(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 044058 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.20

(21) Номер заявки
201991157

(22) Дата подачи заявки
2017.12.20

(51) Int. Cl. ***C07K 14/195*** (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)

(54) ДОСТАВКА БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ, АТТЕНУИРОВАННЫХ ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ

(31) **16205439.9**
(32) **2016.12.20**
(33) **EP**
(43) **2020.01.16**
(86) **PCT/EP2017/083853**
(87) **WO 2018/115140 2018.06.28**

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

(72) Изобретатель:
Иттиг Симон, Амштуц Марлиз, Каспер Кристоф (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A2-9945098

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

H. RUSSMANN ET AL.: "Protection Against Murine Listeriosis by Oral Vaccination with Recombinant Salmonella Expressing Hybrid Yersinia Type III Proteins", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 167, no. 1, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 357-365, XP055362697, US, ISSN: 0022-1767, DOI:10.4049/jimmunol.167.1.357, abstract; figure 6

WO-A2-2007044406

WO-A1-2015177197

WO-A2-0226819

XIAN-YANG LI ET AL.: "Tumor suppressor activity of RIG-I", MOLECULAR & CELLULAR ONCOLOGY, vol. 1, no. 4, 8 December 2014 (2014-12-08), page e968016, XP055366048, DOI: 10.4161/23723548.2014.968016, cited in the application, abstract, page 2, right-hand column, paragraph 3 - page 3, left-hand column, paragraph 2, page 4, right-hand column, paragraph 2

KATJA BÖHME ET AL.: "Concerted Actions of a Thermo-labile Regulator and a Unique Intergenic RNA Thermosensor Control Yersinia Virulence", PLOS PATHOGENS, vol. 8, no. 2, 16 February 2012 (2012-02-16), page e1002518, XP055365892, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002518, cited in the application, page 9, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2; figure 11

JIAXI WU ET AL.: "Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids", ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, vol. 32, no. 1, 21 March 2014 (2014-03-21), pages 461-488, XP055366371, US, ISSN: 0732-0582, DOI:10.1146/annurev-immunol-032713-120156, cited in the application, page 462, paragraph 1-2, page 463, paragraph 4 - page 464, paragraph 1; figures 2, 3

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

LETICIA CORRALES ET AL.: "Direct activation of STING in the tumor microenvironment with synthetic cyclic dinucleotide derivatives leads to potent and systemic tumor-specific immunity", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 2, no. Suppl 3, 6 November 2014 (2014-11-06), page 010, XP021202342, ISSN: 2051-1426, DOI:10.1186/2051-1426-2-S3-010, cited in the application, abstract

(57) Изобретение относится к рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммам бактерий и их применению в способе лечения рака у субъекта.

044058 B1

044058 B1

Область техники

Изобретение относится к рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммам бактерий и их применению в способе лечения рака у субъекта.

Уровень техники

Бактерии используют различные механизмы для прямого впрыскивания белков в клетки-мишени[1]. Система секреции III типа (type III secretion system, T3SS), используемая такими бактериями, как Yersinia, Shigella и Salmonella[2], функционирует подобно наношприцу, который инъецирует так называемые бактериальные эффекторные белки в клетки-хозяева.

T3S использовалась для доставки гибридных пептидов и белков в клетки-мишени. Гетерологичные эффекторы бактериальной T3SS доставлялись в случае, когда исследуемая бактерия являлась трудноподдающейся воздействию генетических средств (такая как Chlamydia trachomatis). Часто репортерные белки сливали с предполагаемыми сигналами секреции T3SS в зависимости от требований исследования для T3SS-зависимой доставки белков, таких как аденилатциклаза Bordetella pertussis, ДГФР (дигидрофолатредуктаза) мыши или поддающаяся фосфорилированию метка. Доставку пептидов, главным образом, проводили с целью вакцинации. Пептиды включали вирусные эпитопы, бактериальные эпитопы (листериолизин O), а также пептиды, представляющие эпитопы раковых клеток человека. В нескольких случаях функциональные эукариотические белки доставляли для модулирования клетки-хозяина, которое осуществляли с помощью нанотел[3], ядерных белков (рекомбиназы Cre, MyoD) [45] или Il10 и IL1ra[6]. Ни одна из вышеупомянутых систем не позволяет осуществлять доставку единичных белков, поскольку в каждом случае при этом кодируются один или множество эндогенных эффекторных белков. Более того, применяемые векторы были сконструированы способом, не позволяющим осуществлять простое клонирование других фрагментов ДНК, кодирующих предпочтительные белки, что препятствует широкому применению системы.

Подходы, обеспечивающие адресную доставку лекарственных средств, представляют большой интерес. Например, применяют антитела, распознающие структуры поверхности опухолевых клеток и, в оптимальном случае, селективно связывающиеся с опухолевыми клетками. Для улучшения механизма действия таких антител их можно конъюгировать с терапевтическими средствами или с липидными везикулами, наполненными лекарственными средствами. Одной из проблем при применении таких везикул является надлежащее высвобождение активного компонента. Еще более сложной является доставка терапевтических белков или пептидов, в особенности, при нацеливании на внутриклеточные механизмы. Было испробовано множество альтернативных способов решения данной проблемы доставки терапевтических белков в эукариотические клетки, которые включают "проникающие в клетку пептиды" (cell penetrating peptides, CPP) или подобные технологии, а также различные способы на основе наночастиц. Все из данных технологий характеризуются недостатками - низкой эффективностью и тем, что "груз", поглощенный клеткой посредством эндоцитоза, вероятно, в итоге будет расщеплен в лизосомах. Более того, конфликт между необходимостью обеспечения стабильности транспортирующего груз средства в организме человека и потребностью его дестабилизации и высвобождения в клетке-мишени представляет собой проблему, характерную для таких технологий.

Было показано, что множество бактерий реплицируются в злокачественных солидных опухолях при введении из отдаленного участка, включая Escherichia coli, Vibrio cholerae, Salmonella enterica, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa и Bifidobacteria. На сегодняшний день в клинической практике применяют только бациллу Кальмета-Герена (БЦЖ, полученную из Mycobacterium bovis). БЦЖ вводят для лечения поверхностного рака мочевого пузыря, хотя лежащий в основе молекулярный механизм остается в значительной степени неизвестным. Разработка штаммов бактерий, способных, например, доставлять груз, образованный внутри бактерии, к участку его действия внутри клеток, таких как раковые клетки, т.е. за пределами бактерии, остается важной задачей.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммам бактерий и их применению в способе лечения рака у субъекта. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены рекомбинантные аттенуированные по вирулентности грамотрицательные штаммы бактерий и их применение для лечения рака у субъекта, причем рекомбинантные аттенуированные по вирулентности грамотрицательные штаммы бактерий обеспечивают транслокацию различных эффекторов III типа, а также эффекторов IV типа, вирусных белков и, что наиболее важно, функциональных эукариотических белков в раковые клетки, например, в клетки злокачественной солидной опухоли. В настоящем изобретении предложен рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий с повышенными свойствами экспрессии гетерологичного белка и секреции, который неожиданно является способным стабильно кодировать гетерологичный белок в течение нескольких дней или даже недель in vivo.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аттенуированному по вирулентности грамотрицательному штамму бактерий, содержащему нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффек-

торного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит делецию хромосомного гена, кодирующего эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аттенуированному по вирулентности грамотрицательному штамму бактерий, содержащему нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит модуляцию в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аттенуированному по вирулентности грамотрицательному штамму бактерий, содержащему нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем гетерологичный белок представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН).

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аттенуированному по вирулентности грамотрицательному штамму бактерий, содержащему нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит делецию хромосомного гена, кодирующего эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором, для применения в способе лечения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту указанного рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта. Аналогично, настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, содержащего нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит делецию хромосомного гена, кодирующего эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

Аналогично, настоящее изобретение относится к применению рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, содержащего нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит делецию хромосомного гена, кодирующего эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором, с целью получения лекарственного средства для лечения рака у субъекта.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аттенуированному по вирулентности грамотрицательному штамму бактерий, содержащему нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с

3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит модуляцию в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC, для применения в способе лечения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту указанного рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

Аналогично, настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, содержащего нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит модуляцию в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта. Аналогично, настоящее изобретение относится к применению рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, содержащего нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит модуляцию в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC с целью получения лекарственного средства для лечения рака у субъекта.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аттенуированному по вирулентности грамотрицательному штамму бактерий, содержащему нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем гетерологичный белок представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), для применения в способе лечения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту указанного рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

Аналогично, настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, содержащего нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем гетерологичный белок представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

Аналогично, настоящее изобретение относится к применению рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, содержащего нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем гетерологичный белок представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН) с целью получения лекарственного средства для лечения рака у субъекта.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий и фармацевтически приемлемый носитель, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности

грамотрицательный штамм бактерий содержит нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит делецию хромосомного гена, кодирующего эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором. В следующем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий и фармацевтически приемлемый носитель, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит модуляцию в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий и фармацевтически приемлемый носитель, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем гетерологичный белок представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН).

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - характеристика доставки белков с помощью T3SS. Схематическое представление T3SS-зависимой секреции белка в окружающую среду (секреции in vitro) (левая часть) или в эукариотические клетки (правая часть). I: показана система секреции типа 3. II: показаны белки, секретированные в окружающую среду, III - белки, транслоцированные через мембрану в цитозоль эукариотических клеток (VII). VI: показан участок двух бактериальных мембран, в который встроена T3SS, и находящийся ниже бактериальный цитозоль. IV представляет собой слитый белок, присоединенный к N-концевому фрагменту $YopE_{1-138}$ (V).

Фиг. 2 - описание набора инструментов для доставки на основе секреции III типа. (A) Векторные карты плазмид для клонирования pBad_Si1 и pBad_Si2, которые применяли для получения слитых конструкций с $YopE_{1-138}$. Шаперон SycE и слияние $YopE_{1-138}$ находятся под контролем нативного промотора Y. enterocolitica. Две плазмиды отличаются исключительно наличием индуцибельного арабинозой EGFP (enhanced green fluorescent protein, усиленного зеленого флуоресцентного белка), присутствующего на pBad_Si1 (B) Сайт множественного клонирования расположен непосредственно после фрагмента $yopE_{1-138}$ на плазмидах pBad_Si1 и pBad_Si2.

Фиг. 3A-Q - штаммы Y. enterocolitica, применявшиеся в данном исследовании. Перечень штаммов Y. enterocolitica, применявшихся в данном исследовании, обеспечивает информацию о фоновых штаммах, плазмидах и белках для T3SS-зависимой доставки на соответствующих плазмидах. Также представлена информация об олигонуклеотидах, применявшихся для конструирования соответствующей плазмиды, о каркасной плазмиде и устойчивости к антибиотикам.

Фиг. 4 - плазмида вирулентности Yersinia enterocolitica W227, pYV. Плазмида вирулентности Yersinia штамма W227 (pYV) размером 69673 п.о. представлена в масштабе. Отмечены эффекторные белки T3SS, точка начала репликации и устойчивость к мышьяку (кодируемая генами arsC, B, R и H): I: точка начала репликации, II: yopO, III: yopP, IV: yopQ, V: yopT, VI: sycT, VII: yopM, VIII: yopD, IX: yopB, X: sycD, XII: yopH, XIII: sycH, XIV: sycE, XV: yopE, XVI: yadA, XVII-XVXX: arsC, B, R и H.

Фиг. 5 - доставка синтетических увеличенных проапоптотических белков. Доставка единичных синтетических белков, состоящих из однократных или тандемных повторов доменов BH3, полученных из проапоптотических белков t-BID или BAX, приводит к усиленной индукции апоптоза в раковых клетках 4T1 и B16F10. Клетки 4T1 (I) или B16F10 (II) инфицировали Y. enterocolitica ΔyopHOPEMT, кодируемым на pBad-MycHisA IV: $YopE_{1-138}$ - удлиненный домен BH3 tBID, V: $YopE_{1-138}$-линкер-BH3 tBID, VI: $YopE_{1-138}$-BH3 tBID, VII: $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$, VIII: $YopE_{1-138}$-BH3 tBID - BH3 BAX или IX: $YopE_{1-138}$-BH3 BAX - BH3 tBID. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (множественность заражения, МЗ), проводили для каждого штамма, определяли число клеток и вычисляли IC_{50} с помощью нелинейной регрессии. Указана МЗ IC_{50} (III).

Фиг. 6 - индукция апоптоза кодируемыми pYV синтетическими проапоптотическими белками. Доставка однократного или тандемного повтора домена BH3 BID, кодируемого на pYV, приводит к индукции апоптоза в раковых клетках 4T1 и B16F10. Клетки 4T1 (I) или B16F10 (II) инфицировали Y. enterocolitica ΔHOPEMAT+IV: pYV-$YopE_{1-138}$-BH3-Bid или V:+pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\text{-}Bid)_2$ или VI: с помощью Y. enterocolitica ΔHOPEMAT pBad-MycHisA-$YopE_{1-138}$-$(BH3\text{-}Bid)_2$ в течение 3 ч. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (МЗ), проводили для каждого штамма, определяли число клеток и вычисляли IC50 (III) с помощью нелинейной регрессии.

Фиг. 7 - колонизация опухоли инъецированным в.в. (внутривенно) Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T на модели аллотрансплантата рака молочной железы 4T1. Число бактерий в опухолях указано в виде колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г ткани (III). Подсчет проводили в опухолях в день 8 (I) и 14 (II) после инфекции. Каждая точка представляет отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия обозначает предел обнаружения.

Фиг. 8 - биораспределение инъецированного в.в. Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T на модели аллотрансплантата рака молочной железы 4T1. Число бактерий в крови (I), селезенке (II), печени (III), легких (IV) и опухоли (V) указано в виде колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г ткани или на 1 мл крови (VI). Подсчет проводили в день 14 после инфекции. Каждая точка представляет отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия обозначает предел обнаружения. * обозначает мышь с обширными метастазами, обнаруженными в легких.

Фиг. 9 - задержка прогрессирования опухоли на мышах Balb/C дикого типа с п.к. (подкожным) аллотрансплантатом клеток рака молочной железы 4T1. Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы 4T1 в.в. инъецировали I: ФБР (фосфатный буферный раствор) или II: 1×10^7 Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHairpinI-VirF+pYV-$YopE_{1-138}(BH3\text{-}Bid)_2$, когда опухоль достигала размера 150-250 $мм^3$. День в.в. инъекции бактерий обозначали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (III; с дня 0 по день 9 после в.в. инъекции бактерий) с помощью штангенциркуля. Относительный объем опухоли, нормированный к объему опухоли в день 0, указан (IV) в $мм^3$. Среднее значение указано символами, представленные планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку среднего. Статистическую значимость измеряли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, * указывает значение $p<0,05$, ** - значение $p<0,005$.

Фиг. 10 - прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы 4T1. Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы 4T1 в.в. инъецировали I: ФБР или II: 1×10^7 Y. enterocolitica dHOPEMT, когда опухоль достигала размера 150-250 $мм^3$. День в.в. инъекции бактерий обозначали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (III; с дня 0 по день 9 после в.в. инъекции бактерий) с помощью штангенциркуля. Относительный объем опухоли, нормированный к объему опухоли в день 0, указан (IV) в $мм^3$. Среднее значение указано символами, представленные планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку среднего.

Фиг. 11 - регуляция секреции на основе T3SS посредством контроля экспрессии главного регулятора VirF. A: Анализ секреции in vitro (проводили при температуре 37°C) со штаммами Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, доставляющими $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$. Экспрессия VirF находится под контролем его природного промотора (I+II), индуцибельного арабинозой промотора (III+IV) или его природного промотора с делецией области шпильки I, контролирующей зависимую от температуры экспрессию (V). Анализ секреции проводили при отсутствии арабинозы (I, III и V) или в присутствии 0,2% арабинозы (II и IV). Секретированный $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$ обнаруживали с применением вестерн-блоттинга с антителом, распознающим область $YopE_{1-138}$. B: Анализ секреции in vitro (проводили при температуре 37°C) со штаммами Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, доставляющими $YopE_{1-138}$-домены Card RIG1 мыши. Экспрессия VirF находится под контролем его природного промотора (I+II) или его природного промотора с делецией области шпильки I, контролирующей зависимую от температуры экспрессию (III). Анализ секреции проводили при отсутствии арабинозы (I и III) или в присутствии 0,2% арабинозы (II). Секретированные $YopE_{1-138}$-домены Card RIG1 мыши обнаруживали с применением вестерн-блоттинга с антителом, распознающим область $YopE_{1-138}$.

Фиг. 12 - сравнение роста in vitro. Сравнение роста in vitro для II: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, III: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT Δasd, IV: Y. Enterocolitica ΔHOPEMT Δasd+pBAD-MycHisA-asd, V: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT Δasd+pBAD-MycHisA-asd (обратная ориентация), VI: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодирующего $YopE_{1-138}$-(BH3 tBID)2 на pYV и VII: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT Δasd+pYV-asd-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$. Бактерии инокулировали в жидкой культуре и выращивали в течение 3 ч. Затем для всех штаммов определяли ОП600 (оптическую плотность при длине волны 600 нм) (I).

Фиг. 13 - колонизация опухоли Y. enterocolitica ΔHOPEMAT Δasd+pBad-MycHisA-asd и стабильность pBad-MycHisA-asd: Мышам C57BL/6 дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток меланомы B16F10 в.в. инъецировали 1×10^6 Y. enterocolitica ΔHOPEMAT Δasd+pBad-MycHisA-asd. В день 1 (I) или день 4 (II) после в.в. инъекции бактерий кровь (V), селезенку (VI), печень (VII), легкие (VIII) и опухоль (IX) отбирали, гомогенизировали, готовили серийные разведения и высевали на чашках с агаром LB, со-

держащих налидиксовую кислоту (и не содержащих ампициллин, -IV), или на чашках с агаром LB с ампициллином (+IV), селективных в отношении pBad-MycHisA-asd. Число бактерий в соответствующих образцах указано в виде колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г ткани или мл крови (III). Каждая точка представляет отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия обозначает предел обнаружения.

Фиг. 14 - колонизация опухоли Y. enterocolitica ΔHOPEMAT Δasd+pBad-MycHisA-asd: Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы 4T1 в. в. инъецировали 1×10^6 Y. enterocolitica ΔHOPEMAT Δasd+pBad-MycHisA-asd. В указанные дни после в.в. инъекции бактерий (I) опухоли отбирали, гомогенизировали, готовили серийные разведения и высевали на чашках с агаром LB, содержащих налидиксовую кислоту. Число бактерий в опухолях указано в виде колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г ткани (II). Каждая точка представляет отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия обозначает предел обнаружения.

Фиг. 15 - генетическая стабильность pYV: Стабильность нативной pYV или pYV-asd в солидных опухолях in vivo. Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы 4T1 в.в. инъецировали 1×10^7 II: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT+pYV-YopE$_{1\text{-}138}$-(BH3 tBID)$_2$, III: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT ΔhairpinI-virF+pYV-YopE$_{1\text{-}138}$-(BH3 tBID)$_2$ или IV: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT Δasd+pYV-asd-YopE$_{1\text{-}138}$-(BH3 tBID)$_2$. В день 9 после в.в. инъекции бактерий опухоли отбирали, гомогенизировали, готовили серийные разведения и высевали на чашках с агаром LB, содержащих налидиксовую кислоту. После роста на данных чашках единичные колонии от отдельных мышей переносили на чашки с агаром LB с арсенитом натрия и без него, селективные в отношении pYV. Для каждой мыши указан процент колоний, которые росли на чашках с агаром, содержащих арсенит, к числу колоний, которые росли на чашках, не содержащих арсенит (I: в виде %). 100% обозначает, что все выделенные из солидной опухоли колонии все еще содержат плазмиду pYV.

Фиг. 16 - колонизация опухоли. Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы 4T1 в.в. инъецировали 1×10^7 II: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT+pYV-YopE$_{1\text{-}138}$-(BH3 tBID)$_2$, III: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT ΔhairpinI-virF+pYV-YopE$_{1\text{-}138}$-(BH3 tBID)$_2$ или IV: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT Δasd+pYV-asd-YopE$_{1\text{-}138}$-(BH3 tBID)$_2$. В день 9 после в.в. инъекции бактерий опухоли отбирали, гомогенизировали, готовили серийные разведения и высевали на чашках с агаром LB, содержащих налидиксовую кислоту. Число бактерий в опухолях указано в виде колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г ткани (I). Каждая точка представляет отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия обозначает предел обнаружения.

Фиг. 17 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь Rig1. Доставка доменов Card Rig1 человека и мыши приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: YopE$_{1\text{-}138}$- домены Card Rig1 человека, III: YopE$_{1\text{-}138}$-домены Card Rig1 мыши. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (IV: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (V: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE (interferon-stimulated responsive element, интерферон-стимулируемый реагирующий элемент).

Фиг. 18 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь Rig1. Доставка доменов Card Rig1 человека приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: YopE$_{1\text{-}138}$-MycHis, III: YopE$_{1\text{-}138}$- домен Card Rig1 человека. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (IV: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (V: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 19 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь Rig1: положительный контроль. Положительный контроль в таком же эксперименте, как на фиг. 18, с применением ИФН гамма для стимуляции ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 стимулировали с помощью ИФН гамма мыши. К клеткам добавляли титр ИФН гамма (I: указан в Ед./мл), и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (II: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 20 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь Rig1. Доставка кодируемых pYV доменов Card Rig1 мыши приводит к индукции ИФН I типа в линии клеток рака B16F10. Клетки B16F10 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на pYV II: YopE$_{1\text{-}138}$-домены Card Rig1 мыши. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (III: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали посредством добавления супернатанта клеток к репортерной линии клеток ИФН на основании ак-

тивности секретированной щелочной фосфатазы (IV: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 21 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь Rig1. Доставка кодируемых pYV доменов Card Rig1 мыши приводит к индукции ИФН I типа в линии клеток рака 4T1. Клетки 4T1 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на pYV II: $YopE_{1-138}$-домены Card Rig1 мыши. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (III: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали посредством добавления супернатанта клеток к репортерной линии клеток ИФН на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (IV: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 22 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь STING. Доставка ферментов, образующих циклические динуклеотиды, приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$- WspR P. aeruginosa (с адаптированным доменом стебля). Титрование бактерий, добавленных к клеткам (III: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (IV: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 23 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь STING. Доставка ферментов, образующих циклические динуклеотиды, приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 оставляли необработанными (I) или инфицировали II: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде III: $YopE_{1-138}$- DncV V. cholerae, IV: $YopE_{1-138}$- DisA-подобный белок B. cereus, V: $YopE_{1-138}$-cGAS анемона или VI: $YopE_{1-138}$- MycHis. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (VII: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (VIII: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 24 - T388-зависимая секреция IRF3 в супернатант культуры. Эксперимент по секреции in vitro I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT+$YopE_{1-138}$- BH3 tBID мыши и II: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT+$YopE_{1-138}$-IRF3 Ser397Asp мыши. Содержание белка в суммарных лизатах бактерий ("A") и преципитированных супернатантах культуры ("B") анализировали с помощью вестерн-блоттинга с применением антитела против YopE. Представленные цифры указывают молекулярную массу в кДа при соответствующей высоте.

Фиг. 25 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS в иммунные клетки - путь Rig1 и STING. Доставка доменов Card Rig1 мыши и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток RAW264.7. Репортерные клетки RAW264.7 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$- DncV V. cholerae, III: $YopE_{1-138}$- DisA-подобный белок B. cereus, IV: YopE1-138- cGAS анемона или V: $YopE_{1-138}$- домены Card Rig1 мыши. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (VI: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (VII: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 26 - колонизация опухоли инъецированными в.в. штаммами Y. enterocolitica на модели аллотрансплантата рака молочной железы B16F10. Мышам C57BL/6 дикого типа с п.к. аллотрансплантатом раковых клеток меланомы B16F10 в.в. инъецировали I: ФБР, II: 1×10^7 Y. enterocolitica dHOPEMT, III: Y. enterocolitica dHOPEMT+pYV-$YopE_{1-138}$ - $CARD_{1-24}$6 RIG1 мыши или IV: Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHairpinI-VirF+pYV-$YopE_{1-138}$ - $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, когда опухоль достигала размера 100-315 $мм^3$. Число бактерий в опухолях указано в виде колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г ткани (V). Подсчет проводили в опухолях в день 5 или 8 после инфекции. Каждая точка представляет отдельную мышь. Горизонтальная пунктирная линия обозначает предел обнаружения.

Фиг. 27 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - RIG1. Доставка доменов CARD RIG1 человека и мыши приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Клетки B16F10 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-245}$ RIG1 человека, III: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, IV: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-229}$ RIG1 мыши, V: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (VI: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (VII: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 28 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - RIG1. Доставка доменов CARD RIG1 человека и мыши приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток RAW. Репортерные клетки RAW инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-245}$ RIG1 человека, III: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, IV: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-229}$ RIG1 мыши, V: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (VI: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (VII: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 29 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь MDA5. Доставка MDA5 мыши приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$-$MDA5_{1-294}$ мыши, III: $YopE_{1-138}$- $MDA5_{1-231}$ мыши. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (IV: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (V: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 30 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - MAVS. Доставка CARD MAVS приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, III: $YopE_{1-138}$-$cGAS_{161-522}$ человека, IV: $YopE_{1-138}$-$CARD_{1-100}$ MAVS человека. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (V: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (VI: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 31 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - MAVS. Доставка CARD MAVS приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток макрофагов RAW. Репортерные клетки макрофагов RAW инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, III: $YopE_{1-138}$-$CGAS_{161-522}$ человека, IV: $YopE_{1-138}$-$CARD_{1-100}$ MAVS человека. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (V: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (VI: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 32 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь STING. Доставка ферментов, образующих циклические динуклеотиды, приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$-cGAS анемона, III: $YopE_{1-138}$-$cGAS_{60-422}$ анемона, IV: $YopE_{1-138}$-$cGAS_{161-522}$ человека, V: YopE1-138-CdaAioi-273 Listeria, VI: YopE1-138- DncV V. cholerae, VII: YopE1-138-DisA-подобный белок B. cereus. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (VIII: обозначено как МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (IX: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 33 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - путь STING. Доставка ферментов, образующих циклические динуклеотиды, приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток макрофагов RAW. Репортерные клетки макрофагов RAW инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$-cGAS анемона, III: $YopE_{1-138}$-$cGAS_{60-422}$ анемона, IV: $YopE_{1-138}$-$cGAS_{161-522}$ человека, V: $YopE_{1-138}$-$CdaA_{101-273}$ Listeria, VI: $YopE_{1-138}$- DncV V. cholerae, VII: $YopE_{1-138}$-DisA-подобный белок B. cereus. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (VIII: обозначено как МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (IX: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 34 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS и сравнение с низкомолекулярными агонистами STING. Доставка ферментов, образующих циклические динуклеотиды, приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$-cGAS анемона, III:

$YopE_{1-138}$-$cGAS_{161-522}$ человека, IV: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши. Проводили титрование бактерий, добавленных к клеткам (V: указано в МЗ), и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (VI: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 35 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS и сравнение с низкомолекулярными агонистами STING. Доставка циклического динуклеотида приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток B16F10. Репортерные клетки B16F10 обрабатывали низкомолекулярным агонистом STING 2'3'-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp). Проводили титрование соединения (I: указано в микромолях), и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (II: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 36 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS и сравнение с низкомолекулярными агонистами STING. Доставка ферментов, образующих циклические динуклеотиды, приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток RAW. Репортерные клетки RAW инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде II: $YopE_{1-138}$-cGAS анемона, III: $YopE_{1-138}$-$cGAS_{161-522}$ человека, IV: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши). Проводили титрование бактерий, добавленных к клеткам (V: указано в МЗ), и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (VI: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 37 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS и сравнение с низкомолекулярными агонистами STING. Доставка циклического динуклеотида приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток RAW. Репортерные клетки RAW обрабатывали низкомолекулярным агонистом STING 2'3'-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp). Проводили титрование соединения (I: указано в микромолях), и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной щелочной фосфатазы (II: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 38 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS и доказательство зависимости от T3SS-RIG1 и MAVS. Доставка доменов CARD RIG1 или CARD MAVS, слитых с $YopE_{1-138}$, приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной линии клеток RAW, которая является строго T3SS-зависимой. Репортерные клетки RAW инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, или II: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT- yopB, или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде III: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, V: $YopE_{1-138}$-$CARD_{1-100}$ MAVS человека, или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT-yopB, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде IV: $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, VI: $YopE_{1-138}$-$CARD_{1-100}$ MAVS человека. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (VII: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности секретированной люциферазы Lucía (VIII: ОП650), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 39 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS в неочищенной смеси клеток из изолята опухоли - RIG1. Доставка доменов CARD RIG1, слитых с $YopE_{1-138}$, приводит к индукции ИФН I типа в неочищенном изоляте опухоли. Мышей Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6 умерщвляли, когда опухоль достигала объема >200 $мм^3$. Опухоли растирали, расщепляли и высевали в виде суспензии отдельных клеток на 24-луночных планшетах. Такие клетки от двух различных опухолей инфицировали I и III: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или II и IV: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (V: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали с применением ELISA для интерферона бета (VI: пикограмм/миллилитр). Пунктирные линии обозначают соответствующие необработанные опухоли, I/II и III/IV каждый представляют собой клетки, полученные из одной и той же опухоли.

Фиг. 40 - прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6. Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6 внутриопухолево инъецировали ФБР, когда опухоль достигала размера 60-130 $мм^3$. День первой внутриопухолевой инъекции ФБР обозначали как день 0, лечение проводили в д0, д1, д5, д6, д10 и д11. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (I: с дня -11 по день 80 после первой инъекции бактерий) с помощью штангенциркуля. Относительный объем опухоли (объем опухоли в соответствующий день, разделенный на объем опухоли в д0) в $мм^3$ показан в виде логарифмически (log-2) преобразованных данных (II) для каждой мыши.

Фиг. 41 - прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6. Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молоч-

ной железы EMT6 внутриопухолево инъецировали $7,5\times10^7$ Y. enterocolitica dHOPEMT, когда опухоль достигала размера 60-130 мм^3. День первой внутриопухолевой инъекции бактерий обозначали как день 0, лечение проводили в д0, д1, д5, д6, д10 и д11. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (I: с дня -11 по день 80 после первой инъекции бактерий) с помощью штангенциркуля. Относительный объем опухоли (объем опухоли в соответствующий день, разделенный на объем опухоли в д0) в мм^3 показан в виде логарифмически (log-2) преобразованных данных (II) для каждой мыши.

Фиг. 42 - прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6. Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6 внутриопухолево инъецировали $7,5\times10^7$ Y. enterocolitica dHOPEMT, кодируемого на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, когда опухоль достигала размера 60-130 мм^3. День первой внутриопухолевой инъекции бактерий обозначали как день 0, лечение проводили в д0, д1, д5, д6, д10 и д11. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (I: с дня -11 по день 80 после первой инъекции бактерий) с помощью штангенциркуля. Относительный объем опухоли (объем опухоли в соответствующий день, разделенный на объем опухоли в д0) в мм^3 показан в виде логарифмически (log-2) преобразованных данных (II) для каждой мыши.

Фиг. 43 - прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6. Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6 внутриопухолево инъецировали $7,5\times10^7$ Y. enterocolitica dHOPEMT, кодируемого на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-$cGAS_{161-522}$ человека, когда опухоль достигала размера 60-130 мм^3. День первой внутриопухолевой инъекции бактерий обозначали как день 0, лечение проводили в д0, д1, д5, д6, д10 и д11. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (I: с дня -11 по день 80 после первой инъекции бактерий) с помощью штангенциркуля. Относительный объем опухоли (объем опухоли в соответствующий день, разделенный на объем опухоли в д0) в мм^3 показан в виде логарифмически (log-2) преобразованных данных (II) для каждой мыши.

Фиг. 44 - прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с повторной антигенной стимуляцией п.к. на противоположной стороне клетками рака молочной железы EMT6 после первой полной ремиссии. Мышей Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6 лечили, как описано выше (фиг. 40-43), внутриопухолево $7,5\times10^7$ II: Y. enterocolitica dHOPEMT, кодируемого на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, III: Y. enterocolitica dHOPEMT, кодируемого на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-$cGAS_{161-522}$ человека, когда опухоль достигала размера 60-130 мм^3. День внутриопухолевой инъекции бактерий обозначали как день 0. Мышам с полной регрессией опухоли (или I: мышам, ранее не использованным в экспериментах, в качестве контроля) на противоположную сторону вводили п.к. аллотрансплантат клеток рака молочной железы EMT6. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (IV: вплоть до дня 80 после первой инъекции бактерий) с помощью штангенциркуля. Указан абсолютный объем опухоли (V) в мм^3 для каждой мыши.

Фиг. 45 - прогрессирование опухоли у мышей Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6. Мышам Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6 в.в. инъецировали I: ФБР или 5×10^6 II: Y. enterocolitica dHOPEMT, III: Y. enterocolitica dHOPEMT pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$, IV: Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHairpinI-VirF pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$, V: Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHairpinI-VirF Aasd pYV-asd-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$, когда опухоль достигала размера 80-250 мм^3. День в.в. инъекции бактерий обозначали как день 0, все мыши получали и.п. (интраперитонеально) Десферал в д-1. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (VI: с дня 0 по день 15 после первой инъекции бактерий) с помощью штангенциркуля. Указана медиана объема опухоли (VII) в мм^3.

Фиг. 46 - прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6 дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток меланомы B16F10. Мышам C57BL/6 дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток меланомы B16F10 внутриопухолево инъецировали I: ФБР или $7,5\times10^7$ II: Y. enterocolitica dHOPEMT, III: кодируемого на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, IV: Y. enterocolitica dHOPEMT, кодируемого на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-$cGAS_{161-522}$ человека, когда опухоль достигала размера 60-130 мм^3. День первой внутриопухолевой инъекции бактерий обозначали как день 0, лечение проводили в д0, д1, д2, д3, д6 и д9. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (V: дни) с помощью штангенциркуля. Указан средний объем опухоли (VI) в мм^3.

Фиг. 47 - биораспределение Y. enterocolitica подвид palearctica на модели аллотрансплантата меланомы мыши B16F10: оценка физического внешнего вида. I: Дни, II: доля мышей с оценкой, III: Y. enterocolitica MRS40 ДТ (дикого типа), IV: Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. Стрелка указывает на день в.в. инъекции 2×10^5 бактерий.

Фиг. 48 - биораспределение Y. enterocolitica подвид palearctica на модели аллотрансплантата меланомы мыши B16F10: оценка поведения. I: Дни, II: доля мышей с оценкой, III: Y. enterocolitica MRS40 ДТ, IV: Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. Стрелка указывает на день в.в. инфекции 2×10^5 бактерий.

Фиг. 49 - биораспределение Y. enterocolitica подвид palearctica на модели аллотрансплантата меланомы мыши B16F10: масса тела мышей. Массу тела мышей оценивали ежедневно после в.в. инфекции

бактерий. I: Дни, II: масса тела в граммах, III: Y. enterocolitica MRS40 ДТ, IV: Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. Стрелка указывает на день в.в. инфекции 2×10^5 бактерий.

Фиг. 50 - биораспределение Y. enterocolitica подвид palearctica на модели аллотрансплантата меланомы мыши B16F10: биораспределение Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. Подсчет в органах в указанное время оценивали с помощью гомогенизации органа, серийного разведения и подсчета образованных в результате колониеобразующих единиц (КОЕ). День в.в. инъекции бактерий обозначали как день 0, все мыши получали и.п. Десферал в д-1. I: Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T, II: КОЕ на 1 г ткани или мл крови, III: день 1, IV: день 4, V: кровь, VI: селезенка, VII: печень, VIII: легкие, IX: опухоль. * обозначает мышь, у которой отсутствовала видимая опухоль.

Фиг. 51 - биораспределение Y. enterocolitica подвид palearctica на модели аллотрансплантата меланомы мыши B16F10: биораспределение Y. enterocolitica MRS40 ДТ. Подсчет в органах в указанное время оценивали с помощью гомогенизации органа, серийного разведения и подсчета образованных в результате колониеобразующих единиц (КОЕ). День в.в. инъекции бактерий обозначали как день 0, все мыши получали и.п. Десферал в д-1.1: Y. enterocolitica MRS40 ДТ, II: КОЕ на 1 г ткани или мл крови, III: день 1, IV: день 4, V: кровь, VI: селезенка, VII: печень, VIII: легкие, IX: опухоль.

Фиг. 52 - доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS - MAVS, доставленный с помощью бактериальной T3SS, функционирует независимо от эндогенного MAVS.

Доставка CARD MAVS с помощью T3SS приводит к индукции ИФН I типа в ИФН-репортерной (люцифераза) линии клеток макрофагов RAW $MAVS^{KO}$. Репортерные клетки макрофагов RAW $MAVS^{KO}$ инфицировали I: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или II: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT-yopB, III: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-$CARD_{1-100}$ MAVS человека или IV: Y. enterocolitica ΔHOPEMAT-yopB, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-$CARD_{1-100}$ MAVS человека. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (V: указано в МЗ), проводили для каждого штамма, и стимуляцию ИФН оценивали на основании активности люциферазы (VI: ОЕЛ - относительные единицы люминесценции), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммам бактерий и их применению в способе лечения рака, например, злокачественной солидной опухоли, у субъекта.

С целью толкования настоящего описания будут применяться следующие определения, и, где это применимо, термины, используемые в единственном числе, будут также включать множественное число, и наоборот. Следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации, а не для ограничения.

Термин "грамотрицательный штамм бактерий" в настоящем документе включает следующие бактерии:

Aeromonas salmonicida, Aeromonas hydrophila, Aeromonas veronii, Anaeromyxobacter dehalogenans, Bordetella bronchiseptica, Bordetella parapertussis, Bordetella pertussis, Bradyrhizobium japonicum, Burkholderia cenocepacia, Burkholderia cepacia, Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei, Chlamydia muridarum, Chlamydia trachmoatis, Chlamydophila abortus, Chlamydophila pneumoniae, Chromobacterium violaceum, Citrobacter rodentium, Desulfovibrio vulgaris, Edwardsiella tarda, Endozoicomonas elysicola, Erwinia amylovora, Escherichia albertii, Escherichia coli, Lawsonia intracellularis, Mesorhizobium loti, Myxococcus xanthus, Pantoea agglomerans, Photobacterium damselae, Photorhabdus luminescens, Photorabdus temperate, Pseudoalteromonas spongiae, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas plecoglossicida, Pseudomonas syringae, Ralstonia solanacearum, Rhizobium sp, Salmonella enterica и другие *Salmonella sp*, *Shigella flexneri* и другие *Shigella sp*, *Sodalis glossinidius, Vibrio alginolyticus, Vibrio azureus, Vibrio campellii, Vibrio caribbenthicus, Vibrio harvey, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio tasmaniensis, Vibrio tubiashii, Xanthomonas axonopodis, Xanthomonas campestris, Xanthomonas oryzae, Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis*.

Предпочтительными грамотрицательными штаммами бактерий согласно настоящему изобретению являются грамотрицательные штаммы бактерий, которые относятся к семействам Enterobacteriaceae и

Pseudomonadaceae. Грамотрицательный штамм бактерий согласно настоящему изобретению обычно используют для доставки гетерологичных белков с помощью бактериальной T3SS в эукариотические клетки in vitro и/или in vivo, предпочтительно, in vivo.

Термин "рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий" в настоящем документе обозначает рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, генетически трансформированный нуклеотидной молекулой, такой как вектор. Вирулентность такого рекомбинантного грамотрицательного штамма бактерий обычно аттенуирована в результате делеции бактериальных эффекторных белков, обладающих вирулентной активностью, которые транспортируются одним или несколькими бактериальными белками, которые являются частью аппарата системы секреции. Такие эффекторные белки доставляются аппаратом системы секреции в клетки-хозяева, в которых они проявляют свою вирулентную активность в отношении различных белков хозяина и механизмов клетки. Известно множество различных эффекторных белков, которые транспортируются различными типами систем секреции и демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей, модулирующих функции регуляторных молекул хозяина. Вирулентность рекомбинантного грамотрицательного штамма бактерий в настоящем документе может быть дополнительно аттенуирована вследствие отсутствия сидерофора, в норме или иногда продуцируемого грамотрицательным штаммом бактерий, в результате чего штамм не продуцирует сидерофор, например, является дефицитным по продукции сидерофора. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации применяют рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, в котором отсутствует сидерофор, в норме или иногда продуцируемый грамотрицательным штаммом бактерий, в результате чего штамм не продуцирует сидерофор, например, является дефицитным по продукции сидерофора, более предпочтительно, применяют штамм Yersinia, в частности, Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHairpinI-virF или Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd, с отсутствием сидерофора, в норме или иногда продуцируемого грамотрицательным штаммом бактерий, в результате чего штамм не продуцирует сидерофор, например, является дефицитным по продукции сидерофора, в частности, является дефицитным по продукции иерсиниябактина. Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, который является дефицитным по продукции иерсиниябактина, был описан в публикации WO02077249 и был депонирован 24-го сентября 2001 г. согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в бельгийских Согласованных коллекциях микроорганизмов (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, BCCM); данному штамму был присвоен учетный номер LMG P-21013. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, предпочтительно, не продуцирует по меньшей мере один, предпочтительно, по меньшей мере два сидерофора, например, является дефицитным по продукции по меньшей мере одного, предпочтительно, по меньшей мере двух сидерофоров, более предпочтительно, рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий не продуцирует ни одного сидерофора.

Термины "сидерофор", "сидерофор железа" или "хелатор железа", которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо, обозначают соединения с высокой аффинностью к железу, например, малые соединения с высокой аффинностью к железу.

Сидерофоры грамотрицательных бактерий представляют собой, например, энтеробактин и дигидроксибензоилсерин, синтезируемые Salmonella, Escherichia, Klebsiella, Shigella, Serratia (но используемые всеми энтеробактериями), пиовердины, синтезируемые Pseudomonas, вибриобактин, синтезируемый Vibrio, ацинетобактин и ацинетоферрин, синтезируемые Acinetobacter, иерсиниябактин и аэробактин, синтезируемые Yersinia, орнибактин, синтезируемый Burkholderia, сальмохелин, синтезируемый Salmonella, аэробактин, синтезируемый Escherichia, Shigella, Salmonella и Yersinia, алкалигин, синтезируемый Bordetella, бизукаберин, синтезируемый Vibrio.

Сидерофоры включают гидроксамат, катехолат и сидерофоры со смешанными лигандами. На сегодняшний день несколько сидерофоров были одобрены для применения у людей, а именно для лечения перенасыщения железом. Предпочтительными сидерофорами являются дефероксамин (также известный как десферриоксамин B, десфероксамин B, DFO-B, DFOA, DFB или Десферал), десферриоксамин E, деферазирокс (Эксиджад, Десирокс, Дефриджет, Десифер) и деферипрон (Феррипрокс).

Термин "эндогенный белок, необходимый для роста", в настоящем документе обозначает белки рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, без которых грамотрицательный штамм бактерий не может расти. Эндогенные белки, необходимые для роста, представляют собой, например, фермент, необходимый для продукции аминокислоты, фермент, участвующий в биосинтезе пептидогликана, фермент, участвующий в биосинтезе ЛПС (липополисахарида), фермент, участвующий в синтезе нуклеотида, или фактор инициации трансляции.

Термин "фермент, необходимый для продукции аминокислоты", в настоящем документе обозначает ферменты, которые связаны с продукцией аминокислоты рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий и без которых грамотрицательный штамм бактерий не может расти. Ферменты, необходимые для продукции аминокислоты, представляют собой, например,

аспартат-бета-полуальдегид-дегидрогеназу (asd), глутаминсинтетазу (glnA), триптофанил-тРНК-синтетазу (trpS) или серин-гидроксиметил-трансферазу (glyA), или транскетолазу 1 (tktA), транскетолазу 2 (tktB), рибулозофосфат 3-эпимеразу (rpe), рибозо-5-фосфат-изомеразу A (rpiA), трансальдолазу A (talA), трансальдолазу B (talB), фосфорибозилпирофосфатсинтазу (prs), АТФ-фосфорибозилтрансферазу (hisG), бифункциональный белок биосинтеза гистидина HisIE (hisI), 1-(5-фосфорибозил)-5-[(5-фосфорибозиламино)метилиденамино]имидазол-4-карбоксамидизомеразу (hisA), субъединицу HisH имидазолглицеролфосфатсинтазы (hisH), субъединицу HisF имидазолглицеролфосфатсинтазы (hisF), бифункциональный белок биосинтеза гистидина HisB (hisB), гистидинолфосфат-аминотрансферазу (hisC), гистидинолдегидрогеназу (hisD), 3-дегидрохинатсинтазу (aroB), 3-дегидрохинатдегидратазу (aroD), шикиматдегидрогеназу (NADP(+)) (aroE), шикиматкиназу 2 (aroL), шикиматкиназу 1 (aroK), 3-фосфошикимат 1-карбоксивинилтрансферазу (агоА), хоризматсинтазу (агоС), P-белок (pheA), T-белок (tyrA), аминотрансферазу ароматических аминокислот (tyrB), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатальдолазу (aroG), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатальдолазу (aroH), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатальдолазу (aroF), хинат/шикимат-дегидрогеназу (ydiB), АТФ-зависимый изофермент 6-фосфофруктокиназы 1 (pfkA), АТФ-зависимый изофермент 6-фосфофруктокиназы 2 (pfkB), фруктозо-бисфосфатальдолазу класса 2 (fbaA), фруктозо-бисфосфатальдолазу класса 1 (fbaB), триозофосфат-изомеразу (tpiA), пируваткиназу I (pykF), пируваткиназу II (pykA), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу A (gapA), фосфоглицераткиназу (pgk), 2,3-бисфосфоглицерат-зависимую фосфоглицератмутазу (gpmA), 2,3-бисфосфоглицерат-независимую фосфоглицератмутазу (gpmM/yibO), предполагаемую фосфоглицератмутазу (ytjC/gpmB), енолазу (eno), D-3-фосфоглицератдегидрогеназу (serA), фосфосеринаминотрансферазу (serC), фосфосеринфосфатазу (serB), L-сериндегидратазу I (sdaA), L-сериндегидратазу 2 (sdaB), L-треониндегидратазу каталолическую (tdcB), L-треониндегидратазу биосинтетическую (ilvA), L-сериндегидратазу (tdcG), серинацетилтрансферазу (cysE), цистеинсинтазу A (cysK), цистеинсинтазу B (cysM), бета-цистатионазу (malY), цистатионин бета-лиазу (metC), 5-метилтетрагидроптероилтриглутамат-гомоцистеин-метилтрансферазу (metE), метионинсинтазу (metH), S-аденозилметионинсинтазу (metK), цистатионин гамма-синтазу (metB), гомосерин O-сукцинилтрансферазу (metA), 5'-метилтиоаденозин/S-аденозилгомоцистеин-нуклеозидазу (mtnN), S-рибозилгомоцистеинлиазу (luxS), цистатион бета-лиазу, цистатион гамма-лиазу, серин-гидроксиметилтрансферазу (glyA), глицин-гидроксиметилтрансферазу (itaE), малую субъединицу 3-изопропилмалатдегидратазы (leuD), большую субъединицу 3-изопропилмалатдегидратазы (leuC), 3-изопропилмалатдегидрогеназу (leuB), L-треониндегидратазу биосинтетическую (ilvA), большую субъединицу изофермента 3 ацетолактатсинтазы (ilvI), малую субъединицу изофермента 3 ацетолактатсинтазы (ilvH), малую субъединицу изофермента 1 ацетолактатсинтазы (ilvN), малую субъединицу изофермента 2 ацетолактатсинтазы (ilvM), кетол-кислотную редуктоизомеразу (NADP(+)) (ilvC), дегидратазу дигидроксикислоты (ilvD), аминотрансферазу аминокислот с разветвленной цепью (ilvE), бифункциональную дегидрогеназу аспартокиназы/гомосерина 1 (thrA), бифункциональную дегидрогеназу аспартокиназы/гомосерина 2 (metL), 2-изопропилмалатсинтазу (leuA), глутамат-пируват-аминотрансферазу (alaA), аспартат-аминотрансферазу (aspC), бифункциональную дегидрогеназу аспартокиназы/гомосерина 1 (thrA), бифункциональную дегидрогеназу аспартокиназы/гомосерина 2 (metL), лизин-чувствительную аспартокиназу 3 (lysC), аспартат-полуальдегид-дегидрогеназу (asd), 2-кето-3-дезокси-галактонат-альдолазу (yagE), 4-гидрокси-тетрагидродипиколинат-синтазу (dapA), 4-гидрокси-тетрагидродипиколинат-редуктазу (dapB), 2,3,4,5-тетрагидропиридин-2,6-дикарбоксилат N-сукцинилтрансферазу (dapD), сукцинил-диаминопимелат-десукцинилазу (dapE), диаминопимелат-эпимеразу (dapF), предполагаемую лиазу (yjhH), ацетилорнитин/сукцинил-диаминопимелат-аминотрансферазу (argD), цитратсинтазу (gltA), аконитатгидратазу B (acnB), аконитатгидратазу A (acnA), неохарактеризованную предполагаемую аконитатгидратазу (ybhJ), изоцитратдегидрогеназу (icd), аспартат-аминотрансферазу (aspC), глутамат-пируват-аминотрансферазу (alaA), большую цепь глутаматсинтазы [NADPH] (gltB), малую цепь глутаматсинтазы [NADPH] (gltD), глутаминсинтетазу (glnA), ацетилтрансферазу аминокислот (argA), ацетилглутаматкиназу (argB), N-ацетил-гамма-глутамилфосфат-редуктазу (argC), ацетилорнитин/сукцинилдиаминопимелат-аминотрансферазу (argD), ацетилорнитин-деацетилазу (argE), цепь F орнитинкарбамоилтрансферазы (argF), цепь I орнитинкарбамоилтрансферазы (argI), аргининосукцинатсинтазу (argG), аргининосукцинатлиазу (argH), глутамат 5-киназу (proB), гамма-глутамилфосфатредуктазу (proA), пирролин-5-карбоксилатредуктазу (proC), орнитинциклодеаминазу, лейцин-тРНК лигазу (leuS), глутамин-тРНК лигазу (glnS), серин-тРНК лигазу (serS), бета-субъединицу глицин-тРНК лигазы (glyS), альфа-субъединицу глицин-тРНК лигазы (glyQ), тирозин-тРНК лигазу (tyrS), треонин-тРНК лигазу (thrS), альфа-субъединицу фенилаланин-тРНК лигазы (pheS), бета-субъединицу фенилаланин-тРНК лигазы (pheT), аргинин-тРНК лигазу (argS), гистидин-тРНК лигазу (hisS), валин-тРНК лигазу (valS), аланин-тРНК лигазу (alaS), изолейцин-тРНК лигазу (ileS), пролин-тРНК лигазу (proS), цистеин-тРНК лигазу (cysS), аспарагин-тРНК лигазу (asnS), аспартат-тРНК лигазу (aspS), глутамат-тРНК лигазу (gltX), триптофан-тРНК лигазу (trpS), бета-субъединицу глицин-тРНК лигазы (glyS), метионин-тРНК лигазу (metG), лизин-тРНК лигазу (lysS). Предпочтительные ферменты, необходимые для продукции аминокислоты, представляют собой

tktA, rpe, prs, aroK, tyrB, aroH, fbaA, gapA,

pgk, eno, tdcG, cysE, metK, glyA, asd, dapA/B/D/E/F, argC, proC, leuS, glnS, serS,

glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS, proS, cysS, asnS, aspS, gltX,

trpS, glyS, metG, lysS,

более предпочтительные ферменты представляют собой

asd, glyA, leuS, glnS, serS, glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS,

proS, cysS, asnS, aspS, gltX, trpS, glyS, metG, lysS,

наиболее предпочтительный фермент представляет собой asd.

Термины "грамотрицательный штамм бактерий, дефицитный по продукции аминокислоты, необходимой для роста", и "ауксотрофный мутант" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают грамотрицательные штаммы бактерий, которые не могут расти при отсутствии по меньшей мере одной обеспечиваемой экзогенно незаменимой аминокислоты или ее предшественника. Аминокислота, по продукции которой штамм является дефицитным, представляет собой, например, аспартат, мезо-2,6-диаминопимелиновую кислоту, ароматические аминокислоты или лейцин-аргинин. Такой штамм может быть получен, например, в результате делеции гена аспартат-бета-полуальдегид-дегидрогеназы (Δasd). Такой ауксотрофный мутант не может расти при отсутствии экзогенной мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты. Мутация, например, делеция гена аспартат-бета-полуальдегид-дегидрогеназы, является в настоящем документе предпочтительной для грамотрицательного штамма бактерий, дефицитного по продукции аминокислоты, необходимой для роста, согласно настоящему изобретению.

Термин "грамотрицательный штамм бактерий, дефицитный по продукции белков адгезии, связывающихся с поверхностью эукариотической клетки или внеклеточным матриксом", обозначает мутантные грамотрицательные штаммы бактерий, которые не экспрессируют по меньшей мере один белок адгезии по сравнению с белками адгезии, экспрессируемыми соответствующим штаммом дикого типа. Белки адгезии могут включать, например, протяженные полимерные молекулы адгезии, такие как пили/фимбрии, или нефимбриальные адгезины. Фимбриальные адгезины включают пили 1 типа (такие как Fim-пили E. coli с адгезином FimH), P-пили (такие как Pap-пили с адгезином PapG из E. colt), пили 4 типа (такие как белок пилин, например, из P. aeruginosa) или карлин (белки Csg с адгезином CsgA из S. enterica). Нефимбриальные адгезины включают тримерные адгезины-аутотранспортеры, такие как YadA из Y. enterocolitica, BpaA (B. pseudomallei), Hia (H. influenzae), BadA (B. henselae), NadA (N. meningitidis) или UspA1 (M. catarrhalis), а также другие адгезины-аутотранспортеры, такие как AIDA-1 (E. coli), а также другие адгезины/инвазины, такие как InvA из Y. enterocolitica или интимин (E. coli), либо члены семейства Dr или семейства Afa (E. coli). Термины YadA и InvA в настоящем документе обозначают белки из Y. enterocolitica. Аутотранспортер YadA[7] связывается с различными формами коллагена, а также фибронектина, в то время как инвазин InvA[8] связывается с β-интегринами в мембране эукариотической клетки. Если грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Y. enterocolitica, штамм, предпочтительно, является дефицитным по InvA и/или YadA.

В настоящем документе термин "семейство Enterobacteriaceae" включает семейство грамотрицательных палочкообразных факультативно анаэробных бактерий, обнаруживаемых в почве, воде, растениях и животных, которые часто присутствуют у позвоночных в качестве патогенов. Бактерии данного семейства характеризуются подобной физиологией и демонстрируют консервативность функциональных элементов и генов соответствующих геномов. Также, будучи оксидаза-отрицательными, все члены данного семейства сбраживают глюкозу, и большинство из них являются нитратвосстанавливающими. Бактерии Enterobacteriaceae согласно настоящему изобретению могут представлять собой любую бактерию из данного семейства и конкретно включают, без ограничения, бактерии следующих родов:

Escherichia, Shigella,

Edwardsiella, Salmonella, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus,

Erwinia, Morganella, Providencia или *Yersinia*.

В более конкретных вариантах реализации бактерия относится к виду *Escherichia coli, Escherichia blattae, Escherichia fergusonii, Escherichia hermanii, Escherichia vuneris, Salmonella enterica, Salmonella bongori, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella sonnei, Enterobacter aerogenes, Enterobacter gergoviae, Enterobacter sakazakii, Enterobacter cloacae, Enterobacter agglomerans, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Serratia marcescens, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia pestis, Yersinia enterocolitica, Erwinia amylovora, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Proteus penneri, Proteus hauseri, Providencia alcalifaciens* или *Morganella morganii*.

Предпочтительно, грамотрицательный штамм бактерий выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia, Escherichia, Salmonella, Shigella, Pseudomonas, Chlamydia, Erwinia, Pantoea, Vibrio, Burkholderia, Ralstonia, Xanthomonas, Chromobacterium, Sodalis, Citrobacter, Edwardsiella, Rhizobiae, Aeromonas, Photorhabdus, Bordetella* и *Desulfovibrio*,

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

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

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

"Промотор" в настоящем документе обозначает последовательность нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию единицы транскрипции.

"Область промотора" представляет собой регуляторную область, способную связываться с РНК-полимеразой в клетке и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности, находящейся ниже по течению (в направлении 3'). В области промотора находится сайт инициации транскрипции (который обычно определяют посредством картирования с помощью нуклеазы S1), а также белок-связывающие домены (консенсусные последовательности), отвечающие за связывание РНК-полимеразы, такие как предполагаемая область -35 и бокс Прибнова. Термин "функционально связанный" при описании взаимодействия между двумя нуклеотидами, например, участками ДНК, обозначает ничто иное как то, что данные участки функционально связаны друг с другом и расположены на одном и том же фрагменте нуклеиновой кислоты. Промотор функционально связан со структурным геном, если он контролирует транскрипцию гена и расположен на том же фрагменте нуклеиновой кислоты, что и ген. Обычно промотор является функциональным в указанном грамотрицательном штамме бактерий, т.е. промотор способен экспрессировать слитый белок согласно настоящему изобретению, т.е. промотор способен экспрессировать слитый белок согласно настоящему изобретению без дополнительного применения генетической инженерии или экспрессии дополнительных белков. Более того, функциональный промотор в природе не должен быть контррегулируемым применительно к бактериальной T3SS.

Термин "внехромосомный генетический элемент" в настоящем документе обозначает генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся эндогенно в грамотрицательном штамме бактерий согласно настоящему изобретению, такой как плазмида вирулентности, или который представляет собой экзогенный генетический элемент, которым трансформирован грамотрицательный штамм бактерий и который временно или стабильно интегрирован в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся эндогенно, такой как плазмида вирулентности. Такой внехромосомный генетический элемент может представлять собой вектор, такой как вектор экспрессии, вектор для гомологичной рекомбинации или другого типа интеграции в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся эндогенно, такой как плазмида вирулентности, фрагменты ДНК для гомологичной рекомбинации или другого типа интеграции в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся эндогенно, такой как плазмида вирулентности или элемент РНК, направляющий сайт-специфическую вставку в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся эндогенно, такой как плазмида вирулентности, такая как CRISPR/Cas9, и связанная направляющая РНК.

Термин "термочувствительная область РНК" в настоящем документе обозначает чувствительную к температуре некодирующую последовательность РНК, которая регулирует экспрессию связанных генов. Обычно термочувствительные области РНК функционируют посредством образования вторичной структуры, такой как шпилечная петля РНК, которая стабильно образуется при репрессивной температуре и является нестабильной при пермиссивной температуре и которая маскирует последовательность РНК,

необходимую для трансляции, такую как участок связывания рибосомы, таким образом, регулируя экспрессию гена, связанного с такой последовательностью РНК, необходимой для трансляции.

Термин "шпилечная структура РНК или ее части" в настоящем документе обозначает вторичную структуру РНК, образованную в результате внутримолекулярного спаривания оснований, которое приводит к образованию структуры "петля на стебле". Внутримолекулярное спаривание оснований, обычно в пределах одной цепи РНК, происходит благодаря комплементарным нуклеотидным последовательностям или их частям.

Термин "ДНК-связывающий белок типа AraC", также обозначаемый как семейство AraC/XylS, в настоящем документе обозначает бактериальные белки регуляции транскрипции, которые связываются с ДНК посредством мотива спираль-петля-спираль. Большинство членов ДНК-связывающих белков типа AraC являются положительными регуляторами транскрипции и могут характеризоваться минимальным ДНК-связывающим доменом, охватывающим фрагмент размером более 100 остатков, содержащим два субдомена спираль-петля-спираль. ДНК-связывающие белки типа AraC конкретно включают, без ограничения: VirF, LcrF, YbtA, Rns, MxiE, AraC, XylS, ExsA, PerA, MmsR, RhaS, TcpN, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD, MarA, CafR, FapR и InvF. Предпочтительными являются ДНК-связывающие белки типа AraC, участвующие в регуляции механизмов, связанных с вирулентностью, такие как VirF, LcrF, YbtA, Rns, MxiE, ExsA, PerA, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD, TcpN, CafR, FapR и InvF. Более предпочтительными являются ДНК-связывающие белки типа AraC, участвующие в регуляции активности системы секреции третьего типа, такие как VirF, LcrF, MxiE, ExsA, PerA, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD и InvF, наиболее предпочтительными являются VirF и/или LcrF.

Термин "доставка" в настоящем документе обозначает транспортирование белка из рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий в эукариотическую клетку, включая этапы экспрессии гетерологичного белка в рекомбинантном аттенуированном по вирулентности грамотрицательном штамме бактерий, секрецию экспрессированного белка или белков из такого рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий и транслокацию секретированного белка или белков таким рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий в цитозоль эукариотической клетки. Соответственно, термины "сигнал доставки" или "сигнал секреции", которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо, обозначают полипептидную последовательность, которая может распознаваться системой секреции и транслокации грамотрицательного штамма бактерий и направляет доставку белка из грамотрицательного штамма бактерий в эукариотические клетки.

Термин "сигнал доставки из бактериального эффекторного белка" в настоящем документе обозначает сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функциональный в рекомбинантном грамотрицательном штамме бактерий, т.е. который обеспечивает секрецию экспрессированного в рекомбинантном грамотрицательном штамме бактерий гетерологичного белка из такого рекомбинантного грамотрицательного штамма бактерий с помощью системы секреции, такой как система секреции III типа, IV типа или VI типа, или транслокацию экспрессированного в рекомбинантном грамотрицательном штамме бактерий гетерологичного белка таким рекомбинантным грамотрицательным штаммом бактерий в цитозоль эукариотической клетки с помощью системы секреции, такой как система секреции III типа, IV типа или VI типа. Термин "сигнал доставки из бактериального эффекторного белка" в настоящем документе также включает фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, т.е. более короткие версии сигнала доставки, например, сигнал доставки, содержащий до 10, предпочтительно, до 20, более предпочтительно, до 50, еще более предпочтительно, до 100, в частности, до 140 аминокислот сигнала доставки, например, встречающегося в природе сигнала доставки. Таким образом, нуклеотидная последовательность, такая как, например, последовательность ДНК, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, может кодировать полноразмерный сигнал доставки или его фрагмент, причем фрагмент обычно содержит до 30, предпочтительно, до 60, более предпочтительно, до 150, еще более предпочтительно, до 300, в частности, до 420 нуклеиновых кислот.

В настоящем документе "секреция" белка обозначает транспортирование гетерологичного белка наружу через мембрану клетки рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий. "Транслокация" белка обозначает транспортирование гетерологичного белка из рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий через плазматическую мембрану эукариотической клетки в цитозоль такой эукариотической клетки.

Термин "бактериальный белок, который является частью аппарата системы секреции", в настоящем документе обозначает бактериальные белки, образующие важные компоненты бактериальной системы секреции 3 типа (T3SS), системы секреции 4 типа (T4SS) и системы секреции 6 типа (T6SS), предпочтительно, T3SS. Без таких белков соответствующая система секреции является нефункциональной при транслокации белков в клетки-хозяева, даже если все другие компоненты системы секреции и бактериальный эффекторный белок, подлежащий транслокации, все еще кодируются и продуцируются.

Термин "бактериальный эффекторный белок" в настоящем документе обозначает бактериальные белки, транспортируемые системами секреции, например, бактериальными белками, которые являются частью аппарата системы секреции, в клетки-хозяева. Такие эффекторные белки доставляются посредст-

вом системы секреции в клетку-хозяин, в которой они проявляют, например, вирулентную активность в отношении различных белков хозяина и аппаратов клетки. Известно множество различных эффекторных белков, которые транспортируются различными типами систем секреции и демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей, модулирующих функции регуляторных молекул хозяина. Системы секреции включают систему секреции 3 типа (T3SS), систему секреции 4 типа (T4SS) и систему секреции 6 типа (T6SS). Некоторые эффекторные белки (такие как IpaC Shigella flexneri) также относятся к классу бактериальных белков, которые являются частью аппарата системы секреции и обеспечивают транслокацию белка. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий в настоящем документе обычно содержит бактериальные белки, образующие необходимые компоненты бактериальной системы секреции 3 типа (T3SS), системы секреции 4 типа (T4SS) и/или системы секреции 6 типа (T6SS), предпочтительно, системы секреции 3 типа (T3SS). Термин "бактериальные белки, образующие необходимые компоненты бактериальной T3SS", в настоящем документе обозначает белки, которые в природе образуют инжектисому, например, инжекционную иглу, или которые иным способом являются необходимыми для ее функционирования при транслокации белков в эукариотические клетки. Белки, образующие инжектисому или иным способом являющиеся необходимыми для ее функционирования при транслокации белков в эукариотические клетки, включают, без ограничения:

SctC, YscC, MxiD, InvG, SsaC, EscC, HrcC, HrcC (секретин), SctD, YscD, MxiG, Prg, SsaD, EscD, HrpQ, HrpW, FliG (внешний белок M-кольца), SctJ, YscJ, MxiJ, PrgK, SsaJ, EscJ, HrcJ, HrcJ, FliF (внутренний белок M-кольца), SctR, YscR, Spa24, SpaP, SpaP, SsaR, EscR, HrcR, HrcR, FliP (малый белок аппарата экспорта), SctS, YscS, Spa9 (SpaQ), SpaQ, SsaS, EscS, HrcS, HrcS, FliQ (малый белок аппарата экспорта), SctT, YscT, Spa29 (SpaR), SpaR, SsaT, EscT, HrcT, HrcT, FliR (малый белок аппарата экспорта), SctU, YscU, Spa40, SpaS, SpaS, SsaU, EscU, HrcU, HrcU, FlhB (белок-переключатель аппарата экспорта), SctV, YscV, MxiA, InvA, SsaV, EscV, HrcV, HrcV, FlhA (большой белок аппарата экспорта), SctK, YscK, MxiK, OrgA, HrpD (вспомогательный цитозольный белок), SctQ, YscQ, Spa33, SpaO, SpaO, SsaQ, EscQ, HrcQA+B, HrcQ, FliM + FliN (белок C-кольца), SctL, YscL, MxiN, OrgB, SsaK, EscL, Orf5, HrpE, HrpF, FliH (статор), SctN, YscN, Spa47, SpaL, InvC, SsaN, EscN, HrcN, HrcN, FliI (АТФаза), SctO, YscO, Spa13, SpaM, InvI, SsaO, Orf15, HrpO, HrpD, FliJ (Stalk), SctF, YscF, MxiH, PrgI, SsaG, EscF, HrpA, HrpY (белок филамента иглы), SctI, YscI, MxiI, PrgJ, SsaI, EscI, rOrf8, HrpB, HrpJ, (внутренний белок палочки), SctP, YscP, Spa32, SpaN, InvJ, SsaP, EscP, Orf16, HrpP, HpaP, FliK (регулятор длины иглы), LcrV, IpaD, SipD (гидрофильный транслокатор, белок конца иглы), YopB, IpaB, SipB, SseC, EspD, HrpK, PopF1, PopF2 (гидрофобный транслокатор, поровый белок), YopD, IpaC, SipC, SseD, EspB (гидрофобный транслокатор, поровый белок), YscW, MxiM, InvH (пилотин), SctW, YopN, MxiC, InvE, SsaL, SepL, HrpJ, HpaA (привратник).

Термин "эффекторный белок T6SS" или "бактериальный эффекторный белок T6SS" в настоящем документе обозначает белки, которые в природе инжектируются системами T6S в цитозоль эукариотических клеток или бактерий, и белки, которые в природе секретируются системами T6S, которые могут, например, образовывать транслокационные поры в эукариотической мембране. Термин "эффекторный белок T4SS" или "бактериальный эффекторный белок T4SS" в настоящем документе обозначает белки, которые в природе инжектируются системами T4S в цитозоль эукариотических клеток, и белки, которые в природе секретируются системами T4S, которые могут, например, образовывать транслокационную пору в эукариотической мембране. Термин "эффекторный белок T3SS" или "бактериальный эффекторный белок T3SS" в настоящем документе обозначает белки, которые в природе инжектируются системами T3S в цитозоль эукариотических клеток, и белки, которые в природе секретируются системами T3S, которые могут, например, образовывать транслокационную пору в эукариотической мембране (включая порообразующие транслокаторы (такие как YopB и YopD Yersinia) и белки конца иглы, такие как LcrV Yersinia). Предпочтительно, применяют белки, которые в природе инжектируются системами T3S в цитозоль эукариотических клеток. Данные факторы вирулентности парализуют или перепрограммируют эукариотическую клетку с пользой для патогена. Эффекторы T3S демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей, модулируют функцию критических регуляторных молекул хозяина и включают

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

Термин "рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, накапливающийся в злокачественной солидной опухоли", или "рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий накапливается в злокачественной солидной опухоли" в настоящем документе обозначает рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, который реплицируется в злокачественной солидной опухоли, посредством этого увеличивая число бактерий данного рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий внутри злокачественной солидной опухоли. Неожиданно было обнаружено, что рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий после введения субъекту накапливается специфично в злокачественной солидной опухоли, т.е. накапливается специфично в органе, в котором присутствует злокачественная опухоль, причем число бактерий рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий в органах, в которых не присутствует злокачественная солидная опухоль, является низким или не обнаруживаемым.

В случае внеклеточного обитания бактерий, таких как Yersinia, бактерии преимущественно накапливаются в межклеточном пространстве, образованном между опухолевыми клетками. Внутриклеточно растущие бактерии, такие как Salmonella, преимущественно оккупируют опухолевые клетки и будут обитать внутри таких клеток, хотя также может наблюдаться внеклеточное накопление. Число бактерий рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, накопленное внутри злокачественной солидной опухоли, может находиться, например, в диапазоне от 10^4 до 10^9 бактерий на 1 г опухолевой ткани.

Термин "рак" в настоящем документе обозначает заболевание, при котором абнормальные клетки делятся без контроля и могут инвазировать прилежащие ткани. Раковые клетки могут также распространяться в другие части тела через кровеносную и лимфатическую системы. Существует несколько основных типов рака. Карцинома представляет собой рак, который возникает в коже или тканях, выстилающих или покрывающих внутренние органы. Саркома представляет собой рак, который возникает в кости, суставе, жире, мышцах, кровеносных сосудах или другой соединительной или поддерживающей ткани. Лейкоз представляет собой рак, который возникает в кровообразующей ткани, такой как костный мозг, и вызывает образование и поступление в кровь большого количества абнормальных кровяных клеток. Лимфома и множественная миелома представляют собой типы рака, которые возникают в клетках иммунной системы. Типы рака центральной нервной системы представляют собой типы рака, которые возникают в тканях головного мозга и спинного мозга. Термин "рак" в настоящем документе включает солидные опухоли, т.е. злокачественные солидные опухоли, такие как, например, саркомы, карциномы и лимфомы, и несолидные опухоли, такие как, например, лейкозы (типы рака крови). Злокачественные солидные опухоли являются предпочтительными. Термин "злокачественная солидная опухоль" или "признак злокачественной солидной опухоли" в настоящем документе обозначает абнормальную массу ткани, которая обычно не содержит кисты или жидкие области. Солидные опухоли могут являться доброкачественными (нераковыми) или злокачественными (раковыми). Злокачественные солидные опухоли лечат способами согласно настоящему изобретению. Различные типы злокачественных солидных опухолей называют по типу клеток, которые их образуют. Примерами злокачественных солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы (рак крови) обычно не образуют злокачественные солидные опухоли (определение согласно Национальному институту рака Национального центра здоровья США). Злокачественные солидные опухоли включают, без ограничения, абнормальную массу клеток, которые могут происходить из различных типов тканей, таких как печень, толстая кишка, ободочная и прямая кишка, кожа, молочная железа, поджелудочная железа, шейка матки, тело матки, мочевой пузырь, желчный пузырь, почки, гортань, губа, полость рта, пищевод, яичник, предстательная железа, же-

лудок, яички, щитовидная железа или легкие и, таким образом, включают злокачественные солидные опухоли печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишок, кожи, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почек, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной железы, желудка, яичек, щитовидной железы или легких. Предпочтительными злокачественными солидными опухолями, которые можно лечить способами согласно настоящему изобретению, являются злокачественные солидные опухоли, которые происходят из кожи, молочной железы, печени, поджелудочной железы, мочевого пузыря, предстательной железы и толстой кишки и, таким образом, включают злокачественные солидные опухоли кожи, молочной железы, печени, поджелудочной железы, мочевого пузыря, предстательной железы и толстой кишки. В равной степени предпочтительными злокачественными солидными опухолями, которые можно лечить способами согласно настоящему изобретению, являются злокачественные солидные опухоли, связанные с раком печени, такие как гепатоклеточная карцинома.

Термин "бактериальный эффекторный белок, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток", в настоящем документе обозначает бактериальные эффекторные белки, которые транспортируются системами секреции в клетки-хозяева, в которых они проявляют свою вирулентную активность в отношении различных белков и клеточных аппаратов хозяина. Известно множество различных эффекторных белков, которые транспортируются различными типами систем секреции и демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей, модулирующих функции регуляторных молекул хозяина. Системы секреции включают систему секреции 3 типа (T3SS), систему секреции 4 типа (T4SS) и систему секреции 6 типа (T6SS). Важно отметить, что некоторые эффекторные белки, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток (такие как IpaC Shigella flexneri), также относятся к классу бактериальных белков, которые являются частью аппарата системы секреции. В случае если бактериальный эффекторный белок, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток, также является необходимым для функционирования аппарата секреции, такой белок исключают из данного определения. Эффекторные белки T3SS, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток, обозначают белки, такие как

YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT *Y. enterocolitica,*

или OspF, IpgD, IpgB1 *Shigella flexneri,* или SopE, SopB, SptP *Salmonella enterica,*

или ExoS, ExoT, ExoU, ExoY *P. aeruginosa,* или Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ

E. coli.

Эффекторные белки T4SS, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток, обозначают белки, такие как

LidA, SidC, SidG, SidH,

SdhA, SidJ, SdjA, SdeA, SdeA, SdeC, LepA, LepB, WipA, WipB, YlfA, YlfB, VipA,

VipF, VipD, VpdA, VpdB, DrrA, LegL3, LegL5, LegL7, LegLC4, LegLC8, LegC5,

LegG2, Ceg10, Ceg23, Ceg29 *Legionella pneumophila,* или BepA, BepB, BepC,

BepD, BepE, BepF BepG *Bartonella henselae,* или VirD2, VirE2, VirE3, VirF

Agrobacterium tumefaciens, или CagA *H. Pylori,* или коклюшный токсин *Bordetella*

pertussis.

Эффекторные белки T6SS, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток, обозначают белки, такие как белки VgrG Vibrio cholerae (такие как VgrG1).

Термин "эффекторный белок T3SS, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток", или "эффекторный белок бактериальной T3SS, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток", в настоящем документе обозначает белки, которые в природе инжектируются системами T3S в цитозоль эукариотических клеток, и белки, которые в природе секретируются системами T3S, которые могут, например, образовывать транслокационную пору в эукариотической мембране, которые представляют собой факторы вирулентности в отношении эукариотических клеток, т.е. белки парализуют или перепрограммируют эукариотическую клетку с пользой для патогена. Эффекторы демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей и модулируют функцию критических регуляторных механизмов хозяина, таких как, например, фагоцитоз и актиновый цитоскелет, передача воспалительных сигналов, апоптоз, эндоцитоз или секреторные пути передачи сигналов[29], и включают

AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1,

AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto, AvrPpiBPto, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1,

AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE,

белки семейства GALA, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2,

HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaH, IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB, PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA,, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA.

Эффекторные гены T3SS Yersinia, которые являются вирулентными в эукариотической клетке и могут быть делетированы/подвержены мутации, например, из Y. enterocolitica, представляют собой YopE, YopH, YopM, YopO, YopP (также называемый YopJ) и YopT[10]. Соответствующие эффекторные гены, которые являются вирулентными в эукариотической клетке, могут быть делетированы/подвержены мутации из Shigella flexneri (например, OspF, IpgD, IpgB1), Salmonella enterica (например, SopE, SopB, SptP), P. aeruginosa (например, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) или E. coli (например, Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ). Последовательности нуклеиновой кислоты данных генов доступны специалистам в данной области техники, например, в базе данных Genebank (yopH, yopO, yopE, yopP, yopM, yopT из NC_002120 GI:10955536; эффекторные белки S. flexneri из AF386526.1 GI:18462515; эффекторы S. enterica из NC_016810.1 GI:378697983 или FQ312003.1 GI:301156631; эффекторы P. aeruginosa из AE004091.2 GI:110227054 или CP000438.1 GI:115583796 и эффекторные белки E. coli из NC_011601.1 GI:215485161).

Для целей настоящего изобретения гены обозначаются строчными буквами и курсивом для отличия от белков. В случае если гены (обозначенные строчными буквами и курсивом) следуют за названием вида бактерий (такого как E. coli), они обозначают мутацию соответствующего гена в соответствующем виде бактерий. Например, YopE обозначает эффекторный белок, кодируемый геном yopE. Y. enterocolitica yopE представляет собой Y. enterocolitica, содержащий мутацию в гене yopE.

В настоящем документе термины "полипептид", "пептид", "белок", "полипептидный" и "пептидный" используются взаимозаменяемо и обозначают серию остатков аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями между альфа-амино- и карбоксильными группами соседних остатков. Предпочтительными являются белки, которые содержат аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 10 аминокислот, более предпочтительно, по меньшей мере 20 аминокислот.

Согласно настоящему изобретению "гетерологичный белок" включает встречающиеся в природе белки или их часть, а также включает искусственно сконструированные белки или их часть. В настоящем документе термин "гетерологичный белок" обозначает белок или его часть, отличный от эффекторного белка T3SS или его N-концевого фрагмента, с которым эффекторный белок может быть слит. В частности, гетерологичный белок в настоящем документе обозначает белок или его часть, которая не относится к протеому, т.е. всему природному белку, составляющему конкретный рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, предложенный и применяемый в настоящем изобретении, например, который не относится к протеому, т.е. всему природному белку, составляющему конкретный штамм бактерий рода Yersinia, Escherichia, Salmonella или Pseudomonas. Обычно гетерологичный белок получен из животного, включая человека. Предпочтительно, гетерологичный белок представляет собой белок человека или его часть. Более предпочтительно, гетерологичный белок выбран из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков анкириновых повторов, белков передачи сигналов клетки, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, белков, связанных с GPCR (G-Protein Coupled Receptor, рецептор, сопряженный с G-белком), слитых конструкций нанотел и нанотел, эффекторов бактериальной T3SS, эффекторов бактериальной T4SS и вирусных белков. В особенности предпочтительный гетерологичный белок выбран из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков анкириновых повторов, репортерных белков, малых ГТФаз, белков, связанных с GPCR, слитых конструкций нанотел, эффекторов бактериальной T3SS, эффекторов бактериальной T4SS и вирусных белков. Еще более предпочтительными являются гетерологичные белки, выбранные из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла и белков анкириновых повторов. Наиболее предпочтительными являются белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, или белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), в частности, белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), такие как гетерологичные белки животных, предпочтительно, человека, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, или белки человека, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН). Белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), предпочтительно, представляют собой белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН) I типа, более предпочтительно, белки человека, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН) I типа.

В некоторых вариантах реализации грамотрицательный штамм бактерий согласно настоящему изобретению содержит две нуклеотидные последовательности, кодирующие идентичные или два различных гетерологичных белка, слитых независимо друг от друга в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка.

В некоторых вариантах реализации грамотрицательный штамм бактерий согласно настоящему изобретению содержит три нуклеотидные последовательности, кодирующие идентичные или три различных гетерологичных белка, слитых независимо друг от друга в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка.

Гетерологичный белок, экспрессируемый рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий, обычно характеризуется молекулярной массой от 1 до 150 кДа, предпочтительно, от 1 до 120 кДа, более предпочтительно, от 1 до 100 кДа, наиболее предпочтительно, от 10 до 80 кДа.

В некоторых вариантах реализации часть гетерологичного белка содержит домен гетерологичного белка. Таким образом, в некоторых вариантах реализации грамотрицательный штамм бактерий согласно настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен гетерологичного белка. Предпочтительно, грамотрицательный штамм бактерий согласно настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую один или два домена гетерологичного белка, более предпочтительно, два домена гетерологичного белка.

В некоторых вариантах реализации грамотрицательный штамм бактерий согласно настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка.

Термин "гетерологичные белки, которые относятся к одному функциональному классу белков", в настоящем документе обозначает гетерологичные белки, которые выполняют одну и ту же функцию, например, гетерологичные белки, обладающие ферментативной активностью, гетерологичные белки, которые действуют в одном и том же пути передачи сигналов, таком как, например, регуляция клеточного цикла, или характеризуются общим специфичным свойством, такие как, например, относятся к одному классу бактериальных эффекторных белков. Функциональные классы белков представляют собой, например, белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, белки, которые действуют в качестве регуляторов клеточного цикла, белки анкириновых повторов, белки передачи сигналов клетки, белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), репортерные белки, факторы транскрипции, протеазы, малые ГТФазы, белки, связанные с GPCR, слитые конструкции нанотел и нанотела, эффекторы бактериальной T3SS, эффекторы бактериальной T4SS или вирусные белки, которые действуют совместно в биологическом процессе установления вирулентности в отношении эукариотических клеток.

Согласно настоящему изобретению "домен гетерологичного белка" включает домены встречающихся в природе белков, а также включает домены искусственно сконструированных белков. В настоящем документе термин "домен гетерологичного белка" обозначает домен гетерологичного белка, отличный от домена эффекторного белка T3SS, или домен, отличный от домена, содержащего его N-концевой фрагмент, с которым может быть слит эффекторный белок для получения слитого белка. В частности, домен гетерологичного белка в настоящем документе обозначает домен гетерологичного белка, который не относится к протеому, т.е. всему природному белку, составляющему конкретный рекомбинантный грамотрицательный штамм бактерий, предложенный и применяемый в настоящем изобретении, например, который не относится к протеому, т.е. всему природному белку, составляющему конкретный штамм бактерий рода Yersinia, Escherichia, Salmonella или Pseudomonas. Обычно домен гетерологичного белка получен из животного, включая человека. Предпочтительно, домен гетерологичного белка представляет собой домен белка человека. Более предпочтительно, домен гетерологичного белка представляет собой домен белка, выбранный из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), регуляторов клеточного цикла, белков анкириновых повторов, белков передачи сигналов клетки, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, белков, связанных с GPCR, слитых конструкций нанотел и нанотел, эффекторов бактериальной T3SS, эффекторов бактериальной T4SS и вирусных белков. В особенности предпочтительный домен гетерологичного белка представляет собой домен белка, выбранный из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), регуляторов клеточного цикла, белков анкириновых повторов, репортерных белков, малых ГТФаз, белков, связанных с GPCR, слитых конструкций нанотел, эффекторов бактериальной T3SS, эффекторов бактериальной T4SS и вирусных белков. В особенности еще более предпочтительными являются домены гетерологичных белков, выбранные из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), регуляторов клеточного цикла и белков анкириновых повторов. Наиболее предпочтительными являются домены белков, участвующих в индукции или регуляции

ответа интерферона (ИФН), таких как белки животных, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), предпочтительно, домены гетерологичных белков человека, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН).

Термин "повторяющиеся домены гетерологичного белка" в настоящем документе обозначает слитый белок, состоящий из нескольких повторов домена гетерологичного белка, причем данные домены могут быть либо напрямую слиты друг с другом, либо между доменами может быть введен вариабельный линкер, например, линкер размером от 1 до 30, предпочтительно, от 2 до 15, более предпочтительно, от 3 до 10 аминокислот. Предпочтительно, применяют повторяющиеся идентичные домены или повторяющиеся домены, которые характеризуются идентичностью аминокислотной последовательности более 80%, обычно более 85%, предпочтительно, более 90%, еще более предпочтительно, более 95%, в частности, более 96%, более конкретно, более 97%, еще более конкретно, более 98%, наиболее конкретно, более 99%. Также предпочтительными являются идентичные домены, которые характеризуются идентичностью аминокислот, составляющей 100%. Предпочтительно, в слитом белке, как указано в настоящем документе, содержатся два повторяющихся домена, более предпочтительно, два повторяющихся идентичных домена или два повторяющихся домена, которые характеризуются идентичностью аминокислотной последовательности более 90%, предпочтительно, более 95%, наиболее предпочтительно, 100%. В настоящем изобретении также предусмотрены более двух, например, три, четыре, пять или шесть повторяющихся доменов.

Термин "два или более доменов различных гетерологичных белков" в настоящем документе обозначает слитый белок, состоящий из одного или нескольких повторов по меньшей мере двух доменов различных гетерологичных белков, например, по меньшей мере двух доменов гетерологичных белков, которые характеризуются идентичностью аминокислотной последовательности 80% или менее, предпочтительно, 60% или менее, более предпочтительно, 40% или менее, причем данные домены могут быть либо напрямую слиты друг с другом, либо между доменами может быть введен вариабельный линкер, например, линкер размером от 1 до 30, предпочтительно, от 2 до 15, более предпочтительно, от 3 до 10 аминокислот. Предпочтительно, два домена различных гетерологичных белков содержатся в слитом белке, как указано в настоящем документе. В настоящем изобретении также предусмотрены более двух, например, три, четыре, пять или шесть доменов различных гетерологичных белков.

Домен гетерологичного белка, экспрессируемый рекомбинантным грамотрицательным штаммом бактерий, обычно характеризуется молекулярной массой от 1 до 50 кДа, предпочтительно, от 1 до 30 кДа, более предпочтительно, от 1 до 20 кДа, наиболее предпочтительно, от 1 до 10 кДа.

Согласно настоящему изобретению "белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН", включают, без ограничения,

cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKKэпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG1, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/кардиф/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, риплет, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41, LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, IFNAR1, IFNAR2, TYK2, JAK1, ISGF3, IL10R2, IFNLR1, IFNGR1, IFNGR2, JAK2, STAT4,

ферменты, образующие циклические динуклеотиды (циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ), такие как WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагменты.

Согласно настоящему изобретению "белки участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа", включают, без ограничения,

cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKKэпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG1, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/кардиф/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, риплет, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41, LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70,

ферменты, образующие циклические динуклеотиды (циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ), такие как WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагменты. Предпочтительные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из

cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKKэпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG1, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/кардиф/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, риплет, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, LSm14A, LRRFIP1, DHX29, DHX15

и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагментов.

Более предпочтительные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из cGAS (такого как Uniprot. Q8N884 для белка человека), RIG1 (такого как Uniprot. 095786 для белка человека), MDA5 (такого как Uniprot. Q9BYX4 для белка человека), IPS-1/MAVS (такого как Uniprot. Q7Z434 для белка человека), IRF3 (такого как Uniprot. Q14653 для белка человека), IRF7 (такого как Uniprot. Q92985 для белка человека), IRF9 (такого как Uniprot. Q00978 для белка человека) и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR (такого как Uniprot. Q9HXT9 для белка P. aeruginosa), DncV (такого как Uniprot. Q9KVG7 для белка V. cholerae), DisA и DisA-подобного белка (такого как Uniprot. Q812L9 для белка B. cereus), CdaA (такого как Uniprot. Q8Y5E4 для белка L. monocytogenes), CdaS (такого как Uniprot. 031854 или конститутивная активная мутация L44F, такая как в Seq ID № 114 для белка B. subtilis) и cGAS (такого как Uniprot. Q8N884 для белка человека) или фрагментов данных белков.

IPS-1/MAVS/кардиф/VISA обозначает эукариотический митохондриальный антивирусный сигнальный белок, содержащий N-концевой домен CARD с идентификатором Uniprot (www.uniprot.org) "Q7Z434" для последовательности человека и "Q8VCF0" для последовательности мыши. Термины "IPS-1/MAVS", "MAVS/IPS-1" и "MAVS" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают эукариотический митохондриальный антивирусный сигнальный белок, содержащий N-концевой домен CARD с идентификатором (www.uniprot.org) "Q7Z434" для последовательности человека и "Q8VCF0" для последовательности мыши.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из белков, содержащих домен CARD или его фрагменты, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, или их фрагментов.

Фрагмент гетерологичных белков, участвующих в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, обычно содержит от 25 до 1000 аминокислот, предпочтительно, от 50 до 600 аминокислот, более предпочтительно, от 100 до 400 аминокислот, еще более предпочтительно, от 100 до 362 аминокислот. В некоторых вариантах реализации фрагмент гетерологичных белков, участвующих в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, содержит N-концевой фрагмент гетерологичных белков, участвующих в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, который обычно содержит от 25 до 1000 аминокислот, предпочтительно от 50 до 600 аминокислот, более предпочтительно от 100 до 400 аминокислот, еще более предпочтительно от 100 до 362 аминокислот, в частности от 100 до 246 аминокислот или содержит N-концевой фрагмент гетерологичного белка, участвующего в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, который содержит делецию аминокислотной последовательности, содержащуюся между аминокислотой 1 и аминокислотой 160 N-концевых аминокислот, предпочтительно, делецию аминокислотной последовательности, содержащую N-концевые аминокислоты 1-59 или N-концевые аминокислоты 1-160, и причем N-концевой фрагмент гетерологичного белка, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, обычно содержит от 25 до 1000 аминокислот, предпочтительно, от 50 до 600 аминокислот, более предпочтительно, от 100 до 400 аминокислот, еще более предпочтительно, от 100 до 362 аминокислот.

Гетерологичные белки, содержащие фрагмент домена CARD, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, обычно содержат аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-500, предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-400, более предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-300, более предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-294, более предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-246.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, содержащие фрагмент домена CARD, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 294,

аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 246, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 245, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 229, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 228, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 218, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 217, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 100 и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 101, более конкретно, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 245, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 228, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 217 и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 100 домена CARD человека.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки, содержащие фрагмент домена CARD, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН или ответа ИФН I типа, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 294, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 246, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 245, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 229, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 228, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 218, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 217, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 100, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 101, более конкретно, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 245, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 228, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 217 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 100 домена CARD человека.

Фрагмент ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, обычно содержит аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-600, предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 50 до любой из N-концевых аминокислот 100-550, более предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 60 до любой из N-концевых аминокислот 100-530, в частности, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 60 до N-концевой аминокислоты 530, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 146 до N-концевой аминокислоты 507 или аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 161 до N-концевой аминокислоты 530, более конкретно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 161 до N-концевой аминокислоты 530 cGAS человека. В некоторых вариантах реализации фрагмент cGAS содержит, в частности, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 60 и не более чем N-концевую аминокислоту N-концевую аминокислоту 422, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 146 и не более чем N-концевую аминокислоту N-концевую аминокислоту 507, и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 161 и не более чем N-концевую аминокислоту N-концевую аминокислоту 522. В некоторых вариантах реализации фрагмент cGAS содержит, более конкретно, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 60 до N-концевой аминокислоты 422, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 146 до N-концевой аминокислоты 507 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 161 до N-концевой аминокислоты 522.

В более предпочтительном варианте реализации гетерологичный белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5 и MAVS/IPS-1, содержащих домен CARD, или их фрагментов, и cGAS и его фрагмента, в частности, выбран из группы, со-

стоящей из RIG1, содержащего домен CARD, и его фрагмента, MAVS/IPS-1, содержащего домен CARD, и его фрагмента, и cGAS и его фрагмента. Фрагменты данных белков являются в особенности предпочтительными. В данном более предпочтительном варианте реализации RIG1, MDA5 и MAVS/IPS-1, содержащие домен CARD, содержат встречающийся в природе домен или домены CARD и дополнительно С-концевые аминокислоты после встречающегося в природе домена или доменов CARD, содержащие встречающийся в природе геликазный домен в случае RIG-1 или его фрагмента, предпочтительно, фрагмент, содержащий 1-500, более предпочтительно, 1-250, еще более предпочтительно, 1-150 аминокислот, причем встречающийся в природе геликазный домен или его фрагмент не является функциональным, т.е. не связывается с доменом CARD, или содержат в направлении 5'-3' С-концевую последовательность в случае MAVS/IPS-1 или его фрагмента, предпочтительно, фрагмент, содержащий 1-500, более предпочтительно, 1-250, еще более предпочтительно, 1-150 аминокислот. В данных вариантах реализации cGAS и его фрагмент обычно содержат встречающийся в природе синтазный домен (сердцевину N-Тазы и С-концевой домен; аминокислоты 160-522 cGAS человека, как описано в публикации, [65] и такой как Uniprot. Q8N884 для белка человека), предпочтительно, cGAS и его фрагмент содержит встречающийся в природе синтазный домен, но содержит делецию части или всего N-концевого домена, предпочтительно, делецию всего N-концевого спирального удлинения (N-концевого спирального удлинения; аминокислоты 1-160 cGAS человека, как описано в публикации [65], и такой как Uniprot. Q8N884 для белка человека). Делеция части или всего N-концевого домена, предпочтительно, представляет собой делецию аминокислот 1-59.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из семейства RIG-I-подобного рецептора (RLR) (таких как RIG1 и MDA5) и его фрагмента, других белков, содержащих домен CARD, участвующих в антивирусной передаче сигналов и индукции ИФН I типа (таких как MAVS/IPS-1) и их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS и их фрагментов, которые приводят к стимуляции STING.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из RIG1, MDA5, LGP2, MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагментов, более предпочтительно, выбраны из группы, состоящей из RIG1, WspR, DncV, DisA-подобного белка и cGAS или их фрагментов.

В более предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагмента, еще более предпочтительно, выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагмента, в частности, выбран из группы, состоящей из RIG1, MAVS/IPS-1 и cGAS или их фрагмента. Фрагменты данных белков являются в особенности предпочтительными.

В данном более предпочтительном варианте реализации фрагмент RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1 обычно содержит аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-500, предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-400, более предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-300. В данном более предпочтительном варианте реализации фрагмент RIG1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 246, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 245, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 229, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 228, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 218, и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 217; и фрагмент MAVS/IPS-1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 100 и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем N-концевую аминокислоту 101.

В данном более предпочтительном варианте реализации фрагмент RIG1 содержит, более конкретно, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 246, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 245, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 229, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 228, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 218 и аминокислотной

последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 217; и фрагмент MAVS/IPS-1 содержит, более конкретно, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 100 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до N-концевой аминокислоты 101. В данном более предпочтительном варианте реализации фрагмент cGAS обычно содержит аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из N-концевых аминокислот 100-600, предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 50 до любой из N-концевых аминокислот 100-550, более предпочтительно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 60 до любой из N-концевых аминокислот 100-530, в частности, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 60 до N-концевой аминокислоты 530, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 146 до N-концевой аминокислоты 507 или аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 161 до N-концевой аминокислоты 530, более конкретно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 60 до N-концевой аминокислоты 530 или аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 161 до N-концевой аминокислоты 530 cGAS человека. В данном более предпочтительном варианте реализации фрагмент cGAS содержит, в частности, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 60 и не более чем N-концевую аминокислоту N-концевую аминокислоту 422, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 146 и не более чем N-концевую аминокислоту N-концевую аминокислоту 507, и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 161 и не более чем N-концевую аминокислоту N-концевую аминокислоту 522.

В данном более предпочтительном варианте реализации фрагмент cGAS более конкретно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 60 до N-концевой аминокислоты 422, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 146 до N-концевой аминокислоты 507, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 161 до N-концевой аминокислоты 522.

В еще более предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из доменов $CARD_{1-245}$ RIG1 человека (SEQ ID NO: 37), доменов $CARD_{1-228}$ RIG1 человека (SEQ ID NO: 128), доменов $CARD_{1-217}$ RIG1 человека (SEQ ID NO: 129), доменов $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши (SEQ ID NO: 38), доменов CARD1-229 RIG1 мыши (SEQ ID NO: 110), доменов $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши (SEQ ID NO: 111), домена $CARD_{1-100}$ MAVS человека (SEQ ID NO: 116), домена $CARD_{1-101}$ MAVS мыши (SEQ ID NO: 130), cGAS N. vectensis (SEQ ID NO: 43), $CGAS_{161-522}$ человека (SEQ ID NO: 115), $cGAS_{146-507}$ мыши (SEQ ID NO: 131) и $cGAS_{60-422}$ N. vectensis (SEQ ID NO: 117).

В конкретном предпочтительном варианте реализации белок участвует в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, причем белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из доменов $CARD_{1-245}$ RIG1 человека, (SEQ ID NO: 37), доменов $CARD_{1-228}$ RIG1 человека (SEQ ID NO: 128), доменов $CARD_{1-217}$ RIG1 человека (SEQ ID NO: 129), домена $CARD_{1-100}$ MAVS человека (SEQ ID NO: 116) и $cGAS_{161-522}$ человека (SEQ ID NO: 115).

В более конкретном предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из доменов $CARD_{1-245}$ RIG1 человека, доменов $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, доменов $CARD_{1-229}$ RIG1 мыши, доменов $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши, $MAVS_{1-100}$ человека, cGAS N. vectensis, $cGAS_{161-522}$ человека и $cGAS_{60-422}$ N. vectensis.

Семейство RIG-I-подобного рецептора (RLR) содержит белки, выбранные из группы, состоящей из RIG1, MDA5 и LGP2. Предпочтительные гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, представляют собой белки RIG1 и MDA5, содержащие домен CARD, в частности, белок RIG1, содержащий домен CARD. Другие белки, содержащие домен CARD, участвующие в индукции ИФН I типа, включают белки, выбранные из группы, состоящей из MAVS/IPS-1.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы белков, содержащих домен CARD RIG1, домен CARD MDA5 и/или домен CARD MAVS/IPS-1, и WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS и их фрагментов, предпочтительно, выбраны из группы белков, содержащих домен CARD RIG1 и/или домен CARD MAVS/IPS-1, и WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагментов.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из домена CARD RIG1, домена CARD MDA5, домена CARD MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, более предпочтительно, выбраны из группы, состоящей из домена CARD RIG1, WspR, DncV, DisA-подобного белка и cGAS.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, содержат один или несколько (например, два, три или четыре)

доменов CARD, предпочтительно, содержат один или несколько (например, два, три или четыре) доменов CARD RIG1, MDA5 и/или MAVS/IPS-1, предпочтительно, RIG1 и/или MAVS/IPS-1. В более предпочтительном варианте реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, содержат домены CARD RIG1 или MDA5, в частности, RIG1.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбраны из группы, состоящей из белка, индуцирующего ответ ИФН I типа, без ферментативной функции или белка, индуцирующего ответ ИФН I типа, с ферментативной функцией. Белок, индуцирующий ответ ИФН I типа, без ферментативной функции, включенный в настоящее изобретение, обычно содержит по меньшей мере один домен CARD, предпочтительно, два домена CARD. Домен CARD обычно состоит из комплекта от шести до семи альфа-спиралей, предпочтительно, упорядоченности от шести до семи антипараллельных альфа-спиралей с гидрофобной сердцевиной и внешней поверхностью, состоящей из заряженных остатков. Белок, индуцирующий ответ ИФН I типа, с ферментативной функцией, включенный в настоящее изобретение, обычно содержит фермент, образующий циклический динуклеотид (циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ) или его домен, которые приводят к стимуляции STING, предпочтительно, диаденилатциклазу (DAC), дигуанилатциклазу (DGC) или ГМФ-АМФ-циклазу (GAC) или их домен.

Согласно настоящему изобретению "белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза", включают, без ограничения, Bad, Bcl2, Bak, Bmt, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, Apaf1, каспазу 9, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 10, DFFA, DFFB, ROCK1, APP, CAD, ICAD, CAD, EndoG, AIF, HtrA2, Smac/Diablo, Arts, ATM, ATR, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), семейство IAP, LC8, PP2B, белки 14-3-3, PKA, PKC, PI3K, Erk1/2, p90RSK, TRAF2, TRADD, FADD, Daxx, каспазу8, каспазу2, RIP, RAIDD, MKK7, JNK, FLIP, FKHR, GSK3, CDK и их ингибиторы, такие как семейство INK4 (pl6(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) и семейство Cip1/Waf1/Kip1-2 (p21(Cip1/Waf1), p27(Kip1), p57(Kip2). Предпочтительно, применяют Bad, Bmt, Bcl2, Bak, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, каспазу9, каспазу3, каспазу6, каспазу7, Smac/Diablo, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), LC8, PP2B, TRADD, Daxx, каспазу8, каспазу2, RIP, RAIDD, FKHR, CDK и их ингибиторы, такие как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), наиболее предпочтительно, BIM, Bid, усеченный Bid, FADD, каспазу 3 (и ее субъединицы), Bax, Bad, Akt, CDK и их ингибиторы, такие как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d))[11-13]. Дополнительно белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, включают DIVA, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bid и tBid, Egl-1, Bcl-Gs, цитохром С, беклин, CED-13, BNIP1, BNIP3, Bcl-B, Bcl-W, Ced-9, A1, NR13, Bfl-1, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 8.

Белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из проапоптотических белков, антиапоптотических белков, ингибиторов путей, предотвращающих апоптоз, и ингибиторов путей передачи сигналов или путей, способствующих выживанию. Проапоптотические белки включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома С, FADD, семейства каспаз и CDK и их ингибиторов, таких как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), или выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома С, FADD и семейства каспаз. Предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Apafl, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспаз, CDK и их ингибиторы, такие как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)). В равной степени предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспаз.

Антиапоптотические белки включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bcl-2, Bcl-X1, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13, семейства IAP и Bfl-1.

Предпочтительными являются Bcl-2, Bcl-X1, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13 и Bfl-1.

Ингибиторы путей, предотвращающих апоптоз, включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bad, Noxa и Cdc25A. Предпочтительными являются Bad и Noxa.

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

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из белков BH3-только, каспаз и белков внутриклеточной передачи сигналов контроля апоптоза рецепторами смерти. Белки BH3-только являются предпочтительными. Белки BH3-только включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bad, BIM, Bid и tBid, Puma, Bik/Nbk, Bod, Hrk/Dp5, BNIP1, BNIP3, Bmf, Noxa, Mcl-1, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13. Предпочтительными являются Bad, BIM, Bid и tBid, в частности, tBid.

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

Белки внутриклеточной передачи сигналов контроля апоптоза рецепторами смерти включают белки, выбранные из группы, состоящей из FADD, TRADD, ASC, BAP31, GULP1/CED-6, CIDEA, MFG-E8, CIDEC, RIPK1/RIP1, CRADD, RIPK3/RIP3, Crk, SHB, CrkL, DAXX, семейства 14-3-3, FLIP, DFF40 и 45, PEA-15, SODD. Предпочтительными являются FADD и TRADD.

В некоторых вариантах реализации два гетерологичных белка, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, содержатся в грамотрицательном штамме бактерий, причем один белок представляет собой проапоптотический белок, а второй белок представляет собой ингибитор путей, предотвращающих апоптоз, или причем один белок представляет собой проапоптотический белок, а второй белок представляет собой ингибитор путей передачи сигналов или путей, способствующих выживанию.

Проапоптотические белки, включенные в настоящее изобретение, обычно содержат альфа-спиральную структуру, предпочтительно, гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и обычно содержат по меньшей мере один из доменов BH1, BH2, BH3 или BH4, предпочтительно, содержат по меньшей мере один домен BH3. Обычно проапоптотические белки, включенные в настоящее изобретение, не обладают ферментативной активностью.

Антиапоптотические белки, включенные в настоящее изобретение, обычно содержат альфа-спиральную структуру, предпочтительно, гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и содержат комбинацию различных доменов BH1, BH2, BH3 и BH4, предпочтительно, комбинацию различных доменов BH1, BH2, BH3 и BH4, в которой присутствует домен BH1 и BH2, более предпочтительно, BH4-BH3-BH1-BH2, BH1-BH2, BH4-BH1-BH2 или BH3-BH1-BH2 (от N- к С-концу). Дополнительно также включены белки, содержащие по меньшей мере один домен BIR.

Ингибиторы путей, предотвращающих апоптоз, включенные в настоящее изобретение, обычно содержат альфа-спиральную структуру, предпочтительно, гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и обычно содержат один домен BH3.

Каждый из доменов BH1, BH2, BH3 или BH4 обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот в длину. Таким образом, в некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из гетерологичных белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, которые составляют от приблизительно 5 до приблизительно 200, предпочтительно, от приблизительно 5 до приблизительно 150, более предпочтительно, от приблизительно 5 до приблизительно 100, наиболее предпочтительно, от приблизительно 5 до приблизительно 50, в частности, от приблизительно 5 до приблизительно 25 аминокислот в длину.

В некоторых вариантах реализации грамотрицательный штамм бактерий согласно настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую два домена гетерологичных белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, предпочтительно, два повторяющихся, более предпочтительно, два идентичных повторяющихся домена белка, участвующего в апоптозе или регуляции апоптоза, или два домена различных белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, наиболее предпочтительно, два идентичных повторяющихся домена белка, участвующего в апоптозе или регуляции апоптоза. В некоторых вариантах реализации грамотрицательный штамм бактерий согласно настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую два домена гетерологичных белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, причем один представляет собой домен проапоптотического белка, а другой представляет собой домен белка, который представляет собой ингибитор путей, предотвращающих апоптоз, или причем один представляет собой домен проапоптотического белка, а другой домен представляет собой домен белка, который представляет собой ингибитор путей передачи сигналов или путей, способствующих выживанию.

Конкретный предпочтительный гетерологичный белок представляет собой домен BH3 индуктора апоптоза tBID, более конкретно, домен BH3, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-32, предпочтительно, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 32.

В равной степени предпочтительным является домен BH3 регулятора апоптоза BAX, более конкретно, домен BAX, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33-36, предпочтительно, SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36. В SEQ ID NO приведены последовательности человека и мыши, однако в равной степени включены домены BH3 tBID и BAX всех других видов.

В некоторых вариантах реализации повторяющиеся домены гетерологичных белков представляют собой домен BH3, предпочтительно, повторяющиеся домены BH3 индуктора апоптоза tBID, более предпочтительно, повторяющиеся домены BH3 индуктора апоптоза tBID, содержащиеся в SEQ ID NO: 29-32 или SEQ ID NO: 25, или SEQ ID NO: 19, еще более предпочтительно, два повторяющихся домена BH3 индуктора апоптоза tBID, наиболее предпочтительно, два повторяющихся домена BH3 индуктора апоптоза tBID, содержащегося в SEQ ID NO: 29-32, или SEQ ID NO: 25, или SEQ ID NO: 19, в частности, два повторяющихся домена BH3 индуктора апоптоза tBID, содержащиеся в последовательности SEQ ID NO: 27. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации грамотрицательный штамм бактерий и/или вектор согласно настоящему изобретению содержит вторую последовательность ДНК, кодирующую два повторяющихся домена BH3, более предпочтительно, два повторяющихся домена BH3 индуктора апоптоза tBID. Два повторяющихся домена могут быть соединены линкером длиной 1-30 аминокислот, предпочтительно, 2-15 аминокислот, более предпочтительно, длиной 3-10 аминокислот.

В некоторых вариантах реализации два или более доменов различных гетерологичных белков представляют собой домены гетерологичных белков, которые относятся к одному функциональному классу белков, предпочтительно, различные гетерологичные белки двух или более доменов представляют собой различные гетерологичные белки из класса белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза. В предпочтительном варианте реализации два или более доменов различных гетерологичных белков представляют собой домен BH3 индуктора апоптоза tBID и домен BH3 регулятора апоптоза BAX, в частности, слитые домены BH3, содержащиеся в последовательности SEQ ID NO: 24 и 28. Два домена различных гетерологичных белков могут быть соединены линкером длиной 1-30 аминокислот, предпочтительно, 2-15 аминокислот, более предпочтительно, длиной 3-10 аминокислот.

Другой конкретный предпочтительный гетерологичный белок представляет собой домен белка, участвующего в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, более конкретно, домен CARD RIG1, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37, 38, 110, 111, 128, 129, домен CARD MDA5, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44-47, 112, 113, предпочтительно, SEQ ID NO: 112 или 113, или домен CARD MAVS/IPS-1, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, 48-49, предпочтительно, SEQ ID NO: 116, полноразмерный cGAS, такой как cGAS N. vectensis (SEQ ID NO: 43), $CGAS_{161-522}$ человека (SEQ ID NO: 115), $cGAS_{60-422}$N. vectensis (SEQ ID NO: 117) или $cGAS_{146-507}$ мыши (SEQ ID NO: 131). Наиболее конкретно, домен CARD RIG1, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37, 38, 110, 111, 128, 129, белок домена CARD, состоящий из MAVS/IPS-1, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, 48-49, предпочтительно, SEQ ID NO: 116, и полноразмерный cGAS, такой как cGAS N. vectensis (SEQ ID NO: 43), $CGAS_{161-522}$ человека (SEQ ID NO: 115), $cGAS_{60-422}$ N. vectensis (SEQ ID NO: 117) или $cGAS_{146-507}$ мыши (SEQ ID NO: 131).

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки представляют собой фермент, конвертирующий пролекарство. В данных вариантах реализации рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий экспрессирует, предпочтительно, экспрессирует и секретирует фермент, конвертирующий пролекарство. Фермент, конвертирующий пролекарство, как указано в настоящем документе, включает ферменты, конвертирующие нетоксичные пролекарства в токсичное лекарственное средство, предпочтительно, ферменты, выбранные из группы, состоящей из цитозиндезаминазы, пурин-нуклеозидфосфорилазы, тимидинкиназы, бета-галактозидазы, карбоксилэстераз, нитроредуктаз, карбоксипептидаз и бета-глюкуронидаз, более предпочтительно, ферменты, выбранные из группы, состоящей из цитозиндезаминазы, пурин-нуклеозидфосфорилазы, тимидинкиназы и бета-галактозидазы.

Термин "сайт расщепления протеазы" в настоящем документе обозначает специфичный аминокислотный мотив в аминокислотной последовательности, например, в аминокислотной последовательности белка или слитого белка, который расщепляется специфичной протеазой, распознающей аминокислотный мотив. Обзор см. в публикации[14]. Примеры сайтов расщепления протеазы представляют собой аминокислотные мотивы, которые расщепляются протеазой, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкая цепь), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы риновируса человека (HRV 3C), протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактор Xa и тромбина. Следующие аминокислотные мотивы распознаются соответствующими протеазами:

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

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

Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser и модифицированные мотивы на основе,

Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly/Ser (где X представляет собой любую аминокислоту), распознаваемые протеазой TEV (tobacco etch virus, вируса гравировки табака),

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

Ile-(Glu или Asp)-Gly-Arg: протеаза фактор Xa,

Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser: тромбин.

Сайты расщепления протеазы в настоящем документе включают убиквитин. Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах реализации убиквитин используют в качестве сайта расщепления протеазы, т.е. нуклеотидная последовательность кодирует убиквитин в качестве сайта расщепления протеазы, который может быть расщеплен специфичными убиквитин-процессирующими протеазами на N-концевом сайте, например, который может быть расщеплен специфичными убиквитин-процессирующими протеазами, называемыми деубиквитинизирующими ферментами, на N-концевом сайте эндогенно в клетке, в которую был доставлен слитый белок. Убиквитин процессируется на C-конце группой эндогенных убиквитин-специфичных C-концевых протеаз (деубиквитинизирующие ферменты, ДУБ). Расщепление убиквитина под действием ДУБ, как полагают, происходит на самом C-конце убиквитина (после G76).

"Индивидуум", "субъект" или "пациент" представляет собой позвоночное. В определенных вариантах реализации позвоночное представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают, без огра-

ничения, приматов (включая человека и нечеловекообразных приматов) и грызунов (например, мышей и крыс). В предпочтительных вариантах реализации субъект представляет собой человека.

Термин "мутация" в настоящем документе используется в качестве общего термина и включает изменения одной пары оснований и множества пар оснований. Такие мутации могут включать замены, мутации со сдвигом рамки, делеции, вставки и усечения.

Термин "сигнал внутриядерной локализации" в настоящем документе обозначает аминокислотную последовательность, которая помечает белок для импорта в ядро эукариотической клетки и, предпочтительно, включает вирусный сигнал внутриядерной локализации, такой как NLS, полученный из большого Т-антигена SV40 (PPKKKRKV).

Термин "сайт множественного клонирования" в настоящем документе обозначает короткую последовательность ДНК, содержащую несколько сайтов рестрикции для расщепления рестрикционными эндонуклеазами, такими как

AclI, HindIII, SspI, MluCI, Tsp509I, PciI, AgeI, BspMI, BfuAI, SexAI, MluI, BceAI, HpyCH4IV, HpyCH4III, BaeI, BsaXI, AflIII, SpeI, BsrI, BmrI, BglII, AfeI, AluI, StuI, ScaI, ClaI, BspDI, PI-SceI, NsiI, AseI, SwaI, CspCI, MfeI, BssSI, BmgBI, PmlI, DraIII, AleI, EcoP15I, PvuII, AlwNI, BtsIMutI, TspRI, NdeI, NlaIII, CviAII, FatI, MslI, FspEI, XcmI, BstXI, PflMI, BccI, NcoI, BseYI, FauI, SmaI, XmaI, TspMI, Nt.CviPII, LpnPI, AciI, SacII, BsrBI, MspI, HpaII, ScrFI, BssKI, StyD4I, BsaJI, BslI, BtgI, NciI, AvrII, MnlI, BbvCI, Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, SbfI, Bpu10I, Bsu36I, EcoNI, HpyAV, BstNI, PspGI, StyI, BcgI, PvuI, BstUI, EagI, RsrII, BsiEI, BsiWI, BsmBI, Hpy99I, MspA1I, MspJI, SgrAI, BfaI, BspCNI, XhoI, EarI, AcuI, PstI, BpmI, DdeI, SfcI, AflII, BpuEI, SmlI, AvaI, BsoBI, MboII, BbsI, XmnI, BsmI, Nb.BsmI, EcoRI, HgaI, AatII, ZraI, Tth111I PflFI, PshAI, AhdI, DrdI, Eco53kI, SacI, BseRI, PleI, Nt.BstNBI, MlyI, HinfI, EcoRV, MboI, Sau3AI, DpnII BfuCI, DpnI, BsaBI, TfiI, BsrDI, Nb.BsrDI, BbvI, BtsI, Nb.BtsI, BstAPI, SfaNI, SphI, NmeAIII, NaeI, NgoMIV, BglI, AsiSI, BtgZI, HinP1I, HhaI, BssHII, NotI, Fnu4HI, Cac8I, MwoI, NheI, BmtI, SapI, BspQI, Nt.BspQI, BlpI, TseI, ApeKI, Bsp1286I, AlwI, Nt.AlwI, BamHI, FokI, BtsCI, HaeIII, PhoI, FseI, SfiI, NarI, KasI, SfoI, PluTI, AscI, EciI, BsmFI, ApaI, PspOMI, Sau96I, NlaIV, KpnI, Acc65I, BsaI, HphI, BstEII, AvaII, BanI, BaeGI, BsaHI, BanII, RsaI, CviQI, BstZ17I, BciVI, SalI, Nt.BsmAI, BsmAI, BcoDI, ApaLI, BsgI, AccI, Hpy166II, Tsp45I, HpaI, PmeI, HincII, BsiHKAI, ApoI, NspI, BsrFI, BstYI, HaeII, CviKI-1, EcoO109I, PpuMI, I-CeuI, SnaBI, I-SceI, BspHI, BspEI, MmeI, TaqαI, NruI, Hpy188I, Hpy188III, XbaI, BclI, HpyCH4V, FspI, PI-PspI, MscI, BsrGI, MseI, PacI, PsiI, BstBI, DraI, PspXI, BsaWI, BsaAI, EaeI, предпочтительно, XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI.

Термин "сайт множественного клонирования" в настоящем документе также обозначает короткую последовательность ДНК, используемую для событий рекомбинации, как, например, в стратегии клонирования Gateway, или для способов, таких как сборка Гиббсона или клонирование в TOPO-системе.

Термин "штамм дикого типа" или "грамотрицательный штамм бактерий дикого типа" в настоящем документе обозначает встречающийся в природе вариант или встречающийся в природе вариант, содержащий генетические модификации, позволяющие применять векторы, такие как делеционные мутации в рестрикционных эндонуклеазах или генах устойчивости к антибиотикам. Данные штаммы содержат хромосомную ДНК, а также в некоторых случаях (например, Y. enterocolitica, S. flexneri) - немодифицированную плазмиду вирулентности.

Термин "штамм Yersinia дикого типа" в настоящем документе обозначает встречающийся в природе вариант (такой как Y. enterocolitica E40) или встречающийся в природе вариант, содержащий генетические модификации, позволяющие применять векторы, такие как делеционные мутации в рестрикционных эндонуклеазах или генах устойчивости к антибиотикам (такой как Y. enterocolitica MRS40, чувствительное к ампициллину производное Y. enterocolitica E40) Данные штаммы содержат хромосомную ДНК, а также немодифицированную плазмиду вирулентности (называемую pYV). Y. enterocolitica подвид palearctica обозначает низкопатогенные штаммы Y. enterocolitica, которые отличаются от более вирулентных штаммов подвида enterocolitica[15,16]. В Y. enterocolitica подвид palearctica отсутствует, по сравнению с Y.

enterocolitica подвид enterocolitica, остров высокой патогенности (high-pathogenicity island, HPI). Данный HPI кодирует сидерофор железа, называемый иерсиниабактин[17]. Отсутствие иерсиниабактина в Y. enterocolitica подвид palearctica делает данный подвид менее патогенным и зависимым от индуцируемого системно доступного железа для персистентной инфекции, например, в печени или селезенке[17]. Железо может стать доступным для бактерии в индивидууме, например, в результате предварительного введения дефероксамина, хелатора железа, который применяют для лечения перенасыщения железом у пациентов[18].

Термин "содержать" обычно используют в значении "включать", иначе говоря, допуская присутствие одного или нескольких свойств или компонентов.

Термин "приблизительно" обозначает диапазон значений ±10% от указанного значения. Например, фраза "приблизительно 200" включает ±10% от 200 или от 180 до 220.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, содержащий нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит делецию хромосомного гена, кодирующего эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором.

В следующем аспекте в настоящем изобретении предложен рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, содержащий нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит модуляцию в РНК в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC.

В следующем аспекте в настоящем изобретении предложен рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, содержащий нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем гетерологичный белок представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН).

В следующем аспекте в настоящем изобретении предложен рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, как описано в настоящем документе, для применения в способе лечения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту указанного рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта. Предпочтительно, в настоящем изобретении предложен рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, как описано в настоящем документе, для применения в способе лечения рака - злокачественной солидной опухоли - у субъекта, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий накапливается в злокачественной солидной опухоли и причем указанный способ включает введение субъекту указанного рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий является дефицитным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий трансформирован нуклеотидной молекулой, например, вектором, который содержит в направлении от 5' к 3'

промотор;

первую нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связанную с указанным промотором;

вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом указанной первой нуклеотидной последовательности.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий трансформирован нуклеотидной молекулой, например, вектором, который содержит в направлении от 5' к 3'

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

вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом указанной первой нуклеотидной последовательности.

Предпочтительно, нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, фланкирована на 3'-конце нуклеотидной последовательностью, гомологичной нуклеотидной последовательности хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности на 3'-конце сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту. Более предпочтительно, данная нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок на 3'-конце, является гомологичной нуклеотидной последовательности, лежащей в пределах 10 т.п.о. на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности на 3'-конце сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту. В частности, данная нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок на его 3'-конце, является гомологичной нуклеотидной последовательности в пределах того же оперона на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. В данном варианте реализации трансформацию обычно проводят так, чтобы слитая нуклеотидная последовательность была встроена в результате гомологичной рекомбинации на эндогенной плазмиде вирулентности или хромосоме, предпочтительно, на эндогенной плазмиде вирулентности, рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, и чтобы слитая нуклеотидная последовательность была функционально связана с промотором эндогенной плазмиды вирулентности или хромосомы, например, хромосомного острова патогенности. Предпочтительно, слитая нуклеотидная последовательность функционально связана с промотором эндогенной плазмиды вирулентности. В данном варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит сигнал доставки или его фрагмент из бактериального эффекторного белка, предпочтительно, его фрагмент, который обеспечивает гомологичную рекомбинацию в гомологичном сайте на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, предпочтительно, на эндогенной плазмиде вирулентности, которая в результате приводит к тому, что нуклеотидная последовательность размещается в рамке с 3'-концом сигнала доставки хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности, который функционально связан с эндогенным промотором.

В следующем варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий или рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий трансформирован нуклеотидной молекулой, предпочтительно, нуклеотидной молекулой ДНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, и нуклеотидную последовательность, которая является гомологичной или идентичной нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или которая является гомологичной или идентичной нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, причем сигнал доставки из бактериального эффекторного белка или его фрагмент кодируется на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий. Предпочтительно, нуклеотидная последовательность, которая является гомологичной или идентичной нуклеотидной последовательности сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту, расположена на 5'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок. Более предпочтительно, нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, фланкирована на 3'-конце нуклеотидной последовательностью, гомологичной нуклеотидной последовательности хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности на 3'-конце сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту. Еще более предпочтительно, данная нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок на 3'-конце, является гомологичной нуклеотидной последовательности, лежащей в пределах 10 т.п.о. на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности на 3'-конце сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. В частности, данная нуклеотидная последовательность, фланкирующая гомологичный белок на 3'-конце, является гомологичной нуклеотидной последовательности и находится в пределах того же оперона на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. В данном варианте реализации трансформацию обычно проводят так, чтобы нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, была встроена на эндогенной плазмиде вирулентности или хромосоме рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, предпочтительно, на эндогенной плазмиде вирулентности, на 3'-конце сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, кодируемого хромосомой или эндогенной плазмидой вирулентности, причем гетерологичный белок, слитый с сигналом доставки, экспрессируется и секретируется.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит делецию хромосомного гена, кодирующего

эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором. В норме ген, кодирующий эндогенный белок, необходимый для роста, на эндогенной плазмиде вирулентности кодирует тот же эндогенный белок, необходимый для роста, который кодируется делетированным хромосомным геном. Предпочтительно, ген, кодирующий эндогенный фермент, необходимый для роста, и расположенный на эндогенной плазмиде вирулентности, содержит его эндогенный промотор и его эндогенный терминатор транскрипции. В случае если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Yersinia, ген, кодирующий эндогенный фермент, необходимый для роста, расположен на эндогенной плазмиде вирулентности pYV и, предпочтительно, содержит его эндогенный промотор и его эндогенный терминатор транскрипции. Ген, кодирующий эндогенный фермент, необходимый для роста, эндогенный промотор и эндогенный терминатор транскрипции, предпочтительно, расположены на расстоянии 122 п.о. в направлении 3'-5' от старта orf155 (SycO) на эндогенной плазмиде вирулентности, например, на pYV. Ген, кодирующий эндогенный фермент, необходимый для роста, эндогенный промотор и эндогенный терминатор транскрипции, обычно заменяет вставку последовательности, обнаруженную в pYVe40, плазмиде вирулентности штаммов Y. enterocolitica MRS40 и E40, но не в pYVe227, плазмиде вирулентности Y. enterocolitica W227O3 (Genbank: AF102990.1).

В случае если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Yersinia, эндогенная плазмида вирулентности представляет собой pYV (plasmid of Yersinia Virulence, плазмида вирулентности Yersinia). В случае если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Salmonella, эндогенное месторасположение для вставки представляет собой один из кластеров генов, называемых SpiI или SpiII (для острова патогенности Salmonella), положение, в котором эффекторный белок кодируется в другом месте или, в качестве альтернативы, одну из плазмид вирулентности Salmonella (SVP).

Предпочтительно, нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, слитый в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, встроена на эндогенной плазмиде вирулентности в нативном сайте бактериального эффекторного белка, например, в нативном сайте фактора вирулентности, предпочтительно, в случае если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Yersinia, - в нативном сайте YopE или другого Yop (YopH, YopO, YopP, YopM, YopT), предпочтительно, в нативном сайте YopE, или в случае если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Salmonella, - в нативном сайте эффекторного белка, кодируемого в SpiI, SpiII или кодируемого в другом месте, предпочтительно, в нативном сайте эффекторного белка, кодируемого в SpiI или SpiII, более предпочтительно, в нативном сайте SopE или SteA. Предпочтительно, нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, слитый в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с нативным промотором бактериального эффекторного белка, присутствующим на эндогенной плазмиде вирулентности, например, в случае если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Yersinia, - с нативным промотором из гена вирулона Yersinia, как указано ниже, более предпочтительно, с нативным промотором YopE или другим промотором Yop (YopH, YopO, YopP, YopM, YopT), предпочтительно, с нативным промотором YopE, или в случае если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Salmonella, - с нативным промотором из острова патогенности SpiI или SpiII или из эффекторного белка, кодируемого в другом месте, как указано ниже, более предпочтительно, с нативным промотором SopE, InvB или SteA.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит делецию хромосомного гена, кодирующего эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором, причем ген, кодирующий эндогенный белок, необходимый для роста, выбран из гена, кодирующего фермент, необходимый для продукции аминокислоты, гена, кодирующего фермент, участвующий в биосинтезе пептидогликана, гена, кодирующего фермент, участвующий в биосинтезе ЛПС, гена, кодирующего фермент, участвующий в синтезе нуклеотида, и гена, кодирующего фактор инициации трансляции.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит делецию хромосомного гена, кодирующего эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором, и причем ген, кодирующий эндогенный фермент, необходимый для роста, представляет собой ген, кодирующий фермент, необходимый для про-

дукции аминокислоты, причем фермент, необходимый для продукции аминокислоты, выбран из группы, состоящей из аспартат-бета-полуальдегид-дегидрогеназы (asd), глутаминсинтетазы (glnA), триптофанил-тРНК-синтетазы (trpS) или серин-гидроксиметил-трансферазы (glyA) или транскетолазы 1 (tktA), транскетолазы 2 (tktB), рибулозофосфат 3-эпимеразы (rpe), рибозо-5-фосфат-изомеразы A (rpiA), трансальдолазы A (talA), трансальдолазы B (talB), фосфорибозилпирофосфатсинтазы (prs), АТФ-фосфорибозилтрансферазы (hisG), бифункционального белка биосинтеза гистидина HisIE (hisI), 1-(5-фосфорибозил)-5-[(5-фосфорибозиламино)метилиденамино]имидазол-4-карбоксамид-изомеразы (hisA), субъединицы HisH имидазолглицеролфосфатсинтазы (hisH), субъединицы HisF имидазолглицеролфосфатсинтазы (hisF), бифункционального белка биосинтеза гистидина HisB (hisB), гистидинолфосфат-аминотрансферазы (hisC), гистидинолдегидрогеназы (hisD), 3-дегидрохинатсинтазы (aroB), 3-дегидрохинатдегидратазы (aroD), шикиматдегидрогеназы (NADP(+)) (aroE), шикиматкиназы 2 (aroL), шикиматкиназы 1 (aroK), 3-фосфошикимат 1-карбоксивинилтрансферазы (aroA), хоризматсинтазы (aroC), P-белка (pheA), T-белка (tyrA), аминотрансферазы ароматических аминокислот (tyrB), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатальдолазы (aroG), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатальдолазы (aroH), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатальдолазы (aroF), хинат/шикимат-дегидрогеназы (ydiB), АТФ-зависимого изофермента 6-фосфофруктокиназы 1 (pfkA), АТФ-зависимого изофермента 6-фосфофруктокиназы 2 (pfkB), фруктозо-бисфосфатальдолазы класса 2 (fbaA), фруктозо-бисфосфат альдолазы класса 1 (fbaB), триозофосфат-изомеразы (tpiA), пируваткиназы I (pykF), пируваткиназы II (pykA), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы A (gapA), фосфоглицераткиназы (pgk), 2,3-бисфосфоглицерат-зависимой фосфоглицератмутазы (gpmA), 2,3-бисфосфоглицерат-независимой фосфоглицератмутазы (gpmM/yibO), предполагаемой фосфоглицератмутазы (ytjC/gpmB), енолазы (eno), D-3-фосфоглицератдегидрогеназы (serA), фосфосеринаминотрансферазы (serC), фосфосеринфосфатазы (serB), L-сериндегидратазы I (sdaA), L-сериндегидратазы 2 (sdaB), L-треониндегидратазы катаболической (tdcB), L-треониндегидратазы биосинтетической (ilvA), L-сериндегидратазы (tdcG), серинацетилтрансферазы (cysE), цистеинсинтазы A (cysK), цистеинсинтазы B (cysM), бета-цистатионазы (malY), цистатионин бета-лиазы (metC), 5-метилтетрагидроптероилтриглутамат-гомоцистеин-метилтрансферазы (metE), метионинсинтазы (metH), S-аденозилметионинсинтазы (metK), цистатионин гамма-синтазы (metB), гомосерин O-сукцинилтрансферазы (metA), 5'-метилтиоаденозин/S-аденозилгомоцистеин-нуклеозидазы (mtnN), S-рибозилгомоцистеинлиазы (luxS), цистатион бета-лиазы, цистатион гамма-лиазы, серин-гидроксиметилтрансферазы (glyA), глицин-гидроксиметилтрансферазы (itaE), малой субъединицы 3-изопропилмалатдегидратазы (leuD), большой субъединицы 3-изопропилмалатдегидратазы (leuC), 3-изопропилмалатдегидрогеназы (leuB), L-треониндегидратазы биосинтетической (ilvA), большой субъединицы изофермента 3 ацетолактатсинтазы (ilvI), малой субъединицы изофермента 3 ацетолактатсинтазы (ilvH), малой субъединицы изофермента 1 ацетолактатсинтазы (ilvN), малой субъединицы изофермента 2 ацетолактатсинтазы (ilvM), кетол-кислотной редуктоизомеразы (NADP(+)) (ilvC), дегидратазы дигидроксикислоты (ilvD), аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью (ilvE), бифункциональной дегидрогеназы аспартокиназы/гомосерина 1 (thrA), бифункциональной дегидрогеназы аспартокиназы/гомосерина 2 (metL), 2-изопропилмалатсинтазы (leuA), глутамат-пируват-аминотрансферазы (alaA), аспартат-аминотрансферазы (aspC), бифункциональной дегидрогеназы аспартокиназы/гомосерина 1 (thrA), бифункциональной дегидрогеназы аспартокиназы/гомосерина 2 (metL), лизин-чувствительной аспартокиназы 3 (lysC), аспартат-полуальдегид-дегидрогеназы (asd), 2-кето-3-дезокси-галактонат-альдолазы (yagE), 4-гидрокси-тетрагидродипиколинатсинтазы (dapA), 4-гидрокси-тетрагидродипиколинат-редуктазы (dapB), 2,3,4,5-тетрагидропиридин-2,6-дикарбоксилат N-сукцинилтрансферазы (dapD), сукцинил-диаминопимелат-десукцинилазы (dapE), диаминопимелат-эпимеразы (dapF), предполагаемой лиазы (yjhH), ацетилорнитин/сукцинилдиаминопимелат-аминотрансферазы (argD), цитратсинтазы (gltA), аконитатгидратазы B (acnB), аконитатгидратазы A (acnA), неохарактеризованной предполагаемой аконитатгидратазы (ybhJ), изоцитратдегидрогеназы (icd), аспартат-аминотрансферазы (aspC), глутамат-пируват-аминотрансферазы (alaA), большой цепи глутаматсинтазы [NADPH] (gltB), малой цепи глутаматсинтазы [NADPH] (gltD), глутаминсинтетазы (glnA), ацетилтрансферазы аминокислот (argA), ацетилглутаматкиназы (argB), N-ацетил-гамма-глутамил-фосфат редуктазы (argC), ацетилорнитин/сукцинилдиаминопимелат-аминотрансферазы (argD), ацетилорнитин-деацетилазы (argE), цепи F орнитинкарбамоилтрансферазы (argF), цепи I орнитинкарбамоилтрансферазы (argI), аргининосукцинатсинтазы (argG), аргининосукцинатлиазы (argH), глутамат 5-киназы (proB), гамма-глутамилфосфатредуктазы (proA), пирролин-5-карбоксилатредуктазы (proC), орнитинциклодеаминазы, лейцин-тРНК лигазы (leuS), глутамин-тРНК лигазы (glnS), серин-тРНК лигазы (serS), бета-субъединицы глицин-tPFIK лигазы (glyS), альфа-субъединицы глицин-тРНК лигазы (glyQ), тирозин-тРНК лигазы (tyrS), треонин-тРНК лигазы (thrS), альфа-субъединицы фенилаланин-тРНК лигазы (pheS), бета-субъединицы фенилаланин-тРНК лигазы (pheT), аргинин-тРНК лигазы (argS), гистидин-тРНК лигазы (hisS), валин-тРНК лигазы (valS), аланин-тРНК лигазы (alaS), изолейцин-тРНК лигазы (ileS), пролин-тРНК лигазы (proS), цистеин-тРНК лигазы (cysS), аспарагин-тРНК лигазы (asnS), аспартат-тРНК лигазы (aspS), глутамат-тРНК лигазы (gltX), триптофан-тРНК лигазы (trpS), бета-субъединицу глицин-тРНК лигазы (glyS), метионин-тРНК лигазы (metG), лизин-тРНК лигазы (lysS). Предпочтительные ферменты, необходимые для продукции аминокислоты, представляют собой

tktA, rpe, prs, aroK, tyrB, aroH, fbaA, gapA, pgk, eno, tdcG, cysE, metK, glyA, asd, dapA/B/D/E/F, argC, proC, leuS, glnS, serS, glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS, proS, cysS, asnS, aspS, gltX, trpS, glyS, metG, lysS, более предпочтительными являются asd, glyA, leuS, glnS, serS, glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS, proS, cysS, asnS, aspS, gltX, trpS, glyS, metG, lysS, наиболее предпочтительным является asd.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит модуляцию в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC. Модуляция в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC, может представлять собой делецию, вставку или замену в термочувствительной области РНК. Делеция или вставка обычно включает делецию или вставку одного или нескольких, предпочтительно, от приблизительно 30 до приблизительно 100 нуклеотидов, более предпочтительно, от приблизительно 40 до приблизительно 60 нуклеотидов. Замена обычно включает замену одного или нескольких, предпочтительно, от приблизительно 3 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно, от приблизительно 3 до приблизительно 15 нуклеотидов. Предпочтительно, модуляция в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC, представляет собой делецию, предпочтительно, делецию от приблизительно 30 до приблизительно 100 нуклеотидов, более предпочтительно, от приблизительно 40 до приблизительно 60 нуклеотидов в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC. Эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC и термочувствительная область РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего ДНК-связывающий белок типа AraC, обычно расположены на эндогенной плазмиде вирулентности, содержащейся в рекомбинантном аттенуированном по вирулентности грамотрицательном штамме бактерий. ДНК-связывающий белок типа AraC, предпочтительно, выбран из группы, состоящей из VirF, LcrF, MxiE, ExsA, PerA, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD и InvF. Более предпочтительно, ДНК-связывающий белок типа AraC выбран из группы, состоящей из VirF и LcrF. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой Yersinia enterolitica, и ДНК-связывающий белок типа AraC представляет собой VirF.

Предпочтительно, модуляция в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC, включает модуляцию, которая нарушает шпильку РНК, предпочтительно, шпильку I, в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC. Более предпочтительно, модуляция в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC, включает делецию, которая устраняет шпилечную структуру РНК или ее части, предпочтительно, части шпильки I, в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC. Делеция, которая устраняет шпилечную структуру РНК или ее части, обычно включает делецию от приблизительно 30 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно, от приблизительно 40 до приблизительно 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой Yersinia enterolitica, и делеция включает делецию нуклеотидов в положении от -111 до -57 в направлении 3'-5' кодирующей последовательности virF (где -1 представляет собой 1 основание в направлении 3'-5' от основания A стартового кодона ATG кодирующей последовательности virF).

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий выбран из группы, состоящей из родов Yersinia, Escherichia, Salmonella и Pseudomonas. В одном варианте реализации рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий выбран из группы, состоящей из родов Yersinia и Salmonella. Предпочтительно, рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Yersinia, более предпочтительно, штамм Yersinia enterocolitica. Наиболее предпочтительным является Yersinia enterocolitica E40 (0:9, биотип 2)[19] или его чувствительные к ампициллину производные, такие как Y. enterocolitica MRS40 (также называемый Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40), описанные в публикации[20]. Y. enterocolitica E40 и его производное Y. enterocolitica MRS40, описанные в публикации [20], являются идентичными Y. enterocolitica подвид palearctica E40 и его производному Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40, описанным в публикациях[15,17,21] Также предпочтительно рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Salmonella, более предпочтительно, штамм Salmonella enterica. Наиболее предпочтительным является Salmonella enterica серовар Тифимуриум SL1344, описанный в коллекции культур Управления здравоохранения Англии (NCTC 13347).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм, который не продуцирует сидерофор, например, является дефицитным по продукции сидерофора, предпочтительно, не продуцирует сидерофоры, например, является дефицитным по продукции любого сидерофора. Такой штамм представляет собой, например, Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40, описанный в публикациях[15,17,20,21], который не продуцирует иерсиниабактин и который является предпочтительным.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнал доставки из бактериального эффекторного белка содержит бактериальный эффекторный белок или его N-концевой фрагмент, предпочтительно, бактериальный эффекторный белок, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток, или его N-концевой фрагмент.

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнал доставки из бактериального эффекторного белка представляет собой эффекторный белок бактериальной T3SS, включающий эффекторный белок бактериальной T3SS или его N-концевой фрагмент, причем эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент может содержать сайт связывания шаперонов. Эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, который содержит сайт связывания шаперонов, является в особенности подходящим в качестве сигнала доставки в настоящем изобретении. Предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из

SopE, SopE2, SptP, YopE,

ExoS, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SseJ, Sse, SrfH,

YopJ, AvrA, AvrBsT, YopT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map,

OspG, OspI, IpaH, SspH1,VopF, ExoS, ExoT, HopAB2, XopD, AvrRpt2, HopAO1,

HopPtoD2, HopU1, белков семейства GALA, AvrBs2, AvrD1, AvrBS3, YopO,
YopP, YopE, YopM, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1,

OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto,

AvrPpiBPto, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN,

PopB, PopP2, AvrBs3, XopD и AvrXv3.

Более предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из

SopE, SptP, YopE, ExoS, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO,

YopP, YopE, YopM, YopT,

из которых наиболее предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из IpgB1, SopE, SopB, SptP, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, в частности, YopE или его N-концевого фрагмента.

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

SopE, SopE2, SptP, SteA,

SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SifB, SseJ, Sse, SrfH,

YopJ, AvrA, AvrBsT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG,

OspI, IpaH, VopF, ExoS, ExoT, HopAB2, AvrRpt2, HopAO1, HopU1, белков

семейства GALA, AvrBs2, AvrD1, YopO, YopP, YopE, YopT, EspG, EspH, EspZ,

IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD,

AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto, AvrPpiBPto, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA,

AvrRpm1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD и

AvrXv3.

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

SopE, SptP,

SteA, SifB, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE,

YopT,

среди которых в равной степени наиболее предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из

IpgB1, SopE, SopB, SptP, SteA, SifB, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE и YopT,

в частности, SopE, SteA или YopE или их N-концевых фрагментов, более конкретно, SteA или YopE или их N-концевых фрагментов, наиболее конкретно, YopE или его N-концевого фрагмента.

В некоторых вариантах реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей бактериальный эффекторный белок или его N-концевой фрагмент, причем его N-концевой фрагмент содержит по меньшей мере первые 10, предпочтительно, по меньшей мере первые 20, более предпочтительно, по меньшей мере первые 100 аминокислот эффекторного белка бактериальной T3SS.

В некоторых вариантах реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка кодируется нуклеотидной последовательностью, содержащей эффекторный белок бактериальной T3SS или его N-концевой фрагмент, причем эффекторный белок бактериальной T3SS или его N-концевой фрагмент содержит сайт связывания шаперонов.

Предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты, которые содержат сайт связывания шаперонов, включают следующие комбинации сайта связывания шаперонов и эффекторного белка T3SS или его N-концевого фрагмента SycE-YopE, InvB-SopE, SicP-SptP, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpcS-ExoS, CesF-EspF, SycD-YopB, SycD-YopD. Более предпочтительными являются SycE-YopE, InvB-SopE, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpcS-ExoS, CesF-EspF.

Наиболее предпочтительным является YopE или его N-концевой фрагмент, содержащий сайт связывания шаперонов SycE, такой как N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий N-концевые 138 аминокислот эффекторного белка YopE, обозначаемый в настоящем документе как $YopE_{1-138}$ и представленный в SEQ ID NO: 2, или SopE или его N-концевой фрагмент, содержащий сайт связывания шаперонов InvB, такой как N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий N-концевые 81 или 105 аминокислот эффекторного белка SopE, обозначаемый в настоящем документе как $SopE_{1-81}$ или $SopE_{1-105}$, соответственно, и представленный в SEQ ID NO: 6 и 7.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Yersinia, и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка содержит эффекторный белок YopE или его N-концевую часть, предпочтительно, эффекторный белок YopE Y. enterocolitica или его N-концевую часть. Предпочтительно, сайт связывания SycE содержится в N-концевой части эффекторного белка YopE. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE может содержать N-концевые 12, 16, 18, 52, 53, 80 или 138 аминокислот[22,24]. Наиболее предпочтительным является N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий N-концевые 138 аминокислот эффекторного белка YopE, например, как описано в публикации Forsberg and Wolf-Watz[25], обозначаемый в настоящем документе как $YopE_{1-138}$ и представленный в SEQ ID NO: 2.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Salmonella, и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, кодируемый нуклеотидной последовательностью, содержит эффекторный белок SopE или SteA или его N-концевую часть, предпочтительно, эффекторный белок SopE или SteA Salmonella enterica или его N-концевую часть. Предпочтительно, сайт связывания шаперонов содержится в N-концевой части эффекторного белка SopE. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE может содержать N-концевые 81 или 105 аминокислот. Наиболее предпочтительным является полноразмерный SteA (SEQ ID NO: 5) и N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий N-концевые 105 аминокислот эффекторного белка, например, как описано в SEQ ID NO: 7.

Специалисту в данной области техники известны способы идентификации полипептидных последовательностей эффекторного белка, которые способны доставлять белок. Например, один такой способ описан в публикации Sory et al. [19]. Вкратце, полипептидные последовательности, например, из различных частей белков Yop, можно слить в рамке с репортерным ферментом, таким как активируемый кальмодулином аденилатциклазный домен (или Cya) циклолизина Bordetella pertussis. Доставка гибридного белка Yop-Cya в цитозоль эукариотических клеток отмечается появлением циклазной активности в инфицированных эукариотических клетках, которая приводит к накоплению цАМФ. Применяя такой подход, специалист в данной области техники может при необходимости определить минимальное требование к последовательности, т.е. непрерывную аминокислотную последовательность наиболее короткой длины, которая способна доставлять белок, см., например, публикацию[19]. Соответственно, предпочтительные сигналы доставки согласно настоящему изобретению состоят из по меньшей мере минимальной последовательности аминокислот эффекторного белка T3SS, которая способна доставлять белок.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложен рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, который является дефицитным по продук-

ции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, более предпочтительно, который является дефицитным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток, еще более предпочтительно, который является дефицитным по продукции по меньшей мере одного эффекторного белка T3SS, наиболее предпочтительно, который является дефицитным по продукции по меньшей мере одного эффекторного белка T3SS, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные аттенуированные по вирулентности грамотрицательные штаммы бактерий являются дефицитными по продукции по меньшей мере одного, предпочтительно, по меньшей мере двух, более предпочтительно, по меньшей мере трех, еще более предпочтительно, по меньшей мере четырех, в частности, по меньшей мере пяти, более конкретно, по меньшей мере шести, наиболее конкретно, всех бактериальных эффекторных белков, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные аттенуированные по вирулентности грамотрицательные штаммы бактерий являются дефицитными по продукции по меньшей мере одного, предпочтительно, по меньшей мере двух, более предпочтительно, по меньшей мере трех, еще более предпочтительно, по меньшей мере четырех, в частности, по меньшей мере пяти, более конкретно, по меньшей мере шести, наиболее конкретно, всех функциональных бактериальных эффекторных белков, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток, так, что полученный в результате рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий продуцирует меньше бактериальных эффекторных белков или продуцирует бактериальные эффекторные белки в меньшей степени по сравнению с грамотрицательным штаммом бактерий дикого типа, не аттенуированным по вирулентности, т.е. по сравнению с грамотрицательным штаммом бактерий дикого типа, который в норме продуцирует бактериальные эффекторные белки, или так, что полученный в результате рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий больше не продуцирует какие-либо функциональные бактериальные эффекторные белки, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток.

Согласно настоящему изобретению такой мутантный грамотрицательный штамм бактерий, т.е. такой рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, который является дефицитным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, например, который является дефицитным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток, например, такой мутантный штамм Yersinia может быть получен посредством введения по меньшей мере одной мутации в по меньшей мере один ген, кодирующий эффектор. Предпочтительно, такие гены, кодирующие эффектор, включают YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopP/YopJ и YopT, если речь идет о штамме Yersinia. Предпочтительно, такие гены, кодирующие эффектор, включают

AvrA, CigR, GogB, GtgA, GtgE, PipB, SifB,

SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopB/SigD, SopA, SpiC/SsaB, SseB,

SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SopD, SopE, SopE2, SspH1, SspH2, PipB2, SifA,

SopD2, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SteC, SteA, SteB, SteD, SteE, SpvB, SpvC,

SpvD, SrfJ, SptP,

если речь идет о штамме Salmonella. Наиболее предпочтительно, все гены, кодирующие эффектор, делетированы. Специалист в данной области техники может применять любое количество стандартных методик для получения мутаций в данных эффекторных генах T3SS. В руководстве Sambrook et al. в общем виде описаны данные методики. См. руководство Sambrook et al.[26]. Согласно настоящему изобретению мутацию можно ввести в области промотора гена, кодирующего эффектор, так, чтобы экспрессия такого эффекторного гена была устранена.

Мутацию также можно ввести в кодирующую область гена, кодирующего эффектор, так, чтобы каталитическая активность кодируемого эффекторного белка была устранена. "Каталитическая активность" эффекторного белка обычно обозначает функцию эффекторного белка, направленную на клетку-мишень, т.е. токсичность. Такая активность регулируется каталитическими мотивами в каталитическом домене эффекторного белка. Подходы для идентификации каталитического домена и/или каталитических мотивов эффекторного белка хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, публикации[27,28].

Соответственно, одна предпочтительная мутация согласно настоящему изобретению представляет собой делецию всего каталитического домена. Другая предпочтительная мутация представляет собой мутацию со сдвигом рамки считывания в гене, кодирующем эффектор, так, что каталитический домен не присутствует в белковом продукте, экспрессированном с такого гена "со сдвигом рамки считывания". Наиболее предпочтительная мутация представляет собой мутацию с делецией всей кодирующей области эффекторного белка. Настоящим изобретением также предусмотрены другие мутации, такие как небольшие делеции или замены пар оснований, которые вводят в каталитические мотивы эффекторного белка и которые приводят в нарушению каталитической активности данного эффекторного белка.

Мутации, которые получают в генах функциональных бактериальных эффекторных белков, можно ввести в конкретный штамм с помощью множества способов. Один из таких способов включает клонирование мутированного гена в векторе-"самоубийце", который способен вводить мутированную последовательность в штамм в результате аллельного обмена. Пример такого вектора-"самоубийцы" описан в публикации[29].

Таким образом, мутации, полученные во множестве генов, можно последовательно ввести в грамотрицательный штамм бактерий, получая полимутантный, например, шестикратно мутантный рекомбинантный штамм. Порядок, в котором вводят данные мутантные последовательности, неважен. При определенных условиях может быть желательно получить мутации только некоторых, но не всех эффекторных генов. Соответственно, в настоящем изобретении также предусмотрен полимутантный Yersinia, отличный от шестикратно мутантного Yersinia, например, двукратно мутантный, трехкратно мутантный, четырехкратно мутантный и пятикратно мутантные штаммы. Для цели доставки белков система секреции и транслокации настоящего мутантного штамма должна быть интактной.

Предпочтительный рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий согласно настоящему изобретению представляет собой шестикратно мутантный штамм Yersinia, в котором все гены, кодирующие эффектор, мутированы так, что полученный в результате Yersinia больше не продуцирует каких-либо функциональных эффекторных белков. Такой шестикратно мутантный штамм Yersinia обозначают как ΔyopH,O,P,E,M,T для Y. enterocolitica. В качестве примера, такой шестикратный мутант может быть получен из штамма MRS40 Y. enterocolitica с получением Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T (также называемого в настоящем документе Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T или Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T), который является предпочтительным. Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, который является дефицитным по продукции иерсиниабактина, был описан в публикации WO02077249 и был депонирован 24ого сентября 2001 года согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в бельгийских Согласованных коллекциях микроорганизмов (BCCM); данному штамму был присвоен учетный номер LMG P-21013.

Более предпочтительным является Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, который содержит делецию на эндогенной плазмиде вирулентности pYV, устраняющую шпилечную структуру РНК или ее части, такую как делеция шпильки I (Hairpin I) в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC (ΔHairpinI-virF), такой как Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHairpinI-virF (также называемый Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHairpinI-virF). В равной степени предпочтительным является Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, который содержит делецию хромосомного гена, кодирующего asd, и эндогенную плазмиду вирулентности pYV, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий asd, функционально связанный с промотором (pYV-asd), такой как Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd (также называемый в настоящем документе Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Aasd pYV-asd). В особенности предпочтительным является Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHairpinI-virF pYV-asd, который содержит обе модификации, описанные выше (также называемый в настоящем документе Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Aasd ΔHairpinI-virF pYV-asd). В особенности предпочтительными штаммами являются Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHairpinI-virF (также называемый Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHairpinI-virF), Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd (также называемый в настоящем документе Y. Enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd) или Y. enterocolitica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHairpinI-virF pYV-asd (также называемый в настоящем документе Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHairpinI-virF pYV-asd), которые являются дефицитными по продукции сидерофора, предпочтительно, не продуцируют сидерофоры, например, являются дефицитными по продукции любого сидерофора, как в случае всех штаммов Y. enterocolitica подвид palearctica. Таким образом, в равной степени в особенности предпочтительными штаммами являются Y. enterocolitica подвид palearctica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHairpinI-virF (также называемый Y. enterocolitica подвид palearctica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHairpinI-virF), Y. enterocolitica подвид palearctica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd, также называемый в настоящем документе Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd) или Y. enterocolitica подвид palearctica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHairpinI-virF pYV-asd (также называемый в настоящем документе Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHairpinI-virF pYV-asd).

Нуклеотидные молекулы, такие как векторы, которые можно применять согласно настоящему изобретению для трансформации грамотрицательного штамма бактерий, могут зависеть от используемых грамотрицательных штаммов бактерий, как известно специалисту. Нуклеотидные молекулы, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают векторы экспрессии (включая синтетические или полученные иным способом модифицированные версии эндогенных плазмид вирулентности), векторы для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности и нуклеотидные последовательности, такие как, например, фрагменты ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности. Векторы экспрессии, которые являются подходящими, например, в штаммах Yersinia, Es-

cherichia, Salmonella или Pseudomonas, представляют собой, например, плазмиды pUC, pBad, pACYC, pUCP20 и pET. Векторы для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности, которые являются подходящими, например, в штамме Yersinia, Escherichia, Salmonella или Pseudomonas, представляют собой, например, pKNG101. Фрагменты ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности обозначают способы, применяемые, например, в штамме Yersinia, Escherichia, Salmonella или Pseudomonas, как, например, генетическая инженерия лямбда-red. Векторы для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности либо фрагменты ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности могут встраивать нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению так, что, например, нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, слитая в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с эндогенным промотором рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий. Таким образом, если применяют вектор для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности либо фрагмент ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности, эндогенный промотор может кодироваться на эндогенной бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной ДНК), и только соответствующая нуклеотидная последовательность будет обеспечена сконструированным вектором для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности либо фрагментом ДНК для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности. В качестве альтернативы, если применяют вектор для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности либо нуклеотидную молекулу, такую как, например, нуклеотидная последовательность для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности, эндогенный промотор и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка может кодироваться на эндогенной бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной ДНК), и только нуклеотидная молекула, такая как, например, нуклеотидная последовательность, кодирующая гетерологичный белок, будет обеспечена вектором для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности либо нуклеотидной молекулой, такой как, например, нуклеотидная последовательность для хромосомной вставки или вставки плазмиды вирулентности. Таким образом, не требуется, чтобы промотор обязательно содержался в векторе, применяемом для трансформации рекомбинантных аттенуированных по вирулентности грамотрицательных штаммов бактерий, т.е. рекомбинантные аттенуированные по вирулентности грамотрицательные штаммы бактерий согласно настоящему изобретению могут быть трансформированы вектором, который не содержит промотор.

В предпочтительном варианте реализации нуклеотидная молекула, например, вектор согласно настоящему изобретению, содержит в направлении от 5' к 3'

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

вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом указанной первой нуклеотидной последовательности.

Предпочтительный вектор, например, предпочтительный вектор экспрессии для Yersinia, выбран из группы, состоящей из pBad_Si_1 и pBad_Si_2. pBad_Si2 был сконструирован путем клонирования фрагмента SycE-$YopE_{1-138}$, содержащего эндогенные промоторы для YopE и SycE, из очищенного pYV40 в сайт KpnI/HindIII pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BgIII pBad-MycHisA путем расщепления, обработку фрагментом Кленова и повторное лигирование. Дополнительно на 3'-конце $YopE_{1-138}$ были добавлены следующие сайты расщепления: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII). pBad_Si1 аналогичен pBad_Si2, но кодирует EGFP, амплифицированный из pEGFP-C1 (Clontech) в сайте NcoI/BgIII под контролем индуцибельного арабинозой промотора. В равной степени предпочтительным является применение модифицированных версий эндогенной плазмиды вирулентности Yersinia pYV, кодирующих гетерологичные белки в виде слияний с сигнальной последовательностью T3SS.

Предпочтительный вектор, например, предпочтительный вектор экспрессии для Salmonella, выбран из группы, состоящей из pSi_266, pSi_267, pSi_268 и pSi_269. Плазмиды pSi_266, pSi_267, pSi_268 и pSi_269, содержащие соответствующий эндогенный промотор и фрагмент $SteA_{1-20}$ (pSi_266), полноразмерную последовательность SteA (pSi_267), фрагмент $SopE_{1-81}$ (pSi_268) или фрагмент $SopE_{1-105}$ (pSi_269), амплифицировали из геномной ДНК S. enterica SL1344 и клонировали в сайт NcoI/KpnI pBad-MycHisA (Invitrogen).

Нуклеотидные молекулы, например, векторы согласно настоящему изобретению, могут содержать другие элементы последовательности, такие как 3'-последовательность терминации (включая стоп-кодон и последовательность поли-А), или ген, предоставляющий лекарственную устойчивость, который позволяет проводить селекцию трансформантов, получивших настоящий вектор.

Рекомбинантные аттенуированные по вирулентности грамотрицательные штаммы бактерий можно трансформировать нуклеотидными молекулами, например, векторами согласно настоящему изобретению, множеством известных способов. Для целей настоящего изобретения способы трансформации с целью введения вектора включают, без ограничения, электропорацию, трансформацию, опосредованную фосфатом кальция, конъюгацию или их комбинации. Например, нуклеотидными молекулами, например,

вектором, можно трансформировать первый штамм бактерий с помощью стандартной процедуры электропорации. Затем такие нуклеотидные молекулы, например, вектор, могут быть перенесены из первого штамма бактерий в желаемый штамм с помощью конъюгации, процесса, также называемого "мобилизацией". Трансформант (т.е. грамотрицательные штаммы бактерий, захватившие вектор) можно отобрать, например, с помощью антибиотиков. Данные методики хорошо известны в данной области техники. См., например, публикацию[19].

Согласно настоящему изобретению промотор, функционально связанный с бактериальным эффекторным белком рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий согласно настоящему изобретению, может представлять собой нативный промотор эффекторного белка T3SS соответствующего штамма или совместимого штамма бактерий либо промотор, применяемый в векторах экспрессии, которые являются подходящими, например, в штамме Yersinia, Escherichia, Salmonella или Pseudomonas, например, pUC и pBad. Такие промоторы представляют собой промотор T7, промотор Plac или индуцибельный арабинозой промотор Ara-bad. Если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Yersinia, промотор может быть получен из гена вирулона Yersinia. "Ген вирулона Yersinia" обозначает гены на плазмиде pYV Yersinia, экспрессия которых контролируется как температурой, так и осуществлением контакта с клеткой-мишенью. Такие гены включают гены, кодирующие элементы аппарата секреции (гены Ysc), гены, кодирующие транслокаторы (YopB, YopD и LcrV), гены, кодирующие контрольные элементы (YopN, TyeA и LcrG), гены, кодирующие эффекторные шапероны T3SS (SycD, SycE, SycH, SycN, SycO и SycT), и гены, кодирующие эффекторы (YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopT и YopP/YopJ), а также другие белки, кодируемые pYV, такие как VirF и YadA.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор T3SS. Если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Yersinia, промотор выбран из любого одного из YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM и YopP/YopJ. Более предпочтительно, промотор получен из YopE или SycE. Наиболее предпочтительным является промотор YopE.

Если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Salmonella, промотор может быть получен из острова патогенности SpiI или SpiII или из эффекторного белка, кодируемого в другом месте. Такие гены включают гены, кодирующие элементы аппарата секреции, гены, кодирующие транслокаторы, гены, кодирующие контрольные элементы, гены, кодирующие эффекторные шапероны T3SS, и гены, кодирующие эффекторы, а также другие белки, кодируемые SPI-1 или SPI-2. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор T3SS. Если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Salmonella, промотор выбран из любого одного из эффекторных белков. Более предпочтительно, промотор получен из SopE, InvB или SteA. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой искусственно индуцируемый промотор, такой как, например, индуцибельный арабинозой промотор, который является предпочтительным. В данном случае бактерии обычно обеспечивают арабинозой, которая затем индуцирует бактериальную экспрессию белка, подлежащего доставке.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт расщепления протеазы. Сайт расщепления протеазы обычно расположен на нуклеотидной молекуле, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, между нуклеотидной последовательностью, кодирующей гетерологичный белок, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнал доставки. Получение функционального и в общем виде применимого сайта расщепления позволяет отщеплять сигнал доставки после транслокации. Поскольку сигнал доставки может препятствовать правильной локализации и/или функционированию транслоцированного белка в клетках-мишенях, введение сайта расщепления протеазы между сигналом доставки и белком, представляющим интерес, обеспечивает доставку в эукариотические клетки практически нативных белков. Предпочтительно, сайт расщепления протеазы представляет собой аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой или ее каталитическими доменами, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкая цепь), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы риновируса человека 3C, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактор Xa и тромбина, более предпочтительно, аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой TEV. В равной степени предпочтительный сайт расщепления протеазы представляет собой аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой или ее каталитическими доменами, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкая цепь), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы риновируса человека 3C, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактор Xa, убиквитин-процессирующей протеазы, называемой деубиквитинизирующими ферментами, и тромбина. Наиболее предпочтительным является аминокислотный мотив, кото-

рый расщепляется протеазой TEV или убиквитин-процессирующей протеазой. Таким образом, в следующем варианте реализации настоящего изобретения гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка протеазой. Предпочтительными способами отщепления являются способы, в которых:

a) протеаза транслоцируется в эукариотическую клетку рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий, как описано в настоящем документе, который экспрессирует слитый белок, содержащий сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, и протеазу в качестве гетерологичного белка; или

b) протеаза экспрессируется конститутивно или временно в эукариотической клетке.

Обычно рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, применяемый для доставки желаемого белка в эукариотическую клетку, и рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, транслоцирующий протеазу в эукариотическую клетку, являются различными.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу для мечения или акцепторный сайт для молекулы для мечения. Дополнительная нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу для мечения или акцепторный сайт для молекулы для мечения, обычно слита с 5'-концом или с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок. Предпочтительная молекула для мечения или акцепторный сайт для молекулы для мечения выбраны из группы, состоящей из усиленного зеленого флуоресцентного белка (enhanced green fluourescent protein, EGFP), кумарина, акцепторного сайта кумаринлигазы, резоруфина, акцепторного сайта резоруфинлигазы, тетрацистеинового мотива, применяемого с красителем FlAsH/ReAsH (Life Technologies). Наиболее предпочтительным является резоруфин и акцепторный сайт резоруфинлигазы или EGFP. Применение молекулы для мечения или акцепторного сайта для молекулы для мечения приведет к присоединению молекулы для мечения к гетерологичному белку, представляющему интерес, который затем будет доставлен в таком виде в эукариотическую клетку и сделает возможным отслеживание белка, например, с помощью микроскопии живых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидную метку. Дополнительная нуклеотидная последовательность, кодирующая пептидную метку, обычно слита с 5'-концом или с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок.

Предпочтительная пептидная метка выбрана из группы, состоящей из метки Myc, метки His, метки Flag, метки HA, метки Strep или метки V5 или комбинации двух или более меток из данной группы. Наиболее предпочтительными являются метка Myc, метка Flag, метка His и сочетание меток Myc и His. Применение пептидной метки обеспечит возможность отслеживать меченный белок, например, с помощью иммунофлуоресценции или вестерн-блоттинга с применением антител против метки. Дополнительно применение пептидной метки позволяет проводить аффинную очистку желаемого белка после секреции в супернатант культуры или после транслокации в эукариотические клетки, в обоих случаях с применением способа очистки, подходящего для соответствующей метки (например, металл-хелатной аффинной очистки при применении с меткой His или очистки на основе антитела против Flag при применении с меткой Flag).

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит дополнительную нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнал внутриядерной локализации (nuclear localization signal, NLS). Дополнительная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал внутриядерной локализации (NLS), обычно слита с 5'-концом или с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок, причем указанная дополнительная нуклеотидная последовательность кодирует сигнал внутриядерной локализации (NLS). Предпочтительный NLS выбран из группы, состоящей из NLS большого Т-антигена SV40 и его производных[30], а также других вирусных NLS. Наиболее предпочтительным является NLS большого Т-антигена SV40 и его производные.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий содержит сайт множественного клонирования. Сайт множественного клонирования обычно расположен на 3'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, и/или на 5'-конце или 3'-конце нуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичный белок. В векторе может содержаться один или более одного сайта множественного клонирования. Предпочтительный сайт множественного клонирования выбран из группы рестрикционных ферментов, состоящей из XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, Sad, SalI, BstBI. Наиболее предпочтительными являются XbaI, XhoI, BstBI и HindIII.

Слитый белок, экспрессируемый рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий согласно настоящему изобретению, также обозначают как "слитый белок"

или "гибридный белок", т.е. слитый белок или гибрид сигнала доставки и гетерологичного белка. Слитый белок может также содержать, например, сигнал доставки и два или более различных гетерологичных белков.

В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения рака у субъекта, например, лечения злокачественных солидных опухолей, включающие доставку гетерологичных белков, как описано в настоящем документе выше, в раковые клетки, например, в клетки злокачественной солидной опухоли. Белки можно доставить, т.е. транслоцировать в раковую клетку, например, в клетки злокачественной солидной опухоли, во время введения рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий субъекту, или их можно доставить, т.е. транслоцировать в раковую клетку, например, в клетки злокачественной солидной опухоли, в более позднее время, например, после того, как рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий достигнет раковой клетки, например, участка злокачественной солидной опухоли, и/или достигнет раковой клетки, например, участка злокачественной солидной опухоли, и реплицируется, как описано выше. Время доставки можно регулировать, например, с помощью промотора, который применяют для экспрессии гетерологичных белков в рекомбинантном аттенуированном по вирулентности грамотрицательном штамме бактерий. В первом случае гетерологичным белком может управлять конститутивный промотор или, более предпочтительно, эндогенный промотор бактериального эффекторного белка. В случае отсроченной доставки белков гетерологичным белком может управлять искусственно индуцируемый промотор, такой как индуцибельный арабинозой промотор. В данном случае после того, как бактерии достигли желаемого участка и накопились в нем, субъекту будут вводить арабинозу. Затем арабиноза индуцирует бактериальную экспрессию белка, подлежащего доставке.

Таким образом, в одном варианте реализации способ лечения рака включает:

i) культивирование рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, как описано в настоящем документе;

ii) введение субъекту указанного рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий посредством осуществления контакта раковой клетки с рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий по п. i), причем слитый белок, который содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, экспрессируется рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий и транслоцируется в раковую клетку; и необязательно

iii) расщепление слитого белка так, что гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка внутри раковой клетки, причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

Раковые клетки для доставки гетерологичных белков обычно представляют собой раковые клетки от типов рака, выбранных из несолидных опухолей, выбранных из группы, состоящей из саркомы, лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, типов рака центральной нервной системы и злокачественных солидных опухолей, которые включают, без ограничения, абнормальную массу клеток, которые могут происходить из различных типов тканей, таких как печень, толстая кишка, ободочная и прямая кишка, кожа, молочная железа, поджелудочная железа, шейка матки, тело матки, мочевой пузырь, желчный пузырь, почки, гортань, губа, полость рта, пищевод, яичник, предстательная железа, желудок, яички, щитовидная железа или легкие, и, таким образом, включают злокачественные солидные опухоли печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишок, кожи, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почек, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной железы, желудка, яичек, щитовидной железы или легких. Предпочтительно, раковые клетки для доставки гетерологичных белков представляют собой злокачественные солидные опухоли.

Таким образом, в одном предпочтительном варианте реализации рак представляет собой злокачественную солидную опухоль, и способ включает:

i) культивирование рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, как описано в настоящем документе;

ii) введение субъекту указанного рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий посредством осуществления контакта клетки злокачественной солидной опухоли с рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий по п. i), причем слитый белок, который содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, экспрессируется рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий и транслоцируется в клетку злокачественной солидной опухоли; и необязательно

iii) расщепление слитого белка так, что гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка внутри клетки злокачественной солидной опухоли,

причем рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере два слитых белка, каждый из которых содер-

жит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, экспрессируются рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий и транслоцируются в эукариотическую клетку, например, раковую клетку, способами согласно настоящему изобретению.

Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий можно культивировать так, чтобы экспрессировался слитый белок, который содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, согласно способам, известным в данной области техники (например, см. публикацию FDA, Bacteriological Analytical Manual (BAM), chapter 8: Yersinia enterocolitica). Предпочтительно, рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий можно культивировать в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, например, при температуре 28°C. Для индукции экспрессии T3SS и, например, генов, зависимых от промотора YopE/SycE, бактерии можно выращивать при температуре 37°C. В одном варианте реализации осуществляют контакт раковой клетки, например, клетки злокачественной солидной опухоли, с двумя рекомбинантными аттенуированными по вирулентности грамотрицательными штаммами бактерий по п. i), причем первый рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий экспрессирует первый слитый белок, который содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и первый гетерологичный белок, а второй рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий экспрессирует второй слитый белок, который содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и второй гетерологичный белок, так, что первый и второй слитый белок транслоцируются в клетку злокачественной солидной опухоли. Данный вариант реализации обеспечивает коинфекцию раковой клетки, например, клетки злокачественной солидной опухоли, двумя штаммами бактерий в качестве надежного способа для доставки, например, двух различных гибридных белков в отдельные клетки для направления их функционального взаимодействия.

Специалисты в данной области техники могут также применять множество вариантов анализа для определения того, была ли доставка слитого белка успешной. Например, слитый белок можно обнаружить с помощью иммунофлуоресценции с применением антител, распознающих слитую метку (такую как метка Myc). Определение также может основываться на ферментативной активности белка, доставку которого проводят, например, как в анализе, описанном в публикации[19].

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, как описано в настоящем документе, необязательно содержащая подходящий фармацевтически приемлемый носитель. Таким образом, в настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, как описано в настоящем документе, для применения в способе лечения рака, например, злокачественной солидной опухоли у субъекта.

Рекомбинантные аттенуированные по вирулентности грамотрицательные бактерии могут быть приготовлены для удобного и эффективного введения в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта, в виде фармацевтической композиции с подходящим фармацевтически приемлемым носителем. Единичная лекарственная форма рекомбинантных аттенуированных по вирулентности грамотрицательных бактерий или фармацевтической композиции, подлежащей введению, может, например, содержать рекомбинантные аттенуированные по вирулентности грамотрицательные бактерии в количестве от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий на 1 мл, предпочтительно, от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий на 1 мл, более предпочтительно, от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий на 1 мл, наиболее предпочтительно, приблизительно 10^8 бактерий на 1 мл.

Под "количеством, достаточным для лечения субъекта", или "эффективным количеством", которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо, подразумевают количество бактерии или бактерий, достаточно высокое, чтобы в значительной степени положительно изменить состояние, лечение которого проводят, но достаточно низкое, чтобы избежать серьезных побочных эффектов (при обоснованном соотношении польза/риск), в рамках здравого медицинского суждения. Эффективное количество бактерии будет варьировать в зависимости от конкретной поставленной цели, возраста и физического состояния субъекта, лечение которого проводят, длительности лечения, природы сопутствующей терапии и конкретной применяемой бактерии. Эффективное количество бактерии будет, таким образом, представлять собой минимальное количество, которое обеспечит желаемый эффект. Обычно субъекту вводят количество от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий, например, от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий/м^2 поверхности тела, предпочтительно, от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий, например, от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий/м^2 поверхности тела, более предпочтительно, от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий, например, от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий/м^2 поверхности тела, наиболее предпочтительно, 10^8 бактерий, например, 10^8 бактерий/м^2 поверхности тела.

Однократная доза рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий для введения субъекту, например, человеку, для лечения рака, например, злокачественной солидной опухоли, составляет обычно от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{10} бактерий,

например, от приблизительно 10^4 бактерий/м^2 поверхности тела до приблизительно 10^{10} бактерий/м^2 поверхности тела, предпочтительно, от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий, например, от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий/м^2 поверхности тела, более предпочтительно, от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий, например, от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий/м^2 поверхности тела, еще более предпочтительно, от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий, например, от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий/м^2 поверхности тела, наиболее предпочтительно, 10^8 бактерий, например, 10^8 бактерий/м^2 поверхности тела суммарных рекомбинантных аттенуированных по вирулентности грамотрицательных бактерий.

Примеры веществ, которые могут выступать в качестве фармацевтических носителей, представляют собой сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетаты целлюлозы; порошковый трагакант; солод; желатин; тальк; стеариновые кислоты; стеарат магния; сульфат кальция; карбонат кальция; растительные масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао-бобов; многоатомные спирты, такие как пропиленгликоль, глицерин, сорбитол, маннитол и полиэтиленгликоль; агар; альгиновые кислоты; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; экстракты клюквы и фосфатный буферный раствор; обезжиренное сухое молоко; а также другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах, такие как, например, витамин С, эстроген и эхинацея. Также могут присутствовать смачивающие средства и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия, а также красящие средства, ароматизирующие вещества, смазывающие вещества, вспомогательные вещества, вещества, способствующие таблетированию, стабилизаторы, антиоксиданты и консерванты.

Способы введения рекомбинантных аттенуированных по вирулентности грамотрицательных бактерий субъекту можно выбрать из группы, состоящей из внутривенного, внутриопухолевого, интраперитонеального и перорального введения. Несмотря на то, что настоящее изобретение не предназначено быть ограниченным каким-либо конкретным способом применения, внутривенное или внутриопухолевое введение бактерий или фармацевтических композиций является предпочтительным.

В зависимости от пути введения может требоваться, чтобы активные компоненты, которые содержат бактерии, были покрыты материалом для защиты указанных организмов от действия ферментов, кислот и других природных условий, которые могут инактивировать указанные организмы. С целью введения бактерий путем, отличным от парентерального введения, бактерии должны быть покрыты материалом для защиты от инактивации или должны вводиться вместе с указанным материалом. Например, бактерии можно вводить совместно с ингибиторами ферментов или в липосомах. Ингибиторы ферментов включают ингибитор трипсина поджелудочной железы, диизопропилфлуорофосфат (DFP) и тразилол. Липосомы включают эмульсии Р40 вода-в-масле-в-воде, а также общепринятые и специально разработанные липосомы, которые транспортируют бактерии, такие как Lactobacillus, или их побочные продукты, к внутренней мишени субъекта-хозяина.

Одну бактерию можно ввести саму по себе или в сочетании с второй, отличной бактерией. Любое число различных бактерий можно применять в сочетании. Под "в сочетании с" подразумевают "вместе", по существу одновременно или последовательно. Композиции можно также вводить в форме таблетки, драже или капсулы, например, такой как высушенная сублимацией капсула, содержащая бактерии или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, либо в виде замороженного раствора бактерий или фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, содержащего DMSO или глицерол. Другая предпочтительная форма применения включает приготовление лиофилизированных капсул бактерий или фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению. Еще одна предпочтительная форма применения включает приготовление высушенной теплом капсулы бактерий или фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению.

Рекомбинантные аттенуированные по вирулентности грамотрицательные бактерии или фармацевтическую композицию, подлежащие введению, можно ввести с помощью инъекции. Формы, подходящие для инъекционного применения, включают моносептические или стерильные водные растворы (в случае водорастворимых компонентов) либо дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии непосредственно перед применением. Во всех случаях форма должна быть моносептической или стерильной и должна быть жидкой в той степени, чтобы ее можно было с легкостью ввести через шприц. Форма должна быть стабильной в условиях производства и хранения. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерол, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), подходящие смеси данных компонентов и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические вещества, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить посредством применения в композиции веществ, которые отсрочивают всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный аттенуированный по

вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят субъекту совместно с сидерофором. Данные варианты реализации являются предпочтительными. Сидерофоры, которые можно вводить совместно, представляют собой сидерофоры, включая гидроксамат, катехолат и сидерофоры со смешанными лигандами. Предпочтительные сидерофоры представляют собой дефероксамин (также известный как десферриоксамин B, десфероксамин B, DFO-B, DFOA, DFB или Десферал), десферриоксамин E, деферазирокс (Эксиджад, Десирокс, Дефриджет, Десифер) и деферипрон (Феррипрокс), более предпочтительным является дефероксамин. Дефероксамин представляет собой бактериальный сидерофор, продуцируемый актинобактерией Streptomyces pilosus, который является коммерчески доступным, например, от компании Novartis Pharma Schweiz AG (Швейцария).

Совместное введение с сидерофором можно проводить до, одновременно с или после введения рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий. Предпочтительно, сидерофор вводят до введения рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий, более предпочтительно, вводят по меньшей мере за 1 ч, предпочтительно, по меньшей мере за 6 ч, более предпочтительно, по меньшей мере за 12 ч, в частности, по меньшей мере за 24 ч до введения субъекту рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий. В конкретном варианте реализации субъект получает предварительное лечение десфреоксамином за 24 ч до инфицирования рекомбинантным аттенуированным по вирулентности грамотрицательным штаммом бактерий для обеспечения роста бактерий. Обычно сидерофор вводят совместно в однократной дозе от приблизительно $0,5\times10^{-5}$ моль до приблизительно 1×10^{-3} моль, более предпочтительно, от приблизительно 1×10^{-5} моль до приблизительно 1×10^{-4} моль, предпочтительно, от приблизительно $3,5\times10^{-5}$ моль до приблизительно $1,1\times10^{-4}$ моль на 1 кг массы тела. Обычно дефероксамин вводят совместно в однократной дозе от приблизительно 20 мг до приблизительно 60 мг, предпочтительно, от приблизительно 20 мг до приблизительно 60 мг на 1 кг массы тела.

Режимы дозирования при введении рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе, будут варьировать в зависимости от конкретной поставленной цели, возраста и физического состояния субъекта, лечение которого проводят, длительности лечения, природы сопутствующей терапии и конкретной применяемой бактерии, как известно специалисту. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий обычно вводят субъекту согласно режиму введения доз, состоящему из однократной дозы каждые 1-20 дней, предпочтительно, каждые 1-10 дней, более предпочтительно, каждые 1-7 дней. Период введения составляет обычно от приблизительно 20 до приблизительно 60 дней, предпочтительно, приблизительно 30-40 дней. В качестве альтернативы, период введения составляет обычно от приблизительно 8 до приблизительно 32 недель, предпочтительно, от приблизительно 8 до приблизительно 24 недель, более предпочтительно, от приблизительно 12 до приблизительно 16 недель.

В следующем варианте реализации в настоящем изобретении предложен набор для лечения рака, например, такого как злокачественные солидные опухоли, предпочтительно, у человека. Такие наборы, как правило, будут содержать рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и инструкции по применению набора. В некоторых вариантах реализации наборы содержат носитель, упаковку или контейнер, который разделен с получением одного или нескольких контейнеров, таких как флаконы, пробирки и т.п., причем каждый из контейнера или контейнеров содержит один из отдельных элементов для применения в способе, описанном в настоящем документе. Подходящие контейнеры включают, например, бутыли, флаконы, шприцы и лабораторные пробирки. В других вариантах реализации контейнеры изготовлены из множества материалов, таких как стекло или пластик.

Примеры

Пример 1.

А) Материалы и методы.

Штаммы бактерий и условия роста.

Штаммы, применявшиеся в данном исследовании, перечислены на фиг. 3A-M. E. coli Top10, который применяли для очистки и клонирования плазмиды, и E. coli Sm10λ pir, который применяли для конъюгации, а также E. coli BW19610 [31], который применяли для размножения pKNG101, выращивали общепринятым способом на чашках с агаром LB и в бульоне LB при температуре 37°C. Ампициллин использовали в концентрации 200 мкг/мл (Yersinia) или 100 мкг/мл (E. coli) для отбора векторов экспрессии. Стрептомицин использовали в концентрации 100 мкг/мл для отбора векторов-"самоубийц". Y. enterocolitica MRS40 (0:9, биотип 2)[20], не устойчивое к ампициллину E40-производное[19], и полученные из него штаммы выращивали общепринятым способом на сердечно-мозговом экстракте (Brain Heart Infusion BHI; Difco) при к.т. (комнатной температуре). Ко всем штаммам Y. enterocolitica добавляли налидиксовую кислоту (35 мкг/мл), а ко всем штаммам Y. enterocolitica asd дополнительно добавляли 100 мкг/мл мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты (mDAP, Sigma Aldrich). S. enterica SL1344 выращивали общепринятым способом на чашках с агаром LB и в бульоне LB при температуре 37°C. Ампициллин исполь-

зовали в концентрации 100 мкг/мл для отбора векторов экспрессии в S. enterica.

Генетические манипуляции с Y. enterocolitica.

Генетические манипуляции с Y. enterocolitica были описаны в публикации[32,33]. Вкратце, мутаторы для модификации или делеции генов в плазмидах pYV или на хромосоме конструировали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами из 2-х фрагментов с применением в качестве матрицы очищенной плазмиды pYV40 или геномной ДНК, что приводило к получению фланкирующих последовательностей размером 200-250 п.о. на обеих сторонах делетированной или модифицированной части соответствующего гена. Полученные в результате фрагменты клонировали в pKNG101 [29] в E. coli BW19610 [31]. Плазмидами с подтвержденной последовательностью трансформировали E. coli Sm10λ pir, из которого плазмиды мобилизировали в соответствующий штамм Y. enterocolitica. Мутанты, несущие встроенный вектор, размножали для получения нескольких поколений без давления отбора. Затем для отбора клонов, которые утратили вектор, использовали сахарозу. Наконец, мутанты идентифицировали с помощью ПЦР для отбора колоний. Конкретные мутаторы (pSi_408, pSi_419) перечислены в табл. III.

Конструкция плазмид.

Плазмиду pBad_Si2 или pBad_Si1 (фиг. 2) применяли для клонирования слитых белков с N-концевыми 138 аминокислотами YopE (SEQ ID NO: 2). pBad_Si2 была сконструирована путем клонирования содержащих фрагмент SycE-$YopE_{1-138}$ эндогенных промоторов для YopE и SycE из очищенной pYV40 в сайт KpnI/HindIII pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BglII pBad-MycHisA путем расщепления, обработку фрагментом Кленова и повторное лигирование. Двунаправленный терминатор транскрипции (BBa_B1006; iGEM foundation) клонировали в разрез KpnI, обработанный фрагментом Кленова (pBad_Si2), или сайт разреза BglII (pBad_Si1). Затем на 3'-конце $YopE_{1-138}$ были добавлены следующие сайты расщепления: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII) (фиг. 2 B). pBad_Si1 аналогична pBad_Si2, но кодирует EGFP, амплифицированный из pEGFP-C1 (Clontech) в сайте NcoI/BglII под контролем индуцибельного арабинозой промотора. Плазмиды pSi_266, pSi_267, pSi_268 и pSi_269, содержащие соответствующий эндогенный промотор и фрагмент $SteA_{1-20}$ (pSi_266), полноразмерную последовательность SteA (pSi_267), фрагмент $SopE_{1-81}$ (pSi_268) или фрагмент $SopE_{1-105}$ (pSi_269), амплифицировали из геномной ДНК S. enterica SL1344 и клонировали в сайт NcoI/KpnI pBad-MycHisA (Invitrogen).

Полноразмерные гены или их фрагменты амплифицировали со специфичными праймерами, перечисленными в табл. I ниже, и клонировали в виде слияний с $YopE_{1-138}$ в плазмиду pBad_Si2 или, в случае z-BIM (SEQ ID NO: 16), - в pBad_Si1 (см. табл. II ниже). Для слияния с SteA или SopE синтетические конструкции ДНК расщепляли KpnI/HindII и клонировали в pSi_266, pSi_267, pSi_268 или pSi_269, соответственно. В случае генов бактериальных видов в качестве матрицы применяли очищенную геномную ДНК (S. flexneri M90T, Salmonella enterica подвид enterica серовар Тифимуриум SL1344, Bartonella henselae ATCC 49882). Для генов человека применяли универсальную библиотеку к ДНК (Clontech), если не указано обратное (фиг. 3A-M, гены данио-рерио амплифицировали из библиотеки к ДНК (любезно предоставленной M. Affolter)). Лигированные плазмиды клонировали в E. coli Top10. Секвенированные плазмиды переносили посредством электропорации в желаемый штамм Y. enterocolitica или S. enterica с применением настроек для стандартной электропорации E. coli.

Таблица I

№ Si Праймера_: Последовательность

Seq_Id_No_51: Праймер №: Si_285
CATACCATGGGAGTGAGCAAGGGCGAG

Seq_Id_No_52: Праймер №: Si_286
GGAAGATCTttACTTGTACAGCTCGTCCAT

Seq_Id_No_53: Праймер №: Si_287
CGGGGTACCTCAACTAAATGACCGTGGTG

Seq_Id_No_54: Праймер №: Si_288
GTTAAAGCTTttcgaatctagactcgagCGTGGCGAACTGGTC

Seq_Id_No_55: Праймер №: Si_387
CGTAtctagaATGGACTGTGAGGTCAACAA

Seq_Id_No_56: Праймер №: Si_391
CGTAtctagaGGCAACCGCAGCA

Seq_Id_No_57: Праймер №: Si_389
GTTAAAGCTTTCAGTCCATCCCATTTCTg

Seq_Id_No_58: Праймер №: Si_436
CGTAtctagaATGCCCCGCCCC

Seq_Id_No_59: Праймер №: Si_437
GTTAAAGCTTCTACCCACCGTACTCGTCAAT

Seq_Id_No_60: Праймер №: Si_438
CGTAtctagaATGTCTGACACGTCCAGAGAG

Seq_Id_No_61: Праймер №: Si_439
GTTAAAGCTTTCATCTTCTTCGCAGGAAAAAG

Seq_Id_No_62: Праймер №: Si_463
CAGTctcgaggaaagcttgtttaaggggc

Seq_Id_No_63: Праймер №: Si_464
cagtTTCGAAttagcgacggcgacg

Seq_Id_No_64: Праймер №: Si_476
GTTAAAGCTTttACTTGTACAGCTCGTCCAT

Seq_Id_No_65: Праймер №: Si_494
CGTAtctagaATGGCCGAGCCTTG

Seq_Id_No_66: Праймер №: Si_495
GTTAAAGCTTttaTTGAAGATTTGTGGCTCC

Seq_Id_No_67: Праймер №: Si_504
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTA
TGCCCCGCCCC

Seq_Id_No_68: Праймер №: Si_505
GTTAAAGCTTCCCACCGTACTCGTCAATtc

Seq_Id_No_69: Праймер №: Si_508
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTA
TGGCCGAGCCTTG

Seq_Id_No_70: Праймер №: Si_509
GTTAAAGCTTTTGAAGATTTGTGGCTCCc

Seq_Id_No_71: Праймер №: Si_511
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTG
TGAGCAAGGGCGAG

Seq_Id_No_72: Праймер №: Si_512
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTC
CGCCGAAAAAAAAACGTAAAGTTGTGAGCAAGGGCGAG

Seq_Id_No_73: Праймер №: Si_513
GTTAAAGCTTttAAACTTTACGTTTTTTTTTCGGCGGCTTGTACAGCTCGTCC
AT

Seq_Id_No_74: Праймер №: Si_515
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTG
ATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG

Seq_Id_No_75: Праймер №: Si_677
TTACTATTCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCCGCCATCTGGCCCAAATT
GGTGATGAAATGGATCATTAAGCTTGGAGTA

Seq_Id_No_76: Праймер №: Si_678
TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTCATCACCAATTTGGGCCAGATGGCGGG
CAATATTATGAATAATTTCTTCGAATAGTAA

Seq_Id_No_77: Праймер №: Si_682
TTACTACTCGAGAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCGCCGCATTGGTGATGA
ACTGGATAGCTAAGCTTGGAGTA

Seq_Id_No_78: Праймер №: Si_683
TACTCCAAGCTTAGCTATCCAGTTCATCACCAATGCGGCGCAGACATTCGC
TCAGTTTTTTCTCGAGTAGTAA

Seq_Id_No_79: Праймер №: Si_580
catgccatggatttatggtcatagatatgacctc

Seq_Id_No_80: Праймер №: Si_612
CGGGGTACCatgaggtagcttatttcctgataaag

Seq_Id_No_81: Праймер №: Si_613
CGGGGTACCataattgtccaaatagttatggtagc

Seq_Id_No_82: Праймер №: Si_614
catgccatggCGGCAAGGCTCCTC

Seq_Id_No_83: Праймер №: Si_615
cggggtaccTTTATTTGTCAACACTGCCC

Seq_Id_No_84: Праймер №: Si_616
cggggtaccTGCGGGGTCTTTACTCG

Seq_Id_No_85: Праймер №: Si_585
CAGTctcgagATGCAGATCTTCGTCAAGAC

Seq_Id_No_86: Праймер №: Si_586
GTTAAAGCTTgctagcttcgaaACCACCACGTAGACGTAAGAC

Seq_Id_No_87: Праймер №: Si_588
cagtTTCGAAGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG

Seq_Id_No_88: праймер № 733
TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCGAAGAAATTATTCATAATATTGCC
CG

Seq_Id_No_89: праймер № 735
TACTCCTTCGAATTAATGATCCATTTCATCACCAATTTG

Seq_Id_No_90: праймер № 736
TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCG

Seq_Id_No_91: праймер № 738
TACTCCTTCGAATTAGCTATCCAGTTCATCACCAATG

Seq_Id_No_92: праймер № 734
TACTCCTTCGAAGGCACCATGATCCATTTCATCACCAATTTGG

Seq_ID_No_93: праймер № 725:
TTACTATTCGAAGAAATTATTCATAATATTGCC

Seq_ID_No_94: праймер № 726:
TACTCCAAGCTTACGGTTGAATATTATGATCCATTTCATCACCAATTTGG

Seq_ID_No_95: праймер № 727:
TTACTATTCGAAGCCGGTGGTGCCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCC

Seq_ID_No_96: праймер № 728:
TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTCATCA

Seq_ID_No_97: праймер № 737:
TACTCCTTCGAAGGCACCGCTATCCAGTTCATCACCAATG

Seq_ID_No_101: праймер № 869:
gatcgtcgacTTAAGTTCAATGGAGCGTTTAATATC

Seq_ID_No_102: праймер № 870:
ctttgactggcgagaaacgcTCTTAACATGAGGCTGAGCTC

Seq_ID_No_103: праймер № 871:
GAGCTCAGCCTCATGTTAAGAgcgtttctcgccagtcaaag

Seq_ID_No_104: праймер № 872:
gatagcccccgagcctgtGCACTTTGTCATTAACCTCAGC

Seq_ID_No_105: праймер № 873:
GCTGAGGTTAATGACAAAGTGCacaggctcgggggctatc

Seq_ID_No_106: праймер № 874:
catgtctagaCCCTCAGCATAATAACGACTC

Seq_ID_No_107: праймер № 600:
catgacatgtTGGCGTTTCTCGCC

Seq_ID_No_108: праймер № 601:

catgacatgtATTAACCTCAGCCCTGACTATAAG

Seq_ID_No_119: праймер № 1010:
cacatgtctagaCAACCGTTTCCGAAAGGTGATCTG

Seq_ID_No_120: праймер № 1012:
atccCAagctTATTGGCGTTGGGTGGTAAAAATTTTG

Seq_ID_No_121: праймер № 1021:
cacatgtctagaATGACCGCCGAACAACGC

Seq_ID_No_122: праймер № 1022:
catgaagcttaCGGACCCGGATTTTGGCTC

>Seq_ID_No_123: праймер № 1023:
catgaagcttaCGGTTCTTCTTGAATAAAAATTTGAATG

Seq_ID_No_124: праймер № 1024:
catgaagcttaTTGCAGCACTTTCGGCCAATTT

Seq_ID_No_125: праймер № 1025:
cacatgtctagaATGAGCATTGTGTGTAGCGC

Seq_ID_No_126: праймер № 1026:
catgaagcttaGCTTTCATCCACGGCCGG

Seq_ID_No_127: праймер № 1027:
catgaagcttaATTACCGGTTTGGCGCAGC

Таблица II

Клонированные слитые белки

Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	**Seq. ID. № белка**	**Каркасная плазмида**	**Название полученной в результате плазмиды**	**Праймеры. Si_Nr.:**	**Seq. ID № праймера**
YopE1-138-MycHis	3	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138)	51/52 и 53/54
YopE1-138-MycHis	3	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-	53/54

				YopE1-138)	
YopE1-138- Bid человека	16	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	55/56
YopE1-138- t-Bid человека	17	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	55/57
YopE1-138-ET1	9	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	58/59
YopE1-138-z-BIM	16	pBad_Si_1	pSi_121	438/439	60/61
YopE1-138- протеаза TEV S219V	12	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	62/63
YopE1-138-Ink4C	8	pBad_Si_2	pSi_151	494/495	65/66
YopE1-138-2x сайт TEV - ET1	11	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	67/68
YopE1-138-2x сайт TEV- EGFP	98	pBad_Si_2	pSi_158	511/476	71/64
YopE1-138-2x сайт TEV - EGFP - NLS	99	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	71/73
YopE1-138-2x сайт TEV - NLS - EGFP	100	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	72/64
YopE1-138-2x сайт TEV - INK4C	10	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	69/70
YopE1-138-2x сайт TEV - Flag - INK4C	13	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	74/70
YopE1-138-кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 tBid мыши	19	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	75/76
YopE1-138-кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 Bax мыши	20	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	77/78
SteA1-20	5	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_266	580/612	79/80
SteA	4	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_267	580/613	79/81
SopE1-81	6	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_268	614/615	82/83
SopE1-105	7	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_269	614/616	82/84
YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica tBid мыши	21	pBad_Si_2	pSi_315	синтетическая конструкция	/

YopE1-138-Убиквитин	14	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	85/86
YopE1-138-Убиквитин-Flag-INK4C-MycHis	15	pSi_236	pSi_237_II	588/509	87/70
YopE1-138-(кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 tBid мыши), готовая для вставки дополнительных доменов	25	pBad_Si_2	pSi_357	733/735	88/89
YopE1-138-(кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 BAX мыши), готовая для вставки дополнительных доменов	26	pBad_Si_2	pSi_358	736/738	90/91
YopE1-138-(кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 tBid мыши)$_2$	27	pSi_357	pSi_371	733/734	88/92
YopE1-(138-кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 tBid мыши- кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 BAX мыши	28	pSi_358	pSi_373	733/734	88/92
YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированная удлиненная часть BH3 tBid мыши	22	pBad_Si_2	pSi_353	725/726	93/94
YopE$_{1-138}$-линкер 10 АК - кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 tBid мыши	23	pBad_Si_2	pSi_354	727/728	95/96
YopE$_{1-138}$-кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 Bax мыши- кодон-	24	pSi_357	pSi_374	736/737	90/97

оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 tBid мыши					
YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-1 человека (АК 1-245)	37	pBad_Si_2	pSi_453	синтетическая конструкция	/
YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-1 мыши (АК 1-246)	38	pBad_Si_2	pSi_454	синтетическая конструкция	/
YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica GCN4 S. cerevisiae (АК 249-278) - кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica WspR P. aeruginosa (АК 172-347)	39	pBad_Si_2	pSi_452	синтетическая конструкция	/
YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica IRF3 S397D мыши	40	pBad_Si_2	pSi_428	синтетическая конструкция	/
YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica DncV V. Cholerae (M3toL413)	41	pBad_Si_2	pSi_482	синтетическая конструкция	/
YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica DisA-подобный белок B. cereus_ (PDB: 2FB5; АК 76-205)	42	pBad_Si_2	pSi_483	синтетическая конструкция	/
YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica cGAS анемона (N. vectensis) (Ensembl: A7SFB5.1)	43	pBad_Si_2	pSi_484	синтетическая конструкция	/
YopE1-138 - кодон-оптимизированные	110	pBad_Si_2	pSi_521	1021/1022	122/123

для Y. enterocolitica домены CARD RIG1 мыши (АК 1-229)					
YopE1-138 - кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica домены CARD RIG1 мыши (АК 1-218)	111	pBad_Si_2	pSi_522	1021/1023	122/124
YopE1-138 - кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica MDA5 мыши (АК 1-294)	112	pBad_Si_2	pSi_517	синтетическая конструкция	/
YopE1-138 - кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica MDA5 мыши (АК 1-231)	113	pBad_Si_2	pSi_524	1025/1026	126/127
YopE1-138- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica cGAS человека (АК 161-522)	115	pBad_Si_2	pSi_515	синтетическая конструкция	/
YopE1-138- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica CARD MAVS человека (АК 1-100)	116	pBad_Si_2	pSi_539	синтетическая конструкция	/
YopE1-138- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica cGAS анемона (N. vectensis) (АК 60-422) (Ensembl: A7SFB5.1)	117	pBad_Si_2	pSi_503	1010/1012	120/121
YopE1-138- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica CdaA Listeria (АК 101-273)	118	pBad_Si_2	**pSi_518**	синтетическая конструкция	/

Таблица III
Мутаторы для генетической модификации

Мутатор/ конструкция	**Подлежит вставке в:**	**Каркасная плазмида**	**Название полученной в результате плазмиды**	**Праймеры, Si_Nr.:**	**Seq.Id № праймеров**	**Применяли с конкретным родительским штаммом**
$YopE_{1-138}$-BH3 tBID мыши	pYV	pKNG101	pSi_408	Синтетический ген	/	/
$YopE_{1-138}$-(BH3 tBID мыши)$_2$	pYV	pKNG101	pSi_437	Синтетический ген	/	Штамм, мутированный pSi_408
$YopE_{1-138}$-кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-1 мыши (АК 1-246)	pYV	pKNG101	pSi_456 (Seq ID No 50)	Синтетический ген	/	/
pYV-asd	pYV	pKNG101	pSi_417	ПЦР1: 869/870; ПЦР2: 871/872; ПЦР3: 873/874; ПЦР с перекры	ПЦР1: 101/102; ПЦР2: 103/104; ПЦР3: 105/106; ПЦР с перекры	Δ*asd*

				вающим ися праймер ами 869/874	вающим ися праймер ами 101/106	
pYV-virF-hairpinI	pYV	pKNG101	pSi_441	Синтети ческий ген	/	/
pYV-pAra-VirF	pYV	pKNG101	pSi_439	Синтети ческий ген	/	/

Секреция Yop.

Индуцию регулона yop проводили посредством переноса культуры в температуру 37°C в BHI-Ox (пермиссивные условия для секреции)[34]. В качестве источника углерода добавляли глюкозу (4 мг/мл). Суммарные клетки и фракции супернатанта разделяли путем центрифугирования при 20800 g в течение 10 мин при температуре 4°C. Осадок клеток отбирали в виде суммарной фракции клеток. Белки в супернатанте преципитировали 10% трихлоруксусной кислотой (масса/объем) на конечном этапе в течение 1 ч при температуре 4°C. После центрифугирования (20800 g в течение 15 мин) и удаления супернатанта полученный в результате осадок промывали в ледяном ацетоне в течение ночи. Образцы снова центрифугировали, супернатант отбрасывали, осадок высушивали на воздухе и ресуспендировали в 1× ДСН (додецилсульфате натрия) и красителе для нанесения.

Секретированные белки анализировали методом ПААГ-ДСН (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия); в каждом случае на дорожку наносили белки, секретированные 3×10^8 бактерий. Обнаружение конкретных секретированных белков методом иммуноблоттинга проводили с применением 12,5% гелей ПААГ-ДСН. Для обнаружения белков в суммарных клетках на дорожку наносили 2×10^8 бактерий, если не указано обратное, и белки разделяли на 12,5% гелях ПААГ-ДСН перед обнаружением методом иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг проводили с применением моноклональных антител крысы против YopE (MIPA193-13A9; 1:1000, [35]). Антисыворотку предварительно абсорбировали дважды в течение ночи против Y. enterocolitica ΔHOPEMAT asd для снижения фонового окрашивания. Обнаружение проводили с помощью вторичных антител, направленных против антител крысы и конъюгированных с пероксидазой хрена (1:5000; Southern biotech), с последующим развитием визуализации с помощью хемилюминесцентного субстрата ECL (LumiGlo, KPM).

Культура клеток и инфекции.

Клетки HeLa Ccl2 и B16F10 культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) с добавлением 10% ЭТС (эмбриональной телячьей сыворотки) и 2 мМ L-глутамина (cDMEM). Клетки 4T1 культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% ЭТС и 2 мМ L-глутамина. Y. enterocolitica выращивали в BHI с добавками в течение ночи при к.т., разводили в свежем BHI до $ОП_{600}$ 0,2 и выращивали в течение 2 ч при к.т. до повышения температуры до 37°C на шейкере с водяной баней в течение еще 30 мин или в течение 1 ч в случае доставки EGFP. Наконец, бактерии собирали путем центрифугирования (ОЦУ, относительное центробежное ускорение, 6000, 30 с) и промывали один раз DMEM с добавлением 10 мМ HEPES и 2 мМ L-глутамина. Наконец, бактерии собирали путем центрифугирования (6000 ОЦУ, 30 с) и промывали один раз DMEM с добавлением 10 мМ HEPES и 2 мМ L-глутамина. Клетки, которые высевали в 96-луночные (для анализа иммунофлуоресценции) или 6-луночные (для вестерн-блоттинга) планшеты, инфицировали при указанных МЗ в DMEM с добавлением 10 мМ HEPES и 2 мМ L-глутамина. После добавления бактерий планшеты центрифугировали в течение 1 мин при 1750 об./мин и помещали в температуру 37°C на указанные периоды времени. Внеклеточные бактерии уничтожали гентамицином (100 мг/мл), если это указано. В случае анализа иммунофлуоресценции анализы инфекционности останавливали с помощью фиксации в 4% ПФА (параформальдегиде). Для анализа методом вестерн-блоттинга клетки промывали дважды ледяным ФБР и с целью лизирования клеток добавляли буфер для лизиса PhosphoSafe (Novagen). После инкубации на льду клетки центрифугировали (16000 ОЦУ, 25 мин, 4°C).

Супернатанты собирали и анализировали для определения суммарного содержания белка методом Брэдфорда - методом с бицинхониновой кислотой (Pierce), после чего проводили анализ методом ПААГ-ДСН и вестерн-блоттинга с применением антитела против актина (Millipore), против Bid (Cell Signaling), против Myc (Santa Cruz), против каспазы-3 p17 (Cell Signaling) и против Ink4C (Cell Signaling).

Вестерн-блоттинг транспонированных с помощью T3SS белков из инфицированных клеток. Клетки HeLa в 6-луночных планшетах инфицировали при МЗ 100, как описано выше. В случае коинфекции с транслоцирующим протеазу TEV штаммом Y. enterocolitica задавали $ОП_{600}$ штаммов, и две бактериальные суспензии перед добавлением к клеткам перемешивали в пробирке в соотношении 1:1 (если не указано обратное). По окончании инфицирования клетки дважды промывали ледяным ФБР и собирали путем соскабливания в небольшой объем ледяного ФБР. После центрифугирования (16000 ОЦУ, 5 мин, 4°C) осадок растворяли в 0,002% дигитонине с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche complete, Roche). Растворенный осадок инкубировали а течение 5 мин на льду, а затем центрифугировали (16000 ОЦУ, 25 мин, 4°C). Супернатанты собирали и анализировали для определения суммарного содержания белка методом Брэдфорда - методом с бицинхониновой кислотой (Pierce), после чего проводили анализ методом ПААГ-ДСН и вестерн-блоттинга с применением антитела против Myc (Santa Cruz, 9E11) или против Ink4C (Cell Signaling).

Автоматизированная микроскопия и анализ изображений. Изображения были автоматически получены с помощью системы ImageXpress Micro (Molecular devices, Саннивей, США). Количественное определение интенсивностей окрашивания против Myc проводили с применением программного обеспечения MetaXpress (Molecular devices, Саннивей, США). Области в пределах клеток, за исключением областей ядра и областей, содержащих бактерии, выбирали вручную (круги площадью 40 пикселей), записывали среднюю интенсивность.

Биораспределение на моделях аллотрансплантата опухоли на мышах B16-F10 и 4T1.

Все эксперименты на животных были одобрены (лицензия 1908; Kantonales Veterinäramt Basel-Stadt) и проводились в соответствии с местными руководствами (Tierschutz-Verordnung, Basel-Stadt) и законом Швейцарии о защите животных (Tierschutz-Gesetz). Мышей C57Bl/6 и BALB/c в возрасте 6 недель заказывали в компании Janvier Labs. После по меньшей мере одной недели адаптации мышам проводили анестезию изофлураном и подкожно инъецировали в бок C57Bl/6 и BALB/c 100 мкл клеток B16-P10 или 4T1 (1×10^5-1×10^6 клеток), соответственно. В течение всего эксперимента проводили оценку поведения и внешнего вида мышей, поверхностной температуры, а также измеряли массу тела.

После развития опухолей мышам вводили раствор Десферала 8 мг/мл (10 мл/кг) путем и.п. инъекции. На следующий день мышей инфицировали Y. enterocolitica MRS40 или Y. enterocolitica MRS40 ΔHOPEMAT (2×10^5, 1×10^6 или 1×10^7 бактерий) путем инъекции в хвостовую вену. Инокулюм, который в.в. вводили мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения. В некоторых экспериментах прогрессирование опухоли отслеживали путем ежедневных изменений длины и ширины опухоли с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли определяли как 0,523×длина×ширина^2. В соответствующие дни после анализа мышей умерщвляли с помощью ингаляции CO_2. Немедленно отбирали образец крови путем аспирации из сердца. Отбирали печень, селезенку, легкие и опухоль и определяли их массу. Органы и опухоль гомогенизировали. КОЕ в каждом образце определяли путем точечного нанесения серийных разведений на чашки с агаром LB, содержащие налидиксовую кислоту (35 мкг/мл).

Прямой анализ активации интерферона I типа. Клетки меланомы мыши B16F10, RAW264.7 мыши дикого типа или макрофаги с нокаутом MAVS, стабильно экспрессирующие секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (secreted embryonic alkaline phosphatase, SEAP) или секретируемую люциферазу Lucia под контролем промотора I-ISG54, который состоит из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE, заказывали в компании InvivoGen (B16-Blue ISG, RAW-Blue ISG, RAW-Lucia ISG и RAW-Lucia ISG-KO-MAVS). Условия роста и анализ ИФН I типа адаптировали на основании протоколов, предоставленных InvivoGen. Вкратце, 12500 клеток B16-Blue ISG, или 30000 клеток RAW-Blue, RAW-Lucia или RAW-Lucia KO-MAVS ISG в 150 мкл среды для анализа (RPMI+2мМ L-глутамина+10% ЭТС для клеток B16-Blue ISG; DMEM+2мМ L-глутамина+10% ЭТС для клеток RAW-Blue, RAW-Lucia и RAW-Lucia KO-MAVS ISG) на лунку высевали в 96-луночный планшет с плоским дном (NUNC или Corning). На следующий день клетки инфицировали штаммами бактерий для оценки посредством добавления 15 мкл на лунку желаемой множественности заражения (МЗ, разводили в среде для анализа). Через 2 ч инкубации (37°C и 5% CO_2) бактерии убивали добавлением среды для анализа, содержащей пенициллин (100 Ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Инкубацию продолжали в течение 20-24 ч. Обнаружение SEAP и люциферазы проводили согласно протоколам QUANTI-Blue™ и QUANTI-Luc™ (InvivoGen), соответственно. Для обнаружения SEAP: 20 мкл супернатанта клеток инкубировали с 180 мкл реактива для обнаружения (QUANTI-Blue™, InvivoGen). Планшет инкубировали при температуре 37°C, и активность SEAP измеряли путем считывания ОП при 650 нм с применением считывающего устройства для микропланшетов (Molecular Devices). В качестве положительного контроля использовали ИФН у мыши (базовый раствор: 1000000 Ед./мл), разведенный до соответствующих концентраций в среде для анализа. Для обнаружения люциферазы: к 20 мкл супернатанта клеток добавляли 50 мкл реактива для обнаружения (QUANTI-Luc™, InvivoGen) в непрозрачных планшетах (ThermoScientific). Немедленно измеряли люминесценцию с применением считывающего устройства для планшетов (BioTek).

Непрямой анализ активации интерферона I типа. Клетки B16F10 или 4T1 мыши инфицировали с указанной множественностью заражения (МЗ) штаммами бактерий, которые оценивали, в течение в сум-

ме 4 ч, как описано выше. Затем супернатант клеток переносили на клетки меланомы мыши B16F10, стабильно экспрессирующие секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP) под контролем промотора I-ISG54 (состоит из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE; заказывали в компании InvivoGen, клетки B16-Blue ISG). Условия роста и анализ ИФН I типа адаптировали на основании протоколов, предоставленных InvivoGen. Вкратце, 12500 клеток B16-Blue ISG в 150 мкл среды для анализа (RPMI+2 мМ L-глутамин+10% ЭТС) на лунку высевали в 96-луночный планшет с плоским дном (NUNC). На следующий день всю среду удаляли и добавляли 100 мкл супернатанта клеток, предварительно инфицированных B16F10 или 4T1. Планшеты инкубировали в течение 20-24 ч при температуре 37°C и 5% CO_2. Обнаружение SEAP проводили согласно протоколу QUANTI-Blue™ (InvivoGen). 20 мкл супернатанта клеток инкубировали с 180 мкл реактива для обнаружения (QUANTI-Blue™, InvivoGen). Планшет инкубировали при температуре 37°C, и активность SEAP измеряли путем считывания ОП при 650 нм с применением считывающего устройства для микропланшетов (Molecular Devices).

Исследование прогрессирования опухоли на модели аллотрансплантата опухоли B16F10 на мышах после внутриопухолевого лечения. Все эксперименты на животных были одобрены ответственными органами и проводились в соответствии с местными руководствами и законами о защите животных. Самок мышей C57Bl/6 в возрасте 5-7 недель заказывали в компании Charles River (L'Arbresles). После по меньшей мере одной недели адаптации мышам проводили анестезию изофлураном, и в правый бок мышей подкожно инъецировали 1×10^6 клеток B16-F10 в 200 мкл RPMI 1640. Через регулярные промежутки времени оценивали поведение и внешний вид мышей и измеряли массу тела.

Лечение начинали, когда опухоли достигали объема 60-130 $мм^3$ (определяли как день 0). Мышам вводили штаммы бактерий, оценку которых проводили, в дни 0, 1, 2, 3, 6 и 9 путем внутриопухолевой инъекции ($7,5\times10^7$ бактерий в 50 мкл ФБР на введение) с анестезией изофлураном. Инокулюм, который внутриопухолево вводили мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения. В качестве контроля мышам инъецировали только не содержащий эндотоксины ФБР. За 24 ч до последнего введения бактерий (день 8) мышам вводили раствор Десферала 8 мг/мл (10 мл/кг) путем и.п. инъекции. Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли определяли как 0,5×длина×ширина^2. Объем опухоли, превышающий 1500 $мм^3$, определяли как конечную точку для человека.

Исследование прогрессирования опухоли и повторной антигенной стимуляции на моделях аллотрансплантата опухоли на мышах EMT-6 после внутриопухолевого лечения. Все эксперименты на животных были одобрены ответственными органами и проводились в соответствии с местными руководствами и законами о защите животных. Самок мышей BALB/c в возрасте 5-7 недель (BALB/cByJ) заказывали в компании Charles River (L'Arbresles). После по меньшей мере одной недели адаптации мышам проводили анестезию изофлураном, и в правый бок мышей подкожно инъецировали 1×10^6 клеток EMT-6 в 200 мкл RPMI 1640. Через регулярные промежутки времени оценивали поведение и внешний вид мышей и измеряли массу тела.

Лечение начинали, когда опухоли достигали объема 60-130 $мм^3$ (определяли как день 0). Мышам вводили штаммы бактерий, оценку которых проводили, в дни 0, 1, 5, 6, 10 и 11 путем внутриопухолевой инъекции ($7,5\times10^7$ бактерий в 50 мкл ФБР на введение) с анестезией изофлураном. Инокулюм, который внутриопухолево вводили мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения. В качестве контроля мышам инъецировали только не содержащий эндотоксины ФБР. За 24 ч до последнего введения бактерий (день 10) мышам вводили раствор Десферала 8 мг/мл (10 мл/кг) путем и.п. инъекции. Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли определяли как 0,5×длина×ширина^2. Объем опухоли, превышающий 1500 $мм^3$, определяли как конечную точку для человека. Мышам, у которых наблюдалась полная регрессия опухоли в день 54 после начала лечения, проводили анестезию изофлураном, и в противоположный (левый) бок относительно первой инъекции опухолевых клеток подкожно инъецировали 1×10^6 клеток EMT-6 в 200 мкл RPMI 1640. В качестве контрольной группы в исследование включали ранее не использованных в экспериментах мышей, которым ранее не трансплантировали клетки EMT-6. Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли определяли как 0,5×длина×ширина^2. Объем опухоли, превышающий 1500 $мм^3$, определяли как конечную точку для человека.

Исследование прогрессирования опухоли на моделях аллотрансплантата опухоли EMT-6 на мышах после внутривенного лечения. Все эксперименты на животных были одобрены ответственными органами и проводились в соответствии с местными руководствами и законами о защите животных. Самок мышей BALB/c в возрасте 5-6 недель (BALB/cByJ) заказывали в компании Charles River (L'Arbresles). После по меньшей мере одной недели адаптации мышам проводили анестезию изофлураном, и в правый бок мышей подкожно инъецировали 1×10^6 клеток EMT-6 в 200 мкл RPMI 1640. Через регулярные промежутки времени оценивали поведение и внешний вид мышей и измеряли массу тела.

Мышей рандомизировали на группы лечения, когда опухоли достигали объема 80-250 $мм^3$ (определяли как день 0). За 24 ч до рандомизации (Д-1) мышам вводили раствор Десферала 8 мг/мл (10 мл/кг)

путем и.п. инъекции. В день 0 мышам вводили штаммы бактерий, оценку которых проводили, путем внутривенной инъекции (5×10^6 бактерий в 100 мкл ФБР на введение) с анестезией изофлураном. Инокулюм, который внутривенно вводили мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения. В качестве контроля мышам инъецировали только не содержащий эндотоксины ФБР. Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли определяли как 0,5×длина×ширина^2. Объем опухоли, превышающий 1500 мм^3, определяли как конечную точку для человека.

Измерение секреции ИФНβ после инфекции изолятов опухолевых клеток.

Все эксперименты на животных были одобрены (лицензия 1908; Kantonales Veterinäramt Basel-Stadt) и проводились в соответствии с местными руководствами (Tierschutz-Verordnung, Basel-Stadt) и законом Швейцарии о защите животных (Tierschutz-Gesetz). Мышей BALB/c в возрасте 6 недель заказывали в компании Janvier Labs. Через неделю адаптации мышам проводили анестезию изофлураном, и в бок мышей подкожно инъецировали 100 мкл клеток EMT-6 (1×10^6 клеток). В течение всего эксперимента проводили оценку поведения и внешнего вида мышей, поверхностной температуры и измеряли массу тела. Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли определяли как 0,5×длина×ширина^2. В день анализа опухоли отбирали, разрезали на небольшие кусочки размером 1-2 мм, расщепляли в течение 1-1,5 часов и пропускали через нейлоновую сеть с размером ячейки 70 мкм для получения суспензии отдельных клеток. Определяли число клеток в данном неочищенном изоляте клеток, и в 24-луночный планшет с плоским дном (Corning) высевали по 300000 клеток на лунку в среде роста (DMEM+L-глутамина+заменимые аминокислоты+10% ЭТС). Через 1 ч инкубации при температуре 37°C и 5% CO_2 клетки инфицировали штаммами бактерий, оценку которых проводили, посредством добавления по 100 мкл на лунку титра бактерий (различная МЗ, разведение в среде роста). Через 1 ч инкубации (37°C и 5% CO_2) бактерии убивали добавлением среды роста, содержащей пенициллин (100 Ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Инкубацию продолжали в течение еще 3 ч. Планшет центрифугировали для сбора всех клеток на дне ячеек и анализировали концентрацию ИФНβ в супернатанте с помощью ELISA для ИФН-β мыши LumiKine™ Xpress (Invivogen) согласно инструкциям производителя.

B) Результаты.

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

Несмотря на то, что самый N-конец эффектора T3SS YopE Y. enterocolitica (SEQ ID № 1) содержит сигнал секреции, достаточный для транслокации гетерологичных белков[22], он не содержит сайт связывания шаперона (chaperone-binding site, CBS) для его шаперона (SycE) [36]. Авторы настоящего изобретения выбрали N-концевые 138 аминокислот YopE (SEQ ID NO: 2) для слияния с белками, подлежащими доставке, поскольку данный подход, как было показано, демонстрировал наилучшие результаты при транслокации других гетерологичных субстратов T3S [24]. Поскольку данные N-концевые 138 аминокислот YopE содержат CBS, авторы настоящего изобретения затем решили коэкспрессировать SycE. Фрагмент SycE-$YopE_{1-138}$, клонированный из очищенной плазмиды вирулентности pYV40 Y. enterocolitica, содержит эндогенные промоторы YopE и его шаперона SycE (фиг. 2). Вследствие этого SycE и любой слитый белок $YopE_{1-138}$ индуцируется быстрым сдвигом температуры от выращивания при к.т. до 37°C. Время культивирования при температуре 37°C будет влиять на количество слитого белка, присутствующее в бактериях. На 3'-конце $YopE_{1-138}$ добавляли сайт множественного клонирования (multiple cloning site, MCS) (фиг. 2 B), за которым следовали Myc и 6x метка His, а также стоп-кодон.

Фоновый штамм тщательно выбирали. Во-первых, для ограничения транслокации эндогенных эффекторов авторы настоящего изобретения использовали штамм Y. enterocolitica, в котором были делетированы все известные эффекторы, Yop H, O, P, E, M и T (названный ΔHOPEMAT) [37]. Помимо этого, авторы настоящего изобретения иногда использовали ауксотрофный мутант, который не может расти при отсутствии экзогенной мезо-2,6-диаминопимелиновой кислоты[38]. В данном штамме был делетирован ген аспартат-бета-полуальдегид-дегидрогеназы (Δasd), и его классифицировали как соответствующий уровню биологической безопасности 1 согласно Швейцарскому агентству безопасности (поправка к A010088/2). Помимо этого, авторы настоящего изобретения делетировали белки адгезии YadA и/или InvA для обеспечения большего выбора фоновых штаммов. В то время как применение штаммов yadA или yadA/invA снизило индуцированную фоновую передачу сигналов[39], также оказывалось влияние на количество доставленного белка[40].

Удаление добавки $YopE_{1-138}$ после транслокации слитого белка в эукариотическую клетку.

Несмотря на то, что фрагмент $YopE_{1-138}$ обеспечивает большое преимущество при бактериальной доставке, он может препятствовать функции и/или локализации слитых белков. Вследствие этого его удаление после доставки белков будет оптимальным. С данной целью авторы настоящего изобретения ввели два сайта расщепления TEV (ENLYFQS) [41,43] между $YopE_{1-138}$ и партнером слияния (регулятор транскрипции ET1-Myc (SEQ ID NO: 9 и 11)[44] и INK4C человека (SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 10)). Для сохранения преимуществ представленного способа авторы настоящего изобретения дополнительно слили протеазу TEV (вариант S219V; [45]) с $YopE_{1-138}$ (SEQ ID NO: 12) в другом штамме Y. enterocolitica.

Клетки HeLa инфицировали обоими штаммами одновременно. Для обеспечения анализа только транслоцированной фракции белков инфицированные клетки HeLa лизировали в течение 2 ч после инфекции дигитонином, который, как известно, не лизирует бактерии([46];). Анализ методом вестерн-блоттинга выявил присутствие $YopE_{1-138}$-2x сайт расщепления TEV-ET1-Myc или $YopE_{1-138}$-2x сайт расщепления TEV-Flag-INK4C-Myc, только когда клетки инфицировали соответствующим штаммом. После расщепления данного лизата клеток очищенной протеазой TEV в течение ночи наблюдали смещенную полосу. Данная полоса соответствует ET1-Myc или Flag-INK4C с N-концевыми остатками сайта расщепления TEV, наиболее вероятно, только одним серином. После коинфекции клеток штаммом, доставляющим протеазу TEV, становится видимым такой же отщепленный фрагмент ET1-Myc или Flag-INK4C; это свидетельствует, что протеаза TEV, доставленная с помощью T3SS, является функциональной, и что единичные клетки были инфицированы обоими штаммами бактерий. Несмотря на то что расщепление еще не закончено, большинство транслоцированных белков отщепляется уже через 2 ч после инфекции, и даже расщепление очищенной протеазой TEV в течение ночи не позволило достичь более высокую степень расщепления. Как сообщается, для зависимого от протеазы TEV расщепления может требоваться оптимизация в зависимости от слитого белка [47,48]. Вследствие этого зависимое от протеазы TEV удаление добавки $YopE_{1-138}$ после транслокации впервые обеспечивает доставку белков с помощью T3SS для практически нативных гетерологичных белков с изменением аминокислотного состава только на одну N-концевую аминокислоту. Альтернативный подход по сравнению с зависимым от протеазы TEV расщеплением фрагмента YopE заключается во встраивании в слитый белок, представляющий интерес, убиквитина. Действительно, убиквитин процессируется на С-конце группой эндогенных убиквитин-специфичных С-концевых протеаз (деубиквитинизирующие ферменты, ДУБ). Поскольку расщепление, как полагают, происходит на самом С-конце убиквитина (после G76), белок, представляющий интерес, не должен содержать дополнительной аминокислотной последовательности. Данный способ исследовали на слитом белке $YopE_{1-138}$-Убиквитин-Flag-INK4C-MycHis. В контрольных клетках, инфицированных экспрессирующими $YopE_{1-138}$-Flag-INK4C-MycHis бактериями, была обнаружена полоса, соответствующая $YopE_{1-138}$-Flag-INK4C-MycHis; это свидетельствует об эффективной транслокации слитого белка. Когда клетки инфицировали в течение 1 ч экспрессирующими $YopE_{1-138}$-Убиквитин-Flag-INK4C-MycHis бактериями, была визуализирована дополнительная полоса, соответствующая по размеру Flag-INK4C-MycHis; это свидетельствует, что часть слитого белка была отщеплена. Данный результат демонстрирует, что введение убиквитина в слитый белок делает возможным отщепление фрагмента $YopE_{1-138}$ без потребности в экзогенной протеазе.

Аттенуирование по вирулентности путем делеции/мутации бактериальных эффекторных белков с вирулентной активностью в отношении эукариотических клеток.

В случае Y. enterocolitica вирулентность снижали в результате делеции шести эндогенных эффекторных белков, называемых "внешние белки Yersinia" (Yersinia outer proteins, Yop), более конкретно, YopH, O, P, E, M, T (MRS40 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]) [37]. Данные Yop кодируются на "плазмиде вирулентности Yersinia" (pYV), плазмиде размером приблизительно 70 т.п.о., на которой кодируется полная система секреции 3 типа (T3SS), а также другие белки, обуславливающие вирулентность (фиг. 4). YopH, O, P, E, M и T представляют собой шесть эффекторных белков, которые доставляются в клетки-хозяева бактериальной системой секреции третьего типа для модулирования и ослабления иммунной системы. Каждый Yop обладает специфической биохимической активностью в клетке-хозяине. YopT отщепляет С-концевой цистеин Rho-ГТФаз и, таким образом, удаляет изопренильную группу, которая заякоривает ГТФазы в мембрану. Данная инактивация Rho в связи с изменением расположения позволяет избежать фагоцитоза иммунными клетками, такими как макрофаги и нейтрофилы[49]. В том же пути YopE выступает в качестве белка, активирующего ГТФазу (GTPase activating protein, GAP), для Rho-ГТФаз, деактивируя их. Это приводит к снижению уровня фагоцитоза и ингибированию высвобождения иммунными клетками ИЛ-1 бета[49]. Более того, YopO выступает в качестве ингибитора диссоциации нуклеотида гуанидина (guanidine nucleotide dissociation inhibitor, GDI), деактивируя Rho-ГТФазы. YopO также содержит серин/треонин-киназный домен, оказывающий действие на актиновый цитоскелет способом, который до конца не понятен[49]. YopH представляет собой тирозин-фосфатазу, воздействующую на белки фокальной адгезии, такие как киназа фокальной адгезии (Focal adhesion kinase, Fak), паксиллин и другие, таким образом, в высокой степени предотвращая фагоцитоз макрофагами и нейтрофилами[49]. Было обнаружено, что YopP, обозначаемый YopJ у Y. pseudotuberculosis или Y. pestis, инактивирует в иммунных клетках путь MAPK/NFκB, предотвращая высвобождение ФНОα и ИЛ-8, стимулированных присутствием бактерий, из иммунных клеток. Более того, было обнаружено, что YopP индуцирует в иммунных клетках апоптоз, что может быть связано с эффектом, нарушающим путь МАРК, который в своем активированном состоянии защищает клетки от апоптоза[49]. Роль YopM пока что полностью не ясна, но было обнаружено, что он связан с рибосомальной S6 киназой 1 (ribosomal S6 kinase 1, RSK1) и С-подобной протеинкиназой 2 (protein kinase C-like 2, PRK2). Представляется, что YopM может стимулировать фосфорилирование RSK1 и, таким образом, воздействовать на нижестоящие мишени, такие как, например, прогрессирование клеточного цикла[49]. В результате делеции

одного или нескольких из данных Yop защитный механизм бактерий против иммунной системы кардинально нарушается[50]. Мутацию соответствующих yop подтверждали методом ПЦР в соответствующей области и с помощью анализа секреции in vitro. Анализ секреции in vitro методом ПААГ-ДСН и окрашивание Кумасси голубым подтвердили отсутствие полноразмерного YopH,O,M и YopE.

Более того, был сконструирован штамм Y. enterocolitica с делециями в asd (аспартат-полуальдегиддегидрогеназе). Мутация в asd приводит к полной утрате способности к росту без добавления мезодиаминопимелиновой кислоты. Данный подход позволяет получить не содержащие антибиотики системы, поддерживающие плазмиду, на основании присутствия asd на соответствующей плазмиде. Аналогично, можно использовать другие ауксотрофные мутанты.

Получение усиленных проапоптотических бактерий.

Для оптимизации доставки или проапоптотических белков получали штаммы, трансформированные различными проапоптотическими белками, согласно табл. IV.

Таблица IV

Штаммы, трансформированные различными проапоптотическими белками

Название штамма	**Фоновый штамм**	**Белок, который будет доставлен с помощью T3SS**	**Каркасная плазмида**	**Название полученной в результате плазмиды**	**Праймеры. Si_Nr.:**	**Устойчивости**
YopE1-138-(кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica удлиненная часть BH3 tBid мыши)	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica удлиненный BH3 tBid мыши (на 4 АК)	pBad_Si_2	pSi_353		Nal Amp
YopE1-138-линкер 10 АК-(кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 tBid мыши)	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	YopE1-138-линкер 10 АК-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 tBid мыши	pBad_Si_2	pSi_354	727/728	Nal Amp
YopE1-(138-кодон-оптимизированная для Y.	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y.	pSi_357	pSi_374	736/737	Nal Amp

enterocolitica часть BH3 Bax мыши-кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 tBid мыши		enterocolitica BH3 Bax мыши -. кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 tBID мыши				

Укорачивание доставляемых белков до существенных доменов, необходимых для передачи сигналов (например, домена BH3 t-BID (SEQ ID NO: 19)), может увеличить эффективность уничтожения клеток (фиг. 5). Не опираясь на какую-либо теорию, считают, что данное увеличение эффективности, вероятно, связано с увеличением количества продукции белка и последующей доставки с помощью T3SS благодаря меньшему размеру доставляемого белка. Введение линкера между частью YopE и доменом BH3 tBID (SEQ ID NO: 23) снижало эффективность, как и удлинение домена BH3 на 4 дополнительные аминокислоты (SEQ ID NO: 22) (фиг. 5).

Дополнительно получали синтетические грузы с повторами таких существенных доменов (например, домена BH3 t-BID (SEQ ID NO: 27)) или с комбинациями данных существенных доменов (например, домена BH3 t-BID и домена BH3 BAX (SEQ ID NO: 24 и 28)). Неожиданно было обнаружено, что тандемные повторы одинаковых или различных доменов BH3 приводят в результате к усилению индукции апоптоза на раковых линиях клеток (включая клетки 4T1 и B16F10, фиг. 5). Было обнаружено, что IC_{50} (половина максимальной ингибирующей концентрации), обозначающая число бактерий на эукариотическую клетку (МЗ), необходимое для гибели 50% таких клеток, снижается после доставки тандемных повторов домена BH3 tBID по сравнению с единичным доменом BH3 tBID (фиг. 5). Данный результат был неожиданным, поскольку размер белка увеличивается при слиянии с вторым доменом BH3 t-BID. В связи с этим можно было ожидать снижения уровней экспрессии и доставки $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$ (SEQ ID NO: 27) по сравнению с $YopE_{1-138}$-BH3 tBID (SEQ ID NO: 19 и 25), и в лучшем случае можно было ожидать эквивалентных уровней. Для достижения увеличения активности по уничтожению клеток слитые домены BH3 tBID должны одновременно действовать совместно после доставки в эукариотические клетки с помощью T3SS. В случае только одного домена BH3 tBID в $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$ конструкция будет функциональной и в лучшем случае можно ожидать такую же эффективность, как для $YopE_{1-138}$-BH3 tBID.

С целью увеличения генетической стабильности $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$ (SEQ ID NO: 27) для исследований in vivo авторы настоящего изобретения клонировали $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$ (SEQ ID NO: 27) путем гомологичной рекомбинации на плазмиде вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE и под контролем нативного промотора YopE (с применением плазмид-мутаторов pSI_408 npSI_419). Такие мутаторы содержат последовательность ДНК, кодирующую желаемый белок, фланкированную с обеих сторон последовательностями размером 200-250 п.о., которые соответствуют сайту соответствующего гена, в котором должна пройти интеграция. Данными плазмидами трансформировали E. coli Sm10λ pir, из которых плазмиды мобилизировали в соответствующий штамм Y. enterocolitica. Мутантов, несущих вектор, размножали для получения нескольких поколений без давления отбора. Затем для отбора клонов, которые утратили вектор, использовали сахарозу. Наконец, мутанты идентифицировали с помощью ПНР для отбора колоний. Эндогенные белки для транспортирования с помощью T3SS (называемые "внешние белки Yersinia", Yop) кодируются Y. enterocolitica на данной плазмиде размером 70 т.о., называемой плазмидой вирулентности Yersinia (pYV), которая дополнительно кодирует аппарат T3SS. Оценивали способность штаммов Yersinia, кодирующих $YopE_{1-138}$-(BH3 tBID) (SEQ ID NO: 19 и 25) или $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$ (SEQ ID NO: 27) на плазмиде вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE и под контролем нативного промотора YopE, индуцировать апоптоз в раковых клетках (включая клетки 4T1 и B16F10, фиг. 6). Было обнаружено, что IC_{50} (половина максимальной ингибирующей концентрации), обозначающая число бактерий на эукариотическую клетку (МЗ), необходимое для гибели 50% таких клеток, снижается после доставки тандемных повторов домена BH3 tBID по сравнению с единичным доменом BH3 tBID, когда оба белка кодируются на плазмиде вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE и под контролем нативного промотора YopE (фиг. 6). Это согласуется с результатами, полученными с плазмидой экспрессии, обеспечивающей доставку данных белков (фиг. 5). Данный результат вновь был неожиданным, поскольку при слиянии с вторым доменом BH3 t-BID размер белка увеличивается. В связи с этим можно было ожидать снижения уровней экспрессии и доставки $YopE_{1-138}$-(BH3

tBID)$_2$ (SEQ ID NO: 27) по сравнению с YopE$_{1-138}$-BH3 tBID (SEQ ID NO: 19 и 25), и в лучшем случае можно было ожидать эквивалентных уровней. Для достижения увеличения активности по уничтожению клеток слитые домены BH3 tBID должны одновременно действовать совместно после доставки с помощью T3SS в эукариотические клетки. В случае только одного домена BH3 tBID в YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$ конструкция будет функциональной, и в лучшем случае можно ожидать такую же эффективность, как для YopE$_{1-138}$-BH3 tBID. Более того, сравнивали способность штаммов Yersinia, кодирующих YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$ (SEQ ID NO: 27), на плазмиде вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE и под контролем нативного промотора YopE, индуцировать апоптоз в раковых клетках с доставкой YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$ на основе плазмиды экспрессии (на основе pBad-MycHisA). В соответствии с более высоким числом копий pBad-MycHisA (20-25 копий) по сравнению с pYV (сообщалось о 1-6 копиях) доставка YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$ (SEQ ID NO: 27) на основе pBad-MycHisA привела к незначительному снижению значения IC$_{50}$ на клетках 4T1 и B16F10 (фиг. 6).

Исследования биораспределения на модели меланомы на мышах.

Для подтверждения возможности применения грамотрицательных бактерий с мутацией или мутациями на ключевых детерминантах вирулентности, таких как эффекторы T3SS, в качестве опухоль-специфичного носителя, проводили исследования на аллотрансплантатах опухоли на мышах с применением надежно отработанной модели меланомы B16F10 (ATCC № CRL-6475). Когда п.к. опухоли достигали определенного размера (приблизительно 100-200 мм^3), мышей в.в. инфицировали 2×10^5 КОЕ Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40 или Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T. Для обеспечения роста бактерий мышам предварительно вводили десфреоксамин за 24 ч до инфицирования. Мыши, инфицированные штаммом Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40 ДТ, характеризовались повышенным баллом при оценке внешнего вида и поведения (фиг. 47-48), и у них наблюдалась значительная потеря массы тела в течение первых 48 ч инфекции (фиг. 49), что заставило авторов настоящего изобретения умертвить всех мышей в данной группе уже в день 2 после инфекции. Напротив, у мышей, инфицированных аттенуированным по вирулентности штаммом Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, не наблюдалось значительной потери массы тела, и они все еще получали нормальный балл при оценке по внешнему виду и поведению (фиг. 47-49) в день 4 после инфекции. У мышей, инфицированных штаммом ДТ (Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40), живые бактерии были обнаружены во всех изученных органах и, более того, в крови (фиг. 51). Хотя бактерии ДТ были обнаружены в злокачественной солидной опухоли, такое же или даже большее число бактерий было обнаружено в других органах, наибольшее - в селезенке (фиг. 51). Наоборот, у мышей, инфицированных Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, в день 1 после инфекции живые бактерии, главным образом, были обнаружены в злокачественной солидной опухоли, а число бактерий, обнаруженных в селезенке, печени и легких, было низким. Примечательно, что в день 4 после инфекции число бактерий в злокачественной солидной опухоли увеличилось в несколько десятков раз (и достигло более 10^8 КОЕ/г опухолевой ткани), в то время как во всех остальных изученных органах число бактерий снизилось ниже предела обнаружения (фиг. 50). Таким образом, Y. enterocolitica подвид palearctica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T накапливался в день 4 после инфекции в участке злокачественной солидной опухоли в дозе, превышающей приблизительно (минимально) в один миллион раз дозу в селезенке или печени (при расчете дозы по сравнению с пределом обнаружения).

Аналогично высокое число бактерий на 1 г солидных опухолей в день 5 или 8 после внутривенного введения в латеральную хвостовую вену мышей с меланомой B16F10 было определено для Y. enterocolitica dHOPEMT, Y. enterocolitica dHOPEMT+pYV-YopE$_{1-138}$- CARD RIG1 мыши или Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHairpinI-VirF+pYV-YopE$_{1-138}$ - CARD RIG1 мыши (фиг. 26). Это подтверждает, что груз гетерологичного белка и дополнительные мутации, влияющие на регуляцию T3SS (VirF), не влияют на колонизацию бактериями солидных опухолей на моделях на мышах.

Полученные результаты подтверждают данную стратегию аттенуации по вирулентности с помощью мутации ключевых детерминант вирулентности для получения бактериального носителя, который специфично нацелен на злокачественную солидную опухоль.

Подтверждение опухоль-специфичного роста in vivo до дня 14 после введения бактерий.

Эксперимент по колонизации опухоли генетически модифицированными Y. enterocolitica повторяли на сингенной аллотрансплантатной модели на мышах (модель рака молочной железы 4T1), и колонизацию бактериями отслеживали в течение двух недель. На этот раз мышей инфицировали 1×10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ) Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. Хотя и были получены результаты, подобные результатам, полученным на модели B16F10, в течение первых дней после инфекции, авторы настоящего изобретения смогли дополнительно продемонстрировать, что колонизация опухоли согласованно обнаруживалась в день 8 и вплоть до дня 14 после инфекции (фиг. 7). Более того, колонизация оставалась высокоспецифичной, и во всех других изученных органах было обнаружено лишь незначительное число бактерий (фиг. 8). Данные результаты свидетельствуют, что Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T способен устанавливать персистентную колонизацию опухоли, тем самым предотвращая клиренс со стороны иммунной системы.

Эффективность Y. enterocolitica ΔHOPEMAT по отсрочиванию прогрессирования опухоли.

Для оценки влияния $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$, доставленного в опухолевые клетки in vivo, авторы настоящего изобретения проводили исследование на мышах Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы 4T1. Целью авторов настоящего изобретения была оценка штамма Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодирующего $YopE_{1-138}$-(BH3 tBID)2, на плазмиде вирулентности Yersinia pYV в нативном сайте YopE и под контролем нативного промотора YopE, который дополнительно оптимизировали путем делеции области шпильки I в направлении 3'-5' от VirF для увеличения количества доставленных белков. Мышам в.в. инъецировали ФБР или 1×10^7 Y. enterocolitica ΔHOPEMAT ΔHairpinI-virF pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$, когда опухоль достигала размера 150-250 $мм^3$. День в.в. инъекции бактерий обозначали как день 0. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (с дня 0 по день 9 после в.в. инъекции бактерий) с помощью штангенциркуля. Объем опухоли нормировали к объему опухоли в день 0 для учета любой исходной гетерогенности размера опухоли. Лечение Y. enterocolitica ΔHOPEMAT ΔHairpinI-VirF pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$ продемонстрировало влияние на прогрессирование объема опухоли со статистически значимым снижением опухоли в день 8, 9 и 10 после введения бактерий (фиг. 9). Важно отметить, что было обнаружено, что Y. enterocolitica ΔHOPEMAT сам по себе не влиял на прогрессирование опухоли на модели рака на мышах 4T1 (фиг. 10). Данные результаты подчеркивают, что такие бактерии и их T3SS можно применять для препятствования прогрессированию опухоли.

Y. enterocolitica ΔHOPEMAT с делецией в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего ДНК-связывающий белок типа AraC.

Наиболее известные гены вирулентности Yersinia не экспрессируются за пределами эукариотического хозяина и индуцируются только после поступления в окружающую среду хозяина. Экспрессия данных генов вирулентности индуцируется резким повышением температуры, связанным с поступлением в хозяина. Таким образом в особенности регулируются кодируемые pYV факторы вирулентности, такие как T3SS и ее эффекторные белки (Yop). При комнатной температуре (20-25°C) гены, необходимые для регуляции T3SS, образования T3SS самой по себе и доставляемых эффекторов, не экспрессируются, и экспрессия индуцируется только после такого повышения температуры до 37°C. Экспрессия большинства кодируемых pYV генов вирулентности (yadA и генов, связанных с T3SS) индуцируется температурой, и для этого требуется ДНК-связывающий белок типа AraC VirF в Y. enterocolitica (LcrF - в других видах Yersinia). Считают, что терморегуляция экспрессии LcrF осуществляется посредством плавления при более высоких температурах "петли на стебле" РНК в мРНК, которая в нерасплавленном состоянии изолирует сайт связывания рибосомы, таким образом, предотвращая трансляцию[51]. В Y. enterocolitica, напротив, было показано, что транскрипция VirF зависит, главным образом, от температуры[52]. Совсем недавние исследования продемонстрировали более сложную картину с участием термолабильного регулятора, называемого YmoA [51], хотя было обнаружено, что термосенсор РНК в направлении 3'-5' от LcrF, главным образом, отвечает за температурную регуляцию LcrF и, таким образом, зависимых от температуры генов вирулентности.

Для увеличения уровней секреции гетерологичного груза, экспрессированного с pYV под контролем нативного промотора YopE, целью авторов настоящего изобретения было делетирование одной из данных шпилечных структур РНК в Y. enterocolitica в направлении 3'-5' от VirF. Несмотря на то, что важность таких "петель на стебле" РНК на Y. enterocolitica не была однозначно показана, и температурная индукция была скорее характерной изменениям транскрипции, авторы настоящего изобретения смогли идентифицировать шпильку I [51] в направлении 3'-5' от VirF Y. enterocolitica. Затем авторы настоящего изобретения удалили путем гомологичной рекомбинации части шпильки I (от -111 до -57, как в публикации[51]) и оценивали способность секреции кодируемого pYV белка $YopE_{1-138}$-$(BH3\ tBID)_2$ (SEQ ID NO: 27) или $YopE_{1-138}$- $CARD_2$RIG-1 мыши (SEQ ID NO: 38) (каждый в нативном сайте YopE) в анализе секреции in vitro (фиг. 11). Неожиданно было обнаружено, что делеция части области шпильки I в направлении 3'-5' от VirF в Y. enterocolitica увеличила секрецию гетерологичных белков in vitro (фиг. 11 A и B), в отличие от предыдущих сообщений о Y. enterocolitica[52], в которых считали, что транскрипция VirF являлась основной движущей силой терморегуляции.

Чтобы сделать возможной искусственную индукцию экспрессии T3SS и доставки белков с помощью T3SS, авторы настоящего изобретения заменили в другом штамме эндогенный промотор VirF на pYV индуцибельным арабинозой промотором, известным из pBad-MycHisA. Помимо замены промотора VirF, авторы настоящего изобретения ввели в направлении 3'-5' (в обратной ориентации) полный ген araC. Затем авторы настоящего изобретения оценивали способность секреции $YopE_{1-138}$-(BH3 tBID)2 (SEQ ID NO: 27) (кодируемый pYV; в нативном сайте YopE) при отсутствии или в присутствии арабинозы в анализе секреции in vitro (фиг. 11A). Было обнаружено, что гетерологичный белок секретируется с помощью T3SS только после добавления арабинозы, что согласуется с регуляцией экспрессии VirF арабинозой.

Y. enterocolitica ΔHOPEMAT с увеличенной стабильностью гетерологичного груза (in vitro и in vivo).

Было продемонстрировано, что Y. enterocolitia ΔyopH,O,P,E,M,T является высокоспецифичным

штаммом для нацеливания на солидные опухоли в экспериментах авторов настоящего изобретения на мышах; при этом было обнаружено, что зависимая от T3SS доставка цитотоксических белков эффективна в культуре клеток на раковых клетках. Для объединения двух данных свойств необходимо оптимально сконструировать бактерии, колонизирующие солидную опухоль, чтобы они стабильно кодировали цитотоксический груз в течение нескольких дней или даже недель, in vivo. В связи с регуляторными требованиями использование классической устойчивости к антибиотикам для поддержания чужеродной плазмиды в бактериях является неприемлемым. Таким образом, в исследованиях на аллотрансплантатах на мышах авторы настоящего изобретения оценивали систему поддержания плазмиды, не включающую устойчивость к антибиотикам. Данная система основана на хромосомной делеции существенного гена (такого как аспартат-полуальдегид-дегидрогеназа, asd) и кодировании данного гена на гетерологичной плазмиде для поддержания роста бактерий. Дополнение делеции asd для поддержания плазмиды было продемонстрировано ранее[53], хотя сообщалось о сложностях с воспроизводимостью и персистенцией в течение нескольких дней[54]. Авторы настоящего изобретения адаптировали данную систему для применения в Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T, в котором авторы настоящего изобретения дополнительно делетировали кодируемый хромосомно asd (что привело к получению Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd), который затем возвращали на плазмиду со средним числом копий, pBad-MycHisA (pBad-MycHisA-asd). Ген asd клонировали из Y. enterocolitica 8081 и встраивали в сайт PciI pBad-MycHisA в прямой и обратной ориентации, соответственно, с его эндогенным промотором и терминатором транскрипции. Характеристики роста полученных в результате штаммов Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd+pBad-MycHisA-asd (прямая или обратная ориентация asd) сравнивали в культуральных колбах in vitro (среда BHI) с ДТ и родительскими штаммами Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd (фиг. 12). В обеих ориентациях pBad-MycHisA-asd восстанавливал фенотип, наблюдаемый после делеции asd (фиг. 12). Напротив, на модели меланомы B16F10 на мышах, а также на модели 4T1 авторы настоящего изобретения обнаружили, что Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd+pBad-MycHisA-asd не колонизирует солидные опухоли в достаточной степени (фиг. 13 и 14), и из нескольких выделенных колоний авторам настоящего изобретения не удалось восстановить плазмиду pBad-MycHisA-asd. Более того, колонии, выделенные из модели меланомы B16F10 на мышах, подтверждали применительно к росту на содержащих ампициллин планшетах, который подтверждал наличие плазмиды pBad-MycHisA-asd, кодирующей устойчивость к ампициллину. В день 4 после в.в. инъекции только незначительная фракция выделенных колоний демонстрировала устойчивость к ампициллину (фиг. 13). Данный результат может отражать утрату pBad-MycHisA-asd, но также может быть связан с утратой только гена устойчивости к ампициллину или с трудностями при повторном начале экспрессии гена устойчивости к ампициллину, достаточно быстром, чтобы избежать гибели под действием ампициллина. В любом случае колонизация опухоли Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd+pBad-MycHisA-asd, которая наблюдалась на модели меланомы B16F10 на мышах, а также на модели 4T1, продемонстрировала быстрое снижение числа бактерий в солидной опухоли, в отличие от Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. Таким образом, делеция хромосомного asd и дополнение на pBad-MycHisA приводит к резкому снижению выживаемости и способности бактерий размножаться in vivo. Данное наблюдение согласуется с сообщениями о снижении жизнеспособности вследствие несбалансированных уровней asd [54].

Эндогенные белки для транспортирования с помощью T3SS (называемые "внешние белки Yersinia", Yop) кодируются Y. enterocolitica на плазмиде размером 70 т.о. Данная плазмида, называемая плазмидой вирулентности Yersinia (pYV), дополнительно кодирует аппарат T3SS. Авторы настоящего изобретения оценивали стабильность плазмиды pYV на аллотрансплантатной модели 4T1 на мышах. Авторы настоящего изобретения успешно выделили pYV из штаммов, отобранных в день 9 или 10 после инфекции мыши (фиг. 15). Затем авторы настоящего изобретения провели анализы, подтверждающие присутствие и функциональность T3SS выделенных штаммов бактерий через восемь дней роста в солидной опухоли in vivo. Таким образом, авторы настоящего изобретения посчитали pYV вектором, предпочтительным для кодирования гетерологичного груза с целью доставки in vivo. Несмотря на это, авторы настоящего изобретения обнаружили, что процент колоний бактерий, несущих плазмиду pYV, является гетерогенным после роста в течение 9-10 дней в солидных опухолях 4T1 на мышах (фиг. 15). Помимо собственной нестабильности pYV, штамм Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T утратил селективное преимущество увеличения вирулентности Yop in vivo.

Для стабилизации pYV и, таким образом, гетерологичного груза, кодируемого на pYV, авторы настоящего изобретения адаптировали "asd"-систему для применения в Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T на pYV. Авторы настоящего изобретения делетировали кодируемый хромосомно asd (что привело к получению Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd), который затем возвращали на pYV (называемую pYV-asd). Ген asd клонировали из Y. enterocolitica 8081 (Y. enterocolitica подвид enterocolitica 8081; эталонная последовательность NCBI: NC_008800.1) и встраивали путем гомологичной рекомбинации в pYV (в природную область вставки перед SycO) с его эндогенным промотором и терминатором транскрипции. Характеристики роста полученных в результате штаммов Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd+pYV-asd сравнивали в культуральных колбах in vitro (среда BHI) с ДТ и родительскими штаммами Y. enteroco-

litica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd (фиг. 12). pYV-asd был способен восстанавливать фенотип, наблюдаемый после делеции asd (фиг. 12), при этом восстановление не было полным, и могло наблюдаться незначительное снижение роста in vitro. Напротив, на сингенной модели рака 4T1 на мышах in vivo авторы настоящего изобретения обнаружили, что Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd+pYV-asd эффективно колонизирует солидные опухоли (фиг. 16). Поразительно, но было обнаружено, что все колонии, выделенные из солидной опухоли в день 9-10 после инъекции, все еще содержали плазмиду pYV (селекция на содержащих арсенит планшетах для роста; устойчивость к арсениту связана с присутствием генов arsRBC на pYV [55]) (фиг. 15). Следовательно, pYV-asd неожиданно продемонстрировала, что является стабильным in vivo вектором для кодирования гетерологичных белков, подлежащих экспрессии в солидных опухолях путем колонизации бактерий, в течение нескольких дней и недель в исходном штамме Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd.

Эффективность Y. enterocolitica ΔHOPEMT по отсрочиванию прогрессирования опухоли и влияние изменения активности VirF, а также увеличения стабильности.

Эксперименты, подобные проведенным с клетками 4T1 (фиг. 9 и 10), проводили на модели рака молочной железы EMT6 на мышах, в которой мышам Balb/C дикого типа п.к. вводили аллотрансплантат клеток рака молочной железы EMT6 и лечили однократным в.в. введением бактерий, когда опухоль достигала размера приблизительно 80-250 мм^3. День в.в. инъекции бактерий обозначали как день 0, все мыши получали и.п. инъекцию Десферала за один день до Д0. Лечение Y. enterocolitica ΔHOPEMAT не влияло на прогрессирование опухоли по сравнению с солевым раствором. Y. enterocolitica ΔHOPEMAT pYV-YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$ продемонстрировал незначительное влияние на прогрессирование опухоли, которое усиливалось при применении Y. enterocolitica ΔHOPEMAT ΔHairpinI-VirF pYV-YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)2 (фиг. 45). Данные результаты подчеркивают, что такие бактерии и их T3SS можно применять для препятствования прогрессированию опухоли, и что манипуляции с активностью VirF можно применять для модуляции активности бактериальной T3SS после введения in vivo. Более того, применение Y. enterocolitica ΔHOPEMAT ΔHairpinI-VirF Δasd pYV-asd-YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$ дополнительно усиливает влияние на прогрессирование опухоли (фиг. 45), подчеркивая преимущества усиленной генетической стабильности после системного введения.

Доставка триггерных белков пути RIG-1-подобного рецептора с помощью бактериальной T3SS для индукции ответа ИФН I типа.

Цитозольные нуклеиновые кислоты воспринимаются рецептором, таким как члены семейства RIG-1-подобного рецептора (RLR), которые обнаруживают РНК из патогена в цитозоле[56]. RIG-1 и MDA5 состоят из двух N-концевых доменов CARD и центрального (DExD/H) геликазного домена, воспринимающего специфичные нуклеотиды[56]. Связывание со стимуляторной РНК вызывает структурные перестройки в RIG-I (и MDA5), в результате которых CARD высвобождается для последующего связывания с незаякоренными связанными с K63 цепями убиквитина для образования олигомеров[56] (а в случае MDA5 - для образования филаментов[56]). Олигомеризованные домены CARD RIG-I и MDA5 взаимодействуют с доменом CARD MAVS. Данное взаимодействие стимулирует полимеризацию единичного домена CARD MAVS, которая индуцирует нижестоящую передачу сигналов, в конечном итоге приводящую к индукции генов ИФН I типа[56].

Авторы настоящего изобретения получили штаммы бактерий, экспрессирующие два N-концевых домена CARD RIG-1, полученного от человека или мыши, слитые с N-концевым бактериальным сигналом секреции для доставки с помощью T3SS, в частности, YopE$_{1-138}$ (SEQ ID NO: 37 и 38). Доставку слитого белка YopE$_{1-138}$ - CARD2 RIG-1 оценивали с помощью стандартного анализа секреции in vitro, и функциональность доставленных белков оценивали на репортерной линии клеток для индукции ИФН I типа. Репортерные клетки меланомы мыши B16F10 для стимуляции ИФН I типа основаны на активности секретированной щелочной фосфатазы, находящейся под контролем промотора I-ISG54, который состоит из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE. Репортерные клетки инфицировали различными количествами (МЗ) штаммов бактерий, экспрессированных из полученной из pBadMycHisA плазмиды (pBad_Si2) и транслоцирующих белок YopE$_{1-138}$ - CARD$_2$ RIG-1. N-концевые домены CARD RIG-1 мыши и человека продемонстрировали индукцию дозозависимого ответа ИФН I типа в репортерной линии клеток (фиг. 17), в то время как фоновый штамм бактерий (Y. enterocolitica ΔHOPEMAT) не был способен индуцировать такой ответ (фиг. 17). Домены CARD RIG-1 человека и мыши индуцировали подобный ответ ИФН I типа на репортерной линии клеток мыши (фиг. 17), что согласуется с высокой степенью идентичности (76%) и подобия (88,5%) последовательности. Таким образом, слияние с N-концевым сигналом секреции бактерий привело к успешной доставке экспрессированных в бактериях белков YopE$_{1-138}$ - CARD$_2$ RIG-1 человека и мыши и не предотвратило фолдинг и функцию доменов CARD RIG-1 в эукариотической клетке. Это означает, что слитые с YopE домены CARD RIG1 все еще способны мультимеризоваться и индуцировать мультимеризацию MAVS, что является неожиданным.

В следующих экспериментах с применением данной репортерной линии клеток ИФН I типа B16F10 авторы настоящего изобретения сравнивали Y. enterocolitica ΔHOPEMAT с Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде (pBad_Si2) YopE$_{1-138}$-MycHis или YopE$_{1-138}$-

$CARD_2$Rig1 человека. Вновь доставка доменов CARD RIG-1 человека индуцировала дозозависимый ответ ИФН I типа, тогда как Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, доставляющие $YopE_{1-138}$-MycHis, не оказывали влияния на ответ ИФН I типа (фиг. 18). В этом же анализе авторы настоящего изобретения сравнивали потенциал индукции ИФН I типа бактерий, доставляющих домены CARD RIG-1, с положительным контролем, интерфероном гамма (ИФНγ) мыши.

Весьма неожиданно было установлено, что бактериальная доставка доменов CARD RIG-1 была способна индуцировать максимальный ответ репортерной линии клеток, подобный ответу, полученному в положительном контроле индукции ИФН I типа, ИФНγ (фиг. 18 и 19).

В следующих экспериментах авторы настоящего изобретения инфицировали клетки рака молочной железы мыши 4T1 или клетки меланомы B16F10 ДТ и переносили супернатант, предположительно, содержащий ИФН, через 4 ч на репортерную линию клеток ИФН I типа B16F10. Данным способом авторы настоящего изобретения сравнивали Y. enterocolitica ΔHOPEMAT с Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодирующим на эндогенной плазмиде вирулентности (pYV) $YopE_{1-138}$ - $CARD_2$RIG1 мыши. Доставка кодируемых pYV доменов CARD RIG-1 мыши индуцировала дозозависимый ответ ИФН I типа, тогда как Y. enterocolitica ΔHOPEMAT не оказывал влияния на ответ ИФН I типа на клетках B16F10 ДТ (фиг. 20) или 4T1 (фиг. 21).

В следующем эксперименте оценивали потенциал нескольких версий, состоящих из различных длин CARD RIG-1 мыши, индуцировать ответ ИФН I типа. Домены CARD RIG-1, как прогнозируют, кодируются аминокислотами 1-172 (последовательность мыши, Uniprot № Q6Q899). Авторы настоящего изобретения оценивали $YopE_{1-138}$-домены CARD1-246 RIG1 мыши, $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-229}$ RIG1 мыши и $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши на ИФН-репортерных клетках меланомы B16F10, а также ИФН-репортерных клетках макрофагов RAW (фиг. 27-28). Было обнаружено, что $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-229}$ RIG1 мыши и $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши являются в равной степени активными. В следующем эксперименте авторы настоящего изобретения оценивали биологическую активность доставленных с помощью бактерий MDA5. Авторы настоящего изобретения клонировали несколько версий, состоящих из различных длин CARD MDA5 мыши, и оценивали их биологическую активность при индукции ответа ИФН I типа на ИФН-репортерных клетках B16F10. Домены CARD MDA5, как прогнозируют, кодируются аминокислотами 1-190 (последовательность мыши, Uniprot № Q8R5F7). Авторы настоящего изобретения оценивали $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-294}$ MDA5 мыши и $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-231}$ MDA5 мыши на ИФН-репортерных клетках меланомы B16F10. Было обнаружено, что все варианты являются активными (фиг. 29). Неожиданно было обнаружено, что активность доставленных CARD MDA5 была гораздо менее высокой, чем CARD RIG-1, даже несмотря на то, что белки характеризовались весьма подобной биологической функцией и структурой белка, состоящей из двух N-концевых доменов CARD и центрального (DExD/H) геликазного домена, воспринимающего специфичные нуклеотиды[56].

Доставка триггерных белков пути cGAS/STING с помощью бактериальной T3SS для индукции ответа ИФН I типа.

В пути cGAS/STING цитозольная двухцепочечная ДНК обнаруживается в результате связывания с ферментом циклической ГМФ-АМФ синтазой (cGAS). После связывания с дсДНК (двухспиральной ДНК) cGAS активируется и продуцирует второй мессенджер-циклический динуклеотид, циклический ГМФ-АМФ (цГАМФ). цГАМФ напрямую связывается с рецепторным белком эндоплазматического ретикулума STING (Stimulator of IFN Genes, стимулятор генов ИФН). После связывания с цГАМФ STING активируется и индуцирует путь передачи сигналов, приводящий к транскрипции ИФН I типа и других корегулируемых генов[57]. CGAS человека продуцирует 2',3'-цГАМФ (содержащий 2'-5' и 3'-5' фосфодиэфирные связи), однако было показано, что другие циклические динуклеотиды способны индуцировать STING мыши или человека на различных уровнях. Такие циклические динуклеотиды включают 3',3'-цГАМФ (например, продуцируемый DncV Vibrio cholera или некоторыми эукариотическими cGAS), циклический ди-АМФ (например, продуцируемый CdaA или DisA различных грамположительных видов) или циклический ди-ГМФ (например, продуцируемый WspR Pseudomonas aeruginosa)[57,58]. В то время как STING человека ДТ (и STING мыши) распознает 2',3'-цГАМФ, 3',3'-цГАМФ, циклический ди-АМФ и циклический ди-ГМФ, некоторые природные варианты STING человека отвечают на данные агонисты различным образом[59]. Для активации пути cGAS/STING после доставки белков бактериями авторы настоящего изобретения клонировали подлежащий экспрессии WspR P. aeruginosa, продуцирующий циклический ди-ГМФ, и доставляли с использованием Y. enterocolitica с помощью T3SS. Для увеличения активности WspR применяли только его домен GGDEF (дигуанилатциклазный домен), и домен стебля, расположенный в направлении 3'-5', заменяли мотивом лейциновой молнии GCN4 из дрожжей. Известно, что для проявления активности WspR необходима димеризация, и было продемонстрировано, что лейциновая молния GCN4 образует параллельные двойные спирали и, таким образом, выступает в качестве мощного модуля демеризации. Мотив GCN4 был слит с доменом GGDEF WspR, включая природный линкер между GGDEF и спиральным стеблем, чтобы обеспечить междоменную гибкость, сравнимую с WspR дикого типа[60].

Доставку слитого белка $YopE_{1-138}$ - лейциновая молния GCN4 - домен GGDEF WspR (сокращенно: $YopE_{1-138}$ - WspR) (SEQ ID NO: 39) оценивали на репортерной линии клеток для индукции ИФН I типа. Репортерные клетки меланомы мыши B16F10 для стимуляции ИФН I типа основаны на активности секретированной щелочной фосфатазы, находящейся под контролем промотора I-ISG54, который состоит из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE. Репортерные клетки инфицировали различными количествами (МЗ) штаммов бактерий, экспрессированных из полученной из pBad-MycHisA плазмиды (pBad_Si2) и транслоцирующих белок $YopE_{1-138}$ - WspR. Домен GGDEF WspR P. aeruginosa, слитый с мотивом лейциновой молнии GCN4, продемонстрировал дозозависимую индукцию ответа ИФН I типа в репортерной линии клеток (фиг. 22), в то время как фоновый штамм бактерий (Y. enterocolitica ΔHOPEMAT) не был способен индуцировать такой ответ (фиг. 22). Таким образом, слияние с N-концевым сигналом секреции бактерий привело к успешной доставке экспрессированного в бактериях белка $YopE_{1-138}$ - лейциновая молния GCN4 (дрожжи) - GGDEF WspR (P. aeruginosa) и не предотвратило фолдинг и функцию данного состоящего из трех частей белка в эукариотической клетке. Это означает, что слитые с YopE лейциновая молния GCN4 - GGDEF WspR все еще способны димеризоваться и, таким образом, приводить к получению активных доменов GGDEF, что является неожиданным.

Для следующих экспериментов авторы настоящего изобретения клонировали DncV V. cholerae (продуцирующий 3',3'-цГАМФ)[57], DisA-подобный белок Bacillus cereus (продуцирующий циклический ди-АМФ)[61] и cGAS эукариотического анемона (Nematostella vectensis) (продуцирующий 3',3'-цГАМФ)[57], которые, как сообщалось, являются активными при отсутствии внешних стимулов, для экспрессии и транслокации бактериями. Циклазы типа DisA обычно образуют октамеры[61], которые могут быть не совместимыми с N-концевым слиянием YopE и бактериальной доставкой. DisA-подобный белок B. cereus (код PDB 2fb5) идентифицировали на основании структурного подобия диаденилатциклазному (DAC) домену классических белков DisA [61], но, что примечательно, в нем отсутствуют все спирали, которые, как известно для других белков DisA, необходимы для мультимеризации. Авторы настоящего изобретения, таким образом, решили использовать преимущество предположительно мономерного активного DisA-подобного белка из B. cereus (код PDB 2fb5; остатки 76-205).

Доставку слитого белка $YopE_{1-138}$ - DncV V. cholerae (SEQ ID NO: 41), $YopE_{1-138}$ - DisA-подобный белок B. cereus (SEQ ID NO: 42) и $YopE_{1-138}$ - cGAS анемона (SEQ ID NO: 43) оценивали на репортерной линии клеток для индукции ИФН I типа. Репортерные клетки меланомы мыши B16F10 для стимуляции ИФН I типа основаны на активности секретированной щелочной фосфатазы, находящейся под контролем промотора I-ISG54, который состоит из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE. Репортерные клетки инфицировали различными количествами (МЗ) штаммов бактерий, экспрессированных из полученной из pBadMycHisA плазмиды (pBad_Si2) и транслоцирующих $YopE_{1-138}$ - DncV V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - DisA-подобный белок B. cereus и $YopE_{1-138}$ - cGAS анемона. $YopE_{1-138}$ - DncV V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - DisA-подобный белок B. cereus и $YopE_{1-138}$- cGAS анемона все продемонстрировали дозозависимую индукцию ответа ИФН I типа в репортерной линии клеток (фиг. 23), в то время как фоновый штамм бактерий (Y. enterocolitica ΔHOPEMAT) или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, доставляющий $YopE_{1-138}$-MycHis, не были способны индуцировать такой ответ (фиг. 23). cGAS анемона (Nematostella vectensis), продуцирующий 3',3'-цГАМФ, продемонстрировал наивысшую активность, вместе с тем было обнаружено, что DncV V. cholerae (продуцирующий 3',3'-цГАМФ) и DisA-подобный белок Bacillus cereus (продуцирующий циклический ди-АМФ) активируют ответ ИФН I типа в аналогичной степени.

Таким образом, слияние с N-концевым сигналом секреции бактерий привело к успешной доставке экспрессированных в бактериях белков $YopE_{1-138}$ - DncV V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - DisA-подобный белок B. cereus и $YopE_{1-138}$ - cGAS анемона и не предотвратило фолдинг и функцию данных белков в эукариотической клетке, что не могло быть предсказано.

В качестве альтернативы, IRF3 мыши, центральный фактор транскрипции, функционирующий ниже RLR- или cGAS/STING-зависимой передачи сигналов [62], клонировали для экспрессии и транспортирования бактериями. При отсутствии активации IRF-3 находится в латентной конформации в цитоплазме. Только после активации вышестоящих рецепторов, таких как RIG-1, MDA5 или STING, IRF-3 фосфорилируется посредством TBK1 и IKKε и, таким образом, активируется. Фосфорилирование IRF-3 приводит к димеризации, транслокации в ядро и связыванию с коактиваторами[62]. Для получения конститутивно активной версии IRF3 авторы настоящего изобретения заменили один из наиболее важных сайтов фосфорилирования (Ser397 в IRF3 мыши) на Asp [62]. Доставку слитого белка $YopE_{1-138}$ - IRF3 Ser397Asp мыши (SEQ ID NO: 40) оценивали в анализе секреции in vitro, в котором искусственно индуцировали секрецию белка в окружающую жидкость. После преципитации белка с помощью трихлоруксусной кислоты для определения секретированных количеств белка применяли анализ методом вестерн-блоттинга с антителом против YopE (фиг. 24). Хотя штаммы ΔHOPEMT, кодирующие $YopE_{1-138}$ - BH3 tBID мыши, привели к получению мощной полосы в секретированной фракции (на уровне 15-20 кДа), было обнаружено, что также, хотя и в меньшей степени, секретируется $YopE_{1-138}$ - IRF3 Ser397Asp мыши (на уровне 50-75 Да) (фиг. 24). Анализ суммарной фракции бактериальных клеток выявил, что уровни экспрессии $YopE_{1-138}$ - BH3 tBID мыши и $YopE_{1-138}$ - IRF3 Ser397Asp мыши являются сопоставимыми, хотя для

$YopE_{1-138}$ - IRF3 Ser397Asp мыши наблюдался паттерн полос деградации (фиг. 24)

Доставка триггерных белков путей cGAS/STING и RIG-1-подобного рецептора с помощью бактериальной T3SS для индукции ответа ИФН I типа в иммунных клетках.

Доставку слитого белка $YopE_{1-138}$ - CARD2 RIG-1 мыши, $YopE_{1-138}$ - DncV V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - DisA-подобный белок B. cereus и $YopE_{1-138}$ - cGAS анемона оценивали на иммунной репортерной линии клеток для индукции ИФН I типа.

Репортерные клетки макрофагов RAW264.7 мыши для стимуляции ИФН I типа были основаны на активности секретированной щелочной фосфатазы, находящейся под контролем промотора I-ISG54, который состоит из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE. Репортерные клетки инфицировали различными количествами (MЗ) штаммов бактерий, экспрессированных из полученной из pBadMycHisA плазмиды (pBad_Si2) и транслоцирующих $YopE_{1-138}$- $CARD_2$RIG-1 мыши, $YopE_{1-138}$-DncV V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - DisA-подобный белок B. cereus и $YopE_{1-138}$- cGAS анемона. $YopE_{1-138}$- $CARD_2$RIG-1 мыши, $YopE_{1-138}$ - DncV V. cholerae и $YopE_{1-138}$- cGAS анемона все продемонстрировали дозозависимую индукцию ответа ИФН I типа на данной иммунной репортерной линии клеток (фиг. 25), в то время как фоновый штамм бактерий (Y. enterocolitica ΔHOPEMAT) не был способен индуцировать такой ответ (фиг. 25). $YopE_{1-138}$ - CARD2 RIG-1 мыши продемонстрировал наивысшую активность, за ним следовали cGAS анемона (Nematostella vectensis), продуцирующий 3',3-цГАМФ, и DncV V. cholerae (продуцирующий 3',3'-цГАМФ). Было обнаружено, что DisA-подобный белок Bacillus cereus (продуцирующий циклический ди-АМФ) лишь слабо активировал ответ ИФН I типа.

Для следующих экспериментов авторы настоящего изобретения клонировали аминокислоты 161-522 cGAS человека (Uniprot № Q8N884 и SEQ ID NO: 115; продуцирующий 2',3'-цГАМФ)[57] для экспрессии и транслокации бактериями. Репортерные клетки меланомы мыши B16F10 и макрофаги мыши RAW для стимуляции ИФН I типа были основаны на активности секретированной щелочной фосфатазы, находящейся под контролем промотора I-ISG54, который состоит из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE. Репортерные клетки были инфицированы различными количествами (MЗ) штаммов бактерий, экспрессированных из полученной из pBadMycHisA плазмиды (pBad_Si2) и транслоцирующих $YopE_{1-138}$ - $cGAS_{161-522}$ человека, и продемонстрировали дозозависимую индукцию ответа ИФН I типа в репортерной линии клеток, так же как штамм бактерий, экспрессированный из полученной из pBadMycHisA плазмиды (pBad_Si2) и транслоцирующий $YopE_{1-138}$ - cGAS анемона, $YopE_{1-138}$ - $CGAS_{60-422}$ анемона, $YopE_{1-138}$ - $CdaA_{101-273}$ Listeria, $YopE_{1-138}$- DncV V. cholerae или $YopE_{1-138}$ - DisA-подобный белок B. cereus (фиг. 32-33). Наиболее мощная активация наблюдалась для $YopE_{1-138}$ - $cGAS_{161-522}$ человека, за ним следовали $YopE_{1-138}$ - cGAS анемона, $YopE_{1-138}$ - $CGAS_{60-422}$ анемона. Интересно отметить, что наиболее короткий вариант $cGAS_{60-422}$ анемона был незначительно более активным. $YopE_{1-138}$ - $CdaA_{101-273}$ Listeria, $YopE_{1-138}$ - DncV V. cholerae или $YopE_{1-138}$ - DisA-подобный белок B. cereus также демонстрировали дозозависимую активацию ИФН, хотя и в меньшей степени, чем белки cGAS (фиг. 32-33).

Доставка MAVS с помощью бактериальной T3SS для индукции ответа ИФН I типа.

Цитозольные нуклеиновые кислоты воспринимаются рецептором, таким как члены семейства RIG-1-подобного рецептора (RLR), которые обнаруживают РНК из патогена в цитозоле[56]. RIG-1 и MDA5 состоят из двух N-концевых доменов CARD и центрального (DExD/H) геликазного домена, воспринимающего специфичные нуклеотиды[56]. Связывание со стимуляторной РНК вызывает структурные перестройки в RIG-I (и MDA5), которые высвобождают CARD для последующего связывания с незаякоренными связанными с K63 цепями убиквитина для образования олигомеров[56] (а в случае MDA5 - для образования филаментов[56]). Олигомеризованные домены CARD RIG-I и MDA5 взаимодействуют с доменом CARD MAVS. Данное взаимодействие стимулирует полимеризацию единичного домена CARD MAVS, которая индуцирует нижестоящую передачу сигналов, в конечном итоге приводящую к индукции генов ИФН I типа[56].

Авторы настоящего изобретения получили штаммы бактерий (на основе Y. enterocolitica ΔHOPEMAT), экспрессирующие N-концевые домены CARD MAVS, полученные от человека, слитые с N-концевым бактериальным сигналом секреции для доставки с помощью T3SS, в частности, $YopE_{1-138}$. Доставку слитого белка $YopE_{1-138}$ - CARD MAVS оценивали с помощью стандартного анализа секреции in vitro, и функциональность доставленных белков оценивали на репортерной линии клеток для индукции ИФН I типа. Репортерные клетки меланомы мыши B16F10 и макрофаги мыши RAW для стимуляции ИФН I типа были основаны на активности секретированной щелочной фосфатазы, находящейся под контролем промотора I-ISG54, который состоит из ИФН-индуцибельного промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE. Репортерные клетки инфицировали различными количествами (MЗ) Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, экспрессированного из полученной из pBadMycHisA плазмиды (pBad_Si2) и транслоцирующего белок $YopE_{1-138}$ - CARD MAVS человека. N-концевой домен CARD MAVS мыши продемонстрировал дозозависимую индукцию ответа ИФН I типа в репортерной линии клеток (фиг. 30-31), в то время как фоновый штамм бактерий (Y. enterocolitica ΔHOPEMAT) не был способен индуцировать такой ответ (фиг. 30-31). cGAS человека и домены CARD RIG-1 мыши индуцировали ответ ИФН I типа анало-

гичным образом на репортерных линиях клеток мыши (фиг. 30-31), причем RIG-1 демонстрировал наивысший потенциал активации, за ним следовали MAVS и cGAS. Таким образом, слияние с N-концевым сигналом секреции бактерий привело к успешной доставке экспрессированного в бактериях белка $YopE_{1-138}$ - CARD MAVS человека и не предотвратило фолдинг и функцию домена CARD MAVS в эукариотической клетке. Это означает, что слитый с YopE домен CARD MAVS все еще способен мультимеризоваться и индуцировать мультимеризацию MAVS, что является неожиданным. Еще более неожиданным является то, что было показано, что только CARD MAVS был неспособен индуцировать нижестоящую передачу сигналов ИФН [64], после чего авторы настоящего изобретения обнаружили, что слитый с YopE домен CARD MAVS мощно активирует путь ИФН I типа.

Более того, было продемонстрировано, что С-концевой трансмембранный домен MAVS является существенным для функционирования MAVS после трансфекции ДНК, и было продемонстрировано, что домен CARD MAVS сам по себе является неактивным при экспрессии из трансфицированных конструкций ДНК [66]. Более того, было продемонстрировано, что CARD MAVS, слитый с трансмембранной областью, которая обладает способностью при экспрессии из трансфицированной ДНК или в виде очищенного белка активировать ответ ИФН I типа[64,66], зависел от эндогенных MAVS, агрегацию и, таким образом, активацию которых он начинал[64]. Авторы настоящего изобретения с применением линии клеток MAVS КО смогли продемонстрировать (фиг. 52), что доставленный бактериями слитый с YopE CARD MAVS является активным без эндогенных MAVS, присутствующих на митохондриях. То, что CARD MAVS, слитый с YopE, способен мультимеризоваться и активировать нижестоящие партнеры без трансмембранного домена и, более того, без эндогенных MAVS, является неожиданным.

Сравнительный анализ с низкомолекулярным агонистом STING с целью индукции ответа ИФН I типа in vitro.

Циклические динуклеотиды представляют собой хорошо известные агонисты пути STING, приводящие к нижестоящей индукции передачи сигналов ИФН I типа. Агонисты STING были описаны в литературе[59] и, как было обнаружено, они, главным образом, воздействуют на иммунные клетки, причем наивысшая активность была продемонстрирована на дендритных клетках[59]. Передача сигналов RLR, напротив, как было обнаружено, экспрессируется более повсеместно[63]. Авторы настоящего изобретения, таким образом, сравнивали бактерии Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, доставляющие ферменты, которые образуют циклические динуклеотиды ($YopE_{1-138}$-cGAS анемона и $YopE_{1-138}$-cGAS человека), или бактерии, доставляющие $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши, с низкомолекулярным агонистом STING 2'3'-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp) (подобен ADU-S100 от компании Aduro Biotech) на иммунных клетках (ИФН-репортерные клетки макрофаги RAW) и неиммунных клетках (ИФН-репортерные клетки меланомы B16F1) в отношении интерферон-индуцирующего потенциала. На иммунных клетках аналогичный активирующий потенциал наблюдался для низкомолекулярного агониста STING 2'3'-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp) и всех трех исследованных штаммов бактерий, доставляющих белок ($YopE_{1-138}$-cGAS анемона, $YopE_{1-138}$-cGAS человека или $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-218}$RIG1 мыши), в то время как бактерии Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, не доставляющие белок, продемонстрировали весьма слабый активирующий потенциал (фиг. 34-37). На неиммунных клетках (раковые клетки, меланома) доставленные бактериями $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-218}$ RIG1 мыши, доставленные бактериями $YopE_{1-138}$-cGAS анемона и $YopE_{1-138}$-cGAS человека работали в равной степени хорошо и практически превосходили низкомолекулярный агонист STING, что подчеркивает более повсеместное присутствие RLR по сравнению со STING (фиг. 34-37).

Строгая зависимость от T3SS доставленных бактериями доменов CARD RIG1 или CARD MAVS.

Для доказательства строго зависимого от T3SS транспортирования делетировали один из белков T3SS, образующий транслокационную пору в мембране эукариотической клетки (YopB). Потенциал таких бактерий с делетированным yopB (называемых Y. enterocolitica ΔHOPEMAT-yopB), экспрессирующих $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши или $YopE_{1-138}$ - $CARD_{1-100}$ MAVS человека, оценивали на ИФН-репортерной линии клеток макрофагов RAW и сравнивали с экспрессирующими yopB бактериями Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, также экспрессирующими $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши или $YopE_{1-138}$ - $CARD_{1-100}$ MAVS человека (фиг. 38). Хотя бактерии с yopB дикого типа, экспрессирующие $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши или $YopE_{1-138}$-$CARD_{1-100}$ MAVS человека, демонстрировали дозозависимую активацию ответа ИФН I типа, штаммы с делетированным yopB, экспрессирующие эти же белки, были неспособны индуцировать такой ответ выше фонового уровня, обусловленного фоновым штаммом бактерий, который не экспрессировал белок, подлежащий доставке (фиг. 38). Это подтверждает, что $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши или $YopE_{1-138}$ - $CARD_{1-100}$ MAVS человека оба транспортировались через иглу T3SS в эукариотические клетки-мишени.

Индукция ответа ИФН I типа в неочищенном изоляте опухоли/

Для подтверждения того, что ответ ИФН I типа можно инициировать в микроокружении опухоли, авторы настоящего изобретения проводили анализ на неочищенных изолятах опухоли, инфицированных ex vivo штаммами бактерий, с последующим анализом интерферона бета методом ELISA. Мышей Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6 умерщвляли, когда опухоль достигала объема. Опухоли растирали, расщепляли и высевали в виде суспензии отдельных клеток на 24-

луночных планшетах. Такие клетки от двух различных опухолей оставляли неинфицированными (пунктирные линии на фиг. 39) или инфицировали Y. enterocolitica ΔHOPEMAT или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодируемым на полученной из pBadMycHisA плазмиде $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши. Стимуляцию ИФН оценивали с применением ELISA для интерферона бета, и было продемонстрировано, что, хотя Y. enterocolitica ΔHOPEMAT был неспособен индуцировать секрецию интерферона бета, инфекция Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, кодирующим $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши, привела к дозозависимой секреции интерферона бета неочищенным изолятом опухоли двух различных опухолей (фиг. 39). Это подтверждает, что доставленные с помощью бактерий домены CARD RIG1 способны индуцировать продукцию интерферона в смешанных популяциях клеток, состоящих из раковых клеток, иммунных клеток и всех других клеток, в микроокружении опухоли.

Эффективность Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, доставляющего CARD RIG1 или cGAS, по отсрочиванию прогрессирования опухоли/

Для оценки влияния $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши и $YopE_{1-138}$-cGAS человека, доставленных в опухолевые клетки in vivo, авторы настоящего изобретения проводили исследование на мышах Balb/C дикого типа с п.к. аллотрансплантатом клеток рака молочной железы EMT6. Мышам внутриопухолево (в.о.) инъецировали ФБР (фиг. 40) или $7{,}5\times10^7$ Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, Y. enterocolitica ΔHOPEMAT+$YopE_{1-138}$ домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT+$YopE_{1-138}$ cGAS человека, когда опухоль достигала размера приблизительно 60-130 $мм^3$. День первой в.о. инъекции бактерий обозначали как день 0. Мышам вводили в.о. инъекции в Д0, Д1, Д5, Д6, Д10 и Д11. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней с помощью штангенциркуля. Лечение Y. enterocolitica ΔHOPEMAT самим по себе продемонстрировало влияние на прогрессирование объема опухоли, у 4/14 мышей наблюдалась полная регрессия опухоли (фиг. 41). Было обнаружено, что Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, который доставляет белок, индуцирующий ответ ИФН I типа, будь то CARD RIG1 или cGAS, приводил к более выраженному влиянию на прогрессирование опухоли; у 8/14 (CARD RIG1) или 8/15 (cGAS) мышей наблюдалась полная и длительная регрессия опухоли (фиг. 42-43). Данные результаты подчеркивают, что такие бактерии и их T3SS можно применять, чтобы весьма значительно препятствовать прогрессированию опухоли, и что доставка белков, индуцирующих ИФН I типа, хорошо подходит для индукции регрессии первичной опухоли.

Затем за мышами с полной регрессией опухоли наблюдали вплоть до дня 65 после исходной аллотранплантации опухоли, после чего в день 65 проводили повторную антигенную стимуляцию клетками рака молочной железы EMT6 на противоположной стороне для оценки иммуно-опосредованной памяти и системной активности против данных раковых клеток. В данном исследовании повторной антигенной стимуляции дополнительное лечение не вводили, и за мышами просто наблюдали применительно к прогрессированию опухоли на противоположной стороне и сравнивали с ранее не использованными в экспериментах мышами (мышами, которых ранее не подвергали воздействию клеток рака молочной железы EMT6, но все другие параметры которых, такие как возраст, были идентичными). Было обнаружено, что в то время как на ранее не использованных в экспериментах мышах п.к. аллотрансплантированные опухолевые клетки привели к росту опухоли, все мыши с предварительно вылеченной опухолью EMT6 с полной регрессией на противоположной стороне были защищены от роста опухоли (фиг. 44). Следует отметить, что опухоли у мышей с предшествующей полной регрессией, индуцированной лечением бактериями, на противоположной стороне начинали расти в течение нескольких дней и достигали объемов вплоть до >100 $мм^3$ (при максимальном объеме приблизительно в день 10 после второй трансплантации), а затем сморщивались (фиг. 44). Данный лаг-период может свидетельствовать об адаптивном ответе иммунной системы, которому требуется несколько дней, прежде чем полностью установиться.

В следующих экспериментах для оценки влияния $YopE_{1-138}$-домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши и $YopE_{1-138}$-cGAS человека, доставленных в опухолевые клетки in vivo, авторы настоящего изобретения провели исследование на мышах C57BL/6 дикого типа с п.к. аллотрансплантатом раковых клеток меланомы B16F10. Мышам внутриопухолево (в.о.) инъецировали ФБР или $7{,}5\times10^7$ Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, Y. enterocolitica ΔHOPEMAT+$YopE_{1-138}$ домены $CARD_{1-246}$ RIG1 мыши или Y. enterocolitica ΔHOPEMAT+$YopE_{1-138}$ cGAS человека, когда опухоль достигала размера приблизительно 75 $мм^3$. День первой в.о. инъекции бактерий обозначали как день 0. Мышам вводили в.о. инъекции в Д0, Д1, Д2, Д3, Д6 и Д9. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней с помощью штангенциркуля. Лечение Y. enterocolitica ΔHOPEMAT самим по себе продемонстрировало влияние на прогрессирование объема опухоли, у 1/15 мышей наблюдалась полная регрессия опухоли (фиг. 46). Было обнаружено, что Y. enterocolitica ΔHOPEMAT, который доставлял белок, индуцирующий ответ ИФН I типа, будь то CARD RIG1 или cGAS, приводил к весьма выраженному влиянию на прогрессирование опухоли; у 5/15 (CARD RIG1) или 8/15 (cGAS) мышей наблюдалась полная и длительная регрессия опухоли (фиг. 46). Данные результаты подчеркивают, что такие бактерии и их T3SS можно применять, чтобы весьма значительно препятствовать прогрессированию опухоли, и что доставка белков, индуцирующих ИФН I типа, хорошо подходит для индукции регрессии первичной опухоли. Примечательно, особенно в случае бактерий, доставляющих $YopE_{1-138}$-cGAS человека, что сразу после первых введений наблюдалось увеличение объема опухо-

ли по сравнению с контролем, получавшим ФБР, что может быть вызвано миграцией лейкоцитов в опухоль (псевдопрогрессирование), вызванной внутриклеточной доставкой белка cGAS, индуцирующего ИФН I типа.

Перечень литературных источников

1 Hayes, C. S., Aoki, S. K. & Low, D. A. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet* **44**, 71-90, doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091449 (2010).

2 Cornelis, G. R. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811-825, doi:nrmicro1526 [pii]10.1038/nrmicro1526 (2006).

3 Blanco-Toribio, A., Muyldermans, S., Frankel, G. & Fernandez, L. A. Direct injection of functional single-domain antibodies from E. coli into human cells. *PLoS One* **5**, e15227, doi:10.1371/journal.pone.0015227 (2010).

4 Bichsel, C. *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. *Cell Reprogram* **15**, 117-125, doi:10.1089/cell.2012.0058 (2013).

5 Bichsel, C. *et al.* Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and differentiated cells. *PLoS One* **6**, e16465, doi:10.1371/journal.pone.0016465 (2011).

6 Chamekh, M. *et al.* Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the Shigella type III secretion apparatus. *J Immunol* **180**, 4292-4298 (2008).

7 Skurnik, M. & Wolf-Watz, H. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of Yersinia spp. *Mol Microbiol* **3**, 517-529 (1989).

8 Isberg, R. R., Voorhis, D. L. & Falkow, S. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**, 769-778 (1987).

9 Mota, L. J. & Cornelis, G. R. The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* **37**, 234-249, doi:R673752030212825 [pii]10.1080/07853890510037329 (2005).

10 Trosky, J. E., Liverman, A. D. & Orth, K. Yersinia outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* **10**, 557-565, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x (2008).

11 Brenner, D. & Mak, T. W. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 871-877, doi:S0955-0674(09)00160-4 [pii]10.1016/j.ceb.2009.09.004 (2009).

12 Chalah, A. & Khosravi-Far, R. The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol* **615**, 25-45, doi:10.1007/978-1-4020-6554-5_3 (2008).

13 Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742-758, doi:S0092-8674(11)01283-9 [pii]10.1016/j.cell.2011.10.033 (2011).

14 Waugh, D. S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* **80**, 283-293, doi:S1046-5928(11)00203-8 [pii]10.1016/j.pep.2011.08.005 (2011).

15 Howard, S. L. *et al.* Application of comparative phylogenomics to study the evolution of Yersinia enterocolitica and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J Bacteriol* **188**, 3645-3653, doi:10.1128/JB.188.10.3645-3653.2006 (2006).

16 Thomson, N. R. *et al.* The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity Yersinia enterocolitica strain 8081. *PLoS Genet* **2**, e206, doi:10.1371/journal.pgen.0020206 (2006).

17 Pelludat, C., Hogardt, M. & Heesemann, J. Transfer of the core region genes of the Yersinia enterocolitica WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to Y.

enterocolitica MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun* **70**, 1832-1841 (2002).

18 Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P. & Cornelis, G. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of Yersinia enterocolitica W227. *Infect Immun* **57**, 2534-2541 (1989).

19 Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells. *Mol Microbiol* **14**, 583-594 (1994).

20 Sarker, M. R., Neyt, C., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The Yersinia Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* **180**, 1207-1214 (1998).

21 Neubauer, H., Aleksic, S., Hensel, A., Finke, E. J. & Meyer, H. Yersinia enterocolitica 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol* **290**, 61-64, doi:10.1016/S1438-4221(00)80107-1 (2000).

22 Feldman, M. F., Muller, S., Wuest, E. & Cornelis, G. R. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the Yersinia enterocolitica type III Ysc system. *Mol Microbiol* **46**, 1183-1197, doi:3241 [pii] (2002).

23 Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. A synonymous mutation in Yersinia enterocolitica yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *J Bacteriol* **187**, 707-715, doi:10.1128/JB.187.2.707-715.2005 (2005).

24 Wolke, S., Ackermann, N. & Heesemann, J. The Yersinia enterocolitica type 3 secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins. *Cell Microbiol* **13**, 1339-1357, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01623.x (2011).

25 Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Genetic analysis of the yopE region of Yersinia spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression. *J Bacteriol* **172**, 1547-1555 (1990).

26 Sambrook, J. (ed David W. Russell) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. , 2001).

27 Alto, N. M. & Dixon, J. E. Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of bacterial type III effector proteins. *Methods Enzymol* **439**, 131-143, doi:S0076-6879(07)00410-7 [pii]10.1016/S0076-6879(07)00410-7 (2008).

28 Alto, N. M. *et al.* Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* **124**, 133-145, doi:S0092-8674(05)01229-8 [pii]10.1016/j.cell.2005.10.031 (2006).

29 Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica. *Gene* **109**, 137-141, doi:0378-1119(91)90599-7 [pii] (1991).

30 Yoneda, Y. *et al.* A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently. *Exp Cell Res* **201**, 313-320 (1992).

31 Metcalf, W. W., Jiang, W. & Wanner, B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new Escherichia coli hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. *Gene* **138**, 1-7 (1994).

32 Diepold, A. *et al.* Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome. *Embo J* **29**, 1928-1940, doi:emboj201084 [pii]10.1038/emboj.2010.84 (2010).

33 Iriarte, M., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The rpoS gene from Yersinia enterocolitica and its influence on expression of virulence factors. *Infect Immun* **63**, 1840-1847 (1995).

34 Cornelis, G., Vanootegem, J. C. & Sluiters, C. Transcription of the yop regulon from Y. enterocolitica requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* **2**, 367-379, doi:0882-4010(87)90078-7 [pii] (1987).

35 Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Role of Yops and adhesins in resistance of Yersinia enterocolitica to phagocytosis. *Infect Immun* **70**, 4165-4176 (2002).

36 Boyd, A. P., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. Competition between the Yops of Yersinia enterocolitica for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* **182**, 4811-4821 (2000).

37 Iriarte, M. & Cornelis, G. R. YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**, 915-929 (1998).

38 Kudryashev, M. *et al.* In situ structural analysis of the Yersinia enterocolitica injectisome. *Elife* **2**, e00792, doi:10.7554/eLife.0079200792 [pii] (2013).

39 Schulte, R. *et al.* Yersinia enterocolitica invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* **14**, 1471-1484 (2000).

40 Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C. & Cornelis, G. R. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**, 1278, doi:307/5713/1278 [pii]10.1126/science.1107679 (2005).

41 Carrington, J. C. & Dougherty, W. G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3391-3395 (1988).

42 Kapust, R. B., Tozser, J., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 949-955, doi:10.1016/S0006-291X(02)00574-0S0006-291X(02)00574-0 [pii] (2002).

43 Liang, H., Gao, H., Maynard, C. A. & Powell, W. A. Expression of a self-processing, pathogen resistance-enhancing gene construct in Arabidopsis. *Biotechnol Lett* **27**, 435-442, doi:10.1007/s10529-005-1884-9 (2005).

44 Weber, W. *et al.* Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol* **20**, 901-907, doi:10.1038/nbt731nbt731 [pii] (2002).

45 Kapust, R. B. *et al.* Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng* **14**, 993-1000 (2001).

46 Lee, V. T., Anderson, D. M. & Schneewind, O. Targeting of Yersinia Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol* **28**, 593-601 (1998).

47 Gray, D. C., Mahrus, S. & Wells, J. A. Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease. *Cell* **142**, 637-646, doi:S0092-8674(10)00783-X [pii]10.1016/j.cell.2010.07.014 (2010).

48 Henrichs, T. *et al.* Target-directed proteolysis at the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4246-4251, doi:102/12/4246 [pii]10.1073/pnas.0408520102 (2005).

49 Aepfelbacher, M., Trasak, C. & Ruckdeschel, K. Effector functions of pathogenic Yersinia species. *Thromb Haemost* **98**, 521-529 (2007).

50 Trulzsch, K., Sporleder, T., Igwe, E. I., Russmann, H. & Heesemann, J. Contribution of the major secreted yops of Yersinia enterocolitica O:8 to

pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* **72**, 5227-5234, doi:10.1128/IAI.72.9.5227-5234.2004 (2004).

51 Bohme, K. *et al.* Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control Yersinia virulence. *PLoS Pathog* **8**, e1002518, doi:10.1371/journal.ppat.1002518 (2012).

52 Rohde, J. R., Luan, X. S., Rohde, H., Fox, J. M. & Minnich, S. A. The Yersinia enterocolitica pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J Bacteriol* **181**, 4198-4204 (1999).

53 Curtiss, R., 3rd, Galan, J. E., Nakayama, K. & Kelly, S. M. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Res Microbiol* **141**, 797-805 (1990).

54 Spreng, S. & Viret, J. F. Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines. *Vaccine* **23**, 2060-2065, doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.009 (2005).

55 Neyt, C., Iriarte, M., Thi, V. H. & Cornelis, G. R. Virulence and arsenic resistance in Yersiniae. *J Bacteriol* **179**, 612-619 (1997).

56 Wu, J. & Chen, Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* **32**, 461-488, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120156 (2014).

57 Kranzusch, P. J. *et al.* Ancient Origin of cGAS-STING Reveals Mechanism of Universal 2',3' cGAMP Signaling. *Mol Cell* **59**, 891-903, doi:10.1016/j.molcel.2015.07.022 (2015).

58 Commichau, F. M., Dickmanns, A., Gundlach, J., Ficner, R. & Stulke, J. A jack of all trades: the multiple roles of the unique essential second messenger cyclic di-AMP. *Mol Microbiol* **97**, 189-204, doi:10.1111/mmi.13026 (2015).

59 Corrales, L. *et al.* Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep* **11**, 1018-1030, doi:10.1016/j.celrep.2015.04.031 (2015).

60 De, N., Navarro, M. V., Raghavan, R. V. & Sondermann, H. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J Mol Biol* **393**, 619-633, doi:10.1016/j.jmb.2009.08.030 (2009).

61 Witte, G., Hartung, S., Buttner, K. & Hopfner, K. P. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Mol Cell* **30**, 167-178, doi:10.1016/j.molcel.2008.02.020 (2008).

62 Panne, D., McWhirter, S. M., Maniatis, T. & Harrison, S. C. Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *J Biol Chem* **282**, 22816-22822, doi:10.1074/jbc.M703019200 (2007).

63 Engel, C., G. Brugmann, S. Lambing, L.H. Muhlenbeck, S. Marx, C. Hagen, D. Horvath, M. Goldeck, J. Ludwig, A.M. Herzner, J.W. Drijfhout, D. Wenzel, C. Coch, T. Tuting, M. Schlee, V. Hornung, G. Hartmann, and J.G. Van den Boorn. 2017. RIG-I Resists Hypoxia-Induced Immunosuppression and Dedifferentiation. *Cancer Immunol Res*. 5:455-467.

64 Hou, F., L. Sun, H. Zheng, B. Skaug, Q.X. Jiang, and Z.J. Chen. 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 146:448-461.

65 Kranzusch, P.J., A.S. Lee, J.M. Berger, and J.A. Doudna. 2013. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep*. 3:1362-1368.

66 Seth, R.B., L. Sun, C.K. Ea, and Z.J. Chen. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 122:669-682.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий, содержащий нуклеотидную молекулу, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка системы секреции III типа (T3SS), причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, и причем указанный гетерологичный белок представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (ИФН), причем указанный гетерологичный белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из семейства RIG-I-подобного рецептора (RLR), других белков, содержащих домен CARD,

участвующих в антивирусной передаче сигналов и индукции ИФН I типа, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, которые приводят к стимуляции STING.

2. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по п.1, отличающийся тем, что указанный белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН, представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, причем указанный белок, участвующий в индукции или регуляции ответа ИФН I типа, выбран из группы, состоящей из RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагментов.

3. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по любому из пп.1 и 2, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит делецию хромосомного гена, кодирующего эндогенный белок, необходимый для роста, и эндогенную плазмиду вирулентности, содержащую нуклеотидную последовательность, которая содержит ген, кодирующий указанный эндогенный белок, необходимый для роста, функционально связанный с промотором.

4. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по п.3, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий является дефицитным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка.

5. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по п.3 или 4, отличающийся тем, что указанный ген, кодирующий эндогенный белок, необходимый для роста, выбран из гена, кодирующего фермент, необходимый для продукции аминокислоты, гена, кодирующего фермент, участвующий в биосинтезе пептидогликана, гена, кодирующего фермент, участвующий в биосинтезе ЛПС (липополисахарида), гена, кодирующего фермент, участвующий в синтезе нуклеотида, и гена, кодирующего фактор инициации трансляции.

6. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по любому из пп.3-5, отличающийся тем, что указанный ген, кодирующий эндогенный фермент, необходимый для роста, представляет собой ген, кодирующий фермент, необходимый для продукции аминокислоты, причем указанный фермент, необходимый для продукции аминокислоты, представляет собой аспартат-бета-полуальдегид-дегидрогеназу (asd).

7. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой штамм Yersinia.

8. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по любому из пп.3-7, отличающийся тем, что указанный ген, кодирующий эндогенный фермент, необходимый для роста, расположенный на эндогенной плазмиде вирулентности, содержит его эндогенный промотор и его эндогенный терминатор транскрипции.

9. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по п.8, отличающийся тем, что указанный ген, кодирующий эндогенный фермент, необходимый для роста, его эндогенный промотор и его эндогенный терминатор транскрипции расположены на расстоянии 122 п.о. в направлении 3'-5' от старта orf155 (SycO) на эндогенной плазмиде вирулентности.

10. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий дополнительно содержит модуляцию в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC.

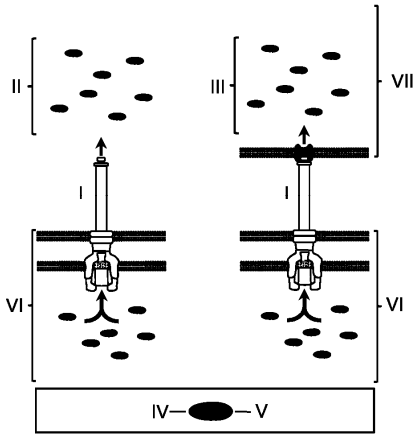
11. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по п.10, отличающийся тем, что указанная модуляция в термочувствительной области РНК в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC, содержит делецию, которая устраняет шпилечную структуру РНК или ее части в направлении 3'-5' от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC.

12. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по любому из пп.10 и 11, отличающийся тем, что указанный ДНК-связывающий белок типа AraC представляет собой VirF.

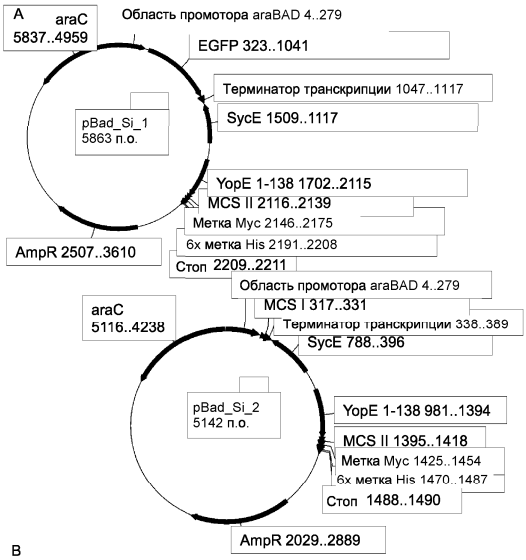
13. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий представляет собой Yersinia enterolitica.

14. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту рекомбинантного аттенуированного по вирулентности грамотрицательного штамма бактерий по любому из пп.1-13, причем указанный рекомбинантный аттенуированный по вирулентности грамотрицательный штамм бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

A


II
III
VII
I
I
VI
VI
IV
V

Фиг. 1


A
araC
5837..4959
Область промотора araBAD 4..279
EGFP 323..1041
Терминатор транскрипции 1047..1117
SycE 1509..1117
pBad_Si_1
5863 п.о.
YopE 1-138 1702..2115
MCS II 2116..2139
Метка Myc 2146..2175
6x метка His 2191..2208
AmpR 2507..3610
Стоп 2209..2211
Область промотора araBAD 4..279
MCS I 317..331
araC
5116..4238
Терминатор транскрипции 338..389
SycE 788..396
pBad_Si_2
5142 п.о.
YopE 1-138 981..1394
MCS II 1395..1418
Метка Myc 1425..1454
6x метка His 1470..1487
Стоп 1488..1490
AmpR 2029..2889
B
YopE1-138
XhoI
XbaI
BstBI
GTTCGCCACG CTCGAGTCTA GATTCGAA
HindIII
эпитоп myc
AAGCTTGGGC CCGAACAAAA ACTCATCTCA
GAAGAGGATCTGAATAGCGC CGTCGACCAT
6x метка His
CATCATCATC ATCATTGAGT TTAAACGGTC
TCCAGCTTGG CTGTTTTGG C

Фиг. 2

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT	Y. enterocolitica	MRS40 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Iriarte and Cornelis, 1998
ΔHOPEMT asd yopB	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 pIML421 [yopBΔ89-217, yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal Kan	
ΔHOPEMT asd	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 asdΔ292-610 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Kudryashev et al., 2013
ΔHOPEMT asd inv	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 asdΔ292-610 invAΔ352-2225::aphA-3 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				445/446, 447/448, 449/450	Nal Kan	
ΔHOPEMT asd inv yadA	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔinvA ΔyadA	MRS40 asdΔ292-610 invAΔ587-836 (кointеграция вектора) yadAΔ89-354::aphA3 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				352/353, 354/355, 356/357	Nal Kan Tet	

Фиг. 3A

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT asd pBad_Si1	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	EGFP (индуцибельный арабинозой), фрагмент SycE-YopE1-138-MycHis		pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138)	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pBad_Si2	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	Фрагмент SycE-YopE$_{1-138}$-MycHis	YopE1-138-MycHis	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-YopE1-138)	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_85	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Bid	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_87	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-t-Bid	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	Nal Amp	

Фиг. 3B

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT asd pSi_120	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-ET1	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_121	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-z-BIM	pbad_Si_1	pSi_121	438/439	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_132	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-протеаза TEV S219V	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_158	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138 - 2x сайт TEV -EGFP	pBad_Si_2	pSi_158	511/476	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_151	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ink4C	pBad_Si_2	pSi_151	494/495	Nal Amp	

Фиг. 3C

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT asd pSi_156	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV - ET1	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_159	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV - EGFP - NLS	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_160	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV - NLS - EGFP	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_161	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV - INK4C	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_164	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2x сайт TEV - Flag - INK4C	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	Nal Amp	

Фиг. 3D

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT asd pSi_318	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 tBid мыши	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_322	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-кодон-оптимизированная для Y. enterocolitica часть BH3 Bax мыши	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	Nal Amp	
S. enterica SL1344 ΔaroA	S. enterica подвид enterica серовар Тифимуриум SL1344 ΔaroA							Hoiseth and Stocker, 1981
ΔHOPEMT asd pSi_315	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica tBid мыши	pBad_Si_2	pSi_315	синтетическая конструкция	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_236	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-убиквитин	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_237_II	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-убиквитин-Flag-INK4C-MycHis	pSi_236	pSI_237_II	588/509	Nal Amp	

Фиг. 3E

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_357	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 tBid мыши	pBad_Si_2	pSi_357	733/735	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_358	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 Bax мыши	pBad_Si_2	pSi_358	736/738	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_371	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138-(кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 tBid мыши)$_2$	pSi_357	pSi_371	733/734	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_373	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 tBid мыши-. кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 Bax мыши	pSi_358	pSi_373	733/734	Nal Amp	

Фиг. 3F

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_353	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica удлиненный BH3 tBid мыши (на 4 АК)	pBad_Si_2	pSi_353	725/726	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_354	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138-линкер 10 АК-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 tBid мыши	pBad_Si_2	pSi_354	727/728	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_374	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138-кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 Bax мыши-. кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 tBid мыши	pSi_357	pSi_374	736/737	Nal Amp	

Фиг. 3G

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_453	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138- кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-1 человека (АК 1-245)	pBad_Si_2	pSi_453	синтетическая конструкция	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_454	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138- кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-1 мыши (АК 1-246)	pBad_Si_2	pSi_454	синтетическая конструкция	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_452	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica GCN4 S. cerevisiae (АК 249-278) - кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica WspR P. aeruginosa (АК 172-347)	pBad_Si_2	pSi_452	синтетическая конструкция	Nal Amp	

Фиг. 3H

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_428	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica IRF3 S397D мыши	pBad_Si_2	pSi_428	синтетическая конструкция	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_482	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica DncV V. Cholerae (M3toL413)	pBad_Si_2	pSi_482	синтетическая конструкция	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_483	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica DisA-подобный белок B. cereus (PDB: 2FB5; АК 76-205)	pBad_Si_2	pSi_483	синтетическая конструкция	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_484	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE1-138- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica cGAS анемона (N. vectensis) (Ensembl: A7SFB5.1)	pBad_Si_2	pSi_484	синтетическая конструкция	Nal Amp	

Фиг. 3I

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT asd pYV-asd	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T *Δasd*	MRS40 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135, pYV-asd]	/	pKNG101	pSi_417 (Мутатор	ПЦР1: 869/870; ПЦР2: 871/872; ПЦР3: 873/874; ПЦР с перекрывающимися праймерами 869/874	Nal	
ΔHOPEMT asd pBad-asd	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T *Δasd*	MRS40 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]	YopE1-138-MycHis	pBad_Si_2	pSi_397	600/601	Nal	
ΔHOPEMT *virF-hairpinI*	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 virFΔ-111 – -57]	/	pKNG101	pSI_441 (Мутатор)	синтетическая конструкция	Nal	
ΔHOPEMT *virF-hairpinI* pSi_371	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δ*virF-hairpinI*	MRS40 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 virFΔ-111 – -57]	YopE1-138-(кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 tBid мыши)$_2$	pBad_Si_2	pSi_371	733/734	Nal Amp	

Фиг. 3J

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT pYV-YopE$_{1-138}$- BH3 tBID мыши	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 yopE::BH3 tBID]	YopE$_{1-138}$-BH3 tBID	pKNG101	pSI_408 (Мутатор)	синтетическая конструкция	Nal	
ΔHOPEMT pYV-YopE$_{1-138}$- (BH3 tBID)$_2$ мыши	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 yopE::(BH3 tBID)$_2$]	YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$	pKNG101	pSI_437 (Мутатор)	синтетическая конструкция	Nal	
ΔHOPEMT pYV-*virF-hairpinI* -YopE$_{1-138}$- (BH3 tBID)$_2$ мыши	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T, yopE::(BH3 tBID)$_2$	MRS40 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 yopE::(BH3 tBID)$_2$ virFΔ-111 – -57]	YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$	pKNG101	pSI_441 (Мутатор)	синтетическая конструкция	Nal	
ΔHOPEMT asd pYV-asd-YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$ мыши	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δ*asd* pYV-asd	MRS40 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135, yopE::(BH3 tBID)$_2$ pYV-asd]	YopE$_{1-138}$-(BH3 tBID)$_2$	pKNG101	pSI_437 (Мутатор)	синтетическая конструкция	Nal	

Фиг. 3K

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT pYV-YopE$_{1-138}$- домены CARD RIG-1 мыши	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 yopE::домены CARD RIG-1	YopE$_{1-138}$- домены CARD RIG-1	pKNG101	pSI_456 (Мутатор)	синтетическая конструкция	Nal	
ΔHOPEMT pYV-pAra-*virF*	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 pAra::virF]	/	pKNG101	pSI_439 (Мутатор)	синтетическая конструкция	Nal	
ΔHOPEMT pYV-pAra-*virF* pSi_371	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T, pYV-pAra-*virF*	MRS40 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 pAra::virF]	YopE$_{1-138}$-(кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica BH3 tBid мыши)$_2$	pBad_Si_2	pSi_371	733/734	Nal Amp	

Фиг. 3L

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT pYV-*virF-hairpinI* -YopE$_{1-138}$- домены CARD RIG-1 мыши	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T yopE::домены CARD RIG-1 мыши	MRS40 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 virFΔ-111 – -57 yopE::домены CARD RIG-1	YopE$_{1-138}$- домены CARD RIG-1	pKNG101	pSI_441 (Мутатор)	синтетическая конструкция	Nal	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_521	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-1 мыши (АК 1-229)	pBad_Si_2	pSi_521	1021/1022	Nal Amp	

Фиг. 3M

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_522	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-1 мыши (АК 1-218)	pBad_Si_2	pSi_522	1021/1023	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_517	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD MDA5 мыши (АК 1-294)	pBad_Si_2	pSi_517	синтетическая конструкция	Nal Amp	

Фиг. 3N

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_524	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD MDA5 мыши (АК 1-231)	pBad_Si_2	pSi_524	1025/1026	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_515	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica cGAS человека (АК 161-522)	pBad_Si_2	pSi_515	синтетическая конструкция	Nal Amp	

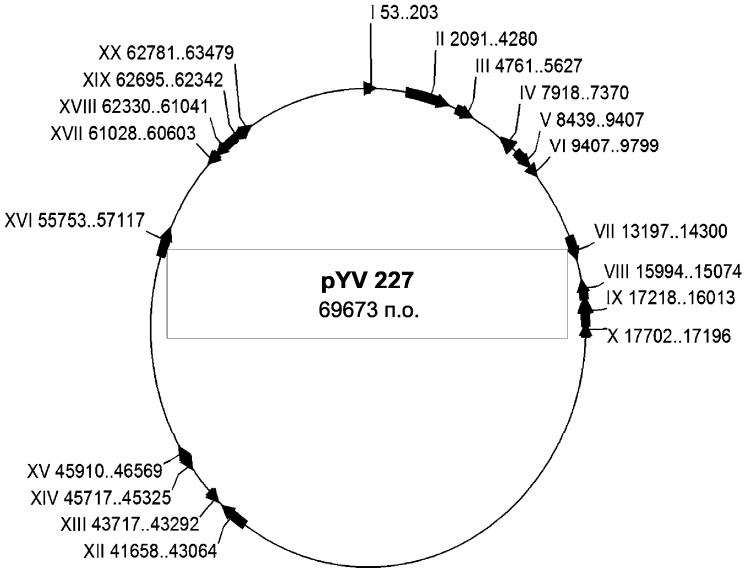
Фиг. 3O

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_539	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica CARD MAVS человека (АК 1-100)	pBad_Si_2	pSi_539	синтетическая конструкция	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_503	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica cGAS анемона (N. vectensis) (АК 60-422) (Ensembl: A7SFB5.1)	pBad_Si_2	pSi_484	1010/1012	Nal Amp	
ΔHOPEMT Или: ΔHOPEMT asd pSi_518	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T (Δasd)		YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica CdaA Listeria monocytogenes (АК 101-273)	pBad_SI_2	pSi_518	синтетическая конструкция	Nal Amp	

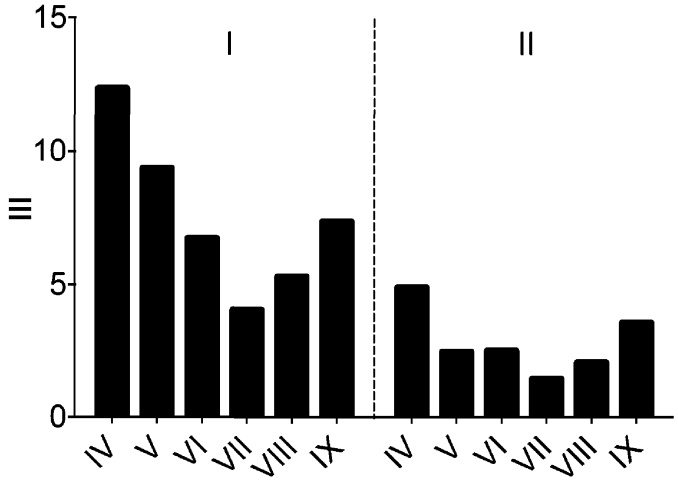
Фиг. 3P

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Каркасная плазмида	Название полученной в результате плазмиды	Si_№ праймеров	Устойчивость	Литературный источник
ΔHOPEMT-yopB pSi_539	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T,B	Делеция *yopB*	YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированный для Y. enterocolitica CARD MAVS человека (АК 1-100)	pBad_Si_2	pSi_539	синтетическая конструкция	Nal Amp	
ΔHOPEMT-yopB pSi_454	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T,B	Делеция *yopB*	YopE$_{1-138}$- кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-1 мыши (АК 1-246)	pBad_Si_2	pSi_454	синтетическая конструкция	Nal Amp	

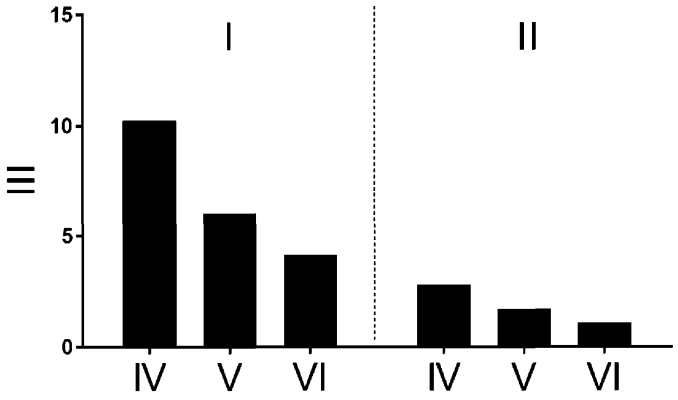
Фиг. 3Q



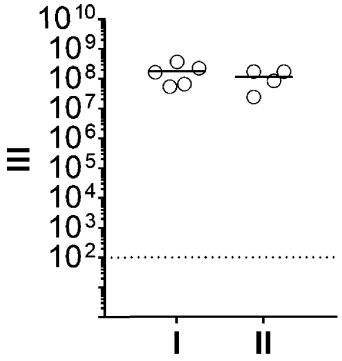
Фиг. 4



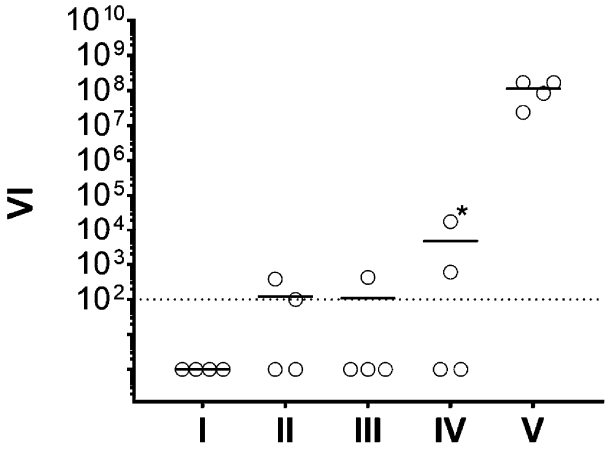
Фиг. 5



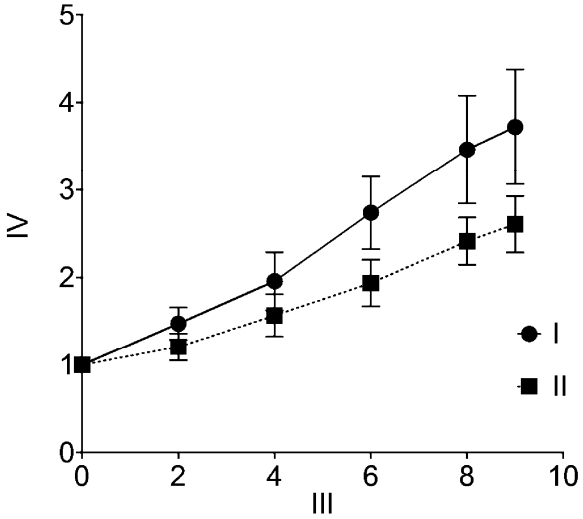
Фиг. 6



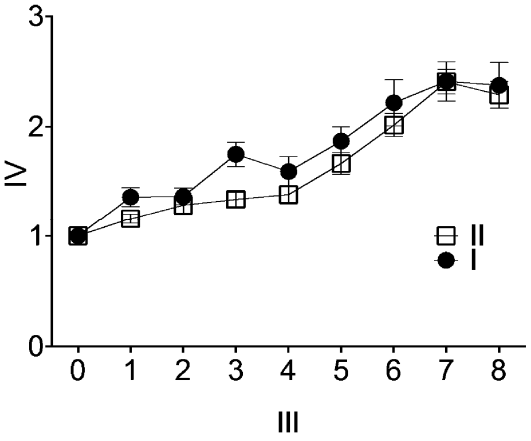
Фиг. 7



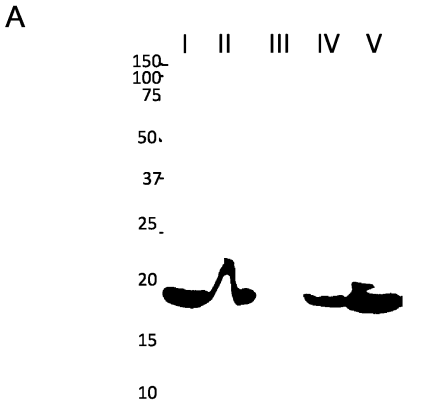
Фиг. 8

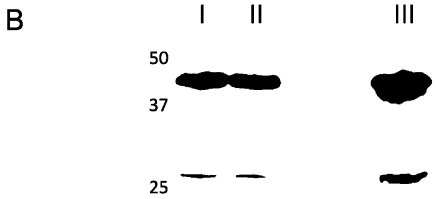


Фиг. 9

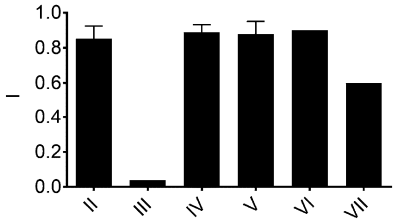


Фиг. 10

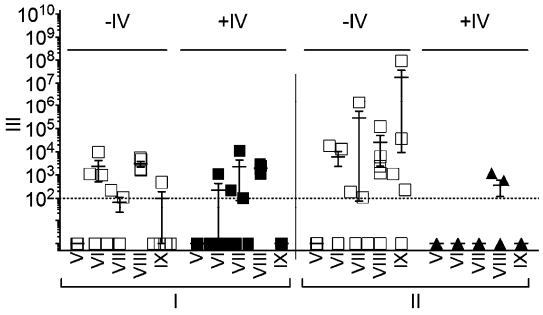




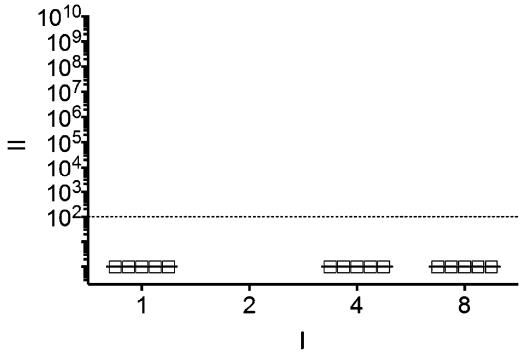
Фиг. 11



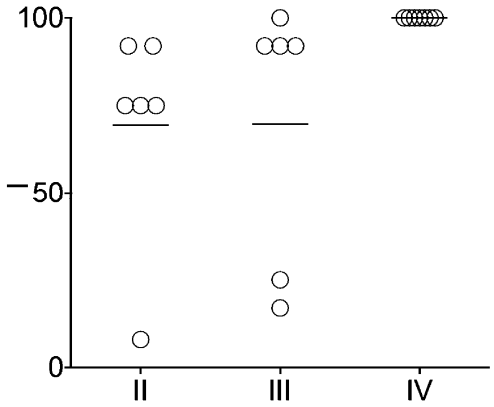
Фиг. 12



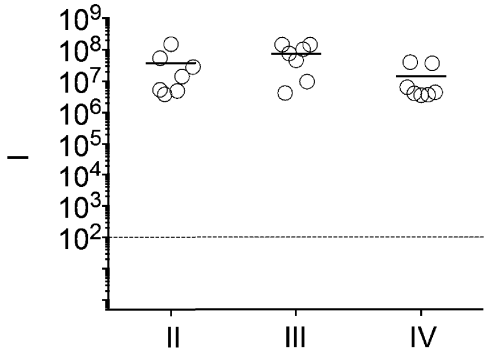
Фиг. 13



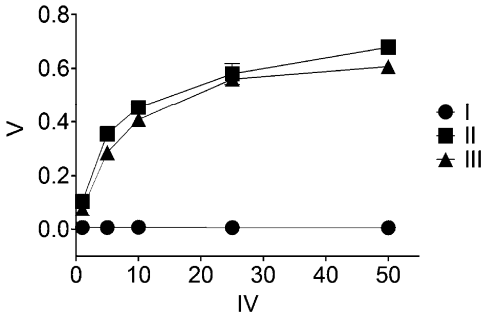
Фиг. 14



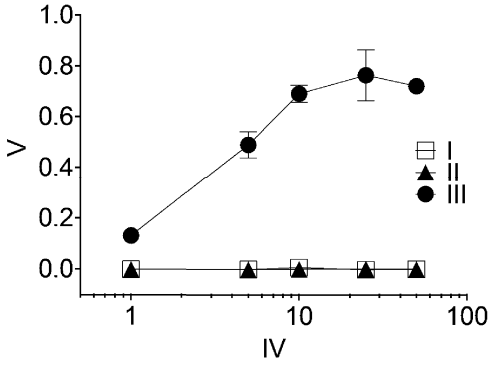
Фиг. 15



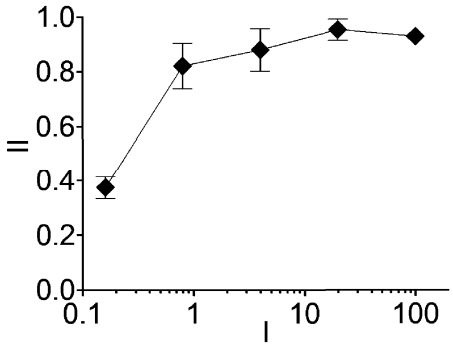
Фиг. 16



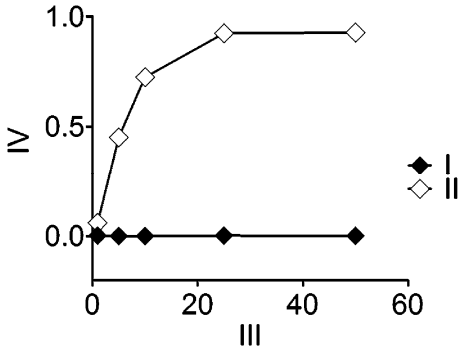
Фиг. 17



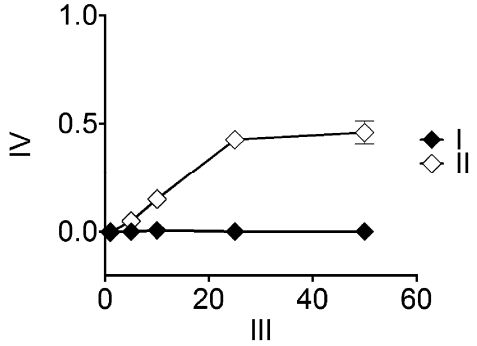
Фиг. 18



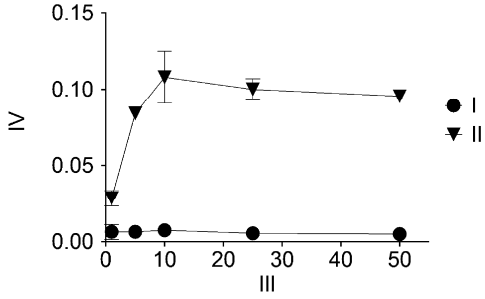
Фиг. 19



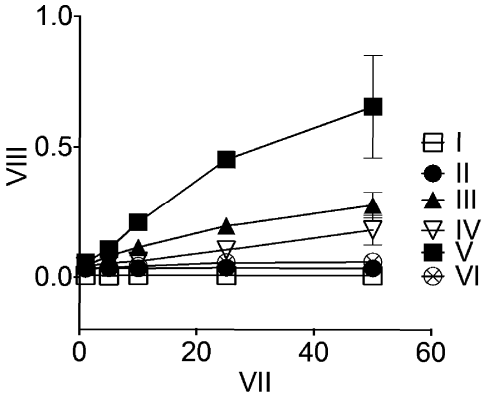
Фиг. 20



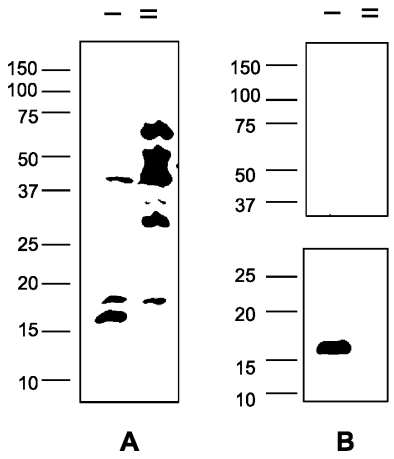
Фиг. 21



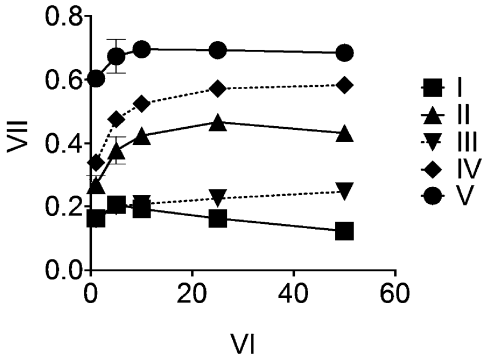
Фиг. 22



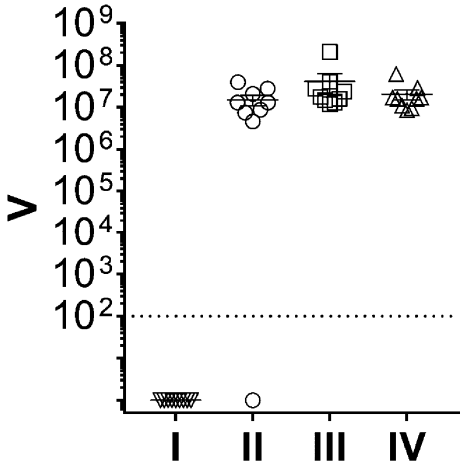
Фиг. 23



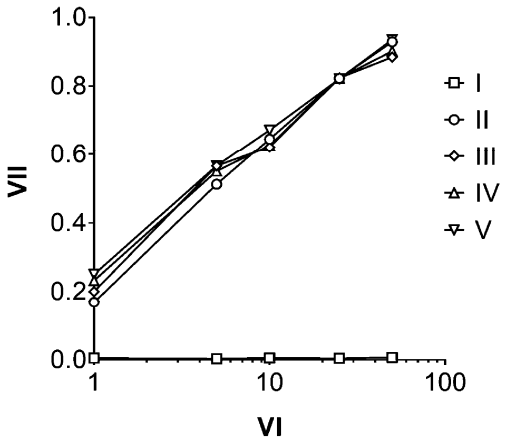
Фиг. 24



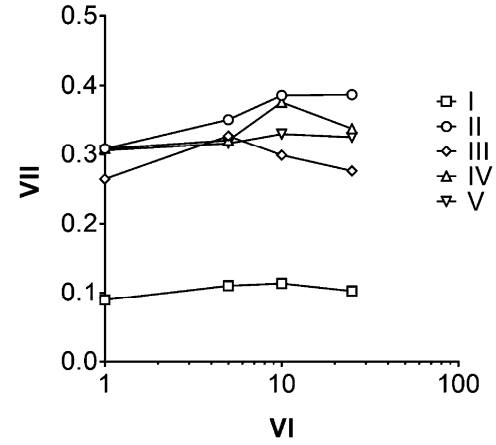
Фиг. 25



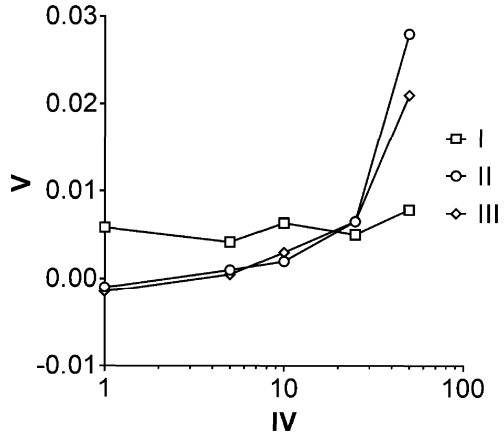
Фиг. 26



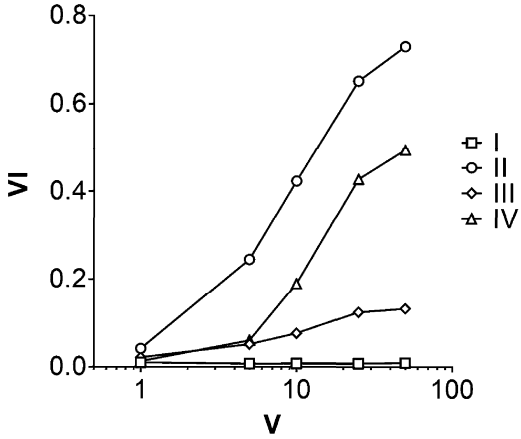
Фиг. 27



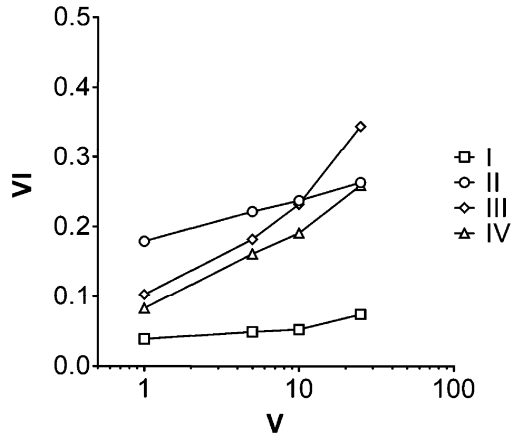
Фиг. 28



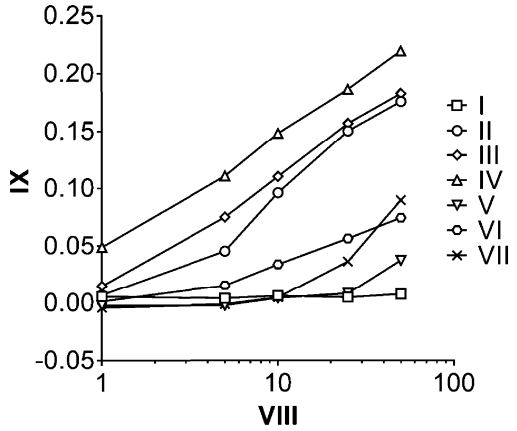
Фиг. 29



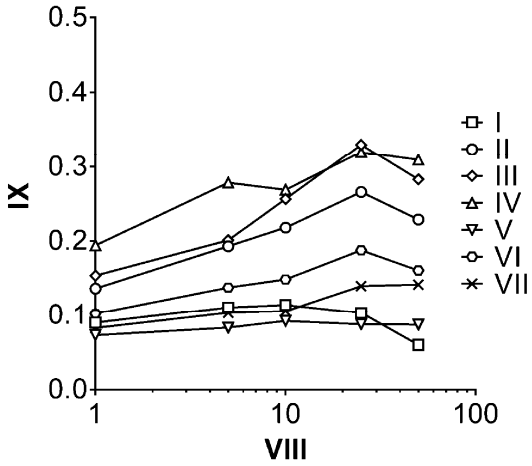
Фиг. 30



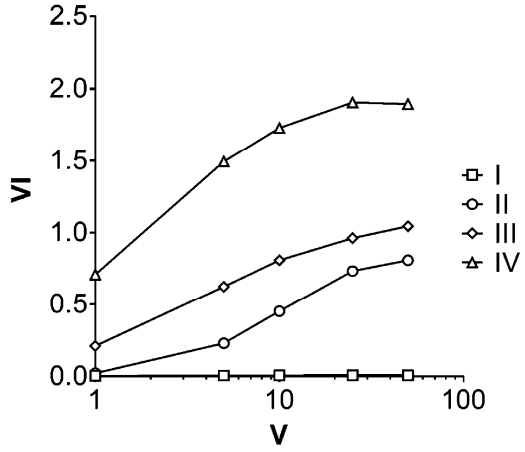
Фиг. 31



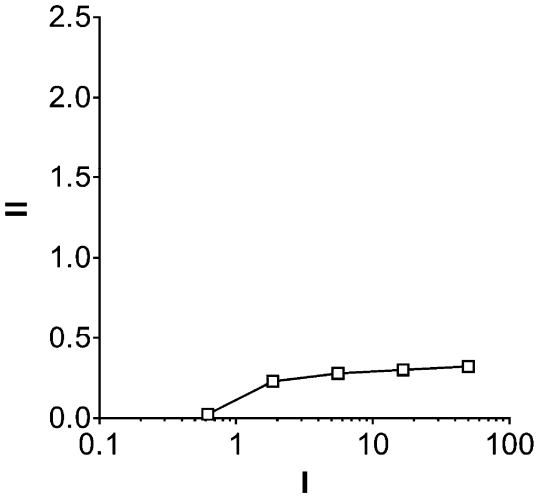
Фиг. 32



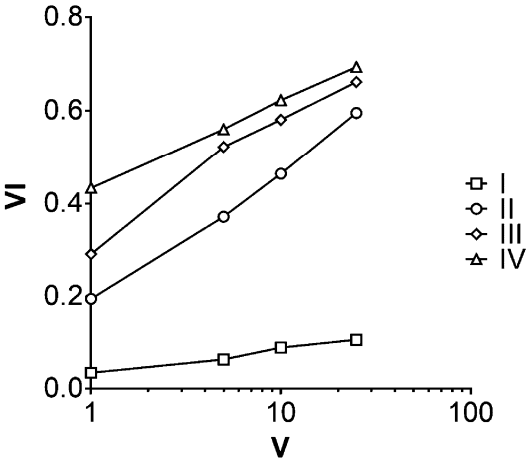
Фиг. 33



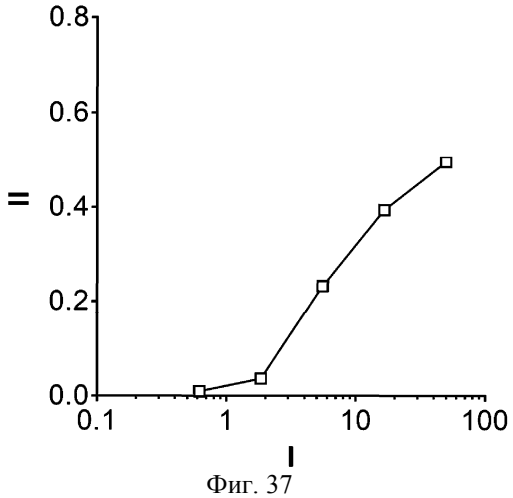
Фиг. 34



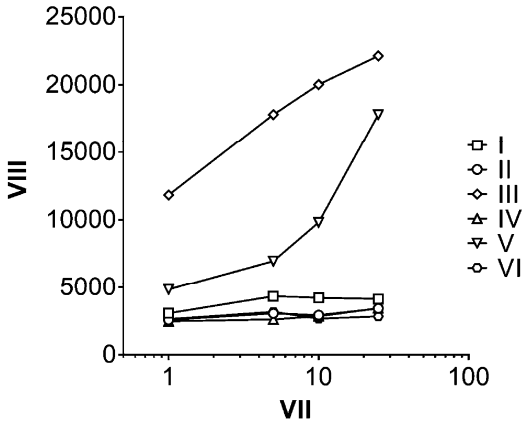
Фиг. 35



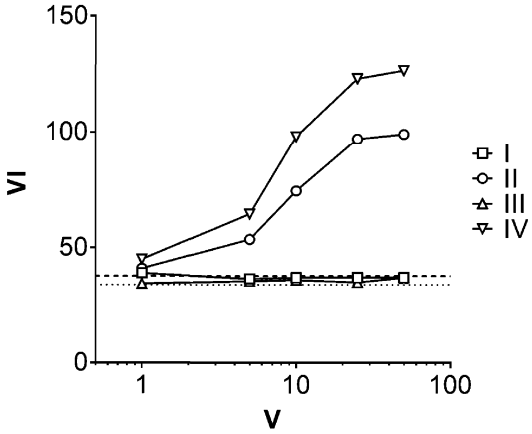
Фиг. 36



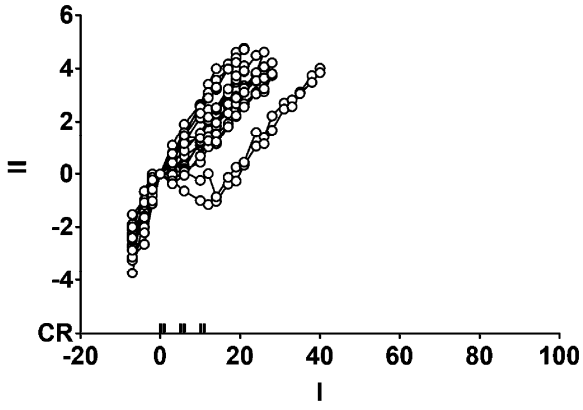
Фиг. 37



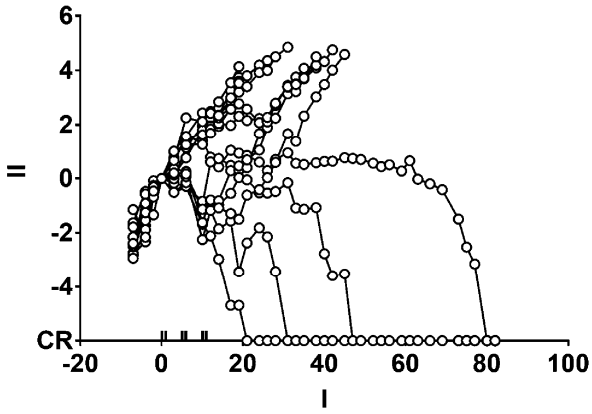
Фиг. 38



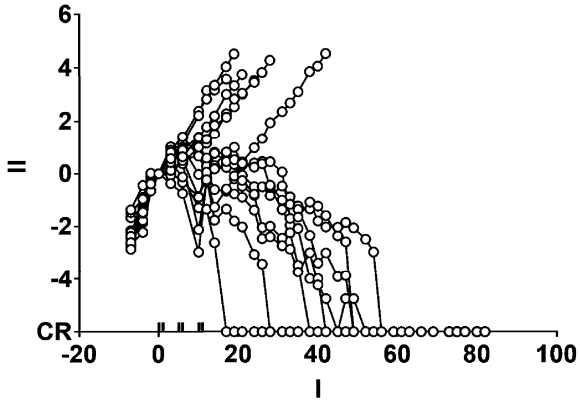
Фиг. 39



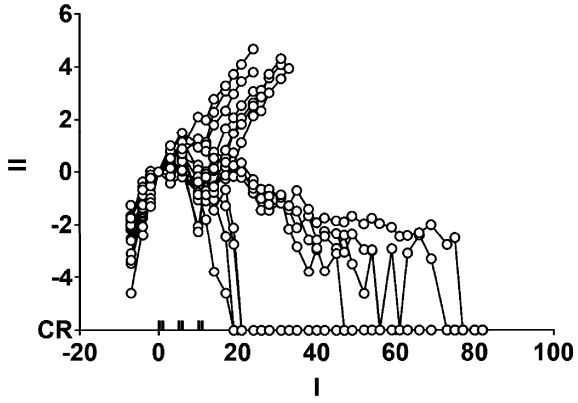
Фиг. 40



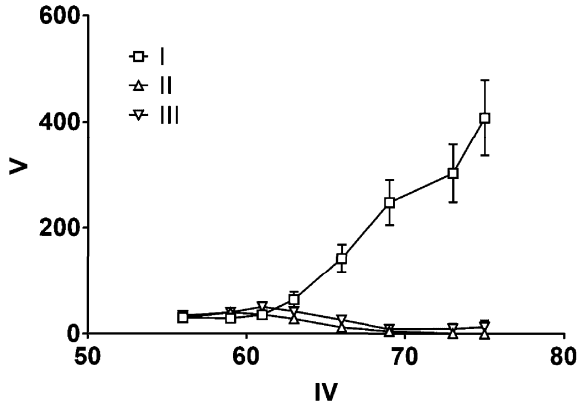
Фиг. 41



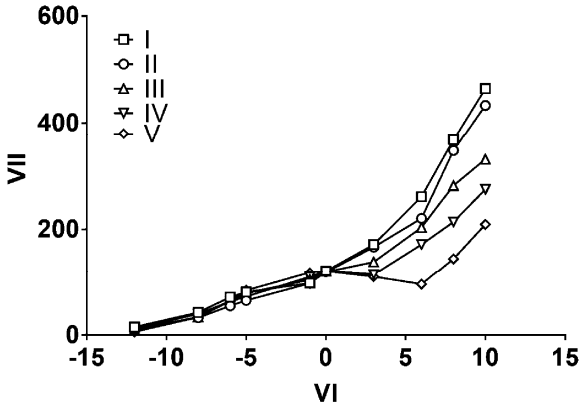
Фиг. 42



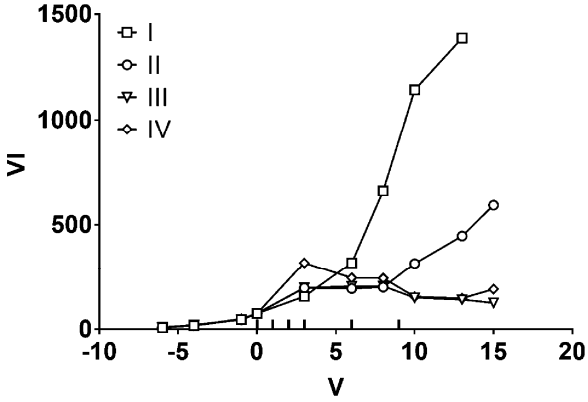
Фиг. 43



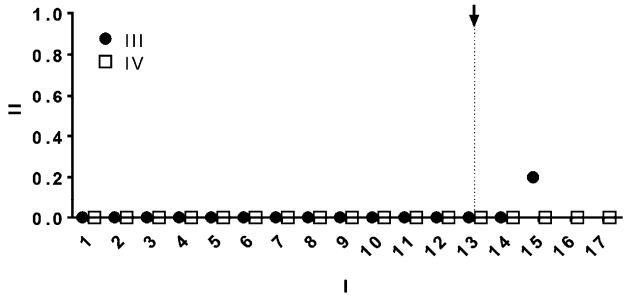
Фиг. 44



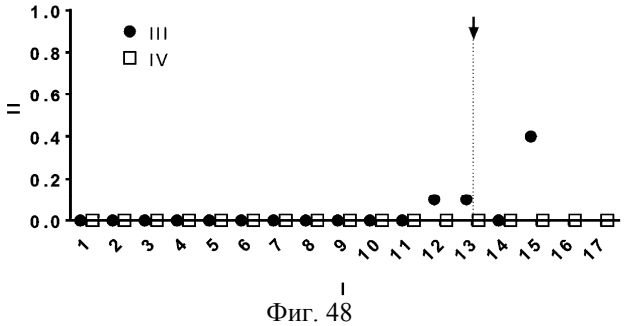
Фиг. 45



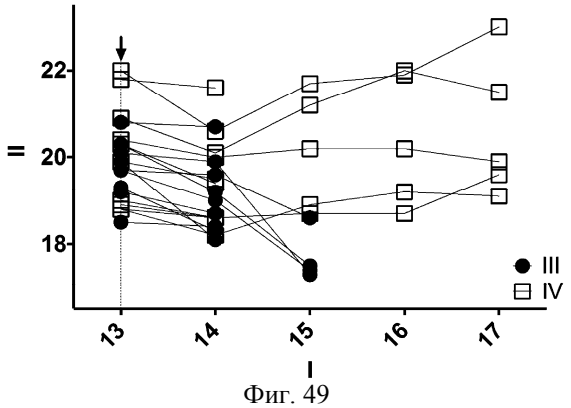
Фиг. 46



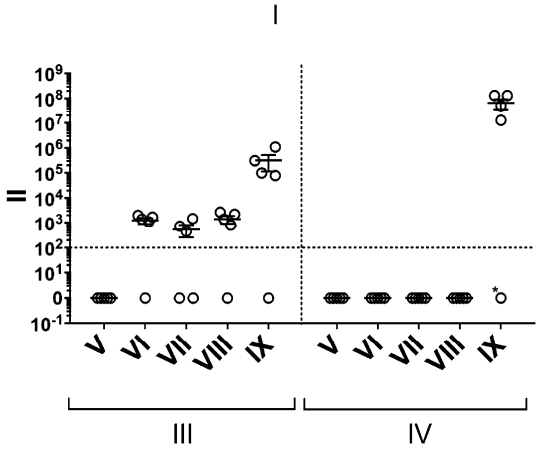
Фиг. 47



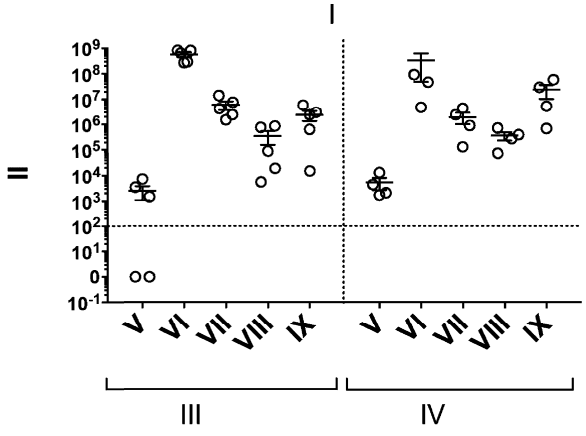
Фиг. 48



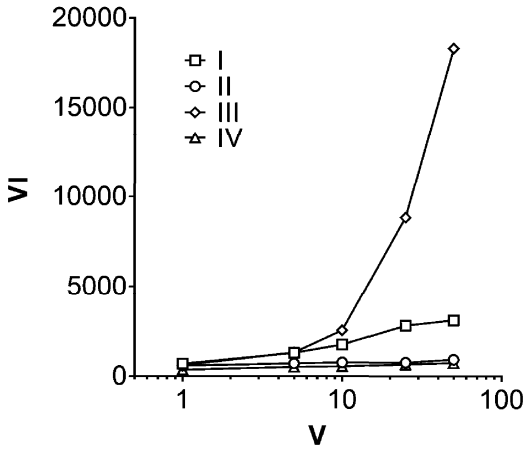
Фиг. 49



Фиг. 50



Фиг. 51



Фиг. 52