgggtctag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 1920
ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc 1980
aacgacccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg 2040
actttccatt gacgtcaatg ggtggactat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat 2100
caagtgtatc atatgccaag tacgcccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc 2160
tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta 2220
ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag 2280
cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt 2340
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa 2400
atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctctctg gctaactaga 2460
gaacccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actataggga gacccaagct 2520
tagatctgtt tccggtcgcc accatgagcg agctgatcaa ggagaacatg cacatgaagc 2580
tgtacatgga gggcaccgtg aacaaccacc acttcaagtg cacatccgag ggcgaaggca 2640
agcccctacga gggcacccag accatgaaga tcaaggtggt cgagggcggc cctctccccct 2700
tcgccttcga catcctggct accagcttca tgtacggcag caaagccttc atcaaccaca 2760
cccagggcat ccccgacttc tttaagcagt ccttccctga gggcttcaca tgggagagaa 2820
tcaccacata cgaagacggg ggcgtgctga ccgctaccca ggacaccagc ttccagaacg 2880
gctgcatcat ctacaacgtc aagatcaacg gggtgaactt cccatccaac ggccctgtga 2940
tgcagaagaa aacacgcggc tgggaggcca acaccgagat gctgtacccc gctgacggcg 3000
gcctgagagg ccacagccag atggccctga agctcgtggg cgggggctac ctgcactgct 3060
ccttcaagac cacatacaga tccaagaaac ccgctaagaa cctcaagatg cccggcttcc 3120
acttcgtgga ccacagactg gaaagaatca aggaggccga caaagagacc tacgtcgagc 3180

agcacgagat ggctgtggcc aagtactgcg acctccctag caaactgggg cacagataat 3240
cgatagtttg tttgaatgag gcttcagtac tttacagaat cgttgcctgc acatcttgga 3300
aacacttgct gggattactt cttcaggtta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg 3360
ctgttgacag tgagcgnnnn nnnnnnnnnn nnnnntagtg aagccacaga tgtannnnnn 3420
nnnnnnnnnn nnntgcctac tgcctcggaa ttcaaggggc tactttagga gcaattatct 3480
tgtttactaa aactgaatac cttgctatct ctttgataca tttttacaaa gctgaattaa 3540
aatggtataa attaaatcac ttttttcaat tctctagagg taccgcatgc gtacgtggcc 3600
agcggccgca ggtaagccag cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgccc 3660
tagagtagcc tgcatccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct 3720
cttcctcagg tctgcccggg tggcatccct gtgacccctc cccagtgcct ctcctggccc 3780
tggaagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaat aaaattaagt tgcatcattt 3840
tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tggggtggag gggggtggta tggagcaagg 3900
ggcccaagtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac 3960
aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat 4020
caatgtatct tatcatgtct ggatccagtc gactgaattg gttcctttaa agcctgcttt 4080
tttgtacaaa gttggcatta taaaaaagca ttgctcatca atttgttgca acgaacaggt 4140
cactatcagt caaaataaaa tcattatttg gggcccgagc ttaagactgg ccgtcgtttt 4200
acaacgtcgt gactgggaaa acatccatgc tagcgttaac gcgagagtag ggaactgcca 4260
ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcgg aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt 4320
tgtcggtgaa cgctctcctg agtaggacaa atccgccggg agcggatttg aacgttgtga 4380
agcaacggcc cggagggtgg cgggcaggac gcccgccata aactgccagg catcaaacta 4440
agcagaaggc catcctgacg gatggccttt ttgcgtttct acaaactctt cctggctagc 4500
ggtacgcgta ttaattgcgt tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg 4560
ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc 4620
ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc 4680
agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaag 4738

<210> 218
<211> 6329
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pKD46

<400> 218
catcgattta ttatgacaac ttgacggcta catcattcac tttttcttca caaccggcac 60
ggaactcgct cgggctggcc ccggtgcatt ttttaaatac ccgcgagaaa tagagttgat 120
cgtcaaaacc aacattgcga ccgacggtgg cgataggcat ccgggtggtg ctcaaaagca 180
gcttcgcctg gctgatacgt tggtcctcgc gccagcttaa gacgctaatc cctaactgct 240
ggcggaaaag atgtgacaga cgcgacggcg acaagcaaac atgctgtgcg acgctggcga 300
tatcaaaatt gctgtctgcc aggtgatcgc tgatgtactg acaagcctcg cgtacccgat 360
tatccatcgg tggatggagc gactcgttaa tcgcttccat gcgccgcagt aacaattgct 420
caagcagatt tatcgccagc agctccgaat agcgcccttc cccttgcccg gcgttaatga 480
tttgcccaaa caggtcgctg aaatgcggct ggtgcgcttc atccgggcga aagaaccccg 540
tattggcaaa tattgacggc cagttaagcc attcatgcca gtaggcgcgc ggacgaaagt 600
aaacccactg gtgataccat tcgcgagcct ccggatgacg accgtagtga tgaatctctc 660
ctggcgggaa cagcaaaata tcacccggtc ggcaaacaaa ttctcgtccc tgatttttca 720
ccacccccctg accgcgaatg gtgagattga gaatataacc tttcattccc agcggtcggt 780
cgataaaaaa atcgagataa ccgttggcct caatcggcgt taaacccgcc accagatggg 840
cattaaacga gtatcccggc agcaggggat cattttgcgc ttcagccata cttttcatac 900
tcccgccatt cagagaagaa accaattgtc catattgcat cagacattgc cgtcactgcg 960
tcttttactg gctcttctcg ctaaccaaac cggtaacccc gcttattaaa agcattctgt 1020
aacaaagcgg gaccaaagcc atgacaaaaa cgcgtaacaa aagtgtctat aatcacggca 1080
gaaaagtcca cattgattat ttgcacggcg tcacactttg ctatgccata gcatttttat 1140
ccataagatt agcggatcct acctgacgct ttttatcgca actctctact gtttctccat 1200
acccgttttt ttgggaattc gagctctaag gaggttataa aaaatggata ttaatactga 1260
aactgagatc aagcaaaagc attcactaac ccccttttcct gttttcctaa tcagcccggc 1320
atttcgcggg cgatattttc acagctattt caggagttca gccatgaacg cttattacat 1380
tcaggatcgt cttgaggctc agagctgggc gcgtcactac cagcagctcg cccgtgaaga 1440

gaaagaggca gaactggcag acgacatgga aaaaggcctg ccccagcacc tgtttgaatc 1500
gctatgcatc gatcatttgc aacgccacgg ggccagcaaa aaatccatta cccgtgcgtt 1560
tgatgacgat gttgagtttc aggagcgcat ggcagaacac atccggtaca tggttgaaac 1620
cattgctcac caccaggttg atattgattc agaggtataa aacgaatgag tactgcactc 1680
gcaacgctgg ctgggaagct ggctgaacgt gtcggcatgg attctgtcga cccacaggaa 1740
ctgatcacca ctcttcgcca gacggcattt aaaggtgatg ccagcgatgc gcagttcatc 1800
gcattactga tcgttgccaa ccagtacggc cttaatccgt ggacgaaaga aatttacgcc 1860
tttcctgata agcagaatgg catcgttccg gtggtgggcg ttgatggctg gtcccgcatc 1920
atcaatgaaa accagcagtt tgatggcatg gactttgagc aggacaatga atcctgtaca 1980
tgccggattt accgcaagga ccgtaatcat ccgatctgcg ttaccgaatg gatggatgaa 2040
tgccgccgcg aaccattcaa aactcgcgaa ggcagagaaa tcacggggcc gtggcagtcg 2100
catcccaaac ggatgttacg tcataaagcc atgattcagt gtgcccgtct ggccttcgga 2160
tttgctggta tctatgacaa ggatgaagcc gagcgcattg tcgaaaatac tgcatacact 2220
gcagaacgtc agccggaacg cgacatcact ccggttaacg atgaaaccat gcaggagatt 2280
aacactctgc tgatcgccct ggataaaaca tgggatgacg acttattgcc gctctgttcc 2340
cagatatttc gccgcgacat tcgtgcatcg tcagaactga cacaggccga agcagtaaaa 2400
gctcttggat tcctgaaaca gaaagccgca gagcagaagg tggcagcatg acaccggaca 2460
ttatcctgca gcgtaccggg atcgatgtga gagctgtcga acaggggat gatgcgtggc 2520
acaaattacg gctcggcgtc atcaccgctt cagaagttca caacgtgata gcaaaacccc 2580
gctccggaaa gaagtggcct gacatgaaaa tgtcctactt ccacaccctg cttgctgagg 2640
tttgcaccgg tgtggctccg gaagttaacg ctaaagcact ggcctgggga aaacagtacg 2700
agaacgacgc cagaaccctg tttgaattca cttccggcgt gaatgttact gaatccccga 2760
tcatctatcg cgacgaaagt atgcgtaccg cctgctctcc cgatggttta tgcagtgacg 2820
gcaacggcct tgaactgaaa tgcccgttta cctcccggga tttcatgaag ttccggctcg 2880
gtggtttcga ggccataaag tcagcttaca tggcccaggt gcagtacagc atgtgggtga 2940
cgcgaaaaaa tgcctggtac tttgccaact atgacccgcg tatgaagcgt gaaggcctgc 3000
attatgtcgt gattgagcgg gatgaaaagt acatggcgag ttttgacgag atcgtgccgg 3060
agttcatcga aaaaatggac gaggcactgg ctgaaattgg ttttgtattt ggggagcaat 3120
ggcgatgacg catcctcacg ataatatccg ggtaggcgca atcactttcg tctactccgt 3180
tacaaagcga ggctgggtat ttcccggcct ttctgttatc cgaaatccac tgaaagcaca 3240
gcggctggct gaggagataa ataataaacg aggggctgta tgcacaaagc atcttctgtt 3300
gagttaagaa cgagtatcga gatggcacat agccttgctc aaattggaat caggtttgtg 3360
ccaataccag tagaaacaga cgaagaatcc atgggtatgg acagttttcc ctttgatatg 3420
taacggtgaa cagttgttct acttttgttt gttagtcttg atgcttcact gatagataca 3480
agagccataa gaacctcaga tccttccgta tttagccagt atgttctcta gtgtggttcg 3540
ttgtttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca tacttacttt gcatgtcact 3600
caaaaatttt gcctcaaaac tggtgagctg aatttttgca gttaaagcat cgtgtagtgt 3660
ttttcttagt ccgttacgta ggtaggaatc tgatgtaatg gttgttggta ttttgtcacc 3720
attcattttt atctggttgt tctcaagttc ggttacgaga tccatttgtc tatctagttc 3780
aacttggaaa atcaacgtat cagtcgggcg gcctcgctta tcaaccacca atttcatatt 3840
gctgtaagtg tttaaatctt tacttattgg tttcaaaacc cattggttaa gccttttaaa 3900
ctcatggtag ttattttcaa gcattaacat gaacttaaat tcatcaaggc taatctctat 3960
atttgccttg tgagttttct tttgtgttag ttcttttaat aaccactcat aaatcctcat 4020
agagtatttg ttttcaaaag acttaacatg ttccagatta tattttatga attttttaa 4080
ctggaaaaga taaggcaata tctcttcact aaaaactaat tctaattttt cgcttgagaa 4140
cttggcatag tttgtccact ggaaaatctc aaagccttta accaaaggat tcctgatttc 4200
cacagttctc gtcatcagct ctctggttgc tttagctaat acaccataag cattttccct 4260
actgatgttc atcatctgag cgtattggtt ataagtgaac gataccgtcc gttctttcct 4320
tgtagggttt tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag cataaaatta gcttggtttc 4380
atgctccgtt aagtcatagc gactaatcgc tagttcattt gctttgaaaa caactaattc 4440
agacatacat ctcaattggt ctaggtgatt ttaatcacta taccaattga gatgggctag 4500
tcaatgataa ttactagtcc ttttcctttg agttgtgggt atctgtaaat tctgctagac 4560
ctttgctgga aaacttgtaa attctgctag accctctgta aattccgcta gacctttgtg 4620
tgttttttt gtttatattc aagtggttat aatttataga ataaagaaag aataaaaaaa 4680
gataaaaaga atagatccca gccctgtgta taactcacta ctttagtcag ttccgcagta 4740
ttacaaaagg atgtcgcaaa cgctgtttgc tcctctacaa aacagacctt aaaaccctaa 4800
aggcttaagt agcaccctcg caagctcggt tgcggccgca atcgggcaaa tcgctgaata 4860
ttccttttgt ctccgaccat caggcacctg agtcgctgtc tttttcgtga cattcagttc 4920
gctgcgctca cggctctggc agtgaatggg ggtaaatggc actacaggcg ccttttatgg 4980
attcatgcaa ggaaactacc cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctcagggcgt 5040
tttatggcgg gtctgctatg tggtgctatc tgactttttg ctgttcagca gttcctgccc 5100

tctgattttc cagtctgacc acttcggatt atcccgtgac aggtcattca gactggctaa 5160
tgcacccagt aaggcagcgg tatcatcaac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 5220
acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 5280
ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta 5340
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt 5400
tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 5460
tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca 5520
gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc 5580
tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 5640
tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag 5700
ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatccccc atgttgtgca aaaaagcggt 5760
tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 5820
ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 5880
gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 5940
ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat 6000
cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 6060
ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 6120
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 6180
gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 6240
ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc 6300
gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctg 6329

<210> 219
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> asd-1 primer

<400> 219
ccttcctaac gcaaattccc tg 22

<210> 220
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> asd-2 primer

<400> 220
ccaatgctct gcttaactcc tg 22

<210> 221
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> asd-3 primer

<400> 221
gcctcgccat gtttcagtac g 21

<210> 222
<211> 21

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> asd-4 primer

<400> 222
ggtctggtgc attccgagta c 21

<210> 223
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> scFv-3 primer

<400> 223
cataatctgg gtccttggtc tgc 23

<210> 224
<211> 5728
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pJW168 plasmid

<400> 224
ttactaatcg ccatcttcca gcaggcgcac cattgcccct gtttcactat ccaggttacg 60
gatatagttc atgacaatat ttacattggt ccagccacca gcttgcatga tctccggtat 120
tgaaactcca gcgcgggcca tatctcgcgc ggctccgaca cgggcactgt gtccagacca 180
ggccaggtat ctctgaccag agtcatcctt agcgccgtaa atcaatcgat gagttgcttc 240
aaaaatccct tccagggcgc gagttgatag ctggctggtg gcagatggcg cggcaacacc 300
atttttctg acccggcaaa acaggtagtt attcggatca tcagctacac cagagacgga 360
aatccatcgc tcgaccagtt tagttacccc caggctaagt gccttctcta cacctgcggt 420
gctaaccagc gttttcgttc tgccaatatg gattaacatt ctcccaccgt cagtacgtga 480
gatatcttta accctgatcc tggcaatttc ggctatacgt aacagggtgt tataagcaat 540
ccccagaaat gccagattac gtatatcctg gcagcgatcg ctattttcca tgagtgaacg 600
aacctggtcg aaatcagtgc gttcgaacgc tagagcctgt tttgcacgtt caccggcatc 660
aacgttttct tttcggatcc gccgcataac cagtgaaaca gcattgctgt cacttggtcg 720
tggcagcccg gaccgacgat gaagcatgtt tagctggccc aaatgttgct ggatagtttt 780
tactgccaga ccgcgcgcct gaagatatag aagataatcg cgaacatctt caggttctgc 840
gggaaaccat ttccggttat tcaacttgca ccatgccgcc cacgaccggc aaacggacag 900
aagcattttc caggtatgct cagaaaacgc ctggcgatcc ctgaacatgt ccatcaggtt 960
cttgcgaacc tcatcactcg ttgcatcgac cggtaatgca ggcaaatttt ggtgtacggg 1020
cagtaaattg gacatgtcaa cggtacctgc agtctagagt cgaggcctgt ttcctgtgtg 1080
aaattgttat ccgctcacaa ttccacacat tatacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 1140
ctggggtgcc taatgagtga gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 1200
cacattatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctgc 1260
ctcgcgcgtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc 1320
acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt 1380
gttggcgggt gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta gcgatagacg gagtgtatcc 1440
gacaccatcg aatggtgcaa aacctttcgc ggtatggcat gatagcgccc ggaagagagt 1500
caattcaggg tggtgaatgt gaaaccagta acgttatacg atgtcgcaga gtatgccggt 1560
gtctcttatc agaccgtttc ccgcgtggtg aaccaggcca gccacgtttc tgcgaaaacg 1620
cgggaaaaag tggaagcggc gatggcggag ctgaattaca ttcccaaccg cgtggcacaa 1680
caactggcgg gcaaacagtc gttgctgatt ggcgttgcca cctccagtct ggccctgcac 1740
gcgccgtcgc aaattgtcgc ggcgattaaa tctcgcgccg atcaactggg tgccagcgtg 1800

gtggtgtcga tggtagaacg aagcggcgtc gaagcctgta aagcggcggt gcacaatctt 1860
ctcgcgcaac gcgtcagtgg gctgatcatt aactatccgc tggatgacca ggatgccatt 1920
gctgtggaag ctgcctgcac taatgttccg gcgttatttc ttgatgtctc tgaccagaca 1980
cccatcaaca gtattatttt ctcccatgaa gacggtacgc gactgggcgt ggagcatctg 2040
gtcgcattgg gtcaccagca aatcgcgctg ttagcgggcc cattaagttc tgtctcggcg 2100
cgtctgcgtc tggctggctg gcataaatat ctcactcgca atcaaattca gccgatagcg 2160
gaacgggaag gcgactggag tgccatgtcc ggttttcaac aaaccatgca aatgctgaat 2220
gagggcatcg ttcccactgc gatgctggtt gccaacgatc agatggcgct gggcgcaatg 2280
cgcgccatta ccgagtccgg gctgcgcgtt ggtgcggata tctcggtagt gggatacgac 2340
gataccgaag acagctcatg ttatatcccg ccgttaacca ccatcaaaca ggattttcgc 2400
ctgctggggc aaaccagcgt ggaccgcttg ctgcaactct ctcagggcca ggcggtgaag 2460
ggcaatcagc tgttgcccgt ctcactggtg aaaagaaaaa ccaccctggc gcccaatacg 2520
caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc 2580
cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aatcaatgtg agttagctca ctcattaggc 2640
accccaggct ttacacttta tgcttccgac catactggct taactatgcg gcatcagagc 2700
agattgtact gagagtgcac catcgatgca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 2760
acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 2820
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 2880
gtcgccctta ttccctttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg 2940
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 3000
gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 3060
agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 3120
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 3180
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg 3240
agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 3300
gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 3360
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 3420
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 3480
tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 3540
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 3600
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 3660
atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa 3720
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 3780
aaaaggatct aggtgaagat ccttttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 3840
ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgtt gatgataccg ctgccttact gggtgcatta 3900
gccagtctga atgacctgtc acgggataat ccgaagtggt cagactggaa aatcagaggg 3960
caggaactgc tgaacagcaa aaagtcagat agcaccacat agcagacccg ccataaaacg 4020
ccctgagaag cccgtgacgg gcttttcttg tattatgggt agtttccttg catgaatcca 4080
taaaaggcgc ctgtagtgcc atttaccccc attcactgcc agagccgtga gcgcagcgaa 4140
ctgaatgtca cgaaaaagac agcgactcag gtgcctgatg gtcggagaca aaaggaatat 4200
tcagcgattt gcccgattgc ggccgcaacc gagcttgcga gggtgctact taagccttta 4260
gggttttaag gtctgttttg tagaggagca aacagcgttt gcgacatcct tttgtaatac 4320
tgcggaactg actaaagtag tgagttatac acagggctgg gatctattct ttttatcttt 4380
ttttattctt tctttattct ataaattata accacttgaa tataaacaaa aaaaacacac 4440
aaaggtctag cggaatttac agagggtcta gcagaattta caagttttcc agcaaaggtc 4500
tagcagaatt tacagatacc cacaactcaa aggaaaagga ctagtaatta tcattgacta 4560
gcccatctca attggtatag tgattaaaat cacctagacc aattgagatg tatgtctgaa 4620
ttagttgttt tcaaagcaaa tgaactagcg attagtcgct atgacttaac ggagcatgaa 4680
accaagctaa ttttatgctg tgtggcacta ctcaacccca cgattgaaaa ccctacaagg 4740
aaagaacgga cggtatcgtt cacttataac caatacgttc agatgatgaa catcagtagg 4800
gaaaatgctt atggtgtatt agctaaagca accagagagc tgatgacgag aactgtggaa 4860
atcaggaatc ctttggttaa aggctttgag attttccagt ggacaaacta tgccaagttc 4920
tcaagcgaaa aattagaatt agtttttagt gaagagatat tgccttatct tttccagtta 4980
aaaaaattca taaaatataa tctggaacat gttaagtctt ttgaaaacaa atactctatg 5040
aggatttatg agtggttatt aaaagaacta acacaaaaga aaactcacaa ggcaaatata 5100
gagattagcc ttgatgaatt taagttcatg ttaatgcttg aaaataacta ccatgagttt 5160
aaaaggctta accaatgggt tttgaaacca ataagtaaag atttaaacac ttacagcaat 5220
atgaaattgg tggttgataa gcgaggccgc ccgactgata cgttgatttt ccaagttgaa 5280
ctagatagac aaatggatct cgtaaccgaa cttgagaaca accagataaa aatgaatggt 5340
gacaaaatac caacaaccat tacatcagat tcctacctac ataacggact aagaaaaaca 5400
ctacacgatg ctttaactgc aaaaattcag ctcaccagtt ttgaggcaaa atttttgagt 5460

gacatgcaaa gtaagyatga tctcaatggt tcgttctcat ggctcacgca aaaacaacga 5520
accacactag agaacatact ggctaaatac ggaaggatct gaggttctta tggctcttgt 5580
atctatcagt gaagcatcaa gactaacaaa caaaagtaga acaactgttc accgttacat 5640
atcaaaggga aaactgtcca tacccatggg ctagctgatc agccagtgcc aagcttgctc 5700
aatcaatcac cggatccccc gggaattc 5728

<210> 225
<211> 3736
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pATIU6 plasmid

<400> 225
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaatggatc caaggtcggg 120
caggaagagg gcctatttcc catgattcct tcatatttgc atatacgata caaggctgtt 180
agagagataa ttagaattaa tttgactgta aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga 240
cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt gcagttttaa aattatgttt taaaatggac 300
tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat ttcgatttct tggctttata tatcttgtgg 360
aaaggacgaa actagttttt tctcgagtag ctagagaatt cttaagccag ccccgacacc 420
cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac 480
aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca tcaccgaaac 540
gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata ggttaatgtc atgataataa 600
tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gaagcttcgc ggaaccccta 660
tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 720
aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 780
ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa acgctggtga 840
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca 900
acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 960
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 1020
gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 1080
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 1140
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 1200
tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 1260
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 1320
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg 1380
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 1440
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag 1500
atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 1560
aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taaaagcttc 1620
tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 1680
aaaggatcta ggtgaagatc ctttatggtg aaggatgcgc cacaggatac tggcgcgcat 1740
acacagcaca tctctttgca ggaaaaaaac gctatgaaaa atgttggttt tatcggctgg 1800
cgcggaatgg tcggctctgt tctcatgcaa cgcatggtag aggagcgcga tttcgacgct 1860
attcgccctg ttttcttttc tacctcccag tttggacagg cggcgcccac cttcggcgac 1920
acctccaccg gcacgctaca ggacgctttt gatctggatg cgctaaaagc gctcgatatc 1980
atcgtgacct gccagggcgg cgattatacc aacgaaattt atccaaagct gcgcgaaagc 2040
ggatggcagg gttactggat tgatgcggct tctacgctgc gcatgaaaga tgatgccatt 2100
attattctcg acccggtcaa ccaggacgtg attaccgacg gcctgaacaa tggcgtgaag 2160
acctttgtgg gcggtaactg taccgttagc ctgatgttga tgtcgctggg cggtctcttt 2220
gcccataatc tcgttgactg ggtatccgtc gcgacctatc aggccgcctc cggcggcggc 2280
gcgcgccata tgcgcgagct gttaacccag atgggtcagt tgtatggcca tgtcgccgat 2340
gaactggcga cgccgtcttc cgcaattctt gatattgaac gcaaagttac ggcattgacc 2400
cgcagcggcg agctgccggt tgataacttt ggcgtaccgc tggcgggaag cctgatcccc 2460
tggatcgaca aacagctcga taacggccag agccgcgaag agtggaaagg ccaggcggaa 2520
accaacaaga ttctcaatac tgcctctgtg attccggttg atggtttgtg tgtgcgcgtc 2580
ggcgcgctgc gctgtcacag ccaggcgttc accatcaagc tgaaaaaaga ggtatccatt 2640
ccgacggtgg aagaactgct ggcggcacat aatccgtggg cgaaagtggt gccgaacgat 2700

cgtgatatca ctatgcgcga attaaccccg gcggcggtga ccggcacgtt gactacgccg 2760
gttggtcgtc tgcgtaagct gaacatgggg ccagagttct tgtcggcgtt taccgtaggc 2820
gaccagttgt tatggggcgc cgccgagccg ctgcgtcgaa tgctgcgcca gttggcgtag 2880
ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc 2940
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atccttttt tctgcgcgta atctgctgct 3000
tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa 3060
ctcttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag 3120
tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc 3180
tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 3240
actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 3300
cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 3360
gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg 3420
tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 3480
ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 3540
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc 3600
cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 3660
cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga 3720
gcgaggaagc ggaaga 3736

<210> 226
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> APR-001 Kan PrimerF

<400> 226
aaaaaagctt gcagctctgg cccgtg 26

<210> 227
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> APR-002 Kan PrimerR

<400> 227
aaaaaagctt ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatga 38

<210> 228
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> APR-003 pATI ori T148CF

<400> 228
acactagaag gacagtattt ggtatctg 28

<210> 229
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> APR-004 pATI ori T148CR

<400> 229
agccgtagtt aggccacc 18

<210> 230
<211> 3203
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pSL0147 plasmid

<400> 230
gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
tccttttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct 1260
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc 1380
ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggttt 1560
cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800
gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1980
cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
accatgatta cgccaagctc ggcgcgccat tgggatggaa cgcgttatcg gcaatctgga 2280
ggcaaagttt aatgataatt ttgcaaaaat aatgcgcgga ataatgatgc ataaagcggc 2340
tatttcgccg cctaagaaaa agatcggggg aagtgaaaaa ttttctaaag ttcgaaattc 2400
aggtgccgat acaagggtta cggtgagaaa ccgtgggcaa cagcccaata acatcaagtt 2460
gtaattgata aggaaaagat catgggctag cctcaataag cttcttgcct ttctgcagac 2520
caaggaccca gattatgttg cagcaggccg gtacctccgt tctggcgcag gcgaaccagg 2580
ttccgcaaaa cgtcctctct ttactgcgtt aatccggcga ttgattcacc gacacgtggt 2640
acacaatcaa ggcagcgaaa gctgcctttt ttaattccgg agcctgtgta atgaaagaaa 2700

tcaccgtcac tgaacctgcc tttgtcaccc gcttttcctg ttctggctcg gcctgtcgcg 2760
accactgttg taagggctgg aaagttccat cccaatacgc gtcaattcac tggccgtcgt 2820
tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca 2880
tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca 2940
gttgcgcagc ctgaatggcg aatggcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcatctgtg 3000
cggtatttca caccgcatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt 3060
aagccagccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 3120
ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 3180
accgtcatca ccgaaacgcg cga 3203

<210> 231
<211> 3196
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pSL0148 plasmid

<400> 231
gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120
tctaaatаca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct 1260
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc 1380
ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggttt 1560
cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800
gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1980
cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
accatgatta cgccaagctc ggcgcgccat tgggatggaa cttccagacg acaagagtat 2280
cgcctttatt tacatacttt aacgctcgtt tcaggccggg gcggtttgca atcttgccac 2340
tgatacggtc ctcaaaaatg cggtcacaat ttgcactagt aagcgcatta cgctgtaaat 2400
cgatattttg gtcaattgtt gacacccgaa tatacccaat agtagccatg attttctcct 2460

ttacatcaga taaggaagaa ttttagtcgc ttttctcatg gaggattgct gctagcctca 2520
ataagcttct tgcctttctg cagaccaagg acccagatta tgtatggaat gtatggctgt 2580
aaatgatatt tcctacgggc gagaagctga aatatggccg cgggattatt ctatgcttgc 2640
tcgtcgagtt caatttctac gttttaatga tatccctgtt cgattggtga gtaataatgc 2700
ccggataatc acaggctaca ttgcgaagtt taatccgaag gaaaatttga ttctggcttc 2760
ggataaacct aaaggagttc catcccaata cgcgtcaatt cactggccgt cgttttacaa 2820
cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatcccccc 2880
ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc 2940
agcctgaatg gcgaatggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt 3000
tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag 3060
ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc 3120
gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca 3180
tcaccgaaac gcgcga 3196

<210> 232
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> flic-1 primer

<400> 232
cgttatcggc aatctggagg c 21

<210> 233
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> flic-2 primer

<400> 233
ccagccctta caacagtggt c 21

<210> 234
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> flic-3 primer

<400> 234
gtctgtcaac aactggtcta acgg 24

<210> 235
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> flic-4 primer

<400> 235
agacggtcct catccagata agg 23

<210> 236
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fljb-1 primer sequence

<400> 236
ttccagacga caagagtatc gc 22

<210> 237
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fljb-2 primer

<400> 237
cctttaggtt tatccgaagc cagaatc 27

<210> 238
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fljb-3 primer

<400> 238
caccaggttt ttcacgctgc 20

<210> 239
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fljb-4 primer

<400> 239
acacgcattt acgcctgtcg 20

<210> 240
<211> 1518
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cytoLLO ORF

<400> 240
atgaaagacg cctccgcgtt taacaaggag aactccatca gctccatggc cccgccccgct 60
tccccgccgg cgagccctaa aaccccgatc gagaaaaagc acgccgacga gattgacaaa 120

tatattcaag gtttagacta caataagaac aacgtgctgg tgtatcacgg cgatgcggtg 180
accaatgttc cgccgcgcaa gggctacaaa gatggtaacg aatatatcgt ggttgagaaa 240
aagaaaaaaa gcatcaacca gaacaacgcc gatatccaag ttgtgaacgc catcagctct 300
ttaacctatc cgggcgcgct ggtgaaagcc aacagcgaac tggtggaaaa ccagcccgat 360
gtgctgccgg tgaaacgcga ttctttaacg ctgagcattg atttaccggg catgacgaac 420
caagataaca aaatcgtggt gaagaacgcg accaagtcca acgtgaacaa cgcggtgaac 480
acgctggtgg aacgctggaa cgaaaaatac gcccaagctt acccgaacgt gagcgcgaag 540
attgactacg acgacgaaat ggcctacagc gagagccagc tgatcgcgaa attcggcacc 600
gcgttcaaag cggtgaacaa ctctttaaac gtgaactttg gcgcgatcag cgaaggcaaa 660
atgcaagaag aggtgatcag ctttaaacaa atctattata acgtgaatgt taacgagccg 720
acgcgtccga gccgcttttt cggcaaagcg gtgacgaagg aacagctgca agcgcttggc 780
gtgaacgcgg aaaaccctcc ggcctatatt tccagcgtgg cgtatggccg ccaagtttat 840
ctgaagctga gcacgaacag ccacagcacc aaagttaagg cggcctttga tgcggcggtg 900
agcggcaaaa gcgttagcgg cgacgttgag ctgacgaaca tcatcaagaa cagctccttt 960
aaagcggtga tctatggcgg tagcgcgaaa gacgaagtgc agatcatcga cggcaattta 1020
ggtgatctgc gcgatatttt aaaaaagggc gccaccttca accgtgagac gcccggtgtg 1080
ccgatcgcct acaccaccaa ctttttaaag gataacgagc tggccgtgat caaaaacaat 1140
tccgaatata tcgaaaccac gagcaaggcg tataccgatg gcaagatcaa cattgaccac 1200
agcggtggct atgtggcgca gttcaacatc agctgggatg aagtgaacta tgatccggag 1260
ggcaacgaga tcgtgcagca caagaactgg tccgagaaca acaaatccaa gctggcgcat 1320
ttcaccagca gcatctatct gccgggcaac gcgcgcaaca ttaatgtgta cgcgaaagag 1380
tgcacgggtc ttgcgtggga atggtggcgc accgtgatcg atgatcgcaa tttaccgctg 1440
gtgaaaaacc gcaacatctc catctggggc accactttat acccgaaata ttccaacaaa 1500
gttgataacc ctattgag 1518

<210> 241
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LLO promoter

<400> 241
attatgtctt gacatgtagt gagtgggctg gtataatgca gcaag 45

<210> 242
<211> 1176
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Asd Gene ORF

<400> 242
ctacgccaac tggcgcagca ttcgacgcag cggctcggcg gcgccccata acaactggtc 60
gcctacggta aacgccgaca agaactctgg ccccatgttc agcttacgca gacgaccaac 120
cggcgtagtc aacgtgccgg tcaccgccgc cggggttaat tcgcgcatag tgatatcacg 180
atcgttcggc accactttcg cccacggatt atgtgccgcc agcagttctt ccaccgtcgg 240
aatggatacc tctttttca gcttgatggt gaacgcctgg ctgtgacagc gcagcgcgcc 300
gacgcgcaca cacaaaccat caaccggaat cacagaggca gtattgagaa tcttgttggt 360
ttccgcctgg cctttccact cttcgcggct ctggccgtta tcgagctgtt tgtcgatcca 420
ggggatcagg cttcccgcca gcggtacgcc aaagttatca accggcagct cgccgctgcg 480
ggtcaatgcc gtaactttgc gttcaatatc aagaattgcg gaagacggcg tcgccagttc 540
atcggcgaca tggccataca actgacccat ctgggttaac agctcgcgca tatggcgcgc 600
gccgccgccg gaggcggcct gataggtcgc gacggatacc cagtcaacga gattatgggc 660
aaagagaccg cccagcgaca tcaacatcag gctaacggta cagttaccgc ccacaaaggt 720
cttcacgcca ttgttcaggc cgtcggtaat cacgtcctgg ttgaccgggt cgagaataat 780
aatggcatca tctttcatgc gcagcgtaga agccgcatca atccagtaac cctgccatcc 840

gctttcgcgc agctttggat aaatttcgtt ggtataatcg ccgccctggc aggtcacgat 900
gatatcgagc gcttttagcg catccagatc aaaagcgtcc tgtagcgtgc cggtggaggt 960
gtcgccgaag gtgggcgccg cctgtccaaa ctgggaggta gaaaagaaaa cagggcgaat 1020
agcgtcgaaa tcgcgctcct ctaccatgcg ttgcatgaga acagagccga ccattccgcg 1080
ccagccgata aaaccaacat ttttcatagc gtttttttcc tgcaaagaga tgtgctgtgt 1140
atgcgcgcca gtatcctgtg gcgcatcctt caccat 1176

<210> 243
<211> 589
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pBR322 Origin

<400> 243
ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 60
agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 120
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 180
caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 240
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 300
ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 360
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 420
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 480
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 540
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaa 589

<210> 244
<211> 3269
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pEQU6 shSCR

<400> 244
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 60
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 120
gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 180
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaata cgcgtaccgc 240
tagccaggaa gagtttgtag aaacgcaaaa aggccatccg tcaggatggc cttctgctta 300
gtttgatgcc tggcagttta tggcgggcgt cctgcccgcc accctccggg ccgttgcttc 360
acaacgttca aatccgctcc cggcggattt gtcctactca ggagagcgtt caccgacaaa 420
caacagataa aacgaaaggc ccagtcttcc gactgagcct ttcgttttat ttgatgcctg 480
gcagttccct actctcgcgt taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttgtaa 540
aacgacggcc agtcttaagc tcgggcccca aataatgatt ttattttgac tgatagtgac 600
ctgttcgttg caacaaattg atgagcaatg ctttttttata atgccaactt tgtacaaaaa 660
agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccaa ggtcgggcag gaagagggcc 720
tatttcccat gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataatta 780
gaattaattt gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat 840
aatttcttgg gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta 900
ccgtaacttg aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaact 960
agcaacaaga tgaagagcac caattctaga gattggtgct cttcatcttg ttgtttttttc 1020
gagtagctag agaattcatg gtaatagcga tgactaatac gtagatgtac tgccaagtag 1080
gaaagtccca taaggtcatg tactgggcat aatgccaggc gggccattta ccgtcattga 1140
cgtcaatagg gggcgtactt ggcatatgat acacttgatg tactgccaag tgggcagttt 1200
accgtaaata gtccacccat tgacgtcaat ggaaagtccc tattggcgtt actatgggaa 1260
catacgtcat tattgacgtc aatgggcggg ggtcgttggg cggtcagcca ggcgggccat 1320
ttaccgtaag ttatgtaacg cggaactcca tatatgggct atgaactaat gaccccgtaa 1380

ttgattacta ttaataacta gacccagctt tcttgtacaa agttggcatt ataagaaagc 1440
attgcttatc aatttgttgc aacgaacagg tcactatcag tcaaaataaa atcattattt 1500
gccatccagc tgatatcccc tatagtgagt cgtattacat ggtcatagct gtttcctggc 1560
agctctggcc cgtgtctcaa aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat 1620
catgaacaat aaaactgtct gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt atgagccata 1680
ttcaacggga aacgtcgagg ccgcgattaa attccaacat ggatgctgat ttatatgggt 1740
ataaatgggc tcgcgataat gtcgggcaat caggtgcgac aatctatcgc ttgtatggga 1800
agcccgatgc gccagagttg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc aatgatgtta 1860
cagatgagat ggtcagacta aactggctga cggaatttat gcctcttccg accatcaagc 1920
attttatccg tactcctgat gatgcatggt tactcaccac tgcgatcccc ggaaaaacag 1980
cattccaggt attagaagaa tatcctgatt caggtgaaaa tattgttgat gcgctggcag 2040
tgttcctgcg ccggttgcat tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac agcgatcgcg 2100
tatttcgtct cgctcaggcg caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat gcgagtgatt 2160
ttgatgacga gcgtaatggc tggcctgttg aacaagtctg gaaagaaatg cataaacttt 2220
tgccattctc accggattca gtcgtcactc atggtgattt ctcacttgat aaccttattt 2280
ttgacgaggg gaaattaata ggttgtattg atgttggacg agtcggaatc gcagaccgat 2340
accaggatct tgccatccta tggaactgcc tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac 2400
ggctttttca aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag tttcatttga 2460
tgctcgatga gtttttctaa tcagaattgg ttaattggtt gtaacactgg cagagcatta 2520
cgctgacttg acgggacggc gcaagctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttacgcgt 2580
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 2640
ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 2700
tgccggatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 2760
taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 2820
caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 2880
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 2940
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 3000
gatacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 3060
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 3120
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 3180
tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac 3240
ggttcctggc cttttgctgg ccttttgct 3269

<210> 245
<211> 4642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pATI2.0 U6-H1 Plasmid

<400> 245
accggtctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 60
agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca accggtcttg cacctcagca 120
aaaggccatc cgtcaggatg gccttctgct tagtttgatg cctggcagtt tatggcgggc 180
gtcctgcccg ccaccctccg ggccgttgct tcacaacgtt caaatccgct cccggcggat 240
ttgtcctact caggagagcg ttcaccgaca aacaacagat aaaacgaaag gcccagtctt 300
ccgactgagc ctttcgtttt atttgggccg gccatgcctg gcagttccct actctcgcgt 360
taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttctta agctcgggcc cttaaaggaa 420
ccaattcagt cgagaattac tagtggtacc atatttgcat gtcgctatgt gttctgggaa 480
atcaccataa acgtgaaatg tctttggatt tgggaatctt ataagttctg tatgagacca 540
ctccctaggt ttttgtcgac agatctggcg cgccgactac caaaatgact tcggatatga 600
ccattatggt gcccgacttc gtaatttacg cgtacccatt tggatgacgg tgcgtccatg 660
tttgttctgc atgcctgaga tagtaaggcc gacccccaac aatccacaag gccacgattg 720
acacatgagg ttccttttt aaacctgaac ctttagttca cacaggtggc tgcgccgccg 780
tgaatggtgg cagtagttac ttctaatcaa gctcaatccc tcggctctga agaggacata 840
gtagacctca tctggtcttt cgactacggg gggtaacaga tgtcggtggt ataacaatcc 900
tccacgagat catttcacgt aagcatgact tttacaccta tcggaatcat ataactgtta 960
ggcaatggtt tatgattggg cgacagacgt cagatcggcg aacctttacg tagccccccg 1020
ttcatctaga caggaagagg gcctatttcc catgattcct tcatatttgc atatacgata 1080

caaggctgtt agagagataa ttagaattaa tttgactgta aacacaaaga tattagtaca 1140
aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt gcagttttaa aattatgttt 1200
taaaatggac tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat ttcgatttct tggctttata 1260
tatcttgtgg aaaggacgaa acttgttttt tctcgagtag ctagagaatt cgtcgacgga 1320
actccatata tgggctatga actaatgacc ccgtaattga ttactattaa taactagcca 1380
tccagctgat atccgccggc gctgcagcta cgccaactgg cgcagcattc gacgcagcgg 1440
ctcggcggcg ccccataaca actggtcgcc tacggtaaac gccgacaaga actctggccc 1500
catgttcagc ttacgcagac gaccaaccgg cgtagtcaac gtgccggtca ccgccgccgg 1560
ggttaattcg cgcatagtga tatcacgatc gttcggcacc actttcgccc acggattatg 1620
tgccgccagc agttcttcca ccgtcggaat ggatacctct tttttcagct tgatggtgaa 1680
cgcctggctg tgacagcgca gcgcgccgac gcgcacacac aaaccatcaa ccggaatcac 1740
agaggcagta ttgagaatct tgttggtttc cgcctggcct ttccactctt cgcggctctg 1800
gccgttatcg agctgtttgt cgatccaggg gatcaggctt cccgccagcg gtacgccaaa 1860
gttatcaacc ggcagctcgc cgctgcgggt caatgccgta actttgcgtt caatatcaag 1920
aattgcggaa gacggcgtcg ccagttcatc ggcgacatgg ccatacaact gacccatctg 1980
ggttaacagc tcgcgcatat ggcgcgcgcc gccgccggag gcggcctgat aggtcgcgac 2040
ggatacccag tcaacgagat tatgggcaaa gagaccgccc agcgacatca acatcaggct 2100
aacggtacag ttaccgccca caaaggtctt cacgccattg ttcaggccgt cggtaatcac 2160
gtcctggttg accgggtcga gaataataat ggcatcatct ttcatgcgca gcgtagaagc 2220
cgcatcaatc cagtaaccct gccatccgct ttcgcgcagc tttggataaa tttcgttggt 2280
ataatcgccg ccctggcagg tcacgatgat atcgagcgct tttagcgcat ccagatcaaa 2340
agcgtcctgt agcgtgccgg tggaggtgtc gccgaaggtg ggcgccgcct gtccaaactg 2400
ggaggtagaa aagaaaacag ggcgaatagc gtcgaaatcg cgctcctcta ccatgcgttg 2460
catgagaaca gagccgacca ttccgcgcca gccgataaaa ccaacatttt tcatagcgtt 2520
tttttcctgc aaagagatgt gctgtgtatg cgcgccagta tcctgtggcg catccttcac 2580
cataaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa 2640
gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtc tgcaggatat cccatgggca ttggcgcaga 2700
aaaaaatgcc tgatgcgacg ctgcgcgtct tatactccca catatgccag attcagcaac 2760
ggatacggct tccccaactt gcccacttcc atacgtgtcc tccttaccag aaatttatcc 2820
ttaaccatgg aagctttgca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg ttacattgca 2880
caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa cagtaataca 2940
aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa ttccaacatg 3000
gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc aggtgcgaca 3060
atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca tggcaaaggt 3120
agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac ggaatttatg 3180
cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt actcaccact 3240
gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc aggtgaaaat 3300
attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt ttgtaattgt 3360
ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat gaataacggt 3420
ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga acaagtctgg 3480
aaagaaatgc ataaactttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca tggtgatttc 3540
tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga tgttggacga 3600
gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct cggtgagttt 3660
tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc tgatatgaat 3720
aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaaa gctttcagaa ttggttaatt 3780
ggttgtaaca ctggcagagc attacgctga cttgacggga cggcgcaagc tcatggatcc 3840
caattggcgg ccgcttaatt aaacatgtga gctcgatgta cattcgaagg accccaaaat 3900
cccttaacgt gagttacgcg tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 3960
gatcttcatc gatttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 4020
aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga 4080
aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt 4140
taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt 4200
taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat 4260
agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct 4320
tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca 4380
cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag 4440
agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc 4500
gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga 4560
aaatcgattc cggaaacgcc aggctcttcc aacgcggcct ttttacggtt gaagagccct 4620
ggccttttgc tggccttttg ct 4642

<210> 246
<211> 1261
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ASD gene orf + 85 bp upstream

<400> 246
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 60
aaaaggatct aggtgaagat cctttatggt gaaggatgcg ccacaggata ctggcgcgca 120
tacacagcac atctctttgc aggaaaaaaa cgctatgaaa aatgttggtt ttatcggctg 180
gcgcggaatg gtcggctctg ttctcatgca acgcatggta gaggagcgcg atttcgacgc 240
tattcgccct gttttctttt ctacctccca gtttggacag gcggcgccca ccttcggcga 300
cacctccacc ggcacgctac aggacgcttt tgatctggat gcgctaaaag cgctcgatat 360
catcgtgacc tgccagggcg gcgattatac caacgaaatt tatccaaagc tgcgcgaaag 420
cggatggcag ggttactgga ttgatgcggc ttctacgctg cgcatgaaag atgatgccat 480
tattattctc gacccggtca accaggacgt gattaccgac ggcctgaaca atggcgtgaa 540
gacctttgtg ggcggtaact gtaccgttag cctgatgttg atgtcgctgg gcggtctctt 600
tgcccataat ctcgttgact gggtatccgt cgcgacctat caggccgcct ccggcggcgg 660
cgcgcgccat atgcgcgagc tgttaaccca gatgggtcag ttgtatggcc atgtcgccga 720
tgaactggcg acgccgtctt ccgcaattct tgatattgaa cgcaaagtta cggcattgac 780
ccgcagcggc gagctgccgg ttgataactt tggcgtaccg ctggcgggaa gcctgatccc 840
ctggatcgac aaacagctcg ataacggcca gagccgcgaa gagtggaaag gccaggcgga 900
aaccaacaag attctcaata ctgcctctgt gattccggtt gatggtttgt gtgtgcgcgt 960
cggcgcgctg cgctgtcaca gccaggcgtt caccatcaag ctgaaaaaag aggtatccat 1020
tccgacggtg gaagaactgc tggcggcaca taatccgtgg gcgaaagtgg tgccgaacga 1080
tcgtgatatc actatgcgcg aattaacccc ggcggcggtg accggcacgt tgactacgcc 1140
ggttggtcgt ctgcgtaagc tgaacatggg gccagagttc ttgtcggcgt ttaccgtagg 1200
cgaccagttg ttatggggcg ccgccgagcc gctgcgtcga atgctgcgcc agttggcgta 1260
g 1261

<210> 247
<211> 4112
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pATI2.0 synthetic v26 scramble pBR322ori.dna

<400> 247
accggtctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 60
agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca accggtcttg cacctcagca 120
aaaggccatc cgtcaggatg gccttctgct tagtttgatg cctggcagtt tatggcgggc 180
gtcctgcccg ccaccctccg ggccgttgct tcacaacgtt caaatccgct cccggcggat 240
ttgtcctact caggagagcg ttcaccgaca aacaacagat aaaacgaaag gcccagtctt 300
ccgactgagc ctttcgtttt atttgggccg gccatgcctg gcagttccct actctcgcgt 360
taacgctagc atggatgttt tcccagtcac gacgttctta agctcgggcc cttaaaggaa 420
ccaattcagt cgagaattac tagtggtacc caggaagagg gcctatttcc catgattcct 480
tcatatttgc atatacgata caaggctgtt agagagataa ttagaattaa tttgactgta 540
aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt 600
gcagttttaa aattatgttt taaaatggac tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat 660
ttcgatttct tggctttata tatcttgtgg aaaggacgaa actagcaaca agatgaagag 720
caccaattct agagattggt gctcttcatc ttgttgtttt tctcgagtag ctagagaatt 780
cgtcgacgga actccatata tgggctatga actaatgacc ccgtaattga ttactattaa 840
taactagcca tccagctgat atccgccggc gctgcagcta cgccaactgg cgcagcattc 900
gacgcagcgg ctcggcggcg ccccataaca actggtcgcc tacggtaaac gccgacaaga 960
actctggccc catgttcagc ttacgcagac gaccaaccgg cgtagtcaac gtgccggtca 1020
ccgccgccgg ggttaattcg cgcatagtga tatcacgatc gttcggcacc actttcgccc 1080

acggattatg tgccgccagc agttcttcca ccgtcggaat ggatacctct tttttcagct 1140
tgatggtgaa cgcctggctg tgacagcgca gcgcgccgac gcgcacacac aaaccatcaa 1200
ccggaatcac agaggcagta ttgagaatct tgttggtttc cgcctggcct ttccactctt 1260
cgcggctctg gccgttatcg agctgtttgt cgatccaggg gatcaggctt cccgccagcg 1320
gtacgccaaa gttatcaacc ggcagctcgc cgctgcgggt caatgccgta actttgcgtt 1380
caatatcaag aattgcggaa gacggcgtcg ccagttcatc ggcgacatgg ccatacaact 1440
gacccatctg ggttaacagc tcgcgcatat ggcgcgcgcc gccgccggag gcggcctgat 1500
aggtcgcgac ggatacccag tcaacgagat tatgggcaaa gagaccgccc agcgacatca 1560
acatcaggct aacggtacag ttaccgccca caaaggtctt cacgccattg ttcaggccgt 1620
cggtaatcac gtcctggttg accgggtcga gaataataat ggcatcatct ttcatgcgca 1680
gcgtagaagc cgcatcaatc cagtaaccct gccatccgct ttcgcgcagc tttggataaa 1740
tttcgttggt ataatcgccg ccctggcagg tcacgatgat atcgagcgct tttagcgcat 1800
ccagatcaaa agcgtcctgt agcgtgccgg tggaggtgtc gccgaaggtg ggcgccgcct 1860
gtccaaactg ggaggtagaa aagaaaacag ggcgaatagc gtcgaaatcg cgctcctcta 1920
ccatgcgttg catgagaaca gagccgacca ttccgcgcca gccgataaaa ccaacatttt 1980
tcatagcgtt tttttcctgc aaagagatgt gctgtgtatg cgcgccagta tcctgtggcg 2040
catccttcac cataaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa 2100
tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtc tgcaggatat cccatgggca 2160
ttggcgcaga aaaaaatgcc tgatgcgacg ctgcgcgtct tatactccca catatgccag 2220
attcagcaac ggatacggct tccccaactt gcccacttcc atacgtgtcc tccttaccag 2280
aaatttatcc ttaaccatgg aagctttgca gctctggccc gtgtctcaaa atctctgatg 2340
ttacattgca caagataaaa atatatcatc atgaacaata aaactgtctg cttacataaa 2400
cagtaataca aggggtgtta tgagccatat tcaacgggaa acgtcgaggc cgcgattaaa 2460
ttccaacatg gatgctgatt tatatgggta taaatgggct cgcgataatg tcgggcaatc 2520
aggtgcgaca atctatcgct tgtatgggaa gcccgatgcg ccagagttgt ttctgaaaca 2580
tggcaaaggt agcgttgcca atgatgttac agatgagatg gtcagactaa actggctgac 2640
ggaatttatg cctcttccga ccatcaagca ttttatccgt actcctgatg atgcatggtt 2700
actcaccact gcgatccccg gaaaaacagc attccaggta ttagaagaat atcctgattc 2760
aggtgaaaat attgttgatg cgctggcagt gttcctgcgc cggttgcatt cgattcctgt 2820
ttgtaattgt ccttttaaca gcgatcgcgt atttcgtctc gctcaggcgc aatcacgaat 2880
gaataacggt ttggttgatg cgagtgattt tgatgacgag cgtaatggct ggcctgttga 2940
acaagtctgg aaagaaatgc ataaacttttt gccattctca ccggattcag tcgtcactca 3000
tggtgatttc tcacttgata accttatttt tgacgagggg aaattaatag gttgtattga 3060
tgttggacga gtcggaatcg cagaccgata ccaggatctt gccatcctat ggaactgcct 3120
cggtgagttt tctccttcat tacagaaacg gctttttcaa aaatatggta ttgataatcc 3180
tgatatgaat aaattgcagt ttcatttgat gctcgatgag tttttctaaa gctttcagaa 3240
ttggttaatt ggttgtaaca ctggcagagc attacgctga cttgacggga cggcgcaagc 3300
tcatggatcc caattggcgg ccgcttaatt aaacatgtga gctcgatgta cattcgaagg 3360
accccaaaat cccttaacgt gagttacgcg tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa 3420
aagatcaaag gatcttcatc gatttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg 3480
caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 3540
ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg 3600
tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg 3660
ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac 3720
tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca 3780
cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga 3840
gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 3900
ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct 3960
gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg 4020
agcctatgga aaatcgattc cggaaacgcc aggctcttcc aacgcggcct ttttacggtt 4080
gaagagccct ggccttttgc tggccttttg ct   4112

<210> 248
<211> 165
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> miR-16-2

<400> 248
ccggatcaac gccctaggtt tatgtttgga tgaactgaca tacttgttcc actctagcag 60
cacgtaaata ttggcgtagt gaaatatata ttaaacacca atattactgt gctgctttag 120
tgtgacaggg atacagcaac tattttatca attgtttgcg tcgac 165

<210> 249
<211> 165
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)...(75)
<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (97)...(117)
<223> n may be any nucleotide

<220>
<221> source
<222> (1)...(165)
<223> microRNA backbone where Ns represent inserted
anti-sense and sense microRNAs

<400> 249
ccggatcaac gccctaggtt tatgtttgga tgaactgaca tacgcgtatc cgtcnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nnnnngtagt gaaatatata ttaaacnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnntac 120
ggtaacgcgg aattcgcaac tattttatca atttttttgcg tcgac 165

<210> 250
<211> 708
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> endA

<400> 250
atgtaccgta atttctcttt tgccgctgtg ttgctggccg cagcgttttc aggccaggcc 60
ctggccgatg gcattaacaa tttttctcag gccaaagcgg cgagcgtcaa agtcaatgct 120
gacgcgcccg gcagctttta ctgcgggtgc caaatccgct ggcagggtaa aaaaggcgtc 180
gtagacctgg agtcctgcgg ctataaggtg cgtaaaaacg agaatcgcgc cagacgcatt 240
gagtgggagc acgttgtccc cgcctggcaa ttcggtcatc agcgccagtg ctggcaggac 300
ggcgggcgaa aaaactgcgc taaagacccg gtctaccgca aaatggaaag cgatatgcat 360
aacctgcaac ccgcgattgg cgaagtgaat ggcgatcgcg gcaactttat gtatagccag 420
tggaacggcg gcgaaggtca gtacgggcag tgcgccatga aagtagattt caaagcgaag 480
ctcgccgagc cgcccgcccg cgcccgtggc gcaatcgccc gcacttattt ttatatgcgc 540
gaccaatacc aactgaaact ttcccgccaa caaacgcagc tttttaacgt ctgggataag 600
cagtaccccg ttaccgcctg ggagtgcgag cgcgatgcgc gtatcgcgaa ggtccagggt 660
aatcataatc cctatgtgca acgcgcttgc caggcgcgaa agagctaa 708

<210> 251
<211> 235
<212> PRT
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> Endonuclease (endA)

<400> 251
Met Tyr Arg Asn Phe Ser Phe Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ala Phe
 1   5   10   15
Ser Gly Gln Ala Leu Ala Asp Gly Ile Asn Asn Phe Ser Gln Ala Lys
            20   25   30
Ala Ala Ser Val Lys Val Asn Ala Asp Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Cys
        35   40   45
Gly Cys Gln Ile Arg Trp Gln Gly Lys Lys Gly Val Val Asp Leu Glu
    50   55   60
Ser Cys Gly Tyr Lys Val Arg Lys Asn Glu Asn Arg Ala Arg Arg Ile
65   70   75   80
Glu Trp Glu His Val Val Pro Ala Trp Gln Phe Gly His Gln Arg Gln
                85   90   95
Cys Trp Gln Asp Gly Gly Arg Lys Asn Cys Ala Lys Asp Pro Val Tyr
            100   105   110
Arg Lys Met Glu Ser Asp Met His Asn Leu Gln Pro Ala Ile Gly Glu
        115   120   125
Val Asn Gly Asp Arg Gly Asn Phe Met Tyr Ser Gln Trp Asn Gly Gly
    130   135   140
Glu Gly Gln Tyr Gly Gln Cys Ala Met Lys Val Asp Phe Lys Ala Lys
145   150   155   160
Ile Ala Glu Pro Pro Ala Arg Ala Arg Gly Ala Ile Ala Arg Ile Tyr
                165   170   175
Phe Tyr Met Arg Asp Gln Tyr Gln Leu Lys Leu Ser Arg Gln Gln Thr
            180   185   190
Gln Leu Phe Asn Val Trp Asp Lys Gln Tyr Pro Val Thr Ala Trp Glu
        195   200   205
Cys Glu Arg Asp Ala Arg Ile Ala Lys Val Gln Gly Asn His Asn Pro
    210   215   220
Tyr Val Gln Arg Ala Cys Gln Ala Arg Lys Ser
225   230   235

<210> 252
<211> 78
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> microRNA-103a1 (miR-103a1)

<400> 252
tactgccctc ggcttcttta cagtgctgcc ttgttgcata tggatcaagc agcattgtac 60
agggctatga aggcattg   78

<210> 253
<211> 71
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> microRNA-30a (miR-30a)

<400> 253
gcgactgtaa acatcctcga ctggaagctg tgaagccaca gatgggcttt cagtcggatg 60
tttgcagctg c   71

<210> 254
<211> 615
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pMB1 origin of replication

<400> 254
aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa 60
ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag 120
gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgta gccgtagtta 180
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta 240
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag 300
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg 360
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg 420
cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag 480
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc 540
cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 600
aacgccagca acgcg 615

<210> 255
<211> 913
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> p15A origin of replication

<400> 255
gcgctagcgg agtgtatact ggcttactat gttggcactg atgagggtgt cagtgaagtg 60
cttcatgtgg caggagaaaa aaggctgcac cggtgcgtca gcagaatatg tgatacagga 120
tatattccgc ttcctcgctc actgactcgc tacgctcggt cgttcgactg cggcgagcgg 180
aaatggctta cgaacggggc ggagatttcc tggaagatgc caggaagata cttaacaggg 240
aagtgagagg gccgcggcaa agccgttttt ccataggctc cgccccctg acaagcatca 300
cgaaatctga cgctcaaatc agtggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 360
gtttccccct ggcggctccc tcgtgcgctc tcctgttcct gcctttcggt ttaccggtgt 420
cattccgctg ttatggccgc gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg 480
cagttcgctc caagctggac tgtatgcacg aacccccccgt tcagtccgac cgctgcgcct 540
tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca ccactggcag 600
cagccactgg taattgattt agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa 660
actgaaagga caagttttgg tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaagag 720
ttggtagctc agagaacctt cgaaaaaccg ccctgcaagg cggtttttc gttttcagag 780
caagagatta cgcgcagacc aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa 840
tatttctaga tttcagtgca atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata 900
cgatataagt tgt 913

<210> 256
<211> 223
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pSC101 origin of replication

<400> 256
gagttataca cagggctggg atctattctt tttatctttt tttattcttt ctttattcta 60
taaattataa ccacttgaat ataaacaaaa aaaacacaca aaggtctagc ggaatttaca 120

gagggtctag cagaatttac aagttttcca gcaaaggtct agcagaattt acagataccc 180
acaactcaaa ggaaaaggac tagtaattat cattgactag ccc 223

<210> 257
<211> 602
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> ColE1 origin of replication

<400> 257
aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 60
accgctacca cggtggtttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 120
aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagtcggg 180
ccactacttc aagaactctg tagcaccgtt tgtgccatca tcgctctgct aatccggtta 240
ccagtggctg ctgccagtgg cgttaaggcg tgccttaccg ggttggactc aagacgatag 300
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggttt cgtgcacaca gcccagcttg 360
gagcgaacga cctacaccga actgagatac caacagcgtg agctatgaga aagcgccacg 420
cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag 480
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc 540
cacctctgac ttgagcgtct atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 600
aa 602

<210> 258
<211> 201
<212> DNA
<213> Pseudomonas syringae

<220>
<223> pPS10 origin of replication

<400> 258
acctgaccgg cgcggaagcg ctcttgatct ttttttcttg tttttacttg ttgttccttg 60
ttttcgtaat tttaactata tgatttataa gaaaaaaaag ggtttaaagg ggacagattc 120
agggtttaaa ggggacagat tcagggttta aaggggacag attcagggtt taaaggggac 180
agattcaggc tgatatccac a 201

<210> 259
<211> 617
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> RK2 origin of replication

<400> 259
ccgggctggt tgccctcgcc gctgggctgg cggccgtcta tggccctgca aacgcgccag 60
aaacgccgtc gaagccgtgt gcgagacacc gcggccgccg gcgttgtgga taccacgcgg 120
aaaacttggc cctcactgac agatgagggg cggacgttga cacttgaggg gccgactcac 180
ccggcgcggc gttgacagat gaggggcagg ctcgatttcg gccggcgacg tggagctggc 240
cagcctcgca aatcggcgaa aacgcctgat tttacgcgag tttcccacag atgatgtgga 300
caagcctggg gataagtgcc ctgcggtatt gacacttgag gggcgcgact actgacagat 360
gaggggcgcg atccttgaca cttgaggggc agagtgatga cagatgaggg gcgcacctat 420
tgacatttga ggggctgtcc acaggcagaa aatccagcat ttgcaagggt ttccgcccgt 480
ttttcggcca ccgctaacct gtcttttaac ctgcttttaa accaatattt ataaaccttg 540
tttttaacca gggctgcgcc ctggcgcgtg accgcgcacg ccgaaggggg gtgccccccc 600
ttctcgaacc ctcccgg 617

<210> 260
<211> 639
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> R6K alpha origin of replication

<400> 260
tcttacttct ttgcgtagct gttaaataca gcgttgtttt gataaaatca tcattatcat 60
cgataatgct ttcttcaatt tttttatcct tactctttaa taaagcactt gctaataact 120
tcataccttt tgcaactgtc aaatttggtt catcagggta aatgctttta aggcatacta 180
acaaataatc atggtcttca tcttcaactc taaactgaat ttttttcatc ataactccca 240
acaagaaccg actgtaggtc accgggcaaa cgctgaaaaa taacgtcgaa tgacgtcatt 300
ttgcggcgtt tgccctatcc tgcatcgcag tagaaaatgc cacaactgaa attgtgcttc 360
agtatgtaca gaaatgcaaa atctgaggga tttcgtagct gaaagatcgc cagtcttcga 420
ccgtaaggat aggagttgct gtaagacctg tgcggggcgt tcgcttcgcg aacgggtctg 480
gcaggggca caagcgctgt gctgtgatat atgcaaaaga agccacccac gaacgggagg 540
gcttcggcga atcgactata gtgatctatt tacccggctg attgtcgcct tctagccctc 600
gcgggcatca tgcaaccagt gcctgaattt agttatatg 639

<210> 261
<211> 1027
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> R6K beta origin of replication

<400> 261
tgaagctttt tttatgaatt tatctgaagc tgatgcagct tttctcaagg tatttgatga 60
aaccgtacct cccaaaaaag ctaaggggtg atatatggct aaaatttacg atttccctca 120
aggagccgaa cgccgcagga tgcaccgcaa aatccagtgg aacaacgctg taaaattatc 180
taaaaatggc tggagtaagc cagaggttaa acgctggtct tttttagcat tcatctcaac 240
tggctggtat tactttcgcc tttcggtagc agtcattttc catatcatta ctatttgtgg 300
tttagctgtg ctcgcggcgt taagcaatac gatattctgg attggtggcg cgatatgtct 360
tgtaacctgg tatacaaatg accatcaaat ttggagtact aacaatctta ctatccctat 420
tgttttcgga ctttgggtgt taagtttagt agctgcacca ctcatagatt ttttcagtca 480
aaaattgccc ttttatcgtc ttcttgtgcc tgatgcgaag cgtgaggaag tgggcgaaga 540
tgattcttaa agccctgccc tgtacggctt taacgccttc tcgcggtaga tctatggatg 600
ttgagaatgt agtatggtta tactgcgatg caggataggg caaacgccgt aaaatgacgt 660
ctttgacgtt atttttcagc gcttgcccgg tgacctacag tcggtgcttg ttgggagatt 720
ttatgaagtt tactagtaaa ggatttttatc agtgataaat atgcaaaggc tattaacatt 780
ttaaatgata accttaaaga aaactactat gtttttttatg gtgtaaggtt aagtgaaatt 840
ctttttcctg caagtgatta tggtacagat gatttttttta aggagtttga ggaaataaac 900
aacgttacct tgcctttagt tgtttttgaa ataaatgaac gtgaacctgt gattgtaatt 960
ggttttgatg aaataaatcc tgcgattctt atagagaaat ccggtataaa ggttttagta 1020
atcggac 1027

<210> 262
<211> 442
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> R6K gamma origin of replication

<400> 262
gatcgctagt ttgttttgac tccatccatt agggcttcta aaacgccttc taaggccatg 60
tcagccgtta agtgttcctg tgtcactgaa aattgctttg agaggctcta agggcttctc 120
agtgcgttac atccctggct tgttgtccac aaccgttaaa ccttaaaagc tttaaaagcc 180
ttatatattc ttttttttct tataaaactt aaaaccttag aggctattta agttgctgat 240
ttatattaat tttattgttc aaacatgaga gcttagtacg tgaaacatga gagcttagta 300
cgttagccat gagagcttag tacgttagcc atgagggttt agttcgttaa acatgagagc 360
ttagtacgtt aaacatgaga gcttagtacg tgaaacatga gagcttagta cgtactatca 420
acaggttgaa ctgctgatct tc 442

<210> 263
<211> 242
<212> DNA
<213> Enterobacteria phage P1

<220>
<223> P1 origin of plasmid replication oriR

<400> 263
tttcccgtca acacacatcc tatatcccgc cagcacacat tagcaacccg tcagcacaca 60
tttttatccc tccagcacac atcgttttcc ctccagcaca catcgcgata cacttctaag 120
ccagacgtgg cgcggcctgc aacgatcagg gatctatatg gatctaattg ggatctgtat 180
ggacctgatt attggatcta tccagtggat aatgtggata agtgaaaaac cggccaacgt 240
ag 242

<210> 264
<211> 792
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> R1 origin of replication

<400> 264
ttatccacat ttaactgcaa gggacttccc cataaggtta caaccgttca tgtcataaag 60
cgccagccgc cagtcttaca gggtgcaatg tatcttttaa acacctgttt atatctcctt 120
taaactactt aattacattc atttaaaaag aaaacctatt cactgcctgt cctgtggaca 180
gacagatatg cacctcccac cgcaagcggc gggccccgac cggagccact ttagttacaa 240
cacacaaaaa caacctccag aaaaaccccg gtccagcgca gaaccgaaac cacaaagccc 300
ctccctcata actgaaaagc ggccccgccc cggcccaaag ggccggaaca gagtcgcttt 360
taattatgaa tgttgtaact acatcttcat cgctgtcagt cttctcgctg gaagttctca 420
gtacacgctc gtaagcggcc ctcacggccc gctaacgcgg agatacgccc cgacttcggg 480
taaaccctcg tcgggaccac tccgaccgcg cacagaagct ctctcatggc tgaaagcggg 540
tatggtctgg cagggctggg gatgggtaag gtgaaatcta tcaatcagta ccggcttacg 600
ccgggcttcg gcggttttac tcctgtatca tatgaaacaa cagagtgccg ccttccatgc 660
cgctgatgcg gcatatcctg gtaacgatat ctgaattgtt atacatgtgt atatacgtgg 720
taatgacaaa aataggacaa gttaaaaatt tacaggcgat gcaatgattc aaacacgtaa 780
tcaatatctg ca 792

<210> 265
<211> 2920
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pWSK origin of replication

<400> 265

ccgatgccct tgagagcctt caacccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact 60
atcgtcgccg cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca gggtgccggc 120
agcgctctgg gtcattttcg gcgaggaccg ctttcgctgg agcgcgacga tgatcggcct 180
gtcgcttgcg gtattcggaa tcttgcacgc cctcgctcaa gccttcgtca ctggtcccgc 240
caccaaacgt ttcggcgaga agcaggccat tatcgccggc atggcggccg acgcgctggg 300
ctacgtcttg ctggcgttcg cgacgcgagg ctggatggcc ttccccatta tgattcttct 360
cgcttccggc ggcatcggga tgcccgcgtt gcaggccatg ctgtccaggc aggtagatga 420
cgaccatcag ggacagcttc aaggatcgct cgcggctctt accagcctaa cttcgatcat 480
tggaccgctg atcgtcacgg cgatttatgc cgcctcggcg agcacatgga acgggttggc 540
atggattgta ggcgccgccc tataccttgt ctgcctcccc gcgttgcgtc gcggtgcatg 600
gagccgggcc acctcgacct gaatggaagc cggcggcacc tcgctaacgg attcaccact 660
ccgcagaccc gccataaaac gccctgagaa gcccgtgacg ggcttttctt gtattatggg 720
tagtttcctt gcatgaatcc ataaaaggcg cctgtagtgc catttacccc cattcactgc 780
cagagccgtg agcgcagcga actgaatgtc acgaaaaaga cagcgactca ggtgcctgat 840
ggtcggagac aaaaggaata ttcagcgatt tgcccgagct tgcgagggtg ctacttaagc 900
ctttagggtt ttaaggtctg ttttgtagag gagcaaacag cgtttgcgac atccttttgt 960
aatactgcgg aactgactaa agtagtgagt tatacacagg gctgggatct attcttttta 1020
tctttttttа ttctttcttt attctataaa ttataaccac ttgaatataa acaaaaaaaa 1080
cacacaaagg tctagcggaa tttacagagg gtctagcaga atttacaagt tttccagcaa 1140
aggtctagca gaatttacag atacccacaa ctcaaaggaa aaggactagt aattatcatt 1200
gactagccca tctcaattgg tatagtgatt aaaatcacct agaccaattg agatgtatgt 1260
ctgaattagt tgttttcaaa gcaaatgaac tagcgattag tcgctatgac ttaacggagc 1320
atgaaaccaa gctaatttta tgctgtgtgg cactactcaa ccccacgatt gaaaacccta 1380
caaggaaaga acggacggta tcgttcactt ataaccaata cgctcagatg atgaacatca 1440
gtagggaaaa tgcttatggt gtattagcta aagcaaccag agagctgatg acgagaactg 1500
tggaaatcag gaatcctttg gttaaaggct ttgagatttt ccagtggaca aactatgcca 1560
agttctcaag cgaaaaatta gaattagttt ttagtgaaga gatattgcct tatcttttcc 1620
agttaaaaaa attcataaaa tataatctgg aacatgttaa gtcttttgaa aacaaatact 1680
ctatgaggat ttatgagtgg ttattaaaag aactaacaca aaagaaaact cacaaggcaa 1740
atatagagat tagccttgat gaatttaagt tcatgttaat gcttgaaaat aactaccatg 1800
agtttaaaag gcttaaccaa tgggttttga aaccaataag taaagattta aacacttaca 1860
gcaatatgaa attggtggtt gataagcgag gccgcccgac tgatacgttg attttccaag 1920
ttgaactaga tagacaaatg gatctcgtaa ccgaacttga gaacaaccag ataaaaatga 1980
atggtgacaa aataccaaca accattacat cagattccta cctacataac ggactaagaa 2040
aaacactaca cgatgcttta actgcaaaaa ttcagctcac cagttttgag gcaaaatttt 2100
tgagtgacat gcaaagtaag tatgatctca atggttcgtt ctcatggctc acgcaaaaac 2160
aacgaaccac actagagaac atactggcta aatacggaag gatctgaggt tcttatggct 2220
cttgtatcta tcagtgaagc atcaagacta acaaacaaaa gtagaacaac tgttcaccgt 2280
tacatatcaa agggaaaact gtccatatgc acagatgaaa acggtgtaaa aaagatagat 2340
acatcagagc ttttacgagt ttttggtgca ttcaaagctg ttcaccatga acagatcgac 2400
aatgtaacag atgaacagca tgtaacacct aatagaacag gtgaaaccag taaaacaaag 2460
caactagaac atgaaattga acacctgaga caacttgtta cagctcaaca gtcacacata 2520
gacagcctga aacaggcgat gctgcttatc gaatcaaagc tgccgacaac acgggagcca 2580
gtgacgcctc ccgtggggaa aaaatcatgg caattctgga agaaatagcg ctttcagccg 2640
gcaaaccggc tgaagccgga tctgcgattc tgataacaaa ctagcaacac cagaacagcc 2700
cgtttgcggg cagcaaaacc cgtacttttg gacgttccgg cggttttttg tggcgagtgg 2760
tgttcgggcg gtgcgcgcaa gatccattat gttaaacggg cgagtttaca tctcaaaacc 2820
gcccgcttaa caccatcaga aatcctcagc gcgattttaa gcaccaaccc ccccccgtaa 2880
cacccaaatc catactgaaa gtggctttgt tgaataaatc 2920

<210> 266
<211> 37
<212> DNA
<213> E. coli

<220>
<223> ColE2 origin of replication

<400> 266
aaaatgagac cagataagcc ttatcagata acagcgc 37

<210> 267
<211> 668
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pUC origin of replication

<400> 267
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 60
cataggctcc gccccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 120
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 180
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg 240
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 300
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 360
cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 420
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 480
tacggctaca ctagaagaac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 540
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 600
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 660
ttttctac 668

<210> 268
<211> 457
<212> DNA
<213> Bacteriophage F1

<220>
<223> F1 origin of replication

<400> 268
gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 60
gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc 120
acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt 180
agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg 240
ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt 300
ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc ttttgattta 360
taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt 420
aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaattt 457

<210> 269
<211> 534
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL-7

<400> 269
atgttccatg tttcttttag gtatatcttt ggacttcctc ccctgatcct tgttctgttg 60
ccagtagcat catctgattg tgatattgaa ggtaaagatg gcaaacaata tgagagtgtt 120
ctaatggtca gcatcgatca attattggac agcatgaaag aaattggtag caattgcctg 180
aataatgaat ttaacttttt taaaagacat atctgtgatg ctaataagga aggtatgttt 240
ttattccgtg ctgctcgcaa gttgaggcaa tttcttaaaa tgaatagcac tggtgatttt 300
gatctccact tattaaaagt ttcagaaggc acaacaatac tgttgaactg cactggccag 360
gttaaaggaa gaaaaccagc tgccctgggt gaagcccaac caacaaagag tttggaagaa 420
aataaatctt taaaggaaca gaaaaaactg aatgacttgt gtttcctaaa gagactatta 480
caagagataa aaacttgttg gaataaaatt ttgatgggca ctaaagaaca ctga 534

<210> 270
<211> 987
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL12B

<400> 270
atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg ttttccctgg tttttctggc atctcccctc 60
gtggccatat gggaactgaa gaaagatgtt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat 120
gcccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacacccctg aagaagatgg tatcacctgg 180
accttggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgaccat ccaagtcaaa 240
gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg 300
ctcctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatatttt aaaggaccag 360
aaagaaccca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgtttc 420
acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga 480
ggctcttctg acccccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc 540
agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgccca 600
gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atggtggatg ccgttcacaa gctcaagtat 660
gaaaactaca ccagcagctt cttcatcagg gacatcatca aacctgaccc acccaagaac 720
ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga gtaccctgac 780
acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggcaag 840
agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc 900
cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcgggcc caggaccgct actatagctc atcttggagc 960
gaatgggcat ctgtgccctg cagttag   987

<210> 271
<211> 762
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL12A

<400> 271
atgtggcccc ctgggtcagc ctcccagcca ccgccctcac ctgccgcggc cacaggtctg 60
catccagcgg ctcgccctgt gtccctgcag tgccggctca gcatgtgtcc agcgcgcagc 120
ctcctccttg tggctaccct ggtcctcctg gaccacctca gtttggccag aaacctcccc 180
gtggccactc cagacccagg aatgttccca tgccttcacc actcccaaaa cctgctgagg 240
gccgtcagca acatgctcca gaaggccaga caaactctag aattttaccc ttgcacttct 300
gaagagattg atcatgaaga tatcacaaaa gataaaacca gcacagtgga ggcctgttta 360
ccattggaat taaccaagaa tgagagttgc ctaaattcca gagagacctc tttcataact 420
aatgggagtt gcctggcctc cagaaagacc tcttttatga tggccctgtg ccttagtagt 480
atttatgaag acttgaagat gtaccaggtg gagttcaaga ccatgaatgc aaagcttctg 540
atggatccta agaggcagat ctttctagat caaaacatgc tggcagttat tgatgagctg 600
atgcaggccc tgaatttcaa cagtgagact gtgccacaaa aatcctccct tgaagaaccg 660
gatttttata aaactaaaat caagctctgc atacttcttc atgctttcag aattcgggca 720
gtgactattg atagagtgat gagctatctg aatgcttcct aa   762

<210> 272
<211> 489
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL-15

<400> 272
atgagaattt cgaaaccaca tttgagaagt atttccatcc agtgctactt gtgtttactt 60

ctaaacagtc attttctaac tgaagctggc attcatgtct tcattttggg ctgtttcagt 120
gcagggcttc ctaaaacaga agccaactgg gtgaatgtaa taagtgattt gaaaaaaatt 180
gaagatctta ttcaatctat gcatattgat gctactttat atacggaaag tgatgttcac 240
cccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc tttctcttgg agttacaagt tatttcactt 300
gagtccggag atgcaagtat tcatgataca gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacaac 360
agtttgtctt ctaatgggaa tgtaacagaa tctggatgca aagaatgtga ggaactggag 420
gaaaaaaata ttaaagaatt tttgcagagt tttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac 480
acttcttga 489

<210> 273
<211> 804
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IL15RA

<400> 273
atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60
ctgctgctcc ggccgccggc gacgcggggc atcacgtgcc ctccccccat gtccgtggaa 120
cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180
tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtgtt gaacaaggcc 240
acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagaccc tgccctggtt 300
caccaaaggc cagcgccacc ctccacagta acgacggcag gggtgacccc acagccagag 360
agcctctccc cttctggaaa agagcccgca gcttcatctc ccagctcaaa caacacagcg 420
gccacaacag cagctattgt cccgggctcc cagctgatgc cttcaaaatc accttccaca 480
ggaaccacag agataagcag tcatgagtcc tcccacggca ccccctctca gacaacagcc 540
aagaactggg aactcacagc atccgcctcc caccagccgc caggtgtgta tccacagggc 600
cacagcgaca ccactgtggc tatctccacg tccactgtcc tgctgtgtgg gctgagcgct 660
gtgtctctcc tggcatgcta cctcaagtca aggcaaactc ccccgctggc cagcgttgaa 720
atggaagcca tggaggctct gccggtgact tgggggacca gcagcagaga tgaagacttg 780
gaaaactgct ctcaccacct atga 804

<210> 274
<211> 378
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CXCL9

<400> 274
atgaagaaaa gtggtgttct tttcctcttg ggcatcatct tgctggttct gattggagtg 60
caaggaaccc cagtagtgag aaagggtcgc tgttcctgca tcagcaccaa ccaagggact 120
atccacctac aatccttgaa agaccttaaa caatttgccc caagcccttc ctgcgagaaa 180
attgaaatca ttgctacact gaagaatgga gttcaaacat gtctaaaccc agattcagca 240
gatgtgaagg aactgattaa aaagtgggag aaacaggtca gccaaaagaa aaagcaaaag 300
aatgggaaaa aacatcaaaa aaagaaagtt ctgaaagttc gaaaatctca acgttctcgt 360
caaaagaaga ctacataa 378

<210> 275
<211> 297
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CXCL10

<400> 275
atgaatcaaa ctgccattct gatttgctgc cttatctttc tgactctaag tggcattcaa 60
ggagtacctc tctctagaac tgtacgctgt acctgcatca gcattagtaa tcaacctgtt 120

aatccaaggt ctttagaaaa acttgaaatt attcctgcaa gccaattttg tccacgtgtt 180
gagatcattg ctacaatgaa aaagaagggt gagaagagat gtctgaatcc agaatcgaag 240
gccatcaaga atttactgaa agcagttagc aaggaaaggt ctaaaagatc tccttaa 297

<210> 276
<211> 285
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CXCL11

<400> 276
atgagtgtga agggcatggc tatagccttg gctgtgatat tgtgtgctac agttgttcaa 60
ggcttcccca tgttcaaaag aggacgctgt ctttgcatag gccctggggt aaaagcagtg 120
aaagtggcag atattgagaa agcctccata atgtacccaa gtaacaactg tgacaaaata 180
gaagtgatta ttaccctgaa agaaaataaa ggacaacgat gcctaaatcc caaatcgaag 240
caagcaaggc ttataatcaa aaaagttgaa agaaagaatt tttaa 285

<210> 277
<211> 465
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CCL5

<400> 277
atgaaggtct ccgcggcagc cctcgctgtc atcctcattg ctactgccct ctgcgctcct 60
gcatctgcct ccccatattc ctcggacacc acaccctgct gctttgccta cattgcccgc 120
ccactgcccc gtgcccacat caaggagtat ttctacacca gtggcaagtg ctccaaccca 180
gcagtcgtcc acaggtcaag gatgccaaag agagagggac agcaagtctg gcaggatttc 240
ctgtatgact cccggctgaa caagggcaag ctttgtcacc cgaaagaacc gccaagtgtg 300
tgccaaccca gagaagaaat gggttcggga gtacatcaac tctttggaga tgagctagga 360
tggagagtcc ttgaacctga acttacacaa atttgcctgt ttctgcttgc tcttgtccta 420
gcttgggagg cttcccctca ctatcctacc ccacccgctc cttga 465

<210> 278
<211> 765
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> 4-1BB Ligand

<400> 278
atggaatacg cctctgacgc ttcactggac cccgaagccc cgtggcctcc cgcgccccgc 60
gctcgcgcct gccgcgtact gccttgggcc ctggtcgcgg ggctgctgct gctgctgctg 120
ctcgctgccg cctgcgccgt cttcctcgcc tgcccctggg ccgtgtccgg ggctcgcgcc 180
tcgcccggct ccgcggccag cccgagactc cgcgagggtc ccgagctttc gcccgacgat 240
cccgccggcc tcttggacct gcggcagggc atgtttgcgc agctggtggc ccaaaatgtt 300
ctgctgatcg atgggcccct gagctggtac agtgacccag gcctggcagg cgtgtcctg 360
acgggggcc tgagctacaa agaggacacg aaggagctgg tggtggccaa ggctggagtc 420
tactatgtct tctttcaact agagctgcgg cgcgtggtgg ccggcgaggg ctcaggctcc 480
gtttcacttg cgctgcacct gcagccactg cgctctgctg ctggggccgc cgccctggct 540
ttgaccgtgg acctgccacc cgcctcctcc gaggctcgga actcggcctt cggtttccag 600
ggccgcttgc tgcacctgag tgccggccag cgcctgggcg tccatcttca cactgaggcc 660
agggcacgcc atgcctggca gcttacccag ggcgccacag tcttgggact cttccgggtg 720
acccccgaaa tcccagccgg actcccttca ccgaggtcgg aataa 765

<210> 279

<211> 1368
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF1A

<400> 279
atgggcctct ccaccgtgcc tgacctgctg ctgccactgg tgctcctgga gctgttggtg 60
ggaatatacc cctcaggggt tattggactg gtccctcacc taggggacag ggagaagaga 120
gatagtgtgt gtccccaagg aaaatatatc caccctcaaa ataattcgat ttgctgtacc 180
aagtgccaca aaggaaccta cttgtacaat gactgtccag gcccggggca ggatacggac 240
tgcagggagt gtgagagcgg ctccttcacc gcttcagaaa accacctcag acactgcctc 300
agctgctcca aatgccgaaa ggaaatgggt caggtggaga tctcttcttg cacagtggac 360
cgggacaccg tgtgtggctg caggaagaac cagtaccggc attattggag tgaaaacctt 420
ttccagtgct tcaattgcag cctctgcctc aatgggaccg tgcacctctc ctgccaggag 480
aaacagaaca ccgtgtgcac ctgccatgca ggtttctttc taagagaaaa cgagtgtgtc 540
tcctgtagta actgtaagaa aagcctggag tgcacgaagt tgtgcctacc ccagattgag 600
aatgttaagg gcactgagga ctcaggcacc acagtgctgt tgcccctggt cattttcttt 660
ggtctttgcc ttttatccct cctcttcatt ggtttaatgt atcgctacca acggtggaag 720
tccaagctct actccattgt ttgtgggaaa tcgacacctg aaaaagaggg ggagcttgaa 780
ggaactacta ctaagccccct ggccccaaac ccaagcttca gtcccactcc aggcttcacc 840
cccaccctgg gcttcagtcc cgtgcccagt tccaccttca cctccagctc cacctatacc 900
cccggtgact gtcccaactt tgcggctccc cgcagagagg tggcaccacc ctatcagggg 960
gctgacccca tccttgcgac agccctcgcc tccgacccca tccccaaccc ccttcagaag 1020
tgggaggaca gcgcccacaa gccacagagc ctagacactg atgaccccgc gacgctgtac 1080
gccgtggtgg agaacgtgcc cccgttgcgc tggaaggaat tcgtgcggcg cctagggctg 1140
agcgaccacg agatcgatcg gctggagctg cagaacgggc gctgcctgcg cgaggcgcaa 1200
tacagcatgc tggcgacctg gaggcggcgc acgccgcggc gcgaggccac gctggagctg 1260
ctgggacgcg tgctccgcga catggacctg ctgggctgcc tggaggacat cgaggaggcg 1320
ctttgcggcc ccgccgccct cccgcccgcg cccagtcttc tcagatga 1368

<210> 280
<211> 1386
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF1B

<400> 280
atggcgcccg tcgccgtctg ggccgcgctg gccgtcggac tggagctctg ggctgcggcg 60
cacgccttgc ccgcccaggt ggcatttaca ccctacgccc cggagcccgg gagcacatgc 120
cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaatg ctcgccgggc 180
caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac 240
agcacataca cccagctctg gaactgggtt cccgagtgct tgagctgtgg ctcccgctgt 300
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcgggaac agaaccgcat ctgcacctgc 360
aggcccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg 420
cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg 480
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg 540
ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc 600
acgtccacgt cccccacccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg 660
tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaaccca gcactgctcc aagcacctcc 720
ttcctgctcc caatgggccc cagcccccca gctgaaggga gcactggcga cttcgctctt 780
ccagttggac tgattgtggg tgtgacagcc ttgggtctac taataatagg agtggtgaac 840
tgtgtcatca tgacccaggt gaaaaagaag cccttgtgcc tgcagagaga agccaaggtg 900
cctcacttgc ctgccgataa ggcccggggt acacagggcc ccgagcagca gcacctgctg 960
atcacagcgc cgagctccag cagcagctcc ctggagagct cggccagtgc gttggacaga 1020
agggcgccca ctcggaacca gccacaggca ccaggcgtgg aggccagtgg ggccggggag 1080
gcccgggcca gcaccgggag ctcagattct tcccctggtg gccatgggac ccaggtcaat 1140
gtcacctgca tcgtgaacgt ctgtagcagc tctgaccaca gctcacagtg ctcctcccaa 1200

gccagctcca caatgggaga cacagattcc agcccctcgg agtccccgaa ggacgagcag 1260
gtccccttct ccaaggagga atgtgccttt cggtcacagc tggagacgcc agagaccctg 1320
ctggggagca ccgaagagaa gcccctgccc cttggagtgc ctgatgctgg gatgaagccc 1380
agttaa 1386

<210> 281
<211> 1308
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> LTBR

<400> 281
atgctcctgc cttgggccac ctctgccccc ggcctggcct gggggcctct ggtgctgggc 60
ctcttcgggc tcctggcagc atcgcagccc caggcggtgc ctccatatgc gtcggagaac 120
cagacctgca gggaccagga aaaggaatac tatgagcccc agcaccgcat ctgctgctcc 180
cgctgcccgc caggcaccta tgtctcagct aaatgtagcc gcatccggga cacagtttgt 240
gccacatgtg ccgagaattc ctacaacgag cactggaact acctgaccat ctgccagctg 300
tgccgccccct gtgacccagt gatgggcctc gaggagattg ccccctgcac aagcaaacgg 360
aagacccagt gccgctgcca gccgggaatg ttctgtgctg cctgggccct cgagtgtaca 420
cactgcgagc tactttctga ctgcccgcct ggcactgaag ccgagctcaa agatgaagtt 480
gggaagggta acaaccactg cgtcccctgc aaggccgggc acttccagaa tacctcctcc 540
cccagcgccc gctgccagcc ccacaccagg tgtgagaacc aaggtctggt ggaggcagct 600
ccaggcactg cccagtccga cacaacctgc aaaaatccat tagagccact gcccccagag 660
atgtcaggaa ccatgctgat gctggccgtt ctgctgccac tggccttctt tctgctcctt 720
gccaccgtct tctcctgcat ctggaagagc cacccttctc tctgcaggaa actgggatcg 780
ctgctcaaga ggcgtccgca gggagaggga cccaatcctg tagctggaag ctgggagcct 840
ccgaaggccc atccatactt ccctgacttg gtacagccac tgctacccat ttctggagat 900
gtttccccag tatccactgg gctccccgca gccccagttt tggaggcagg ggtgccgcaa 960
cagcagagtc ctctggacct gaccagggag ccgcagttgg aacccgggga gcagagccag 1020
gtggcccacg gtaccaatgg cattcatgtc accggcgggt ctatgactat cactggcaac 1080
atctacatct acaatggacc agtactgggg ggaccaccgg gtcctggaga cctcccagct 1140
acccccgaac ctccataccc cattcccgaa gaggggggacc ctggccctcc cgggctctct 1200
acaccccacc aggaagatgg caaggcttgg cacctagcgg agacagagca ctgtggtgcc 1260
acaccctcta acaggggccc aaggaaccaa tttatcaccc atgactga 1308

<210> 282
<211> 1008
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> FAS

<400> 282
atgctgggca tctggaccct cctacctctg gttcttacgt ctgttgctag attatcgtcc 60
aaaagtgtta atgcccaagt gactgacatc aactccaagg gattggaatt gaggaagact 120
gttactacag ttgagactca gaacttggaa ggcctgcatc atgatggcca attctgccat 180
aagccctgtc ctccaggtga aaggaaagct agggactgca cagtcaatgg ggatgaacca 240
gactgcgtgc cctgccaaga agggaaggag tacacagaca aagcccattt ttcttccaaa 300
tgcagaagat gtagattgtg tgatgaagga catggcttag aagtggaaat aaactgcacc 360
cggacccaga ataccaagtg cagatgtaaa ccaaactttt tttgtaactc tactgtatgt 420
gaacactgtg acccttgcac caaatgtgaa catggaatca tcaaggaatg cacactcacc 480
agcaacacca agtgcaaaga ggaaggatcc agatctaact tggggtggct ttgtcttctt 540
cttttgccaa ttccactaat tgtttgggtg aagagaaagg aagtacagaa aacatgcaga 600
aagcacagaa aggaaaacca aggttctcat gaatctccaa ctttaaatcc tgaaacagtg 660
gcaataaatt tatctgatgt tgacttgagt aaatatatca ccactattgc tggagtcatg 720
acactaagtc aagttaaagg ctttgttcga aagaatggtg tcaatgaagc caaaatagat 780
gagatcaaga atgacaatgt ccaagacaca gcagaacaga aagttcaact gcttcgtaat 840
tggcatcaac ttcatggaaa gaaagaagcg tatgacacat tgattaaaga tctcaaaaaa 900

gccaatcttt gtactcttgc agagaaaatt cagactatca tcctcaagga cattactagt 960
gactcagaaa attcaaactt cagaaatgaa atccaaagct tggtctag 1008

<210> 283
<211> 903
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF6B

<400> 283
atgagggcgc tggaggggcc aggcctgtcg ctgctgtgcc tggtgttggc gctgcctgcc 60
ctgctgccgg tgccggctgt acgcggagtg gcagaaacac ccacctaccc ctggcgggac 120
gcagagacag gggagcggct ggtgtgcgcc cagtgccccc caggcacctt tgtgcagcgg 180
ccgtgccgcc gagacagccc cacgacgtgt ggcccgtgtc caccgcgcca ctacacgcag 240
ttctggaact acctagagcg ctgccgctac tgcaacgtcc tctgcgggga gcgtgaggag 300
gaggcacggg cttgccacgc cacccacaac cgtgcctgcc gctgccgcac cggcttcttc 360
gcgcacgctg gtttctgctt ggagcacgca tcgtgtccac ctggtgccgg cgtgattgcc 420
ccgggcaccc ccagccagaa cacgcagtgc cagccgtgcc ccccaggcac cttctcagcc 480
agcagctcca gctcagagca gtgccagccc caccgcaact gcacggccct gggcctggcc 540
ctcaatgtgc caggctcttc ctcccatgac accctgtgca ccagctgcac tggcttcccc 600
ctcagcacca gggtaccagg agctgaggag tgtgagcgtg ccgtcatcga ctttgtggct 660
ttccaggaca tctccatcaa gaggctgcag cggctgctgc aggccctcga ggccccggag 720
ggctggggtc cgacaccaag ggcgggccgc gcggccttgc agctgaagct gcgtcggcgg 780
ctcacggagc tcctgggggc gcaggacggg gcgctgctgg tgcggctgct gcaggcgctg 840
cgcgtggcca ggatgcccgg gctggagcgg agcgtccgtg agcgcttcct ccctgtgcac 900
tga 903

<210> 284
<211> 783
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CD27

<400> 284
atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc gttctgggga ccctggtggg gctctcagct 60
actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctcagggaaa gctgtgctgc 120
cagatgtgtg agccaggaac attcctcgtg aaggactgtg accagcatag aaaggctgct 180
cagtgtgatc cttgcatacc gggggtctcc ttctctcctg accaccacac ccggccccac 240
tgtgagagct gtcggcactg taactctggt cttctcgttc gcaactgcac catcactgcc 300
aatgctgagt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg caccgagtgt 360
gatcctcttc caaacccttc gctgaccgct cggtcgtctc aggccctgag cccacaccct 420
cagcccaccc acttacctta tgtcagtgag atgctggagg ccaggacagc tgggcacatg 480
cagactctgg ctgacttcag gcagctgcct gcccggactc tctctaccca ctggccaccc 540
caaagatccc tgtgcagctc cgattttatt cgcatccttg tgatcttctc tggaatgttc 600
cttgttttca ccctggccgg ggccctgttc ctccatcaac gaaggaaata tagatcaaac 660
aaaggagaaa gtcctgtgga gcctgcagag ccttgtcgtt acagctgccc cagggaggag 720
gagggcagca ccatccccat ccaggaggat taccgaaaac cggagcctgc ctgctccccc 780
tga 783

<210> 285
<211> 1788
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF8

<400> 285
atgcgcgtcc tcctcgccgc gctgggactg ctgttcctgg gggcgctacg agccttccca 60
caggatcgac ccttcgagga cacctgtcat ggaaacccca gccactacta tgacaaggct 120
gtcaggaggt gctgttaccg ctgccccatg gggctgttcc cgacacagca gtgcccacag 180
aggcctactg actgcaggaa gcagtgtgag cctgactact acctggatga ggccgaccgc 240
tgtacagcct gcgtgacttg ttctcgagac gacctcgtgg agaagacgcc gtgtgcatgg 300
aactcctccc gtgtctgcga atgtcgaccc ggcatgttct gttccacgtc tgccgtcaac 360
tcctgtgccc gctgcttctt ccattctgtc tgtccggcag ggatgattgt caagttccca 420
ggcacggcgc agaagaacac ggtctgtgag ccggcttccc caggggtcag ccctgcctgt 480
gccagcccag agaactgcaa ggaaccctcc agtggcacca tcccccaggc caagcccacc 540
ccggtgtccc cagcaacctc cagtgccagc accatgcctg taagaggggg cacccgcctc 600
gcccaggaag ctgcttctaa actgacgagg gctcccgact ctccctcctc tgtgggaagg 660
cctagttcag atccaggtct gtccccaaca cagccatgcc cagaggggtc tggtgattgc 720
agaaagcagt gtgagcccga ctactacctg gacgaggccg gccgctgcac ggcctgcgtg 780
agctgttctc gagatgacct tgtggagaag acgccatgtg catggaactc ctcccgcacc 840
tgcgaatgtc gacctggcat gatctgtgcc acatcagcca ccaactcctg tgcccgctgt 900
gtcccctacc caatctgtgc agcagagacg gtcaccaagc cccaggatat ggctgagaag 960
gacaccacct ttgaggcgcc acccctgggg acccagccgg actgcaaccc caccccagag 1020
aatggcgagg cgcctgccag caccagcccc actcagagct tgctggtgga ctcccaggcc 1080
agtaagacgc tgcccatccc aaccagcgct cccgtcgctc tctcctccac ggggaagccc 1140
gttctggatg cagggccagt gctcttctgg gtgatcctgg tgttggttgt ggtggtcggc 1200
tccagcgcct tcctcctgtg ccaccggagg gcctgcagga agcgaattcg gcagaagctc 1260
cacctgtgct acccggtcca gacctcccag cccaagctag agcttgtgga ttccagaccc 1320
aggaggagct caacgcagct gaggagtggt gcgtcggtga cagaacccgt cgcggaagag 1380
cgagggttaa tgagccagcc actgatggag acctgccaca gcgtgggggc agcctacctg 1440
gagagcctgc cgctgcagga tgccagcccg gccgggggcc cctcgtcccc cagggacctt 1500
cctgagcccc gggtgtccac ggagcacacc aataacaaga ttgagaaaat ctacatcatg 1560
aaggctgaca ccgtgatcgt ggggaccgtg aaggctgagc tgccggaggg ccggggcctg 1620
gcggggccag cagagcccga gttggaggag gagctggagg cggaccatac cccccactac 1680
cccgagcagg agacagaacc gcctctgggc agctgcagcg atgtcatgct ctcagtggaa 1740
gaggaaggga aagaagaccc cttgcccaca gctgcctctg gaaagtga 1788

<210> 286
<211> 1407
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF10A

<400> 286
atggcgccac caccagctag agtacatcta ggtgcgttcc tggcagtgac tccgaatccc 60
gggagcgcag cgagtgggac agaggcagcc gcggccacac ccagcaaagt gtggggctct 120
tccgcgggga ggattgaacc acgaggcggg ggccgaggag cgctccctac ctccatggga 180
cagcacggac ccagtgcccg ggcccgggca gggcgcgccc caggacccag gccggcgcgg 240
gaagccagcc ctcggctccg ggtccacaag accttcaagt ttgtcgtcgt cggggtcctg 300
ctgcaggtcg tacctagctc agctgcaacc atcaaacttc atgatcaatc aattggcaca 360
cagcaatggg aacatagccc tttgggagag ttgtgtccac caggatctca tagatcagaa 420
catcctggag cctgtaaccg gtgcacagag ggtgtgggtt acaccaatgc ttccaacaat 480
ttgtttgctt gcctcccatg tacagcttgt aaatcagatg aagaagagag aagtccctgc 540
accacgacca ggaacacagc atgtcagtgc aaaccaggaa ctttccggaa tgacaattct 600
gctgagatgt gccggaagtg cagcagaggg tgccccagag ggatggtcaa ggtcaaggat 660
tgtacgccct ggagtgacat cgagtgtgtc cacaaagaat caggcaatgg acataatata 720
tgggtgattt tggttgtgac tttggttgtt ccgttgctgt tggtggctgt gctgattgtc 780
tgttgttgca tcggctcagg ttgtggaggg gaccccaagt gcatggacag ggtgtgtttc 840
tggcgcttgg gtctcctacg agggcctggg gctgaggaca atgctcacaa cgagattctg 900
agcaacgcag actcgctgtc cactttcgtc tctgagcagc aaatggaaag ccaggagccg 960
gcagatttga caggtgtcac tgtacagtcc ccaggggagg cacagtgtct gctgggaccg 1020
gcagaagctg aagggtctca gaggaggagg ctgctggttc cagcaaatgg tgctgacccc 1080
actgagactc tgatgctgtt ctttgacaag tttgcaaaca tcgtgccctt tgactcctgg 1140
gaccagctca tgaggcagct ggacctcacg aaaaatgaga tcgatgtggt cagagctggt 1200

acagcaggcc caggggatgc cttgtatgca atgctgatga aatgggtcaa caaaactgga 1260
cggaacgcct cgatccacac cctgctggat gccttggaga ggatggaaga gagacatgca 1320
agagagaaga ttcaggacct cttggtggac tctggaaagt tcatctactt agaagatggc 1380
acaggctctg ccgtgtcctt ggagtga 1407

<210> 287
<211> 1323
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF10B

<400> 287
atggaacaac ggggacagaa cgccccggcc gcttcggggg cccggaaaag gcacggccca 60
ggacccaggg aggcgcgggg agccaggcct gggccccggg tccccaagac ccttgtgctc 120
gttgtcgccg cggtcctgct gttggtctca gctgagtctg ctctgatcac ccaacaagac 180
ctagctcccc agcagagagc ggccccacaa caaaagaggt ccagcccctc agagggattg 240
tgtccacctg gacaccatat ctcagaagac ggtagagatt gcatctcctg caaatatgga 300
caggactata gcactcactg gaatgacctc cttttctgct tgcgctgcac caggtgtgat 360
tcaggtgaag tggagctaag tccctgcacc acgaccagaa acacagtgtg tcagtgcgaa 420
gaaggcacct tccgggaaga agattctcct gagatgtgcc ggaagtgccg cacagggtgt 480
cccagaggga tggtcaaggt cggtgattgt acaccctgga gtgacatcga atgtgtccac 540
aaagaatcag gtacaaagca cagtggggaa gtcccagctg tggaggagac ggtgacctcc 600
agcccaggga ctcctgcctc tccctgttct ctctcaggca tcatcatagg agtcacagtt 660
gcagccgtag tcttgattgt ggctgtgttt gtttgcaagt ctttactgtg gaagaaagtc 720
cttccttacc tgaaaggcat ctgctcaggt ggtggtgggg accctgagcg tgtggacaga 780
agctcacaac gacctggggc tgaggacaat gtcctcaatg agatcgtgag tatcttgcag 840
cccacccagg tccctgagca ggaaatggaa gtccaggagc cagcagagcc aacaggtgtc 900
aacatgttgt cccccgggga gtcagagcat ctgctggaac cggcagaagc tgaaaggtct 960
cagaggagga ggctgctggt tccagcaaat gaaggtgatc ccactgagac tctgagacag 1020
tgcttcgatg actttgcaga cttggtgccc tttgactcct gggagccgct catgaggaag 1080
ttgggcctca tggacaatga gataaaggtg gctaaagctg aggcagcggg ccacagggac 1140
accttgtaca cgatgctgat aaagtgggtc aacaaaaccg ggcgagatgc ctctgtccac 1200
accctgctgg atgccttgga gacgctggga gagagacttg ccaagcagaa gattgaggac 1260
cacttgttga gctctggaaa gttcatgtat ctagaaggta atgcagactc tgccatgtcc 1320
taa 1323

<210> 288
<211> 780
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF10C

<400> 288
atggcccgga tccccaagac cctaaagttc gtcgtcgtca tcgtcgcggt cctgctgcca 60
gtcctagctt actctgccac cactgcccgg caggaggaag ttccccagca gacagtggcc 120
ccacagcaac agaggcacag cttcaagggg gaggagtgtc cagcaggatc tcatagatca 180
gaacatactg gagcctgtaa cccgtgcaca gagggtgtgg attacaccaa cgcttccaac 240
aatgaacctt cttgcttccc atgtacagtt tgtaaatcag atcaaaaaca taaaagttcc 300
tgcaccatga ccagagacac agtgtgtcag tgtaaagaag gcaccttccg gaatgaaaac 360
tccccagaga tgtgccggaa gtgtagcagg tgccctagtg gggaagtcca agtcagtaat 420
tgtacgtcct gggatgatat ccagtgtgtt gaagaatttg gtgccaatgc cactgtggaa 480
accccagctg ctgaagagac aatgaacacc agcccgggga ctcctgcccc agctgctgaa 540
gagacaatga acaccagccc agggactcct gccccagctg ctgaagagac aatgaccacc 600
agcccgggga ctcctgcccc agctgctgaa gagacaatga ccaccagccc ggggactcct 660
gccccagctg ctgaagagac aatgaccacc agcccgggga ctcctgcctc ttctcattac 720
ctctcatgca ccatcgtagg gatcatagtt ctaattgtgc ttctgattgt gtttgtttga 780

<210> 289
<211> 1161
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF10D

<400> 289
atgggacttt ggggacaaag cgtcccgacc gcctcgagcg ctcgagcagg gcgctatcca 60
ggagccagga cagcgtcggg aaccagacca tggctcctgg accccaagat ccttaagttc 120
gtcgtcttca tcgtcgcggt tctgctgccg gtccgggttg actctgccac catcccccgg 180
caggacgaag ttccccagca gacagtggcc ccacagcaac agaggcgcag cctcaaggag 240
gaggagtgtc cagcaggatc tcatagatca gaatatactg gagcctgtaa cccgtgcaca 300
gagggtgtgg attacaccat tgcttccaac aatttgcctt cttgcctgct atgtacagtt 360
tgtaaatcag gtcaaacaaa taaaagttcc tgtaccacga ccagagacac cgtgtgtcag 420
tgtgaaaaag gaagcttcca ggataaaaac tcccctgaga tgtgccggac gtgtagaaca 480
gggtgtccca gagggatggt caaggtcagt aattgtacgc cccggagtga catcaagtgc 540
aaaaatgaat cagctgccag ttccactggg aaaaccccag cagcggagga gacagtgacc 600
accatcctgg ggatgcttgc ctctccctat cactacctta tcatcatagt ggttttagtc 660
atcattttag ctgtggttgt ggttggcttt tcatgtcgga agaaattcat ttcttacctc 720
aaaggcatct gctcaggtgg tggaggaggt cccgaacgtg tgcacagagt ccttttccgg 780
cggcgttcat gtccttcacg agttcctggg gcggaggaca atgcccgcaa cgagaccctg 840
agtaacagat acttgcagcc cacccaggtc tctgagcagg aaatccaagg tcaggagctg 900
gcagagctaa caggtgtgac tgtagagttg ccagaggagc cacagcgtct gctggaacag 960
gcagaagctg aagggtgtca gaggaggagg ctgctggttc cagtgaatga cgctgactcc 1020
gctgacatca gcaccttgct ggatgcctcg gcaacactgg aagaaggaca tgcaaaggaa 1080
acaattcagg accaactggt gggctccgaa aagctctttt atgaagaaga tgaggcaggc 1140
tctgctacgt cctgcctgtg a 1161

<210> 290
<211> 1851
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF11A

<400> 290
atggccccgc gcgcccggcg gcgccgcccg ctgttcgcgc tgctgctgct ctgcgcgctg 60
ctcgcccggc tgcaggtggc tttgcagatc gctcctccat gtaccagtga gaagcattat 120
gagcatctgg gacggtgctg taacaaatgt gaaccaggaa agtacatgtc ttctaaatgc 180
actactacct ctgacagtgt atgtctgccc tgtggcccgg atgaatactt ggatagctgg 240
aatgaagaag ataaatgctt gctgcataaa gtttgtgata caggcaaggc cctggtggcc 300
gtggtcgccg gcaacagcac gacccccggg cgctgcgcgt gcacggctgg gtaccactgg 360
agccaggact gcgagtgctg ccgccgcaac accgagtgcg cgccgggcct gggcgcccag 420
cacccgttgc agctcaacaa ggacacagtg tgcaaacctt gccttgcagg ctacttctct 480
gatgcctttt cctccacgga caaatgcaga ccctggacca actgtacctt ccttggaaag 540
agagtagaac atcatgggac agagaaatcc gatgcggttt gcagttcttc tctgccagct 600
agaaaaccac caaatgaacc ccatgtttac ttgcccggtt taataattct gcttctcttc 660
gcgtctgtgg ccctggtggc tgccatcatc tttggcgttt gctataggaa aaaagggaaa 720
gcactcacag ctaatttgtg gcactggatc aatgaggctt gtggccgcct aagtggagat 780
aaggagtcct caggtgacag ttgtgtcagt acacacacgg caaactttgg tcagcaggga 840
gcatgtgaag gtgtcttact gctgactctg gaggagaaga catttccaga agatatgtgc 900
tacccagatc aaggtggtgt ctgtcagggc acatgtgtag gaggtggtcc ctacgcacaa 960
ggcgaagatg ccaggatgct ctcattggtc agcaagaccg agatagagga agacagcttc 1020
agacagatgc ccacagaaga tgaatacatg gacaggccct cccagcccac agaccagtta 1080
ctgttcctca ctgagcctgg aagcaaatcc acacctcctt tctctgaacc cctggaggtg 1140
ggggagaatg acagtttaag ccagtgcttc acggggacac agagcacagt gggttcagaa 1200
agctgcaact gcactgagcc cctgtgcagg actgattgga ctcccatgtc ctctgaaaac 1260
tacttgcaaa aagaggtgga cagtggccat tgcccgcact gggcagccag ccccagcccc 1320

aactgggcag atgtctgcac aggctgccgg aaccctcctg gggaggactg tgaacccctc 1380
gtgggttccc caaaacgtgg acccttgccc cagtgcgcct atggcatggg ccttcccccc 1440
gaagaagaag ccagcaggac ggaggccaga gaccagcccg aggatggggc tgatgggagg 1500
ctcccaagct cagcgagggc aggtgccggg tctggaagct cccctggtgg ccagtccccc 1560
gcatctggaa atgtgactgg aaacagtaac tccacgttca tctccagcgg gcaggtgatg 1620
aacttcaagg gcgacatcat cgtggtctac gtcagccaga cctcgcagga gggcgcggcg 1680
gcggctgcgg agcccatggg ccgcccggtg caggaggaga ccctggcgcg ccgagactcc 1740
ttcgcgggga acggcccgcg cttcccggac ccgtgcggcg gccccgaggg gctgcgggag 1800
ccggagaagg cctcgaggcc ggtgcaggag caaggcgggg ccaaggcttg a 1851

<210> 291
<211> 1206
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF11B

<400> 291
atgaacaact tgctgtgctg cgcgctcgtg tttctggaca tctccattaa gtggaccacc 60
caggaaacgt ttcctccaaa gtaccttcat tatgacgaag aaacctctca tcagctgttg 120
tgtgacaaat gtcctcctgg tacctaccta aaacaacact gtacagcaaa gtggaagacc 180
gtgtgcgccc cttgccctga ccactactac acagacagct ggcacaccag tgacgagtgt 240
ctatactgca gccccgtgtg caaggagctg cagtacgtca agcaggagtg caatcgcacc 300
cacaaccgcg tgtgcgaatg caaggaaggg cgctaccttg agatagagtt ctgcttgaaa 360
cataggagct gccctcctgg atttggagtg gtgcaagctg gaaccccaga gcgaaataca 420
gtttgcaaaa gatgtccaga tgggttcttc tcaaatgaga cgtcatctaa agcaccctgt 480
agaaaacaca caaattgcag tgtctttggt ctcctgctaa ctcagaaagg aaatgcaaca 540
cacgacaaca tatgttccgg aaacagtgaa tcaactcaaa aatgtggaat agatgttacc 600
ctgtgtgagg aggcattctt caggtttgct gttcctacaa agtttacgcc taactggctt 660
agtgtcttgg tagacaattt gcctggcacc aaagtaaacg cagagagtgt agagaggata 720
aaacggcaac acagctcaca agaacagact ttccagctgc tgaagttatg gaaacatcaa 780
aacaaagacc aagatatagt caagaagatc atccaagata ttgacctctg tgaaaacagc 840
gtgcagcggc acattggaca tgctaacctc accttcgagc agcttcgtag cttgatggaa 900
agcttaccgg gaaagaaagt gggagcagaa gacattgaaa aaacaataaa ggcatgcaaa 960
cccagtgacc agatcctgaa gctgctcagt ttgtggcgaa taaaaaatgg cgaccaagac 1020
accttgaagg gcctaatgca cgcactaaag cactcaaaga cgtaccactt tcccaaaact 1080
gtcactcaga gtctaaagaa gaccatcagg ttccttcaca gcttcacaat gtacaaattg 1140
tatcagaagt tatttttaga aatgataggt aaccaggtcc aatcagtaaa aataagctgc 1200
ttataa 1206

<210> 292
<211> 390
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF12A

<400> 292
atggctcggg gctcgctgcg ccggttgctg cggctcctcg tgctggggct ctggctggcg 60
ttgctgcgct ccgtggccgg ggagcaagcg ccaggcaccg ccccctgctc ccgcggcagc 120
tcctggagcg cggacctgga caagtgcatg gactgcgcgt cttgcagggc gcgaccgcac 180
agcgacttct gcctgggctg cgctgcagca cctcctgccc ccttccggct gctttggccc 240
atccttgggg gcgctctgag cctgaccttc gtgctggggc tgctttctgg ctttttggtc 300
tggagacgat gccgcaggag agagaagttc accaccccca tagaggagac cggcggagag 360
ggctgcccag ctgtggcgct gatccagtga 390

<210> 293
<211> 882
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF13B

<400> 293
atgagtggcc tgggccggag caggcgaggt ggccggagcc gtgtggacca ggaggagcgc 60
tttccacagg gcctgtggac gggggtggct atgagatcct gccccgaaga gcagtactgg 120
gatcctctgc tgggtacctg catgtcctgc aaaaccattt gcaaccatca gagccagcgc 180
acctgtgcag ccttctgcag gtcactcagc tgccgcaagg agcaaggcaa gttctatgac 240
catctcctga gggactgcat cagctgtgcc tccatctgtg gacagcaccc taagcaatgt 300
gcatacttct gtgagaacaa gctcaggagc ccagtgaacc ttccaccaga gctcaggaga 360
cagcggagtg gagaagttga aaacaattca gacaactcgg gaaggtacca aggattggag 420
cacagaggct cagaagcaag tccagctctc ccggggctga agctgagtgc agatcaggtg 480
gccctggtct acagcacgct ggggctctgc ctgtgtgccg tcctctgctg cttcctggtg 540
gcggtggcct gcttcctcaa gaagaggggg gatccctgct cctgccagcc ccgctcaagg 600
ccccgtcaaa gtccggccaa gtcttcccag gatcacgcga tggaagccgg cagccctgtg 660
agcacatccc ccgagccagt ggagacctgc agcttctgct tccctgagtg cagggcgccc 720
acgcaggaga gcgcagtcac gcctgggacc cccgacccca cttgtgctgg aaggtggggg 780
tgccacacca ggaccacagt cctgcagcct tgcccacaca tcccagacag tggccttggc 840
attgtgtgtg tgcctgccca ggaggggggc ccaggtgcat aa 882

<210> 294
<211> 555
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF13C

<400> 294
atgaggcgag ggccccggag cctgcggggc agggacgcgc cagcccccac gccctgcgtc 60
ccggccgagt gcttcgacct gctggtccgc cactgcgtgg cctgcgggct cctgcgcacg 120
ccgcggccga aaccggccgg ggccagcagc cctgcgccca ggacggcgct gcagccgcag 180
gagtcggtgg gcgcgggggc cggcgaggcg gcgctgcccc tgcccgggct gctctttggc 240
gcccccgcgc tgctgggcct ggcactggtc ctggcgctgg tcctggtggg tctggtgagc 300
tggaggcggc gacagcggcg gcttcgcggc gcgtcctccg cagaggcccc cgacggagac 360
aaggacgccc cagagccccct ggacaaggtc atcattctgt ctccgggaat ctctgatgcc 420
acagctcctg cctggcctcc tcctggggaa gacccaggaa ccaccccacc tggccacagt 480
gtccctgtgc cagccacaga gctgggctcc actgaactgg tgaccaccaa gacggccggc 540
cctgagcaac aatag 555

<210> 295
<211> 852
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF14

<400> 295
atggagcctc ctggagactg ggggcctcct ccctggagat ccacccccaa aaccgacgtc 60
ttgaggctgg tgctgtatct caccttcctg ggagcccccct gctacgcccc agctctgccg 120
tcctgcaagg aggacgagta cccagtgggc tccgagtgct gccccaagtg cagtccaggt 180
tatcgtgtga aggaggcctg cggggagctg acgggcacag tgtgtgaacc ctgccctcca 240
ggcacctaca ttgcccacct caatggccta agcaagtgtc tgcagtgcca aatgtgtgac 300
ccagccatgg gcctgcgcgc gagccggaac tgctccagga cagagaacgc cgtgtgtggc 360
tgcagcccag gccacttctg catcgtccag gacggggacc actgcgccgc gtgccgcgct 420
tacgccacct ccagcccggg ccagagggtg cagaagggag gcaccgagag tcaggacacc 480
ctgtgtcaga actgcccccc ggggaccttc tctcccaatg ggaccctgga ggaatgtcag 540
caccagacca agtgcagctg gctggtgacg aaggccggag ctgggaccag cagctcccac 600

tgggtatggt ggtttctctc agggagcctc gtcatcgtca ttgtttgctc cacagttggc 660
ctaatcatat gtgtgaaaag aagaaagcca aggggtgatg tagtcaaggt gatcgtctcc 720
gtccagcgga aaagacagga ggcagaaggt gaggccacag tcattgaggc cctgcaggcc 780
cctccggacg tcaccacggt ggccgtggag gagacaatac cctcattcac ggggaggagc 840
ccaaaccact ga 852

<210> 296
<211> 1284
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> NGFR

<400> 296
atgggggcag gtgccaccgg ccgcgccatg gacgggccgc gcctgctgct gttgctgctt 60
ctgggggtgt cccttggagg tgccaaggag gcatgcccca caggcctgta cacacacagc 120
ggtgagtgct gcaaagcctg caacctgggc gagggtgtgg cccagccttg tggagccaac 180
cagaccgtgt gtgagccctg cctggacagc gtgacgttct ccgacgtggt gagcgcgacc 240
gagccgtgca agccgtgcac cgagtgcgtg gggctccaga gcatgtcggc gccgtgcgtg 300
gaggccgacg acgccgtgtg ccgctgcgcc tacggctact accaggatga gacgactggg 360
cgctgcgagg cgtgccgcgt gtgcgaggcg ggctcgggcc tcgtgttctc ctgccaggac 420
aagcagaaca ccgtgtgcga ggagtgcccc gacggcacgt attccgacga ggccaaccac 480
gtggacccgt gcctgccctg caccgtgtgc gaggacaccg agcgccagct ccgcgagtgc 540
acacgctggg ccgacgccga gtgcgaggag atccctggcc gttggattac acggtccaca 600
cccccagagg gctcggacag cacagccccc agcacccagg agcctgaggc acctccagaa 660
caagacctca tagccagcac ggtggcaggt gtggtgacca cagtgatggg cagctcccag 720
cccgtggtga cccgaggcac caccgacaac ctcatccctg tctattgctc catcctggct 780
gctgtggttg tgggccttgt ggcctacata gccttcaaga ggtggaacag ctgcaagcag 840
aacaagcaag gagccaacag ccggccagtg aaccagacgc ccccaccaga gggagaaaaa 900
ctccacagcg acagtggcat ctccgtggac agccagagcc tgcatgacca gcagccccac 960
acgcagacag cctcgggcca ggccctcaag ggtgacggag gcctctacag cagcctgccc 1020
ccagccaagc gggaggaggt ggagaagctt ctcaacggct ctgcggggga cacctggcgg 1080
cacctggcgg gcgagctggg ctaccagccc gagcacatag actcctttac ccatgaggcc 1140
tgccccgttc gcgccctgct tgcaagctgg gccacccagg acagcgccac actggacgcc 1200
ctcctggccg ccctgcgccg catccagcga gccgacctcg tggagagtct gtgcagtgag 1260
tccactgcca catccccggt gtga 1284

<210> 297
<211> 555
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF17

<400> 297
atgttgcaga tggctgggca gtgctcccaa aatgaatatt ttgacagttt gttgcatgct 60
tgcatacctt gtcaacttcg atgttcttct aatactcctc ctctaacatg tcagcgttat 120
tgtaatgcaa gtgtgaccaa ttcagtgaaa ggaacgaatg cgattctctg gacctgtttg 180
ggactgagct taataatttc tttggcagtt ttcgtgctaa tgtttttgct aaggaagata 240
aactctgaac cattaaagga cgagtttaaa aacacaggat caggtctcct gggcatggct 300
aacattgacc tggaaaagag caggactggt gatgaaatta ttcttccgag aggcctcgag 360
tacacggtgg aagaatgcac ctgtgaagac tgcatcaaga gcaaaccgaa ggtcgactct 420
gaccattgct ttccactccc agctatggag gaaggcgcaa ccattcttgt caccacgaaa 480
acgaatgact attgcaagag cctgccagct gctttgagtg ctacggagat agagaaatca 540
atttctgcta ggtaa 555

<210> 298
<211> 1254
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF19

<400> 298
atggctttaa aagtgctact agaacaagag aaaacgtttt tcactctttt agtattacta 60
ggctatttgt catgtaaagt gacttgtgaa tcaggagact gtagacagca agaattcagg 120
gatcggtctg gaaactgtgt tccctgcaac cagtgtgggc caggcatgga gttgtctaag 180
gaatgtggct tcggctatgg ggaggatgca cagtgtgtga cgtgccggct gcacaggttc 240
aaggaggact ggggcttcca gaaatgcaag ccctgtctgg actgcgcagt ggtgaaccgc 300
tttcagaagg caaattgttc agccaccagt gatgccatct gcggggactg cttgccagga 360
ttttatagga agacgaaact tgtcggcttt caagacatgg agtgtgtgcc ttgtggagac 420
cctcctcctc cttacgaacc gcactgtgcc agcaaggtca acctcgtgaa gatcgcgtcc 480
acggcctcca gcccacggga cacggcgctg gctgccgtta tctgcagcgc tctggccacc 540
gtcctgctgg ccctgctcat cctctgtgtc atctattgta agagacagtt tatggagaag 600
aaacccagct ggtctctgcg gtcacaggac attcagtaca acggctctga gctgtcgtgt 660
tttgacagac ctcagctcca cgaatatgcc cacagagcct gctgccagtg ccgccgtgac 720
tcagtgcaga cctgcgggcc ggtgcgcttg ctcccatcca tgtgctgtga ggaggcctgc 780
agccccaacc cggcgactct tggttgtggg gtgcattctg cagccagtct tcaggcaaga 840
aacgcaggcc cagccgggga gatggtgccg actttcttcg gatccctcac gcagtccatc 900
tgtggcgagt tttcagatgc ctggcctctg atgcagaatc ccatgggtgg tgacaacatc 960
tctttttgtg actcttatcc tgaactcact ggagaagaca ttcattctct caatccagaa 1020
cttgaaagct caacgtcttt ggattcaaat agcagtcaag atttggttgg tggggctgtt 1080
ccagtccagt ctcattctga aaactttaca gcagctactg atttatctag atataacaac 1140
acactggtag aatcagcatc aactcaggat gcactaacta tgagaagcca gctagatcag 1200
gagagtggtg ctgtcatcca cccagccact cagacgtccc tccaggaagc ttaa 1254

<210> 299
<211> 1293
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> RELT

<400> 299
atgaagccaa gtctgctgtg ccggcccctg tcctgcttcc ttatgctgct gccctggcct 60
ctcgccaccc tgacatcaac aacccttttgg cagtgcccac ctggggagga gcccgacctg 120
gacccagggc agggcacatt atgcaggccc tgccccccag gcaccttctc agctgcatgg 180
ggctccagcc catgccagcc ccatgcccgt tgcagccttt ggaggaggct ggaggcccag 240
gtgggcatgg caactcgaga tacactctgt ggagactgct ggcctgggtg gtttgggcct 300
tgggggttc cccgcgttcc atgtcaacca tgttcctggg cacctctggg tactcatggc 360
tgtgatgagt gggggcggcg ggcccgacgt ggcgtggagg tggcagcagg ggccagcagc 420
ggtggtgaga cacggcagcc tgggaacggc acccgggcag gtggcccaga ggagacagcc 480
gcccagtacg cggtcatcgc catcgtccct gtcttctgcc tcatggggct gttgggcatc 540
ctggtgtgca acctcctcaa gcggaagggc taccactgca cggcgcacaa ggaggtcggg 600
cccggccctg gaggtggagg cagtggaatc aaccctgcct accggactga ggatgccaat 660
gaggacacca ttggggtcct ggtgcgcttg atcacagaga agaaagagaa tgctgcggcc 720
ctggaggagc tgctgaaaga gtaccacagc aaacagctgg tgcagacgag ccacaggcct 780
gtgtccaagc tgccgccagc gcccccgaac gtgccacaca tctgcccgca ccgccaccat 840
ctccacaccg tgcagggcct ggcctcgctc tctggcccct gctgctcccg ctgtagccag 900
aagaagtggc ccgaggtgct gctgtcccct gaggctgtag ccgccactac tcctgttccc 960
agccttctgc ctaacccgac cagggttccc aaggccgggg ccaaggcagg gcgtcagggc 1020
gagatcacca tcttgtctgt gggcaggttc cgcgtggctc gaattcctga gcagcggaca 1080
agttcaatgg tgtctgaggt gaagaccatc acggaggctg ggccctcgtg gggtgatctc 1140
cctgactccc cacagcctgg cctccccccct gagcagcagg ccctgctagg aagtggcgga 1200
agccgtacaa agtggctgaa gcccccagca gagaacaagg ccgaggagaa ccgctatgtg 1260
gtccggctaa gtgagagcaa cctggtcatc tga 1293

<210> 300

<211> 1968
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF21

<400> 300
atggggacct ctccgagcag cagcaccgcc ctcgcctcct gcagccgcat cgcccgccga 60
gccacagcca cgatgatcgc gggctccctt ctcctgcttg gattccttag caccaccaca 120
gctcagccag aacagaaggc ctcgaatctc attggcacat accgccatgt tgaccgtgcc 180
accggccagg tgctaacctg tgacaagtgt ccagcaggaa cctatgtctc tgagcattgt 240
accaacacaa gcctgcgcgt ctgcagcagt tgccctgtgg ggacctttac caggcatgag 300
aatggcatag agaaatgcca tgactgtagt cagccatgcc catggccaat gattgagaaa 360
ttaccttgtg ctgccttgac tgaccgagaa tgcacttgcc cacctggcat gttccagtct 420
aacgctacct gtgcccccca tacggtgtgt cctgtgggtt ggggtgtgcg gaagaaaggg 480
acagagactg aggatgtgcg gtgtaagcag tgtgctcggg gtaccttctc agatgtgcct 540
tctagtgtga tgaaatgcaa agcatacaca gactgtctga gtcagaacct ggtggtgatc 600
aagccgggga ccaaggagac agacaacgtc tgtggcacac tcccgtcctt ctccagctcc 660
acctcacctt cccctggcac agccatcttt ccacgccctg agcacatgga aacccatgaa 720
gtcccttcct ccacttatgt tcccaaaggc atgaactcaa cagaatccaa ctcttctgcc 780
tctgttagac caaaggtact gagtagcatc caggaaggga cagtccctga caacacaagc 840
tcagcaaggg ggaaggaaga cgtgaacaag accctcccaa accttcaggt agtcaaccac 900
cagcaaggcc cccaccacag acacatcctg aagctgctgc cgtccatgga ggccactggg 960
ggcgagaagt ccagcacgcc catcaagggc cccaagaggg gacatcctag acagaaccta 1020
cacaagcatt ttgacatcaa tgagcatttg ccctggatga ttgtgctttt cctgctgctg 1080
gtgcttgtgg tgattgtggt gtgcagtatc cggaaaagct cgaggactct gaaaaagggg 1140
ccccggcagg atcccagtgc cattgtggaa aaggcagggc tgaagaaatc catgactcca 1200
acccagaacc gggagaaatg gatctactac tgcaatggcc atggtatcga tatcctgaag 1260
cttgtagcag cccaagtggg aagccagtgg aaagatatct atcagtttct ttgcaatgcc 1320
agtgagaggg aggttgctgc tttctccaat gggtacacag ccgaccacga gcgggcctac 1380
gcagctctgc agcactggac catccggggc cccgaggcca gcctcgccca gctaattagc 1440
gccctgcgcc agcaccggag aaacgatgtt gtggagaaga ttcgtgggct gatggaagac 1500
accacccagc tggaaactga caaactagct ctcccgatga gccccagccc gcttagcccg 1560
agccccatcc ccagccccaa cgcgaaactt gagaattccg ctctcctgac ggtggagcct 1620
tccccacagg acaagaacaa gggcttcttc gtggatgagt cggagccccc tctccgctgt 1680
gactctacat ccagcggctc ctccgcgctg agcaggaacg gttcctttat taccaaagaa 1740
aagaaggaca cagtgttgcg gcaggtacgc ctggacccct gtgacttgca gcctatcttt 1800
gatgacatgc tccactttct aaatcctgag gagctgcggg tgattgaaga gattccccag 1860
gctgaggaca aactagaccg gctattcgaa attattggag tcaagagcca ggaagccagc 1920
cagaccctcc tggactctgt ttatagccat cttcctgacc tgctgtag 1968

<210> 301
<211> 1254
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> TNFRSF25

<400> 301
atggagcagc ggccgcgggg ctgcgcggcg gtggcggcgg cgctcctcct ggtgctgctg 60
ggggcccggg cccagggcgg cactcgtagc cccaggtgtg actgtgccgg tgacttccac 120
aagaagattg gtctgttttg ttgcagaggc tgcccagcgg ggcactacct gaaggcccct 180
tgcacggagc cctgcggcaa ctccacctgc cttgtgtgtc cccaagacac cttcttggcc 240
tgggagaacc accataattc tgaatgtgcc cgctgccagg cctgtgatga gcaggcctcc 300
caggtggcgc tggagaactg ttcagcagtg gccgacaccc gctgtggctg taagccaggc 360
tggtttgtgg agtgccaggt cagccaatgt gtcagcagtt cacccttcta ctgccaacca 420
tgcctagact gcggggccct gcaccgccac acacggctac tctgttcccg cagagatact 480
gactgtggga cctgcctgcc tggcttctat gaacatggcg atggctgcgt gtcctgcccc 540
acgagcaccc tggggagctg tccagagcgc tgtgccgctg tctgtggctg gaggcagatg 600

ttctgggtcc aggtgctcct ggctggcctt gtggtccccc tcctgcttgg ggccaccctg 660
acctacacat accgccactg ctggcctcac aagcccctgg ttactgcaga tgaagctggg 720
atggaggctc tgaccccacc accggccacc catctgtcac ccttggacag cgcccacacc 780
cttctagcac ctcctgacag cagtgagaag atctgcaccg tccagttggt gggtaacagc 840
tggacccctg gctaccccga gacccaggag gcgctctgcc cgcaggtgac atggtcctgg 900
gaccagttgc ccagcagagc tcttggcccc gctgctgcgc ccacactctc gccagagtcc 960
ccagccggct cgccagccat gatgctgcag ccgggcccgc agctctacga cgtgatggac 1020
gcggtcccag cgcggcgctg gaaggagttc gtgcgcacgc tggggctgcg cgaggcagag 1080
atcgaagccg tggaggtgga gatcggccgc ttccgagacc agcagtacga gatgctcaag 1140
cgctggcgcc agcagcagcc cgcgggcctc ggagccgttt acgcggccct ggagcgcatg 1200
gggctggacg gctgcgtgga agacttgcgc agccgcctgc agcgcggccc gtga 1254

<210> 302
<211> 1347
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> EDAR

<400> 302
atggcccatg tgggggactg cacgcagacg ccctggctcc ccgtcctggt ggtgtctctg 60
atgtgctcag cccgagcgga atactcaaac tgcggtgaga acgagtacta caaccagact 120
acggggctgt gccaggagtg ccccccgtgt gggccgggag aggagcccta cctgtcctgt 180
ggctacggca ccaaagacga ggactacggc tgcgtccccc gcccggcgga gaagttttcc 240
aaaggaggct accagatatg caggcgtcac aaagactgtg agggcttctt ccgggccacc 300
gtgctgacac caggggacat ggagaatgac gctgagtgtg gcccttgcct ccctggctac 360
tacatgctgg agaacagacc gaggaacatc tatggcatgg tctgctactc ctgcctcctg 420
gcaccccccа acaccaagga atgtgtggga gccacttcag gagcttctgc caacttccct 480
ggcacctcgg gcagcagcac cctgtctccc ttccagcacg cccacaaaga actctcaggc 540
caaggacacc tggccactgc cctgatcatt gcaatgtcca ccatcttcat catggccatc 600
gccatcgtcc tcatcatcat gttctacatc ctgaagacaa agccctctgc cccagcctgt 660
tgcaccagcc acccggggaa gagcgtggag gcccaagtga gcaaggacga ggagaagaaa 720
gaggccccag acaacgtggt gatgttctcc gagaaggatg aatttgagaa gctgacagca 780
actccagcaa agcccaccaa gagcgagaac gatgcctcat ccgagaatga gcagctgctg 840
agccggagcg tcgacagtga tgaggagccc gcccctgaca agcagggctc cccggagctg 900
tgcctgctgt cgctggttca cctggccagg gagaagtctg ccaccagcaa caagtcagcc 960
gggattcaaa gccggaggaa aaagatcctc gatgtgtatg ccaacgtgtg tggagtcgtg 1020
gaaggtctta gccccacgga gctgccattt gattgcctcg agaagactag ccgaatgctc 1080
agctccacgt acaactctga gaaggctgtt gtgaaaacgt ggcgccacct cgccgagagc 1140
ttcggcctga agagggatga gattgggggc atgacagacg gcatgcaact ctttgaccgc 1200
atcagcacgg caggctacag catccctgag ctactcacaa aactggtgca gattgagcgg 1260
ctggatgctg tggagtcctt gtgtgcagac atactggagt gggcgggggt tgtgccacct 1320
gcctcccagc cacatgctgc atcctga 1347

<210> 303
<211> 894
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> EDA2R

<400> 303
atggattgcc aagaaaatga gtactgggac caatggggac ggtgtgtcac ctgccaacgg 60
tgtggtcctg gacaggagct atccaaggat tgtggttatg gagagggtgg agatgcctac 120
tgcacagcct gccctcctcg caggtacaaa agcagctggg gccaccacag atgtcagagt 180
tgcatcacct gtgctgtcat caatcgtgtt cagaaggtca actgcacagc tacctctaat 240
gctgtctgtg gggactgttt gcccaggttc taccgaaaga cacgcattgg aggcctgcag 300
gaccaagagt gcatcccgtg cacgaagcag acccccacct ctgaggttca atgtgccttc 360
cagttgagct tagtggaggc agatacaccc acagtgcccc ctcaggaggc cacacttgtt 420

```
gcactggtga gcagcctgct agtggtgttt accctggcct tcctggggct cttcttcctc 480
tactgcaagc agttcttcaa cagacattgc cagcgtggag gtttgctgca gtttgaggct 540
gataaaacag caaaggagga atctctcttc cccgtgccac ccagcaagga gaccagtgct 600
gagtcccaag tgagtgagaa catctttcag acccagccac ttaaccctat cctcgaggac 660
gactgcagct cgactagtgg cttccccaca caggagtcct ttaccatggc ctcctgcacc 720
tcagagagcc actcccactg ggtccacagc cccatcgaat gcacagagct ggacctgcaa 780
aagttttcca gctctgcctc ctatactgga gctgagacct tgggggggaaa cacagtcgaa 840
agcactggag acaggctgga gctcaatgtg ccctttgaag ttcccagccc ttaa       894
```

<210> 304
<211> 1137
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STING (R232 Allele)

<220>
<221> allele
<222> (694)...(696)
<223> nnn = CGT, CGC, CGA, CGG, AGA or AGG

<400> 304

```
atgccccact ccagcctgca tccatccatc ccgtgtccca ggggtcacgg ggcccagaag 60
gcagccttgg ttctgctgag tgcctgcctg gtgacccttt gggggctagg agagccacca 120
gagcacactc tccggtacct ggtgctccac ctagcctccc tgcagctggg actgctgtta 180
aacggggtct gcagcctggc tgaggagctg cgccacatcc actccaggta ccggggcagc 240
tactggagga ctgtgcgggc ctgcctgggc tgccccctcc gccgtggggc cctgttgctg 300
ctgtccatct atttctacta ctccctccca aatgcggtcg gcccgccctt cacttggatg 360
cttgccctcc tgggcctctc gcaggcactg aacatcctcc tgggcctcaa gggcctggcc 420
ccagctgaga tctctgcagt gtgtgaaaaa gggaatttca acgtggccca tgggctggca 480
tggtcatatt acatcggata tctgcggctg atcctgccag agctccaggc ccggattcga 540
acttacaatc agcattacaa caacctgcta cggggtgcag tgagccagcg gctgtatatt 600
ctcctcccat tggactgtgg ggtgcctgat aacctgagta tggctgaccc caacattcgc 660
ttcctggata aactgcccca gcagaccggt gacnnngctg gcatcaagga tcgggtttac 720
agcaacagca tctatgagct tctggagaac gggcagcggg cgggcacctg tgtcctggag 780
tacgccaccc ccttgcagac tttgtttgcc atgtcacaat acagtcaagc tggctttagc 840
cgggaggata ggcttgagca ggccaaactc ttctgccgga cacttgagga catcctggca 900
gatgcccctg agtctcagaa caactgccgc ctcattgcct accaggaacc tgcagatgac 960
agcagcttct cgctgtccca ggaggttctc cggcacctgc ggcaggagga aaaggaagag 1020
gttactgtgg gcagcttgaa gacctcagcg gtgcccagta cctccacgat gtcccaagag 1080
cctgagctcc tcatcagtgg aatggaaaag cccctccctc tccgcacgga tttctct    1137
```

<210> 305
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human STING (R232 Allele)

<400> 305

```
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
```

```
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
            100                 105                 110
Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
        115                 120                 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
    130                 135                 140
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
                165                 170                 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
            180                 185                 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
    210                 215                 220
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305                 310                 315                 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
            340                 345                 350
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
        355                 360                 365
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
    370                 375


<210> 306
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human STING (H232 Allele)

<400> 306
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
 1                5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
```

65 70 75 80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
85 90 95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
100 105 110
Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
115 120 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
130 135 140
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145 150 155 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
165 170 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
180 185 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
195 200 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
210 215 220
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225 230 235 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
245 250 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
260 265 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
275 280 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
290 295 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305 310 315 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
325 330 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
340 345 350
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
355 360 365
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
370 375

<210> 307
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human STING (Q293 Allele)

<400> 307
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
1 5 10 15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
20 25 30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
35 40 45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
50 55 60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65 70 75 80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly

```
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
            100                 105                 110
Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
        115                 120                 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
    130                 135                 140
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
                165                 170                 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
            180                 185                 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
    210                 215                 220
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Gln Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305                 310                 315                 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
            340                 345                 350
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
        355                 360                 365
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
    370                 375


<210> 308
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human STING (HAQ allele; R71H/G230A/R293Q)

<400> 308
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu His His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
```

```
            100                 105                 110
Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
        115                 120                 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
    130                 135                 140
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
                165                 170                 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
            180                 185                 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
    210                 215                 220
Leu Pro Gln Gln Thr Ala Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Gln Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305                 310                 315                 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
            340                 345                 350
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
        355                 360                 365
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
    370                 375


<210> 309
<211> 379
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human STING (AQ allele; G230A/R293Q)

<400> 309
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
            100                 105                 110
Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
```

```
        115                 120                 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
    130                 135                 140
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
                165                 170                 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
            180                 185                 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
    210                 215                 220
Leu Pro Gln Gln Thr Ala Asp His Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Gln Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305                 310                 315                 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
            340                 345                 350
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
        355                 360                 365
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
    370                 375
```

<210> 310
<211> 1025
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> MDA5/IFIH1

<400> 310

```
Met Ser Asn Gly Tyr Ser Thr Asp Glu Asn Phe Arg Tyr Leu Ile Ser
 1               5                  10                  15
Cys Phe Arg Ala Arg Val Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu
            20                  25                  30
Asp Tyr Leu Thr Phe Leu Pro Ala Glu Val Lys Glu Gln Ile Gln Arg
        35                  40                  45
Thr Val Ala Thr Ser Gly Asn Met Gln Ala Val Glu Leu Leu Leu Ser
    50                  55                  60
Thr Leu Glu Lys Gly Val Trp His Leu Gly Trp Thr Arg Glu Phe Val
65                  70                  75                  80
Glu Ala Leu Arg Arg Thr Gly Ser Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Met Asn
                85                  90                  95
Pro Glu Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Phe Glu Asn Ala His Asp
            100                 105                 110
Glu Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys
        115                 120                 125
Leu Leu Val Arg Asp Val Leu Asp Lys Cys Met Glu Glu Glu Leu Leu
```

```
    130                 135                 140
Thr Ile Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ala Glu Asn Asn Gly Asn
145                 150                 155                 160
Glu Ser Gly Val Arg Glu Leu Leu Lys Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn
                165                 170                 175
Trp Phe Ser Ala Phe Leu Asn Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asn Glu
            180                 185                 190
Leu Val Gln Glu Leu Thr Gly Ser Asp Cys Ser Glu Ser Asn Ala Glu
        195                 200                 205
Ile Glu Asn Leu Ser Gln Val Asp Gly Pro Gln Val Glu Glu Gln Leu
    210                 215                 220
Leu Ser Thr Thr Val Gln Pro Asn Leu Glu Lys Glu Val Trp Gly Met
225                 230                 235                 240
Glu Asn Asn Ser Ser Glu Ser Ser Phe Ala Asp Ser Ser Val Val Ser
                245                 250                 255
Glu Ser Asp Thr Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Ser Cys Leu Asp Glu
            260                 265                 270
Ser Leu Gly His Asn Ser Asn Met Gly Ser Asp Ser Gly Thr Met Gly
        275                 280                 285
Ser Asp Ser Asp Glu Glu Asn Val Ala Ala Arg Ala Ser Pro Glu Pro
    290                 295                 300
Glu Leu Gln Leu Arg Pro Tyr Gln Met Glu Val Ala Gln Pro Ala Leu
305                 310                 315                 320
Glu Gly Lys Asn Ile Ile Ile Cys Leu Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr
                325                 330                 335
Arg Val Ala Val Tyr Ile Ala Lys Asp His Leu Asp Lys Lys Lys Lys
            340                 345                 350
Ala Ser Glu Pro Gly Lys Val Ile Val Leu Val Asn Lys Val Leu Leu
        355                 360                 365
Val Glu Gln Leu Phe Arg Lys Glu Phe Gln Pro Phe Leu Lys Lys Trp
    370                 375                 380
Tyr Arg Val Ile Gly Leu Ser Gly Asp Thr Gln Leu Lys Ile Ser Phe
385                 390                 395                 400
Pro Glu Val Val Lys Ser Cys Asp Ile Ile Ile Ser Thr Ala Gln Ile
                405                 410                 415
Leu Glu Asn Ser Leu Leu Asn Leu Glu Asn Gly Glu Asp Ala Gly Val
            420                 425                 430
Gln Leu Ser Asp Phe Ser Leu Ile Ile Ile Asp Glu Cys His His Thr
        435                 440                 445
Asn Lys Glu Ala Val Tyr Asn Asn Ile Met Arg His Tyr Leu Met Gln
    450                 455                 460
Lys Leu Lys Asn Asn Arg Leu Lys Lys Glu Asn Lys Pro Val Ile Pro
465                 470                 475                 480
Leu Pro Gln Ile Leu Gly Leu Thr Ala Ser Pro Gly Val Gly Gly Ala
                485                 490                 495
Thr Lys Gln Ala Lys Ala Glu Glu His Ile Leu Lys Leu Cys Ala Asn
            500                 505                 510
Leu Asp Ala Phe Thr Ile Lys Thr Val Lys Glu Asn Leu Asp Gln Leu
        515                 520                 525
Lys Asn Gln Ile Gln Glu Pro Cys Lys Lys Phe Ala Ile Ala Asp Ala
    530                 535                 540
Thr Arg Glu Asp Pro Phe Lys Glu Lys Leu Leu Glu Ile Met Thr Arg
545                 550                 555                 560
Ile Gln Thr Tyr Cys Gln Met Ser Pro Met Ser Asp Phe Gly Thr Gln
                565                 570                 575
Pro Tyr Glu Gln Trp Ala Ile Gln Met Glu Lys Lys Ala Ala Lys Lys
            580                 585                 590
Gly Asn Arg Lys Glu Arg Val Cys Ala Glu His Leu Arg Lys Tyr Asn
        595                 600                 605
Glu Ala Leu Gln Ile Asn Asp Thr Ile Arg Met Ile Asp Ala Tyr Thr
    610                 615                 620
```

```
His Leu Glu Thr Phe Tyr Asn Glu Glu Lys Asp Lys Lys Phe Ala Val
625                 630                 635                 640
Ile Glu Asp Asp Ser Asp Glu Gly Gly Asp Asp Glu Tyr Cys Asp Gly
                645                 650                 655
Asp Glu Asp Glu Asp Asp Leu Lys Lys Pro Leu Lys Leu Asp Glu Thr
            660                 665                 670
Asp Arg Phe Leu Met Thr Leu Phe Phe Glu Asn Asn Lys Met Leu Lys
        675                 680                 685
Arg Leu Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Glu Asn Glu Lys Leu Thr Lys Leu
    690                 695                 700
Arg Asn Thr Ile Met Glu Gln Tyr Thr Arg Thr Glu Glu Ser Ala Arg
705                 710                 715                 720
Gly Ile Ile Phe Thr Lys Thr Arg Gln Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Gln
                725                 730                 735
Trp Ile Thr Glu Asn Glu Lys Phe Ala Glu Val Gly Val Lys Ala His
            740                 745                 750
His Leu Ile Gly Ala Gly His Ser Ser Glu Phe Lys Pro Met Thr Gln
        755                 760                 765
Asn Glu Gln Lys Glu Val Ile Ser Lys Phe Arg Thr Gly Lys Ile Asn
    770                 775                 780
Leu Leu Ile Ala Thr Thr Val Ala Glu Glu Gly Leu Asp Ile Lys Glu
785                 790                 795                 800
Cys Asn Ile Val Ile Arg Tyr Gly Leu Val Thr Asn Glu Ile Ala Met
                805                 810                 815
Val Gln Ala Arg Gly Arg Ala Arg Ala Asp Glu Ser Thr Tyr Val Leu
            820                 825                 830
Val Ala His Ser Gly Ser Gly Val Ile Glu His Glu Thr Val Asn Asp
        835                 840                 845
Phe Arg Glu Lys Met Met Tyr Lys Ala Ile His Cys Val Gln Asn Met
    850                 855                 860
Lys Pro Glu Glu Tyr Ala His Lys Ile Leu Glu Leu Gln Met Gln Ser
865                 870                 875                 880
Ile Met Glu Lys Lys Met Lys Thr Lys Arg Asn Ile Ala Lys His Tyr
                885                 890                 895
Lys Asn Asn Pro Ser Leu Ile Thr Phe Leu Cys Lys Asn Cys Ser Val
            900                 905                 910
Leu Ala Cys Ser Gly Glu Asp Ile His Val Ile Glu Lys Met His His
        915                 920                 925
Val Asn Met Thr Pro Glu Phe Lys Glu Leu Tyr Ile Val Arg Glu Asn
    930                 935                 940
Lys Ala Leu Gln Lys Lys Cys Ala Asp Tyr Gln Ile Asn Gly Glu Ile
945                 950                 955                 960
Ile Cys Lys Cys Gly Gln Ala Trp Gly Thr Met Met Val His Lys Gly
                965                 970                 975
Leu Asp Leu Pro Cys Leu Lys Ile Arg Asn Phe Val Val Val Phe Lys
            980                 985                 990
Asn Asn Ser Thr Lys Lys Gln Tyr Lys Lys Trp Val Glu Leu Pro Ile
        995                 1000                1005
Thr Phe Pro Asn Leu Asp Tyr Ser Glu Cys Cys Leu Phe Ser Asp Glu
    1010                1015                1020
Asp
1025


<210> 311
<211> 925
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> RIG-I/DDX58
```

<400> 311
Met Thr Thr Glu Gln Arg Arg Ser Leu Gln Ala Phe Gln Asp Tyr Ile
 1   5   10   15
Arg Lys Thr Leu Asp Pro Thr Tyr Ile Leu Ser Tyr Met Ala Pro Trp
            20   25   30
Phe Arg Glu Glu Glu Val Gln Tyr Ile Gln Ala Glu Lys Asn Asn Lys
        35   40   45
Gly Pro Met Glu Ala Ala Thr Leu Phe Leu Lys Phe Leu Leu Glu Leu
    50   55   60
Gln Glu Glu Gly Trp Phe Arg Gly Phe Leu Asp Ala Leu Asp His Ala
65   70   75   80
Gly Tyr Ser Gly Leu Tyr Glu Ala Ile Glu Ser Trp Asp Phe Lys Lys
                85   90   95
Ile Glu Lys Leu Glu Glu Tyr Arg Leu Leu Leu Lys Arg Leu Gln Pro
            100   105   110
Glu Phe Lys Thr Arg Ile Ile Pro Thr Asp Ile Ile Ser Asp Leu Ser
        115   120   125
Glu Cys Leu Ile Asn Gln Glu Cys Glu Glu Ile Leu Gln Ile Cys Ser
    130   135   140
Thr Lys Gly Met Met Ala Gly Ala Glu Lys Leu Val Glu Cys Leu Leu
145   150   155   160
Arg Ser Asp Lys Glu Asn Trp Pro Lys Thr Leu Lys Leu Ala Leu Glu
                165   170   175
Lys Glu Arg Asn Lys Phe Ser Glu Leu Trp Ile Val Glu Lys Gly Ile
            180   185   190
Lys Asp Val Glu Thr Glu Asp Leu Glu Asp Lys Met Glu Thr Ser Asp
        195   200   205
Ile Gln Ile Phe Tyr Gln Glu Asp Pro Glu Cys Gln Asn Leu Ser Glu
    210   215   220
Asn Ser Cys Pro Pro Ser Glu Val Ser Asp Thr Asn Leu Tyr Ser Pro
225   230   235   240
Phe Lys Pro Arg Asn Tyr Gln Leu Glu Leu Ala Leu Pro Ala Met Lys
                245   250   255
Gly Lys Asn Thr Ile Ile Cys Ala Pro Thr Gly Cys Gly Lys Thr Phe
            260   265   270
Val Ser Leu Leu Ile Cys Glu His His Leu Lys Lys Phe Pro Gln Gly
        275   280   285
Gln Lys Gly Lys Val Val Phe Phe Ala Asn Gln Ile Pro Val Tyr Glu
    290   295   300
Gln Gln Lys Ser Val Phe Ser Lys Tyr Phe Glu Arg His Gly Tyr Arg
305   310   315   320
Val Thr Gly Ile Ser Gly Ala Thr Ala Glu Asn Val Pro Val Glu Gln
                325   330   335
Ile Val Glu Asn Asn Asp Ile Ile Ile Leu Thr Pro Gln Ile Leu Val
            340   345   350
Asn Asn Leu Lys Lys Gly Thr Ile Pro Ser Leu Ser Ile Phe Thr Leu
        355   360   365
Met Ile Phe Asp Glu Cys His Asn Thr Ser Lys Gln His Pro Tyr Asn
    370   375   380
Met Ile Met Phe Asn Tyr Leu Asp Gln Lys Leu Gly Gly Ser Ser Gly
385   390   395   400
Pro Leu Pro Gln Val Ile Gly Leu Thr Ala Ser Val Gly Val Gly Asp
                405   410   415
Ala Lys Asn Thr Asp Glu Ala Leu Asp Tyr Ile Cys Lys Leu Cys Ala
            420   425   430
Ser Leu Asp Ala Ser Val Ile Ala Thr Val Lys His Asn Leu Glu Glu
        435   440   445
Leu Glu Gln Val Val Tyr Lys Pro Gln Lys Phe Phe Arg Lys Val Glu
    450   455   460
Ser Arg Ile Ser Asp Lys Phe Lys Tyr Ile Ile Ala Gln Leu Met Arg

```
465                 470                 475                 480
Asp Thr Glu Ser Leu Ala Lys Arg Ile Cys Lys Asp Leu Glu Asn Leu
                485                 490                 495
Ser Gln Ile Gln Asn Arg Glu Phe Gly Thr Gln Lys Tyr Glu Gln Trp
            500                 505                 510
Ile Val Thr Val Gln Lys Ala Cys Met Val Phe Gln Met Pro Asp Lys
        515                 520                 525
Asp Glu Glu Ser Arg Ile Cys Lys Ala Leu Phe Leu Tyr Thr Ser His
    530                 535                 540
Leu Arg Lys Tyr Asn Asp Ala Leu Ile Ile Ser Glu His Ala Arg Met
545                 550                 555                 560
Lys Asp Ala Leu Asp Tyr Leu Lys Asp Phe Phe Ser Asn Val Arg Ala
                565                 570                 575
Ala Gly Phe Asp Glu Ile Glu Gln Asp Leu Thr Gln Arg Phe Glu Glu
            580                 585                 590
Lys Leu Gln Glu Leu Glu Ser Val Ser Arg Asp Pro Ser Asn Glu Asn
        595                 600                 605
Pro Lys Leu Glu Asp Leu Cys Phe Ile Leu Gln Glu Glu Tyr His Leu
    610                 615                 620
Asn Pro Glu Thr Ile Thr Ile Leu Phe Val Lys Thr Arg Ala Leu Val
625                 630                 635                 640
Asp Ala Leu Lys Asn Trp Ile Glu Gly Asn Pro Lys Leu Ser Phe Leu
                645                 650                 655
Lys Pro Gly Ile Leu Thr Gly Arg Gly Lys Thr Asn Gln Asn Thr Gly
            660                 665                 670
Met Thr Leu Pro Ala Gln Lys Cys Ile Leu Asp Ala Phe Lys Ala Ser
        675                 680                 685
Gly Asp His Asn Ile Leu Ile Ala Thr Ser Val Ala Asp Glu Gly Ile
    690                 695                 700
Asp Ile Ala Gln Cys Asn Leu Val Ile Leu Tyr Glu Tyr Val Gly Asn
705                 710                 715                 720
Val Ile Lys Met Ile Gln Thr Arg Gly Arg Gly Arg Ala Arg Gly Ser
                725                 730                 735
Lys Cys Phe Leu Leu Thr Ser Asn Ala Gly Val Ile Glu Lys Glu Gln
            740                 745                 750
Ile Asn Met Tyr Lys Glu Lys Met Met Asn Asp Ser Ile Leu Arg Leu
        755                 760                 765
Gln Thr Trp Asp Glu Ala Val Phe Arg Glu Lys Ile Leu His Ile Gln
    770                 775                 780
Thr His Glu Lys Phe Ile Arg Asp Ser Gln Glu Lys Pro Lys Pro Val
785                 790                 795                 800
Pro Asp Lys Glu Asn Lys Lys Leu Leu Cys Arg Lys Cys Lys Ala Leu
                805                 810                 815
Ala Cys Tyr Thr Ala Asp Val Arg Val Ile Glu Glu Cys His Tyr Thr
            820                 825                 830
Val Leu Gly Asp Ala Phe Lys Glu Cys Phe Val Ser Arg Pro His Pro
        835                 840                 845
Lys Pro Lys Gln Phe Ser Ser Phe Glu Lys Arg Ala Lys Ile Phe Cys
    850                 855                 860
Ala Arg Gln Asn Cys Ser His Asp Trp Gly Ile His Val Lys Tyr Lys
865                 870                 875                 880
Thr Phe Glu Ile Pro Val Ile Lys Ile Glu Ser Phe Val Val Glu Asp
                885                 890                 895
Ile Ala Thr Gly Val Gln Thr Leu Tyr Ser Lys Trp Lys Asp Phe His
            900                 905                 910
Phe Glu Lys Ile Pro Phe Asp Pro Ala Glu Met Ser Lys
        915                 920                 925
```

<210> 312
<211> 427
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<223> IRF-3, isofom 1

<400> 312
Met Gly Thr Pro Lys Pro Arg Ile Leu Pro Trp Leu Val Ser Gln Leu
 1   5   10   15
Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gly Val Ala Trp Val Asn Lys Ser Arg Thr
            20   25   30
Arg Phe Arg Ile Pro Trp Lys His Gly Leu Arg Gln Asp Ala Gln Gln
        35   40   45
Glu Asp Phe Gly Ile Phe Gln Ala Trp Ala Glu Ala Thr Gly Ala Tyr
    50   55   60
Val Pro Gly Arg Asp Lys Pro Asp Leu Pro Thr Trp Lys Arg Asn Phe
65   70   75   80
Arg Ser Ala Leu Asn Arg Lys Glu Gly Leu Arg Leu Ala Glu Asp Arg
                85   90   95
Ser Lys Asp Pro His Asp Pro His Lys Ile Tyr Glu Phe Val Asn Ser
            100   105   110
Gly Val Gly Asp Phe Ser Gln Pro Asp Thr Ser Pro Asp Thr Asn Gly
        115   120   125
Gly Gly Ser Thr Ser Asp Thr Gln Glu Asp Ile Leu Asp Glu Leu Leu
    130   135   140
Gly Asn Met Val Leu Ala Pro Leu Pro Asp Pro Gly Pro Pro Ser Leu
145   150   155   160
Ala Val Ala Pro Glu Pro Cys Pro Gln Pro Leu Arg Ser Pro Ser Leu
                165   170   175
Asp Asn Pro Thr Pro Phe Pro Asn Leu Gly Pro Ser Glu Asn Pro Leu
            180   185   190
Lys Arg Leu Leu Val Pro Gly Glu Glu Trp Glu Phe Glu Val Thr Ala
        195   200   205
Phe Tyr Arg Gly Arg Gln Val Phe Gln Gln Thr Ile Ser Cys Pro Glu
    210   215   220
Gly Leu Arg Leu Val Gly Ser Glu Val Gly Asp Arg Thr Leu Pro Gly
225   230   235   240
Trp Pro Val Thr Leu Pro Asp Pro Gly Met Ser Leu Thr Asp Arg Gly
                245   250   255
Val Met Ser Tyr Val Arg His Val Leu Ser Cys Leu Gly Gly Gly Leu
            260   265   270
Ala Leu Trp Arg Ala Gly Gln Trp Leu Trp Ala Gln Arg Leu Gly His
        275   280   285
Cys His Thr Tyr Trp Ala Val Ser Glu Glu Leu Leu Pro Asn Ser Gly
    290   295   300
His Gly Pro Asp Gly Glu Val Pro Lys Asp Lys Glu Gly Gly Val Phe
305   310   315   320
Asp Leu Gly Pro Phe Ile Val Asp Leu Ile Thr Phe Thr Glu Gly Ser
                325   330   335
Gly Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Leu Trp Phe Cys Val Gly Glu Ser Trp
            340   345   350
Pro Gln Asp Gln Pro Trp Thr Lys Arg Leu Val Met Val Lys Val Val
        355   360   365
Pro Thr Cys Leu Arg Ala Leu Val Glu Met Ala Arg Val Gly Gly Ala
    370   375   380
Ser Ser Leu Glu Asn Thr Val Asp Leu His Ile Ser Asn Ser His Pro
385   390   395   400
Leu Ser Leu Thr Ser Asp Gln Tyr Lys Ala Tyr Leu Gln Asp Leu Val
                405   410   415
Glu Gly Met Asp Phe Gln Gly Pro Gly Glu Ser
            420   425

<210> 313
<211> 503
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> IRF-7, isoform A

<400> 313
Met Ala Leu Ala Pro Glu Arg Ala Ala Pro Arg Val Leu Phe Gly Glu
 1   5   10   15
Trp Leu Leu Gly Glu Ile Ser Ser Gly Cys Tyr Glu Gly Leu Gln Trp
            20   25   30
Leu Asp Glu Ala Arg Thr Cys Phe Arg Val Pro Trp Lys His Phe Ala
        35   40   45
Arg Lys Asp Leu Ser Glu Ala Asp Ala Arg Ile Phe Lys Ala Trp Ala
    50   55   60
Val Ala Arg Gly Arg Trp Pro Pro Ser Ser Arg Gly Gly Gly Pro Pro
65   70   75   80
Pro Glu Ala Glu Thr Ala Glu Arg Ala Gly Trp Lys Thr Asn Phe Arg
                85   90   95
Cys Ala Leu Arg Ser Thr Arg Arg Phe Val Met Leu Arg Asp Asn Ser
            100   105   110
Gly Asp Pro Ala Asp Pro His Lys Val Tyr Ala Leu Ser Arg Glu Leu
        115   120   125
Cys Trp Arg Glu Gly Pro Gly Thr Asp Gln Thr Glu Ala Glu Ala Pro
    130   135   140
Ala Ala Val Pro Pro Pro Gln Gly Gly Pro Pro Gly Pro Phe Leu Ala
145   150   155   160
His Thr His Ala Gly Leu Gln Ala Pro Gly Pro Leu Pro Ala Pro Ala
                165   170   175
Gly Asp Lys Gly Asp Leu Leu Leu Gln Ala Val Gln Gln Ser Cys Leu
            180   185   190
Ala Asp His Leu Leu Thr Ala Ser Trp Gly Ala Asp Pro Val Pro Thr
        195   200   205
Lys Ala Pro Gly Glu Gly Gln Glu Gly Leu Pro Leu Thr Gly Ala Cys
    210   215   220
Ala Gly Gly Pro Gly Leu Pro Ala Gly Glu Leu Tyr Gly Trp Ala Val
225   230   235   240
Glu Thr Thr Pro Ser Pro Gly Pro Gln Pro Ala Ala Leu Thr Thr Gly
                245   250   255
Glu Ala Ala Ala Pro Glu Ser Pro His Gln Ala Glu Pro Tyr Leu Ser
            260   265   270
Pro Ser Pro Ser Ala Cys Thr Ala Val Gln Glu Pro Ser Pro Gly Ala
        275   280   285
Leu Asp Val Thr Ile Met Tyr Lys Gly Arg Thr Val Leu Gln Lys Val
    290   295   300
Val Gly His Pro Ser Cys Thr Phe Leu Tyr Gly Pro Pro Asp Pro Ala
305   310   315   320
Val Arg Ala Thr Asp Pro Gln Gln Val Ala Phe Pro Ser Pro Ala Glu
                325   330   335
Leu Pro Asp Gln Lys Gln Leu Arg Tyr Thr Glu Glu Leu Leu Arg His
            340   345   350
Val Ala Pro Gly Leu His Leu Glu Leu Arg Gly Pro Gln Leu Trp Ala
        355   360   365
Arg Arg Met Gly Lys Cys Lys Val Tyr Trp Glu Val Gly Gly Pro Pro
    370   375   380
Gly Ser Ala Ser Pro Ser Thr Pro Ala Cys Leu Leu Pro Arg Asn Cys
385   390   395   400
Asp Thr Pro Ile Phe Asp Phe Arg Val Phe Phe Gln Glu Leu Val Glu

```
                405                 410                 415
Phe Arg Ala Arg Gln Arg Arg Gly Ser Pro Arg Tyr Thr Ile Tyr Leu
            420                 425                 430
Gly Phe Gly Gln Asp Leu Ser Ala Gly Arg Pro Lys Glu Lys Ser Leu
        435                 440                 445
Val Leu Val Lys Leu Glu Pro Trp Leu Cys Arg Val His Leu Glu Gly
    450                 455                 460
Thr Gln Arg Glu Gly Val Ser Ser Leu Asp Ser Ser Ser Leu Ser Leu
465                 470                 475                 480
Cys Leu Ser Ser Ala Asn Ser Leu Tyr Asp Asp Ile Glu Cys Phe Leu
                485                 490                 495
Met Glu Leu Glu Gln Pro Ala
            500
```

<210> 314
<211> 1184
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Elongation factor 1 (EF1) alpha promoter

<400> 314
```
cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60
tgggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa 180
gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240
gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300
gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360
ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420
cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480
ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgcttttt 540
tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600
gggccgcggg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720
tgcctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780
caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840
ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900
ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc 960
tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttgggggggag gggttttatg 1020
cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080
tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140
agacagtggt tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtga                  1184
```

<210> 315
<211> 3199
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Plasmid pSL0191

<400> 315
```
gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
```

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc 1380
ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggttt 1560
cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800
gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1980
cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
accatgatta cgccaagctc ggcgcgccat tgggatggaa ccgcgtgacg gttctgagtg 2280
ctaaatcaaa cgccgttaac ccgatactct ctcagattat tctctgttta tagtttgtta 2340
agattttatt caggttaatg ttgttattat cacagtcgaa tttttgaacg gtatgtatgt 2400
tgcgatgatc atcagaaagt attttcttat tattgctctc cttttgatgc catggctggc 2460
tattcgctag cctcaataag cttcttgcct ttctgcaggt tttgatgggg aagggtatgc 2520
ttcagttgtg aattaaaaag tcttaaaaaa caataagtag atagagttag ctaaaaatta 2580
acgcgatatt tatcactttt tcgcaaagtt cgactggaca aaatgcatca caattgttgt 2640
actggtatcc gacacagcat ttgtgtctat ttttcatgta aaggtaattt tgatgtctaa 2700
gattaaaggt aacgttaagt ggtttaatga atccaaagga ttcggtttca ttactccgga 2760
agatggcagc aaagacgtgg ttccatccca atacgcgtca attcactggc cgtcgtttta 2820
caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc 2880
cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg 2940
cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt 3000
atttcacacc gcatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc 3060
cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca 3120
tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg 3180
tcatcaccga aacgcgcga 3199

<210> 316
<211> 3141
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Plasmid pSL0196

<400> 316
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt gacgcgtatt gggatacact 420
tgctttaaga tttgtaatgg ctagattgaa aacagttaaa agtattttcg taaatatttt 480
tctctttctg gataatgggc tatttcaacc cacagcagtg caacatctgt cagtacttct 540
ggtgccttta ttttatgggg gcagctgtca gatgtgcgat taaaaaaagt ggagtttcat 600
catgtttaat gaagtccata gtagctagcc tcaataagct tcttgccttt ctgcagacca 660
aggacccaga ttatgtttca tgggcaaacg ataatctcag gcggtaaggc catgaaacgc 720
tatctgacct ggattgtagc agcagagtta ctgttcgcta ccggaaacct gcatgccaat 780
gaagttgaag tcgaggttcc cggattgtta accgaccaga ccgtctcttc gataggacat 840
gaattctatc gtgcattcag cgacaaatgg gaaagcgaat acaccatccc aatggcgcgc 900
cgagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa 960
ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga 1020
gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt 1080
gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct 1140
cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 1200
cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 1260
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 1320
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 1380
ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 1440
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 1500
gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 1560
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 1620
actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 1680
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc 1740
ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 1800
ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 1860
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 1920
tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 1980
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 2040
aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 2100
aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 2160
tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc 2220
gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 2280
agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 2340
aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag 2400
gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 2460
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc 2520
cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 2580
ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa 2640
ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 2700
gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 2760
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taacccactc 2820
gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 2880
caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 2940
tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 3000
acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 3060
aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc 3120
gtatcacgag gccctttcgt c 3141

<210> 317
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> csgd-1 primer

<400> 317
cacttgcttt aagatttgta atggctag 28

<210> 318
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> csgd-2 primer

<400> 318
ggtgtattcg ctttcccatt tgtc 24

<210> 319
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> csgd-3 primer

<400> 319
tgtgctgtcc aggttaatgc c 21

<210> 320
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> csgd-4 primer

<400> 320
gacgacggtt ttctcgaagt ctc 23

<210> 321
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pagp-1 primer

<400> 321
gcgtgacggt tctgagtgct 20

<210> 322
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pagp-2 primer

<400> 322
cgtctttgct gccatcttcc g 21

<210> 323
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pagp-3 primer

<400> 323
acaataacga cgactccgat aagg 24

<210> 324
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pagp-4 primer

<400> 324
ctgctgaatg tgctgattaa cctg 24

<210> 325
<211> 664
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> csgD

<400> 325
gtggagtttc atcatgttta atgaagtcca tagtagtcat ggtcacacac tattgttgat 60
cacaaagcca tctctgcaag ctacggcatt attgcaacat ttaaagcaat cgctggccat 120
aaccggaaaa ctgcataata ttcaacgttc tctggaagat atctcggccg gttgcattgt 180
tttaatggat atgatggaag cggataagaa gcttatccac tattggcagg ataatttaag 240
ccgcaaaaac aataatataa aaacattatt gttaaatacc cctgacgatt atccctaccg 300
tgaaattgaa aactggcctc atattaacgg cgtgttttac gctactgaag accaggaaca 360
cgtggtcagc ggattacagg gtattctgcg tggcgaatgc tatttttcac aaaaattagc 420
cagttacctg attacgcact caggaaatta ccgctacaac agcaccgagt ccgcattact 480
cactcatcgc gaaaaagaga tcctcaataa gttacgtatt ggtgcctcta ataatgaaat 540
cgcgaggtcg ctatttatca gcgagaatac ggttaagaca catctttata atcttttcaa 600
aaagatagct gtcaaaaatc gcacccaggc agtttcatgg gcaaacgata atctcaggcg 660
gtaa 664

<210> 326
<211> 4369
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> pagP

<400> 326
gaattccagc acggcggcca gcagcataca gatcaccaga atggtaataa tgtgcaactg 60

cggcccccat ttaccgtcaa aaatcagtac gccgataatg ggcgtgaacg gcaaaagggc 120
ataaaacgcc ggggccgtgg tggtaatctc cgccacgtcc agcatctcat gtgaaatgtt 180
ctcttttta tccagatagc gttgccagaa aaagtgcgca atcgccatac cgataatggc 240
ggcgatggaa attggcagcg tagttttgaa cgcgaaatcg attaacggca tctccgccgc 300
ttttgcggct aaaaccacat cgccagacgt tggcgagagg atgatggcgg ccggagaggc 360
gcaaatagcc gccgccgcgc cgcggctaat gccgacgttg accatcaccg ggaagagagt 420
agccatgagc agtacgccaa gccccgtcgc ggaagagacg gccagcgaca tcaggcaggc 480
gacaaaatag gcggcaatca tcaacaggta gggcgagttt atgtactgta aaggtttcga 540
cgccagcttc acgaccatat cattcgcgcc gatatgcgtc atataggcgg caaagccgca 600
cagcatcatg atcatcatgc caagatcgcc gccgcgactc ataagcaaaa ttttgatgta 660
ttcaacaata tctgttgcgg tatagccggt actggtttcg ctggcaggta ataccttatg 720
ccccatcagc gcgctgataa taagcagagc cagaccgccg acaaataaaa cgccagtggc 780
ggaatatccc ttaatgatgt agcgcgctac acccacaata acgacgattc cgataaggac 840
ctctataact gttagcattg tttcccctgt cttatcgaca cccagagtaa aaataagaac 900
cacaaaagtg gtataaaaat gtaccgaata aaggatggcg ccttactgat taaaatcacg 960
gcgcggttat tttttcatgt cattgctaaa gatgaaatat acttatacga attttctgta 1020
gcactataag tattaattta ttgttatttt attgttttat ttgttgtgct ttgttttgtg 1080
ttttttgtga aagcttatta aggagcgcgt gacggttctg agtgctaaat caaacgccgt 1140
taacccgata ctctctcaga ttattctctg tttatagttt gttaagattt tattcaggtt 1200
aatgttgtta ttatcacagt cgaatttttg aacggtatgt atgttgcgat gatcatcaga 1260
aagtattttc ttattattgc tctccttttg atgccatggc tggctattcc ttcagtctct 1320
gcggcggata aaggggggtt taacacgttt accgataacg tcgcagaaac gtggcgacag 1380
cctgagcatt atgatttgta tgtccccgcc attacctggc atgcgcgctt tgcctacgat 1440
aaagagaaaa cggatcgcta taacgagcgg ccgtggggcg ttggttttgg tcagtcccgc 1500
tgggacgaca aaggcaactg gcatggcctc tatatgatgg cctttaaaga ttcatttaac 1560
aaatgggaac ccataggcgg ttatggctgg gaaaaaacct ggcgaccgct ggaagacgat 1620
aattttcgcc ttggactggg ctttaccgca ggcgttaccg cgcgcgacaa ctggaattat 1680
attcccatcc ctgtgctgtt gcctttagcg tcgataggct atggtcccgc tacctttcag 1740
atgacctaca ttccgggttc gtataacaac ggaaacgtct atttcgcctg gatgcgtttc 1800
cagttttgat ggggaagggt atgcttcagt tgtgaattaa aaagtcttaa aaaacaataa 1860
gtagatagag ttagctaaaa attaacgcga tatttatcac tttttcgcaa agttcgactg 1920
gacaaaatgc atcacaattg ttgtactggt atccgacaca gcatttgtgt ctatttttca 1980
tgtaaaggta attttgatgt ctaagattaa aggtaacgtt aagtggttta atgaatccaa 2040
aggattcggt ttcattactc cggaagatgg cagcaaagac gtgtttgtac acttctctgc 2100
aatccagacc aatggtttta aaactctggc tgaaggtcag cgcgtagagt tcgaaatcac 2160
taacggtgcc aaaggccctt ccgctgcaaa cgtaactgct ctgtaagcat acgtccgaca 2220
gcaagatttc aaaacccgcc ctttcggcgg gtttttttttg cgcttaacgc gccgctgcgg 2280
cggaaaatag ccagaatgcc agcgccgtca tggcaaacga acctaacagg ttaatcagca 2340
cattcagcag cgcccagcca aagcgcccct cttgcagcaa gaataccact tcggcagaaa 2400
aagtagaaaa ggtcgtcagg ccgccgcaaa agccggttgt gatgagcact ttccacatcg 2460
gatcgatatg tgtcatgcgg ttaaaccagg cgaaccccat gccgataata aacgcgccaa 2520
gcaaatttgc tgttagcgta ccgatgggaa tcgcctgatg aagcggatta aaacgcatac 2580
tgagcatcca ccgggctacg ctccccgttc caccgccgat aaaaactgct aaaagaagct 2640
gtaacactgc cgaatccttt atttaattgc tatacaagag gagtgtaacg ccgaacacgc 2700
ataattggcg agtcctgaca gaggtgtggg aggggatatg ttcgttgcag ccgggcagtt 2760
tgtggtgagt tctgtatggg aagagaatgc gcaagtttgc gtttcgttaa tggctcaggc 2820
ggcgggccgc ggcgtatcgc ttctggtgtt gcctgagggg atattagcgc gagatgacat 2880
cgaccttgac ctgccgattc gcgccgcgca gccgctggat ggcgcgttta tgacgcggct 2940
tctggaagaa agcgctcata ataatatgac gacgatattc actatccttg tcccgtcaac 3000
gcctggacgg gcggttaata tgctggtggc gctacgggcg ggtcacattg tcgcgcgtta 3060
cgcgaagctg catctctatg atgcgttttc gatgcaagaa tcccaaagta ttgatgccgg 3120
aaccgttatc gcgcctgtgc tggacgtgga gggggttaag gtggggctta tgacctgtta 3180
tgacctgcgc tttccggaca tggcgctagc gctggcttta caggggggctg acgtattggc 3240
gctgccgacg ggctgggttc gcggcccgtt gaaagagcag cagtggtcga cgctgctggc 3300
ggcgagagcg ctggatacca ccagctatat gattgcggcc ggggagtgtg gtaatcgtaa 3360
tattggtcaa agtcgtatta tcgatccgtt gggggtaacg atagccgcgg cagccgatcg 3420
tccggcgctg atcgtcgcgg aaatattcag agaacgaata gaccaggtgc gggagcaact 3480
tcctcttttg cagcaacgac gatttgcgcc accgcaatta ttatgatgtt tttttacgca 3540
aagcttgatt caccttgtta cagattgcta ttgtgtgcgc gcgtcgaaag accgttaata 3600
ttctcaggtt aatccggcgc gttacgcagc ctgtttttag tgaagaaggt atctatgggt 3660
gagattagta ttaccaaact gctggtggtt gccgcactgg ttgttctgct gtttggtacc 3720

aagaagttac gtacgctggg cggagacctg ggcacggcga ttaaaggatt caagaaagca 3780
atgaacgatg aagacgcggg cgttaagaaa gacgtcgacg gtagcgttca ggctgaaaaa 3840
ctctcgcaca aagagtaatt gcgcgatgcg cttgctccgc agagtaaaaa aaccggcgag 3900
ttgccggttt tttttgcctg aaatgtaagc gtctattaca cgatcatttc acttccatgc 3960
ctttggcctg gagatcagca tggtacgaag aacgtacaaa ggggccacag gcggcatggg 4020
taaagcccat cgccagggct tccgctttca tctcgtcaaa ctcttccggg ctgacataac 4080
gctgtaccgg caggtgatgg cggcttggct gtagatactg accaagcgtc agcatggtaa 4140
cgccgtgacg gcgtaagtcg cgcataacct caatgatttc cgcattggtt tcgcctaagc 4200
ccaccatcag acccgatttt gtcggaattt ccgggtgcgc ttctttgaag cgttccagta 4260
atttcagcga ccagttgtaa tcggcgcccg gacgaacctg gcggtaaata cgcggcacgt 4320
tttccaggtt gtggttaaac acatccggcg gcgtcgcgtt aaggatatc 4369

<210> 327
<211> 1500
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> fliC

<400> 327
aaggaaaaga tcatggcaca agtcattaat acaaacagcc tgtcgctgtt gacccagaat 60
aacctgaaca aatcccagtc cgctctgggc accgctatcg agcgtctgtc ttccggtctg 120
cgtatcaaca gcgcgaaaga cgatgcggca ggtcaggcga ttgctaaccg ttttaccgcg 180
aacatcaaag gtctgactca ggcttcccgt aacgctaacg acggtatctc cattgcgcag 240
accactgaag gcgcgctgaa cgaaatcaac aacaacctgc agcgtgtgcg tgaactggcg 300
gttcagtctg ctaacagcac caactcccag tctgacctcg actccatcca ggctgaaatc 360
acccagcgcc tgaacgaaat cgaccgtgta tccggccaga ctcagttcaa cggcgtgaaa 420
gtcctggcgc aggacaacac cctgaccatc caggttggtg ccaacgacgg tgaaactatc 480
gatatcgatc tgaagcagat caactctcag accctgggtc tggatacgct gaatgtgcaa 540
caaaaatata aggtcagcga tacggctgca actgttacag gatatgccga tactacgatt 600
gctttagaca atagtacttt taaagcctcg gctactggtc ttggtggtac tgaccagaaa 660
attgatggcg atttaaaatt tgatgatacg actggaaaat attacgccaa agttaccgtt 720
acgggggggaa ctggtaaaga tggctattat gaagtttccg ttgataagac gaacggtgag 780
gtgactcttg ctggcggtgc gacttccccg cttacaggtg gactacctgc gacagcaact 840
gaggatgtga aaaatgtaca agttgcaaat gctgatttga cagaggctaa agccgcattg 900
acagcagcag gtgttaccgg cacagcatct gttgttaaga tgtcttatac tgataataac 960
ggtaaaacta ttgatggtgg tttagcagtt aaggtaggcg atgattacta ttctgcaact 1020
caaaataaag atggttccat aagtattaat actacgaaat acactgcaga tgacggtaca 1080
tccaaaactg cactaaacaa actgggtggc gcagacggca aaaccgaagt tgtttctatt 1140
ggtggtaaaa cttacgctgc aagtaaagcc gaaggtcaca actttaaagc acagcctgat 1200
ctggcggaag cggctgctac aaccaccgaa aacccgctgc agaaaattga tgctgctttg 1260
gcacaggttg acacgttacg ttctgacctg ggtgcggtac agaaccgttt caactccgct 1320
attaccaacc tgggcaacac cgtaaacaac ctgacttctg cccgtagccg tatcgaagat 1380
tccgactacg cgaccgaagt ttccaacatg tctcgcgcgc agattctgca gcaggccggt 1440
acctccgttc tggcgcaggc gaaccaggtt ccgcaaaacg tcctctcttt actgcgttaa 1500

<210> 328
<211> 1528
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> fljB

<400> 328
aaattttatg gcacaagtaa tcaacactaa cagtctgtcg ctgctgaccc agaataacct 60
gaacaaatcc cagtccgcac tgggcaccgc tatcgagcgt ctgtcttctg gtctgcgtat 120
caacagcgcg aaagacgatg cggcaggtca ggcgattgct aaccgtttca ccgcgaacat 180

caaaggtctg actcaggctt cccgtaacgc taacgacggt atctccattg cgcagaccac 240
tgaaggcgcg ctgaacgaaa tcaacaacaa cctgcagcgt gtgcgtgaac tggcggttca 300
gtctgctaac agcaccaact cccagtctga cctcgactcc atccaggctg aaatcaccca 360
gcgcctgaac gaaatcgacc gtgtatccgg ccagactcag ttcaacggcg tgaaagtcct 420
ggcgcaggac aacaccctga ccatccaggt tggcgccaac gacggtgaaa ctatcgatat 480
cgatctgaag cagatcaact ctcagaccct gggtctggac tcactgaacg tgcagaaagc 540
gtatgatgtg aaagatacag cagtaacaac gaaagcttat gccaataatg gtactacact 600
ggatgtatcg ggtcttgatg atgcagctat taaagcggct acgggtggta cgaatggtac 660
ggcttctgta accggtggtg cggttaaatt tgacgcagat aataacaagt actttgttac 720
tattggtggc tttactggtg ctgatgccgc caaaaatggc gattatgaag ttaacgttgc 780
tactgacggt acagtaaccc ttgcggctgg cgcaactaaa accacaatgc ctgctggtgc 840
gacaactaaa acagaagtac aggagttaaa agatacaccg gcagttgttt cagcagatgc 900
taaaaatgcc ttaattgctg gcggcgttga cgctaccgat gctaatggcg ctgagttggt 960
caaaatgtct tataccgata aaaatggtaa gacaattgaa ggcggttatg cgcttaaagc 1020
tggcgataag tattacgccg cagattacga tgaagcgaca ggagcaatta aagctaaaac 1080
tacaagttat actgctgctg acggcactac caaaacagcg gctaaccaac tgggtggcgt 1140
agacggtaaa accgaagtcg ttactatcga cggtaaaacc tacaatgcca gcaaagccgc 1200
tggtcatgat ttcaaagcac aaccagagct ggcggaagca gccgctaaaa ccaccgaaaa 1260
cccgctgcag aaaattgatg ccgcgctggc gcaggtggat gcgctgcgct ctgatctggg 1320
tgcggtacaa aaccgtttca actctgctat caccaacctg ggcaataccg taaacaatct 1380
gtctgaagcg cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg accgaagttt ccaacatgtc 1440
tcgcgcgcag attctgcagc aggccggtac ttccgttctg gcgcaggcta accaggtccc 1500
gcagaacgtg ctgtctctgt tacgttaa 1528

<210> 329
<211> 589
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional
Regulatory Element (WPRE)

<400> 329
aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct 60
ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt 120
atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagttg 180
tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 240
ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt cccctccct 300
attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg 360
ttgggcactg acaattccgt ggtgttgtcg gggaagctga cgtcctttcc atggctgctc 420
gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc 480
aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt 540
cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgc 589

<210> 330
<211> 398
<212> PRT
<213> Danio rerio

<220>
<223> WT Zebrafish STING (zfSTING)

<400> 330
Met Ser Val Met Gly Glu Asp Ala Leu Val Pro Arg Ala Arg Ser Arg
1 5 10 15
Leu Pro Val Met Cys Ala Ala Gly Leu Gly Phe Leu Thr Leu Ala Val
20 25 30
Ala Trp Leu Leu Asp Ser Asp Lys Phe Ser Glu Arg Ala Gly Ile Ile

```
        35                  40                  45
Ala Phe Gly Leu Met Leu Glu Arg Phe Ile Tyr Cys Ile Cys Leu Leu
    50                  55                  60
Ala Glu Glu Leu Leu Phe His Ser Arg Gln Arg Tyr His Gly Arg Met
65                  70                  75                  80
Ser Glu Ile Phe Arg Ala Cys Phe Arg Gly Ser Gly Ile Leu Gly Met
                85                  90                  95
Cys Ala Ile Phe Leu Met Leu Met Leu Gly Gly Val Ser Phe Ser Val
            100                 105                 110
Lys Gln Trp Ser His Phe Asn Leu Met Cys Ala Gly Tyr Met Leu Leu
        115                 120                 125
Asn Ser Leu Gly Val Leu Gly Pro Ala Pro Val Glu Ile Ser Glu Ile
    130                 135                 140
Cys Glu Ala Lys Lys Met Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp Ser Phe
145                 150                 155                 160
Tyr Ile Gly Tyr Leu Lys Phe Leu Leu Pro Ala Leu Glu Val Asn Val
                165                 170                 175
Arg Glu Tyr Ser Arg Arg Glu Arg Leu Ser Ser Pro Arg Leu His Ile
            180                 185                 190
Leu Leu Pro Leu Asn Ala Arg Val Pro Ser Lys Pro Glu Glu Glu Asp
        195                 200                 205
Thr Asn Val Val Phe His Glu Asn Leu Pro Asp Leu Lys Leu Asp Arg
    210                 215                 220
Ala Gly Val Arg Lys Arg Ser Tyr Thr Asn Ser Val Tyr Lys Ile Thr
225                 230                 235                 240
His Asn Asn Glu Thr Phe Ser Cys Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu
                245                 250                 255
Leu Thr Leu Tyr Gln Met Ser Gln Glu Ser Ser Ala Gly Phe Gly Glu
            260                 265                 270
Arg Glu Arg Lys Gln Gln Val Leu Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Gln
        275                 280                 285
Ile Leu Asp Asn Ser Leu Glu Cys Arg Asn Arg Tyr Arg Leu Ile Leu
    290                 295                 300
Leu Asn Asp Glu His Thr Gly Asp Pro His Tyr Leu Ser Arg Glu Leu
305                 310                 315                 320
Phe Gln Asn Leu Lys Gln Gln Asp Gly Glu Ile Phe Met Asp Pro Thr
                325                 330                 335
Asn Glu Val His Pro Val Pro Glu Glu Gly Pro Val Gly Asn Cys Asn
            340                 345                 350
Gly Ala Leu Gln Ala Thr Phe His Glu Glu Pro Met Ser Asp Glu Pro
        355                 360                 365
Thr Leu Met Phe Ser Arg Pro Gln Ser Leu Arg Ser Glu Pro Val Glu
    370                 375                 380
Thr Thr Asp Tyr Phe Asn Pro Ser Ser Ala Met Lys Gln Asn
385                 390                 395


<210> 331
<211> 381
<212> PRT
<213> Sarcophilus harrisii

<220>
<223> WT Tasmanian devil STING (tazSTING)

<400> 331
Met Pro Arg Ser His Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Trp
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Cys Val Leu Leu Ser Leu Cys Met Ala Ala
            20                  25                  30
Val Tyr Ile Leu Gly Glu Ser Ala Ala Phe Thr Leu Gln Trp Leu Leu
```

```
        35                  40                  45
Phe Tyr Phe Thr Thr Val Gln Val Gly Leu Leu Leu Lys Gly Ala Tyr
    50                  55                  60
Cys Leu Ala Glu Glu Leu Tyr His Ile Gln Ser Arg His Gln Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Gln Ala Ile Gln Ala Cys Ile His Tyr Pro Phe Gln Arg Ile
                85                  90                  95
Ser Leu Leu Leu Leu Ser Gly Tyr Phe Tyr Val Thr Leu Ser Asn Lys
            100                 105                 110
Pro Asn Pro Ser Leu Thr Trp Thr Phe Ala Leu Leu Gly Leu Ser His
        115                 120                 125
Ala Leu Ser Phe Ile Leu Gly Leu Gln Asn Leu Thr Ser Ala Glu Ile
    130                 135                 140
Ser Glu Val Cys Glu Lys Arg His Leu Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Lys Leu Ile Leu Pro Gly Leu Gln
                165                 170                 175
Thr Arg Ile Gln Ile Tyr Asn Gln Phe Asn Lys Asp Val Leu Arg Ser
            180                 185                 190
Pro Glu Gly His Arg Leu His Ile Leu Ile Pro Leu Asp Cys Ser Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Gln Ala Asp Pro Asn Ile Gln Phe Leu Gln Glu
    210                 215                 220
Leu Pro Gln His Lys Leu Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Thr Asn Ser Ile Tyr Lys Ile Ser Glu Asp Gly Gln Pro Ala Glu Val
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Phe Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Asp Ala Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ala Arg Asp Cys Cys Arg Leu Val Val Tyr Gln Glu Pro Glu Asp Lys
305                 310                 315                 320
Ala Val Ser Asn Phe Ser Leu Ser Lys Glu Ile Leu Arg His Leu Arg
                325                 330                 335
Gln Glu Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr
            340                 345                 350
Val Thr Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser
        355                 360                 365
Gly Met Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe
    370                 375                 380
```

<210> 332
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tasmanian devil STING (tazSTING) C206Y

```
<400> 332
Met Pro Arg Ser His Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Trp
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Cys Val Leu Leu Ser Leu Cys Met Ala Ala
            20                  25                  30
Val Tyr Ile Leu Gly Glu Ser Ala Ala Phe Thr Leu Gln Trp Leu Leu
        35                  40                  45
Phe Tyr Phe Thr Thr Val Gln Val Gly Leu Leu Leu Lys Gly Ala Tyr
```

```
    50                  55                  60
Cys Leu Ala Glu Glu Leu Tyr His Ile Gln Ser Arg His Gln Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Gln Ala Ile Gln Ala Cys Ile His Tyr Pro Phe Gln Arg Ile
                85                  90                  95
Ser Leu Leu Leu Leu Ser Gly Tyr Phe Tyr Val Thr Leu Ser Asn Lys
            100                 105                 110
Pro Asn Pro Ser Leu Thr Trp Thr Phe Ala Leu Leu Gly Leu Ser His
        115                 120                 125
Ala Leu Ser Phe Ile Leu Gly Leu Gln Asn Leu Thr Ser Ala Glu Ile
    130                 135                 140
Ser Glu Val Cys Glu Lys Arg His Leu Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Lys Leu Ile Leu Pro Gly Leu Gln
                165                 170                 175
Thr Arg Ile Gln Ile Tyr Asn Gln Phe Asn Lys Asp Val Leu Arg Ser
            180                 185                 190
Pro Glu Gly His Arg Leu His Ile Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Ser Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Gln Ala Asp Pro Asn Ile Gln Phe Leu Gln Glu
    210                 215                 220
Leu Pro Gln His Lys Leu Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Thr Asn Ser Ile Tyr Lys Ile Ser Glu Asp Gly Gln Pro Ala Glu Val
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Phe Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Asp Ala Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ala Arg Asp Cys Cys Arg Leu Val Val Tyr Gln Glu Pro Glu Asp Lys
305                 310                 315                 320
Ala Val Ser Asn Phe Ser Leu Ser Lys Glu Ile Leu Arg His Leu Arg
                325                 330                 335
Gln Glu Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr
            340                 345                 350
Val Thr Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser
        355                 360                 365
Gly Met Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe
    370                 375                 380
```

<210> 333
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tasmanian devil STING (tazSTING) R284G

```
<400> 333
Met Pro Arg Ser His Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Trp
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Cys Val Leu Leu Ser Leu Cys Met Ala Ala
            20                  25                  30
Val Tyr Ile Leu Gly Glu Ser Ala Ala Phe Thr Leu Gln Trp Leu Leu
        35                  40                  45
Phe Tyr Phe Thr Thr Val Gln Val Gly Leu Leu Leu Lys Gly Ala Tyr
    50                  55                  60
Cys Leu Ala Glu Glu Leu Tyr His Ile Gln Ser Arg His Gln Gly Ser
65                  70                  75                  80
```

```
Tyr Trp Gln Ala Ile Gln Ala Cys Ile His Tyr Pro Phe Gln Arg Ile
                85                  90                  95
Ser Leu Leu Leu Leu Ser Gly Tyr Phe Tyr Val Thr Leu Ser Asn Lys
            100                 105                 110
Pro Asn Pro Ser Leu Thr Trp Thr Phe Ala Leu Leu Gly Leu Ser His
        115                 120                 125
Ala Leu Ser Phe Ile Leu Gly Leu Gln Asn Leu Thr Ser Ala Glu Ile
    130                 135                 140
Ser Glu Val Cys Glu Lys Arg His Leu Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Lys Leu Ile Leu Pro Gly Leu Gln
                165                 170                 175
Thr Arg Ile Gln Ile Tyr Asn Gln Phe Asn Lys Asp Val Leu Arg Ser
            180                 185                 190
Pro Glu Gly His Arg Leu His Ile Leu Ile Pro Leu Asp Cys Ser Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Gln Ala Asp Pro Asn Ile Gln Phe Leu Gln Glu
    210                 215                 220
Leu Pro Gln His Lys Leu Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Thr Asn Ser Ile Tyr Lys Ile Ser Glu Asp Gly Gln Pro Ala Glu Val
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Phe Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Asp Ala Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Gly Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ala Arg Asp Cys Cys Arg Leu Val Val Tyr Gln Glu Pro Glu Asp Lys
305                 310                 315                 320
Ala Val Ser Asn Phe Ser Leu Ser Lys Glu Ile Leu Arg His Leu Arg
                325                 330                 335
Gln Glu Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr
            340                 345                 350
Val Thr Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser
        355                 360                 365
Gly Met Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe
    370                 375                 380
```

<210> 334
<211> 379
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> WT human STING-tasmanian devil CTT

<400> 334

```
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
                85                  90                  95
```

```
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
            100                 105                 110
Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
        115                 120                 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
    130                 135                 140
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
                165                 170                 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
            180                 185                 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
    210                 215                 220
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305                 310                 315                 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr Val Thr
            340                 345                 350
Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser Gly Met
        355                 360                 365
Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe
    370                 375

<210> 335
<211> 379
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> human STING C206Y-tasmanian devil CTT

<400> 335
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
            100                 105                 110
Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
```

```
        115                 120                 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
    130                 135                 140
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
                165                 170                 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
            180                 185                 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Tyr Gly Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
    210                 215                 220
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305                 310                 315                 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr Val Thr
            340                 345                 350
Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser Gly Met
        355                 360                 365
Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe
    370                 375
```

<210> 336
<211> 379
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> human STING R284G-tasmanian devil CTT

<400> 336

```
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
            100                 105                 110
Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
        115                 120                 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
```

```
    130                 135                 140
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
                165                 170                 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
            180                 185                 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
    210                 215                 220
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Gly Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305                 310                 315                 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr Val Thr
            340                 345                 350
Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser Gly Met
        355                 360                 365
Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe
    370                 375


<210> 337
<211> 376
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> WT human STING delTRAF6 binding motif
     (Asp-Phe-Ser at C-terminal removed)

<400> 337
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Cys Pro Arg Gly His
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Glu His Thr Leu Arg Tyr Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Gly Val Cys
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Ile His Ser Arg Tyr Arg Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Thr Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Leu Arg Arg Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ser Leu Pro Asn Ala
            100                 105                 110
Val Gly Pro Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
        115                 120                 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile
    130                 135                 140
```

```
Ser Ala Val Cys Glu Lys Gly Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Glu Leu Gln
                165                 170                 175
Ala Arg Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Tyr Asn Asn Leu Leu Arg Gly
            180                 185                 190
Ala Val Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Leu Pro Leu Asp Cys Gly Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asn Leu Ser Met Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys
    210                 215                 220
Leu Pro Gln Gln Thr Gly Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asp Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Ser Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Thr
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Tyr Ser Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Ala Tyr Gln Glu Pro Ala Asp Asp
305                 310                 315                 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
            340                 345                 350
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
        355                 360                 365
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr
    370                 375


<210> 338
<211> 377
<212> PRT
<213> Felis catus

<220>
<223> WT cat STING (catSTING)

<400> 338
Met Pro Arg Thr Gly Leu His Pro Ser Ile Pro Arg Pro Arg Gly Met
 1                5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ala Val Cys Leu Ala Ala
            20                  25                  30
Leu Trp Arg Leu Gly Glu Ser Pro Asp His Thr Leu Arg Trp Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Phe Thr Gly Val Cys
    50                  55                  60
His Leu Thr Glu Glu Leu Cys His Leu His Ser Arg Tyr Gln Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Ala Met Lys Ala Cys Leu Gly Ser Pro Val Arg Ser Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Ser Thr
            100                 105                 110
Asp Leu Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln Ala
        115                 120                 125
Leu Asn Ile Leu Leu Asp Leu Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Val Ser
    130                 135                 140
Ala Val Cys Glu Lys Lys Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp
145                 150                 155                 160
```

```
Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu Pro Ala
                165                 170                 175
Arg Val Leu Thr Cys Asn Gln Leu His Asn Asn Ile Leu Arg Gly Thr
            180                 185                 190
Gly Ser His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro
        195                 200                 205
Asp Asp Met Ser Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Tyr Glu Leu
    210                 215                 220
Pro Gln Gln Ser Ala Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr Thr
225                 230                 235                 240
Asn Ser Val Tyr Ala Leu Leu Glu Asn Gly Gln Gln Ala Gly Ile Cys
                245                 250                 255
Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln
            260                 265                 270
Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys
        275                 280                 285
Leu Phe Cys Arg Ile Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Thr Pro Glu Cys
    290                 295                 300
Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Glu Glu Gly Ser
305                 310                 315                 320
Asn Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Arg His Leu Arg Gln Glu Glu
                325                 330                 335
Arg Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Met Val Arg Asn Pro
            340                 345                 350
Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Asn Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln
        355                 360                 365
Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe
    370                 375


<210> 339
<211> 377
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cat STING C205Y

<400> 339
Met Pro Arg Thr Gly Leu His Pro Ser Ile Pro Arg Pro Arg Gly Met
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ala Val Cys Leu Ala Ala
            20                  25                  30
Leu Trp Arg Leu Gly Glu Ser Pro Asp His Thr Leu Arg Trp Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Phe Thr Gly Val Cys
    50                  55                  60
His Leu Thr Glu Glu Leu Cys His Leu His Ser Arg Tyr Gln Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Ala Met Lys Ala Cys Leu Gly Ser Pro Val Arg Ser Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Ser Thr
            100                 105                 110
Asp Leu Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln Ala
        115                 120                 125
Leu Asn Ile Leu Leu Asp Leu Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Val Ser
    130                 135                 140
Ala Val Cys Glu Lys Lys Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu Pro Ala
                165                 170                 175
```

```
Arg Val Leu Thr Cys Asn Gln Leu His Asn Asn Ile Leu Arg Gly Thr
            180                 185                 190
Gly Ser His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Val Pro
        195                 200                 205
Asp Asp Met Ser Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Tyr Glu Leu
    210                 215                 220
Pro Gln Gln Ser Ala Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr Thr
225                 230                 235                 240
Asn Ser Val Tyr Ala Leu Leu Glu Asn Gly Gln Gln Ala Gly Ile Cys
                245                 250                 255
Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln
            260                 265                 270
Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys
        275                 280                 285
Leu Phe Cys Arg Ile Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Thr Pro Glu Cys
    290                 295                 300
Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Glu Glu Gly Ser
305                 310                 315                 320
Asn Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Arg His Leu Arg Gln Glu Glu
                325                 330                 335
Arg Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Met Val Arg Asn Pro
            340                 345                 350
Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Asn Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln
        355                 360                 365
Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe
    370                 375


<210> 340
<211> 377
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cat STING R283G

<400> 340
Met Pro Arg Thr Gly Leu His Pro Ser Ile Pro Arg Pro Arg Gly Met
 1                5                  10                  15
Gly Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ala Val Cys Leu Ala Ala
            20                  25                  30
Leu Trp Arg Leu Gly Glu Ser Pro Asp His Thr Leu Arg Trp Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Phe Thr Gly Val Cys
    50                  55                  60
His Leu Thr Glu Glu Leu Cys His Leu His Ser Arg Tyr Gln Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Ala Met Lys Ala Cys Leu Gly Ser Pro Val Arg Ser Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Ser Thr
            100                 105                 110
Asp Leu Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln Ala
        115                 120                 125
Leu Asn Ile Leu Leu Asp Leu Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Val Ser
    130                 135                 140
Ala Val Cys Glu Lys Lys Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu Pro Ala
                165                 170                 175
Arg Val Leu Thr Cys Asn Gln Leu His Asn Asn Ile Leu Arg Gly Thr
            180                 185                 190
```

```
Gly Ser His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro
        195                 200                 205
Asp Asp Met Ser Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Tyr Glu Leu
    210                 215                 220
Pro Gln Gln Ser Ala Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr Thr
225                 230                 235                 240
Asn Ser Val Tyr Ala Leu Leu Glu Asn Gly Gln Gln Ala Gly Ile Cys
                245                 250                 255
Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln
            260                 265                 270
Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Gly Leu Glu Gln Ala Lys
        275                 280                 285
Leu Phe Cys Arg Ile Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Thr Pro Glu Cys
    290                 295                 300
Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Glu Glu Gly Ser
305                 310                 315                 320
Asn Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Arg His Leu Arg Gln Glu Glu
                325                 330                 335
Arg Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Met Val Arg Asn Pro
            340                 345                 350
Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Asn Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln
        355                 360                 365
Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe
    370                 375


<210> 341
<211> 377
<212> PRT
<213> Callithrix jacchus

<220>
<223> WT Marmoset STING

<400> 341
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro His Pro Arg Gly His
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gln Glu Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Val Cys Leu Val Thr
            20                  25                  30
Leu Trp Trp Leu Arg Glu Ala Pro Glu Asp Ile Leu Arg Phe Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Asn Arg Leu Cys
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Arg His Val His Thr Arg Tyr Gln Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Ala Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Ile Arg Leu Gly
                85                  90                  95
Ala Gln Leu Leu Leu Ser Ile Tyr Phe Tyr Cys Phe Leu Pro Asn Gly
            100                 105                 110
Arg Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Phe Ser Gln Ala Leu
        115                 120                 125
Asn Ile Leu Leu Gly Leu Lys Gly Leu Ala Pro Ala Glu Ile Ser Ala
    130                 135                 140
Val Cys Glu Lys Arg Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp Ser
145                 150                 155                 160
Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Phe Gln Ala Arg
                165                 170                 175
Ile Arg Thr Tyr Asn Gln His Asn Asn Asn Val Leu Arg Gly Pro Ala
            180                 185                 190
Ser Gln Arg Leu Tyr Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp
        195                 200                 205
```

Asn Leu Ser Thr Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Asp Lys Leu Pro
210 215 220
Gln Glu Thr Ile Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr Thr Asn
225 230 235 240
Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Ala Cys Val
245 250 255
Leu Glu Tyr Ala Ser Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln Tyr
260 265 270
Gly Gln Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys Leu
275 280 285
Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu Ser Gln
290 295 300
Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Glu Glu Pro Ala Asp Gly Ser Ser
305 310 315 320
Phe Leu Leu Ser Gln Glu Val Leu Gln His Leu Arg Gln Glu Glu Glu
325 330 335
Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Glu Val Pro Ser Thr
340 345 350
Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Lys
355 360 365
Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Leu Phe
370 375

<210> 342
<211> 378
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> WT Cattle/Bovine STING

<400> 342
Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Leu
1 5 10 15
Arg Ala Gln Lys Ala Ala Leu Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Val Ala
20 25 30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Pro Pro Asp Tyr Thr Leu Lys Trp Leu Val
35 40 45
Leu His Leu Ala Ser Gln Gln Met Gly Leu Leu Ile Lys Gly Ile Cys
50 55 60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Cys His Val His Ser Arg Tyr His Gly Ser
65 70 75 80
Tyr Trp Arg Ala Val Arg Ala Cys Leu Cys Ser Ser Met Arg Cys Gly
85 90 95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Cys Ser Leu Pro Asn Met
100 105 110
Ala Asp Leu Pro Phe Thr Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
115 120 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Val
130 135 140
Ser Ala Ile Cys Glu Lys Arg Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145 150 155 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu Pro
165 170 175
Ala Arg Ile Gln Ile Tyr Asn Gln Phe His Asn Asn Thr Leu Gln Gly
180 185 190
Ala Gly Ser His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val
195 200 205
Pro Asp Asp Leu Asn Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu His Glu
210 215 220

```
Leu Pro Gln Gln Ser Ala Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Thr Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Arg Ala Gly Val
                245                 250                 255
Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asn Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ser Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Ala Glu Gly
305                 310                 315                 320
Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Gln His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Glu Arg Glu Val Thr Met Gly Ser Thr Glu Thr Ser Val Met Pro Gly
            340                 345                 350
Ser Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Leu Glu
        355                 360                 365
Lys Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Val Phe
    370                 375


<210> 343
<211> 375
<212> PRT
<213> Struthio camelus australis

<220>
<223> WT Ostrich STING

<400> 343
Met Ala His Glu Ser Gly Thr Pro Ser Asn Pro Ala Thr Pro Leu Ile
 1               5                  10                  15
Pro Lys Ala Arg Glu Gly Arg Ala Gln His Ala Ala Tyr Val Leu Leu
            20                  25                  30
Ala Leu Cys Ala Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Glu Pro Val Val His
        35                  40                  45
Ile Ala Arg Ser Phe Thr Ser His Phe Val Ala Leu Gln Ile Gly Ala
    50                  55                  60
Leu Leu Lys Gly Ile Cys Tyr Leu Val Glu Glu Ile Phe His Leu Glu
65                  70                  75                  80
Thr Arg His Arg Gly Ser Phe Arg Arg Ala Leu Ser Ala Cys Leu His
                85                  90                  95
Leu Arg Trp His Val Thr Leu Leu Leu Val Cys Gly Ser Ala Tyr Val
            100                 105                 110
Ala Leu Leu Asp Gly Asp Glu Gln Pro Leu Gly Leu His Leu Gly Leu
        115                 120                 125
Ala Cys Leu Cys Gln Leu Leu Ile Leu Ala Leu Gly Leu His Lys Pro
    130                 135                 140
Ser Ala Val Glu Ile Ser Glu Met Ser Glu Arg Ser Lys Gln Asn Val
145                 150                 155                 160
Ala His Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Lys Ile Val
                165                 170                 175
Leu Pro Arg Leu Lys Glu Ser Met Glu Asn Ile Gly Arg Thr Asn Pro
            180                 185                 190
Asn Met Leu Ala His Lys Glu Thr Trp Lys Leu His Ile Leu Val Pro
        195                 200                 205
Leu Ser Cys Asn Ile Cys Asp Asp Leu Glu Lys Ala Asp Ser Asn Ile
    210                 215                 220
Gln Tyr Ala Met Asp Leu Pro Glu Thr Thr Leu Thr Arg Ala Gly Thr
225                 230                 235                 240
```

```
Lys Lys Arg Val Tyr Arg Asn Thr Leu Tyr Lys Ile Lys Asp Glu Asp
                245                 250                 255
Lys Phe Arg Phe Cys Val Val Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Ser Leu
            260                 265                 270
Tyr Ala Met Ser Gln Asp Glu Cys Ala Ala Phe Ser Arg Glu Asp Arg
        275                 280                 285
Ile Glu Gln Ala Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Glu Glu Ile Leu Gln
    290                 295                 300
Ser Ala Lys Glu Cys Ala Gly Thr Tyr Arg Leu Ile Val Tyr Glu Glu
305                 310                 315                 320
Ser Gly Glu Ala Glu Thr His Phe Leu Ser Arg Glu Ile Leu Arg His
                325                 330                 335
Leu Gln Gln Gln Arg Gln Glu Glu Tyr Thr Val Cys Asp Gly Thr Leu
            340                 345                 350
Cys Ser Thr Asp Leu Ser Leu Gln Ile Ser Glu Ser Asp Leu Pro Gln
        355                 360                 365
Pro Leu Arg Ser Asp Cys Leu
    370                 375


<210> 344
<211> 382
<212> PRT
<213> Nipponia nippon

<220>
<223> WT Crested ibis STING

<400> 344
Met Ser Gln Glu Pro Gln Trp Leu Ser His Pro Thr Ala Leu Leu Ile
 1               5                  10                  15
Pro Lys Ala Arg Gly Gly Arg Ala Gln His Ala Val Tyr Leu Leu Leu
            20                  25                  30
Ala Leu Cys Ala Ala Val Leu Tyr Leu Ala Gly Glu Pro Leu Val Pro
        35                  40                  45
Ser Ala Arg Ser Leu Ile Ser His Phe Met Ala Leu Gln Ile Gly Val
    50                  55                  60
Leu Leu Lys Gly Thr Cys Tyr Leu Ala Glu Glu Ile Phe His Leu Gln
65                  70                  75                  80
Ser Arg His His Gly Ser Phe Trp Arg Ala Leu Ser Ala Cys Phe Pro
                85                  90                  95
Leu Arg Trp His Gly Leu Met Leu Leu Val Cys Gly Ser Ala Tyr Val
            100                 105                 110
Ala Leu Leu Glu Asp Gly Gln Pro Leu Gly Leu His Leu Gly Leu Ala
        115                 120                 125
Ser Leu Cys Gln Leu Leu Ile Leu Ala Leu Gly Leu His Lys Pro Ser
    130                 135                 140
Ala Val Glu Met Ser Glu Met Ser Glu Arg Ser Lys Gln Asn Val Ala
145                 150                 155                 160
His Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Lys Ile Val Leu
                165                 170                 175
Pro Arg Val Lys Lys Ser Met Glu Glu Phe Ser Arg Ala Asn Pro Asn
            180                 185                 190
Val Leu Ala Arg Arg Glu Thr Trp Lys Leu His Ile Leu Val Pro Leu
        195                 200                 205
Ser Cys Asp Val Tyr Asp Asp Leu Glu Lys Ala Asp Ser Asn Ile Gln
    210                 215                 220
Tyr Leu Met Asp Leu Pro Glu Thr Thr Leu Thr Arg Ala Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240
Lys Arg Val Tyr Lys His Ser Leu Tyr Thr Ile Arg Asp Glu Gly Asn
                245                 250                 255
```

```
Lys Leu Trp His Cys Ala Val Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Ser Leu
            260                 265                 270
Tyr Ala Met Ser Gln Asp Glu Tyr Ala Ala Phe Ser Arg Glu Asp Arg
        275                 280                 285
Leu Glu Gln Ala Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Glu Glu Ile Leu Lys
    290                 295                 300
Gly Ser Lys Glu Cys Ala Gly Thr Tyr Arg Leu Ile Val Tyr Glu Glu
305                 310                 315                 320
Ser Gly Glu Ala Glu Thr His Ser Leu Ser Arg Asp Ile Leu Trp His
                325                 330                 335
Leu Arg Gln Gln Cys His Glu Glu Tyr Thr Val Tyr Glu Gly Asn Gln
            340                 345                 350
Pro His Asn Pro Ser Thr Thr Leu His Ser Thr Glu Leu Asn Leu Gln
        355                 360                 365
Ile Ser Glu Ser Asp Leu Pro Gln Pro Leu Arg Ser Asp Cys
    370                 375                 380
```

<210> 345
<211> 380
<212> PRT
<213> Latimeria chalumnae

<220>
<223> WT Coelacanth STING
(UniProtKB entry H3A3G4)

<400> 345

```
Phe Gly Leu Gln Asn Met Ser Ala Ile Ile Pro Gln Pro Arg Gly Asn
 1               5                  10                  15
Arg Ala Asn Gln Met Ala Tyr Phe Ile Ile Thr Val Ile Leu Met Leu
            20                  25                  30
Leu Trp Ile Phe Arg Asn Ile Met Asp Asn Val Leu Glu Val Ile Ala
        35                  40                  45
Leu His Ile Leu Leu Leu Gln Gly Ala Ala Ile Met Lys Gly Ile Cys
    50                  55                  60
Asn Phe Ala Glu Glu Val Asn His Val Gln Pro Arg Tyr Gly Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Lys Ala Leu Glu Ala Cys Leu Asn Leu Ser Lys Tyr Asp Val
                85                  90                  95
Met Lys Ile Val Phe Ala Gly Val Leu Trp Trp His Phe Ser Ser Ser
            100                 105                 110
Leu Phe Val Val Trp Phe Leu His Leu Leu Val Ser Cys Leu Cys His
        115                 120                 125
Leu Leu Asn Asn Val Leu Gly Val Leu Lys Pro Ser Pro Val Glu Val
    130                 135                 140
Ser Glu Ile Tyr Glu Arg Asn Arg Ile Gly Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Leu Val Leu Pro Glu Leu Glu
                165                 170                 175
Asp Arg Ile Lys Ser Tyr Asn Val Ser His Gly Asn Leu Leu Lys His
            180                 185                 190
Lys Glu Thr Trp Arg Leu His Ile Leu Leu Pro Leu Ser Cys Ser Ile
        195                 200                 205
Phe Asp Asn Leu Ala Asp Val Asp Ser Asn Ile Glu Phe Leu Asp Asn
    210                 215                 220
Leu Ser Glu Leu Gln Ile Asn Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Ser Tyr
225                 230                 235                 240
Lys His Ser Leu Tyr Gln Val Leu Asp Glu Asp Lys Arg Pro His Tyr
                245                 250                 255
Cys Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Lys Ser Leu Leu Glu Met Ser
```

```
            260                 265                 270
Lys Glu Ala Ser Ala Glu Phe Thr Lys Glu Asp Arg Leu Glu Gln Thr
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asp Asn Ser Gln Glu
    290                 295                 300
Cys Arg Gly Arg Phe Arg Leu Val Ile Tyr Asp Gly Arg Glu Asp Ser
305                 310                 315                 320
Gly Lys Ser His Phe Leu Ser Lys Glu Leu Leu Arg His Leu Asn Gln
                325                 330                 335
Gln Gln Lys Glu Glu Tyr Phe Met Ser Glu Gln Thr Gln Pro Asn Ser
            340                 345                 350
Ser Ser Thr Ser Cys Leu Ser Thr Glu Pro Gln Leu Met Ile Ser Asp
        355                 360                 365
Thr Asp Ala Pro His Thr Leu Lys Arg Gln Val Cys
    370                 375                 380


<210> 346
<211> 405
<212> PRT
<213> Latimeria chalumnae

<220>
<223> WT Coelecanth STING
      (Isoform X1; NCBI Accession No. XP_005989369.1)

<400> 346
Met Cys Phe Ile Gln Val Leu Asp Ile Thr Ile Ile Thr Gln Met Leu
 1               5                  10                  15
Gln Gly Glu Tyr Phe Gly Leu Gln Asn Met Ser Ala Ile Ile Pro Gln
            20                  25                  30
Pro Arg Gly Asn Arg Ala Asn Gln Met Ala Tyr Phe Ile Ile Thr Val
        35                  40                  45
Ile Leu Met Leu Leu Trp Ile Phe Arg Asn Ile Met Asp Asn Val Leu
    50                  55                  60
Glu Val Ile Ala Leu His Ile Leu Leu Leu Gln Gly Ala Ala Ile Met
65                  70                  75                  80
Lys Gly Ile Cys Asn Phe Ala Glu Glu Val Asn His Val Gln Pro Arg
                85                  90                  95
Tyr Gly Gly Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Glu Ala Cys Leu Asn Leu Ser
            100                 105                 110
Lys Tyr Asp Val Met Lys Ile Val Phe Ala Gly Val Leu Trp Trp His
        115                 120                 125
Phe Ser Ser Ser Leu Phe Val Val Trp Phe Leu His Leu Leu Val Ser
    130                 135                 140
Cys Leu Cys His Leu Leu Asn Asn Val Leu Gly Val Leu Lys Pro Ser
145                 150                 155                 160
Pro Val Glu Val Ser Glu Ile Tyr Glu Arg Asn Arg Ile Gly Val Ala
                165                 170                 175
His Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Leu Val Leu
            180                 185                 190
Pro Glu Leu Glu Asp Arg Ile Lys Ser Tyr Asn Val Ser His Gly Asn
        195                 200                 205
Leu Leu Lys His Lys Glu Thr Trp Arg Leu His Ile Leu Leu Pro Leu
    210                 215                 220
Ser Cys Ser Ile Phe Asp Asn Leu Ala Asp Val Asp Ser Asn Ile Glu
225                 230                 235                 240
Phe Leu Asp Asn Leu Ser Glu Leu Gln Ile Asn Arg Ala Gly Ile Lys
                245                 250                 255
Gly Arg Ser Tyr Lys His Ser Leu Tyr Gln Val Leu Asp Glu Asp Lys
            260                 265                 270
```

```
Arg Pro His Tyr Cys Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Lys Ser Leu
        275                 280                 285
Leu Glu Met Ser Lys Glu Ala Ser Ala Glu Phe Thr Lys Glu Asp Arg
    290                 295                 300
Leu Glu Gln Thr Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asp
305                 310                 315                 320
Asn Ser Gln Glu Cys Arg Gly Arg Phe Arg Leu Val Ile Tyr Asp Asp
                325                 330                 335
Cys Gln Asp Val Leu Asp Gly Glu Asp Ser Gly Lys Ser His Phe Leu
            340                 345                 350
Ser Lys Glu Leu Leu Arg His Leu Asn Gln Gln Gln Lys Glu Glu Tyr
        355                 360                 365
Phe Met Ser Glu Gln Thr Gln Pro Asn Ser Ser Ser Thr Ser Cys Leu
    370                 375                 380
Ser Thr Glu Pro Gln Leu Met Ile Ser Asp Thr Asp Ala Pro His Thr
385                 390                 395                 400
Leu Lys Ser Gly Phe
                405
```

<210> 347
<211> 378
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<220>
<223> WT Boar STING

<400> 347

```
Met Pro Tyr Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Gln Pro Arg Gly Leu
 1               5                  10                  15
Arg Ala Gln Val Ala Ala Leu Val Leu Leu Gly Ala Cys Leu Val Ala
            20                  25                  30
Leu Trp Gly Leu Gly Glu Leu Pro Glu Tyr Thr Leu Arg Trp Leu Val
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser Gln Gln Ile Gly Leu Leu Val Lys Gly Leu Cys
    50                  55                  60
Ser Leu Ala Glu Glu Leu Cys His Val His Ser Arg Tyr Gln Ser Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Arg Ala Ala Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Ile Arg Cys Gly
                85                  90                  95
Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Phe Ser Ile Arg Asp Lys
            100                 105                 110
Ala Gly Leu Pro Leu Pro Trp Met Leu Ala Leu Leu Gly Leu Ser Gln
        115                 120                 125
Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Gln His Leu Ala Pro Ala Glu Val
    130                 135                 140
Ser Ala Ile Cys Glu Lys Arg Asn Phe Asn Val Ala His Gly Leu Ala
145                 150                 155                 160
Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu Arg
                165                 170                 175
Ala Arg Ile Gln Ala Tyr Asn Gln Arg His Lys Asn Val Leu Gly Gly
            180                 185                 190
Ile Gly Asn His Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val
        195                 200                 205
Pro Asp Asp Leu Ser Val Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu His Glu
    210                 215                 220
Leu Pro Gln Gln Ser Ala Asp Arg Ala Gly Ile Lys Gly Arg Val Tyr
225                 230                 235                 240
Thr Asn Ser Ile Tyr Glu Leu Leu Glu Asn Gly Gln Pro Ala Gly Val
                245                 250                 255
```

```
Cys Val Leu Gly Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser
            260                 265                 270
Gln Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala
        275                 280                 285
Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp Ala Pro Glu
    290                 295                 300
Ala Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Thr Glu Gly
305                 310                 315                 320
Gly Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Arg His Leu Arg Gln Glu
                325                 330                 335
Glu Arg Glu Val Thr Met Gly Ser Ala Glu Thr Ser Val Val Pro Thr
            340                 345                 350
Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu
        355                 360                 365
Gln Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Ile Phe
    370                 375


<210> 348
<211> 380
<212> PRT
<213> Rousettus aegyptiacus

<220>
<223> WT Bat STING

<400> 348
Met Ser His Ser Ser Leu His Pro Ser Val Pro Arg Pro Arg Gly Arg
 1               5                  10                  15
Arg Ala Arg Asn Ile Ala Ala Phe Val Leu Leu Ile Val Cys Leu Ala
            20                  25                  30
Ala Leu Trp Leu Ser Gly Lys Pro Ser Glu Tyr Thr Leu Arg Cys Leu
        35                  40                  45
Val Leu His Leu Ala Ser Gln Gln Leu Gly Leu Leu Ser Asn Arg Val
    50                  55                  60
Cys Tyr Leu Ala Glu Glu Leu Ser His Ile His Ser Arg Tyr Gln Gly
65                  70                  75                  80
Asn Tyr Trp Arg Ala Val Arg Ala Cys Leu Ser Cys Pro Ile Arg Phe
                85                  90                  95
Gly Val Val Leu Leu Val Ser Phe Phe Phe Tyr Thr Ser Leu Pro Asn
            100                 105                 110
Ile Asp Asp Leu Pro Leu Thr Trp Met Leu Ala His Leu Gly Leu Ser
        115                 120                 125
Glu Ala Leu Asn Ile Leu Leu Gly Leu Arg Gly Leu Thr Pro Ala Glu
    130                 135                 140
Val Ser Thr Val Cys Glu Gln Arg His Phe Asn Val Ala His Gly Leu
145                 150                 155                 160
Ala Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu
                165                 170                 175
Arg Ala Arg Ile His Thr Tyr Asn Gln Leu His Gly Asn Thr Leu Gln
            180                 185                 190
Gly Val Gly Ser His Arg Leu Tyr Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly
        195                 200                 205
Val Leu Asp Asp Leu Ser Ala Ala Asp Pro Asn Ile Arg Phe Leu Arg
    210                 215                 220
Glu Leu Pro Arg Gln Ser Ser Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asn Arg Val
225                 230                 235                 240
Tyr Thr Asn Ser Val Tyr Glu Leu Leu Glu Lys Gly Lys Pro Val Gly
                245                 250                 255
Thr Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met
            260                 265                 270
```

Ser Gln Asp Ala Arg Ala Gly Phe Ser Gln Glu Asp Arg Leu Glu Gln
        275   280   285
Ala Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Ala Asp Ile Leu Ala Asp Asp Pro
    290   295   300
Glu Ser Gln Lys Ser Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Thr Glu
305   310   315   320
Glu Ser Asp Phe Ser Leu Ser Gln Ala Ile Leu Lys His Leu Arg Gln
                325   330   335
Glu Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Thr Val Gly Thr Tyr Glu Ala
            340   345   350
Pro Gly Ser Ser Thr Leu His Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly
        355   360   365
Met Asp Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Ile Phe
    370   375   380

<210> 349
<211> 387
<212> PRT
<213> Trichechus manatus latirostris

<220>
<223> WT Manatee STING

<400> 349
Met Val Glu Met Pro His Ser Ser Leu His Pro Ser Ile Pro Arg His
 1   5   10   15
Arg Gly His Gly Ile Gln Lys Ala Ala Phe Val Leu Leu Val Ala Cys
            20   25   30
Leu Val Ala Leu Trp Glu Leu Gly Glu Pro Pro Gly His Thr Leu Gln
        35   40   45
Trp Leu Val Cys Gln Leu Ala Ser Leu Gln Leu Gly Leu Leu Leu Lys
    50   55   60
Val Ile Cys Ser Leu Ala Glu Glu Leu Cys His Val His Ser Arg Tyr
65   70   75   80
Gln Ser Ser Tyr Trp Arg Ala Val Arg Ala Cys Met Gly Cys Pro Ile
                85   90   95
Arg Arg Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Cys Tyr Phe Tyr Phe Cys Phe
            100   105   110
Pro Asn Met Ala Asp Leu Pro Leu Thr Trp Thr Leu Ala Leu Leu Gly
        115   120   125
Leu Leu Gln Ala Met Asn Ile Leu Leu Ser Leu Gln Gly Leu Thr Pro
    130   135   140
Ala Glu Ile Ser Ala Ile Cys Glu Lys Arg Asn Leu Asn Val Ala His
145   150   155   160
Gly Leu Ala Trp Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro
                165   170   175
Gly Leu Gln Asp Arg Ile Arg Ile Tyr Asn Leu Gln His Asn Asn Met
            180   185   190
Leu Arg Gly Thr Gly Ser Gln Arg Leu His Ile Leu Phe Pro Leu Asp
        195   200   205
Cys Gly Val Pro Asn Asp Leu Ser Val Ala Asp Ala Asn Ile Arg Phe
    210   215   220
Leu Gln Lys Leu Pro Gln Gln Ser Ala Asp Cys Ala Gly Ile Lys Gly
225   230   235   240
Arg Val Tyr Thr Asn Ser Val Tyr Gln Leu Leu Glu His Gly Gln Pro
                245   250   255
Ala Gly Ile Cys Val Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe
            260   265   270
Ala Met Ser Gln Asp Gly Arg Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu
        275   280   285

Glu Gln Ala Lys Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Asp Ile Leu Ala Asp
290 295 300
Ala Pro Glu Tyr Gln Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Ser
305 310 315 320
Ala Glu Gly Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Ile Leu Arg His Leu
325 330 335
Arg Gln Glu Glu Arg Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser
340 345 350
Val Val Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ser Thr Ser Ser Leu Ser Gln Glu
355 360 365
Pro Lys Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr
370 375 380
Asp Val Phe
385

<210> 350
<211> 378
<212> PRT
<213> Callorhinchus milii

<220>
<223> WT Ghost shark STING

<400> 350
Met Ser Asp Ser Ile Pro Arg Pro Arg Gly Lys Val Ala Thr Tyr Val
1 5 10 15
Gly Leu Ile Leu Met Ser Gly Leu Ala Cys Leu Tyr Phe Met Leu Thr
20 25 30
Pro Asp Tyr His Ile Lys Phe Ile Val Gln Gln Val Ala Gln Gln Leu
35 40 45
Ile Val Ser Phe Phe Ala Leu Cys Leu Leu Arg Leu Cys Glu Phe Val
50 55 60
Glu Glu Leu Gly His Lys Gln Thr Arg Tyr Gln Asn Ser Trp Val Arg
65 70 75 80
Ala Leu Asn Ala Ser Leu Asp Trp Lys Lys Tyr Gly Phe Cys Leu Leu
85 90 95
Ile Ser Leu Leu Phe Asn Trp Val Leu Pro Tyr Glu Lys His Met Ser
100 105 110
Tyr Ala Val Pro Thr Val Gly Gln Thr Ile Ser Leu Thr Cys Phe Cys
115 120 125
Val Leu Phe Leu Lys Val Phe Gln Leu Asp Val Leu Ser Pro Ala Gln
130 135 140
Ile Ser Glu Ile Ser Glu Thr Asn Lys Cys Asn Val Ala His Gly Leu
145 150 155 160
Ala Trp Ser Tyr Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Val Leu Pro Lys Leu
165 170 175
Glu Glu Lys Ile Asn Gln Tyr His Arg Glu Tyr Gly Asn Val Leu Gln
180 185 190
Gln Lys Gly Lys Lys Leu Tyr Ile Leu Ile Pro Phe Ser Cys Lys Val
195 200 205
Leu Asp Lys Leu Glu Lys Val Asp Thr Asn Ile Val Phe Tyr Gln Asn
210 215 220
Leu Pro Glu Leu Leu Val Asp Arg Ala Gly Ile Lys Ser Arg Ser Tyr
225 230 235 240
Lys His Ser Ile Tyr Leu Ile Tyr Asp Gln Lys Lys Gln Gln Pro His
245 250 255
His Cys Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Arg Ser Leu Phe Glu Met
260 265 270
Thr Asn Asp Ser Ala Ala Ala Phe Ser Lys Glu Gln Arg Leu Asp Gln
275 280 285

```
Ala Lys Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Lys Ser Ile Leu Asn Asn Val Pro
    290                 295                 300
Glu Val Thr Gly Ser Tyr Arg Leu Ile Pro Tyr Asp Asp Asp Leu Glu
305                 310                 315                 320
Gly Ala Glu Leu Gly Pro His Phe Val Ser Glu Glu Ile Leu Lys His
                325                 330                 335
Met Arg Gln Glu Leu Thr Glu Tyr Pro Val Ala Glu Pro Ser Asn Ala
            340                 345                 350
Asn Glu Thr Asp Cys Met Ser Ser Glu Pro His Leu Met Ile Ser Asp
        355                 360                 365
Asp Pro Lys Pro Leu Arg Ser Tyr Cys Pro
    370                 375


<210> 351
<211> 378
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> WT Mouse STING

<400> 351
Met Pro Tyr Ser Asn Leu His Pro Ala Ile Pro Arg Pro Arg Gly His
 1               5                  10                  15
Arg Ser Lys Tyr Val Ala Leu Ile Phe Leu Val Ala Ser Leu Met Ile
            20                  25                  30
Leu Trp Val Ala Lys Asp Pro Pro Asn His Thr Leu Lys Tyr Leu Ala
        35                  40                  45
Leu His Leu Ala Ser His Glu Leu Gly Leu Leu Leu Lys Asn Leu Cys
    50                  55                  60
Cys Leu Ala Glu Glu Leu Cys His Val Gln Ser Arg Tyr Gln Gly Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Trp Lys Ala Val Arg Ala Cys Leu Gly Cys Pro Ile His Cys Met
                85                  90                  95
Ala Met Ile Leu Leu Ser Ser Tyr Phe Tyr Phe Leu Gln Asn Thr Ala
            100                 105                 110
Asp Ile Tyr Leu Ser Trp Met Phe Gly Leu Leu Val Leu Tyr Lys Ser
        115                 120                 125
Leu Ser Met Leu Leu Gly Leu Gln Ser Leu Thr Pro Ala Glu Val Ser
    130                 135                 140
Ala Val Cys Glu Glu Lys Lys Leu Asn Val Ala His Gly Leu Ala Trp
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Arg Leu Ile Leu Pro Gly Leu Gln Ala
                165                 170                 175
Arg Ile Arg Met Phe Asn Gln Leu His Asn Asn Met Leu Ser Gly Ala
            180                 185                 190
Gly Ser Arg Arg Leu Tyr Ile Leu Phe Pro Leu Asp Cys Gly Val Pro
        195                 200                 205
Asp Asn Leu Ser Val Val Asp Pro Asn Ile Arg Phe Arg Asp Met Leu
    210                 215                 220
Pro Gln Gln Asn Ile Asp Arg Ala Gly Ile Lys Asn Arg Val Tyr Ser
225                 230                 235                 240
Asn Ser Val Tyr Glu Ile Leu Glu Asn Gly Gln Pro Ala Gly Val Cys
                245                 250                 255
Ile Leu Glu Tyr Ala Thr Pro Leu Gln Thr Leu Phe Ala Met Ser Gln
            260                 265                 270
Asp Ala Lys Ala Gly Phe Ser Arg Glu Asp Arg Leu Glu Gln Ala Lys
        275                 280                 285
Leu Phe Cys Arg Thr Leu Glu Glu Ile Leu Glu Asp Val Pro Glu Ser
    290                 295                 300
```

```
Arg Asn Asn Cys Arg Leu Ile Val Tyr Gln Glu Pro Thr Asp Gly Asn
305                 310                 315                 320
Ser Phe Ser Leu Ser Gln Glu Val Leu Arg His Ile Arg Gln Glu Glu
                325                 330                 335
Lys Glu Glu Val Thr Met Asn Ala Pro Met Thr Ser Val Ala Pro Pro
            340                 345                 350
Pro Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Arg Leu Leu Ile Ser Gly Met Asp
        355                 360                 365
Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Leu Ile
    370                 375
```

<210> 352
<211> 43
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Human STING C-terminal tail (CTT)

<400> 352
```
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Ala Val Pro
 1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
            20                  25                  30
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Phe Ser
        35                  40
```

<210> 353
<211> 43
<212> PRT
<213> Sarcophilus harrisii

<220>
<223> Tasmanian devil STING C-terminal tail (CTT)

<400> 353
```
Arg Gln Glu Glu Phe Ala Ile Gly Pro Lys Arg Ala Met Thr Val Thr
 1               5                  10                  15
Thr Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Gln Leu Leu Ile Ser Gly Met
            20                  25                  30
Glu Gln Pro Leu Ser Leu Arg Thr Asp Gly Phe
        35                  40
```

<210> 354
<211> 43
<212> PRT
<213> Callithrix jacchus

<220>
<223> Marmoset STING C-terminal tail (CTT)

<400> 354
```
Glu Glu Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Leu Lys Thr Ser Glu Val Pro
 1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Thr Met Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
            20                  25                  30
Glu Lys Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Leu Phe
        35                  40
```

<210> 355
<211> 42
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<223> Cattle/Bovine STING C-terminal tail (CTT)

<400> 355
Glu Arg Glu Val Thr Met Gly Ser Thr Glu Thr Ser Val Met Pro Gly
 1   5   10   15
Ser Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Leu Glu
            20   25   30
Lys Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Val Phe
        35   40

<210> 356
<211> 42
<212> PRT
<213> Felis catus

<220>
<223> Cat STING C-terminal tail (CTT)

<400> 356
Glu Arg Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Met Val Arg Asn
 1   5   10   15
Pro Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Asn Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu
            20   25   30
Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe
        35   40

<210> 357
<211> 35
<212> PRT
<213> Struthio camelus australis

<220>
<223> Ostrich STING C-terminal tail (CTT)

<400> 357
Arg Gln Glu Glu Tyr Thr Val Cys Asp Gly Thr Leu Cys Ser Thr Asp
 1   5   10   15
Leu Ser Leu Gln Ile Ser Glu Ser Asp Leu Pro Gln Pro Leu Arg Ser
            20   25   30
Asp Cys Leu
        35

<210> 358
<211> 42
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<220>
<223> Boar STING C-terminal tail (CTT)

<400> 358
Glu Arg Glu Val Thr Met Gly Ser Ala Glu Thr Ser Val Val Pro Thr
 1   5   10   15
Ser Ser Thr Leu Ser Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met Glu
            20   25   30
Gln Pro Leu Pro Leu Arg Ser Asp Ile Phe
        35   40

<210> 359
<211> 43
<212> PRT
<213> Rousettus aegyptiacus

<220>
<223> Bat STING C-terminal tail (CTT)

<400> 359
Glu Lys Glu Glu Val Thr Val Gly Thr Val Gly Thr Tyr Glu Ala Pro
 1   5   10   15
Gly Ser Ser Thr Leu His Gln Glu Pro Glu Leu Leu Ile Ser Gly Met
            20   25   30
Asp Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Ile Phe
        35   40

<210> 360
<211> 48
<212> PRT
<213> Trichechus manatus latirostris

<220>
<223> Manatee STING C-terminal tail (CTT)

<400> 360
Glu Arg Glu Glu Val Thr Val Gly Ser Val Gly Thr Ser Val Val Pro
 1   5   10   15
Ser Pro Ser Ser Pro Ser Thr Ser Ser Leu Ser Gln Glu Pro Lys Leu
            20   25   30
Leu Ile Ser Gly Met Glu Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Val Phe
        35   40   45

<210> 361
<211> 43
<212> PRT
<213> Nipponia nippon

<220>
<223> Crested ibis STING C-terminal tail (CTT)

<400> 361
Cys His Glu Glu Tyr Thr Val Tyr Glu Gly Asn Gln Pro His Asn Pro
 1   5   10   15
Ser Thr Thr Leu His Ser Thr Glu Leu Asn Leu Gln Ile Ser Glu Ser
            20   25   30
Asp Leu Pro Gln Pro Leu Arg Ser Asp Cys Phe
        35   40

<210> 362

<211> 43
<212> PRT
<213> Latimeria chalumnae

<220>
<223> Coelacanth STING (SEQ ID NO:345) C-terminal tail
(CTT)

<400> 362
Gln Lys Glu Glu Tyr Phe Met Ser Glu Gln Thr Gln Pro Asn Ser Ser
1 5 10 15
Ser Thr Ser Cys Leu Ser Thr Glu Pro Gln Leu Met Ile Ser Asp Thr
20 25 30
Asp Ala Pro His Thr Leu Lys Arg Gln Val Cys
35 40

<210> 363
<211> 42
<212> PRT
<213> Latimeria chalumnae

<220>
<223> Coelacanth STING (SEQ ID NO:346) C-terminal tail
(CTT)

<400> 363
Gln Lys Glu Glu Tyr Phe Met Ser Glu Gln Thr Gln Pro Asn Ser Ser
1 5 10 15
Ser Thr Ser Cys Leu Ser Thr Glu Pro Gln Leu Met Ile Ser Asp Thr
20 25 30
Asp Ala Pro His Thr Leu Lys Ser Gly Phe
35 40

<210> 364
<211> 71
<212> PRT
<213> Danio rerio

<220>
<223> Zebrafish STING C-terminal tail (CTT)

<400> 364
Asp Gly Glu Ile Phe Met Asp Pro Thr Asn Glu Val His Pro Val Pro
1 5 10 15
Glu Glu Gly Pro Val Gly Asn Cys Asn Gly Ala Leu Gln Ala Thr Phe
20 25 30
His Glu Glu Pro Met Ser Asp Glu Pro Thr Leu Met Phe Ser Arg Pro
35 40 45
Gln Ser Leu Arg Ser Glu Pro Val Glu Thr Thr Asp Tyr Phe Asn Pro
50 55 60
Ser Ser Ala Met Lys Gln Asn
65 70

<210> 365
<211> 38
<212> PRT
<213> Callorhinchus milii

<220>
<223> Ghost shark STING C-terminal tail (CTT)

<400> 365
Leu Thr Glu Tyr Pro Val Ala Glu Pro Ser Asn Ala Asn Glu Thr Asp
 1   5   10   15
Cys Met Ser Ser Glu Pro His Leu Met Ile Ser Asp Asp Pro Lys Pro
            20   25   30
Leu Arg Ser Tyr Cys Pro
        35

<210> 366
<211> 43
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<223> Mouse STING C-terminal tail (CTT)

<400> 366
Glu Lys Glu Glu Val Thr Met Asn Ala Pro Met Thr Ser Val Ala Pro
 1   5   10   15
Pro Pro Ser Val Leu Ser Gln Glu Pro Arg Leu Leu Ile Ser Gly Met
            20   25   30
Asp Gln Pro Leu Pro Leu Arg Thr Asp Leu Ile
        35   40

<210> 367
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> T2A peptide

<400> 367
Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 1   5   10   15
Gly Pro

<210> 368
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> P2A peptide

<400> 368
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
 1   5   10   15
Pro Gly Pro

<210> 369
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> E2A peptide

<400> 369
Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
 1   5   10   15
Asn Pro Gly Pro
            20

<210> 370
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> F2A peptide

<400> 370
Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
 1   5   10   15
Glu Ser Asn Pro Gly Pro
            20

<210> 371
<211> 753
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Hepatitis B virus posttranscriptional regulatory
      element (HPRE)

<400> 371
atgcatgtat tcaatctaag caggctttca ctttctcgcc aacttacaag gcctttctgt 60
gtaaacaata cctgaacctt taccccgttg cccggcaacg gccacctctg tgccaagtgt 120
ttgctgacgc aacccccact ggctggggct tggtcatggg ccatcagcgc atgcgtggaa 180
ccttttcggc tcctctgccg atccatactg cggaactcct agccgcttgt tttgctcgca 240
gcaggtctgg agcaaacatt atcgggactg ataactctgt tgtcctatcc cgcaaatata 300
catcgtttcc atggctgcta ggctgtgctg ccaactggat cctgcgcggg acgtcctttg 360
tttacgtccc gtcggcgctg aatcctgcgg acgacccttc tcggggtcgc ttgggactct 420
ctcgtccccc tctccgtctg ccgttccgac cgaccacggg gcgcacctct ctttacgcgg 480
actccccgtc tgtgccttct catctgccgg accgtgtgca cttcgcttca cctctgcacg 540
tcgcatggag accaccgtga acgcccacca aatattgccc aaggtcttac ataagaggac 600
tcttggactc tcagcaatgt caacgaccga ccttgaggca tacttcaaag actgtttgtt 660
taaagactgg gaggagttgg gggaggagat taggttaaag gtctttgtac taggaggctg 720
taggcataaa ttggtctgcg caccagcacc atg   753

<210> 372
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ansb-1 primer

<400> 372
accttagaag atagccgcaa agc   23

<210> 373
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ansb-2 primer

<400> 373
cagagacatg acacccacga ttatc 25

<210> 374
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ansb-3 primer

<400> 374
gcaaaccgct atccagaacg a 21

<210> 375
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ansb-4 primer

<400> 375
agtttaagta tgccgtggta ctgc 24

<210> 376
<211> 1217
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<220>
<223> ansB (L-asparaginase II)

<400> 376
tggcgcagat cgtatctgcg ccttttttatt ctgtttttttc ctgcattttg ttatccatct 60
ctaaaaaata ctctctgtcg gatatatatc gctggttaat cgtatggcgt cacattattc 120
gtctgcaata tagagataat gcgaccagtt gacataactg gagatataac atggagtttt 180
tcaggaaaac ggcattagct gctctggtaa tgggtttcag cggcgcagcg ttcgctttac 240
cgaatatcac catcttagcg accggcggaa cgatcgctgg cggtggtgat tcagcaacaa 300
aatcaaatta tacggcaggt aaagtcggcg tcgaaaatct ggtggatgcc gttcctcaat 360
tgaaggacat tgcggtagtg aaaggcgagc aggtcgttaa cattggctcg caggatatga 420
acgatgaagt ctggctcacg ctggcgaaaa aaatcaatac cgagtgcgac agcaccgacg 480
gtttcgtgat cacccacggt actgatacga tggaagagac cgcttatttc ctcgatctga 540
ccgtgaaatg caataaaccg gtggtactgg tcggcgcgat gcgtccttcc acgtcaatga 600
gcgcagatgg cccgttcaac ctctataatg cggtagtaac agcggctgat aaacagtctg 660
ccaaccgcgg cgtgctggtg gtaatgaatg ataccgtcat ggacggacgc gacgtcacta 720
agaccaatac gactgacgtg gcgacgttta aagcggttaa ctacggcccg ctgggttata 780
tccacaacgg taaaattgac taccagcgta cgccagagcg taaacatacc acctccaccc 840
cgttcgacgt gtcgaagctg accgcgttgc cgaaagtcgg tatcgtttat aactatgcga 900
atgcgtccga tctgccggca aaagcgctgg tagacgcggg ttatgacggg atcgtgagcg 960
caggagtggg taacggcaac ctgtataaaa cggtctttga taccctggcg accgccgcgc 1020
acaacggtac ggtagtggtg cgttcttcac gagtgccgac tggcgcaacc acgcaggatg 1080
cggaagttga cgatgcaaaa tacggctttg tcgcttccgg cacgctgaac ccgcaaaaag 1140

cgcgtgtctt actgcaactg gcgttaaccc agactaaaga tccaaaacag atccagacga 1200
tgttcaatca gtattaa 1217

<210> 377
<211> 3214
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Plasmid pSL0230

<400> 377
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt gacgcgtatt gggattgacc 420
ttagaagata gccgcaaagc gctggttggc agcctgaagt aatctttcct ttttaaacaa 480
tggcgcagat cgtatctgcg ccttttttatt ctgtttttttc ctgcattttg ttatccatct 540
ctaaaaaata ctctctgtcg gatatatatc gctggttaat cgtatggcgt cacattattc 600
gtctgcaata tagagataat gcgaccagtt gacataactg gagatataac atggctagcc 660
tcaataagct tcttgccttt ctgcagacca aggacccaga ttatgtgaag ttgacgatgc 720
aaaatacggc tttgtcgctt ccggcacgct gaacccgcaa aaagcgcgtg tcttactgca 780
actggcgtta acccagacta aagatccaaa acagatccag acgatgttca atcagtatta 840
aagataatgc cccggtcgga aggccggggc tatctttgga agacctctcg cacaaccaac 900
actattatct tgctaattat catcctggtt atgataatcg tgggtgtcat gtctctggat 960
cccaatggcg cgccgagctt ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt 1020
tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt 1080
gcctaatgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg 1140
ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg 1200
cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg 1260
cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat 1320
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 1380
gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc 1440
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 1500
agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 1560
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 1620
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 1680
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg 1740
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc 1800
ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg 1860
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 1920
gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 1980
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 2040
taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 2100
aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa 2160
tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc 2220
tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct 2280
gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 2340
gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt 2400
aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt 2460
gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 2520
ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc 2580
tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt 2640
atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 2700
ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 2760
ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 2820
ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 2880

atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 2940
gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 3000
tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 3060
ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 3120
acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc 3180
tataaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtc 3214

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING) из нечеловеческих видов, где нечеловеческий STING представляет собой белок с более низкой сигнальной активностью NF-KB по сравнению с сигнальной активностью NF-KB человеческого STING и, возможно , более высокой сигнальной активности пути интерферона I типа (IFN) по сравнению с STING человека, при этом:

нечеловеческий белок STING модифицирован для включения мутации или мутаций таким образом, чтобы он обладал повышенной активностью или действовал конститутивно в отсутствие цитозольных нуклеиновых кислот;

мутации представляют собой вставки, делеции и/или замены аминокислот; а также

белок STING, возможно, имеет делецию сайта связывания TRAF6.

2. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING) из вида, отличного от человека, или химерный белок STING человека, или варианты химерного белка STING, где модифицированный белок STING и вариант химерного белка STING содержат одну или несколько мутаций, связанных с приобретением функции (GOF), которые приводят к конститутивной активации кодируемого белка STING и/или повышенной чувствительности, или повышенной аффинности, или связыванию с эндогенными лигандами, при этом:

белок STING модифицирован одной или несколькими вставками, делециями и заменами аминокислоты или аминокислот;

химерный человеческий белок STING содержит часть человеческого белка STING и часть нечеловеческого белка STING;

нечеловеческий или химерный белок STING обладает сигнальной активностью IFN-бета и сигнальной активностью аттенуированного ядерного фактора каппа-легкой цепи-энхансера активированных B-клеток (NF-KB) по сравнению с сигнальной активностью NF-KB человеческого STING; и мутация или мутации, приводящие к варианту или модифицированному белку, приводят к повышенной активности STING или конститутивной активности в индукции продукции IFN-бета.

3. Модифицированный белок STING по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что немодифицированный белок STING человека содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQIDNO: 305-309, или представляет собой его человеческий аллельный вариант, содержащий по меньшей мере 98% идентичности аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQIDNO:305-309.

4. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что:

белок STING представляет собой химеру, включающую замену области С-концевого хвоста (CTT) в белке STING первого вида на CTT белка STING второго вида;

белок STING второго вида имеет более низкую сигнальную активность NF-KB, чем сигнальная активность NF-KB человеческого STING;

а также сайт связывания TRAF6 в CTT может быть удален.

5. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что мутация или мутации представляют собой любые, которые соответствуют мутациям, связанным с автовоспалительным заболеванием человека STING-ассоциированной васкулопатией с началом в младенчестве (SAVI).

6. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING), который представляет собой химеру, включающую замену области CTT (С-концевой хвост) в STING первого вида на CTT STING второго вида, при этом:

белок STING второго вида имеет более низкую сигнальную активность NF-KB, чем сигнальная активность NF-KB человеческого STING; а также

сайт связывания TRAF6 в CTT удален.

7. Модифицированный белок STING по любому из пп. 2-6, отличающийся тем, что:

химера содержит часть человеческого белка STING и часть нечеловеческого белка STING; а также

белок STING человека содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQIDNO:305-309, или представляет собой его человеческий аллельный вариант с по меньшей мере 98% идентичности с последовательностью аминокислот, указанной в любой из SEQID №: 305-309.

8. Модифицированный белок STING по любому из пп. 2 и 4-7, который представляет собой химеру, содержащую части белков STING двух видов, при этом полученный белок STING обладает сигнальной активностью IFN-бета, причем первый вид представляет собой человека, а второй вид выбран из тасманийских дьяволов, мартышек, крупного рогатого скота, кошек, страусов, кабанов, летучих мышей, ламантинов, хохлатых ибисов, латимерий, мышей и акул-призраков.

9. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что сигнальная активность IFNI типа нечеловеческого STING составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно 30% активности человеческого белка STING дикого типа.

10. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что сигнальная активность NF-KB нечеловеческого STING составляет менее 30%, менее 20%, менее15%, менее 10% или менее 5% от сигнальной активности STINGNF-KB человека дикого типа.

11. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что вид, отличный от человека, или второй вид выбран из числа тасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, кабана, летучей мыши, ламантина, хохлатого ибиса, латимерии, мыши и акулы-призрака.

12. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что модификация STING представляет собой мутацию или мутации, которые соответствуют, по ссылке и сопоставлению с STING человека, мутации, которая возникает при интерферонопатии, где последовательность человеческого STING, с которой осуществляется сопоставление, указана в любой из SEQIDNO:305-309.

13. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-12, который включает замену С-концевого хвоста (CTT) на CTT из второго белка STING, который имеет пониженную сигнальную активность NF-KB по сравнению с сигнальной активностью NF-KB человеческого STING.

14. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что сайт связывания TRAF6 в CTT удален.

15. Модифицированный белок STING по п.13 или п.14, где второй CTT получен из белка STINGтасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, кабана, летучей мыши, ламантина, хохлатого ибиса, латимерии, мыши или акулы-призрака.

16. Модифицированный белок STING по п. 13 или п. 14, отличающийся тем, что второй CTT получен из белка STING тасманийского дьявола, мартышки, крупного

рогатого скота, кошки, страуса, кабана, летучей мыши, ламантина, хохлатого ибиса, латимерии, мыши или акулы-призрака, и он заменяет человеческий STINGCTT.

17. Модифицированный белок STING по любому из пп.13-16, отличающийся тем, что замещающий CTT выбран из следующих видов:тасманских дьяволов, мартышек, крупного рогатого скота, кошек, страусов, кабанов, летучих мышей, ламантинов, хохлатых ибисов, латимерий, мышей и акул-призраков, и имеет последовательность:

ТасманскийRQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGFSEQIDNO:353,

дьявол

Мартышка

EEEEVTVGSLKTSEVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRSDLFSEQIDNO:354

,

Крупный рогатый скот
EREVTMGSTETSVMPGSSVLSQEPELLISGLEKPLPLRSDVFSEQIDNO:355,
Кошка
EREVTVGSVGTSMVRNPSVLSQEPNLLISGMEQPLPLRTDVFSEQID NO:356,
Страус RQEEYTVCDGTLCSTDLSLQISESDLPQPLRSDCL SEQIDNO:357,
Кабан EREVTMGSAETSVVPTSSTLSQEPELLISGMEQPLPLRSDIF SEQIDNO:358,
Летучая мышь
EKEEVTVGTVGTYEAPGSSTLHQEPELLISGMDQPLPLRTDIFSEQID NO:359,
Ламантин EREEVTVG SVGT SVVP SP S SP ST S SLSQEPKLLISGMEQPLPLR SEQ ID NO:360, TDVF
Хохлатыйибис CHEEYTVYEGNQPHNPSTTLHSTELNLQISESDLPQPLRSDCF SEQ ID NO:361, Латимерия
QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKRQVC SEQ ID NO:362, (вариантt 1)
Латимерия QKEEYFMSEQTQPNS S ST S CL STEPQLMISDTDAPHTLKSGF SEQ ID NO:363, (вариант 2)
Акула- LlEYPVAEP SNANETD CMS SEPHLMI SDDPKPLRS Y CP SEQ ID NO:365,
призрак
Мышь EKEEVTMNAPMTSVAPPPSVLSQEPRLLISGMDQPLPLRTDLI SEQ ID NO:366,

или аллельные варианты каждой из этих последовательностей, имеющие по меньшей мере 98% идентичности последовательности с ними.

18. Модифицированный белок STING по любому из пп. 4-17, отличающийся тем, что человеческий STINGCTTсодержит последовательность EKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS (SEQIDNO:352), или представляет собой аллельный вариант, последовательность которого идентична по крайней мере на 98%.

19. Модифицированный белок STING по любому из пп.4-18, отличающийся тем, что модифицированный белок STING представляет собой химеру, в которой CTT STING человека заменен на CTT STING тасманского дьявола.

20. Модифицированный белок STING по п.19, отличающийся тем, что С-концевой хвост (CTT) от STING тасманского дьявола включает в себя последовательность: RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF(SEQIDNO:353), или представляет собой аллельный вариант, последовательность которого идентична по крайней мере на 98%.

21. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-20, включающий делецию сайта связывания TRAF6.

22. Модифицированный белок STING по п.21, где STING представляет собой STING человека, а сайт связывания TRAF6 содержит аминокислотные остатки DFS на С-конце.

23. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-22, содержащий модификацию, которая увеличивает сигнальную активность интерферона типа I или делает активность конститутивной в отсутствие цитозольных нуклеиновых кислот.

24. Модифицированный белок STING по п.23, отличающийся тем, что указанная модификация соответствует, по сравнению с человеческим STING, мутации, которая возникает при интерферонопатии, при этом STING человека имеет последовательность, указанную в любой из SEQIDNO:305-309.

25. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что модификация, придающая повышенную активность или конститутивную активность, представляет собой одну или несколько аминокислотных замен, которые соответствуют одному или нескольким из S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, и S324A/S326A, со ссылкой на последовательность STING человека, как указано в любой из SEQIDNO:305-309.
26. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-25, отличающийся тем, что нечеловеческий белок STING представляет собой белок STING тасманского дьявола с SEQIDNO: 331 или его аллельный вариант, имеющий по меньшей мере 98% идентичности последовательности с белком STING из SEQIDNO:331.
27. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-26, содержащий замену, соответствующую C206Y или R284G, относительно последовательности STING человека, как указано в любой из SEQIDNO:305-309.
28. Модифицированный белок STING по п.27, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQIDNO: 332 или 333.
29. Модифицированный белок STING по любому из пп.1-25, отличающийся тем, что последовательности белков STING нечеловеческого вида представляют собой последовательности, указанные в SEQIDNO: 331, 338 и 341-351, или белки STING нечеловеческого происхождения представляют собой аллельные варианты любого из белков STING, представленных в SEQIDNO: 331, 338 и 341-351, имеющие по меньшей мере 98% идентичности с ними.
30. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую модифицированный белок STING по любому из пп. 1-29, или кодирующую белок STING не относящегося к человеку вида, где белок STING обладает сигнальной активностью IFNI типа и

аттенуированнуюсигнальную активность NF-KB по сравнению с сигнальной активностью NF-KB человеческого STING.

31. Иммуностимулирующая бактерия по п.30, отличающаяся тем, что вид, отличный от человека, выбран из тасманийских дьяволов, мартышек, крупного рогатого скота, кошек, страусов, кабанов, летучих мышей, ламантинов, хохлатых ибисов, латимерий, мышей и акул-призраков.

32. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую вариант с усилением функции иммуностимулирующего белка, который в немодифицированной форме является частью цитозольного ДНК/РНК-сенсорного пути, который приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN).

33. Иммуностимулирующая бактерия по п. 32, отличающаяся тем, что:

вариант с усилением функции (GOF) представляет собой конститутивно активный вариант иммуностимулирующего белка, который у людей способствует или вызывает интерферонопатию; а также

геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия предпочтительно инфицирует резидентные в опухоли иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он вызывает меньшую гибель клеток в резидентных опухолевых иммунных клетках (уменьшает пироптоз), посредством чего иммуностимулирующие бактерии накапливаются в опухолях, или в микроокружении опухоли, или в резидентных в опухоли иммунных клетках, тем самым доставляя конститутивно активный иммуностимулирующий белок в клетку-хозяина, чтобы стимулировать или индуцировать экспрессию IFNI типа.

34. Иммуностимулирующая бактерия по п.32 или 33, отличающаяся тем, что вариант белка GOF содержит мутацию, которая устраняет сайт фосфорилирования в иммуностимулирующем белке, тем самым снижая уровень энхансера ядерного фактора каппа-легкой цепи активированных B-клеток (NF-KB) сигнализации.

35. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-34, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок, который индуцирует IFN типа I, представляет собой STING, RIG-I, IRF-3, IRF-7 или MDAS.

36. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую иммуностимулирующий белок, индуцирующий экспрессию IFNI типа, или его

вариант, обладающий повышенной активностью или конститутивной активностью, где иммуностимулирующий белок представляет собой STING, RIG-I, IRF-3, IRF- 7 или MDAS.

37. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-36, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой вариант STING, RIG-I, IRF-3, IRF-7 или MDAS, который содержит мутацию с усилением функции, приводящую к повышенной экспрессии IFNI типа.

38. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-37, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой вариант STING, RIG-I, IRP-3, IRF-7 или MDA5, в котором один или более остатков серин (S) или треонин (T), которые фосфорилируются в результате вирусной инфекции, заменяется остатком аспарагиновой кислоты (D), в результате чего полученный вариант белка представляет собой фосфомиметик, который конститутивно индуцирует IFNI типа.

39. Иммуностимулирующая бактерия по п. 38, отличающаяся тем, что:

вариант белка представляет собой IRF-3 и содержит одну или несколько замен в остатках, соответствующих положениям 385, 386, 396, 398, 402, 404 и 405, со ссылкой на SEQIDNO:312; а также

остатки заменены остатками аспарагиновой кислоты.

40. Иммуностимулирующая бактерия по п.39, отличающаяся тем, что вариант белка IRF-3 имеет замену S396D со ссылкой на SEQIDNO: 312.

41. Иммуностимулирующая бактерия по п.39, отличающаяся тем, что вариант белка IRF-3 содержит замены S396D/S398D/S402D/T404D/S405D со ссылкой на SEQIDNO:312 или их консервативные замены.

42. Иммуностимулирующая бактерия по п.39, отличающаяся тем, что вариант белка IRF-3 содержит замены S396D/S398D/S402D/T404D/S405D со ссылкой на SEQIDNO: 312.

43. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-42, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой вариант, который при экспрессии у субъекта приводит к конститутивной экспрессии IFNI типа.

44. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-43, отличающаяся тем, что модифицированный иммуностимулирующий белок или модифицированный белок STING имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с соответствующим немодифицированным белком или имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, выбранных из вставок, делеций и замен.

45. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-44, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой вариант, который при экспрессии у субъекта приводит к конститутивной экспрессии IFNI типа.

46. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-44, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок в его немодифицированной форме воспринимает или взаимодействует непосредственно или

косвенно с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами или циклическими динуклеотидами, чтобы индуцировать экспрессию IFN типа I, и вариант белка индуцирует экспрессию IFN типа I в отсутствие восприятия или взаимодействия с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами или циклическими динуклеотидами

47. Иммуностимулирующая бактерия по п.46, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой вариант с усилением функции (GOF), который не требует наличия цитозольных нуклеиновых кислот, нуклеотидов, динуклеотидов или циклических динуклеотидов для экспрессии IFNI типа.

48. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-47, где иммуностимулирующий белок в немодифицированной форме активирует или индуцирует экспрессию IFNI типа.

49. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-48, отличающаяся тем, что немодифицированная форма иммуностимулирующего белка участвует во врожденном распознавании цитозольной ДНК/РНК, что активирует IFNI типа.

50. Иммуностимулирующая бактерия по п.49, где IFN типа I представляет собой интерферон-α или интерферон-β.

51. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-50, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок выбран изSTING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, и SNRNP200.

52. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.32-50, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок выбран из TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2,

TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, andSNRNP200.

53. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 32-52, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок, являющийся частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, представляет собой вариант, который содержит мутацию с усилением функции или мутацию, посредством которой экспрессируется интерферон типа I , или другой иммунный медиатор/модулятор, является конститутивным.

54. Иммуностимулирующая бактерия по п. 53, отличающаяся тем, что:

иммуностимулирующий белок, который воспринимает цитозольную ДНК/РНК, является вариантом белка STING, MDA5, RIG-I, IRF-7 или IRF-3;

немодифицированныйSTING имеет последовательность, указанную в любой из SEQIDNO:305-309, немодифицированныйMDA5 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:310, немодифицированныйRIG-I имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:311, немодифицированныйIRF -7 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:313, а немодифицированныйIRF-3 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:312; а также

модифицированный иммуностимулирующий белок имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, выбранных из числа замен, делеций и вставок.

55. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 32-54, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок выбран из STING, MDA5, IRF-3, IRF-7 и RIG-I и содержит мутацию (мутации) с усилением функции. который делает STING, MDA5, IRF-3, IRF-7 или RIG-Iконститутивно активными, посредством чего экспрессия IFNI типа является конститутивной.

56. Иммуностимулирующая бактерия по п.54 или 55, отличающаяся тем, что модификации, которые представляют собой замены аминокислот, выбраны следующим образом:

а) в STING, со ссылкой на SEQIDN0:305-309, один или несколько, выбраны из

a): S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R375A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, и S324A/S326A;

b) в MDA5, соссылкойна SEQ ID NO:310, одинилиболееиз: T331I, T331R, A489T, R822Q, G821S, A946T, R337G, D393V, G495R, R720Q, R779H,25 R779C, L372F, и A452T;

c) вRIG-I, со ссылкой наSEQIDNO:311, один или оба изE373AиC268F;

d) в IRF-3, со ссылкой наSEQIDNO:312, S396D;

e) вIRF-7, со ссылкой наSEQIDNO:313, один или более из: S477D/S479D, S475D/S477D/S479D, и S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D; и

f) замены консервативных аминокислот, которые повышают активность или делают экспрессию интерферона I типа конститутивной.

57. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 54-56, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой вариант STING, содержащий одну или несколько аминокислот, со ссылкой на SEQIDN0:305-309, из: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A,S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, иS324A/S326A.

58. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированный белок STING, который представляет собой иммуностимулирующий белок, который в немодифицированной форме воспринимает цитозольную РНК/ДНК, при этом белок STING кодируется на плазмиде, а кодирующая нуклеиновая кислота функционально связана с регуляторной последовательностью, распознаваемой эукариотическим хозяином.

59. Иммуностимулирующая бактерия по п.58, отличающаяся тем, что модифицированный белок STING не требует для своей активности циклических динуклеотидов (CDN).

60. Иммуностимулирующая бактерия по п. 58 или п. 59, содержащая 20 последовательности нуклеотидов, кодирующих модифицированный белок STING, где:

модификация(и) в STING делает его активность конститутивной, так что для активности не требуется cGAMP;

модифицированный белок STING кодируется модифицированным геном TMEM173;

модификация(и) включает вставки, делеции или замены аминокислот(ы); а также

модифицированный белок STING обладает повышенной иммуностимулирующей активностью по сравнению с немодифицированным белком STING.

61. Иммуностимулирующая бактерия по п. 59 или 60, отличающаяся тем, что замена(и) аминогруппы в STING со ссылкой на SEQIDNO:305-309 представляет собой

одну или более, выбранных из: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E,C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281 Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A,S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, иS324A/S326A, и замены консервативных аминокислот.

62. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-61, содержащая мутацию в геноме бактерии, которая снижает токсичность или инфекционностьнеиммунных клеток хозяина.

63. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-62, отличающаяся тем, что геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия представляет собой флагеллин*(fliC⁻AB⁻) и*/или *page⁻*.

64. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-63, отличающаяся тем, что геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия представляет собой флагеллин-*AB⁻)*.

65. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-64, отличающаяся тем, что геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия представляет собой pagP-/nisbB-.

66. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-63, где бактерия представляет собой флагеллин- (fliC-/fljB-) и pagP-.

67. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-66, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой аспартат-полуальдегиддегидрогеназу- (asct).

68. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-66, представляющая собой аспартат-полуальдегиддегидрогеназу- (asct), где бактерия является asd- в силу разрушения или делеции всего или части эндогенного гена, кодирующего аспартатеполуальдегиддегидрогеназу (asd), при этом эндогенный asd не экспрессируется.

69. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-68, которая кодирует аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (asd) на плазмиде под контролем бактериального промотора.

70. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-69, представляющая собой nisbB-.

71. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-70, которая представляет собой purI- (purM).

72. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-71, представляющая собой asd-, purI-, msbB-, флагеллин (fliC-/fljB) и pagP.

73. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-72, отличающаяся тем, что один или несколько генов или оперонов, участвующих в SPI-1-зависимой инвазии, делетированы или инактивированы, в результате чего иммуностимулирующая бактерия не проникает в эпителиальные клетки и не инфицирует их.

74. Иммуностимулирующая бактерия по п.73, отличающаяся тем, что один или более из *avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invl, invJ, iacP, iagB, spaO, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgl, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA,sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB, usptP*удалены или инактивированы.

75. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 30-72, отличающаяся тем, что один или несколько генов, участвующих в SPI-1-независимой инвазии, делетированы или инактивированы, при этом:

иммуностимулирующая бактерия не вторгается в эпителиальные клетки и не заражает их; а также

один или несколько генов выбраны из числа pagN, hlyE, pefl, srgD, srgA, srgB и srgC.

76. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-75, включающая: модификацию бактериального генома, при которой бактерия вызывает меньшую гибель клеток в опухолерезидентных иммунных клетках; и/или

модификацию бактериального генома, при которой бактерия предпочтительно инфицирует опухолерезидентные иммунные клетки по сравнению с другими типами клеток.

77. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-76, где бактерия кодирует asd на плазмиде, и ее экспрессия находится под контролем промотора, экспрессируемого в микроокружении опухоли (TME) эукариотического субъекта.

78. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-77, которая является ауксотрофной по аденозину и аденину.

79. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-77, которая является ауксотрофной по аденозину.

80. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-79, которая является ауксотрофной по аденозину и лишена флагелл, при этом бактерия дикого типа имеет флагеллы.

81. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-80, содержащая мутацию в геноме бактерии, которая снижает токсичность или инфекционностьнеиммунных клеток хозяина.

82. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-81, где бактерия представляет собой pagP-.

83. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-82, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой флагеллин- (JfiC-/fljB-) и/или pagP-, и один или более ispurl- (purM), msbB-, purD-, adrA-, csgD-, qseC- и hilA-, IppA- или IrrB-.

84. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-83, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой hilA-, pagP- и флагеллин- (fliC-/fljB-).

85. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-84, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую звено CpG, где нуклеиновая кислота, кодирующая звено CpG, включена или является частью бактериального гена, который кодируется на плазмиде.

86. Иммуностимулирующая бактерия по п.85, отличающаяся тем, что ген, содержащий CpG, представляет собой asd, при этом asd кодируется на плазмиде.

87. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-86, дефицитная по флагеллину, где бактерия дикого типа содержит флагеллы.

88. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-87, отличающаяся тем, что плазмида содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую цитоLLO, который представляет собой белок листериолизинО (LLO) без сигнальной последовательности.

89. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-88, которая содержит ядерную мишенную последовательность ДНК, закодированную на плазмиде.

90. Иммуностимулирующая бактерия по п.89, где DTS представляет собой DTSSV40.

91. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-90, имеющая делецию или модификацию гена, кодирующего эндонуклеазу I (endA), в результате чего активность endA ингибируется или устраняется.

92. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-91, отличающаяся тем, что плазмида содержит одно или несколько звеньев CpG, селектируемый маркер гена asd для поддержания плазмиды и ядерную мишенную последовательность ДНК.

93. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-92, где иммуностимулирующая бактерия содержит делецию purl, делецию msbB, делецию asd и делецию adrA.

94. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 30-93, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия содержит:

одну или несколько мутаций в гене, которые изменяют биосинтезлипополисахарида, выбранных из одного или более 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 вводят суицидальный ген и выбраны из одного или нескольких sacB, nuk, hok, gef,kil и phlA; и/или

одну или несколько мутаций, которые вводят ген бактериального лизиса и выбраны из одного или обоих hly и cly и/или

мутацию в одном или нескольких факторах вирулентности, выбраны из isyA,pag, prg, iscA, virG,plc и act, и/или

одну или несколько мутаций в гене, модифицирующем реакцию на стресс, выбраны из recA, htrA, htpR, hsp и groEL; и/или

мутацию в min, нарушающую клеточный цикл; и/или

одну или несколько мутаций в гене, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, выбрано из числа cya, crp, phoP/phoQ и ompR.

95. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-94, представляющая собой msbB-/asd-IpurP.

96. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-95, в которой prgH и/или prgK инактивированы или делетированы.

97. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-96, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок или белок STING на плазмиде, функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей секреторный сигнал, посредством чего при экспрессии в хозяине продукт секретируется.

98. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-97, где плазмида, кодирующая иммуностимулирующий белок, присутствует в низком или среднем числе копий.

99. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-98, отличающаяся тем, что плазмида содержит начало репликации с числом копий от среднего до низкого.

100. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-98, где плазмида содержит начало репликации с низким числом копий.

101. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-100, где плазмида присутствует в низком количестве копий.

102. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 98-101, отличающаяся тем, что среднее число копий составляет менее 150 или менее примерно 150 и более 20 или примерно 20 или находится в диапазоне от 20 или 25 до 150.

103. Иммуностимулирующая бактерия по п.101, где низкое число копий составляет менее 25, или менее 20, или менее примерно 25, или менее примерно 20 копий.

104. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-103, отличающаяся тем, что начало репликации в плазмиде выбрано из начал репликации, происходящих из pBR322, p15A, pSC101, pMBl, colE1, colE2, pPS10, R6K, R1, RK2 и pUC.

105. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 30-104, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок или белок STING, немодифицированная форма которого воспринимает цитозольную РНК/ДНК, находится на плазмиде и функционально связана с регуляторными последовательностями, распознаваемыми эукариотическим хозяином.

106. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-105, где плазмида кодирует иммуностимулирующий белок или STING под контролем эукариотического промотора.

107. Иммуностимулирующая бактерия по п.105 или 106, где регуляторные последовательности содержат промотор РНК-полимеразы II или промотор РНК-полимеразы III.

108. Иммуностимулирующая бактерия по п.105 или 106, где регуляторные последовательности содержат терминатор и/или промоторы, выбранные из генов SV40, hGH, BGH, куриного бета-глобулина и rbGlob (кроличьего глобулина).

109. Иммуностимулирующая бактерия по п. 107, отличающаяся тем, что промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II.

110. Иммуностимулирующая бактерия по п.107, отличающаяся тем, что промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II, который представляет собой промотор вируса или промотор РНК-полимеразы II млекопитающих.

111. Иммуностимулирующая бактерия по п.110, где промотор представляет собой вирусный промотор, выбранный из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора SV40, промотора вируса Эпштейна-Барра (EBV), промотора вируса герпеса, респираторно-синцитиального вируса (RSV) промотора и промотора аденовируса.

112. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 105-110, отличающаяся тем, что промотор, контролирующий экспрессию одного или нескольких кодируемых гетерологичных белков на плазмиде, представляет собой альфа-промотор фактора элонгации-1 (EF-1) или промотор UBC, или промотор PGK, или промотор MND, или промотор CAGG.

113. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 105-110, отличающаяся тем, что промотор представляет собой промотор EF-1 альфа, промотор CMV, промотор SV40, промотор PGK, промотор MND, промотор EIF4A1, промотор CAG или промотор CD68.

114. Иммуностимулирующая бактерия по п.113, отличающаяся тем, что промотор представляет собой промотор EF-1 альфа.

115. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.105-113, где промотор представляет собой вирусный промотор, который является поздним промотором.

116. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-115, отличающаяся тем, что указанная бактерия является грамотрицательной бактерией.

117. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-116, отличающаяся тем, что указанная бактерия представляет собой *Rickettsiarickettsiae, Rickettsiaprowazekii, Rickettsiatsutsugamuchi, Rickettsiamooseri, Rickettsiasibirica, Bordetellabronchiseptica, Neisseriameningitidis, Neisseriagonorrhoeae, Aeromonaseucrenophila, Aeromonassalmonicida, Francisellatularensis, Corynebacteriumpseudotuberculosis,Citrobacter freundii, Chlamydiapneumoniae, Haemophilussomnus, Brucellaabortus, Mycobacteriumintracellulare, Legionellapneumophila, Rhodococcusequi, Pseudomonasaeruginosa, Helicobactermustelae, Vibriocholerae, Bacillussubtilis,Erysipelothrixrhusiopathiae, Yersiniaenterocolitica, Rochalimaeaquintana,* или *Agrobacteriumtumerfacium,* или его аттенуированный штамм или его модифицированный штамм из любого из предыдущих списков бактериальных штаммов.

118. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-116, где бактерия представляет собой штамм *Salmonella, Shigella, E. coli, Bifidobacteriae, Rickettsia,Vibrio, Listeria, Klebsiella, Bordetella, Neisseria, Aeromonas, Francisella, Cholera, Cotynebacterium, Citrobacter, Chlamydia, Haemophilus, Brucella, Mycobacterium, Mycoplasma, Legionella, Rhodococcus, Pseudomonas , Helicobacter, Bacillus,* or*Erysipelothrix,* или их аттенуированный штамм, или его модифицированный штамм из любого из предшествующего списка бактериальных штаммов.

119. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-118, которая представляет собой аттенуированную бактерию.

120. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-119, которая представляет собой штамм Salmonella.

121. Иммуностимулирующая бактерия по п.120, которая представляет собой штамм Salmonellatyphimurium.

122. Иммуностимулирующая бактерия по п.120 или 121, где немодифицированная сальмонелла представляет собой штамм дикого типа.

123. Иммуностимулирующая бактерия по п.120 или 121, отличающаяся тем, что немодифицированный штамм Salmonella является аттенуированным.

124. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-123, где иммуностимулирующая бактерия получена из аттенуированного штамма Salmonellatyphimurium, выбранного из штаммов, обозначенных как AST-100, VNP20009, YS1646 (ATCC #202165), RE88, SL7207, x 8429, x 8431 и x 8468, или

происходит от бактерии дикого типа, которая обладает всеми идентифицирующими характеристиками штамма, депонированного под номером доступа ATCC 14028, или представляет собой штамм ATCC 14028.

125. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 30-124, которая содержит закодированную на плазмиде комбинацию:

a) нуклеиновая кислота, кодирующая один или несколько мутантов STING, RIG-I, MDAS, TRF3 и IRF7 с усилением функции; а также

b) нуклеиновая кислота, кодирующая один или несколько из IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, комплекс IL-15/IL-15R с альфа-цепью, IL-2, который имеет ослабленное связывание с IL-2Ra, IL-2 модифицированный так, что он не связывается с IL-2Ra, IL-18, IL-36 гамма,CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые участвуют или влияют или усиливают рекрутирование/персистентность Т-клеток, CD40, CD40-лиганд (CD40L), 0X40, 0X40-лиганд (OX40L), 4-IBB, 4-IBB-лиганд (4-1 BBL), члены семейства B7-CD28, антагонист полипептида TGF-бета и члены надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

126. Иммуностимулирующая бактерия по п.125, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую два белка в a) и два белка в b).

127. Иммуностимулирующая бактерия по п.125 или 126, где разные промоторы и терминаторы контролируют экспрессию каждого белка.

128. Иммуностимулирующая бактерия по п. 125 или 126, отличающаяся тем, что гены экспрессируются с одного промотора и содержат один терминатор, а последовательность, кодирующая каждый белок, содержит внутренний сайт входа в рибосому (IRES), при этом кодируемая нуклеиновая кислота является полицистронной.

129. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.125-128, где промоторы выбраны из промоторов EF-1 альфа, CMV и GAPDH, а терминаторы выбраны из SV40, hGF, BGH и rbGlob.

130. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-129, где плазмида, кодирующая белок, содержит конструкцию, включающую энхансер, промотор, открытую рамку считывания, кодирующую белок, и полиА-хвост.

131. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-130, где плазмида, кодирующая белок, содержит конструкцию, которая включает энхансер, промотор, IRES, открытую рамку считывания, кодирующую белок, и полиА-хвост.

132. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-131, где плазмида, кодирующая белок, содержит конструкцию, которая включает энхансер, промотор, IRES, последовательность локализации, открытую рамку считывания, кодирующую белок, и полиА-хвост.

133. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-132, отличающаяся тем, что конструкция на плазмиде, кодирующая белок, содержит посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP) или посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита B (HPRE).

134. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-133, имеющая делецию в комплексе SPI-2.

135. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-134, где бактерия обработана полимоксином для снижения пирогенности.

136. Средство доставки, содержащее нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированный белок STING по любому из пп.1-29.

137. Средство доставки, содержащее нуклеиновые кислоты, кодирующие белок STING не относящегося к человеку вида, где белок STING обладает сигнальной активностью IFN типа I и ослабленной сигнальной активностью NF-KB по сравнению с сигнальной активностью NF-KB человеческого STING.

138. Средство доставки по п. 136 или 137, отличающееся тем, что белок STING человека содержит последовательность, указанную в любой из SEQIDNO: 305-309, или представляет собой его человеческий аллельный вариант с по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с последовательностью. аминокислот, представленных в любой из SEQIDNO:305-309.

139. Средство доставки по любому из пп.136-138, отличающееся тем, что сигнальная активность IFNI типа составляет по меньшей мере или по меньшей мере около 30% сигнальной активности IFNI типа STING человека дикого типа.

140. Средство доставки по любому из пп.136-139, отличающееся тем, что сигнальная активность NF-KB составляет менее 30%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% от сигнальной активности NF-KBSTING человека.

141. Средство доставки по любому из пп.136-140, отличающееся тем, что не относящийся к человеку вид представляет собой тасманский дьявол, мартышку, крупный рогатый скот, кошку, страуса, кабана, летучую мышь, ламантина, хохлатого ибиса, целаканта, мышь, рыбку данио или акулу-призрак.

142. Средство доставки, содержащее нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуностимулирующий белок, который при экспрессии у субъекта приводит к конститутивной экспрессии IFN типа I, при этом средство доставки выбрано из наночастиц, липосом, экзосом, бактерий, вирусов, клеток и микровезикул.

143. Средство доставки по п.142, в котором иммуностимулирующий белок находится в сигнальном пути, который воспринимает или взаимодействует прямо или косвенно с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами, циклическими нуклеотидами или циклическими динуклеотидами.

144. Средство доставки по п.143, отличающееся тем, что иммуностимулирующий белок находящийся в пути, который воспринимает или взаимодействует прямо или косвенно с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами, циклическими нуклеотидами, или циклическими динуклеотидами, активирует IFNI типа.

145. Средство доставки по любому из пп. 142-144, в котором иммуностимулирующий белок участвует во врожденном распознавании ДНК/РНК, который активирует интерферон типа I, и выбран из STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, и SNRNP200.

146. Средство доставки по любому из пп. 142-145, в котором иммуностимулирующий белок выбран из STING, MDA5, IRF-3, IRF-7 и RIG-1.

147. Средство доставки по п.146, в котором:

немодифицированный белок STING имеет последовательность, указанную в любой из SEQIDNO:305-309;

немодифицированный белок MDA5 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:310; немодифицированный белок RIG-I имеет последовательность,

указанную в SEQIDNO:311; немодифицированный белок IRF-3 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:312; а также

немодифицированный белок IRF-7 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:313.

148. Средство доставки по любому из пп. 142-147, в которомиммуностимулирующий белок содержит аминокислотную замену (замены), которая делает его активность конститутивной.

149. Средство доставки по любому из пп. 142-148, в которомиммуностимулирующий белок, когда он встречается у субъекта, приводит к интерферонопатии.

150. Средство доставки по любому из пп. 142-149, в которомиммуностимулирующий белок выбран из варианта STING, варианта MDA5, варианта IRF-3, варианта IRF-7 и варианта RIG-I, который содержит мутацию или мутации с усилением функции.

151. Средство доставки по п.150, отличающееся тем, что мутация(и) с усилением функции приводит к конститутивной экспрессии интерферона I типа.

152. Средство доставки по п. 150 или 151, отличающееся тем, что мутации являются следующими:

a)в STING, со ссылкой на SEQIDNo:305-309, один или несколько, выбранных из числа: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, 5R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, и S324A/S326A;

b) в MDA5, соссылкойна SEQ ID NO:310, одинилинескольконз: T331I, T331R, A489T, R822Q, G821S, A946T, R337G, D393V, G495R, R720Q, R779H, R779C, L372F, и A452T;

c) в RIG-I, со ссылкой на SEQIDNO:311, один или оба из E373A и

C268F;

d) в IRF-3 со ссылкой на SEQIDNO:312, S396D; и

e) в IRF-7 со ссылкой на SEQIDNO:313 один или несколько из:

S477D/S479D, S475D/S477D/S479D и

S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D.

153. Средство доставки по п.152, где немодифицированныйSTING имеет последовательность, указанную в любой из SEQIDNO:305-309, немодифицированныйMDA5 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:310, немодифицированныйRIG-I имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:311, немодифицированныйIRF-3 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:312, а немодифицированныйIRF-7 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:313, и каждый модифицированный белок имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью немодифицированного белка.

154. Средство доставки по любому из пп.136-153, которое представляет собой клетку, экзосому, онколитический вирус или вирусный вектор, липосому или другой носитель на основе липидов или иммуностимулирующую бактерию.

155. Средство доставки по п.154, где средством доставки является клетка, которая представляет собой стволовую клетку или иммунную клетку.

156. Средство доставки по любому из пп. 136-154, которое представляет собой экзосому.

157. Средство доставки по любому из пп.136-154, которое представляет собой онколитический вирус.

158. Средство доставки по любому из пп. 136-154, которое представляет собой онколитический вирус, выбранный из онколитического аденовируса, аденоассоциированного вируса, ретровируса,вируса простого герпеса, рабдовируса, папилломавируса, вируса везикулярного стоматита, вируса кори, вируса болезни Ньюкасла, пикомавируса, вируса Синдбиса, поксвируса, парвовируса, реовируса, вируса Коксаки, вируса гриппа, вируса эпидемического паротита, полиовируса, вируса долины Сенека, вируса Сендай, вируса Денге, полиовируса, лесного вируса семлики, альфавируса и флавивируса.

159. Средство доставки по п.158, в котором онколитический вирус представляет собой вирус коровьей оспы, вирус герпеса, вирус кори или реовирус.

160. Средство доставки по любому из пп.136-159, где нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок, экспрессируется под контролем эукариотической регуляторной последовательности.

161. Средство доставки по любому из пп.136-160, где нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок, экспрессируется под контролем эукариотического промотора.

162. Средство доставки по любому из пп.136-161, отличающееся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой конститутивно активный белок STING.

163. Средство доставки по любому из пп. 136-162, которое дополнительно содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуностимулирующий белок, который при экспрессии у субъекта-млекопитающего придает или способствует противодействию или противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли.

164. Средство доставки по п.163, где иммуностимулирующий белок представляет собой цитокин, хемокин, костимулирующий белок или рецептор или костимулирующий рецептор с делетированным цитоплазматическим доменом.

165. Средство доставки по любому из пп.136-164, которое представляет собой клетку.

166. Средство доставки по п.165, где клетка представляет собой стволовую клетку.

167. Средство доставки по п.166, где стволовая клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC).

168. Средство доставки по п.167, где MSC генетически модифицированы для экспрессии комбинации иммуномодулирующих цитокинов.

169. Средство доставки по п.168, отличающееся тем, что цитокины представляют собой интерлейкин 12 (IL-12) и интерлейкин 21 (IL-21).

170. Средство доставки, белок STING, иммуностимулирующий белок или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.1-169, где интерферон типа I представляет собой интерферон-а или интерферон-β.

171. Выделенная клетка, содержащая средство доставки по любому из пп.136-164.

172. Клетка по п.171, которая представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, опухолевую клетку или первичную клеточную линию.

173. Клетка по п.172, которая представляет собой гемопоэтическую клетку.

174. Клетка по п.172, которая представляет собой Т-клетку.

175. Клетка по любому из пп.171-174, полученная exvivo путем инфицирования клетки средством доставки.

176. Выделенная клетка, содержащая иммуностимулирующую бактерию, где:

иммуностимулирующая бактерия модифицируется таким образом, что она предпочтительно инфицирует резидентные в опухоли иммунные клетки, и/или геном

иммуностимулирующей бактерии модифицируется таким образом, что она вызывает меньшую гибель клеток в резидентных опухолевых иммунных клетках; а также

клетка является иммунной клеткой, стволовой клеткой, клеткой из первичной клеточной линии или опухолевой клеткой.

177. Клетка по п.176, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой вид Salmonella, представляющий собой флагеллин- (fliC-/fljB-).

178. Выделенная клетка или культивируемые клетки, содержащие иммуностимулирующую бактерию по любому из пп.30-135.

179. Клетка по любому из пп.176-178, которая представляет собой Т-клетку или гемопоэтическую клетку.

180. Клетка по любому из пп.177-179, полученная exvivo путем инфицирования клетки иммуностимулирующей бактерией.

181. Способ лечения рака, включающий введение клетки по любому из пп. 176-180 субъекту с раком, который представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

182. Способ по п.181, где рак представляет собой солидную опухоль.

183. Способ по п.181 или 182, где рак является метастатическим.

184. Способ по любому из пп. 181-183, отличающийся тем, что рак выбран из рака молочной железы, сердца, легкого, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичника, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени, рака желудка, лимфомы и лейкемии.

185. Применение клетки по любому из пп.176-180 для лечения рака.

186. Применение по п.185, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

187. Применение по п.185 или 186, где рак является метастатическим.

188. Применение по любому из пп. 185-187, отличающееся тем, что рак выбран из рака молочной железы, сердца, легкого, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичника, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени, рака желудка, лимфомы и лейкемии.

189. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный белок STING по любому из пп. 1-29, иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 30-135, средство доставки по любому из пп. 136-170 или клетку по любому из пп. 171- 180 в фармацевтически приемлемом носителе.

190. Выделенная клетка, содержащая модифицированный белок STING по любому из пп. 1–29, иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 30–135 или средство доставки по любому из пп. 136–170, где клетка не является зиготой оплодотворенной человеческой яйцеклетки.

191. Клетка по п.190, которая представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, опухолевую клетку или первичную клеточную линию.

192. Клетка по п.191, которая представляет собой гемопоэтическую клетку, где гемопоэтическая клетка представляет собой миелоидную клетку с химерным антигеном, которая представляет собой макрофаг.

193. Клетка по п.191, которая представляет собой Т-клетку.

194. Клетка по любому из пп.190-193, полученная exvivo путем инфицирования клетки модифицированным белком STING, иммуностимулирующей бактерией или средством доставки.

195. Способ лечения рака, включающий введение модифицированного белка STING по любому из пп.1-29 или иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 30-135, или средства доставки по любому из пп. 136-170, или клетки по любому из пп. 171-180 и 190-194, или фармацевтической композиции по п. 189, или клетки по любому из пп. 190-194, субъекту с раком, который представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

196. Способ по п.195, где рак представляет собой солидную опухоль.

197. Способ по п.195 или 196, где рак является метастатическим.

198. Способ по любому из пп. 195-197, отличающийся тем, что рак выбран из числа лимфомы, лейкемии, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи , ободочной кишки, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, вилочковой железы, матки, яичек, шейки матки и печени.

199. Применение модифицированного белка STING по любому из пп. 1-29, или иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 30-135, или средства доставки по любому из пп. 136-170, или клетки по любому из пп. 171-180 и 190-194, или фармацевтической композиции по п. 189, или клетки по любому из пп. 190-194 для лечения рака.

200. Применение по п.199, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

201. Применение по п.199 или п.200, где рак является метастатическим.

202. Применение по любому из пп. 199-201, отличающееся тем, что рак выбран из лимфомы, лейкемии, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, ободочной кишки, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, вилочковой железы, матки, яичек, шейки матки и печени.

203. Модифицированный белок STING, средство доставки, иммуностимулирующая бактерия, фармацевтическая композиция, клетка, способ или применение по любому из пп. 1-202, отличающиеся тем, что нечеловеческий белок STING имеет последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQIDNO. : 331, 338 или 341-351, или представляет собой аллельный вариант белка STING каждого вида, имеющий не менее 98% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQIDNO: 331, 338 или 341- 351.

204. Модифицированный белок STING, средство доставки, иммуностимулирующая бактерия, фармацевтическая композиция, клетка, способ или применение по любому из пп. 1-202, отличающиеся тем, что нечеловеческий белок или химера STING имеет

последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQIDNO: 332-337, 339 или 340.

205. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуностимулирующую бактерию по любому из пп.30-135 в фармацевтически приемлемом носителе.

206. Фармацевтическая композиция по п.189 или 205, приготовленная для введения без разбавления.

207. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 189, 205 и 206, приготовленная в виде однократной дозы.

208. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 189 и 205-207, приготовленная для парентерального введения.

209. Способ лечения рака, который включает солидную опухоль или гемоталогическое злокачественное новообразование у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции по любому из пп. 189 и 205-208.

210. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 189 и 205-208 для лечения рака, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у субъекта.

211. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.30-135 для применения для лечения рака, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у субъекта.

212. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 195-202 и 209-211, где субъектом является человек.

213. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 195-202 и 209-212, где лечение включает комбинированную терапию, при которой вводят второе противораковое средство или лечение.

214. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по п. 213, где второе противораковое средство или лечение вводят до, одновременно с, после или периодически с иммуностимулирующей бактерией.

215. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по п.214, где второе противораковое средство или лечение представляет собой иммунотерапию.

216. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 195-202 и 209-215, где введение белка, клетки, средства доставки, фармацевтической композиции или иммуностимулирующей бактерии осуществляется парентерально.

217. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 195-202 и 209-216, где введение осуществляется перорально или ректально, или в виде аэрозоля в легкие, или внутриопухолевое введение.

218. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 195-202 и 209-216, где введение осуществляется внутривенно, внутримышечно или подкожно.

219. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп.195-202 и 209-218, где рак выбран из лейкемии, лимфомы, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.

220. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по п.215, где иммунотерапия включает введение антитела к PD-1, или к PD-L1, или к CTLA-4.

221. Способ повышения способности терапевтической бактерии колонизировать опухоль, включающий модификацию генома, посредством чего бактерия становится флагеллином- (fliC-/fljB-) и/или pagP-.

222. Способ по п.221, где терапевтическая бактерия представляет собой иммуностимулирующую бактерию.

223. Способ по п.221 или 222, где бактерия представляет собой вид Salmonella.

224. Способ получения иммуностимулирующей бактерии или онколитического вируса для лечения рака, включающий:

выявление мутантного с усилением функции конститутивно активного иммуностимулирующего белка, который вызывает интерферонопатии у пациентов-людей; а также

введение нуклеиновой кислоты, кодирующей идентифицированный белок, в бактерию или вирус, нацеленные на опухоль, при этом полученная бактерия или вирус при введении субъекту способствует иммуностимуляции микроокружения опухоли.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
откорректированная в соответствии со ст. 34 PCT

1. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING) из видов, не являющихся человеческими, где:

немодифицированный нечеловеческий STING представляет собой белок с более низкой сигнальной активностью NF-κB по сравнению с сигнальной активностью NF-κB человеческого STING дикого типа;

нечеловеческий белок STING модифицирован для включения мутации или мутаций с тем, чтобы он действовал конститутивно для индуцирования IFN 1-го типа в отсутствие стимуляции лигандами; и

мутации представляют собой вставки, делеции и/или замены аминокислот.

2. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING) из видов, не являющихся человеческими, где:

немодифицированный нечеловеческий STING представляет собой белок с более низкой сигнальной активностью NF-κB по сравнению с сигнальной активностью NF-κB человеческого STING дикого типа;

нечеловеческий белок STING модифицирован для включения мутации или мутаций с тем, чтобы он обладал повышенной сигнальной активностью IFN 1-го типа по сравнению с активностью человеческого STING дикого типа; и

мутации представляют собой вставки, делеции и/или замены аминокислот.

3. Модифицированный белок STING по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что модифицированный белок STING имеет делецию сайта связывания TRAF6

4. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING) из видов, не являющихся человеческими, или химерный белок STING человека, или варианты химерного белка STING, где модифицированный белок STING и вариант химерного белка STING содержат одну или несколько мутаций, связанных с усилением функции (GOF), которые приводят к конститутивной активации кодируемого белка STING и/или к повышенной чувствительности, или к повышенной аффинности, или к связыванию с эндогенными лигандами, при этом:

белок STING модифицирован одной или несколькими из вставок, делеций и замен аминокислоты или аминокислот;

химерный человеческий белок STING содержит часть человеческого белка STING и часть нечеловеческого белка STING;

нечеловеческий или химерный белок STING обладает сигнальной активностью IFN-бета и сниженной сигнальной активностью ядерного фактора, усилителя каппа-легкой цепи

активированных В-клеток (NF-κB) по сравнению с сигнальной активностью NF-κB человеческого STING; и

мутация или мутации, приводящие к варианту или модифицированному белку, приводят к повышенной активности STING или конститутивной активности по индуцированию продукции IFN-бета.

5. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-4, где немодифицированный белок STING человека содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 305-309, или представляет собой его человеческий аллельный вариант, обладающий, по меньшей мере, 98% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO:305-309.

6. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что:

белок STING является химерным, включающим замену области С-концевого фрагмента (CTT) в белке STING от первого вида на CTT белка STING от второго вида;

белок STING от второго вида имеет более низкую сигнальную активность NF-κB, чем сигнальная активность NF-κB человеческого STING; и

сайт связывания TRAF6 в CTT необязательно удален.

7. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что мутация или мутации могут быть любыми мутациями, связанными с автовоспалительным заболеванием человека STING-ассоциированной васкулопатией с началом в младенчестве (SAVI).

8. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING), который является химерным, включающим замену области CTT (С-концевого фрагмента) в белке STING от первого вида на CTT белка STING от второго вида, при этом:

немодифицированный белок STING от второго вида имеет более низкую сигнальную активность NF-κB, чем сигнальная активность NF-κB человеческого белка STING дикого типа;

химерный белок STING модифицирован для включения мутации или мутаций с тем, чтобы он действовал конститутивно для индуцирования сигнальной активности IFN 1-го типа в отсутствие стимуляции лигандами; и

мутации представляют собой вставки, делеции и/или замены аминокислот.

9. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING) по п. 8, где первым видом является человек.

10. Модифицированный белок STING по п. 8 или п. 9, где сайт связывания TRAF6 в CTT удален.

11 Модифицированный белок STING по любому из пп. 4-10, где:

химерный STING содержит часть человеческого белка STING и часть нечеловеческого белка STING; и

человеческий белок STING содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO:305-309, или представляет собой его человеческий аллельный вариант, обладающий, по меньшей мере, 98% идентичности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO: 305-309.

12. Модифицированный белок STING по любому из пп. 4 и 6-11, который является химерным и включает части белков STING от двух видов, за счет чего полученный белок STING обладает сигнальной активностью IFN-бета, причем первый вид является человеком, а второй вид выбран из тасманийских дьяволов, обезьян/мартышек, крупного рогатого скота, кошек, страусов, диких кабанов, летучих мышей, ламантинов, хохлатых ибисов, латимерий и каллоринхов.

13. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что сигнальная активность IFN 1-го типа нечеловеческого STING составляет, по меньшей мере, или примерно 30% активности человеческого белка STING дикого типа.

14. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что сигнальная активность NF-κB нечеловеческого STING составляет менее 30%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% от сигнальной активности NF-κB человеческого STING дикого типа.

15. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что вид, отличный от человека, или второй вид выбран из тасманийских дьяволов, обезьян/мартышек, крупного рогатого скота, кошек, страусов, диких кабанов, летучих мышей, ламантинов, хохлатых ибисов, латимерий и каллоринхов.

16. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что модификация STING представляет собой мутацию или мутации, которые соответствуют мутации, которая возникает при интерферонопатии, со ссылкой и по сопоставлению/выравниванию со STING человека, причем последовательность человеческого STING, с которой осуществляли сопоставление, указана в любой из SEQ ID NO:305-309.

17. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-16, включающий замену С-концевого фрагмента (CTT) на CTT из второго белка STING, который имеет пониженную сигнальную активность NF-κB по сравнению с сигнальной активностью NF-κB человеческого STING.

18. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что сайт связывания TRAF6 в CTT удален.

19. Модифицированный белок STING по п. 17 или п. 18, где второй CTT получен из белка STING тасманийских дьяволов, обезьян/мартышек, крупного рогатого скота, кошек, страусов, диких кабанов, летучих мышей, ламантинов, хохлатых ибисов, латимерий или каллоринхов.

20. Модифицированный белок STING по п. 17 или п. 18, отличающийся тем, что второй CTT получен из белка STING тасманийских дьяволов, обезьян/мартышек, крупного рогатого скота, кошек, страусов, диких кабанов, летучих мышей, ламантинов, хохлатых ибисов, латимерий или каллоринхов, и он заменяет CTT человеческого STING.

21. Модифицированный белок STING по любому из пп. 17-20, отличающийся тем, что замещающий CTT выбран из следующих видов, имеющих последовательности:

Тасманийского дьявола	RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF	SEQ ID NO:353
Обезьяны	EEEEVTVGSLKTSEVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRSDLF	SEQ ID NO:354
Коровы	EREVTMGSTETSVMPGSSVLSQEPELLISGLEKPLPLRSDVF	SEQ ID NO:355
Кошки	EREVTVGSVGTSMVRNPSVLSQEPNLLISGMEQPLPLRTDVF	SEQ ID NO:356
Страуса	RQEEYTVCDGTLCSTDLSLQISESDLPQPLRSDCL	SEQ ID NO:357
Дикого кабана	EREVTMGSAETSVVPTSSTLSQEPELLISGMEQPLPLRSDIF	SEQ ID NO:358
Летучей мыши	EKEEVTVGTVGTYEAPGSSTLHQEPELLISGMDQPLPLRTDIF	SEQ ID NO:359
Ламантина	EREEVTVGSVGTSVVPSPSSPSTSSLSQEPKLLISGMEQPLPLR TDVF	SEQ ID NO:360,
Хохлатого ибиса	CHEEYTVYEGNQPHNPSTTLHSTELNLQISESDLPQPLRSDCF	SEQ ID NO:361,
Латимерии	QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKRQVC (вариантт 1)	SEQ ID NO:362,
Латимерии	QKEEYFMSEQTQPNS S ST S CL STEPQLMISDTDAPHTLKSGF (вариант 2)	SEQ ID NO:363,
Каллоринха	LIEYPVAEPSNANETDCMSSEPHLMISDDPKPLRSYCP	SEQ ID NO:365,

или аллельных вариантов каждой из этих последовательностей, имеющих с ними, по меньшей мере, 98% идентичности последовательности.

22. Модифицированный белок STING по любому из пп. 6-21, отличающийся тем, что CTT человеческого STING содержит последовательность EKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS (SEQ ID NO:352) или представляет собой аллельный вариант, последовательность которого идентична с ней, по крайней мере, на 98%.

23. Модифицированный белок STING по любому из пп. 6-22, отличающийся тем, что модифицированный белок STING является химерным, в котором CTT человеческого STING заменен на CTT белка STING тасманийского дьявола.

24. Модифицированный белок STING по п. 23, отличающийся тем, что С-концевой фрагмент (CTT) белка STING тасманийского дьявола включает в себя последовательность: RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF (SEQ ID NO: 353) или представляет собой аллельный вариант, последовательность которого идентична ей, по крайней мере, на 98%.

25. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-24, включающий делецию сайта связывания TRAF6.

26. Модифицированный белок STING по п. 25, где STING представляет собой STING человека, а сайт связывания TRAF6 содержит аминокислотные остатки DFS на С-конце.

27. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-26, содержащий модификацию, которая увеличивает сигнальную активность интерферона 1-го типа или делает активность конститутивной в отсутствие цитозольных нуклеиновых кислот.

28. Модифицированный белок STING по п. 27, отличающийся тем, что модификация соответствует мутации, которая возникает при интерферонопатии, по сравнению и путем выравнивания с человеческим STING, при этом человеческий STING имеет последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:305-309.

29. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что модификация, придающая повышенную активность или конститутивную активность, представляет собой одну или более аминокислотных замен, соответствующих одной или более из S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A и S324A/S326A со

ссылкой на последовательность STING человека, указанную в любой из SEQ ID NO:305-309.

30. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что нечеловеческий белок STING представляет собой белок STING тасманийского дьявола с SEQ ID NO: 331 или его аллельный вариант, имеющий, по меньшей мере, 98% идентичности последовательности с белком STING с последовательностью SEQ ID NO:331.

31. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-30, содержащий замену, соответствующую C206Y или R284G со ссылкой на последовательность STING человека, приведенную в любой из SEQ ID NO:305-309.

32. Модифицированный белок STING по п. 31, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 332 или 333.

33. Модифицированный белок STING по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что последовательности белков STING нечеловеческих видов приведены в SEQ ID NO: 331, 338 и 341-351, или белки STING нечеловеческого происхождения представляют собой аллельные варианты любого из белков STING, представленных в SEQ ID NO: 331, 338 и 341-351 и имеют с ними, по меньшей мере, 98% идентичности последовательности.

34. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую модифицированный белок STING по любому из пп. 1-33, или кодирующую белок STING не относящегося к человеку вида, где белок STING обладает сигнальной активностью IFN 1-го типа и аттенуированную сигнальную активность NF-κB по сравнению с сигнальной активностью NF-κB человеческого STING.

35. Иммуностимулирующая бактерия по п. 34, отличающаяся тем, что вид, отличный от человека, выбран из тасманийских дьяволов, обезьян/мартышек, крупного рогатого скота, кошек, страусов, диких кабанов, летучих мышей, ламантинов, хохлатых ибисов, латимерий и каллоринхов.

36. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую вариант иммуностимулирующего белка с усилением функции, который в немодифицированной форме является частью цитозольного ДНК/РНК-сенсорного пути, приводящего к экспрессии интерферона (IFN) 1-го типа.

37. Иммуностимулирующая бактерия по п. 36, отличающаяся тем, что:

вариант с усилением функции (GOF) представляет собой конститутивно активный вариант иммуностимулирующего белка, который у людей способствует или вызывает интерферонопатию; и

геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что бактерия предпочтительно инфицирует опухолерезидентные иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что он вызывает меньшую гибель клеток в опухолерезидентных иммунных клетках (уменьшает пироптоз), за счет чего иммуностимулирующие бактерии накапливаются в опухолях, или в микроокружении опухолей, или в резидентных в опухоли иммунных клетках, тем самым доставляя конститутивно активный иммуностимулирующий белок в клетку-хозяина, чтобы стимулировать или индуцировать экспрессию IFN 1-го типа.

38. Иммуностимулирующая бактерия по п. 36 или п. 37, где GOF вариант белка содержит мутацию, которая устраняет сайт фосфорилирования в иммуностимулирующем белке, тем самым снижая сигнализацию ядерного фактора, усилителя каппа-легкой цепи активированных В-клеток (NF-κB).

39. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-38, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок, который индуцирует IFN 1-го типа, представляет собой STING, RIG-I, IRF-3, IRF-7 или MDA5.

40. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую иммуностимулирующий белок, индуцирующий экспрессию IFN 1-го типа, или его вариант, обладающий повышенной активностью или конститутивной активностью, где иммуностимулирующий белок представляет собой STING, RIG-I, IRF-3, IRF- 7 или MDA5.

41. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-40, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой вариант STING, RIG-I, IRF-3, IRF-7 или MDA5, который содержит мутацию с усилением функции, приводящую к повышенной экспрессии IFN 1-го типа.

42. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-41, где иммуностимулирующий белок представляет собой вариант STING, RIG-I, IRF-3, IRF-7 или MDA5, в котором один или более остатков серина (S) или треонина (T), которые фосфорилируются в результате вирусной инфекции, заменен(ы) остатком аспарагиновой кислоты (D), в результате чего полученный вариант белка представляет собой фосфомиметик, который конститутивно индуцирует IFN 1-го типа.

43. Иммуностимулирующая бактерия по п. 42, отличающаяся тем, что:

вариант белка представляет собой IRF-3 и содержит одну или более замен в остатках, соответствующих положениям 385, 386, 396, 398, 402, 404 и 405 со ссылкой на SEQ ID NO:312; и

остатки заменены остатками аспарагиновой кислоты.

44. Иммуностимулирующая бактерия по п. 43, отличающаяся тем, что вариант белка IRF-3 имеет замену S396D со ссылкой на SEQ ID NO: 312.

45. Иммуностимулирующая бактерия по п. 43, отличающаяся тем, что вариант белка IRF-3 содержит замены S396D/S398D/S402D/T404D/S405D со ссылкой на SEQ ID NO:312 или их консервативные замены.

46. Иммуностимулирующая бактерия по п. 43, отличающаяся тем, что вариант белка IRF-3 содержит замены S396D/S398D/S402D/T404D/S405D со ссылкой на SEQ ID NO: 312.

47. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-46, где иммуностимулирующий белок представляет собой вариант, который при экспрессии у субъекта приводит к конститутивной экспрессии IFN 1-го типа.

48. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-47, где модифицированный иммуностимулирующий белок или модифицированный белок STING имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с соответствующим немодифицированным белком или имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, выбранных из вставок, делеций и замен.

49. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-48, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой вариант, который при экспрессии у субъекта приводит к конститутивной экспрессии IFN 1-го типа.

50. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-48, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок в его немодифицированной форме воспринимает или взаимодействует, напрямую или опосредованно, с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами или циклическими динуклеотидами, чтобы индуцировать экспрессию IFN 1-го типа, и вариант белка индуцирует экспрессию IFN 1-го типа в отсутствие восприятия или взаимодействия с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами или циклическими динуклеотидами.

51. Иммуностимулирующая бактерия по п. 50, где иммуностимулирующий белок представляет собой вариант с усилением функции (GOF), который не требует наличия цитозольных нуклеиновых кислот, нуклеотидов, динуклеотидов или циклических динуклеотидов для экспрессии IFN 1-го типа.

52. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-51, где иммуностимулирующий белок в немодифицированной форме активирует или индуцирует экспрессию IFN 1-го типа.

53. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-52, отличающаяся тем, что немодифицированная форма иммуностимулирующего белка участвует во врожденном распознавании цитозольной ДНК/РНК, что активирует IFN 1-го типа.

54. Иммуностимулирующая бактерия по п. 53, где IFN 1-го типа представляет собой интерферон-α или интерферон-β.

55. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-54, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок выбран из STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 и SNRNP200.

56. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-54, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок выбран из TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 и SNRNP200.

57. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-56, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок, являющийся частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, представляет собой вариант, который содержит мутацию с усилением функции или мутацию, в результате которой экспрессия интерферона 1-го типа или другого иммунного медиатора/модулятора является конститутивной.

58. Иммуностимулирующая бактерия по п. 57, отличающаяся тем, что:

иммуностимулирующий белок, воспринимающий цитозольную ДНК/РНК, является вариантом белка STING, MDA5, RIG-I, IRF-7 или IRF-3;

немодифицированный STING имеет последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:305-309, немодифицированный MDA5 имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:310, немодифицированный RIG-I имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:311, немодифицированный IRF-7 имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:313, а немодифицированный IRF-3 имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:312; и

модифицированный иммуностимулирующий белок имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных модификаций, выбранных из замен, делеций и вставок.

59. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 36-58, где иммуностимулирующий белок выбран из STING, MDA5, IRF-3, IRF-7 и RIG-I и содержит мутацию (мутации) с усилением функции, делающие STING, MDA5, IRF-3, IRF-7 или RIG-I конститутивно активными, за счет чего экспрессия IFN 1-го типа является конститутивной.

60. Иммуностимулирующая бактерия по п. 58 или п. 59, где модификации, которые представляют собой аминокислотные замены, выбраны следующим образом:

a) в STING, со ссылкой на SEQ ID NO:305-309, одна или более выбраны из: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R375A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A и S324A/S326A;

b) в MDA5, со ссылкой на SEQ ID NO:310, одна или более из: T331I, T331R, A489T, R822Q, G821S, A946T, R337G, D393V, G495R, R720Q, R779H, R779C, L372F и A452T;

c) в RIG-I, со ссылкой на SEQ ID NO:311, одна или обе из E373A и C268F;

d) в IRF-3, со ссылкой на SEQ ID NO:312, S396D;

e) в IRF-7, со ссылкой наSEQ ID NO:313, одна или более из: S477D/S479D, S475D/S477D/S479D и S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D; и

f) замены консервативных аминокислот, которые повышают активность или делают экспрессию интерферона 1-го типа конститутивной.

61. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 58-60, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой вариант STING, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, выбранных из: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A,S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A и S324A/S326A со ссылкой на SEQ ID NO:305-309.

62. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированный белок STING, который представляет собой иммуностимулирующий белок, который в немодифицированной форме воспринимает цитозольную РНК/ДНК, при этом белок STING кодируется на плазмиде, а кодирующая нуклеиновая кислота функционально связана с регуляторной последовательностью, распознаваемой эукариотическим хозяином.

63. Иммуностимулирующая бактерия по п. 62, отличающаяся тем, что модифицированный белок STING не требует для своей активности циклических динуклеотидов (CDN).

64. Иммуностимулирующая бактерия по п. 62 или п. 63, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующую модифицированный белок STING, где:

модификация(и) STING делает его активность конститутивной, так что для активности не требуется cGAMP;

модифицированный белок STING кодируется модифицированным геном *TMEM173*;

модификация(и) включают вставки, делеции или замены аминокислот(ы); и

модифицированный белок STING обладает повышенной иммуностимулирующей активностью по сравнению с немодифицированным белком STING.

65. Иммуностимулирующая бактерия по п. 63 или п. 64, отличающаяся тем, что аминокислотная замена(и) в STING представляет собой одну или более, выбранных из: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E,C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281 Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A,S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, и S324A/S326A со ссылкой на SEQ ID NO:305-309, а также замены их консервативных аминокислот.

66. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-65, содержащая мутацию в геноме бактерии, снижающую токсичность или инфекционность неиммунных клеток хозяина.

67. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-66, отличающаяся тем, что геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован, за счет чего бактерия представляет собой флагеллин$^-$ (*fliC*$^-$/*fljB*$^-$) и/или *pagP*$^-$.

68. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-67, отличающаяся тем, что геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован, за счет чего бактерия представляет собой флагеллин$^-$ (*fliC*$^-$/*fljB*$^-$).

69. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-68, отличающаяся тем, что геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован, за счет чего бактерия представляет собой *pagP*$^-$/*msbB*$^-$.

70. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-67, где бактерия представляет собой флагеллин$^-$ (*fliC*$^-$/*fljB*$^-$) и *pagP*$^-$.

71. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-70, где иммуностимулирующая бактерия является аспартат-полуальдегиддегидрогеназа$^-$ (*asd*$^-$).

72. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-70, которая является аспартат-полуальдегиддегидрогеназа$^-$ (*asd*$^-$), где бактерия является *asd*$^-$ за счет разрушения или делеции всего или части эндогенного гена, кодирующего аспартатеполуальдегиддегидрогеназу (*asd*), при этом эндогенный *asd* не экспрессируется.

73. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-72, которая кодирует аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (*asd*) на плазмиде под контролем бактериального промотора.

74. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-73, являющаяся *msbB*$^-$.

75. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-74, являющаяся *purI*$^-$ (*purM*$^-$).

76. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-75, являющаяся *asd*$^-$, *purI*$^-$, *msbB*$^-$, флагеллин$^-$ (*fliC*$^-$/*fljB*$^-$) и *pagP*$^-$.

77. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-76, отличающаяся тем, что один или более генов или оперонов, участвующих в SPI-1-зависимой инвазии, удалены или инактивированы, в результате чего иммуностимулирующая бактерия не проникает в эпителиальные клетки или не инфицирует их.

78. Иммуностимулирующая бактерия по п. 77, отличающаяся тем, что один или более из *avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invl, invJ, iacP, iagB, spaO, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgl, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA,sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB* и *sptP* удалены или инактивированы.

79. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-76, отличающаяся тем, что один или более генов, участвующих в SPI-1-независимой инвазии, удалены или инактивированы, при этом:

иммуностимулирующая бактерия не проникает в эпителиальные клетки или не инфицирует их; и

один или более генов выбран(ы) из *pagN, hlyE, pefl, srgD, srgA, srgB* и *srgC*.

80. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-79, включающая:

модификацию бактериального генома, за счет чего бактерия вызывает меньшую гибель клеток в опухолерезидентных иммунных клетках; и/или

модификацию бактериального генома, за счет которой бактерия предпочтительно инфицирует опухолерезидентные иммунные клетки по сравнению с другими типами клеток.

81. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-80, где бактерия кодирует *asd* на плазмиде, и ее экспрессия находится под контролем промотора, экспрессируемого в микроокружении опухоли (TME) эукариотического субъекта.

82. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-81, которая является ауксотрофной по аденозину и аденину.

83. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-81, которая является ауксотрофной по аденозину.

84. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-83, которая является ауксотрофной по аденозину и лишена флагелл, при этом бактерия дикого типа имеет флагеллы.

85. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-84, содержащая мутацию в геноме бактерии, снижающую токсичность или инфекционность неиммунных клеток хозяина.

86. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-85, где бактерия является *pagP*$^-$.

87. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-86, где иммуностимулирующая бактерия яляется флагеллин$^-$ (*fliC*$^-$/*fljB*$^-$) и/или *pagP*$^-$, и одной или более из *purI*$^-$ (*purM*$^-$), *msbB*$^-$, *purD*$^-$, *adrA*$^-$, *csgD*$^-$, *qseC*$^-$ и *hilA*$^-$, *lppA*$^-$ или *lppB*$^-$.

88. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-87, где иммуностимулирующая бактерия является *hilA*$^-$, *pagP*$^-$ и флагеллин$^-$ (*fliC*$^-$/*fljB*$^-$).

89. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-88, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую мотив CpG, где нуклеиновая кислота, кодирующая мотив CpG, включена в или является частью бактериального гена, который кодируется на плазмиде.

90. Иммуностимулирующая бактерия по п. 89, отличающаяся тем, что ген, содержащий CpGs, представляет собой *asd*, при этом *asd* кодируется на плазмиде.

91. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-90, дефицитная по флагеллину, где бактерия дикого типа содержит флагеллы.

92. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-91, отличающаяся тем, что плазмида содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую цитоLLO, который представляет собой белок листериолизин O (LLO) без сигнальной последовательности.

93. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-92, которая содержит ядерную мишенную последовательность ДНК (DTS), закодированную на плазмиде.

94. Иммуностимулирующая бактерия по п. 93, где DTS представляет собой DTS SV40.

95. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-94, имеющая делецию или модификацию в гене, кодирующем эндонуклеазу I (*endA*), в результате чего активность *endA* ингибируется или устраняется.

96. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-95, отличающаяся тем, что плазмида содержит один или более из: мотива CpG, селектируемого маркера гена *asd* для поддержания плазмиды и ядерной мишенной последовательности ДНК.

97. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-96, где иммуностимулирующая бактерия содержит делецию *purI*, делецию *msbB*, делецию *asd* и делецию *adrA*.

98. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-97, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия содержит:

одну или более мутаций в гене, изменяющих биосинтез липополисахарида, выбранные из одного или более 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 вводят суицидальный ген и выбраны из одного или нескольких из *sacB, nuk, hok, gef, kil* и *phlA*; и/или

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

мутацию в одном или нескольких факторах вирулентности, выбранные из *isyA, pag, prg, iscA, virG, plc* и *act*, и/или

одну или несколько мутаций в гене, модифицирующем реакцию на стресс, выбранных из *recA, htrA, htpR, hsp* и *groEL*; и/или

мутацию в *min*, нарушающую клеточный цикл; и/или

одну или несколько мутаций в гене, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, выбранные из *cya, crp, phoP/phoQ* и *ompR*.

99. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-98, которая является $msbB^{-}/asd^{-}/purP^{-}$.

100. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-99, в которой *prgH* и/или *prgK* инактивированы или удалены.

101. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-100, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок или белок STING на плазмиде, функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей секреторный сигнал, за счет чего при экспрессии в хозяине продукт секретируется.

102. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-101, где плазмида, кодирующая иммуностимулирующий белок, присутствует в низком или среднем числе копий.

103. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-102, отличающаяся тем, что плазмида содержит начало репликации с числом копий от среднего до низкого.

104. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-102, где плазмида содержит начало репликации с низким числом копий.

105. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-104, где плазмида присутствует в низком количестве копий.

106. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 102-105, где среднее число копий составляет менее 150 или менее примерно 150 и более 20 или примерно 20, или находится в диапазоне от 20 или 25 до 150.

107. Иммуностимулирующая бактерия по п. 105, где низкое число копий составляет менее 25, или менее 20, или менее примерно 25, или менее примерно 20 копий.

108. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-107, отличающаяся тем, что начало репликации в плазмиде выбрано из начал репликации, происходящих из pBR322, p15A, pSC101, pMBl, colE1, colE2, pPS10, R6K, R1, RK2 и pUC.

109. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-108, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок или белок STING, немодифицированная форма которого воспринимает цитозольную РНК/ДНК, находится на плазмиде и функционально связана с регуляторными последовательностями, распознаваемыми эукариотическим хозяином.

110. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-109, где плазмида кодирует иммуностимулирующий белок или STING под контролем эукариотического промотора.

111. Иммуностимулирующая бактерия по п. 109 или п. 110, где регуляторные последовательности содержат промотор РНК-полимеразы II или промотор РНК-полимеразы III.

112. Иммуностимулирующая бактерия по п. 109 или п. 110, где регуляторные последовательности содержат терминатор и/или промоторы, выбранные из генов SV40, hGH, BGH, куриного бета-глобулина и rbGlob (кроличьего глобулина).

113. Иммуностимулирующая бактерия по п. 111, отличающаяся тем, что промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II.

114. Иммуностимулирующая бактерия по п. 111, отличающаяся тем, что промотор является промотором РНК-полимеразы II, который представляет собой промотор вируса или промотор РНК-полимеразы II млекопитающих.

115. Иммуностимулирующая бактерия по п. 114, где промотор представляет собой вирусный промотор, выбранный из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора SV40, промотора вируса Эпштейна-Барра (EBV), промотора вируса герпеса, промотора респираторно-синцитиального вируса (RSV) и промотора аденовируса.

116. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 109-114, отличающаяся тем, что промотор, контролирующий экспрессию одного или более кодируемых гетерологичных белков на плазмиде, представляет собой альфа-промотор фактора элонгации-1 (EF-1), или промотор UBC, или промотор PGK, или промотор MND, или промотор CAGG.

117. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 109-114, отличающаяся тем, что промотор представляет собой промотор EF-1 альфа, промотор CMV, промотор SV40, промотор PGK, промотор MND, промотор EIF4A1, промотор CAG или промотор CD68.

118. Иммуностимулирующая бактерия по п. 117, отличающаяся тем, что промотор представляет собой промотор EF-1 альфа.

119. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 109-117, где промотор представляет собой вирусный промотор, который является поздним промотором.

120. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-119, отличающаяся тем, что бактерия является грамотрицательной бактерией.

121. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-120, отличающаяся тем, что бактерия представляет собой *Rickettsia rickettsiae, Rickettsia prowazekii, Rickettsia tsutsugamuchi, Rickettsia mooseri, Rickettsia sibirica, Bordetella bronchiseptica, Neisseria meningitidis, Neisseriago norrhoeae, Aeromonas eucrenophila, Aeromonas salmonicida, Francisella tularensis, Corynebacterium pseudotuberculosis,Citrobacter freundii, Chlamydia pneumoniae, Haemophilus somnus, Brucella abortus, Mycobacterium intracellulare, Legionella pneumophila, Rhodococcus equi, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter mustelae, Vibrio*

cholerae, Bacillus subtilis, Erysipelothrix rhusiopathiae, Yersinia enterocolitica, Rochalimaea quintana или *Agrobacterium tumerfacium,* или аттенуированный штамм или модифицированный штамм любого из приведенных бактериальных штаммов.

122. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-120, где бактерия представляет собой штамм *Salmonella, Shigella, E. coli, Bifidobacteriae, Rickettsia, Vibrio, Listeria, Klebsiella, Bordetella, Neisseria, Aeromonas, Francisella, Cholera, Cotynebacterium, Citrobacter, Chlamydia, Haemophilus, Brucella, Mycobacterium, Mycoplasma, Legionella, Rhodococcus, Pseudomonas, Helicobacter, Bacillus* или *Erysipelothrix,* или аттенуированный штамм или модифицированный штамм любого из приведенных бактериальных штаммов.

123. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-122, которая представляет собой аттенуированную бактерию.

124. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-123, которая представляет собой штамм *Salmonella.*

125. Иммуностимулирующая бактерия по п. 124, которая представляет собой штамм *Salmonella typhimurium.*

126. Иммуностимулирующая бактерия по п. 124 или 125, где немодифицированный штамм *Salmonella* представляет собой штамм дикого типа.

127. Иммуностимулирующая бактерия по п. 124 или 125, отличающаяся тем, что немодифицированный штамм *Salmonella* является аттенуированным.

128. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-127, где иммуностимулирующая бактерия получена из аттенуированного штамма *Salmonella typhimurium,* выбранного из штаммов, обозначенных как AST-100, VNP20009, YS1646 (ATCC #202165), RE88, SL7207, χ 8429, χ 8431 и χ 8468, или происходит от бактерии дикого типа, которая обладает всеми идентифицирующими характеристиками штамма, депонированного под номером доступа ATCC 14028, или представляет собой штамм ATCC 14028.

129. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-128, которая содержит закодированную на плазмиде комбинацию из:

a) нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более мутантов с усилением функции, выбрвнных из STING, RIG-I, MDAS, TRF3 и IRF7; и

b) нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более из IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, альфа-цепочечного комплекса IL-15/IL-15R, IL-2, имеющего ослабленное связывание с IL-2Ra, IL-2 модифицированного таким образом, что он не

связывается с IL-2Ra, IL-18, IL-36 гамма, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, белков, участвующих, или влияющих, или усиливающих рекрутирование/персистентность Т-клеток, CD40, CD40-лиганда (CD40L), 0X40, 0X40-лиганда (OX40L), 4-IBB, 4-IBB-лиганда (4-1BBL), членов семейства B7-CD28, антагониста полипептида TGF-бета и членов надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

130. Иммуностимулирующая бактерия по п. 129, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую два из белков, приведенных в a), и два из белков, приведенных в b).

131. Иммуностимулирующая бактерия по п. 129 или п. 130, где разные промоторы и терминаторы контролируют экспрессию каждого белка.

132. Иммуностимулирующая бактерия по п. 129 или п. 130, отличающаяся тем, что гены экспрессируются с одного промотора и содержат один терминатор, а последовательность, кодирующая каждый белок, содержит внутренний сайт входа в рибосому (IRES), за счет чего кодируемая нуклеиновая кислота является полицистронной.

133. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 129-132, где промоторы выбраны из промоторов EF-1 альфа, CMV и GAPDH, а терминаторы выбраны из SV40, hGF, BGH и rbGlob.

134. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-133, где плазмида, кодирующая белок, содержит конструкцию, включающую энхансер, промотор, открытую рамку считывания, кодирующую белок, и хвост поли-А.

135. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-134, где плазмида, кодирующая белок, содержит конструкцию, которая включает энхансер, промотор, IRES, открытую рамку считывания, кодирующую белок, и хвост поли-А.

136. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-135, где плазмида, кодирующая белок, содержит конструкцию, которая включает энхансер, промотор, IRES, последовательность локализации, открытую рамку считывания, кодирующую белок, и хвост поли-А.

137. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-136, отличающаяся тем, что конструкция на плазмиде, кодирующей белок, содержит посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP) или посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита B (HPRE).

138. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-137, имеющая делецию в комплексе SPI-2.

139. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-138, где бактерия обработана полимоксином для снижения пирогенности.

140. Средство доставки, содержащее нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированный белок STING по любому из пп. 1-33.

141. Средство доставки, содержащее нуклеиновые кислоты, кодирующие белок STING не относящегося к человеку вида, где белок STING обладает сигнальной активностью IFN 1-го типа и ослабленной сигнальной активностью NF-κB по сравнению с сигнальной активностью NF-κB человеческого STING.

142. Средство доставки по п. 140 или п. 141, отличающееся тем, что белок STING человека содержит последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 305-309, или представляет собой его человеческий аллельный вариант с, по меньшей мере, 98% идентичностью последовательности с последовательностью аминокислот, представленных в любой из SEQ ID NO:305-309.

143. Средство доставки по любому из пп. 140-142, отличающееся тем, что сигнальная активность IFN 1-го типа составляет, по меньшей мере, или около 30% сигнальной активности IFN 1-го типа человеческого STING дикого типа.

144. Средство доставки по любому из пп. 140-143, отличающееся тем, что сигнальная активность NF-κB составляет менее 30%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% от сигнальной активности NF-κB STING человека.

145. Средство доставки по любому из пп. 140-144, отличающееся тем, что не относящийся к человеку вид является тасманийским дьяволом, мартышкой, крупным рогатым скотом, кошкой, страусом, диким кабаном, летучей мышью, ламантином, хохлатым ибисом, латимерией, полосатым данио или каллоринхом.

146. Средство доставки, содержащее нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуностимулирующий белок, который при экспрессии у субъекта приводит к конститутивной экспрессии IFN 1-го типа, при этом средство доставки выбрано из наночастиц, липосом, экзосом, бактерий, вирусов, клеток и микровезикул.

147. Средство доставки по п. 146, где иммуностимулирующий белок находится в сигнальном пути, который воспринимает или взаимодействует прямо или опосредованно с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами, циклическими нуклеотидами или циклическими динуклеотидами.

148. Средство доставки по п. 147, отличающееся тем, что иммуностимулирующий белок, находящийся в пути, который воспринимает или взаимодействует прямо или опосредовано с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами, циклическими нуклеотидами, или циклическими динуклеотидами, активирует IFN 1-го типа.

149. Средство доставки по любому из пп. 146-148, где иммуностимулирующий белок участвует во врожденном распознавании ДНК/РНК, который активирует интерферон 1-го типа, и выбран из STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 и SNRNP200.

150. Средство доставки по любому из пп. 146-149, где иммуностимулирующий белок выбран из STING, MDA5, IRF-3, IRF-7 и RIG-1.

151. Средство доставки по п. 150, где:

немодифицированный белок STING имеет последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:305-309;

немодифицированный белок MDA5 имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:310;

немодифицированный белок RIG-I имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:311;

немодифицированный белок IRF-3 имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:312; и

немодифицированный белок IRF-7 имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:313.

152. Средство доставки по любому из пп. 146-151, где иммуностимулирующий белок содержит аминокислотную замену (замены), которая делает его активность конститутивной.

153. Средство доставки по любому из пп. 146-152, где иммуностимулирующий белок, когда он возникает у субъекта, приводит к интерферонопатии.

154. Средство доставки по любому из пп. 162-153, где иммуностимулирующий белок выбран из варианта STING, варианта MDA5, варианта IRF-3, варианта IRF-7 и варианта RIG-I, содержащего мутацию или мутации с усилением функции.

155. Средство доставки по п. 154, отличающееся тем, что мутация(и) с усилением функции приводит к конститутивной экспрессии интерферона 1-го типа.

156. Средство доставки по п. 154 или 155, отличающееся тем, что мутации являются следующими:

a) в STING одна или более, выбранные из: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A и S324A/S326A со ссылкой на SEQ ID NO:305-309

b) в MDA5 одна или более, выбранные из: T331I, T331R, A489T, R822Q, G821S, A946T, R337G, D393V, G495R, R720Q, R779H, R779C, L372F и A452T со ссылкой на SEQ ID NO:310;

c) в RIG-I одна или обе из E373A и C268F со ссылкой на SEQ ID NO:311;

d) в IRF-3 S396D со ссылкой на SEQ ID NO:312; и

e) в IRF-7 одна или более из: S477D/S479D, S475D/S477D/S479D, and S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D со ссылкой на SEQ ID NO:313.

153. Средство доставки по п. 156, где немодифицированный STING имеет последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO:305-309, немодифицированный MDA5 имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:310, немодифицированный RIG-I имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:311, немодифицированный IRF-3 имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:312, а немодифицированный IRF-7 имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO:313, и каждый модифицированный белок имеет, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с немодифицированным белком.

158. Средство доставки по любому из пп. 140-157, которое представляет собой клетку, экзосому, онколитический вирус или вирусный вектор, липосому или другой носитель на основе липидов, или иммуностимулирующую бактерию.

159. Средство доставки по п. 158, где средством доставки является клетка, которая представляет собой стволовую клетку или иммунную клетку.

160. Средство доставки по любому из пп. 140-158, которое представляет собой экзосому.

161. Средство доставки по любому из пп. 140-158, которое представляет собой онколитический вирус.

162. Средство доставки по любому из пп. 140-158, которое представляет собой онколитический вирус, выбранный из онколитического аденовируса, аденоассоциированного вируса, ретровируса, вируса простого герпеса, рабдовируса, вируса папилломы, вируса везикулярного стоматита, вируса кори, вируса болезни Ньюкасла, пикомавируса, вируса Синдбиса, поксвируса, парвовируса, реовируса, вируса Коксаки, вируса гриппа, вируса эпидемического паротита, полиовируса, вируса долины Сенека, вируса Сендай, вируса Денге, полиовируса, вируса леса Семлики, альфавируса и флавивируса.

163. Средство доставки по п. 162, в котором онколитический вирус представляет собой вирус осповакцины, вирус герпеса, вирус кори или реовирус.

164. Средство доставки по любому из пп. 140-163, где нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок, экспрессируется под контролем эукариотической регуляторной последовательности.

165. Средство доставки по любому из пп. 140-164, где нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок, экспрессируется под контролем эукариотического промотора.

166. Средство доставки по любому из пп. 140-165, отличающееся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой конститутивно активный белок STING.

167. Средство доставки по любому из пп. 140-166, которое дополнительно содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуностимулирующий белок, который при экспрессии у субъекта-млекопитающего придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли.

168. Средство доставки по п. 167, где иммуностимулирующий белок представляет собой цитокин, хемокин, костимулирующий белок или рецептор, или костимулирующий рецептор с удаленным цитоплазматическим доменом.

169. Средство доставки по любому из пп. 140-168, которое представляет собой клетку.

170. Средство доставки по п. 169, где клетка представляет собой стволовую клетку.

171. Средство доставки по п. 170, где стволовая клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC).

172. Средство доставки по п. 171, где MSC генетически модифицирована для экспрессии комбинации иммуномодулирующих цитокинов.

173. Средство доставки по п. 172, отличающееся тем, что цитокины представляют собой интерлейкин 12 (IL-12) и интерлейкин 21 (IL-21).

174. Средство доставки, белок STING, или иммуностимулирующий белок, или иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 1-173, где интерферон 1-го типа представляет собой интерферон-α или интерферон-β.

175. Выделенная клетка, содержащая средство доставки по любому из пп. 140-168.

176. Клетка по п. 175, которая представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, опухолевую клетку или первичную клеточную линию.

177. Клетка по п. 176, которая представляет собой гемопоэтическую клетку.

178. Клетка по п. 176, которая представляет собой Т-клетку.

179. Клетка по любому из пп. 175-178, полученная *ex vivo* путем инфицирования клетки средством доставки.

180. Выделенная клетка, содержащая иммуностимулирующую бактерию, где:

иммуностимулирующая бактерия модифицирована таким образом, что она предпочтительно инфицирует опухолерезидентные иммунные клетки, и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован таким образом, что она вызывает меньшую гибель клеток в опухолерезидентных иммунных клетках; и

клетка является иммунной клеткой, стволовой клеткой, клеткой из первичной клеточной линии или опухолевой клеткой.

181. Клетка по п. 180, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой вид *Salmonella*, являющийся флагеллин$^-$ (*fliC*$^-$/*fljB*$^-$).

182. Выделенная клетка или культивируемые клетки, содержащие иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 34-139.

183. Клетка по любому из пп. 180-182, которая представляет собой Т-клетку или гемопоэтическую клетку.

184. Клетка по любому из пп. 181-183, полученная *ex vivo* путем инфицирования клетки иммуностимулирующей бактерией.

185. Способ лечения рака, включающий введение клетки по любому из пп. 180-184 субъекту с раком, который представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

186. Способ по п. 185, где рак представляет собой солидную опухоль.

187. Способ по п. 185 или п. 186, где рак является метастатическим.

188. Способ по любому из пп. 185-187, отличающийся тем, что рак выбран из рака молочной железы, сердца, легкого, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичника, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени, рака желудка, лимфомы и лейкемии.

189. Применение клетки по любому из пп. 180-184 для лечения рака.

190. Применение по п. 189, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

191. Применение по п. 189 или п. 190, где рак является метастатическим.

192. Применение по любому из пп. 189-191, где рак выбран из рака молочной железы, сердца, легкого, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичника, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени, рака желудка, лимфомы и лейкемии.

193. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный белок STING по любому из пп. 1-33, иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 34-139, средство доставки по любому из пп. 140-174 или клетку по любому из пп. 175-184 в фармацевтически приемлемом носителе.

194. Выделенная клетка, содержащая модифицированный белок STING по любому из пп. 1–33, иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 34–139 или средство доставки по любому из пп. 140–174, где клетка не является зиготой оплодотворенной человеческой яйцеклетки.

195. Клетка по п. 194, которая представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, опухолевую клетку или первичную клеточную линию.

196. Клетка по п. 195, которая представляет собой гемопоэтическую клетку, где гемопоэтическая клетка является миелоидной клеткой с химерным антигеном, которая представляет собой макрофаг.

197. Клетка по п. 195, которая представляет собой Т-клетку.

198. Клетка по любому из пп. 194-197, полученная *ex vivo* путем инфицирования клетки модифицированным белком STING, иммуностимулирующей бактерией или средством доставки.

199. Способ лечения рака, включающий введение модифицированного белка STING по любому из пп.1-33, или иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 34-139, или средства доставки по любому из пп. 140-174, или клетки по любому из пп. 175-184 и 194-198, или фармацевтической композиции по п. 193 субъекту с раком, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

200. Способ по п. 199, где рак включает солидную опухоль.

201. Способ по п. 199 или п. 200, где рак является метастатическим.

202. Способ по любому из пп. 199-201, отличающийся тем, что рак выбран из лимфомы, лейкемии, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, ободочной кишки, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, вилочковой железы, матки, яичек, шейки матки и печени.

203. Применение модифицированного белка STING по любому из пп. 1-33, или иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 34-139, или средства доставки по любому из пп. 140-174, или клетки по любому из пп. 175-184 и 194-198, или фармацевтической композиции по п. 193 для лечения рака.

204. Применение по п. 203, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

205. Применение по п. 203 или п. 204, где рак является метастатическим.

206. Применение по любому из пп. 203-205, отличающееся тем, что рак выбран из лимфомы, лейкемии, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, ободочной кишки, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, вилочковой железы, матки, яичек, шейки матки и печени.

207. Модифицированный белок STING, средство доставки, иммуностимулирующая бактерия, фармацевтическая композиция, клетка, способ или применение по любому из пп. 1-206, где нечеловеческий белок STING имеет последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 331, 338 или 341-351, или представляет собой аллельный вариант белка STING каждого вида, имеющий не менее 98% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 331, 338 или 341-351.

208. Модифицированный белок STING, средство доставки, иммуностимулирующая бактерия, фармацевтическая композиция, клетка, способ или применение по любому из пп. 1-206, где нечеловеческий белок STING или химерный белок имеет последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 332-337, 339 или 340.

209. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 34-139 в фармацевтически приемлемом носителе.

210. Фармацевтическая композиция по п. 193 или п. 209, приготовленная для введения без разбавления.

211. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 193, 209 и 210, приготовленная в виде однократной дозы.

212. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 193 и 209-211, приготовленная для парентерального введения.

213. Способ лечения рака, который включает солидную опухоль или гемоталогическое злокачественное новообразование, у субъекта, включающий введение фармацевтической композиции по любому из пп. 193 и 209-212.

214. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 193 и 209-212 для лечения рака, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование, у субъекта.

215. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 34-139 для применения в лечении рака, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование, у субъекта.

216. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 199-206 и 213-215, где субъектом является человек.

217. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 199-206 и 213-216, где лечение включает комбинированную терапию, при которой используют второе противораковое средство или лечение.

218. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по п. 217, где второе противораковое средство или лечение вводят до, одновременно, после или периодически с иммуностимулирующей бактерией.

219. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по п. 218, где второе противораковое средство или лечение представляет собой иммунотерапию.

220. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 199-206 и 213-219, где введение белка, клетки, средства доставки, фармацевтической композиции или иммуностимулирующей бактерии осуществляют парентерально.

221. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 199-206 и 213-220, где введение осуществляют перорально, или ректально, или в виде аэрозоля в легкие, или внутрь опухоли.

222. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 199-206 и 213-220, где введение осуществляют внутривенно, внутримышечно или подкожно.

223. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 199-206 и 213-222, где рак выбран из лейкемии, лимфомы, рака желудка и рака молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичника, простаты, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.

224. Способ или применение иммуностимулирующей бактерии по п. 219, где иммунотерапия включает введение антитела к PD-1, или к PD-L1, или к CTLA-4.

225. Способ повышения способности терапевтической бактерии колонизировать опухоль, включающий модификацию генома, за счет чего бактерия становится флагеллин$^-$ (*fliC*$^-$/*fljB*$^-$) и/или pagP$^-$.

226. Способ по п. 225, где терапевтическая бактерия представляет собой иммуностимулирующую бактерию.

227. Способ по п. 225 или п. 226, где бактерия представляет собой вид *Salmonella*.

228. Способ получения иммуностимулирующей бактерии или онколитического вируса для лечения рака, включающий:

выявление мутантного с усилением функции конститутивно активного иммуностимулирующего белка, который вызывает интерферонопатии у пациентов-людей; и

введение нуклеиновой кислоты, кодирующей идентифицированный белок, в бактерию или вирус, нацеленные на опухоль, за счет чего полученная бактерия или вирус при введении субъекту способствует иммуностимуляции микроокружения опухоли.

STING человека и Тасманийского дьявола

```
Человек                    1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH      50
                             11.1.111111.111.111111.1111.1• ..... 111••••11::1:•:
Тасманийский               1 MPRSHLHPSIPQPRGWGAQKAACVLLSLCMAAVYILGESAAFTLQWLLFY      50

Человек                   51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRIVRACLGCPLRRGALLL      100
                             ..::1:1111.1...11111.11.11::1111:.::11:..1.:1.:111
Тасманийский              51 FTTVQVGLLLKGAYCLAEELYHIQSRHQGSYWQAIQACIHYPFQRISLLL      100

Человек                  101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK      150
                             11.111.:1.1-1-11-111111.11:.:111:.1-1111.1111
Тасманийский             101 LSGYFYVTLSNKPNPSLTWTFALLGLSHALSFILGLQNLTSAEISEVCEK      150

Человек                  151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI      200
                             •.....:•11111111111
Тасманийский             151 RHLNVAHGLAWSYYIGYLKLILPGLQTRIQIYNQFNKDVLRSPEGHRLHI      200

Человек                  201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN      250
                             1:1111.111111•11III:11•:111•••1.1111.1:1:1111::•1:
Тасманийский             201 LIPLDCSVPDNLSQADPNIQFLQELPQHKLDRAGIKGRIYINSIYKISED      250

Человек                  251 GQRAGICVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGESREDRLEQAKLFCRTLEDILA      300
                             11.1••IIII:IIIIIIIIIII•::1111111111111111111111•
Тасманийский             251 GQPAEVCVLEFATPLQTLFAMSQDARAGESREDRLEQAKLFCRTLEDILE      300

Человек                  301 DAPESQNNCRLIAYQEPADD--SSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKT      348
                             1111:::.111:.1111.1.
Тасманийский             301 DAPEARDCCRLVVYQEPEDKAVSNFSLSKEILRHLRQERQEEFAIGPKRA      350

Человек                  349 SAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTD-FS      379
                             ••1•::11:1111:1111111:11.1111   1
Тасманийский             351 MTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF-      381
```

FIGURE 1

STING человека и мартышки

```
Человек      1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH  50
                IIIIIIIIII.IIIII1:IIIIII.111111.1.1.11••11:1111
Мартышка     1 MPHSSLHPSIPHPRGHGAQEAALVLLSVCLVTLWWLREAPEDILRFLVLH  50

Человек     51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRIVRACLGCPLRRGALLL 100
                IIIIIIIII•:IIIIIIII:I:II:11111.11111111:1.11.11
Мартышка    51 LASLQLGLLLNRLCSLAEELRHVHTRYQGSYWRAVRACLGCP I RLGAQLL 100

Человек    101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK 150
                111111••III                  I.IIIIIIIII.IIIIIIIIIIIIIIIIIIII
Мартышка   101 LS IYFYCFLPN--GRPFTWMLALLGESQALNI LLGLKGLAPAEI SAVCEK 148

Человек    151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI 200
                •  IIIIIIIIIIIIIIIIII—IIIIIIIII.11:111-111111
Мартышка   149 RNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPGFQARIRTYNQHNNNVLRGPASQRLYI 198

Человек    201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNS IYELLEN 250
                1•IIIIIIIII•IIIIIIIIII:1.1.1111.111:111111111
Мартышка   199 LEPLDCGVPDNLSTADPNIRELDKLPQETIDRAGIKGRVYTNSIYELLEN 248

Человек    251 GQRAGTCVLEYAT PLQTLFAMSQYSQAGESREDRLEQAKLECRTLEDI LA 300
                IIII.IIIII:IIIIIIIII.IIIIIIIIIIIIIIIIIIII
Мартышка   249 GQRAGACVLEYAS PLQTLFAMSQYGQAGFS REDRLEQAKLFCRTLEDI LA 298

Человек    301 DAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSA 350
                IIIIIIIIII•I:IIII.111.11IIII:IIIII:II111111111•
Мартышка   299 DAPESQNNCRLIVYEEPADGSSFLLSQEVLQHLRQEEEEEVTVGSLKTSE 348

Человек    351 VPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS 379
                IIIIIIIIIIIIIIIIIIII:I—
Мартышка   349 VPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRSDLF 377
```

FIGURE 2

STING человека и крупного рогатого скота (КРС)

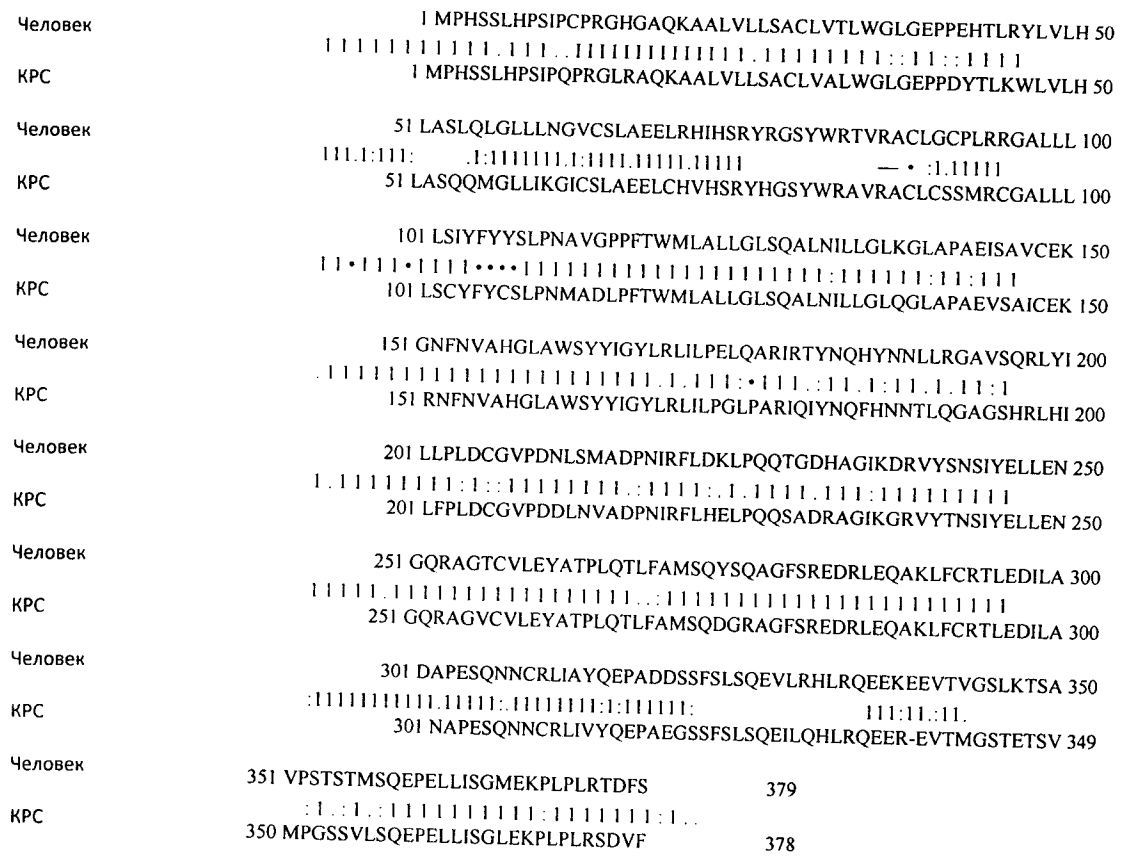


FIGURE 3

STING человека и кота

```
Человек          1 MPHS S LHP S I PCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH 50
                 1 1 •  :                                  .111111.111.1111111111:
                  .11..11.111.1:1111:1111
Кот              1 MPRTGLHP S I PRPRGMGAQKAALVLLAVCLAALWRLGESPDHTLRWLVLH 50

Человек         51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL 100
                 111111111..111.1.111.1:1111:11111.          :      :1111.1:1.11111
Кот             51 LASLQLGLLFTGVCHLTEELCHLHSRYQGSYWRAMKACLGS PVRS GALLL 100

Человек        101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK 150
                 11.111•:11                 :•••IIIIIIIIIIIIIIIII.1:111111:111111
Кот            101 LSCYFYSTLP- STDLPFTWMLALLGLSQALNI LLDLQGLAPAEVSAVCEK 149

Человек        151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI 200
                .1111111111111111111111.1.11:•1.11•:11:111••1.11:1
Кот            150 KNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPGLPARVLTCNQLHNNILRGTGSHRLHI 199

Человек        201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNS IYELLEN 250
                1.11111111::1:11111111•:1111:•1.1111.111:11:1.1111
Кот            200 LFPLDCGVPDDMSVADPNI RFLYELPQQSADRAGI KGRVYTNSVYALLEN 249

Человек        251 GQRAGTCVLEYAT PLQTLFAMSQYSQAGESREDRLEQAKLECRTLEDI LA 300
                11:11.1111111111111111••:1111111111111111.111111
Кот            250 GQQAGI CVLEYAT PLQTLFAMSQDGRAGESREDRLEQAKLECRI LEDI LA 299

Человек        301 DAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSA 350
                1.11.1111111.1111•:•1:111111:11111111:                111111:•II•
Кот            300 DT PECQNNCRLIVYQEPEEGSNFSLSQEI LRHLRQEER-EVTVGSVGT SM 348

Человек        351 VPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS          379
                    1•:•1•:1111.1111111:1111111••
Кот            349 VRNPSVLSQEPNLLISGMEQPLPLRTDVF          377
```

FIGURE 4

STING человека и страуса

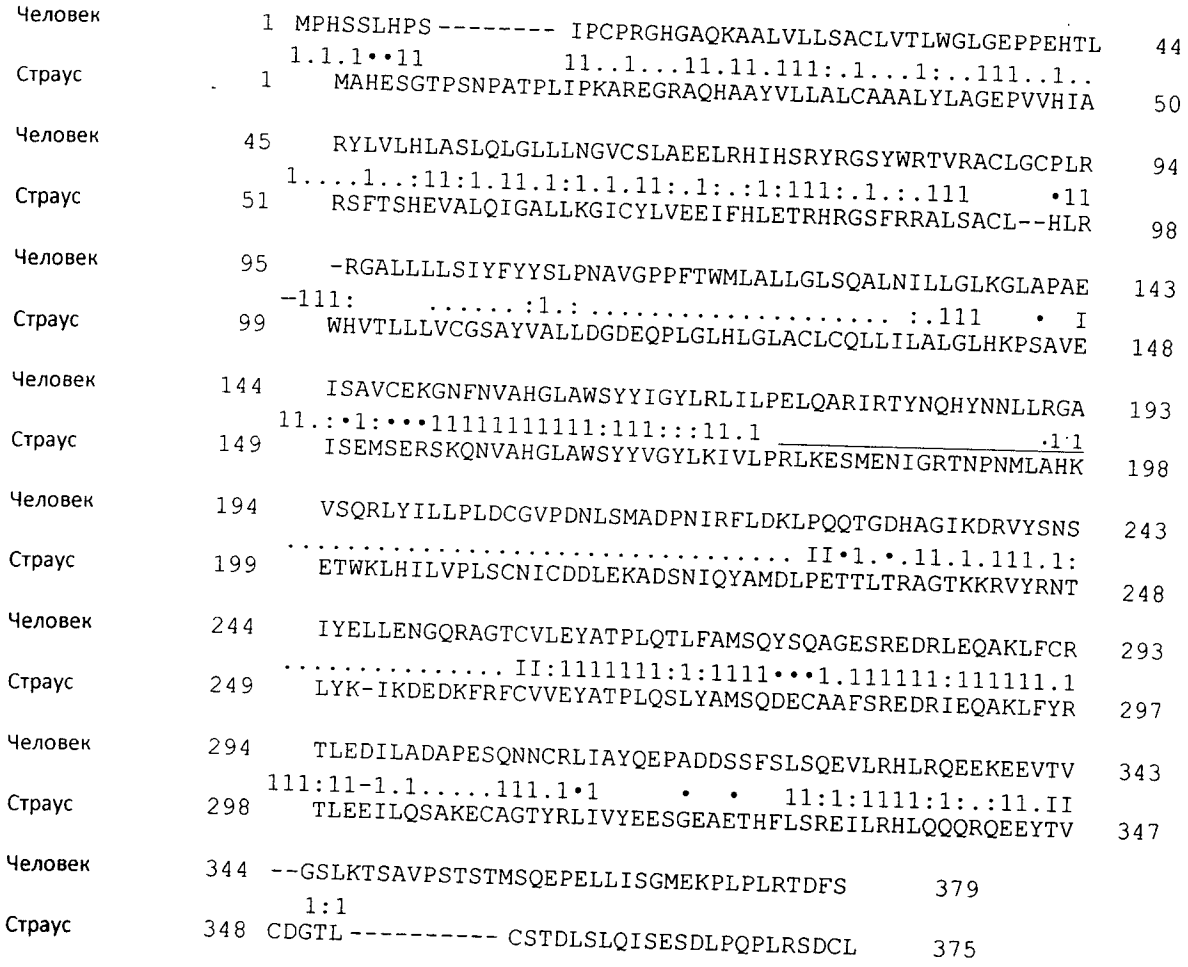


FIGURE 5

STING человека и хохлатого ибиса



FIGURE 6

STING человека и целаканта (вариант с SEQ ID NO:345) STING

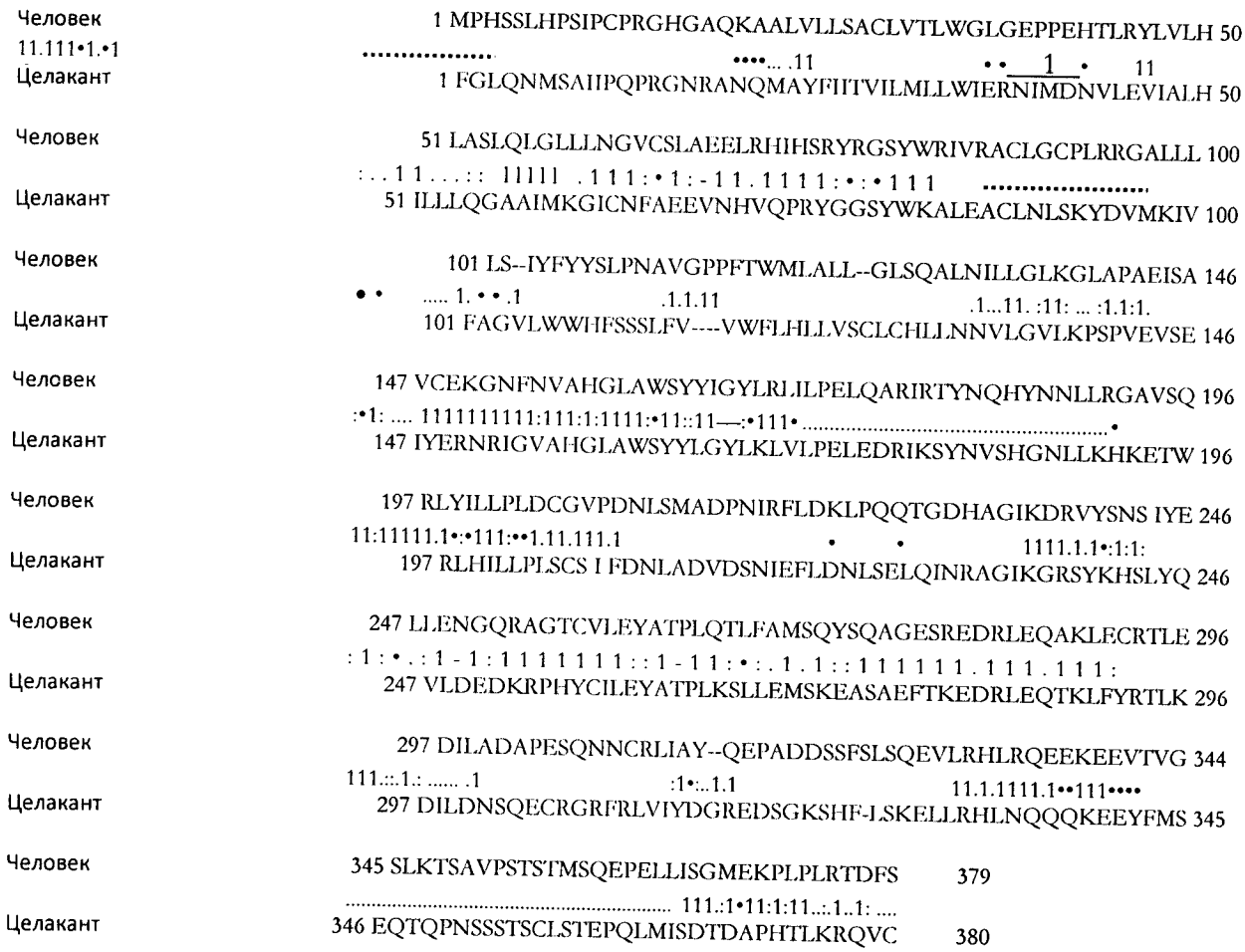


FIGURE 7

STING человека и данио

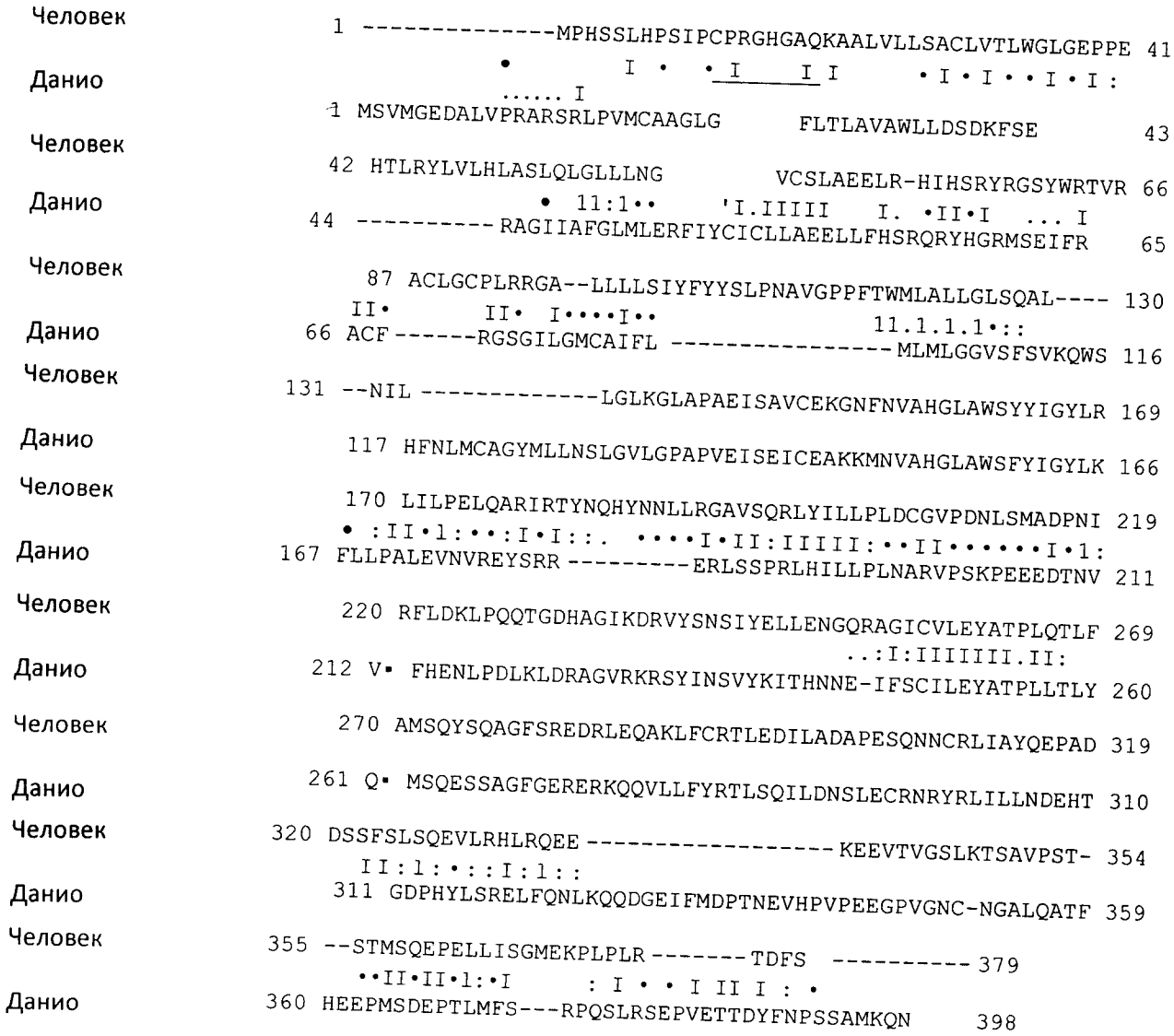


FIGURE 8

STING человека и кабана

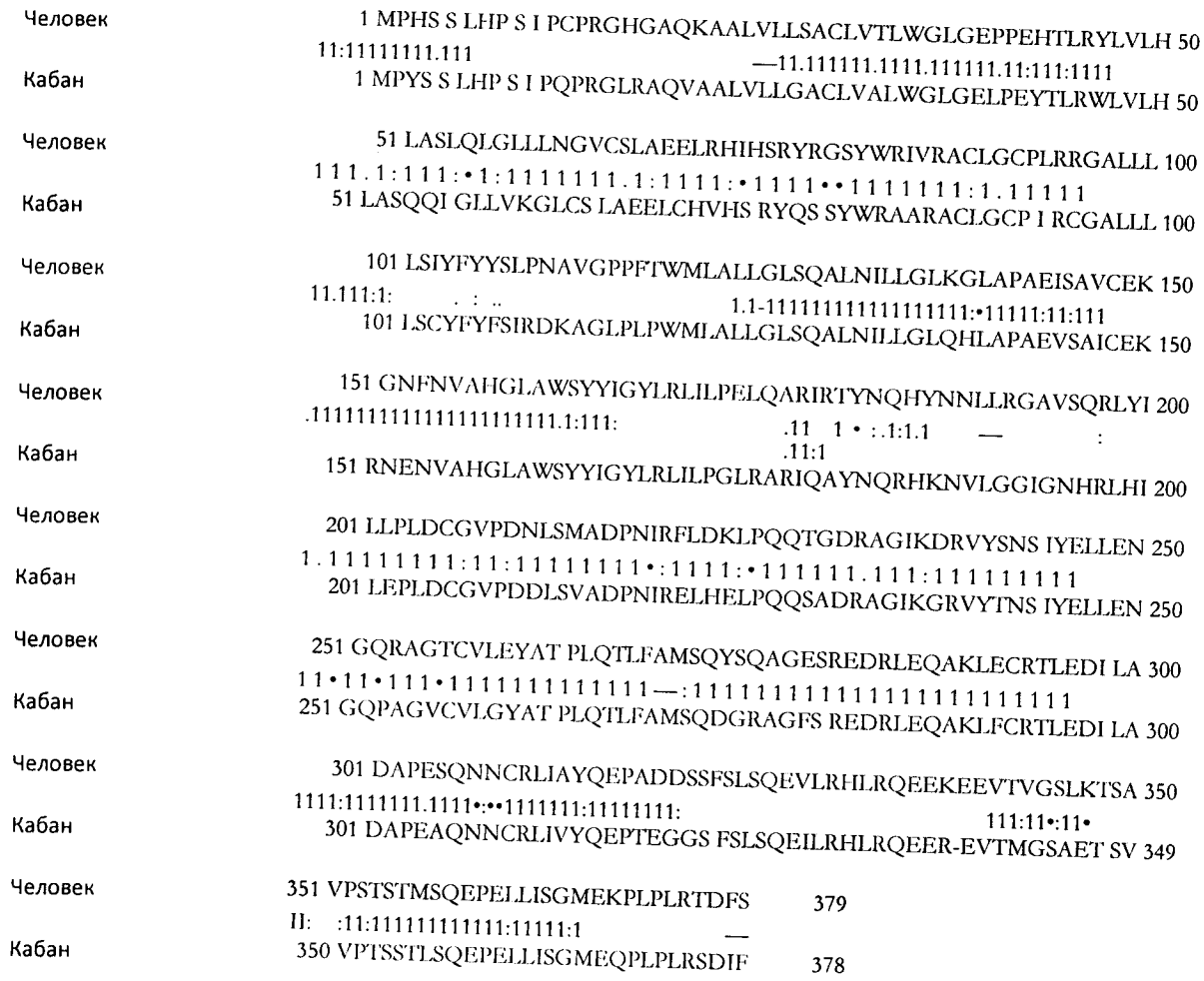


FIGURE 9

STING человека и летучей мыши

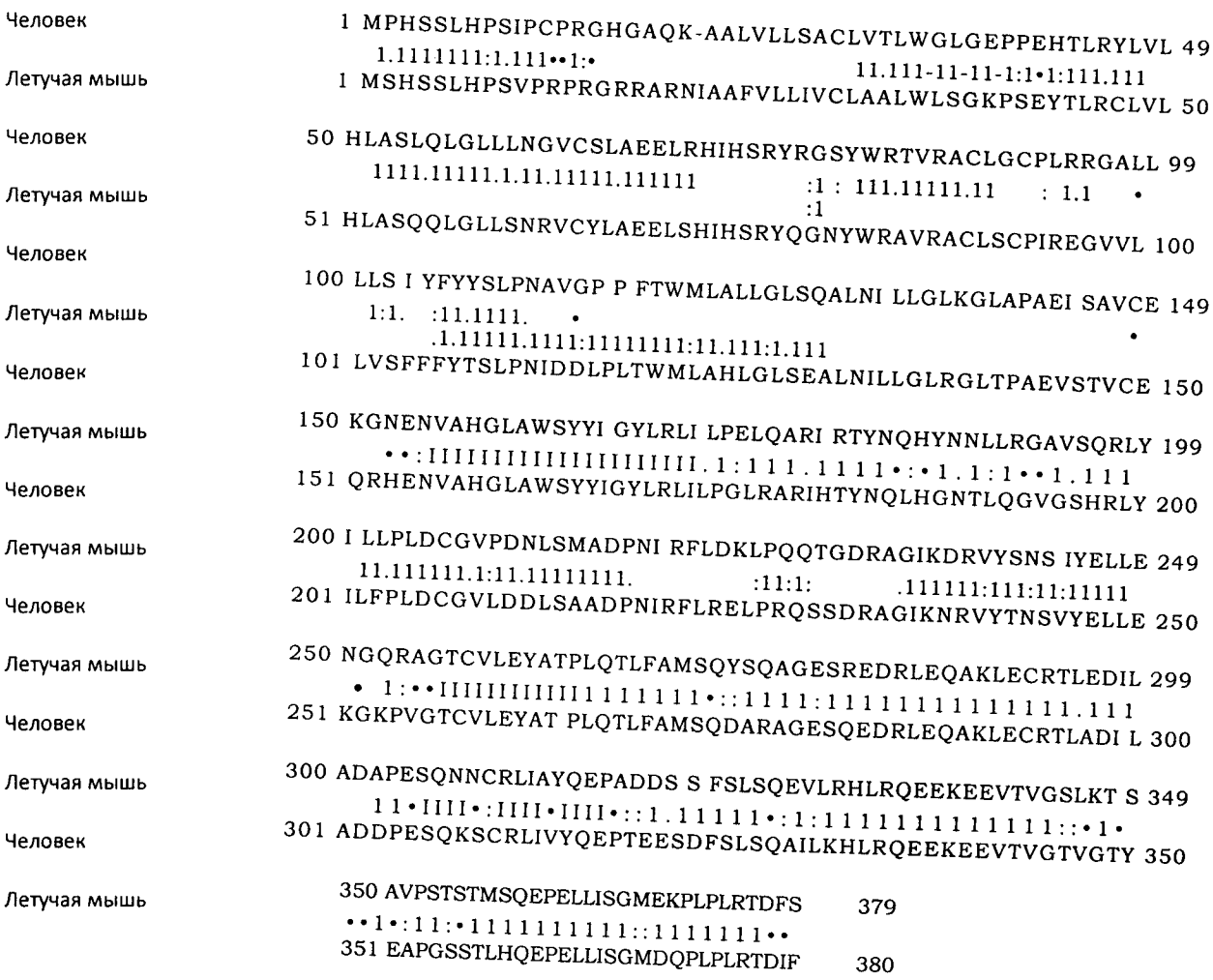


FIGURE 10

STING человека и ламантина

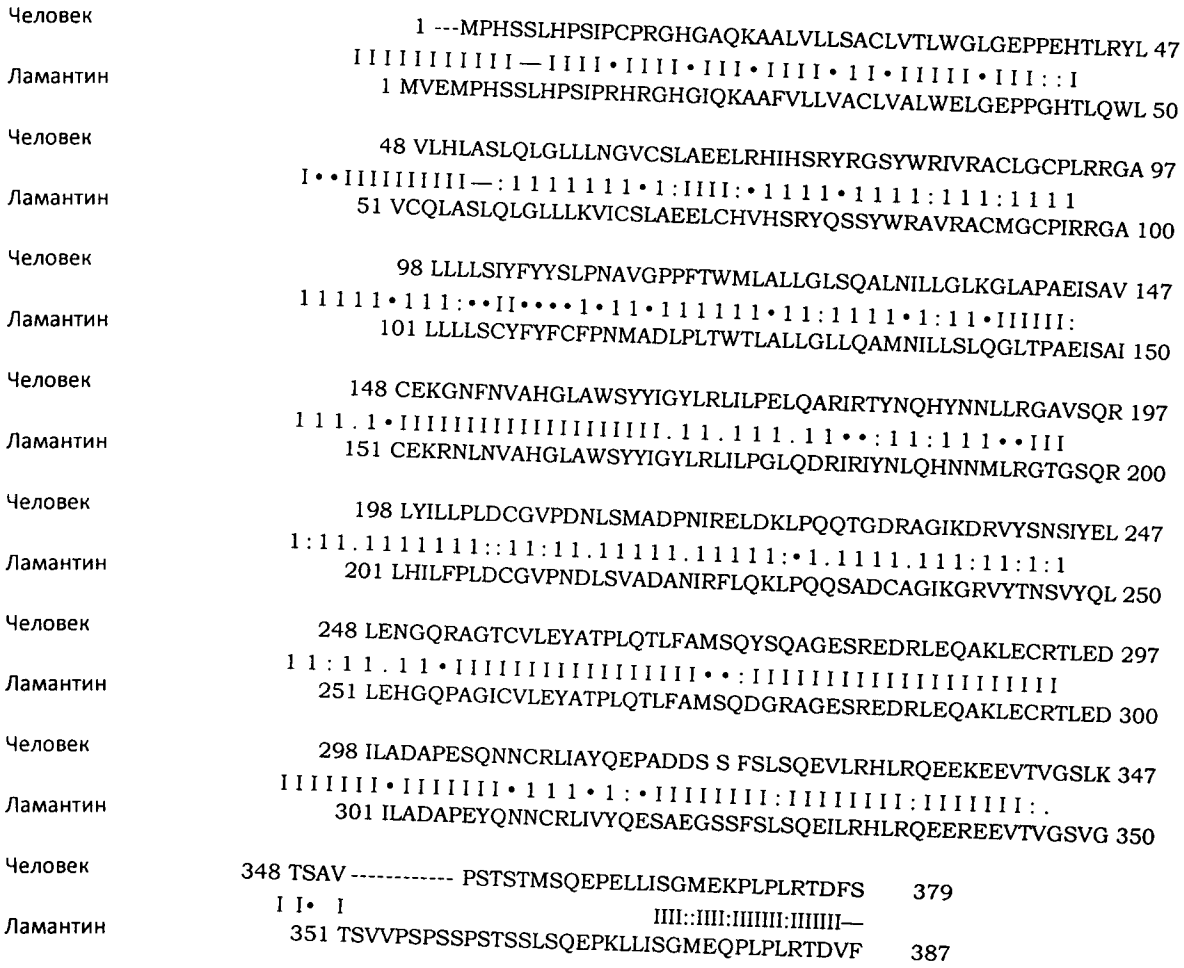


FIGURE 11

STING человека и акулы

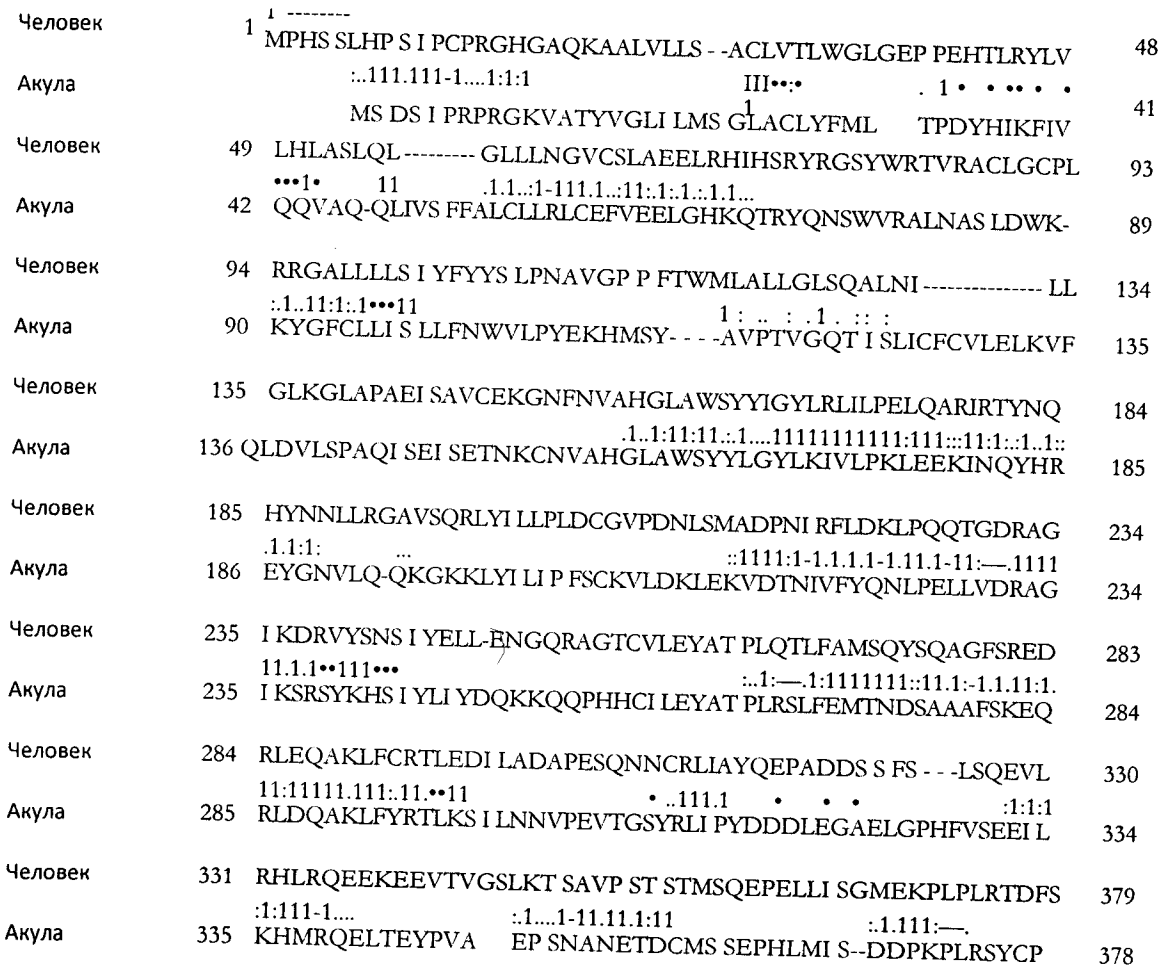


FIGURE 12

STING человека и мыши

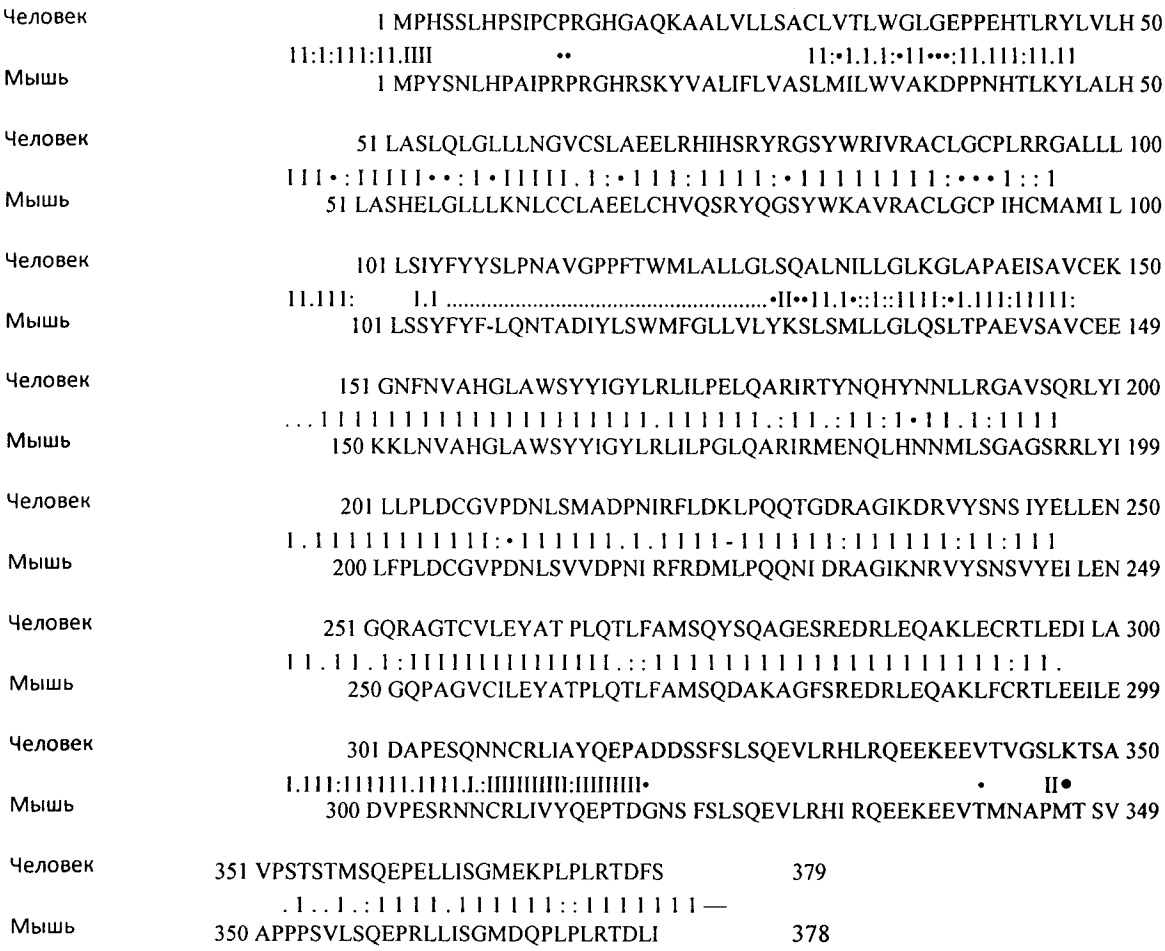


FIGURE 13