(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202200057 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.08

(22) Дата подачи заявки
2020.11.12

(51) Int. Cl. ***C12N 15/113*** (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12N 1/36 (2006.01)
C12N 15/117 (2010.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) ПЛАТФОРМЫ ДОСТАВКИ ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ, СВЯЗАННЫЕ С НИМИ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/934,503; 62/962,162; 62/990,404**
(32) **2019.11.12; 2020.01.16; 2020.03.16**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/060307**
(87) **WO 2021/097144 2021.05.20**
(88) **2021.06.17**

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

(72) Изобретатель:
Тсанос Кристофер Д., Гликман Лаура Хикс, Ианелло Александр Чарльз Майкл, Шрис Рэи, Кихои Хэксинг, Петерсон Брет Николас, Чеунг Чингман (US)

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

(57) Предложены ослабленные иммуностимулирующие бактерии с модифицированными геномами, например, для снижения токсичности и улучшения противоопухолевой активности, посредством увеличения накопления в микроокружении опухоли, в особенности в находящихся в опухоли миелоидных клетках, улучшения сопротивления инактивации комплемента, снижения гибели иммунных клеток, промотирования адаптивного иммунитета и повышения функции аТ-клеток. Повышение колонизации фагоцитарных клеток улучшает доставку кодированных терапевтических продуктов в микроокружение опухоли и опухоль, и позволяет, помимо прочего, системное введение иммуностимулирующих бактерий.

STING человека и Тасманского дьявола

```
Человек           1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH  50
                    ||.|.||||||.|||.|||||||.||||.|:..::.|||.....||::|:.:
Тасманский дьявол 1 MPRSHLHPSIPQPRGWGAQKAACVLLSLCMAAVYILGESAAFTLQWLLFY  50

Человек          51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL 100
                    ..::|:||||.|...||||||.||.|||:|||||:.::||:..|.:|.:|||
Тасманский дьявол 51 FTTVQVGLLLKGAYCLAEELYHIQSRHQGSYWQAIQACIHYPFQRISLLL 100

Человек         101 LSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEK 150
                    ||.|||.:|.|...|..||..||||||.|||:.:|||:.|..||||.||||
Тасманский дьявол 101 LSGYFYVTLSNKPNPSLTWTFALLGLSHALSFILGLQNLTSAEISEVCEK 150

Человек         151 GNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI 200
                    .:.|||||||||||||:||||.||.||:.|||...::||.....||:|
Тасманский дьявол 151 RHLNVAHGLAWSYYIGYLKLILPGLQTRIQIYNQFNKDVLRSPEGHRLHI 200

Человек         201 LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLEN 250
                    |:||||.||||||.|||||:||.:||||...|.||||.|:|:||||::.|:
Тасманский дьявол 201 LIPLDCSVPDNLSQADPNIQFLQELPQHKLDRAGIKGRIYTNSIYKISED 250

Человек         251 GQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILA 300
                    ||.|..||||:|||||||||||.::|||||||||||||||||||||||.
Тасманский дьявол 251 GQPAEVCVLEFATPLQTLFAMSQDARAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILE 300

Человек         301 DAPESQNNCRLIAYQEPADD--SSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKT 348
                    ||||:::.|||:.||||.|.  |:|||||:|||||||.:|||..:|..:.
Тасманский дьявол 301 DAPEARDCCRLVVYQEPEDKAVSNFSLSKEILRHLRQERQEEFAIGPKRA 350

Человек         349 SAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTD-FS   379
                    ..|.::||:||||:|||||:||.|||| |
Тасманский дьявол 351 MTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF-   381
```

202200057 A1

202200057 A1

ПЛАТФОРМЫ ДОСТАВКИ ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ, СВЯЗАННЫЕ С НИМИ ПРИМЕНЕНИЯ

Приоритет испрашивается в отношении одновременно находящейся на рассмотрении предварительной заявки США с серийным номером 62/990,404, поданной 16 марта 2020 г. и озаглавленной «ПЛАТФОРМА ДЛЯ ДОСТАВКИ ОПУХОЛЕВЫХ ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ» на имя заявителя ActymTherapeutics, Inc.

Приоритет также испрашивается в отношении одновременно находящейся на рассмотрении предварительной заявки США с серийным номером 62/962,162, поданной 16 января 2020 г. и озаглавленной «ПЛАТФОРМА ДЛЯ ДОСТАВКИ ОПУХОЛЕВЫХ ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ» на имя заявителя ActymTherapeutics, Inc.

Приоритет также испрашивается в отношении одновременно находящейся на рассмотрении предварительной заявки США с серийным номером 62/934,503, поданной 12 ноября 2019 г. и озаглавленной «ПЛАТФОРМА ДОСТАВКИ ОПУХОЛЕВЫХ ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ» на имя заявителя ActymTherapeutics, Inc.

Эта заявка связана с одновременно находящейся на рассмотрении международной заявкой № PCT/US2020/020240, поданная 27 февраля 2020 г. под названием «ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫЕ БАКТЕРИИ, СОЗДАННЫЕ ДЛЯ КОЛОНИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ, ОПУХОЛЕВЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК И МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ», заявитель ActymTherapeutics, Inc.

Эта заявка также связана с параллельно находящейся на рассмотрении предварительной заявкой США с серийным номером 62/962,140, поданной 16 января 2020 г. и озаглавленной «ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫЕ БАКТЕРИИ, СОЗДАННЫЕ ДЛЯ КОЛОНИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ, ОПУХОЛЕВЫХ

ИММУННЫХ КЛЕТОК И МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ», на имя заявителя Actym. Therapeutics, Inc.

Эта заявка также связана с одновременно находящейся на рассмотрении предварительной заявкой США с серийным номером 62/934,478, поданной 12 ноября 2019 г. и озаглавленной «ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫЕ БАКТЕРИИ, СОЗДАННЫЕ ДЛЯ КОЛОНИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ И МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ», на имя заявителя ActymTherapeutics, Inc.

Эта заявка также связана с международной заявкой № PCT/US2018/041713, поданной 11 июля 2018 г. и опубликованной как WO 2019/014398 17 января 2019 г., и совместно находящейся на рассмотрении заявки на патент США с серийным номером 16/033,187, поданной 11 июля 2018 г. и опубликованной как US Публикация № 2019/0017050 A1 от 17 января 2019 г., каждая из которых озаглавлена «СОЗДАННЫЕ ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ», и каждая из которых претендует на приоритет предварительной заявки США с серийными номерами 62/531,327, поданной 11 июля 2017 г., и 62/648,380, поданной 26 марта 2018 г. Если это разрешено, предмет каждой из этих заявок полностью включен посредством ссылки.

Эта заявка также связана с одновременно находящейся на рассмотрении международной заявкой № PCT/US2019/041489, поданной 11 июля 2019 г. и опубликованной как WO 2020/014543 16 января 2020 г., и одновременно находящейся на рассмотрении заявкой на патент США с серийным номером 16/520,155, поданной 23 июля 2019 г., каждая из которых озаглавлена «СОЗДАННЫЕ ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ», и каждая из которых претендует на приоритет предварительной заявки США с серийным номером 62/789,983, поданной 08 января 2019 г., и предварительной заявки с серийным номером 62/828,990, поданной 03 апреля 2019 г.

Эта заявка также связана с предварительными заявками США с серийными номерами 62/811,521, поданной 27 февраля 2019 г., и 62/828,990, поданной 3 апреля 2019 г.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные в каждой из этих заявок, могут быть модифицированы, как описано в этой заявке, и такие бактерии включены в настоящий документ в качестве ссылки. Там, где это разрешено, предмет каждой из этих заявок полностью включен посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Электронная версия Перечня последовательностей прилагается к настоящему документу, содержание которого полностью включено посредством ссылки. Электронный файл был создан 11 ноября 2020 года, имеет размер 687 килобайт и называется 1707SEQPC1.txt.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Предусмотрены аттенуированные (ослабленные) иммуностимулирующие бактерии с геномами, которые модифицированы, например, для снижения токсичности и улучшения противоопухолевой активности, например, за счет увеличения накопления в микроокружении опухоли, особенно в миелоидных клетках, находящихся в опухоли, за счет повышения устойчивости к инактивации комплемента, уменьшая гибель иммунных клеток, способствуя адаптивному иммунитету и усиливая функцию Т-клеток. Увеличение

колонизации фагоцитарными клетками улучшает доставку закодированных терапевтических продуктов в микроокружение опухоли и опухоли и позволяет, среди прочего, системно вводить иммуностимулирующие бактерии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Область иммунотерапии рака достигла больших успехов, о чем свидетельствуют клинические успехи использования антител к иммунным контрольным точкам против CTLA-4, против PD-1 и против PD-L1 (см., например, Buchbinderetal. (2015) JClin.Invest.125:3377-3383, Hodi и др. (2010) N.Engl.J.Med.363(8):711-723 и Chen и др. (2015) J.Clin.Invest.125 :3384-3391). Опухоли развивают глубоко иммунодепрессивную среду. Они запускают многочисленные механизмы уклонения от иммунного надзора, перепрограммируют противоопухолевые иммунные клетки для подавления иммунитета и постоянно мутируют устойчивость к новейшим методам лечения рака (см., например, Mahoneyetal. (2015) Nat. Rev. DrugDiscov.14(8):561-584). Разработка иммунотерапии и терапии рака, которые преодолевают иммунную толерантность , ограничивая при этом аутоиммунную токсичность современных иммунотерапевтических средств, бросает вызов области иммуноонкологии. Следовательно, необходимы дополнительные и инновационные иммунотерапевтические и другие методы лечения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат модификации генома, и плазмида, которая кодирует один или несколько терапевтических продуктов, таких как противораковые терапевтические средства или связанные с ними методы лечения. Геномные модификации приводят к иммуностимулирующим бактериям, которые накапливаются в микроокружении опухоли и в резидентных опухолевых иммунных клетках, где они экспрессируют закодированные терапевтические продукты. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии кодируют

один или несколько дополнительных продуктов, которые стимулируют, индуцируют или приводят к стойкому противораковому ответу у субъекта.

В настоящем документе предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат плазмиду, кодирующую терапевтический продукт или комбинацию терапевтических продуктов под контролем эукариотического промотора. Геномы бактерий содержат модификации, например одну, две или более модификаций, выбранных из числа:

a) делеция, разрушение или инактивация всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия была модифицирована с образованием пентаацилированноголипополисахарида (ЛПС), при этом:

геном иммуностимулирующей бактерии модифицируют делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, при этом бактерия модифицируется с образованием пентаацилированноголипополисахарида; и/или

содержание гексаацилированноголипополисахарида существенно снижено, по меньшей мере, в 10 раз по сравнению с бактерией дикого типа или отсутствует;

b) делеция, разрушение или инактивация всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия ослабила распознавание Toll-подобными рецепторами (TLR): TLR2, TLR4 и TLR5;

c) делеция, разрушение или инактивация всего или достаточной части гена или генов, при этом бактерия не активирует синтез фимбрийcurli и/или целлюлозы;

d) делеция, разрушение или инактивация всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия не активирует синтез секретируемой аспарагиназы;

d) делеция, разрушение или инактивация всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия является ауксотрофной по пуринам, аденозину или АТФ;

f) делеция, разрушение или инактивация всего или достаточной части гена или генов, в результате чего у бактерии отсутствуют флагеллы;

g) делецию, разрушение или инактивацию всего или достаточной части гена или генов, посредством чего бактерия была модифицирована для специфического инфицирования резидентных в опухоли миелоидных клеток;

h) делеция, разрушение или инактивация всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия была модифицирована для специфического заражения резидентных опухолевых миелоидных клеток и неспособна к репликации в резидентных в опухоли миелоидных клетках; и

i) делецию, разрушение или инактивацию одного или обоих из lppA и lppB для уменьшения или устранения экспрессии липопротеинов в мембране, посредством чего повышается экспрессия кодируемого терапевтического белка в микроокружении опухоли и/или в резидентных в опухоли иммунных клетках.

Например, иммуностимулирующие бактерии содержат модификации, в том числе делеции, вставки и замены a), d) и f), или модификации c) и d), или модификации a), c), d), e), и f), или модификации a), c), d), e), f) и i), или модификации a), d), f), и i), или модификации c), d), и i) , или модификации f) и i), или модификации a)-i), или модификации a), b), c), и d), или модификации a), b), c), и d), и другие комбинации a)-i).

Во всех вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии также могут включать или дополнительно включать делецию или разрушение генов, кодирующих флагеллы, при этом бактерия является флагеллин- (fliC-/fljB-) и не продуцирует флагеллы, при этом бактерия дикого типа имеет флагеллы. Иммуностимулирующие бактерии могут быть ауксотрофными по пуринам, например, ауксотрофными по аденозину, или ауксотрофными по аденозину, аденину и/или АТФ. Иммуностимулирующие бактерии также могут быть *purI*. . Иммуностимулирующие бактерии также могут быть pagP-. Иммуностимулирующие бактерии также могут быть asd- (аспартат-

полуальдегиддегидрогеназа-), например, когда бактерия является asd- в силу разрушения или делеции всего или части эндогенного гена, кодирующего аспартаполуальдегиддегидрогеназу (asd), в результате чего эндогенный asd не выражен. Бактерии могут кодировать аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (asd) на плазмиде под контролем бактериального промотора. Иммуностимулирующие бактерии также могут быть msbB- или могут быть pagP-/msbB-. Например, иммуностимулирующиебактериимогутбытьasd-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-) и pagP-, илионимогутбытьasd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-) и pagP-.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующими бактериями являются ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-) и pagP-.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, или которые кодируют множество продуктов под контролем множества эукариотических промоторов или одного промотора. Геном иммуностимулирующих бактерий модифицируется путем делеции значительной части или разрушения генов, при этом бактерия представляет собой один или несколько из ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC -/fljB-), и pagP-. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии также включают те, у которых гены lppA (lpp1) и/или lppB (lpp2), которые кодируют основные липопротеины наружной мембраны Lpp1 (LppA) и Lpp2 (LppB), соответственно, делетированы или разрушены, чтобы устранить или существенно уменьшить экспрессию кодируемых липопротеинов. В частности, бактерии относятся к lppA- и lppB-. Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат плазмиду, кодирующую противораковое терапевтическое средство под контролем эукариотических регуляторных последовательностей, и которые являются lppA- и lppB-. Например, иммуностимулирующиебактериимогутбытьansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-), pagP-, lppA- и lppB-.

В вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический продукт представляет собой противораковое терапевтическое средство или терапевтическое средство, используемое для лечения рака. Кодируемый(е) продукт(ы) может быть функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей сигнал секреции, в результате чего при экспрессии терапевтический продукт секретируется, например, секретируется резидентной в опухоли иммунной клеткой.

Любая из иммуностимулирующих бактерий также может иметь один или несколько генов или оперонов, вовлеченных в делетированную или инактивированную инвазию острова 1 патогенности сальмонелл (SPI-1), в результате чего иммуностимулирующие бактерии не проникают в эпителиальные клетки и не инфицируют их. Например, одинилиболеегенов/опероновыбраныизчисла*avrA*,*hilA*,*hilD*,*invA*,*invB*,*invC*,*invE*, *invF*,*invG*,*invH*,*invI*,*invJ*,*iacP*,*iagB*,*spaO*,*spaQ*,*spaR*,*spaS*,*orgA*,*orgB*,*orgC*,*prgH*,*prgI* ,*prgJ*,*prgK*,*sicA*,*sicP*,*sipA*,*sipB*,*sipC*,*sipD*,*sirC*,*sopB*,*sopD*,*sopE*, *sopE2*,*sprB*,and*sptP*.

Плазмида в иммуностимулирующих бактериях может иметь низкое или среднее число копий. Плазмида может содержать начало репликации со средним или низким числом копий, такое как начало репликации с низким числом копий. В некоторых вариантах осуществления плазмида присутствует в более высоком количестве копий. Как правило, число копий составляет менее 150 или менее примерно 150 и более 20 или примерно 20, или от 20 или 25 до 150; и низкое число копий составляет менее 25, или менее 20, или менее примерно 25, или менее примерно 20 копий. В частности, количество копий от низкого до среднего составляет менее примерно 150 копий или менее 150 копий; низкое число копий составляет менее примерно 25 копий или менее 25 копий.

Предложены конструкции нуклеиновой кислоты, которые представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие продукты, такие как белки, которые предназначены для введения в клетку или в плазмиду для экспрессии кодируемого продукта. Конструкции содержат нуклеиновую кислоту,

кодирующую множество противораковых продуктов, в виде полицистронной последовательности под контролем одного промотора. Промотор может быть эукариотическим промотором. Другие регуляторные последовательности эукариот, такие как энхансеры, и нуклеиновые кислоты, кодирующие сигналы переноса белков, такие как сигналы секреции, и другие регуляторные последовательности, такие как терминаторы, включая бактериальные терминаторы для предотвращения считывания с бактериальных промоторов на конструкциях, и конкретные конфигурации элементы и порядок кодирующих продукт открытых рамок считывания и/или генов нуклеиновой кислоты предоставлены и описаны в настоящем документе.

В конструкциях полицистронная последовательность может включать сигналы или закодированные сигналы, такие как пептиды, которые приводят к экспрессии дискретных продуктов, кодируемых полицистронной конструкцией. Примерами таких пептидов являются вирусные пептиды семейства 2A. Конструкции включают такие пептиды или другой сигнал между каждой открытой рамкой считывания, кодирующей каждый продукт. Пептид 2A включает один или несколько из T2A, P2A, E2A или F2A.

В число противораковых продуктов входят любые, которые используются для лечения рака или для стимуляции, или помощи, или стимуляции противораковому ответу у субъекта. Как правило, противораковые продукты представляют собой белки. Кодируемые продукты включают один или несколько иммуностимулирующих белков, которые вызывают или способствуют противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли. Примеры кодируемых продуктов представляют собой иммуностимулирующие белки, которые вызывают или способствуют противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, такие как, например, любой, выбранный из одного или нескольких из: IL- 2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra, комплекс альфа-цепи IL-15/IL-15R, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IL-2 модифицированные таким образом,что они не связываются с IL-2Ra, CXCL9,

CXCL10, CXCL11, интерфероном-α, интерфероном-β, интерфероном-γ, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые участвуют или которые влияют или усиливают рекрутирование/персистенцию Т-клеток, костимулирующие белки, такие как CD40, лигандCD40 (CD40L), лигандCD28, OX40, OX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), включая формы костимулирующих белков с делетированным или укороченным цитоплазматическим доменом для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов, с необязательными модификациями для обеспечения правильной ориентации (т.е., цитоплазматический домен в цитоплазме) в клетке; представители семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антитела против IL-6 или рецепторы-приманки, связывающие IL-6, антагонисты полипептида TGF-бета, включая растворимые рецепторы TGF-бета и антагонисты TGF-бета, и представители надсемейства факторных рецепторов некроза опухоли (TNFR), иимуностимулирующие белки, которые участвуют или которые влияют или усиливают рекрутирование/персистенцию Т-клеток, костимулирующие белки, такие как CD40, лигандCD40 (CD40L), CD28, OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, 4-лиганд 1BB (4-1BBL), включая формы костимулирующих белков с делетированным или укороченным цитоплазматическим доменом для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов с необязательными модификациями для обеспечения правильной ориентации (т.е. цитоплазматического домена в цитоплазме) в клетке;

представители семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антитела против IL-6 или рецепторы-приманки, связывающие IL-6, антагонисты полипептида TGF-бета, включая растворимые рецепторы TGF-бета и антагонисты TGF-бета, и представители некроза опухоли надсемейства факторных рецепторов (TNFR), белки, которые участвуют или которые влияют или усиливают рекрутирование/персистенцию Т-клеток, костимулирующие белки, такие как CD40, лигандCD40 (CD40L), CD28, OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, 4-лиганд 1BB (4-1BBL), включая формы костимулирующих белков с делетированным или укороченным цитоплазматическим доменом для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов с

необязательными модификациями для обеспечения правильной ориентации (т.е. цитоплазматического домена в цитоплазме) в клетке;

представители семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антитела против IL-6 или рецепторы-приманки, связывающие IL-6, антагонисты полипептида TGF-бета, включая растворимые рецепторы TGF-бета и антагонисты TGF-бета, и представители некроза опухоли надсемейства факторных рецепторов (TNFR). ЛигандCD40 (CD40L), CD28, OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), включая формы костимулирующих белков, цитоплазматический домен которых удален или укорочен для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов с необязательными модификациями для обеспечения правильной ориентации (т.е. цитоплазматического домена в цитоплазме) в клетке; представители семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антитела против IL-6 или рецепторы-приманки, связывающие IL-6, антагонисты полипептида TGF-бета, включая растворимые рецепторы TGF-бета и антагонисты TGF-бета, и представители некроза опухоли надсемейства факторных рецепторов (TNFR), лигандCD40 (CD40L), CD28, OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), включая формы костимулирующих белков, цитоплазматический домен которых удален или укорочен для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов с необязательными модификациями для обеспечения правильной ориентации (т.е. цитоплазматического домена в цитоплазме) в клетке; представители семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антитела против IL-6 или рецепторы-приманки, связывающие IL-6, антагонисты полипептида TGF-бета, включая растворимые рецепторы TGF-бета и антагонисты TGF-бета, и представители некроза опухоли надсемейства факторных рецепторов (TNFR) с необязательными модификациями для обеспечения правильной ориентации (т.е. цитоплазматического домена в цитоплазме) в клетке; представители семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антитела против IL-6 или рецепторы-приманки, связывающие IL-6, антагонисты полипептида TGF-бета, включая растворимые рецепторы TGF-бета и антагонисты TGF-бета, и представители некроза опухоли

надсемейство факторных рецепторов (TNFR). с необязательными модификациями для обеспечения правильной ориентации (т.е. цитоплазматического домена в цитоплазме) в клетке; представители семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антитела против IL-6 или рецепторы-приманки, связывающие IL-6, антагонисты полипептида TGF-бета, включая растворимые рецепторы TGF-бета и антагонисты TGF-бета, и представители некроза опухоли надсемейство факторных рецепторов (TNFR), члены семейства B7-CD28 и члены надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). Например, конструкция может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую 4-1BBL с делетированным или частично делетированным цитоплазматическим доменом, или частично делетированным цитоплазматическим доменом и необязательно включающую аминокислотные модификации, в результате чего полученный 4-1BBL принимает правильную ориентацию при экспрессии в клетке (см. SEQIDNO: 389-392 и подробное описание ниже, в котором приведены иллюстративные модифицированные варианты 4-1BBL с укороченными цитоплазматическими доменами, где остатки заменены положительно заряженными остатками (т.е. K и L) для придания правильной ориентации при экспрессии в клетку. Цитоплазматический домен укорочен в достаточной степени, чтобы устранить или уменьшить иммуносупрессивную обратную передачу сигналов.

Цитоплазматический домен, где последовательность 4-1BBL представлена в SEQIDNO: 389-392, а примеры последовательностей приведены ниже в подробном описании и примерах. Конструкции также могут содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из следующих продуктов и комбинаций продуктов:

один или более из IL-12, или IL-15, или IL12p70, или комплекс IL-15/IL-15R с альфа-цепью;

цитокин и агонист пути STING;

цитокин, агонист пути STING и либо костимулирующую молекулу, либо ингибитор контрольной точки иммунного ответа;

агонист цитокина и пути STING и антагонист полипептида TGF-бета;

цитокин, агонист пути STING, антагонист полипептида TGF-бета и либо костимулирующую молекулу (рецептор или лиганд), либо ингибитор контрольной точки иммунного ответа,

при этом агонист пути STING представляет собой любой продукт, который увеличивает экспрессию интерферона I типа посредством активации пути STING. Примерами являются конструкции, которые кодируют полипептид стимулятора генов интерферона (STING) или его вариант или его химеру, как подробно описано в настоящем документе. Среди конструкций есть те, которые кодируют комбинацию терапевтических продуктов, выбранную из следующих комбинаций:

антитело против CTLA-4 и полипептид STING,

IL-15 и полипептид STING,

4-1BBL и полипептид STING,

антагонист рецептора-приманки TGF-бета или полипептида и полипептид STING,

IL-12 и полипептид STING

антитело против CTLA-4, IL-15 и полипептид STING,

4-1BBL, IL-15 и полипептид STING,

антагонист рецептора-приманкиTGF-бета или полипептида, и IL-15, и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, и полипептид STING,

4-1BBL, IL-12 и полипептид STING,

антагонист рецептора-приманки TGF-бета или полипептида, IL-12 и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-15, антагонист рецептора-приманки TGF-бета или полипептида и полипептид STING,

4-1BBL и IL-15, антагонист рецептора-приманки TGF-бета или полипептида, и полипептид STING,

антитело против CTLA-4 и IL-12, антагонист рецептора-примнкиTGF-бета или полипептида, и полипептид STING,

4-1BBL, и IL-12, антагонист рецептора-приманки TGF-бета или полипептида, и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-15 и полипептид STING,

4-1BBL, IL-12, IL-15 и полипептид STING,

антагонист рецептора-приманки TGF-бета или полипептида, IL-12, IL-15 и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-15, и полипептид STING,

4-1BBL, IL-12, IL-21, антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-15 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида,

4-1BBL, IL-12, IL-21 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида, и полипептид STING

IL-12, IL-15 и полипептид STING,

IL-15, IL-21 и полипептид STING,

IL-12, IL-21 и полипептид STING,

антитело к CTLA-4, IL-15, IL-21 и полипептид STING,

антитело к CTLA-4, IL-12, IL-21 и полипептид STING,

4-1BBL, IL-15, IL-21 и полипептид STING,

4-1BBL, IL-12, IL-21 и полипептид STING,

антитело против CTLA-4 и IL-15,

антитело против CTLA-4, IL-15 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида,

4-1BBL и IL-15,

4-1BBL, IL-15 и антагонист рецептора-приманки TGF-бета или полипептида,

антитело против CTLA-4 и IL-12,

антитело против CTLA-4 и IL-12, а также антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида,

4-1BBL и IL-12,

4-1BBL, IL-12 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида,

антитело против CTLA-4 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида,

4-1BBL и антагонист рецептора-приманки TGF-бета или полипептида,

IL-15 и антагонист рецептора-приманкиTGF-бета или полипептида,

IL-12 и антагонист рецептора-приманкиTGF-бета или полипептида,

IL-12, IL-15 и антагонист рецептора-приманкиTGF-бета или полипептида, и

IL-15, и IL-21 и антагонист рецептора-приманкиTGF-или полипептида, где:

антитело против CTLA-4 представляет собой scFv или scFv-Fc;

Полипептиды STING включают полипептид STING дикого типа или вариант полипептида STING, или химерный полипептид STING, и химерный белок STING с аминокислотными заменами, которые обеспечивают, например, приобретение функции; и

4-1BBL представляет собой 4-1BBL с удаленным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с модифицированным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом или 4-1BBL с укороченным и модифицированным цитоплазматическим доменом.

Другие конструкции включают те, которые кодируют комбинацию терапевтических продуктов, выбранных из числа:

IL-2 и IL-12p70;

IL-2 и IL-21;

IL-2, IL-12p70 и вариант STING с приобретением функции (GOF);

IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt), где Δcyt представляет собой делетированный цитоплазматический домен;

IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Pα и вариант STINGGOF;

IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Rα и ИЛ-12p70;

IL-15/IL-15Rα и IL-21;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариант STING GOF;

IL-15/IL-15Pα, IL-21 ивариант STING GOF;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и IL-21;

IL-12p70, IL-21 ивариант STING GOF;

IL-12p70, IL-21, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, вариант STINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и IL-18;

IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-2 и IL-12p70;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-2 и IL-21;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

полипептид-антагонист рецептора-приманки TGF-β, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

рецептор-приманка TGF-β илиполипептид-антагонист, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариант STING GOF;

полипептид-антагонистрецептора-приманки TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-21 ивариант STING GOF;

рецептор-приманка TGF-β илиполипептид-антагонист, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-приманка TGF-β илиполипептид-антагонист, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-12p70 и IL-21;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист и IL-12p70;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-12p70 и IL-18;

рецептор-приманка TGF-β или полипептид-антагонист, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

рецептор-приманка TGF-βили полипептид-антагонист, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-приманка TGF-β и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4 и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-18;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2 и IL-12p70;

агонист CD40, IL-2 и IL-21;

агонист CD40, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-12p70 и IL-21;

агонист CD40, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40 и IL-12p70;

агонист CD40, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-12p70 и IL-18;

агонист CD40, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и

агонист CD40 и вариант STINGGOF, где:

4-1BBL представляет собой 4-1BBL с делетированным цитоплазматическим доменом (4-1BBLΔcyt), 4-1BBL с модифицированным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом или 4-1BBL с укороченным и модифицированным цитоплазматическим доменом; и

антитело против CTLA-4 представляет собой scFv или scFv-Fc.

Примерами полипептидов STING являются полипептиды, в которых полипептид STING модифицирован с целью повышения или конститутивной экспрессии интерферона типа I, или представляет собой химерный полипептид, содержащий полипептид STING человека с С-концевым хвостом из другого вида, который имеет более низкую сигнальную активность NF-κB, чем сигнальная активность NF-κBSTING человека, и где, например: сайт связывания TRAF6 в CTT необязательно удален; и белок STING человека имеет последовательность, указанную в любой из SEQIDNO: 305-309.

Конкретные комбинации кодируемых продуктов включают те, в которых кодируемые терапевтические белки содержат IL-12p70 и химерный полипептид STING человека с CTT тасманского дьявола и аминокислотной заменой, которая приводит к усиленной или конститутивной экспрессии интерферона типа I, или представляет собой полипептид STING с

аминокислотной заменой, которая приводит к повышенной или конститутивной экспрессии интерферона типа I, где мутация, которая приводит к усиленной или конститутивной экспрессии интерферона типа I, представляет собой мутацию с приобретением функции.

Примерами являются белки или полипептиды STING с заменами, описанными в подробном описании, например, где замена аминогруппы в полипептиде STING соответствует R284G или N154S/R284G со ссылкой для сопоставления на любую из SEQIDNO: 305-309, которая устанавливает белки STING человека. Эти конструкции могут дополнительно кодировать IL-36γ и/или антитело-ингибитор контрольной точки иммунного ответа. Как описано в настоящем документе, антитела включают их антигенсвязывающие части и любую из различных форм антител, таких как, помимо прочего, scFv и scFv-Fc (обычно IgGFc), где присутствие Fcмультимеризует полученный продукт, так что он имеет две цепи. Целевые иммунные контрольные точки включают, но не ограничиваются ими, CTLA-4, или PD-1, или PD-L1, а формы антител включают двухцепочечные полипептиды scFV и scFV-Fc.

Предложены плазмиды, которые содержат конструкции, описанные выше и во всем описании в настоящем документе. Плазмиды включают бактериальную плазмиду, в которой конструкция оперативно связана с эукариотическими регуляторными последовательностями транскрипции.

Предложены композиции, такие как фармацевтические композиции, которые содержат смесь противораковых белковых продуктов, кодируемых конструкцией или плазмидой, в качестве единственных противораковых белков в композициях. Следовательно, среди них представлены композиции, которые содержат комплементарные комбинации терапевтических белков; смеси включают уникальные комбинации агентов. Они включают комбинации агентов, предусмотренных и описанных в настоящем документе.

Также предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат любые конструкции и/или плазмиды. Конструкции и плазмиды могут быть предоставлены или иным образом введены в любую из иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, включая любые из описанных выше и ниже. Конструкции и плазмиды также могут быть введены в подходящие бактерии, известные в данной области, такие как бактерии, описанные в публикациях, таких как публикации международных заявок №№ WO2020/172461 и WO2020/172462, и в патентах США №№10449237, 10286051 и 9616114.

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии включают модификации генома, такие как делеции, нарушения, изменения, такие как изменение ориентации всего или части гена, так что функциональные продукты гена не экспрессируются. Среди иммуностимулирующих бактерий предусмотрены те, которые модифицированы таким образом, что полученные бактерии являются msbB-/purI-. В некоторых вариантах осуществления бактерии представляют собой msbB- и purI-, при этом полная длина по меньшей мере кодирующей части генов msbB- и/или purI- делетирована/удалена. Геном бактерий также может быть изменен таким образом, чтобы у бактерий не было флагелл. Это происходит у бактерий, которые обычно экспрессируют флагеллы. В таких бактериях, например, гены Salmonella или эквивалентные гены других видов для fliC-/fljB- могут быть делетированы или иным образом модифицированы таким образом, чтобы продукт функционального гена не экспрессировался. Бактерии также можно модифицировать так, чтобы они были ауксотрофами по аденозину и/или были msbB-/pagP-. Также предложены иммуностимулирующие бактерии и содержащие их фармацевтические композиции, где бактерии не экспрессируют L-аспарагиназуII, посредством чего бактерии являются ansB-.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, при этом бактерия не активирует синтез секретируемой аспарагиназы. Примерами таких бактерий являются те, у которых аспарагиназой является L-аспарагиназаII, кодируемая геном ansB.

Здесь показано, что в родительском штамме VNP20009, который является msbB- и purI-, гены делетированы не полностью. В иммуностимулирующих бактериях при условии, что геном бактерии модифицирован таким образом, что удалена полная длина, по крайней мере, кодирующей части генов msbB- и purI-. Эти штаммы более приспособлены, растут быстрее и/или в большей степени, чем родительский штамм. Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения бактерии можно модифицировать таким образом, чтобы нативный продукт гена asd был неактивным или не экспрессировался. Чтобы помочь в получении штамма, ген asd кодируется на плазмиде под контролем прокариотического промотора, такого как индуцируемый промотор.

В вариантах осуществления штаммы включают модификации, в которых бактерии лишены флагелл и являются pagP-, ansB- и csgD-. Кроме того, бактерии бывают *purI*and*asd*. Таким образом, предложены штаммы, включающие модифицированные родительские штаммы, которые уже являются msbB- и purI-, и/или имеют другие модификации, в частности те, которые модифицируют LPS, которые также представляют собой Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD. Штаммы также могут быть ауксотрофами по аденозину или аденозину и аденину.

Кодируемые терапевтические продукты включают нуклеиновые кислоты и белки. Плазмида может кодировать два или более терапевтических продукта. Примеры продуктов включают, но не ограничиваются ими, цитокин, белок, который конститутивно индуцирует интерферон типа I (IFN), и

костимулирующий рецептор или лиганд. Дополнительные иллюстративные комбинации описаны ниже. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула лишена всего или части цитоплазматического домена для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC), вследствие чего укороченная молекула способна осуществлять конститутивную иммуностимулирующую передачу сигнала Т-клетке посредством совместного взаимодействия со стимулирующим рецептором и неспособна подавать контррегуляторный сигнал антигенпрезентирующей клетке (APC) из-за делетированного, укороченного или иным образом модифицированного цитоплазматического домена или его части. Другие продукты включают ферменты, которые активируют терапевтические белки, такие как те, которые активируют пролекарства.

Как описано здесь и ниже, представленные здесь иммуностимулирующие бактерии кодируют противораковые терапевтические средства, включая комбинации терапевтических продуктов, которые в совокупности обеспечивают сильный противораковый ответ. Среди кодируемых белков каждый из продуктов, перечисленных выше и ниже, и комбинации продуктов из разных классов. Включены костимулирующие белки, такие как 4-1BBL, особенно белки с укороченными или делетированными цитоплазматическими доменами для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов, а также любые компенсаторные мутации, обеспечивающие правильную ориентацию полученного белка в клеточной мембране при экспрессии в клетках. Другие продукты включают агонисты пути STING, которые индуцируют или приводят к конститутивной экспрессии интерферонов типа I. Эти продукты включают белок STING и, в частности, модифицированные и химерные белки STING, представленные и описанные в настоящем документе. Один или несколько цитокинов, таких как IL-12, IL-15, IL-21, L-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra, комплекс IL-15/IL-15R15R альфа-цепи и другие, такие как IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, также кодируются на плазмидах. Помимо костимулирующих продуктов, на плазмидах могут кодироваться белки-агонисты пути STING, такие как STING, и цитокины, антитела, такие как антитела-ингибиторы контрольных

точек, включая антитела против CTLA-4. Антитела могут быть scFvs, а также двухцепочечными формами scFvs-Fc, а также другими формами.

Кроме того, среди прочих продуктов, могут быть TGF-бета антагонисты и рецепторы-приманки TGF-β.

Кодируемые терапевтические продукты могут быть оперативно связаны с нуклеиновой кислотой, кодирующей регуляторные последовательности, распознаваемые эукариотическим хозяином, такие как, например, сигналы секреции для осуществления секреции из клетки, содержащей бактерию или плазмиду. В вариантах осуществления, где иммуностимулирующие бактерии кодируют два или более продуктов, экспрессия каждого продукта может находиться под контролем отдельного промотора. В качестве альтернативы, два или более продукта могут быть экспрессированы под контролем одного промотора, и каждый продукт разделен нуклеиновой кислотой, кодирующей, например, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) или пептид 2A, для осуществления отдельной экспрессии каждого кодируемого лечебного продукта.

Примерами пептидов 2A являются T2A, F2A, E2A или P2A, которые могут фланкировать нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтические продукты, для осуществления раздельной экспрессии терапевтических продуктов, экспрессируемых под контролем одного промотора. Терапевтические продукты экспрессируются под контролем эукариотического промотора, такого как промотор РНК-полимеразы II или промотора РНК-полимеразы III. Они включают промотор РНК-полимеразы II, который является вирусным промотором, или промотор РНК-полимеразы II млекопитающих, такой как, но не ограничиваясь этим, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор вируса Эпштейна-Барра (EBV) , промотор герпесвируса, промотор аденовируса, альфа-промотор фактора элонгации-1 (EF-1), промотор UBC, промотор PGK, промотор CAGG, поздний промотор аденовируса 2 или 5, промотор EIF4A1, промотор CAG или

промотор CD68. Кроме того, плазмиды могут включать другие эукариотические регуляторные последовательности, такие как терминаторы и/или промоторы, выбранные из SV40, гормона роста человека (hGH), гормона роста крупного рогатого скота (BGH или bGH), MND (синтетический промотор, который содержит область U3 модифицированного LTRMoMuLV с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы), гены куриного бета-глобулина и rbGlob (кроличий глобулин) для контроля экспрессии терапевтического продукта(ов).

Другие регуляторные последовательности включают полиА-хвост, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита B (WHP) (WPRE) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита B (HPRE). Могут быть включены дополнительные регуляторные элементы, такие как бактериальные терминаторы, вставленные в соответствующие локусы, как описано в настоящем документе, для уменьшения или устранения сквозного считывания с бактериальных промоторов. MND (синтетический промотор, содержащий область U3 модифицированного LTRMoMuLV с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы), гены куриного бета-глобулина и rbGlob (кроличий глобулин) для контроля экспрессии терапевтического продукта (продуктов).

Кодированные терапевтические продукты включают любые описанные здесь и в исходных пунктах формулы изобретения, такие как нуклеиновая кислота, кодирующая белок, являющийся частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, который приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN) или его варианта. IFN типа I включают интерферон-α и интерферон-β. Варианты включают те, которые при экспрессии у субъекта приводят к конститутивной экспрессии IFNI типа. Они включают вариант с приобретением функции (GOF), который не требует цитозольных нуклеиновых кислот, нуклеотидов, динуклеотидов или циклических динуклеотидов для экспрессии IFNI типа.

Примеромэтихбелковявляетсябелок, выбранныйизSTING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60, и SNRNP200, иихварианты,

обладающиеповышеннойактивностьюилиприводящиекконститутивнойэкспресс

ииинтерферона I типа (IFN). Варианты включают вариант STING, RIG-I, IRF-3 или MDA5, в котором один или несколько остатков серина (S) или треонина (T), которые фосфорилированы в результате вирусной инфекции, заменены аспарагиновой кислотой (D), в результате чего полученный вариант представляет собой фосфомиметик, который конститутивно индуцирует IFN типа I, и любой известный специалистам в данной области и/или описанный в настоящем документе.

Вариантывключают, например, те, вкоторыхмутациивыбраныследующимобразом: a) в STING, соссылкойна SEQ ID NO: 305-309, однаилинесколькovыбраныизчисла: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, and S324A/S326A; b) в MDA5, соссылкойна SEQ ID NO:310, одинилиболееиз T331I, T331R, A489T, R822Q, G821S, A946T, R337G, D393V, G495R, R720Q, R779H, R779C, L372F, и A452T; c) в RIG-I, соссылкойна SEQ ID NO:311, одинилиболееиз E373A и C268F; и d) в IRF-3, соссылкойна to SEQ ID NO:312, S396D, такиекаквариант STING которыйсодержитоднуилиболеевыбранныхаминокислотныхзамен, соссылкойна SEQ ID NOs: 305-309, выбранныхиз: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, N154S/R284G, и S324A/S326A, иконсервативныеихзаменыикомбинации.

Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать иммуностимулирующий белок, который обеспечивает или способствует

противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли. Они включают, но не ограничиваются ими, цитокин, хемокин или костимулирующую молекулу. Примером этого является белок, выбранный из одного или нескольких из: IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-36 гамма, IL-2, который имеетаттенуированное связывание с IL-2Ra, комплексом альфа-цепи IL-15/IL-15R, IL-18, IL-21, IL-23, IL-2, модифицированным таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон-α, интерферон-β, интерферон-γ, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые участвуют или влияют или усиливают рекрутирование и/или персистенцию Т-клеток, CD40, лигандCD40 (CD40L), CD28, OX40 , лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), представители семейства B7-CD28, антагонисты CD47, антитело против IL-6 или рецептор-приманка, связывающий IL-6, антагонисты полипептида TGF-бета и члены надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

Костимулирующая молекула, выбранная из числа CD40, лигандаCD40, CD28, OX40, лигандаOX40, лиганда 4-1BB и 4-1BB, может быть укорочена, так что в молекуле отсутствует цитоплазматический домен (или его часть) для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC); и продукт укороченного гена способен осуществлять конститутивную иммуностимулирующую передачу сигнала Т-клетке за счет участия костимулирующего рецептора и неспособен передавать контррегуляторный сигнал антигенпрезентирующей клетке (APC) из-за удаленного цитоплазматического домена или частично удаленного или укороченного цитоплазматического домена для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов.

Другие такие белки представляют собой полипептиды-антагонисты TGF-бета, такие как антитела против TGF-бета, или фрагменты антител, антитела к рецепторам TGF-бета, или фрагменты антител, растворимые полипептиды-антагонисты TGF-бета, или рецепторы-приманки.

Плазмиды могут кодировать терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как, например, Fab, Fab', F(ab')2, одноцепочечный Fv (scFv), scFv-Fc, Fv, dsFv, нанотело. , фрагмент диатела или одноцепочечное антитело. Примеры включают, но не ограничиваются ими, антагонист PD-1, PD-L1, CTLA-4, VEGF, VEGFR2 или IL-6.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, содержат плазмиду, которая кодирует два или более терапевтических белка, выбранных из числа: a) иммуностимулирующего белка, который обеспечивает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли; b) один или несколько белков, являющихся частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, который приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN), или его вариант, обладающий повышенной активностью по увеличению экспрессии IFN типа I, или вариант, что приводит к конститутивной экспрессии IFN типа I; и c) противораковое антитело или его антигенсвязывающая часть. Например, иммуностимулирующий белок может представлять собой костимулирующую молекулу, которая лишена цитоплазматического домена или его части, достаточной для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC), при этом укороченная костимулирующая молекула способна к конститутивной иммуностимулирующей передаче сигналов Т-клетке посредством взаимодействия с костимулирующим рецептором и неспособна к контррегуляторной передаче сигнала к антигенпрезентирующей клетке (APC).

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии кодируют по меньшей мере два терапевтических продукта, выбранных из цитокина, белка, который конститутивно индуцирует IFN типа I, костимулирующей молекулы и противоракового антитела или его антигенсвязывающей части, которые могут находиться под контролем одного промоутера. Например, экспрессия нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере два или все продукты, находится под контролем одного промотора, а нуклеиновая кислота, кодирующая каждый продукт, разделена

нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептиды 2A, при этом при трансляции каждый продукт отдельно экспрессируется.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые кодируют два или более терапевтических продукта, где по крайней мере один продукт выбран из а) и по крайней мере один продукт выбран из б) и а) представляет собой IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL -12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-23, IL-36 гамма, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra, комплекс альфа-цепи IL-15/IL-15R, IL-18, IL- 2 модифицированный таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон-α, интерферон-β, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые участвуют или которые влияют или усиливают рекрутирование и/или персистенцию Т-клетки, CD40, лигандCD40 (CD40L), OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), члены семейства B7-CD28, антагонисты полипептида TGF-бета или представители надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR); б) STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 или SNRNP200. Они также могут кодировать одно или несколько антител, ингибирующих TGF-бета, рецептор-приманку, связывающий TGF-бета, антитело против IL-6 и рецептор-приманку, связывающий IL-6.

Примерами комбинаций кодируемых терапевтических продуктов являются любые из следующих комбинаций терапевтических продуктов: IL-21 и IL-12p70; IL-2 и IL-21; IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF; IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF; IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt, где Δcyt — удаленный цитоплазматический домен, и 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом (4-1BBLcyttrunc)); IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом); IL-15/IL-15Pα и вариант STINGGOF; IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyttrunc); IL-15/ИЛ-15Rα и IL-12p70; IL-15/IL-15Rα и IL-21; IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF; IL-15/IL-15Pα, IL-21 и вариант STINGGOF; IL-

15/IL-15Rα, IL-12p70,IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyttrunc); IL-12п70 и IL-21; IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF; IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyttrunc); IL-12п70 и вариант STINGGOF; IL-12p70, вариант STINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyttrunc); IL-12п70 и IL-18; IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF; IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyttrunc); рецептор-приманка TGF-β, IL-2 и IL-12p70; рецептор-приманка TGF-β, IL-2 и IL-21; рецептор-приманка TGF-β, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF; рецептор-приманка TGF-β, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF; рецептор-приманка TGF-β, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyttrunc); рецептор-приманка TGF-β, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyttrunc);

рецептор-приманка TGF-β, IL-15/IL-15Rα ивариант STING GOF; рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyt trunc); рецептор-приманка TGF-β, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70; рецептор-приманка TGF-β, IL-15/IL-15Rα и IL-21; рецептор-приманка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариант STING GOF; рецептор-приманка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-21 ивариант STING GOF; рецептор-приманка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyt trunc); рецептор-приманка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyt trunc); рецептор-приманка TGF-β, IL-12p70 и IL-21; рецептор-приманка TGF-β, IL-12p70, IL-21 ивариантSTING GOF; рецептор-приманка TGF-β, IL-12p70, IL-21, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyt trunc); рецептор-приманка TGF-β и IL-12p70; рецептор-приманка TGF-β, IL-12p70 ивариант STING GOF; рецептор-приманка TGF-β, IL-12p70, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyt trunc); рецептор-приманка TGF-β, IL-12p70 и IL-18; рецептор-приманка TGF-β, IL-12p70, IL-18 ивариант STING GOF; рецептор-приманка TGF-β, IL-12p70, IL-18, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt и 4-1BBLcyt trunc); рецептор-приманка TGF-β ивариант

STING GOF; антителопротив CTLA-4, IL-2 и IL-12p70; антителопротив CTLA-4, IL-2 и IL-21; антителопротив CTLA-4, IL-2, IL-12p70 ивариант STING GOF; антителопротив CTLA-4, IL-2, IL-21 ивариант STING GOF; антителопротивCTLA-4, IL-2, IL-12p70, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); антителопротивCTLA-4, IL-2, IL-21, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); антителопротивCTLA-4, IL-15/IL-15RαивариантSTINGGOF; антителопротивCTLA-4, IL-15/IL-15Rα, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLсукороченнымцитоплазматическимдоменом); антителопротивCTLA-4, IL-15/IL-15RαиIL-12p70; антителопротивCTLA-4, IL-15/IL-15RαиIL-21; антителопротивCTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариантSTINGGOF; антителопротивCTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21 ивариантSTINGGOF; антителопротивCTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); антителопротивCTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); антителопротивCTLA-4, IL-12p70 иIL-21; антителопротивCTLA-4, IL-12p70, IL-21 ивариантSTINGGOF; антителопротивCTLA-4, IL-12p70, IL-21, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); антителопротивCTLA-4 иIL-12p70; антителопротивCTLA-4, IL-12p70 ивариантSTINGGOF; антителопротивCTLA-4, IL-12p70, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); антителопротивCTLA-4, IL-12p70 иIL-18; антителопротивCTLA-4, IL-12p70, IL-18 ивариантSTINGGOF; антителопротивCTLA-4, IL-12p70, IL-18, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); антителопротивCTLA-4 ивариантSTINGGOF; агонист CD40, IL-2 и IL-12p70; агонистCD40, IL-2 иIL-21; агонистCD40, IL-2, IL-12p70 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-2, IL-21 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-2, IL-12p70, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-2, IL-21, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-15/IL-15RαивариантSTINGGOF; агонистCD40,

IL-15/IL-15Rα, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-12p70; агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-21; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 иSTING вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-2, IL-21, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-15/IL-15RαивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-12p70; агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-21; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 иSTING вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-2, IL-21, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-15/IL-15RαивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-12p70; агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-21; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 иSTING и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-12p70; агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-21; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 иSTING и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-12p70; агонистCD40, IL-15/IL-15RαиIL-21; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 иSTINGGOFвариант; агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-12p70 иIL-21; агонистCD40, IL-12p70, IL-21 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-12p70, IL-21, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40 иIL-12p70; агонистCD40, IL-12p70 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-12p70, вариантSTINGGOFи 4-1BBL

(включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc); агонистCD40, IL-12p70 иIL-18; агонистCD40, IL-12p70, IL-18 ивариантSTINGGOF; агонистCD40, IL-12p70, IL-18, вариантSTINGGOFи 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcytи 4-1BBLcyttrunc);

Вовсехкомбинациях, включая 4-1BBL, молекула 4-1BBLможетбытьполноразмернымбелком (см., например, SEQIDNO: 389 и 393 дячеловеческогоимышиного 4-1BBLсоответственно); вариант 4-1BBLсделетированнымцитоплазматическимдоменом (4-1BBLΔcyt; см., например, SEQIDNO: 390 и 394 дячеловеческогоимышиного 4-1BBLΔcytсоответственно); вариант 4-1BBLсукороченным (т.е. неполностьюделетированным) цитоплазматическимдоменом (4-1BBLcyttrunc; см., например, SEQIDNO:391-392 иSEQIDNO:395-396, например, человеческиеимышиные 4- укороченныеварианты 1BBLcyt); илимолекула 4-1BBLсмодифицированнымцитоплазматическимдоменом, вкоторомодинилинесколькоостатковSer, которыедействуюткаксайтыфосфорилирования, заменены в соответствующем локусе или локусах, например, для 4-1BBL человека, со ссылкой на SEQIDNO :389, Ser5 и Ser8, с остатком, который уменьшает или устраняет обратную передачу сигналов.

Кроме того,также предоставлены модифицированные нечеловеческие белки-стимуляторы генов интерферона (STING) и белковые химеры STING, а также средства доставки, включая любые описанные в настоящем документе, фармацевтические композиции, клетки, кодирующие или содержащие эти белки STING, и их применение, а также способы лечения раков. В частности, представленные в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии кодируют модифицированные нечеловеческие белки STING, нечеловеческие белки STING и химеры, как описано в настоящем документе. Эти белки STING, которые кодируются иммуностимулирующими бактериями, представлены в настоящем документе и описаны повсюду. Здесь представлены:

1. Модифицированные нечеловеческие белки STING, где нечеловеческий белок STING имеет более низкую активацию NF-κB, чем человеческий

белок STING, и, необязательно, более высокую активность активации интерферона I типа по сравнению с диким типом (WT) белка STING человека. Эти нечеловеческие белки STING модифицированы для включения мутации или мутаций, так что они обладают повышенной активностью или действуют конститутивно в отсутствие передачи сигналов цитозольной нуклеиновой кислоты. Мутации, как правило, представляют собой мутации аминокислот, которые возникают при интерферонопатиях у людей, таких как описанные выше для человеческого STING. Соответствующие мутации вводятся в белки STING нечеловеческих видов, где соответствующие аминокислотные остатки идентифицируются путем выравнивания. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления сайт связывания TRAF6 в С-концевом хвосте (CTT) белка STING удален, что снижаетсигнальнуюактивность.

2. 2. Модифицированные белки STING, в частности белки STING человека, которые представляют собой химеры, в которых область CTT (С-концевой хвост) в белке STING одного вида, например человека, заменена CTT белка STING другого вида. который имеет более низкую сигнальную активность NF-κB и/или более высокую сигнальную активность IFNI типа, чем STING человека. Кроме того, в этих химерах может быть удален сайт связывания TRAF6.

3. Модифицированные белки STING 2, которые также включают мутации 1.

4. Средства доставки, такие как иммуностимулирующие бактерии, любые представленные в настоящем документе или известные специалистам в данной области, включая, например, экзосомы, наночастицы, миниклетки, клетки,

липосомы, лизосомы, онколитические вирусы и другие вирусные векторы, которые кодируют модифицированные белки STING любого из 1-3.

5. Средства доставки, такие как иммуностимулирующие бактерии, любые представленные в настоящем документе или известные специалистам в данной области, включая, например, экзосомы, наночастицы, миниклетки, клетки, липосомы, лизосомы, онколитические вирусы и другие вирусные векторы, которые кодируют немодифицированныйSTING вида, отличного от человека, чей белок STING имеет сниженную сигнальную активность NF-κB по сравнению с активностью человеческого STING и, (необязательно), повышенную стимулирующую/сигнальную активность интерферона I типа по сравнению с STING человека.

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

7. Фармацевтические композиции, которые содержат белки STING по любому из 1-3, или средства доставки по 4 и 5, или клетки по 6.

8. Применение и способы лечения рака путем введения любого из 1-7, как описано здесь для иммуностимулирующих бактерий.

Анализы и способы оценки активности NF-κB (сигнальной активности) и интерферон-стимулирующей активности I типа или интерферон-β-стимулирующей активности STING описаны в настоящем документе и также известны специалистам в данной области. Способы включают описанные, например, в deOliveiraMannetal. (2019) CellReports 27:1165-1175, в котором описывается, среди прочего, сигнальная активность интерферона-β и NF-κB белков STING различных видов, включая человека, тем самым идентифицируя белки STING различных видов, которые имеют более низкий уровень NF-κB. активности, чем STING человека, и те, которые также имеют сравнимую или более высокую активность интерферона-β, чем STING человека. де Оливейра Манн и др. (2019) показывает сравнение видов и определяет домены STING у

каждого вида, включая домен CTT (см. также дополнительную информацию deOliveiraMannetal.(2019).

Нечеловеческие STING-белки могут представлять собой, помимо прочего, STING-белки следующих видов: тасманский дьявол (Sarcophilusharrisii; SEQIDNO:349), мартышка (Callithrixjacchus; SEQIDNO:359), крупный рогатый скот (Bos телец; SEQIDNO:360), кошка (Feliscatus; SEQIDNO:356), страус (Struthiocamelusaustralis; SEQIDNO:361), хохлатый ибис (Nipponianippon; SEQIDNO:362), целакант (Latimeriachalumnae; SEQIDNO:363-364), кабан (Susscrofa; SEQIDNO:365), летучая мышь (Rousettusaegyptiacus; SEQIDNO:366), ламантин (Trichechusmanatuslatirostris; SEQIDNO:367), акула-призрак (Callorhinchusmilii; SEQIDNO:368) и мышь (Musmusculus; SEQIDNO:369). Эти STING-белки позвоночных легко активируют иммунную передачу сигналов в клетках человека, указывая на то, что молекулярный механизм передачи сигналов STING является общим для позвоночных (см., deOliveiraMannetal. (2019) *CellReports* 27:1165-1175).

Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, причем инфицирование макрофага, включая макрофаги человека, бактерией превращает макрофаг M2 в макрофаг с фенотипом M1 или с M1-подобным фенотипом. Предложены иммуностимулирующие бактерии, которые содержат плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, экспрессия которого в макрофаге приводит к превращению или превращению макрофагов M2, таких как макрофаги M2 человека, в M1 или M1-подобный фенотип. Иммуностимулирующие бактерии с такими свойствами включают любую из представленных здесь бактерий, которые содержат модификации генома, приводящие к инфицированию резидентных в опухоли (у субъектов с раком) и резидентных в тканях миелоидных клеток. Эти модификации генома включают те, которые приводят к бактериям, не имеющим флагелл, где бактерия дикого типа имеет флагеллы, и другие, такие как бактерии, которые являются pagP-/msbB-. Другие модификации включают те, которые приводят к устранению активности

аспарагиназы, такие как модификации, которые приводят к появлению бактерий, которые являются ansB-, к бактериям, которые инфицируют миелоидные клетки, что тем самым усиливает активность Т-клеток, и другие модификации, которые изменяют липополисахарид (LPS).

Включены иммуностимулирующие бактерии, которые кодируют терапевтические продукты в макрофагах, которые облегчают или приводят к конверсии макрофагов M2 или которые превращают макрофаги M2 в M1 или M1-подобный фенотип. Примерами терапевтических продуктов являются те, которые являются частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, который приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN), особенно к конститутивной экспрессии. Это включает в себя варианты терапевтических продуктов с приобретением функции (GOF), которые являются частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК и не требуют цитозольной нуклеиновой кислоты, нуклеотиды, динуклеотиды или циклические динуклеотиды, приводящие к экспрессии IFN типа I, такие как варианты и нечеловеческие белки STING, как описано и предоставлено в настоящем документе. Иммуностимулирующие бактерии включают любые бактерии, которые могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе, включая виды, перечисленные в настоящем документе, такие как виды и штаммы Salmonella.

Также предложены иммуностимулирующие бактерии, в которых закодированный терапевтический продукт, такой как белок, связан с фрагментом, который придает улучшенное фармакологическое свойство, такое как фармакокинетическое или фармакодинамическое свойство, такое как увеличенный период полувыведения из сыворотки. Следовательно, предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, в которых кодируемый терапевтический продукт содержит домен Fc или фрагмент, продлевающий период полужизни, такой как сывороточный альбумин человека или его часть.

Способы или методы продления периода полувыведения включают, например, пегилирование, модификацию гликозилирования, сиалирование, PASилирование (модификацию полимерами PAS-аминокислот длиной около 100-200 остатков), ELPилирование (см., например, Flossetal. (2010)

TrendsBiotechnol.28(1):37-45), HAPилирование (модификация гомополимером глицина), слияние с сывороточным альбумином человека, слияние с GLK, который представляет собой генетическое слияние неточных повторяющихся пептидных последовательностей, содержащих A, E, G, P, S и T; см., например, Schellenbergeretal. (2009) Нац. Biotechnol.27(12):1186-1190), и другие подобные модификации и слияния, которые увеличивают размер, увеличивают гидродинамический радиус, изменяют заряд или нацелены на рецепторы для рециркуляции, а не очистки, и комбинации таких модификаций и слияний, которые представляет собой генетическое слияние неточных повторяющихся пептидных последовательностей, содержащих A, E, G, P, S и T; см., например, Schellenbergeretal. (2009) Нац. Biotechnol.27(12):1186-1190), и другие подобные модификации и слияния, которые увеличивают размер, увеличивают гидродинамический радиус, изменяют заряд или нацелены на рецепторы для рециркуляции, а не очистки, и комбинации таких модификаций и слияний.

Также предложены иммуностимулирующие бактерии, где кодируемый терапевтический продукт содержит трансмембранный домен белка B7, или где терапевтический продукт заякорен GPI благодаря эндогенному или добавленному якорю GPI. Закодированный терапевтический продукт может включать слияние с коллагеном.

Иммуностимулирующие бактерии в любом и во всех вариантах осуществления могут быть любыми подходящими видами. Там, где делается ссылка на конкретные гены и генные модификации, гены и модификации представляют собой те, которые соответствуют генам и модификациям, упомянутым в отношении сальмонеллы, как иллюстративного вида. Виды и штаммывключают, например, штамм*Rickettsia*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*,*Francisella*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*,*Haemophilus*,*Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*,*Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Vibrio*, *Bacillus*, *and Erysipelothrix.* For example, *Rickettsia rickettsiae*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugamuchi*, *Rickettsia mooseri*,*Rickettsiasibirica*, *Bordetella bronchiseptica*,

Neisseria meningitidis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas salmonicida*,*Francisellatularensis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Citrobacter freundii*, *Chlamydia pneumoniae*,*Haemophilussomnus*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium intracellulare*, *Legionella pneumophila*,*Rhodococcusequi*,*Pudomonas aeruginosa*, *Helicobacter mustelae*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*,*Erysipelothrixrhusiopathiae*, *Yersinia enterocolitica*,*Rochalimaeaquintana*, и *Agrobacterium tumerfacium*.

Бактерии можно ослабить или сделать их малотоксичными или нетоксичными с помощью описанных здесь модификаций. Примеромбактерийявляютсявиды Salmonella, такиекакштамм Salmonella typhimurium. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии включают те, которые эндогенно кодируют и экспрессируют или модифицированы для кодирования и экспрессии гена, кодирующего устойчивость к уничтожению комплемента (rck), такой как ген rck сальмонеллы. Терапевтические E. coli модифицируют для кодирования rck, чтобы их можно было вводить системно. Также предусмотрены, как описано в настоящем документе и как указано в формуле изобретения, средства доставки, клетки, фармацевтические композиции, способы, применение и лечение рака, особенно у людей. Также предусмотрены сопутствующая диагностика и методы отбора субъектов для лечения, а также методы мониторинга лечения.Они описаны ниже и также в формуле.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

На рисунке 1 показано сравнение белков STING человека дикого типа и тасманского дьявола.

На рис. 2 показано сравнение белков STING дикого типа человека и мартышки.

На фигуре 3 показано сравнение белков STING человека и крупного рогатого скота дикого типа.

На рис. 4 показано сравнение белков STING человека и кошки дикого типа.

На фигуре 5 показано сравнение белков STING человека и страуса дикого типа.

На фигуре 6 показано сравнение белков STING дикого типа человека и хохлатого ибиса.

На Фигуре 7 показано сравнение белков STING человека дикого типа и целаканта (SEQIDNO:345).

На фигуре 8 показано сравнение белков STING человека и рыбок данио дикого типа.

На фигуре 9 показано сравнение белков STING дикого типа человека и кабана.

На фигуре 10 показано сравнение белков STING человека и летучей мыши дикого типа.

На фигуре 11 показано сравнение белков STING человека и ламантина дикого типа.

На фигуре 12 показано сравнение белков STING человека и акулы-призрака дикого типа.

На фигуре 13 показано сравнение белков STING человека и мыши дикого типа.

На Фигуре 14 изображена типичная конструкция, содержащая экспрессионную кассету asd, включая бактериальный промотор и любые другие бактериальные регуляторные последовательности, расположенные в противоположной ориентации по отношению к кассете, кодирующей полезную нагрузку (полезные нагрузки) под контролем эукариотического промотора, и включающую бактериальный терминатор, фланкирующую нуклеиновую кислоту, кодирующую полезную(ые) нагрузку(и), и имеющие ориентацию для терминации любых считываемых транскриптов от прокариотического промотора.

ПОДРОБНОЕОПИСАНИЕ

A. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится изобретение(я). Все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности GenBank, базы данных, веб-сайты и другие опубликованные материалы, упомянутые в настоящем описании, если не указано иное, полностью включены посредством ссылки. В случае наличия множества определений терминов в настоящем документе преимущественную силу имеют те, которые даны в этом разделе. Когда делается ссылка на URL-адрес или другой подобный идентификатор или адрес, подразумевается, что такие идентификаторы могут меняться, и конкретная информация в Интернете может появляться и исчезать, но эквивалентную информацию можно найти с помощью поиска в Интернете.

Используемый здесь термин «терапевтические бактерии» представляет собой бактерии, которые оказывают терапевтический эффект, такой как противораковая или противоопухолевая терапия, при введении субъекту, такому как человек.

Используемый здесь термин «иммуностимулирующие бактерии» представляет собой терапевтические бактерии, которые при введении субъекту накапливаются в иммуностимулирующих тканях и клетках, таких как опухоли, микроокружение опухоли и резидентные иммунные клетки, и реплицируют и/или экспрессируют продукты, которые являются иммуностимулирующими. или которые приводят к иммуностимуляции. Например, иммуностимулирующие бактерии аттенуированы в организме хозяина за счет пониженной токсичности или патогенности и/или за счет кодируемых продуктов, которые снижают токсичность или патогенность, поскольку иммуностимулирующие бактерии не могут реплицироваться и/или экспрессировать продукты (или имеют пониженную репликацию/продукцию). экспрессии), за исключением, прежде всего, иммунопривилегированных

сред. Иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные в настоящем документе, модифицированы для кодирования продукта или продуктов или проявления признака или свойства, которое делает их иммуностимулирующими. Такие продукты, свойства и признаки включают, но не ограничиваются ими, например, по меньшей мере один из: иммуностимулирующий белок, такой как цитокин, хемокин или костимулирующая молекула; цитозольный сенсор ДНК/РНК или его вариант с приобретением функции или конститутивно активный вариант (например, STING, IRF3, IRF7, MDA5, RIG-I); РНК, такие как miРНК (shРНК и microРНК) или CRISPR, которые нацеливаются, разрушают или ингибируют ген контрольной точки, такой как TREX1, PD-1, CTLA-4 и/или PD-L1; антитела и их фрагменты, такие как антитело против контрольной точки иммунного ответа, антитело против IL-6, антитело против VEGF или антитело, ингибирующее TGF-β; другие конструкции антител, такие как биспецифическиепривлекатели Т-клеток (BiTEs®); растворимые рецепторы TGF-β, которые действуют как приманки для связывания TGF-β или антагонистических полипептидов TGF-β; и связывания IL-6 с рецепторами-ловушками. Иммуностимулирующие бактерии также могут включать модификацию, которая делает бактерию ауксотрофной по отношению к метаболиту, который является иммуносупрессорным или который находится в иммуносупрессивном пути, таком как аденозин.

Используемые здесь обозначения штаммов VNP20009 (см., например, публикацию международной заявки PCT № WO 99/13053, см. также патент США № 6863894), YS1646 и 41.2.9 используются взаимозаменяемо, и каждое относится к депонированному штамму Американской коллекцией типовых культур (ATCC) и присвоен номер доступа 202165. VNP20009 представляет собой модифицированный аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium, который содержит делеции в msbB и purI и был получен из штамма дикого типа ATCC #14028.

Используемые здесь обозначения штаммов YS1456 и 8.7 используются взаимозаменяемо, и каждое из них относится к штамму, депонированному в

Американской коллекции типовых культур (ATCC) и которому присвоен регистрационный номер 202164 (см. патент США №6 863 894).

Как используется в настоящем документе, указание на то, что бактерия «происходит от» конкретного штамма, означает, что такой штамм может служить исходным материалом и может быть модифицирован для получения конкретной бактерии.

Используемый здесь термин «экспрессионная кассета» относится к конструкции нуклеиновой кислоты, которая включает регуляторные последовательности для экспрессии генов, функционально связанные с нуклеиновой кислотой, кодирующей открытые рамки считывания (ORF), которые кодируют полезные нагрузки, такие как терапевтические продукты или другие белки.

В данном контексте пептиды 2A представляют собой вирусные олигопептиды длиной 18–22 аминокислоты, которые опосредуют расщепление полипептидов во время трансляции в эукариотических клетках. Обозначение «2A» относится к определенной области вирусного генома, и различные вирусные 2A обычно называют в честь вируса, из которого они произошли.

Примерамиизнихявляются F2A (вирусящура 2A), E2A (вирусриниталошадей A), P2A (тешовируссвиней-12A) и T2A (вирусThoseaasigna 2A). См., например, Liuetal. (2017) ScientificReports 7:2193, Fig.1, для кодирования последовательностей. См. также SEQIDNO:327-330. Эти пептиды обычно имеют звено основной последовательности DxExNPGP и встречаются в большом количестве семейств вирусов.

Они помогают расщеплять полипротеины, заставляя рибосому не образовывать пептидную связь. Пептиды 2A обеспечивают мультицистронные векторы, в котором множество белков экспрессируется из одной открытой рамки считывания (ORF). Для целей настоящего документа пептиды 2A включают те, которые встречаются в природе, и любые их модифицированные формы, такие как любые, имеющие идентичность последовательности на 97%, 98% или 99% с любым природным пептидом 2A, включая описанные в настоящем документе, которые приводят к единственному полипептиду транскрибированному и

транслированному с транскрипта, содержащего множество (2 или более) открытых рамок считывания.

Используемый здесь термин «интерферонопатия» относится к расстройству, связанному с активацией интерферона в результате мутации в генном продукте, вовлеченном в путь, который регулирует или индуцирует экспрессию интерферона. Активность продуктов обычно регулируется посредником, таким как цитозольная ДНК, или РНК, или нуклеотиды; когда белковый продукт мутирован, активность является конститутивной. ИнтерферонопатииI типа включают целый ряд состояний, в том числе тяжелые формы синдрома Айкарди-Гутьера (AGS) и более легкие формы семейной обмороженной волчанки (FCL). Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие мутированные продукты с такими свойствами, могут быть получены invitro, например, путем отбора мутаций, которые приводят к приобретению функции продукта по сравнению с продуктом аллеля с нормальной активностью.

Используемый здесь термин «мутация с приобретением функции» представляет собой мутацию, которая увеличивает активность белка по сравнению с тем же белком, который не имеет мутации. Например, если белок является рецептором, он будет иметь повышенное сродство к лиганду; если это фермент, он будет иметь повышенную активность, в том числе конститутивную активность.

Используемый здесь термин «источник репликации» представляет собой последовательность ДНК, при которой инициируется репликация на хромосоме, или плазмиде, или в вирусе. Для небольших ДНК, включая бактериальные плазмиды и небольшие вирусы, достаточно одного источника.

Источник репликации определяет количество копий вектора, которое зависит от выбранного источника репликации. Например, если вектор экспрессии получен из плазмиды с низким числом копий pBR322, число копий составляет примерно 15-20 копий на клетку, а если получен из плазмиды с большим числом копий pUC, оно может составлять 500-700 копий на клетку.

Среднее число копий составляет 150 или менее 150, низкое число 5-30, например 20 или менее 20. Интервал от низкого до среднего – менее 150 копий на клетку. Большое число копий более 150 копий на клетку.

Используемый здесь термин «звено CpG» представляет собой структуру оснований, которая включает неметилированный центральный CpG («p» относится к фосфодиэфирной связи между последовательныминуклеотидамиC и G), окруженную по крайней мере одним основанием, фланкирующим (с 3'- и 5'-стороны) центральный CpG. ОлигодезоксинуклеотидCpG представляет собой олигодезоксинуклеотид, который имеет длину по меньшей мере около десяти нуклеотидов и включает неметилированныйCpG. По крайней мере, Сиз 5' CG 3' неметилирован.

Используемый здесь термин «последовательность связывания RIG-I» относится непосредственно к 5'-трифосфатной (5'ppp) структуре или к той, которая синтезируется РНК polIII из последовательности поли(dA-dT), которая, благодаря взаимодействию с RIG-I, может активировать IFN типа I через путь RIG-I. РНК включает по меньшей мере четыре рибонуклеотида A (AAAA); может содержать 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более. Последовательность связывания RIG-I вводится в плазмиду бактерии для транскрипции в полиA.

Используемый здесь термин «цитокины» представляет собой широкую и свободную категорию малых белков (~ 5–20 кДа), которые важны для передачи клеточных сигналов. Цитокины включают хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухоли. Цитокины представляют собой клеточные сигнальные молекулы, которые способствуют межклеточному взаимодействию в иммунных реакциях и стимулируют движение клеток к местам воспаления, инфекции и травмы.

Используемый здесь термин «хемокины» относится к хемоаттрактантным (хемотактическим) цитокинам, которые связываются с рецепторами хемокинов, и включает белки, выделенные из природных источников, а также полученные синтетическим путем, например, рекомбинантными средствами или путем химического синтеза. Примерыхемокиновключают, нонеограничиваютсяими, IL-8, IL-10, GCP-2, GRO-α, GRO-β, GRO-γ, ENA-78, PBP, CTAP III, NAP-2, LAPF-4, MIG (CXCL9), CXCL10 (IP-10), CXCL11, PF4, SDF-1α, SDF-1β, SDF-2, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-1α (CCL3), MIP-1β (CCL4), MIP-1γ (CCL9), MIP-2, MIP-2α, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, MIP-5, MDC, HCC-1, ALP, лунгкин, Тим-, 1 эотаксин-1, эотаксин-2, I-309, SCYA17, TRAC, RANTES (CCL5), DC-CK-1,лимфотактин и фракталкин и другие, известныеспециалистам в даннойобласти. Хемокины участвуют в миграции иммунных клеток к очагам воспаления, а также в созревании иммунных клеток и генерации адаптивных иммунных ответов.

Используемый здесь термин «иммуностимулирующий белок» представляет собой белок, который проявляет или стимулирует противоопухолевый иммунный ответ в микроокружении опухоли. Примерами таких белков являются цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, такие как, но не ограничиваясь ими, IFN-α, IFN-β, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15. , IL-18, IL-21, IL-23, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), комплекс альфа-цепи IL-15/IL-15R, IL-36 гамма, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra, IL-2, модифицированный таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, CXCL9, CXCL10 (IP-10), CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, вовлеченные молекулы в потенциальном наборе и/или персистенции Т-клеток, CD40, лигандCD40 (CD40L), OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), 4-1BBL с делетированной цитоплазматической домен (4-1BBLΔcyt) или с частично делетированным цитоплазматическим доменом, члены семейства B7-CD28 и члены надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

Среди иммуностимулирующих белков есть укороченные костимулирующие молекулы, такие как, например, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 и OX40L, каждая с полной или частичной делецией цитоплазматического домена, для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC). Эти укороченные генные продукты, такие как продукты с делециями или частичными делециями цитоплазматического домена, способны к конститутивной иммуностимулирующей передаче сигналов Т-клеткам посредством вовлечения костимулирующих рецепторов, но не способны к контррегуляторным сигналам к APC из-за укороченного или удаленного цитоплазматического домена.

Используемый здесь термин «делеция цитоплазматического домена» представляет собой делецию всех или части аминокислотных остатков, составляющих цитоплазматический или внутриклеточный домен белка, при этом делеции достаточно для осуществления конститутивной иммуностимулирующей передачи сигнала к Т-клеток за счет костимулирующего взаимодействия с рецептором, и его достаточно для ингибирования контррегуляторной передачи сигналов к APC. Например, цитоплазматический домен человеческого 4-1BBL (также известного как TNFSF9) содержит аминокислотные остатки 1-28 SEQIDNO:342. Цитоплазматический домен человеческого CD80 включает аминокислотные остатки 264-288 белка; цитоплазматический домен человеческого CD86 включает аминокислотные остатки 269-329 белка; цитоплазматический домен CD27L человека (известный также как CD70) содержит аминокислотные остатки 1-17 белка; цитоплазматический домен B7RP1 человека (известный также как ICOSLG или лигандICOS) содержит аминокислотные остатки 278-302 белка; и цитоплазматический домен OX40L человека (известный также как TNFSF4 или CD252) содержит аминокислотные остатки 1-23 белка.

Используемый здесь термин «рецептор-приманка» или«рецептор-ловушка» представляет собой рецептор, который может специфически эффективно связываться со специфическими факторами роста или цитокинами, но структурно не способен передавать сигнал или активировать предполагаемый рецепторный комплекс. Рецептор-приманка действует как ингибитор, связываясь с лигандом и предотвращая его связывание с родственным ему рецептором.Например, рецепторы семейства TGF-β включают рецепторы серин/треонинкиназы клеточной поверхности типа I (TβRI или TGFβR1) и типа II (TβRII или TGFβR2), которые образуют гетеромерные комплексы в присутствии димеризованныхлигандов, а также типа III рецептор бетагликан (TβRIII или TGFβR3). Растворимые рецепторы-ловушки для TGF-β, которые предотвращают связывание TGF-β с его рецепторами, включают растворимые внеклеточные домены (области связывания TGF-β) TβRI, TβRII или TβRIII (βгликан), которые могут сливаться с другими молекулы, такие как домен Fc. Кроме того, BAMBI (костный морфогенетический белок (BMP) и мембраносвязанный ингибитор активина) структурно связан с рецепторами типа I и действует как приманка, которая ингибирует активацию рецептора. Доминантно-отрицательный TGFβR2 (DN-TGFβR2), который включает внеклеточный домен TGFβR2 и трансмембранную область, но не содержит цитоплазмического домена, необходимого для сигнализации, также может быть использован как TGF-β рецептор-приманка (см., например, WO 2018/138003).

Используемый здесь термин «агонист костимулирующей молекулы» представляет собой молекулу, которая при связывании с костимулирующей молекулой активирует ее или повышает ее активность. Например, агонист может представлять собой агонист антитела. Антитела-агонисты CD40 включают, например, CP-870,893, дацетузумаб, ADC-1013 (митазалимаб) и ChiLob 7/4.

Используемый в настоящем документе цитозольный сенсорный путь ДНК/РНК представляет собой путь, который инициируется присутствием ДНК, РНК,

нуклеотидов, динуклеотидов, циклических нуклеотидов и/или циклических динуклеотидов или других молекул нуклеиновых кислот, что приводит к продукции интерферона I типа. Молекулы нуклеиновой кислоты в цитозоле возникают в результате вирусного, бактериального, радиационного или другого подобного воздействия, что приводит к активации иммунного ответа у хозяина.

Используемый здесь термин «белок пути интерферона I типа» представляет собой белок, который индуцирует врожденный иммунный ответ, такой как индукция интерферона I типа.

Используемый здесь термин «цитозольный ДНК/РНК сенсор (датчик)» представляет собой белок, являющийся частью пути цитозольного ДНК/РНК-сенсора, который приводит к экспрессии медиатора иммунного ответа, такого как интерферон I типа. «Цитозольный ДНК/РНК сенсор» включает белки пути интерферона I типа. Например, как описано в настоящем документе и известно специалистам в данной области, цитозольная ДНК воспринимается cGAS, что приводит к продукции cGAMP и последующей передаче сигналов STING/TBK1/IRF3, а также продукции IFNI типа.

Бактериальные циклические динуклеотиды (такие как бактериальный циклический ди-AMP) также активируют STING. Следовательно, STING является иммуномодулирующим белком, который индуцирует интерферон типа I. 5'-трифосфатная РНК и двухцепочечная РНК обнаруживаются с помощью RIG-I и либо только MDA-5, либо MDA-5/LGP2. Это приводит к полимеризации митохондриального MAVS (митохондриального противовирусного сигнального белка), а также активирует TANK-связывающую киназу 1 (TBK1) и фактор регуляции интерферона 3 (IRF3). Белки в таких путях являются иммуностимулирующими и приводят к экспрессии медиаторов врожденного иммунного ответа, таких как интерферон I типа. Иммуномодулирующие белки в сенсорных путях ДНК/РНК могут быть модифицированы таким образом, чтобы они обладали повышенной активностью или действовали конститутивно в отсутствие цитозольных нуклеиновых кислот, что приводит к иммунному ответу такому как экспрессия интерферона типа I.

Используемый здесь термин «карбоксиконцевой хвост» или «С-концевой хвост» (CTT) белка врожденного иммунитета STING относится к С-концевой части белка STING, которая в белке STING дикого типа связана к cGAMP-связывающему домену гибкой линкерной областью. CTT включает сайт связывания IRF3, сайт связывания TBK1 и сайт связывания TRAF6. STING способствует индукции продукции бета-интерферона (IFN-β) посредством фосфорилирования С-концевого хвоста белка STING (CTT) TANK-связывающей киназой 1 (TBK1). Взаимодействие между STING и TBK1 опосредуется эволюционно законсервированным участком из восьми аминокислотных остатков в карбоксиконцевом конце (CTT) STING. TRAF6 катализирует образование K63-связанных цепей убиквитина на STING.

Делеция или нарушение сайта связывания TRAF6 в CTT может снижать активацию передачи сигналов NF-κB. Замена CTT STING человека (или его частей) на CTT (или его соответствующую часть) из белка STING видов с низкой активацией NF-κB может снизить активацию NF-κB полученным модифицированным белком STING человека. STINGCTT представляет собой неструктурированный отрезок примерно из 40 аминокислот, который содержит звенья последовательности, необходимые для фосфорилирования STING и рекрутирования IRF3 (см. deOliveiraMannetal. (2019) CellReports 27:1165-1175). Остаток S366 STING человека был идентифицирован как первичный сайт фосфорилирования TBK1, который является частью звенаLxIS, общего для адаптерных белков врожденного иммунитета, которые активируют передачу сигналов интерферона (см. deOliveiraMannetal. (2019) CellReports 27:1165-1175) . STINGCTT человека содержит второезвеноPxPLR, которое включает остаток L374, необходимый для связывания TBK1; последовательности LxIS и PxPLR консервативны среди аллелей STING позвоночных (см. deOliveiraMannetal. (2019) CellReports 27:1165-1175). Типовые последовательности STINGCTT и сайты связывания IRF3, TBK1 и TRAF6 представлены в следующей таблице:

Вид	**С-концевая (CTT) последовательность**	**SEQ ID**	**IRF3 сайт**	**TBK1 сайт**	**TRAF6 сайт**

		NO.	связывания	связывания	связывания
Человек	EKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS	370	PELLIS	PLPLRT	DFS
Тасманский дьявол	RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGF	371	PQLLIS	PLSLRT	DGF
Мартышка	EEEEVTVGSLKTSEVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRSDLF	372	PELLIS	PLPLRS	DLF
Крупный рогатый скот	EREVTMGSTETSVMPGSSVLSQEPELLISGLEKPLPLRSDVF	373	PELLIS	PLPLRS	DVF
Кошка	EREVTVGSVGTSMVRNPSVLSQEPNLLISGMEQPLPLRTDVF	374	PNLLIS	PLPLRT	DVF
Страус	RQEEYTVCDGTLCSTDLSLQISESDLPQPLRSDCL	375	LSLQIS	PQPLRS	DCL
Хохлатый ибис	EREVTMGSAETSVVPTSSTLSQEPELLISGMEQPLPLRSDIF	376	PELLIS	PLPLRS	DIF
Летучая мышь	EKEEVTVGTVGTYEAPGSSTLHQEPELLISGMDQPLPLRTDIF	377	PELLIS	PLPLRT	DIF
Ламантин	EREEVTVGSVGTSVVPSPSSPSTSSLSQEPKLLISGMEQPLPLRTDVF	378	PKLLIS	PLPLRT	DVF
Хохлатый ибис	CHEEYTVYEGNQPHNPSTTLHSTELNLQISESDLPQPLRSDCF	379	LNLQIS	PQPLRS	DCF

Целакант (вариант 1)	QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKRQVC	380	PQLMIS	PHTLKR	QVC
Целакант (вариант 2)	QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKSGF	381	PQLMIS	PHTLKS	GF
Данио	DGEIFMDPTNEVHPVPEEGPVGNCNGALQATFHEEPMSDEPTLMFSRPQSLRSEPVETTDYFNPSSAMKQN	382	PTLMFS	PQSLRS	EPVETTDY
Акула-призрак	LTEYPVAEPSNANETDCMSSEPHLMISDDPKPLRSYCP	383	PHLMIS	PKPLRS	YCP
Мышь	EKEEVTMNAPMTSVAPPPSVLSQEPRLLISGMDQPLPLRTDLI	384	PRLLIS	PLPLRT	DLI

Используемый здесь термин «агонист пути STING» представляет собой любой продукт, который повышает экспрессию интерферона типа I (IFN) посредством активации пути STING. Примерами таких агонистов являются варианты полипептида STING с приобретением функции, представленные в настоящем документе, а также варианты с приобретением функции других цитозольных ДНК/РНК-сенсоров и белков пути IFNI типа, таких как варианты IRF-3, IRF- 7, MDA5 и RIG-I, которые увеличивают или делают экспрессию IFNI типа конститутивной посредством STING-пути.

Используемый здесь термин «бактерия, модифицированная таким образом, что она «вызывает меньшую гибель клеток в резидентных в опухоли иммунных клетках» или «вызывает меньшую гибель клеток в иммунных клетках»,

означает, что она является менее токсичной, чем бактерия без модификации, или бактерией, которая имеет пониженную вирулентность по сравнению с бактерией без модификации. Примерами таких модификаций являются те, которые устраняют пироптоз в фагоцитирующих клетках и изменяют профили липополисахарида (ЛПС) в бактериях. Эти модификации включают разрушение или делецию генов флагеллина, pagP или одного или нескольких компонентов пути SPI-1, таких как hilA, стержневой белок (например, prgJ), игольчатый белок (например, prgI) и QseC.

В данном контексте бактерия, которая «модифицирована таким образом, что она предпочтительно инфицирует резидентные в опухоли иммунные клетки» или «модифицирована таким образом, что она преимущественно инфицирует иммунные клетки», имеет модификацию в своем геноме, которая снижает ее способность инфицировать клетки, отличные от иммунных клеток. Примерами таких модификаций являются модификации, которые нарушают систему секреции типа 3 или систему секреции типа 4 или другие гены или системы, влияющие на способность бактерии проникать в неиммунную клетку. Например, модификации включают разрушение/удаление компонента SPI-1, который необходим для инфицирования клеток, таких как эпителиальные клетки, но не влияет на инфицирование иммунных клеток, таких как фагоцитарные клетки, сальмонеллой.

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

Используемый здесь термин «модификация бактериального генома, или плазмиды, или гена» включает делеции, замены и вставки нуклеиновой кислоты.

В данном контексте РНК-интерференция представляет собой биологический процесс, при котором молекулы РНК ингибируют экспрессию или трансляцию гена путем нейтрализации целевых молекул mРНК для ингибирования трансляции и тем самым экспрессии гена-мишени.

Используемые здесь молекулы РНК, называются ингибирующими в силу того, что они подавляют экспрессию гена-мишени. Подавление экспрессии означает, что экспрессия гена-мишени снижена, или подавлена, или ингибирована.

Как используется в данном документе, сайленсинг генов с помощью РНКи считается ингибирующим, подавляющим, разрушающим или подавляющим экспрессию гена-мишени. Ген-мишень содержит последовательности нуклеотидов, которые соответствуют последовательностям ингибиторной РНК, при этом ингибиторная РНК подавляет экспрессию мРНК-мишени.

В данном контексте ингибирование, супрессия, разрушение или замалчивание гена-мишени относится к процессам, которые изменяют экспрессию, такую как трансляция, гена-мишени, в результате чего снижается активность или экспрессия продукта, кодируемого геном-мишенью. Восстановление включает полное или частичное нокаутирование, посредством чего проводится лечение иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе, и их введением.

Используемые здесь малые интерферирующие РНК (siРНК) представляют собой небольшие фрагменты двухцепочечной (ds) РНК, обычно длиной около 21 нуклеотида, с 3'-выступами (2 нуклеотида) на каждом конце, которые можно использовать для «интерференции» с трансляцией. белков путем связывания и стимуляции деградации матричной РНК (mРНК) в определенных последовательностях. При этом siRNAs предотвращают продукцию специфических белков на основе нуклеотидных последовательностей

соответствующих им mРНК. Этот процесс называется РНК-интерференцией (РНКi), а также упоминается как сайленсингsiРНК или нокдаун siРНК.

Используемый здесь термин «РНК с короткой шпилькой» или «РНК с малой шпилькой» (shРНК) представляет собой молекулу искусственной РНК с узким поворотом шпильки, которую можно использовать для подавления экспрессии гена-мишени с помощью РНК-интерференции (РНКi). Экспрессия shРНК в клетках обычно осуществляется путем доставки плазмид или с помощью вирусных или бактериальных векторов.

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

Используемый здесь термин «бактериофекция» относится к опосредованному бактериями переносу генов или плазмидной ДНК в эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих.

Используемые здесь интерфероны типа I человека (IFN) представляют собой подгруппу белков интерферона, которые регулируют активность иммунной системы. Все IFN типа I связываются со специфическими рецепторными комплексами клеточной поверхности, такими как рецептор IFN-α. Интерфероны типа I включают, среди прочих, IFN-α и IFN-β. Миелоидные клетки являются первичными продуцентами IFN-α и IFN-β, которые обладают противовирусной активностью и участвуют в основном во врожденных иммунных реакциях. Два типа IFN-β представляют собой IFN-β1 (IFNB1) и IFN-β3 (IFNB3).

Используемые здесь термины макрофагальный фенотип M1 и макрофагальный фенотип M2 относятся к двум широким группам, на которые делится фенотип макрофагов: M1 (классически активированные макрофаги) и M2 (альтернативно активированные макрофаги). Роль макрофагов M1 заключается в секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также в представлении антигенов, так что они участвуют в положительном иммунном ответе и функционируют как иммунный монитор. Основными провоспалительными цитокинами, которые они продуцируют, являются IL-6, IL-12 и TNF-альфа. Макрофаги M2 в первую очередь секретируют аргиназу-I, IL-10, TGF-β и другие противовоспалительные цитокины, которые уменьшают воспаление, способствуют росту опухоли и иммуносупрессивной функции. Макрофаг с M1-подобным фенотипом секретирует провоспалительные цитокины, и не обладает иммуносупрессивной активностью макрофага M2.

Превращение макрофага M2 в макрофаг с M1 или M1-подобным фенотипом превращает макрофаг M2 в макрофаг, который не является иммуносупрессивным, но участвует в противоопухолевом ответе. Макрофаг M2, который превращается в макрофаг с M1 или M1-подобным фенотипом, проявляет больше провоспалительных цитокинов/хемокинов и рецепторов, таких как CD80 и CCR7, и хемокинов, таких как IFNγ и CXCL10. Фенотипические маркеры M1 включают, но не ограничиваются ими, один или несколько из CD80, CD86, CD64, CD16 и CD32. Экспрессия синтазы оксида азота (iNOS) в M1 также может служить фенотипическим маркером. CD163 и CD206 являются основными маркерами для идентификации макрофагов M2. Другие поверхностные маркеры для клеток типа M2 также включают CD68.

Восстановление или удаление любого маркера M2, и увеличение уровня цетокинов/хемокинов, являющееся показателем макрофатов M1, отражают преобразование фенотипа M2 в фенотип M1 или M1-подобный. В приведенных ниже разделах и рабочих примерах, касающихся конверсии фенотипа M2 в M1-

подобный или M1, описаны иллюстративные цитокиновые профили и маркеры, которые индуцируются.

Как используется в данном документе, указание на то, что нуклеиновая кислота или кодируемая РНК нацелены на ген, означает, что она ингибирует, подавляет или подавляет экспрессию гена любым механизмом. Как правило, такая нуклеиновая кислота включает по меньшей мере часть, комплементарную гену-мишени, причем часть достаточна для образования гибрида с комплементарной частью.

Используемый в настоящем документе термин «делеция» применительно к последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида относится к делеции одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот по сравнению с последовательностью, такой как полинуклеотид-мишень или полипептид, нативный или дикий последовательность типов.

Используемый в настоящем документе термин «вставка» применительно к последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислоты описывает включение одного или нескольких дополнительных нуклеотидов или аминокислот в целевую, нативную, дикого типа или другую родственную последовательность. Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты, содержащая одну или несколько вставок по сравнению с последовательностью дикого типа, содержит один или несколько дополнительных нуклеотидов в пределах линейной длины последовательности.

Используемый здесь термин «дополнения» к последовательностям нуклеиновых кислот и аминокислот описывает добавление нуклеотидов или аминокислот к любому концу по сравнению с другой последовательностью.

Используемый здесь термин «замена» или «замещение» относится к замене одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот в последовательности нативной, целевой, дикого типа или другой нуклеиновой кислоты или полипептида альтернативным нуклеотидом или аминокислотой без изменения

длина (как описано в количестве нуклеотидов или остатков) молекулы. Таким образом, одна или несколько замен в молекуле не меняют количество нуклеотидов или аминокислотных остатков в молекуле. Аминокислотные замены по сравнению с конкретным полипептидом могут быть выражены с точки зрения количества аминокислотных остатков по длине полипептидной последовательности.

Используемый в настоящем документе термин «в положении, соответствующем» или указание на то, что положения нуклеотидов или аминокислот «соответствуют» положениям нуклеотидов или аминокислот в раскрытой последовательности, например, как указано в Перечне последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот, которые идентифицируют при сравнении с раскрытой последовательностью, чтобы максимизировать идентичность с использованием стандартного алгоритма сравнения, такого как алгоритм GAP. Сравнивая последовательности, специалист в данной области может идентифицировать соответствующие остатки, например, используя в качестве направляющих консервативные и идентичные аминокислотные остатки. Какправило, дляопределениясоответствующихположенийпоследовательностиаминокислотсравниваюттакимобразом, чтобыполучитьсоответствиенаивысшегопорядка (см., например,*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carrillo *et al.*(1988) *SIAMJ. AppliedMath* 48:1073).

В данном контексте сравнение последовательностей относится к использованию гомологии для сравнения двух или более последовательностей нуклеотидов или аминокислот. Как правило, две или более последовательностей, которые связаны на 50% или более идентичности,

сравнены (выравнены). Сравненный набор последовательностей относится к 2 или более последовательностям, сравненным в соответствующих положениях, и может включать выравнивающие последовательности, полученные из РНК, таких как EST и другие сДНК, выровненные с последовательностью геномной ДНК. Родственные или вариантные полипептиды или молекулы нуклеиновых кислот можно сравнивать (выравнивать) любым способом, известным специалистам в данной области.

Такие способы обычно максимизируют совпадения и включают такие способы, как использование ручного выравнивания и использование многочисленных доступных программ выравнивания (например, BLASTP) и других, известных специалистам в данной области. Выравнивая последовательности полипептидов или нуклеиновых кислот, специалист в данной области может идентифицировать аналогичные части или положения, используя в качестве направляющих консервативные и идентичные аминокислотные остатки. Кроме того, специалист в данной области также может использовать консервативные аминокислотные или нуклеотидные остатки в качестве ориентиров для поиска соответствующих аминокислотных или нуклеотидных остатков между человеческими и нечеловеческими последовательностями и среди них. Соответствующие положения также могут быть основаны на структурных выравниваниях, например, с помощью компьютерного моделирования выравниваний структуры белка. В других случаях могут быть идентифицированы соответствующие области.

Специалист в данной области также может использовать консервативные аминокислотные остатки в качестве направляющих для нахождения соответствующих аминокислотных остатков между человеческими и нечеловеческими последовательностями и среди них. Специалист в данной области также может использовать консервативные аминокислотные или нуклеотидные остатки в качестве ориентиров для нахождения соответствующих аминокислотных или нуклеотидных остатков между человеческими и нечеловеческими последовательностями и среди них. Соответствующие положения также могут быть основаны на структурных выравниваниях, например, с помощью компьютерного моделирования выравниваний структуры

белка. В других случаях могут быть идентифицированы соответствующие области.

Используемый здесь термин «свойство» полипептида, такого как антитело, относится к любому свойству, проявляемому полипептидом, включая, помимо прочего, специфичность связывания, структурную конфигурацию или конформацию, стабильность белка, устойчивость к протеолизу, конформационную стабильность. , термостойкость и устойчивость к условиям pH. Изменения свойств могут изменить «активность» полипептида. Например, изменение специфичности связывания полипептида антитела может изменить способность связывания антигена и/или различные активности связывания, такие как аффинность или авидность, или активности полипептида invivo.

Используемый здесь термин «активность» или «функциональная активность» полипептида, такого как антитело, относится к любой активности, проявляемой полипептидом. Такие действия могут быть определены эмпирически. Примеры активностей включают, но не ограничиваются ими, способность взаимодействовать с биомолекулой, например, посредством связывания антигена, связывания ДНК, связывания лиганда или димеризации, или ферментативную активность, например, киназную активность или протеолитическую активность. Для антитела (включая фрагменты антител) активность включает, помимо прочего, способность специфически связывать конкретный антиген, аффинность связывания антигена (например, высокая или низкая аффинность), авидность связывания антигена (например, высокая или низкая авидность), скорость включения, скорость диссоциации, эффекторные функции, такие как способность стимулировать нейтрализацию или клиренс антигена, нейтрализацию вируса, и активнсть*invivo*activities.

Активность можно оценивать invitro или invivo с использованием общепризнанных анализов, таких как ELISA, проточная цитометрия, поверхностный плазмонный резонанс или эквивалентные анализы для измерения скорости включения или выключения, иммуногистохимии и

иммунофлуоресцентной гистологии и микроскопии, клеточных анализов и анализы связывания (например, анализы пэннинга).

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

Используемый здесь термин «антитело» относится к иммуноглобулинам и фрагментам иммуноглобулинов, природным или частично или полностью синтетическим, таким как рекомбинантные, включая любой их фрагмент, содержащий по меньшей мере часть вариабельной области тяжелой цепи и легкой области молекулы иммуноглобулина, которые достаточны для образования антигенсвязывающего сайта и, при сборке, для специфического связывания антигена. Следовательно, антитело включает любой белок, имеющий связывающий домен, который гомологиченили по существугомологичен антигенсвязывающему домену иммуноглобулина (участок связывания антитела). Например, антитело относится к антителу, которое содержит две тяжелые цепи (которые могут быть обозначены как H и H') и две легкие цепи (которые могут быть обозначены как L и L'), и каждая легкая цепь может представлять собой полноразмерную легкую цепь или ее часть, достаточную для образования антигенсвязывающего сайта (например, легкие цепи включают, но не ограничиваются ими, цепи VL и цепи VL-CL) . Каждая тяжелая цепь (H и H') соединяется с одной легкой цепью (L и L' соответственно). Как правило, антитела минимально включают всю или по меньшей мере часть вариабельной области тяжелой (VH) цепи и/или вариабельной области легкой (VL) цепи. Антитело также может включать всю или часть константной области.

Для целей настоящего документа термин «антитело» включает полноразмерные антитела и их части, включая фрагменты антител, такие как фрагменты антител против CTLA-4. Фрагменты антител включают, но не ограничиваются ими, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')2-фрагменты, Fv-фрагменты, Fv с дисульфидной связью (dsFv), Fd-фрагменты, Fd'-фрагменты, одноцепочечные Fv (scFv), фрагменты scFv-Fc (в которых домен VH в scFv связан с Fc, таким как, например, FcIgG1 человека), одноцепочечные Fab (scFab), диатела, антиидиотипические (анти-Id) антитела или антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. Антитело также включает синтетические антитела, рекомбинантно полученные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие антитела, нечеловеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и интратела. Представленные здесь антитела включают представителей любого класса иммуноглобулинов (например, IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и IgY), любого подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса (например, ,IgG2a и IgG2b). Антитела для терапии человека обычно представляют собой человеческие антитела или являются гуманизированными.

Используемый здесь термин «фрагмент(ы) антитела» относится к (i) моновалентным и моноспецифическим производным антител, которые содержат вариабельные области тяжелой и/или легкой цепи или функциональные фрагменты антитела и не содержат Fc-части; и (ii) BiTEs® (тандемные scFv), DART, диатела и одноцепочечные диатела (scDb). Такимобразом, фрагментантителавключает a/an: Fab, Fab', scFab, scFv, scFv-Fc, фрагментFv, нанотело (см., например, антитела, полученныеиз Camelus bactriamus, Camelus dromedariusили Lama paccos) (см., например, патент США № 5759808 и Stijlemans и др. (2004) J. Biol. Chem.279:1256-1261), VHH, dAb(однодоменное антитело), минимальная единица распознавания, одноцепочечное диатело (scDb), BiTE® и DART. Указанные фрагменты антител имеют молекулярную массу ниже 60 кДа.

Используемый здесь термин «нуклеиновая кислота» относится по меньшей мере к двум связанным нуклеотидам или производным нуклеотидов, включая дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК), соединенных друг с другом, как правило, фосфодиэфирными связями. Также термин «нуклеиновая кислота» включает аналоги нуклеиновых кислот, такие как пептидная нуклеиновая кислота (ПНК), фосфоротиоатная ДНК и другие подобные аналоги и производные или их комбинации. Нуклеиновые кислоты также включают производные ДНК и РНК, содержащие, например, аналог нуклеотида или «каркасную» связь, отличную от фосфодиэфирной связи, например, фосфотриэфирную связь, фосфорамидатную связь, тиофосфатную связь, тиоэфирную связь или пептидную связь. связь (пептидная нуклеиновая кислота). Термин также включает эквиваленты, производные, варианты и аналоги РНК или ДНК, полученные из аналогов нуклеотидов. и одноцепочечные (смысловые или антисмысловые) и двухцепочечные нуклеиновые кислоты. Дезоксирибонуклеотиды включают дезоксиаденозин, дезоксицитидин, дезоксигуанозин и дезокситимидин. Для РНК основанием урацила является уридин.

Используемый здесь термин «изолированная молекула нуклеиновой кислоты» представляет собой молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, присутствующих в природном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. «Изолированная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может практически не содержать другого клеточного материала или культуральной среды при получении рекомбинантными методами или практически не содержать химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Типичные изолированные (выделенные) молекулы нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе, включают выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем документе.

Используемый здесь термин «функционально связанный» применительно к последовательностям, областям, элементам или доменам нуклеиновой кислоты

означает, что области нуклеиновой кислоты функционально связаны друг с другом. Это относится к сопоставлению, при котором описанные таким образом компоненты находятся в отношениях, позволяющих им функционировать предполагаемым образом. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор воздействует или влияет на ее транскрипцию или экспрессию. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая лидерный пептид, может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, посредством чего нуклеиновые кислоты могут транскрибироваться и транслироваться для экспрессии функционального слитого белка, при этом лидерный пептид влияет на секрецию слитого полипептида. В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая первый полипептид (например, лидерный пептид) функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, и нуклеиновые кислоты транскрибируются как единый транскрипт мРНК, но трансляция транскрипта мРНК может привести к экспрессии одного из двух полипептидов. Например, амбер-стоп-кодон может быть расположен между нуклеиновой кислотой, кодирующей первый полипептид, и нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, так что при введении в клетку с частичным амбер-супрессором полученный одиночный транскрипт мРНК может транслироваться с образованием либо слитого белка, содержащего первый и второй полипептиды, или может быть транслирован с получением только первого полипептида. В другом примере промотор может быть функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, при этом промотор регулирует или опосредует транскрипцию нуклеиновой кислоты.

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

В данном контексте остатки встречающихся в природе α-аминокислот представляют собой остатки тех 20 α-аминокислот, встречающихся в природе,

которые включаются в белок путем специфического узнавания заряженной молекулы tРНК с ее родственным кодоном mРНК у человека.

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

Используемый здесь термин «пептид» относится к полипептиду длиной от 2 до примерно или 40 аминокислот.

Используемый здесь термин «аминокислота» представляет собой органическое соединение, содержащее аминогруппу и группу карбоновой кислоты. Полипептид содержит две или более аминокислот. Для целей настоящего документа аминокислоты, содержащиеся в предоставленных антителах и иммуностимулирующих белках, включают двадцать встречающихся в природе аминокислот (см. Таблицу ниже), неприродные аминокислоты и аналоги аминокислот (например, аминокислоты, в которых α-углерод имеет боковая цепь). Используемые здесь аминокислоты, встречающиеся в различных аминокислотных последовательностях полипептидов, представленных здесь, идентифицируются в соответствии с их хорошо известными трехбуквенными или однобуквенными аббревиатурами (см. Таблицу ниже). Нуклеотиды, встречающиеся в различных молекулах и фрагментах нуклеиновых кислот, обозначаются стандартными однобуквенными обозначениями, обычно используемыми в данной области.

Используемый здесь термин «аминокислотный остаток» относится к аминокислоте, образованной при химическом расщеплении (гидролизе) полипептида в его пептидных связях. Аминокислотные остатки, описанные в настоящем документе, обычно находятся в L-изомерной форме. Остатки в изомерной форме «D» могут быть заменены любым остатком L-аминокислоты до тех пор, пока полипептид сохраняет желаемое функциональное свойство. NH2 относится к свободной аминогруппе, присутствующей на амино-конце полипептида. COOH относится к свободной карбоксигруппе,

присутствующей на карбоксильном конце полипептида. В соответствии со стандартной номенклатурой полипептидов, описанной в J. Biol. Chem., 243:3557-59 (1968) и принятый в 37 CFR §§ 1.821-1.822, сокращения для аминокислотных остатков показаны в следующей таблице:

Таблица соответствия

СИМВОЛ		
1-буквенный	**3-буквенный**	**АМИНОКИСЛОТА**
Y	Tyr	Тирозин
G	Gly	Глицин
F	Phe	Фенилаланин
M	Met	Метионин
A	Ala	Аланин
S	Ser	Серин
I	Ile	Изолейцин
L	Leu	Лейцин
T	Thr	Треонин
V	Val	Валин
P	Pro	Пролин
K	Lys	Лизин
H	His	Гистидин
Q	Gln	Глутамин
E	Glu	Глутамовая кислота
Z	Glx	Глутамовая кислота и/или глугамин
W	Trp	Триптофан
R	Arg	Аргинин
D	Asp	Аспарагиновая кислота
N	Asn	Аспарагин
B	Asx	Аспарагиновая кислота и/или аспарагин

СИМВОЛ		
C	Cys	Цистеин
X	Xaa	Неизвестный или другой

Все последовательности аминокислотных остатков, представленные здесь формулой, имеют ориентацию слева направо в обычном направлении от амино-конца к карбокси-концу. Фраза «аминокислотный остаток» включает аминокислоты, перечисленные в приведенной выше таблице соответствия, а также модифицированные, неприродные и необычные аминокислоты. Прочерк в начале или конце последовательности аминокислотных остатков указывает на пептидную связь с другой последовательностью одного или нескольких аминокислотных остатков, или с амино-концевой группой, такой как NH2, или с карбоксиконцевой группой, такой как COOH. .

Подходящие консервативные замены аминокислот в пептиде или белке известны специалистам в данной области и, как правило, могут быть выполнены без изменения биологической активности полученной молекулы. Специалистам в данной области известно, что, как правило, замены отдельных аминокислот в несущественных участках полипептида существенно не изменяют биологическую активность (см., например, Watsonetal., MolecularBiologyoftheGene, 4-е издание, 1987 г.). ,TheBenjamin/CummingsPub. Co., p. 224).

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

Примерыконсервативныхзаменаминокислот

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

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

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

Используемый здесь термин «неприродная аминокислота» относится к органическому соединению, которое имеет структуру, подобную природной аминокислоте, но структурно модифицировано для имитации структуры и

реакционной способности природной аминокислоты. Таким образом, не встречающиеся в природе аминокислоты включают, например, аминокислоты или аналоги аминокислот, отличных от 20 встречающихся в природе аминокислот, и включают, но не ограничиваются ими, D-стереоизомеры аминокислот. Примерынеприродныхаминокислотизвестныспециалистам в даннойобласти и включают, нонеограничиваютсяими, 2-аминоадипиновую кислоту (Aad), 3-аминоадипиновую кислоту (bAad), β-аланин/β-аминопропионовуюкислоту (Bala), 2-аминомаслянуюкислоту (Abu), 4-аминомаслянуюкислота/пиперидиновуюкислота (4Abu), 6-аминокапроновуюкислоту (Acp), 2-аминогептановуюкислоту (Ahe), 2-аминоизомаслянуюкислоту (Aib), 3- аминоизомаслянаякислота (Baib), N-метилвалин (MeVal), норвалин (Nva), норлейцин (Nle) и орнитин (Orn).

Используемый здесь термин «конструкция ДНК» представляет собой одно- или двухцепочечную, линейную или кольцевую молекулу ДНК, которая содержит сегменты ДНК, объединенные и расположенные рядом друг с другом способом, не встречающимся в природе. ДНК-конструкции существуют в результате манипуляций человека и включают клоны и другие копии манипулируемых молекул.

Используемый здесь термин «сегмент ДНК» представляет собой часть более крупной молекулы ДНК, обладающую определенными свойствами. Например, сегмент ДНК, кодирующий указанный полипептид, представляет собой часть более длинной молекулы ДНК, такую как плазмида или фрагмент плазмиды, который при прочтении в направлении от 5' к 3' кодирует последовательность аминокислот указанного полипептида.

Используемый здесь термин «полинуклеотид» означает одно- или двухцепочечный полимер дезоксирибонуклеотидов или оснований рибонуклеотидов, читаемый от 5'-конца к 3'-концу. Полинуклеотиды включают РНК и ДНК и могут быть выделены из природных источников, синтезированы invitro или получены из комбинации природных и синтетических молекул. Длина полинуклеотидной молекулы указана в настоящем описании в

единицах нуклеотидов (сокращенно «nt») или пар оснований (сокращенно «bp»). Термин нуклеотиды используется для обозначения одноцепочечных и двухцепочечных молекул, если позволяет контекст. Когда этот термин применяется к двухцепочечным молекулам, он используется для обозначения общей длины и будет пониматься как эквивалентный термину «пары оснований». Специалистам в данной области будет понятно, что две нити двухцепочечногополинуклеотида могут немного различаться по длине и что их концы могут располагаться в шахматном порядке; таким образом, все нуклеотиды в молекуле двухцепочечногополинуклеотида не могут быть спарены. Длина таких неспаренных концов обычно не превышает 20 нуклеотидов.

Используемый здесь термин «получение рекомбинантными методами» относится к использованию хорошо известных методов молекулярной биологии для экспрессии белков, кодируемых клонированной ДНК.

Используемый здесь термин «гетерологичная нуклеиновая кислота» представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую продукты (т.е. РНК и/или белки), которые обычно не продуцируются invivo клеткой, в которой она экспрессируется, или нуклеиновую кислоту, которая находится в локусе, в котором она экспрессируется, обычно он не встречается или опосредует или кодирует медиаторы, которые изменяют экспрессию эндогенной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, влияя на транскрипцию, трансляцию или другие регулируемые биохимические процессы. Гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, также называется чужеродной нуклеиновой кислотой. Любая нуклеиновая кислота, такая как ДНК, которую специалист в данной области может распознать или рассматривать как гетерологичную или чужеродную для клетки, в которой она экспрессируется, здесь охватывается гетерологичной нуклеиновой кислотой; гетерологичная нуклеиновая кислота включает экзогенно добавленную нуклеиновую кислоту, которая также экспрессируется эндогенно.

Примеры гетерологичной нуклеиновой кислоты в данном документе включают, но не ограничиваются ими, нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок сенсорного пути ДНК/РНК или его вариант с приобретением функции или конститутивно активный вариант, или иммуностимулирующий белок, такой как цитокин, хемокин или костимулирующая молекула, которая придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли. Также включены другие продукты, такие как антитела и их фрагменты, BiTE®, рецепторы-приманки, антагонистические полипептиды и РНКi, которые обеспечивают или способствуют противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли. В иммуностимулирующих бактериях гетерологичная нуклеиновая кислота обычно кодируется на введенной плазмиде, но она может быть введена в геном бактерии, например, в качестве промотора, который изменяет экспрессию бактериального продукта.

Используемый здесь термин «клеточная терапия» включает доставку клеток субъекту для лечения заболевания или состояния. Клетки, которые могут быть аллогенными или аутологичными для субъекта, модифицируют exvivo, например, путем инфицирования клеток иммуностимулирующими бактериями, предусмотренными в настоящем документе, так что они доставляют или экспрессируют продукты при введении субъекту.

Генетическая терапия, используемая в данном документе, включает перенос гетерологичной нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, в определенные клетки, такие как клетки-мишени, млекопитающего, в частности человека, с нарушением или состоянием, для которого требуется такая терапия. Нуклеиновую кислоту, такую как ДНК, вводят в выбранные клетки-мишени таким образом, чтобы гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, экспрессировалась, и продуцировался терапевтический продукт(ы), кодируемый(ие) таким образом. Генную терапию также можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей генный продукт, который заменяет дефектный ген или дополняет генный продукт, продуцируемый млекопитающим или клеткой, в которую он введен. Введенная нуклеиновая кислота может кодировать терапевтическое соединение, такое как фактор роста

или его ингибитор, или фактор некроза опухоли или его ингибитор, такой как его рецептор, который обычно не продуцируется в организме млекопитающего или который не продуцируется в терапевтически эффективных количествах или в терапевтически полезное время. Гетерологичная нуклеиновая кислота, такая как ДНК, кодирующая терапевтический продукт, может быть модифицирована перед введением в клетки больного хозяина для усиления или иного изменения продукта или его экспрессии. Генетическая терапия может также включать доставку ингибитора или репрессора или другого модулятора экспрессии генов.

Используемый здесь термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полипептиды продуцируются путем транскрипции и трансляции полинуклеотидов. Уровень экспрессии полипептида можно оценить с помощью любого метода, известного в данной области, включая, например, методы определения количества полипептида, продуцируемого из клетки-хозяина. Такие способы могут включать, но не ограничиваются ими, количественный анализ полипептида в лизате клеток с помощью ELISA, окрашивание кумасси синим после гель-электрофореза, анализ белка по Лоури и анализ белка по Бредфорду.

Используемый здесь термин «клетка-хозяин» представляет собой клетку, которую используют для получения, поддержания, воспроизведения и/или амплификации вектора. Клетка-хозяин также может быть использована для экспрессии полипептида, кодируемого вектором. Нуклеиновая кислота, содержащаяся в векторе, реплицируется при делении клетки-хозяина, тем самым амплифицируя нуклеиновую кислоту.

Используемый здесь термин «вектор» представляет собой реплицируемую нуклеиновую кислоту, из которой может экспрессироваться один или несколько гетерологичных белков при трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина. Ссылка на вектор включает те векторы, в которые может быть введена нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид или его фрагмент, обычно путем рестрикционного расщепления и лигирования. Ссылка на вектор также включает те векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую

полипептид, такой как модифицированное антитело против CTLA-4. Вектор используют для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в клетку-хозяина для амплификации нуклеиновой кислоты или для экспрессии/дисплея полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. Векторы обычно остаются эписомальными, но могут быть разработаны для осуществления интеграции гена или его части в хромосому генома. Также рассматриваются векторы, которые представляют собой искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы дрожжей и искусственные хромосомы млекопитающих. Выбор и использование таких носителей хорошо известны специалистам в данной области техники. Вектор также включает «вирусные векторы». Вирусные векторы представляют собой сконструированные вирусы, оперативно связанные с экзогенными генами для переноса (в качестве носителей или челноков) экзогенных генов в клетки.

Используемый здесь термин «вектор экспрессии» включает векторы, способные экспрессировать ДНК, оперативно связанную с регуляторными последовательностями, такими как промоторные области, которые способны осуществлять экспрессию таких фрагментов ДНК. Такие дополнительные сегменты могут включать последовательности промотора и терминатора и необязательно могут включать одно или несколько мест начала репликации, один или несколько селектируемых маркеров, энхансер, сигнал полиаденилирования и т.п. Векторы экспрессии обычно получают из плазмидной или вирусной ДНК или могут содержать элементы того и другого.

Таким образом, вектор экспрессии относится к конструкции рекомбинантной ДНК или РНК, такой как плазмида, фаг, рекомбинантный вирус или другой вектор, который при введении в соответствующую клетку-хозяина приводит к экспрессии клонированной ДНК.

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

Используемый здесь термин «идентичность последовательности» относится к числу идентичных или подобных аминокислот или нуклеотидных оснований при сравнении тестируемого и эталонного полипептида или полинуклеотида. Идентичность последовательностей можно определить путем выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот или белков для выявления областей сходства или идентичности. Для целей настоящего документа идентичность последовательностей обычно определяют путем выравнивания для идентификации идентичных остатков.

Выравнивание может быть локальным или глобальным. Совпадения, несовпадения и пробелы могут быть идентифицированы между сравниваемыми последовательностями. Пробелы представляют собой нулевые аминокислоты или нуклеотиды, вставленные между остатками выравниваемых последовательностей, так что идентичные или похожие символы выровнены. Как правило, могут быть внутренние и конечные зазоры. При использовании штрафов за пробелы идентичность последовательности может быть определена без штрафа за конечные пробелы (например, терминальные пробелы не штрафуются). В качестве альтернативы идентичность последовательности можно определить без учета пробелов, как количество идентичных позиций/длина общей выровненной последовательности x 100.

Как используется в данном документе, «глобальное выравнивание» представляет собой выравнивание, которое выравнивает две последовательности от начала до конца, выравнивая каждую букву в каждой последовательности только один раз. Выравнивание производится независимо от того, есть ли сходство или идентичность между последовательностями. Например, 50% идентичность последовательностей, основанная на «глобальном выравнивании», означает, что при выравнивании полной последовательности двух сравниваемых последовательностей, каждая из которых имеет длину 100 нуклеотидов, 50 % остатков совпадают.

Понятно, что глобальное выравнивание также можно использовать для определения идентичности последовательностей, даже если длина выровненных

последовательностей не одинакова. Различия в терминальных концах последовательностей будут учитываться при определении идентичности последовательностей, если только не будет выбрано «без штрафа за концевые промежутки». В целом, глобальное выравнивание используется для последовательностей, которые имеют значительное сходство на большей части своей длины.

Примеры алгоритмов для выполнения глобального выравнивания включают алгоритм Needleman-Wunsch (Needlemanetal. (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453). Примеры программ для выполнения глобального выравнивания являются общедоступными и включают инструмент глобального выравнивания последовательностей, доступный на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (ncbi.nlm.nih.gov/), и программу, доступную по адресу deepc2.psi.iastate. edu/aat/align/align.html.

Как используется в данном документе, «локальное выравнивание» представляет собой выравнивание, которое выравнивает две последовательности, но выравнивает только те части последовательностей, которые имеют сходство или идентичность.

Следовательно, локальное выравнивание определяет, присутствуют ли подсегменты одной последовательности в другой последовательности. Если нет сходства, выравнивание не будет возвращено. Алгоритмы локального выравнивания включают BLAST или алгоритм Смита-Уотермана (Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)). Например, 50-процентная идентичность последовательности, основанная на «локальном выравнивании», означает, что при выравнивании полной последовательности двух сравниваемых последовательностей любой длины область сходства или идентичности длиной 100 нуклеотидов имеет 50 % остатков, которые являются такими же в отношении сходства или тождества.

Для целей настоящего документа идентичность последовательности может быть определена с помощью стандартных программ алгоритма выравнивания,

используемых по умолчанию со штрафами за пробелы, установленными каждым поставщиком. Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать: (1) матрицу сравнения (содержащая значение 1 для тождеств и 0 для неидентичностей) и взвешенную матрицу сравнения Грибскова и др. (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745-6763, какописано Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp.353-358 (1979); (2) штраф 3,0 закаждыйпробел и дополнительныйштраф 0,10 закаждыйсимвол в каждомпробеле; и (3) отсутствиештрафазаконцевыепромежутки.

Имеют ли какие-либо две молекулы нуклеиновых кислот нуклеотидные последовательности или любые два полипептида имеют аминокислотные последовательности, которые по крайней мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% «идентичны», или другие подобные варианты, определяющие процентную идентичность, может быть определено с использованием известных компьютерных алгоритмов, основанных на локальном или глобальном выравнивании (см., например, wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software, где имеется предоставление ссылок на десятки известных и общедоступных баз данных и программ выравнивания).

Как правило, для целей настоящего документа идентичность последовательности определяется с использованием компьютерных алгоритмов, основанных на глобальном выравнивании, таких как инструмент Needleman-WunschGlobalSequenceAlignment, доступный в NCBI/BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE =BlastHome); LAlign (WilliamPearson, реализующий алгоритм Хуанга и Миллера (Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357)); и программа от XiaoquiHuang, доступная по адресу deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

Как правило, полноразмерная последовательность каждого из сравниваемых полипептидов или нуклеотидов выравнивается по всей длине каждой последовательности в глобальном выравнивании. Локальное выравнивание

также можно использовать, когда сравниваемые последовательности имеют по существу одинаковую длину.

Таким образом, используемый в настоящем документе термин «идентичность» представляет собой сравнение или сопоставление между тестируемым и эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В одном неограничивающем примере выражение «по меньшей мере на 90% идентично» относится к проценту идентичности от 90% до 100% относительно эталонного полипептида или полинуклеотида. Идентичность на уровне 90 % и более свидетельствует о том, что, принимая в качестве примера сравниваемые тестируемый и эталонный полипептид или полинуклеотид длиной 100 аминокислот или нуклеотидов, не более 10 % (т. е. 10 из 100) аминокислот или нуклеотидов в тестируемом полипептиде или полинуклеотиде отличаются от таковых в эталонном полипептиде или полинуклеотиде. Аналогичные сравнения можно провести между тестируемым и эталонным полинуклеотидом. Такие различия можно представить в виде точечных мутаций, случайным образом распределенных по всей длине аминокислотной последовательности, или они могут быть сгруппированы в одном или нескольких местах различной длины вплоть до максимально допустимого, например, 10/100 различий аминокислот (приблизительно 90% идентичности). Различия также могут быть связаны с делециями или укорочениями аминокислотных остатков. Различия определяются как замены, вставки или делеции нуклеиновых кислот или аминокислот. В зависимости от длины сравниваемых последовательностей, при уровне гомологии или идентичности выше примерно 85-90% результат может не зависеть от программы и установленных параметров гэпа; такие высокие уровни идентичности можно легко оценить, часто не полагаясь на программное обеспечение.

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

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

Используемый здесь термин «лечение» относится к любым эффектам, которые облегчают симптомы заболевания или расстройства. Лечение включает профилактику, терапию и/или обработку.

Лечение также включает любое фармацевтическое применение любых иммуностимулирующих бактерий или композиций, предложенных в настоящем документе.

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

Используемый здесь термин «профилактика» или его грамматически эквивалентные формы относятся к методам, при которых снижается риск или вероятность развития заболевания или состояния.

Используемый здесь термин «фармацевтически эффективный агент» включает любой терапевтический агент или биоактивный агент, включая, помимо прочего, например, анестетики, сосудосуживающие средства, диспергирующие агенты и обычные терапевтические лекарственные средства, включая низкомолекулярные лекарственные средства и терапевтические белки.

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

Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, которое по крайней мере достаточно для оказания терапевтического эффекта после введения

субъекту. Следовательно, это количество, необходимое для предотвращения, лечения, облегчения, купирования или частичного купирования симптома болезни или расстройства.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтическая эффективность» относится к способности агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, оказывать терапевтическое действие на субъекта, которому был введен агент, соединение, материал или композиция, содержащая соединение. .

Используемый здесь термин «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная доза» относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, которое при введении субъекту будет иметь предполагаемый профилактический эффект, например , предотвращение или отсрочка возникновения или рецидива заболевания или симптомов, снижение вероятности возникновения или рецидива заболевания или симптомов или снижение частоты вирусной инфекции. Полный профилактический эффект не обязательно достигается при введении одной дозы и может наступить только после введения серии доз. Таким образом, профилактически эффективное количество можно вводить за один или несколько приемов.

Используемый здесь термин «улучшение симптомов конкретного заболевания или расстройства с помощью лечения, такого как введение фармацевтической композиции или другого терапевтического средства», относится к любому ослаблению, постоянному или временному, длительному или преходящему, симптомов, которое может быть отнесены к или связаны с введением композиции или терапевтического средства.

Используемый здесь термин «противораковое средство» или «противораковое терапевтическое средство» относится к любому средству или терапевтическому

средству, которое является разрушительным или токсичным, прямо или косвенно, для злокачественных клеток и тканей. Например, противораковые агенты включают агенты, которые убивают раковые клетки или иным образом ингибируют или нарушают рост опухолей или раковых клеток.

Примерами противораковых средств являются химиотерапевтические средства и иммунотерапевтические средства.

Используемый здесь термин «улучшение симптомов конкретного заболевания или расстройства с помощью лечения, такого как введение фармацевтической композиции или другого терапевтического средства», относится к любому ослаблению, постоянному или временному, длительному или преходящему, симптомов, которое может быть отнесены к или связаны с введением композиции или терапевтического средства.

Используемый здесь термин «противораковое средство» или «противораковое терапевтическое средство» относится к любому средству или терапевтическому средству, которое является разрушительным или токсичным, прямо или косвенно, для злокачественных клеток и тканей. Например, противораковые агенты включают агенты, которые убивают раковые клетки или иным образом ингибируют или нарушают рост опухолей или раковых клеток.

Примерами противораковых средств являются химиотерапевтические средства и иммунотерапевтические средства.

Используемый здесь термин «терапевтическая активность» относится к активности invivo терапевтического продукта, такого как полипептид, молекула нуклеиновой кислоты и др.терапевтические молекулы. Как правило, терапевтическая активность представляет собой активность, связанную с лечением заболевания или состояния.

Используемый здесь термин «субъект» относится к животному, включая млекопитающее, такое как человек.

Используемый здесь термин «пациент» относится к субъекту-человеку.

Используемый здесь термин «животное» включает любое животное, такое как, но не ограничиваясь этим, приматы, в том числе люди, гориллы и обезьяны; грызуны, такие как мыши и крысы; домашняя птица, такая как цыплята; жвачные животные, такие как козы, коровы, олени и овцы; и свиней и других животных. Нечеловеческие животные исключают человека как предполагаемое животное. Предлагаемые здесь полипептиды происходят из любого источника, животного, растительного, прокариотического или грибкового. Большинство полипептидов имеют животное происхождение, включая происхождение от млекопитающих.

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

Используемый здесь термин «комбинация» относится к любой связи между двумя или более элементами. Комбинация может состоять из двух или более отдельных предметов, например, двух композиций или двух коллекций, их смеси, например, единой смеси двух или более предметов, или любого их варианта. Элементы комбинации обычно функционально связаны или родственны.

Используемый здесь термин «комбинированная терапия» относится к введению двух или более различных терапевтических средств. Различные терапевтические агенты могут быть предоставлены и введены по отдельности, последовательно, с перерывами или могут быть предоставлены в виде одной композиции.

Используемый здесь термин «набор» представляет собой упакованную комбинацию, которая (необязательно) включает другие элементы, такие как дополнительные реагенты и инструкции по применению комбинации или ее элементов, с целью, включающей, помимо прочего, активацию, введение, диагностику и оценка биологической активности или свойства.

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

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

Используемый здесь термин «многодозовый состав» относится к составу, который содержит несколько доз терапевтического средства и который можно вводить непосредственно для получения нескольких однократных доз терапевтического средства. Дозы можно вводить в течение минут, часов, недель, дней или месяцев. Составы с несколькими дозами могут позволить регулировать дозу, объединять дозы и/или делить дозу. Поскольку составы с несколькими дозами используются с течением времени, они обычно содержат один или несколько консервантов для предотвращения роста микробов.

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

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

Используемый здесь термин «выделенный или очищенный полипептид или белок (например, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) или его биологически активная часть (например, выделенный антигенсвязывающий фрагмент) практически не содержит клеточного материала или другого загрязняющие белки из клетки или ткани, из которых получены полипептид или белок, или по существу свободные от химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Препараты можно считать практически свободными, если они не

содержат легко обнаруживаемых примесей, что определяется стандартными методами анализа, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ),в которых используется умение в данной области оценить такую чистоту, или являются достаточно чистыми, так что дальнейшая очистка не приводит к заметному изменению физических и химических свойств, таких как ферментативная и биологическая активность вещества.

Способы очистки соединений для получения по существу химически чистых соединений известны специалистам в данной области. Однако по существу химически чистое соединение может представлять собой смесь стереоизомеров. В таких случаях дальнейшая очистка может повысить удельную активность соединения.

Используемый здесь термин «клеточный экстракт» или «лизат» относится к препарату или фракции, полученной из лизированной или разрушенной клетки.

Используемый в настоящем документе термин «контроль» относится к образцу, который по существу идентичен тестируемому образцу, за исключением того, что он не обработан тестируемым параметром, или, если это образец плазмы, он может быть получен от здорового добровольца, не подвергшегося воздействию. с условием интереса. Контроль также может быть внутренним контролем.

Используемые здесь формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на полипептид, содержащий «домен иммуноглобулина», включает полипептиды с одним или несколькими доменами иммуноглобулина.

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

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

Используемый здесь термин «необязательный» или «необязательно» означает, что описанное впоследствии событие или обстоятельство происходит или не происходит, и что описание включает случаи, когда указанное событие или обстоятельство имеет место, и случаи, когда они не происходят. Например, необязательно вариантная часть означает, что часть является вариантной или невариантной.

Используемые здесь сокращения для любых защитных групп, аминокислот и других соединений являются, если не указано иное, в соответствии с их обычным использованием, признанными сокращениями или Комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре (см. Biochem. (1972)). 11(9):1726-1732).

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

B. ОБЗОР ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Признание того, что бактерии обладают противораковой активностью, восходит к 1800-м годам, когда несколько врачей наблюдали регрессию опухолей у пациентов, инфицированных Streptococcuspyogenes. Уильям Коли начал первое исследование с использованием бактерий для лечения рака на последней стадии и разработал вакцину, состоящую из S. pyogenes и Serratiamarcescens, которая успешно использовалась для лечения различных видов рака, включая саркомы, карциномы, лимфомы и меланомы. С техпоррядвидовбактерий, в томчисле Clostridium, Mycobacterium, Bifidobacterium, Listeria monocytogenes и Escherichia, изучались в качествеисточниковпротивораковыхвакцин (см., например, публикациимеждународныхзаявок PCT №№ WO 1999/013053 и WO

2001/). 025399; Bermudes et al. (2002) Curr. Opin. Drug Discov. Devel.5:194-199; Patyar*et al.* (2010) *Journal of Biomedical Science* 17:21; and Pawlek*et al.* (2003) *Lancet Oncol.* 4:548-556).

В качестве терапевтической платформы бактерии имеют ряд преимуществ перед другими методами лечения, такими как онколитические вирусы. Некоторые виды бактерий можно сконструировать для перорального и системного (внутривенно; в/в) введения, они легко размножаются invitro и invivo, их можно хранить и транспортировать в лиофилизированном состоянии.

Бактериальные хромосомы легко поддаются манипуляциям, поскольку в них отсутствуют экзоны, а полные геномы многочисленных штаммов полностью охарактеризованы (Felgneretal. (2016) mBio 7(5):e01220-16). Многие типы бактерий дешевле и проще в производстве, чем вирусы, и надлежащая доставка сконструированных бактерий может быть предпочтительнее доставки вирусов, поскольку они не интегрируются постоянно в геномы клеток-хозяев, они предпочтительно заражают миелоидные клетки, а не эпителиальные клетки, и их можно быстро уничтожить. при необходимости устраняются антибиотиками, что делает их безопасными.

В данном документе представлены иммуностимулирующие бактерии, которые модифицированы для использования этих преимущественных свойств. Представленные здесь бактерии модифицированы таким образом, что они инфицируют и накапливаются в микроокружении опухоли, в частности, в резидентных опухолевых иммунных клетках (миелоидных клетках), таких как опухолеассоциированные макрофаги (ТАМ), дендритные клетки (ДК) и миелоидные супрессорные клетки. клетки (MDSC), а также предназначены для экспрессии и доставки высоких уровней терапевтических белков и их комбинаций, особенно комплементарных комбинаций. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии обладают полезными свойствами, которые

превосходят существующие бактериальные методы лечения, а также клеточные методы лечения, методы лечения онколитическими вирусами и предшествующие бактериальные методы лечения. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии, хотя их можно вводить любым подходящим путем, подходят для системного, например внутривенного, введения. Как показано и описано в настоящем документе, иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, могут воздействовать на основные иммунные пути.

Бактерии, представленные в настоящем документе, разработаны и сконструированы таким образом, чтобы поддерживать полезные свойства бактерий и иметь вирусоподобную иммунную сигнатуру. Это выгодно для использования в качестве противоракового терапевтического средства. В следующей таблице приведены некоторые иммунные и основные свойства бактерий и вирусов; предложенные здесь иммуностимулирующие бактерии сохраняют возможность использования бактериального каркаса, но приводят к вирусоподобному иммунному ответу у субъекта, получающего лечение (более подробно обсуждается в разделе С ниже).

	Бактерии	**Вирусы**	**Иммуностимулирующие бактерии, представленные здесь**
Осуществимость построения терапевтики	Легкость изготовления; стабильность; легкость конструирования; обратимость с антибиотиками;	Трудность изготовления; требуют -80 °Сдляхранения; могут быть трудности при конструировании; иммуногенны;	Сконструированы для сохранения и улучшения свойств осуществимости

	не иммуногенны	комплемент может инактивироваться	
Воспалительный профиль	РаспознаютсяTLR2, TLR4, иTLR5; Нижерасположенные мишени подавляют адаптивный иммунитет	Recognized by TLR3, TLR7/8, and STING; Downstream targets promote adaptive immunity	Сконструированы для получения вирусоподобного иммунного ответа
Градиенты хемоконов	Привлекают нейтрофилы для для очистки от инфекции	Привлекают Т-клетки для очистки от инфекции	
Создание прочного иммунитета	Нет	Да, но только к вирусам	

У видов Salmonella и других видов бактерий флагеллы способствуют воспалению, опосредованному TRL5, LPS приводит к воспалительным реакциям, опосредованным TLR4, а адгезивные фимбрии приводят к воспалительным реакциям, опосредованным TLR2. Геномы иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, модифицированы таким образом, что у бактерий отсутствуют флагеллы и адгезивные фимбрии, и они содержат модифицированный LPS, что приводит к уменьшению или устранению опосредованных TLR4 воспалительных реакций.

В результате предложенные здесь иммуностимулирующие бактерии индуцируют вирусоподобный противоопухолевый иммунный ответ. Исключение или модификация этих компонентов придает другие полезные свойства, такие как те, которые подробно обсуждаются ниже. Иммуностимулирующие бактерии доставляют терапевтические

продукты, такие как противораковые терапевтические средства и, в частности, взаимодополняющие сочетания продуктов. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии доставляют закодированные генетические полезные нагрузки опухолеспецифическим образом к резидентным в опухоли миелоидным клеткам.

Предложен противораковый терапевтический продукт, иммуностимулирующая бактерия, которая доставляет генетическую полезную нагрузку, кодирующую один или несколько терапевтических продуктов. Включена укороченная костимулирующая молекула (рецептор или лиганд; например, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1, OX40L) с полной или частичной делецией цитоплазматического домена для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC), где продукт укороченного гена способен осуществлять конститутивную иммуностимулирующую передачу сигнала Т-клетке за счет участия костимулирующего рецептора и не способен передавать контррегуляторный сигнал APC из-за укороченного или делетированного цитоплазматического домена.

Иммуностимулирующие бактерии могут также экспрессировать один или более из IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-12, IL-15, IL-15/IL-15Rαкомплекс, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, интерферон-α, интерферон-β, IL-2 который имеет ослабленное присоединение к IL-2Ra, IL-2 который модифицирован так, что он не присоединяется к IL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, цитозольные сенсоры ДНК/РНКили белки пути INF типа 1, такие как с приобретением функции или конститутивно активные STING, IRF3, IRF7, MDA5, или варианты RIG-I (которые индуцируют IFN типа 1), ингибиторыTGF-бета, такие как TGF-βингибиторные антитела, TGF-бетаполипептида антагонисты, ирецепторы приманки TGF-бета присоединения , антитела и их фрагменты, и другие противораковые мишени, такие как VEGFиIL-6, костимулирующие рецепторы/молекуты, такие как 4-1BBL,

включая 4-1BBLc цитоплазматическим доментом удаленным или укороченным и другие.

Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать и экспрессировать укороченную костимулирующую молекулу (например, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1, OX40L) с частичной или полной делецией цитоплазматического домена для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке. APC), где продукт укороченного гена способен осуществлять конститутивную иммуностимулирующую передачу сигнала Т-клетке за счет взаимодействия с костимулирующим рецептором и не может передавать контррегуляторный сигнал APC из-за делеции или укорочения цитоплазматического домена. Комбинации таких терапевтических продуктов и агентов могут быть выражены в одной терапевтической композиции. В силу модификаций бактериального генома иммуностимулирующие бактерии проявляют опухолеспецифическую локализацию и обогащение,

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии генетически сконструированы так, чтобы быть безопасными и нацеливаться на опухоли, микроокружение опухоли и/или иммунные клетки, резидентные в опухоли. Иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные в настоящем документе, включают комбинацию геномных модификаций и других модификаций, а также кодированные терапевтические продукты, которые функционируют совместно, обеспечивая иммуностимулирующие бактерии, которые накапливаются в резидентных в опухоли иммунных клетках и которые сохраняются достаточно долго для доставки терапевтических продуктов, в частности, комбинации которые индуцируют или стимулируют противораковую иммунную стимуляцию в опухолях и микроокружении опухоли без токсических побочных эффектов или с ограниченными токсическими побочными эффектами.

При системной доставке, такой как внутривенная (IV), иммуностимулирующие бактерии накапливаются в опухолях, в том числе в метастатических поражениях; они обеспечивают эффективную генетическую передачу иммунных полезных нагрузок, в частности, миелоидным клеткам, резидентным

в опухоли, включая ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM), супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и дендритные клетки (ДК); они вызывают мощные локальные иммунные реакции, уничтожая опухоли и защищая от будущих рецидивов; и, когда терапия завершена, они естественным образом устраняются, например, путем фагоцитоза и разрушения инфицированными клетками, или их можно быстро уничтожить курсом антибиотиков.

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии проявляют преимущественное накопление в микроокружении опухоли и/или в резидентных опухолевых иммунных клетках благодаря разработанной пурин/аденозиновойауксотрофии и проявляют неспособность к репликации внутри фагоцитирующих клеток. Иммуностимулирующие бактерии, которые избегают инактивации комплементом сыворотки, обеспечивают доставку различных иммунотерапевтических агентов и терапевтических продуктов в высоких концентрациях непосредственно в микроокружение опухоли, минимизируя при этом токсичность для нормальных тканей, и представлены в настоящем документе.

Например, как более подробно описано в разделе C.8., представленные здесь иммуностимулирующие бактерии включают модификации генома, которые превращают их в msbB-/pagP-, что изменяет липид A в LPS, что приводит к пентаацилированию (дикий липид типа A имеет 6-7 цепей жирных кислот), снижая сродство к TLR4; являются ауксотрофамиаденонзина/аденина, такими как purI-; аспарагиназаII- (ansB-), улучшающая качество Т-клеток; являются csgD-, и включают другие необязательные геномные модификации, такие как вставки, делеции, разрывы и любые другие модификации, так что кодируемый(е) продукт(ы) не продуцируется(ются) в активной форме, как подробно обсуждается в данном документе. Иммуностимулирующие бактерии включают плазмиду, кодирующую один или несколько терапевтических продуктов, в частности, противораковые продукты,

Предусмотренные здесь иммуностимулирующие бактерии, которые доставляют терапевтические продукты (такие как конститутивно активные варианты STING и другие иммуномодулирующие белки и продукты) в резидентные опухолевые миелоидные клетки, способствуют адаптивному иммунитету и усиливают функцию Т-клеток. Иммуностимулирующие бактерии приводят к полному ремоделированиюиммуносупрессивного микроокружения опухоли в сторону адаптивного противоопухолевого фенотипа и отхода от бактериального фенотипа, который характеризуется усилением врожденного иммунитета и подавлением адаптивного иммунитета.

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии включают геномные модификации, посредством которых они нацеливаются или накапливаются в резидентных в опухоли иммунных клетках, в частности, в резидентных опухолевых миелоидных клетках, таких как макрофаги, MDSC (супрессорные клетки миелоидного происхождения) и DC (дендритные клетки), в которые они доставляют полезные нагрузки закодированных терапевтических продуктов, экспрессируемых под контролем регуляторных последовательностей, распознаваемых механизмом транскрипции/трансляции шланговых клеток (эукариот). Кодируемые продукты экспрессируются в миелоидных клетках и при необходимости доставляются в микроокружение опухоли. Бактерии генерируют противоопухолевый иммунитет, а также могут доставлять противоопухолевые продукты, которые непосредственно лечат опухоли, и продукты, которые могут активировать пролекарства.

Иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, могут демонстрировать по меньшей мере примерно в 100000 раз большую инфильтрацию и обогащение опухоли по сравнению с немодифицированными бактериями. Иммуностимулирующие бактерии потребляются резидентными опухолевыми иммунными клетками и доставляют плазмиды, кодирующие терапевтические продукты, которые экспрессируются и продуцируются в

иммунных клетках и микроокружении опухоли для создания противоопухолевого иммунитета.

1. Бактериальная раковая иммунотерапия.

Многие типы солидных опухолей развивают сильно иммуносупрессивную микросреду, которая делает их крайне невосприимчивыми к утвержденным методам лечения контрольных точек, таким как лечение анти-CTLA-4, анти-PD-1 и анти-PD-L1. Одним из механизмов, с помощью которого опухоли развили устойчивость к терапии контрольных точек, является отсутствие в них внутриопухолевых Т-клеток и перекрестно презентирующих опухолевые антигены дендритных клеток (ДК), описываемых как исключенные Т-клетки, невоспаленные или «холодные опухоли» (Sharma и др. (2017) Cell 168(4):707-723). Для небольшого числа пациентов опухоли которых являются воспаленнми Т-клетками, и реагируют на иммунотерапию контрольных точек, они часто испытывают тяжелую аутоиммунную токсичность, и многие из них в конечном итоге рецидивируют и становятся рефрактерными к контрольным точкам (см., например, Buchbinderetal. (2015) J. Clin. Invest. 125: 3377-3383; Hodi et al. (2010) N.Engl.J.Med.363(8):711-723 и Chen et al.(2015) J.Clin.Invest.125:3384-3391).

Опухоли инициируют многочисленные механизмы уклонения от иммунного надзора, перепрограммирования противоопухолевых иммунных клеток для подавления иммунитета, исключения и инактивации противоопухолевых Т-клеток и развития резистентности к таргетным методам лечения рака (см., например, Mahoneyetal. (2015)). Nat.Rev.DrugDiscov.14(8):561-584). Решение этой проблемы потребует иммунотерапии, которая может должным образом воспалить эти опухоли и создать противоопухолевый иммунитет, который может обеспечить длительную регрессию опухоли. Кроме того, внутриопухолевая терапия трудноизлечима и будет весьма ограничена в условиях метастатического заболевания.

Необходимы системные методы лечения, которые должным образом воспаляют каждое отдельное метастатическое поражение и преодолевают множественные пути иммуносупрессии. Благодаря своей способности целенаправленно

воздействовать на иммунные клетки, резидентные в опухоли, и экспрессировать несколько комплементарных генетических полезных нагрузок/терапевтических продуктов, иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, предназначены для решения этих проблем.

2. Предыдущие методы лечения, нацеленные на микроокружение опухоли

Был разработан ряд методов лечения, нацеленных на микроокружение опухоли (TME) и пытающихся повысить противоопухолевый иммунитет. Каждый из них имеет свои собственные проблемы и недостатки, которые решаются с помощью представленных здесь иммуностимулирующих бактерий.

а. Ограничения терапии аутологичными Т-клетками

Несколько системно применяемых терапевтических платформ были клинически исследованы с целью доступа к высокоиммуносупрессивному микроокружению опухоли и индукции надлежащих иммунных реакций для воспаления опухолей и повышения противоопухолевого иммунитета.

Эти платформы включают химерные антигенные рецепторы Т-клеток (CAR-Т-клетки), которые получают путем сбора Т-клеток у пациентов и их реинжиниринга для слияния Т-клеточного рецептора с вариабельным внеклеточным доменом антитела Ig, специфичным для антигена конкретной опухоли. Это придает клеткам свойства распознавания антигена антител с цитолитическими свойствами активированных Т-клеток (см., например, Sadelainetal. (2015) J. Clin. Invest. 125(9):3392-3400).

Несмотря на перспективность и потенциал этой технологии, такие как одобрение FDACD19 CAR-Tstisagenlecleucel (например, под торговой маркой Kymriah®) и axicabtageneciloleucel (под торговой маркой Yescarta®), успех был ограничен CD19+ $^{+}$гематопоэтическими злокачественными новообразованиями и ценой смертельных побочных эффектов, связанных с иммунитетом (см., например, Jacksonetal. (2016) Nat. Rev. Clin. Oncol.13(6):370-383). Опухоли могут быстро мутировать, подавляя опухолевые антигены-мишени для

солидных опухолей, включая антиген CD19, тем самым способствуя ускользанию от иммунного ответа (см., например, Mardianaetal. (2019) Sci. Transl. Med.11(495):eaaw2293).

Не существует платформы опухолеспецифических антигенов-мишеней. Солидные опухолевые мишени, которые не экспрессируются в здоровых тканях, являются основным препятствием для терапии CAR-T. Помимо этого, терапия CAR-T страдает от других препятствий для доступа к микроокружению солидных опухолей из-за отсутствия достаточных градиентов хемокинов Т-клеток, которые необходимы для правильной инфильтрации Т-клеток в опухоли. Кроме того, как только они инфильтрируют опухоль, они быстро инактивируются (см., например, Brown*etal.* (2019) *Nat. Rev. Immunol.* 19(2):73-74). Если безопасность CAR-T-клеток будет значительно улучшена, а эффективность будет расширена на солидные опухоли, осуществимость и затраты, связанные с этими трудоемкими методами лечения, по-прежнему будут ограничивать их более широкое применение.

b. Платформы вирусных вакцин

Онколитические вирусы (OV) обладают естественными и искусственными свойствами вызывать лизис опухолевых клеток, рекрутировать Т-клетки в опухоль и доставлять генетический материал, который может быть прочитан опухолевыми клетками для производства иммуномодулирующих белков. Например, онколитический вирус, обозначенный как Talimogenelaherparepvec (T-VEC), представляет собой модифицированный вирус простого герпеса, кодирующий антигены против меланомы и цитокин GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий факт Он одобрен FDA для лечения метастатической меланомы (см., например, Bastinetal. (2016) Biomedicines 4(3):21). T-VEC продемонстрировал клиническую пользу для некоторых пациентов с меланомой и с меньшей иммунотоксичностью, чем антитела иммунных контрольных точек или одобренные FDA системные цитокины, такие как IL-2 и интерферон-альфа (см., например, Kimetal. (2006). *CytokineGrowthFactorRev.* 17(5):349-366; и Paul*etal.* (2015) *Gene*567(2):132-137),

Онколитические вирусы (OB) обладают рядом ограничений в качестве противораковой терапии. Во-первых, онколитические вирусы быстро инактивируются человеческим комплементом системы в крови. Было доказано, что путем системного введения трудно доставить достаточное количество вируса для получения желаемого терапевтического эффекта. Внутриопухолевое введение ограничено при метастазах (когда очаги распространяются по всему телу), неизлечимо для большинства типов солидных опухолей (например, поражений легких и внутренних органов) и требует интервенционной радиологии под контролем для инъекций, что ограничивает повторные дозы.

Вирусы трудно производить в промышленных масштабах и хранить. Большинство вакцин на основе OV, таких как вакцины на основе парамиксовируса, реовируса и пикорнавируса, имеют аналогичные ограничения (см., например, Chioccaetal. (2014) CancerImmunol. Res.2(4):295-300). Онколитические вирусы по своей природе иммуногенны и быстро выводятся из крови человека. Т-клетки, которые перемещаются в опухоль, обладают гораздо более высокой аффинностью к вирусным антигенам по сравнению с более слабыми опухолевыми неоантигенами (см., например, Aleksicetal. (2012) Eur. J. Immunol. 42(12):3174-3179). Таким образом, в дополнение к признанным техническим ограничениям платформы, OV пока обладают ограниченной способностью стимулировать стойкий противоопухолевый иммунитет.

с. Бактериальная терапия рака

Ряд видов бактерий продемонстрировали преимущественное размножение в солидных опухолях при инъекциях из дистального отдела в доклинических исследованиях на животных. К нимотносятся, помимопрочего, виды Salmonella, Bifodobacterium, Clostridium и Escherichia. Свойства бактерий направлять опухоль в сочетании с врожденным иммунным ответом хозяина на бактериальную инфекцию могут опосредовать противоопухолевый ответ. Такой тропизм опухолевой ткани в разной степени уменьшает размеры опухолей. Одним из факторов, способствующих опухолевому тропизму этих

видов бактерий, является способность к репликации в бескислородной и гипоксической среде.

Некоторые из этих естественно опухолетропных бактерий были дополнительно сконструированы для повышения эффективности противоопухолевого ответа (рассмотрено в Zuetal. (2014) Crit. Rev. Microbiol. 40(3): 225–235; и Felgner*etal.* (2017) *MicrobialBiotechnology* 10(5):1074–1078). Несмотря на подтверждение концепции в исследованиях на животных, факторы комплемента в сыворотке крови человека, которых нет в животных моделях, могут инактивировать бактерии, что ограничивает их использование в качестве терапии для лечения рака.

- Для перорального или системного введения бактериальные штаммы аттенуируют, чтобы они не вызывали системного заболевания и/или септического шока, но все же сохраняли некоторый уровень инфекционности для эффективной колонизации опухоли и устойчивости к инактивации комплементом. Ряд различных видов бактерий, включая Clostridium (см., например, Dangetal. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA98(26):15155-15160; патентные публикации США № 2017/0020931 и 2015/0147315). и патенты США №№ 7344710 и 3936354),Mycobacterium (см., например, патентные публикации патентов США №№ 2015/0224151 и 2015/0071873), Bifidobacterium (см., например, Dangetal. (2001)); и Kimuraetal. (1980) Cancer Res.40:2061-2068), Lactobacillus (см., например, Dang et al. (2001)), Listeria monocytogenes (см., например, Le et al. (2012) Clin. CancerRes.18(3)):858-868; Starks*etal.* (2004) *J. Immunol.* 173:420-427; и патентная публикация патента США No.2006/0051380) и Escherichiacoli (см., например, патент США № 9320787) изучались как возможные агенты для противораковой терапии.

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии включают модификации генома, направленные на решение проблем с предшествующими бактериями, разработанными для лечения опухолей. Модификации улучшают

нацеливание или накопление бактерий в микроокружении опухоли и, в частности, предназначены для того, чтобы бактерии инфицировали резидентные в опухоли иммунные клетки, а не здоровые ткани, тем самым снижая токсичность и улучшая доставку кодируемых продуктов. Иммуностимулирующие бактерии также предназначены для доставки терапевтических продуктов, включая их комбинации, предназначенных для устранения иммуносупрессивных эффектов опухолей, усиления противоопухолевого ответа хозяина и получения противоопухолевых продуктов.

i. *Listeria*

Listeriamonocytogenes, живая аттенуированная внутриклеточная бактерия, способная индуцировать мощные $CD8^+$Т-клетки.Праймирование Т-клеток к экспрессированным опухолевым антигенам в мышиных моделях рака также исследовали в качестве вектора бактериального рака (см., например, Leetal. (2012) Clin. CancerRes.18(3):858-868). В клиническом испытании вакцины на основе L. monocytogenes, включающей опухолевый антиген мезотелин, вместе с вакциной GVAX на основе аллогенного рака поджелудочной железы в подходе с первичной ревакцинацией средняя выживаемость составила 6,1 месяца у пациентов с распространенным раком поджелудочной железы по сравнению со средней выживаемостью 3,9 месяца для пациентов, получавших только вакцину GVAX (см., например, Leetal. (2015) J. Clin. Oncol. 33(12):1325-1333).

Однако эти результаты не были воспроизведены в более крупном исследовании фазы 2b, что указывает на трудности у людей с нарушением периферического иммунного надзора в отношении низкоаффинных опухолевых неоантигенов.

*L. monocytogenes*также, как было показано, приводят к ограниченному иммунному ответу на кодированный опухолевый антиген, из-за требованиям к бактериям быть лизированным после фагоцитоза, что является

предварительным условием для эффективного переноса плазмиды,и не было продемонстрировано для L. monocytogenes в макрофагах человека.

I

ii. Виды*Salmonella*

SalmonellaentericaserovarTyphimurium (S. typhimurium) является примером вида бактерий для использования в качестве противоракового терапевтического средства. S. typhimurium является грамотрицательным факультативным анаэробом, который преимущественно накапливается в зонах гипоксии и некроза из-за наличия питательных веществ в результате некроза тканей, негерметичной сосудистой сети опухоли и повышенной вероятности их выживания в микроокружении опухоли с подавленным иммунитетом (см., например, Babanetal. (2010) BioengineeredBugs 1(6):385-394). Как факультативный анаэроб, S. typhimurium способен расти в аэробных и анаэробных условиях и поэтому способен колонизировать как небольшие опухоли, менее гипоксичные, так и большие опухоли, более гипоксичные.

Передача S. typhimurium фекально-оральным путем вызывает локальные желудочно-кишечные инфекции. Бактерия также может проникать в кровоток и лимфатическую систему, заражая системные ткани, такие как печень, селезенка и легкие.

Системное введение S. typhimurium дикого типа чрезмерно стимулирует TNF-α и IL-6, что приводит к цитокиновому каскаду и септическому шоку, который, если его не лечить, может привести к летальному исходу. В результате патогенные бактериальные штаммы, такие как S. typhimurium, необходимо аттенуировать, чтобы предотвратить системную инфекцию, не подавляя при этом полностью их способность эффективно колонизировать опухолевые ткани. Аттенуация часто достигается за счет мутации клеточной структуры, которая может вызывать иммунный ответ посредством распознавания особенностей патогена, таких как внешняя мембрана бактерии, или за счет

ограничения способности бактерии к репликации в отсутствие дополнительных питательных веществ.

S. typhimurium является внутриклеточным патогеном, который быстро поглощается фагоцитирующими миелоидными клетками, такими как макрофаги, или может напрямую проникать в нефагоцитирующие клетки, такие как эпителиальные клетки, через остров патогенности Salmonella 1 (SPI-1), кодируемый типом III, система секреции (T3SS1). Оказавшись внутри клеток, он может реплицироваться внутри вакуоли, содержащей сальмонеллы (SCV) посредством регуляции SPI-2, а также может проникать в цитозоль некоторых эпителиальных клеток (см., например, Agboretal. (2011) CellMicrobiol.13(12):1858-1869 и GalanandWolf-Watz (2006) Nature 444:567-573). Генетически модифицированные бактериальные штаммы S. typhimurium были описаны как противоопухолевые агенты, вызывающие прямое тумороцидное действие и/или доставляющие онкоцидные молекулы (см., например, Clairmon*etal.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181:1996-2002; Bermudes, D. *et al.* (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:194-199; Zhao, M. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:755-760; и Zhao, M. *et al.* (2006) *CancerRes.* 66:7647-7652).

В данной области известны различные способы ослабления бактериальных патогенов. Ауксотрофные мутации, например, делают бактерии неспособными синтезировать необходимое питательное вещество, и используются делеции/мутации в таких генах, как aro, pur, gua, thy, nad и asd (см., например, патентную публикацию США № 2012/0009153). . Питательные вещества, продуцируемые путями биосинтеза с участием этих генов, часто недоступны в клетках-хозяевах, и поэтому выживание бактерий является сложной задачей. Например, аттенуацияSalmonella и других видов может быть достигнута делецией или разрушением гена aroA, который является частью пути, соединяющего гликолиз с биосинтезом ароматических аминокислот (см, напр., Felgner*etal.* (2016) *mBio* 7(5):e01220-16).

Делеция или нарушение aroA приводит к бактериальной ауксотрофии ароматических аминокислот и последующей аттенуации (см., например,

патентные публикации США №№ 2003/0170276, 2003/0175297, 2012/0009153 и 2016/0369282; и публикации международных заявок №№ WO 2015 /032165 и WO 2016/025582). Точно так же другие ферменты, участвующие в пути биосинтеза ароматических аминокислот, включая aroC и aroD, были удалены для достижения аттенуации (см., например, патентную публикацию США № 2016/0369282; и публикацию международной заявки WO 2016/025582). Например, штамм S. typhimuriumSL7207 является ауксотрофом по ароматическим аминокислотам (apoA-мутант), а штаммы A1 и A1-R являются ауксотрофами по лейцину и аргинину.

Делеция или нарушение aroA приводит к бактериальной ауксотрофии ароматических аминокислот и последующей аттенуации (см., например, патентные публикации США №№ 2003/0170276, 2003/0175297, 2012/0009153 и 2016/0369282; и публикации международной заявки №№ WO 2015). /032165 и WO 2016/025582). Точно так же другие ферменты, участвующие в пути биосинтеза ароматических аминокислот, включая aroC и aroD, были удалены для достижения аттенуации (см., например, публикацию патента США № 2016/0369282; и публикации международной заявки № WO 2016/025582). Например, штамм S. typhimuriumSL7207 является ауксотрофом по ароматическим аминокислотам (apoA-мутант), а штаммы A1 и A1-R являются ауксотрофами по лейцину и аргинину.

Мутации, аттенуирующие бактерии, также включают, но не ограничиваются ими, мутации в генах, изменяющих биосинтез липополисахарида (ЛПС), таких как rfaL, rfaG, rfaH, rfaD, rfaP, rFb, rfa, msbB, htrB, firA, pagL, pagP, lpxR, arnT, eptA и lpxT; мутации, вводящие суицидальный ген, такие как sacB, nuk, hok, gef, kil или phlA; мутации, вводящие ген бактериального лизиса, такие как hly и cly; мутации в генах, кодирующих факторы вирулентности, такие как IsyA, pag, prg, iscA, virG, plc и act; мутации в генах, модифицирующих реакцию на стресс, таких как recA, htrA, htpR, hsp и groEL; мутации в генах, нарушающие клеточный цикл, такие как min; и мутации в генах, которые нарушают или инактивируют регуляторные функции, такие

как cya, crp, phoP/phoQ и ompR (см., например, патентные публикации США №№ 2012/0009153, 2003/0170276 и 2007/0298012; патент США № 6190657; публикация международной заявки № WO 2015/032165; Felgner*etal.* (2016) *Gut Microbes* 7(2):171-177; Broadway *et al.* (2014) *J. Biotechnology* 192:177-178; Frahm *et al.* (2015) *mBio* 6(2):e00254-15; Kong *et al.* (2011)*Infection and Immunity* 79(12):5027-5038; and Kong *et al.*(2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*109(47):19414-19419).

В общем, аттенуирующие мутации представляют собой делеции генов для предотвращения спонтанных компенсаторных мутаций, которые могут привести к реверсии к вирулентному фенотипу.

Другой способ аттенуацииS. typhimurium в целях безопасности заключается в использовании системы оперонов PhoP/PhoQ, которая представляет собой типичную бактериальную двухкомпонентную регуляторную систему, состоящую из ассоциированной с мембраной сенсорной киназы (PhoQ) и цитоплазматического регулятора транскрипции (PhoP). (см., например, Miller, SI et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5054-5058; и Groisman, EA et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7077- 7081)

PhoP/PhoQ необходим для вирулентности; его делеция приводит к плохой выживаемости этой бактерии в макрофагах и к заметной аттенуации у мышей и людей (см., например, Miller, SIetal. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5054-5058; Groisman, EA и др. (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:7077-7081, Galan, JE и Curtiss, R.III.(1989) Microb.Pathog.6:433-443 и Fields, PIetal. (1986)*Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:5189-5193). Делеционные штаммы PhoP/PhoQ использовались в качестве средств доставки вакцины (см., например, Galan, JEandCurtiss, R. III. (1989) Microb. Pathog. 6:433-443; Fields, PI et al. (1986) Proc. Natl.Acad.Sci.USA83:5189-5193 и Angelakopoulos, H. and Hohmann, EL (2000) Infect. Immun.68:2135-2141). Однако, как описано в настоящем документе, для штамма невыгодно иметь ограниченную выживаемость в макрофагах, если бактерии не пытаются переносить плазмиды.

Было обнаружено, что эти аттенуированные бактериальные штаммы безопасны для мышей, свиней и обезьян при внутривенном (V/V введении (см., например, Zhao, M. etal. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA102:755- 760. Zhao M. и др. (2006) Cancer Res.66:7647-7652;Tjuvajev J. *et al.* (2001) *J. Control. Release* 74:313-315; and Zheng, L. *et al.* (2000) *Oncol. Res.* 12:127-135),ибылопоказано, чтонекоторыеживыеаттенуированныештаммы Salmonella хорошопереносятсяпослепероральноговведениявклиническихиспытанияхналюдях (см., например, Chatfield, SN et al. (1992) Biotechnology 10:888-892; DiPetrillo, M. D. *et al.* (1999) *Vaccine* 18:449-459; Hohmann, E. L. *et al.* (1996) *J. Infect. Dis.* 173:1408-1414; and Sirard, J. C. *et al.* (1999) *Immunol. Rev.* 171:5-26).

Другими штаммами S. typhimurium, которые были аттенуированы для терапии, являются, например, лейцин-аргининовыйауктрофА-1 (см, напр., Zhao*etal.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*102(3):755-760; Yu *et al.* (2012)*ScientificReports* 2:436; патентСША 8,822,194; ипатентнаяпубликацияСШАNo. 2014/0178341), иегопроизводноеAR-1 (см, напр., Yu*etal.* (2012) *Scientific Reports* 2:436; Kawaguchi *et al.* (2017) *Oncotarget* 8(12):19065-19073; Zhao *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66(15):7647-7652; Zhao *et al.* (2012) *Cell Cycle* 11(1):187-193; Tome *et al.* (2013) *Anticancer Research* 33:97-102; Murakami *et al.* (2017) *Oncotarget*8(5):8035-8042; Liu *et al.* (2016) *Oncotarget* 7(16):22873-22882; and Binder *et al.* (2013) *Cancer Immunol. Res.* 1(2):123-133); *aroA*˜мутантный*S. typhimurium* штамм SL7207 (см, напр, Guo *et al.*(2011) *GeneTherapy* 18:95-105; ипатентныепубликацииСША 2012/0009153, 2016/0369282 и 2016/0184456),

Другие штаммы*S. typhimurium*которые были ослаблены перед терапией, представляют собой например, ауксотроф по лейцину-аргинину А-1 (см. напр., Zhao*etal.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*102(3):755-760; Yu *et al.* (2012)*ScientificReports* 2:436; патентСША 8,822,194; ипатентнуюпубликациюСША 2014/0178341), иегопроизводноеAR-1 (см., напр., Yu*etal.* (2012) *Scientific Reports* 2:436; Kawaguchi *et al.* (2017) *Oncotarget* 8(12):19065-19073; Zhao *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66(15):7647-7652; Zhao *et al.* (2012) *Cell Cycle* 11(1):187-193; Tome *et al.* (2013) *Anticancer Research* 33:97-102;

Murakami *et al.*(2017) *Oncotarget*8(5):8035-8042; Liu *et al.* (2016) *Oncotarget* 7(16):22873-22882; and Binder *et al.* (2013) *Cancer Immunol. Res.* 1(2):123-133); *aroA*⁻мутантныйmutant *S. typhimurium* штаммSL7207 (см, напр., Guo *et al.*(2011) *GeneTherapy* 18:95-105; ипатентныепубликацииСША 2012/0009153, 2016/0369282 и 2016/0184456), ианаэробноепроизводноеYB1 (см. напр., WO 2015/032165; Yu*etal.* (2012) *ScientificReports* 2:436; иLeschner*etal.* (2009) *PLoSONE* 4(8):e6692); мутантныйштамм*aroA*⁻/*aroD*⁻*S.typhimurium*strainBRD509, производноеSL1344 (дикоготипа) штамм (см, напр., Yoon*etal.* (2017) *Eur. J. Cancer* 70:48-61); мутантныйштамм*asd*⁻/*cya*⁻/*crp*⁻*S. typhimurium*χ4550 (см, напр., Sorenson*etal.* (2010) *Biologics: Targets & Therapy* 4:61-73) и*phoP*⁻/*phoQ*⁻ *S. typhimurium штамм* LH430 (см, напр., WO 2008/091375).

Однако аттенуация влияет на способность бактерий накапливаться в резидентных в опухоли иммунных клетках, микроокружении опухоли и опухолевых клетках. Эта проблема решена здесь. Иммуностимулирующие бактерии, такие как штаммы Salmonella, приведенные в качестве примеров в данном документе, аттенуированы благодаря модификациям, которые могут включать некоторые из описанных выше, но также имеют другие модификации и свойства, описанные в настоящем документе, которые повышают эффективность противоракового терапевтического средства.

Аттенуированные штаммы S. typhimurium обладают врожденной способностью доставлять ДНК после фагоцитоза и деградации (см., например, Weissetal. (2003) Int. J. Med. Microbiol. 41(7):3413-3414). Они использовались в качестве векторов для генной терапии. Например, штаммы S. typhimurium использовались для доставки и экспрессии различных генов, включая те, которые кодируют цитокины, ингибиторы ангиогенеза, токсины и ферменты, превращающие пролекарства (см., например, патентную публикацию США № 2007/0298012; Loeffler et al. (2008) Cancer Gene Ther.15(12):787-794; Loeffler et al. (2007) Proc. Natl. Acad. (Sci. USA104(31):12879-12883), Loeffler и др. (2008) J. Natl. Cancer Inst.100:1113-1116, Clairmont, C. и др. (2000) J. Infect. Dis.181: 1996-2002 годы; Bermudes, D. *et al.* (2002) *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:194-199;

Zhao, M. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:755-760; Zhao, M. *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66:7647-7652; иTjuvajev J. *et al.* (2001) *J. Control. Release* 74:313-315).

S. typhimurium был модифицирован для доставки связанного с опухолью антигена (TAA) сурвивина (SVN) в антигенпрезентирующие клетки (APC) для активации адаптивного иммунитета (см., например, публикацию патента США № 2014/0186401; и Xuetal. (2014) CancerRes.74(21):6260-6270). SVN является ингибитором белка апоптоза (IAP), который продлевает выживаемость клеток и обеспечивает контроль клеточного цикла, сверхэкспрессируется во всех солидных опухолях и слабо экспрессируется в нормальных тканях. Эта технология использует SPI-2 и его систему секреции типа III для доставки TAA в цитозоль APC, которые затем активируются для индукции TAA-специфических $CD8^+$ Т-клеток и противоопухолевого иммунитета (см., например, Xuetal. (2014) CancerRes.74(21):6260-6270). Подобно вакцинам TAA на основе Listeria, этот подход показал себя многообещающим на моделях мышей, но не продемонстрировал эффективного праймирования Т-клеток, специфичных к опухолевому антигену, у людей.

В дополнение к доставке ДНК, кодирующей белки, S. typhimurium также использовался для доставки малых интерферирующих РНК (siRNA) и коротких шпилечных РНК (shRNA) для лечения рака. Например, аттенуированныйS. typhimurium был модифицирован для экспрессии определенных shРНК, таких как те, которые нацелены на иммуносупрессивный ген индоламиндиоксигеназы (IDO). Экспрессия IDO в мышиной модели меланомы приводила к гибели опухолевых клеток и значительной инфильтрации опухоли нейтрофилами (см., например, Blacheetal. (2012) CancerRes.72(24):6447-6456; публикация международной заявки № WO 2008/091375 и патент США №9,453,227). Совместное введение этого вектора с гиалуронидазой показало положительные результаты при лечении мышиной протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (см., например, Manueletal. (2015) CancerImmunol. Res.3(9):1096-1107; и патентная публикация США 2016/0184456).

В другом исследовании штамм S. typhimurium, аттенуированный делецией phoP/phoQ и экспрессирующий shРНК, специфичную для преобразователя сигнала и активатора транскрипции 3 (STAT3), ингибировал рост опухоли и уменьшал количество метастатических органов, продлевая жизнь C57BL. /6 мышей (см., например, Zhangetal. (2007) CancerRes. 67(12):5859-5864). В другом примере штамм SL7207 S. typhimurium использовался для доставки shРНК, нацеленной на CTNNB1, ген, который кодирует β-катенин (см., например, Guoetal. (2011) GeneTherapy 18:95-105; и патентные публикации США № 2009/0123426 и 2016/0369282). Штамм S. typhimuriumVNP20009 использовался для доставки shРНК, нацеленной на STAT3 (см., например, Manueletal. (2011) CancerRes.71(12):4183-4191; публикации № 2009/0208534, и 2016/0184456 и публикации международной заявки № WO 2008/091375 и WO 2012/149364).

siРНК, нацеленные на гены аутофагииAtg5 и Beclin1, были доставлены в опухолевые клетки с использованием штаммов S. typhimuriumA1-R и VNP20009 (см., например, Liuetal. (2016) Oncotarget 7(16):22873-22882).

Однако было обнаружено, что эти штаммы не стимулируют ни эффективно противоопухолевый иммунный ответ, ни эффективно колонизируют опухоли для доставки терапевтических доз кодируемых продуктов. Необходимо усовершенствование таких штаммов, чтобы они более эффективно стимулировали противоопухолевый иммунный ответ, такие как иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе. Дополнительные и альтернативные модификации различных бактерий описаны в опубликованной международной заявке PCT № WO 2019/014398 и в публикации США № 2019/0017050 A1. Бактерии, описанные в каждой из этих публикаций, а также описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе, для дальнейшего улучшения их иммуностимулирующих и направленных на опухоль свойств.

iii. VNP20009

Примером терапевтической бактерии, которую можно использовать в качестве исходного штамма для модификации, как описано в настоящем документе, является штамм, обозначенный как VNP20009 (ATCC # 202165, YS1646). Этот вирус был клиническим кандидатом. VNP20009 (ATCC # 202165, YS1646) был по крайней мере в 50 000 раз ослаблен в целях безопасности путем делеции генов msbB и purI (см., например, Clairmontetal. (2000) J. Infect. Dis.181:1996-2002; Low и др. (2003) Methods in Molecular Medicine, Vol.90, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, стр. 47-59, а также Lee и др. (2000) InternationalJournalofToxicology 19:19-25). Делеция или разрушение для предотвращения экспрессии гена msbB изменяет состав домена липида А липополисахарида, основного компонента наружных мембран грамотрицательных бактерий (см., например, Lowetal. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17(1):37-41).

Это предотвращает липополисахарид-индуцированный септический шок, ослабляя бактериальный штамм и снижая системную токсичность при одновременном снижении потенциально опасной продукции TNFα (см., например, Dinarello, CA (1997) Chest 112(6 Suppl):321S-329S; и Lowetal. и др. (1999) Nat. Biotechnol. 17(1):37-41). Делеция или разрушение для предотвращения экспрессии гена purI делает бактерии ауксотрофными по пуринам, что еще больше ослабляет бактерии и обогащает их в микроокружении опухоли (см., например, Paweleketal. (1997) CancerRes. 57:4537-4544; и Broadway и др. (2014) J. Biotechnology 192:177-178). Как показано здесь, VNP20009 также является ауксотрофным по отношению к иммуносупрессивному нуклеозиду аденозину. Аденозинможетнакапливатьсявопухолидопатологическивысокихуровнейивноситьвкладвиммуносупрессивноемикроокружениеопухоли (см.,напр., Peter Vaupel and Arnulf Mayer, *Oxygen Transport to Tissue XXXVII*, Advances in Experimental Medicine and Biology 876 chapter 22, pp. 177-183).

Когда VNP20009 вводили мышам с сингенными опухолями или ксенотрансплантатами человека, бактерии накапливались преимущественно во внеклеточных компонентах опухолей в соотношении, превышающем 300-1000 к 1, и демонстрировали ингибирование роста опухоли, а также более продолжительное выживание по сравнению с контрольными мышами (см. например, Clairmontetal. (2000) J. Infect. Dis.181:1996-2002). VNP20009 продемонстрировал успех в нацеливании на опухоли и подавлении роста опухолей на животных моделях, при этом вызывая очень небольшую токсичность (см., например, Broadwayetal. (2014) J. Biotechnology 192:177-178; Loeffler et al. (2007) Proc. Natl. (Acad.Sci.USA104(31):12879-12883), Luo и др. (2002) OncologyResearch 12:501-508 и Clairmont и др. (2000) J. Infect. Dis.181:1996-2002).

Результаты клинического испытания фазы 1 метастатической меланомы человека показали, что, хотя VNP20009 был относительно безопасным и хорошо переносимым, наблюдалась очень ограниченная противоопухолевая активность (см., например, Tosoetal. (2002) J. Clin. Oncol.20). (1):142-152). Хотя использование VNP20009 не приводило к значительным изменениям метастатического заболевания, оно продемонстрировало признаки колонизации опухоли при максимально переносимой дозе (MTD). Более высокие дозы, которые потребовались бы для проявления какой-либо противоопухолевой активности, были невозможны из-за токсичности, которая коррелировала с высокими уровнями провоспалительных цитокинов.

Предлагаемые здесь иммуностимулирующие бактерии обеспечивают многочисленные улучшения и преимущества, которых лишен штамм VNP20009. Иммуностимулирующие бактерии доставляют закодированные генетические полезные нагрузки опухолеспецифическим образом к резидентным в опухоли миелоидным клеткам. Иммуностимулирующие бактерии в силу геномных модификаций, таких как делеции или нарушения

генов, а также других модификаций генома, проявляют ослабленное воспаление, опосредованное TLR2, TLR4 и TLR5, например, благодаря элиминации флагелл , модификаций LPS, устранения фимбрий и уменьшения образования биопленок. Иммуностимулирующие бактерии усиливают функцию Т-клеток, например, за счет устранения экспрессии L-аспарагиназыII, и облегчают, обеспечивают, разрешают и поддерживают поддержание плазмиды. Бактерии накапливаются (или нацеливаются) только или по существу только в миелоидных клетках, особенно в миелоидных клетках, находящихся в опухоли, обеспечивая высокоэффективную доставку плазмиды после фагоцитоза. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии колонизируют микроокружение опухоли и могут вводиться системно. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии демонстрируют по меньшей мере 15-кратное улучшение LD_{50} по сравнению с VNP20009. Таким образом, при необходимости можно вводить гораздо более высокую дозу иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, без токсических эффектов по сравнению с VNP20009 (см. таблицу ниже в разделе F.5., описывающую дозировки и введение).

В настоящем документе показано и описано, что иммуностимулирующие бактерии, модифицированные, как описано в настоящем документе, включая удаление флагелл, модификации LPS и другие модификации, преимущественно накапливаются в миелоидных клетках или нацелены на них, в частности, в миелоидных клетках, резидентных в опухоли. Примеры демонстрируют, что иммуностимулирующие бактерии накапливаются в таких клетках после системного, такого как внутривенное, введения. Примеры также описывают и демонстрируют перенос плазмиды из иммуностимулирующих бактерий в резидентные в опухоли миелоидные клетки и длительную экспрессию белка после гибели бактериальной клетки, тем самым доставляя терапевтические продукты, включая продукты, которые приводят к противораковому ответу и фенотипу.

iv. Штаммы дикого типа

Накопление VNP20009 в опухолях является результатом комбинации факторов, включая присущую родительскому штамму ATCC 14028 инвазивность, его способность к репликации в гипоксической среде и его потребность в высоких концентрациях пуринов, присутствующих в интерстициальной жидкости опухолей. Как описано в настоящем документе, нет необходимости использовать аттенуированный штамм, такой как VNP20009, в качестве исходного бактериального штамма. Благодаря модификациям, описанным здесь, бактерии становятся нетоксичными или аттенуированными. Родительский штамм ATCC 14028 или другой штамм дикого типа можно использовать в качестве исходного штамма и модифицировать, как описано в настоящем документе.

3. Ограничениясуществующейбактериальнойиммунотерапииирака

Многие классы иммунотерапии имеют существенные ограничения, ограничивающие их безопасность и эффективность, а также сложные платформы, которые вряд ли найдут широкое применение. Бактерии обладают многочисленными полезными свойствами для использования в качестве противораковых терапевтических средств по сравнению, например, с онколитическими вирусами. К ним относится легкость, с которой их можно размножать, производить, хранить и удалять из организма-хозяина после завершения лечения. Вирусы, однако, также обладают полезными свойствами, в том числе реакцией хозяина. Реакция на бактериальную инфекцию является врожденной воспалительной реакцией, которая не является благоприятной для противоракового терапевтического средства. Реакция на вирусную инфекцию аналогична противораковой реакции. Это обобщено в следующей таблице (см. также Обзор выше):

	Бактерии	Вирусы
Врожденное	TLR2, TLR4 and TLR5	TLR3, TLR7/8, and STING
Профиль воспалительного	Промотируетврожд. иммунитет:	Промотирует врожденный и адаптивный иммунитет
Градиентыхемокина:	Притягивают нейтрофилы для	ПритягиваютТ-клетки, моноциты для очищения от
Создание иммунитета	Нет	Да
Иммуногенность:	Не иммуногенен	Сильно иммуногенен

Таким образом, ограничение использования бактерий в качестве микробной противораковой платформы происходит из-за специфической иммунной программы, которая инициируется иммунной системой при восприятии бактерий, даже внутриклеточных бактерий, по сравнению с путями обнаружения вирусов, которые более похожи на антираковые пути. Программы зондирования, которые распознают вирусы, позволяют создавать высокоэффективные вакцины и стойкий адаптивный иммунитет. Однако вакцинация против бактерий имела ограниченный успех. Например, одобренная FDA вакцина против брюшного тифа против Salmonellatyphi эффективна только на 55% (см., например, Hartetal. (2016) PLoSONE 11(1):e0145945), несмотря на S. typhi, содержащие высокоиммуногенную капсулу Vi и антиген O:9, которые не встречаются в менее иммуногенных бактериальных штаммах, таких как L.monocytogenes и S. typhimurium, против которых не существует вакцин.

Бактерии и вирусы содержат консервативные структуры, известные как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), которые воспринимаются рецепторами распознавания паттернов клетки-хозяина (PRR). Распознавание PAMP с помощью PRR запускает нижестоящие сигнальные каскады, которые приводят к индукции цитокинов и хемокинов и инициации специфического иммунного ответа (см., например, IwasakiandMedzhitov (2010) Science 327(5963):291-295). Способ, которым

врожденная иммунная система задействует PAMP, и от какого типа инфекционного агента определяет, будет ли генерироваться соответствующий врожденный или адаптивный ответ для борьбы с вторгшимся патогеном.

Класс PRR, известный как Toll-LikeReceptors (TLR), распознает PAMP, происходящие из бактерий и вирусов, и расположен в различных компартментах внутри клетки. TLR распознают различные лиганды, включая липополисахарид (TLR4), липопротеины (TLR2), флагеллин (TLR5), неметилированныезвеньяCpG в ДНК (TLR9), двухцепочечную РНК (TLR3) и одноцепочечную РНК (TLR7 и TLR8). (см., например, Akiraetal. (2001) Nat. Immunol.2(8):675-680 и KawaiandAkira (2005) Curr. Opin. Immunol.17(4):338-344).

Вирусы на основе ДНК и РНК можно обнаружить либо в цитозольных компартментах хозяина после фагоцитоза, либо непосредственно в цитозоле. Интерфероны типа I (IFN-α, IFN-β) представляют собой характерные цитокины, индуцируемые распознаванием хозяином одноцепочечной и двухцепочечной ДНК и РНК вирусного происхождения или поглощением поврежденной ДНК клетки-хозяина. Например, синтетический аналог dsРНК полиинозиновая: полицитидиловая кислота (поли(I:C)) является агонистом эндосомальногоTLR3 и мощным индуктором IFN типа I, а его более стабильная версия, поли ICLC (например, продается под торговой маркой Hiltonol®) находится в стадии клинической разработки (см., например, Caskeyetal. (2011) J. Exp. Med.208(12):2357-2366).

Точно так же одноцепочечная РНК (ssРНК) в эндосоме воспринимается TLR7 и TLR8 (только у человека), а ее известные синтетические лиганды, резиквимод и имихимод, одобрены FDA для местной иммунотерапии рака.

В цитозоле двухцепочечная РНК (dsРНК) воспринимается геликазами РНК, такими как индуцируемый ретиноевой кислотой ген I (RIG-I) и ген 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA-5), что приводит к индукции IFNI типа. (см., например, IretonandGale (2011) Viruses 3(6):906-919). Цитозольный сенсор двухцепочечной ДНК опосредован стимулятором генов интерферона (STING), резидентным адапторным белком ER, который

является центральным медиатором для распознавания цитозольнойдвухцепочечной ДНК от инфекционных патогенов или аберрантных повреждений клетки-хозяина (см., например, Barber (2011) Immunol. Rev.243(1):99-108).

Передача сигналов STING активирует ось TANK-связывающей киназы 1 (TBK1)/регуляторного фактора интерферона 3 (IRF3) и ось передачи сигналов NF-κB, что приводит к индукции IFN-β и других провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые сильно активируют врожденный и адаптивный иммунитет (см., например, Burdetteetal. (2011) Nature 478(7370):515-518). Для обнаружения цитозольнойдвухцепочечной ДНК с помощью STING требуется циклическая GMP-AMP-синтаза (cGAS), нуклеотидилтрансфераза клетки-хозяина, которая непосредственно связывает двухцепочечную ДНК и в ответ синтезирует циклический динуклеотид (CDN) вторичный мессенджер, циклический GMP-AMP (cGAMP), который связывает и активирует STING (см., например, Sunetal. (2013) Science 339(6121):786-791; и Wuetal. (2013) Science 339(6121):826-830).

STING также может связываться с CDN бактериального происхождения, такими как c-di-AMP, продуцируемый внутриклеточным L. monocytogenes, или c-di-GMP из S. typhimurium. Позже было обнаружено, что cGAS продуцирует неканоническую CDN, которая может активировать аллели STING человека, которые не реагируют на канонические CDN бактериального происхождения. В отличие от CDN, продуцируемых бактериями, в которых два пуриновых нуклеозида соединены фосфатным мостиком с 3'-3'-связями, межнуклеотидный фосфатный мостик в cGAMP, синтезируемом cGAS, соединен неканонической 2'-3'-связью.

Эти 2'-3' молекулы связывают STING с аффинностью в 300 раз выше, чем бактериальные 3'-3' c-di-GMP, и, таким образом, являются более сильными физиологическими лигандамиSTING (см., например, Civriletal. (2013)). Nature 498(7454):332-337, Diner и др. (2013) Cell Rep.3(5):1355-1361, Gao и др. (2013) Sci.Signal 6(269):pl1; иAblasser et.al. (2013) Nature 503(7477):530-

534). Сигнальный путь cGAS/STING у людей, по-видимому, эволюционировал, чтобы реагировать на вирусные патогены предпочтительнее, чем на бактериальные патогены.

Таким образом, вирусочувствительныеPRR и TLR, такие как STING, RIG-I, TLR3 и TLR7/8, индуцируют IFN типа I, а также цитокины и хемокины, которые приводят к эффективному адаптивному иммунитету, опосредованному Т-клетками. При опухолях передача сигналов IFN типа I необходима для индукции хемокинов, переносящих Т-клетки, таких как CXCL10, а также для активации перекрестной презентации опухолевых антигенов ДК для праймированияCD8 $^{+}$ Т-клеток (см., например, Diamondetal. (2011) J.Exp.Med.208(10):1989–2003 и Fuertes и др. (2011) J.Exp.Med. 208(10):2005–2016).

Напротив, надзор хозяина за бактериями, такими как S. typhimurium, в значительной степени опосредован TLR2, TLR4 и TLR5 (см., например, Arpaiaetal. (2011) Cell 144(5):675-688). Эти TLR сигнализируют через адаптерные молекулы MyD88 (белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88) и TRIF (адаптер, индуцирующий интерферон-β, содержащий домен рецептора Toll/интерлейкина-1 (TIR)), чтобы опосредовать индукцию NF-κB-зависимых про- воспалительныхе цитокинов TNF-α и IL-6 (см., например, Pandeyetal. (2015) ColdSpringHarb. Perspect. Biol.7(1):a016246).

Было показано, что S. typhimurium активирует путь воспаления NLRP3, что приводит к расщеплению каспазы-1 и индукции провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-18, что приводит к пироптотической гибели клеток. Участие TLR2, TLR4 и TLR5 и активация воспаления, индуцирует хемокины и цитокины, которые приводят к клиренсу бактерий нейтрофилами и макрофагами. Доказательства того, что S. typhimurium уничтожается Т-клетками, ограничены, а антитела, которые вырабатываются против него, не являются нейтрализующими (см., например, McSorley (2014) Immunol. Rev. 260(1):168-182).

Кроме того, S. typhimurium обладает механизмами прямого подавления функции Т-клеток, нарушая любой потенциальный противоопухолевый ответ Т-

клеток (см., например, Kullasetal. (2012) CellHostMicrobe.12(6)791- 798). В результате бактериальная терапия рака, такая как S. typhimurium, приводит к привлечению и выведению нейтрофилов и макрофагов, которые не являются Т-клетками, необходимыми для создания адаптивного противоопухолевого иммунитета. Здесь описывается, что эти различия могут объяснить, почему являются слабыми Т-клеточными праймирующими векторами для людей предшествующие бактериальные противораковые вакцины, даже те, которые содержат опухолевые антигены хозяина,

Эти проблемы входят в число тех, которые решаются с помощью предлагаемых здесь иммуностимулирующих бактерий. Предложенные здесь иммуностимулирующие бактерии сконструированы таким образом, чтобы они обладали благоприятными свойствами, которые ранее обеспечивались только вирусными терапевтическими средствами, а также сохраняли благоприятные свойства бактериальных терапевтических средств. Представленные здесь бактерии можно вводить системно, они могут локализоваться в опухолях, резидентных в опухоли иммунных клетках и/или микроокружении опухоли, преодолевать иммуносупрессию и должным образом активировать противоопухолевый иммунитет, а также ограничивать аутоиммунную токсичность существующих системных иммунотерапевтических средств. . Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии эффективно локализуются в резидентных в опухоли иммунных клетках и кодируют терапевтические противораковые продукты и могут кодировать множество таких продуктов.

Например,в данном документе представлена превосходная микробная противораковая платформа, спроектированная так, чтобы сохранять полезные свойства бактерий, вызывая при этом вирусоподобный иммунный ответ, который индуцирует эффективный адаптивный иммунитет. Как описано в настоящем документе, бактерии, такие как штаммы Salmonella и другие виды, могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе, для

уменьшения воспалительных эффектов и, таким образом, для снижения токсичности. В результате, например, можно вводить более высокие дозы. Любой из этих штаммов Salmonella, а также другие виды бактерий, известные специалистам в данной области и/или перечисленные выше и в настоящем документе, можно модифицировать, как описано в настоящем документе. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии модифицированы для увеличения колонизации микроокружения опухоли, резидентных в опухоли иммунных клеток и опухолей. Они спроектированы таким образом, чтобы снизить токсичность, и другие свойства, которые нацеливают их на микроокружение опухоли, включая ауксотрофию по аденозину.

Представленные здесь штаммы также сконструированы таким образом, что они не инактивируются комплементом.

Предложен противораковый терапевтический продукт, который доставляет генетическую полезную нагрузку, кодирующую укороченную костимулирующую молекулу (рецептор или лиганд; например, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1, OX40L), с полной или усеченной или частичной цитоплазматической делецией домена для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC), где продукт укороченного гена способен к конститутивной иммуностимулирующей передаче сигнала к Т-клетке посредством участия костимулирующего рецептора и неспособен к контррегуляторному сигналу к АПК из-за удаленного или укороченного цитоплазматического домена.

Костимулирующие молекулы также могут быть модифицированы для включения остатков (таких как положительные остатки) в укороченный цитоплазматический домен, чтобы обеспечить их экспрессию в правильной ориентации в клеточной мембране (примеры ниже описывают это более подробно; см. например, пример 19).

Представленные здесь бактериальные штаммы разработаны для доставки терапевтических продуктов. Приведенные здесь бактериальные штаммы доставляют иммуностимулирующие белки, включая цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, а также модифицированные цитозольные ДНК/РНК-сенсоры с усилением функции, которые могут конститутивно вызывать или индуцировать экспрессию INF типа I, и других терапевтических продуктов, таких как, помимо прочего, антитела и их фрагменты, рецепторы-приманки, связывающие TGF-β и IL-6, полипептидные антагонисты TGF-β, биспецифическиепривлекатели Т-клеток (BiTEs®), РНК, и их комплементарные комбинации, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ в микроокружении опухоли. Бактериальные штаммы также включают геномные модификации, которые снижают пироптозфагоцитирующих клеток, тем самым обеспечивая более сильный иммунный ответ и/или снижают или устраняют способность инфицировать/вторгаться в эпителиальные клетки, но сохраняют способность инфицировать/вторгаться в фагоцитирующие клетки, т.е. что они более эффективно накапливаются в опухолях, микроокружении опухоли и в резидентных опухолевых иммунных клетках. Бактериальные штаммы также можно модифицировать, чтобы они были устойчивыми к инактивации факторами комплемента в сыворотке крови человека.

C. МОДИФИКАЦИЯ И УСИЛЕНИЕ ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ИНДЕКСА И УВЕЛИЧЕНИЯ НАКОПЛЕНИЯ В РЕЗИДЕНТНЫХ В ОПУХОЛИ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТКАХ

В настоящем документе предусмотрены усовершенствования, включая модификации бактериального генома или иммуностимулирующих бактерий, которые, например, снижают токсичность и улучшают противоопухолевую активность, например, за счет увеличения накопления в миелоидных клетках, резидентных в опухоли, повышения устойчивости к инактивации комплемента. , уменьшая гибель иммунных клеток, способствуя адаптивному иммунитету и усиливая функцию Т-клеток. Модификации описаны в отношении Salmonella,

особенно S.typhimurium; понятно, что специалист в данной области техники может осуществить аналогичные улучшения/модификации других видов бактерий и других штаммов Salmonella. Примерами таких улучшений/модификаций являются следующие.

1. Делеции в генахпути биосинтеза LPS

Липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий является основным компонентом наружного листка бактериальной мембраны. Он состоит из трех основных частей: липида А, неповторяющегося основного олигосахарида и О-антигена (или О-полисахарида). О-антиген является самой внешней частью ЛПС и служит защитным слоем от бактериальной проницаемости, однако сахарный состав О-антигена широко варьируется между штаммами. Липид А и сердцевинный олигосахарид различаются меньше и обычно сохраняются в пределах штаммов одного и того же вида. Липид А представляет собой часть ЛПС, обладающую эндотоксиновой активностью. Обычно это дисахарид, украшенный несколькими жирными кислотами.

Эти гидрофобные цепи жирных кислот закрепляют ЛПС в бактериальной мембране, а остальная часть ЛПС выступает с поверхности клетки. Домен липида А ответственен за большую часть токсичности грамотрицательных бактерий. Как правило, LPS в крови распознается как важный молекулярный паттерн, ассоциированный с патогенами (PAMP), и вызывает глубокую провоспалительную реакцию. ЛПС является лигандоммембраносвязанного рецепторного комплекса, включающего CD14, MD2 и TLR4. TLR4 представляет собой трансмембранный белок, который может передавать сигналы через пути MyD88 и TRIF для стимуляции пути NF-κB и приводить к продукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF-α и IL-6, результатом чего может быть эндотоксический шок, что может привести к летальному исходу. ЛПС в цитозоле клеток млекопитающих может напрямую связываться с доменами CARDкаспаз 4, 5 и 11, что приводит к аутоактивации и пироптозной гибели клеток (см., например, Hagaretal. (2015) CellResearch 25:149-150) .

Состав липида А и токсигенность вариантов липида А хорошо документированы. Например, монофосфорилированный липид А вызывает гораздо меньшее воспаление, чем липид А с несколькими фосфатными группами. Количество и длина ацильных цепей липида А также могут оказывать сильное влияние на степень токсичности. Канонический липид А из E. coli имеет шесть ацильных цепей, и это гексаацилирование сильно токсично. Липид AS. typhimurium аналогичен липиду E. coli; это дисахарид глюкозамина, который несет четыре первичные и две вторичные гидроксиацильные цепи (см., например, Raetzetal. (2002) Annu. Rev. Biochem. 71:635-700).

a. Делеция *msbB*

Фермент биосинтеза липида А миристоилтрансфераза, кодируемый геном msbB в S. typhimurium, катализирует добавление концевой миристоильной группы к домену липида А липополисахарида (LPS) (см., например, Lowetal. (1999) Nat. Biotechnol. 17(1):37-41). Таким образом, делеция msbB изменяет ацильный состав домена липида А LPS, основного компонента наружных мембран грамотрицательных бактерий. Например, делеция msbB в штамме VNP20009 S. typhimurium приводит к продукции преимущественно пентаацилированного липида А, который менее токсичен, чем нативныйгексаацилированный липид А, и позволяет системно доставляться без индукции токсического шока. см., например, Lee и др. (2000) InternationalJournalofToxicology 19:19-25).

Эта модификация значительно снижает способность LPS вызывать септический шок, ослабляя бактериальный штамм и, таким образом, повышая терапевтический индекс иммунотерапевтических средств на основе сальмонеллы (см., например, патентные публикации США №№ 2003/0170276, 2003/0109026, 2004/0229338, 2005/0255088 и 2007/0298012). Важно,что другие мутанты msbB, которые не экспрессируют продукты msbB, не способны экспрессироваться интраклеточно, как показано здесь (см. Пример 2), что требует вирулентность Salmonella(см, напр., Leung*etal.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:11470-11474). Другие мутации ЛПС, включая замены, делеции или вставки, которые изменяют экспрессию ЛПС, могут быть введены в

бактериальные штаммы, представленные в настоящем документе, включая штаммы Salmonella, которые резко снижают вирулентность и, таким образом, обеспечивают более низкую токсичность и позволяют вводить более высокие дозы. .

Соответствующие гены, кодирующие гомологи или ортологимиристоилтрансферазы биосинтеза липида А у других видов бактерий, также могут быть удалены или разрушены для достижения аналогичных результатов. Эти гены включают, но не ограничиваются ими, например, lpxM, кодирующий миристоил-ацил-носитель белка-зависимую ацилтрансферазу в E. coli; и msbB, кодирующий ацилтрансферазу липида А в S. typhi.

b. Удаление *pagP*

Как описано выше, мутанты msbBS. typhimurium не могут подвергаться терминальному миристоилированиюLPS и продуцируют преимущественно пентаацилированный липид А, который значительно менее токсичен, чем гексаацилированный липид А. Модификация липида А пальмитатом катализируется ферментом липид-А-пальмитоилтрансфераза (PagP).

Транскрипция гена pagP находится под контролем системы PhoP/PhoQ, которая активируется низкими концентрациями магния, например, внутри SCV. Таким образом, содержание ацила в липиде А S. typhimurium варьируется, и у бактерий дикого типа он может быть гекса- или пентаацилирован. Способность S. typhimuriumпальмитировать свой липид А повышает устойчивость к антимикробным пептидам, которые секретируются в фаголизосомы.

У S. typhimurium дикого типа экспрессия pagP приводит к образованию гептаацилированного липида А. У мутанта msbB (у которого нельзя добавить концевую ацильную цепь липида А) индукция pagP приводит к гексаацилированному липиду А (см., например, Kongetal. (2011) InfectionandImmunity 79(12)):5027–5038). Было показано, что гексаацилированный липид А является наиболее провоспалительным. В то

время как группы пытались использовать этот провоспалительный сигнал, например, путем делеции или разрушения pagP, чтобы позволить производить только гексацилированный липид А (см., например, Felgneretal. (2016) GutMicrobes 7(2) :171-177 и Felgneretal. (2018) Oncoimmunology 7(2):e1382791), это может привести к плохой переносимости из-за опосредованной TNF-αпровоспалительной природы ЛПС и парадоксально менее адаптивного иммунитета. (см., например, Kocijancicetal. (2017) Oncotarget 8(30):49988-50001).

LPS является мощным агонистом TLR4, который индуцирует TNF-α и IL-6. Дозолимитирующая токсичность в клиническом испытании IVVNP20009 (см., например, Tosoetal. (2002) J. Clin. Oncol. 20(1):142-152) при 1E9 КОЕ/м ^{2} была опосредована цитокинами (лихорадка, гипотензия) с уровнями TNF-α> 100 000 пг/мл и уровнями IL-6 > 10 000 пг/мл в сыворотке через 2 часа. Несмотря на делецию msbB в VNP20009 и его пониженную пирогенность, ЛПС по-прежнему может быть токсичным в высоких дозах, возможно, из-за присутствия гексаацилированного липида А.

Таким образом, штамм pagP-/msbB-, который не может продуцировать гексаацилированный липид А и продуцирует только пентаацилированный липид А, что приводит к меньшей индукции провоспалительных цитокинов, лучше переносится при более высоких дозах и позволяет вводить дозу для человека на уровне 1E9 КОЕ/м ^{2}. Более высокие дозы приводят к усилению колонизации опухолей, резидентных в опухоли иммунных клеток и микроокружения опухоли, повышая терапевтическую эффективность иммуностимулирующих бактерий. Из-за возникающих в результате изменений в бактериальных мембранах и структуре иммунный ответ хозяина, такой как активность комплемента, изменяется, так что бактерии не уничтожаются при системном введении. Например, здесь показано (см., например, пример 5), что мутантные штаммы pagP-/msbB- обладают повышенной устойчивостью к инактивации комплемента и повышенной стабильностью в сыворотке крови человека.

В данном документе представлены иммуностимулирующие бактерии, примером которых являются живые аттенуированные штаммы Salmonella, такие как типовой штамм S. typhimurium, которые могут продуцировать только LPS с пентаацилированным липидом А, которые содержат делецию гена msbB и которые дополнительно модифицированы делецией или разрушением pagP. Как обсуждалось выше, делеция экспрессии msbB предотвращают терминальное миристоилирование липида А, в то время как делеция экспрессии pagP предотвращает пальмитоилирование. Штамм, модифицированный для продукции LPS с пентаацилированным липидом А, приводит к более низким уровням провоспалительных цитокинов, повышенной стабильности в крови, устойчивости к фиксации комплемента, повышенной чувствительности к антимикробным пептидам, повышенной переносимости, и к повышенному противоопухолевому иммунитету.

Соответствующие гены, кодирующие гомологи и ортологи липид-А-пальмитоилтрансферазы (PagP) у других видов бактерий, также могут быть удалены или разрушены для достижения аналогичных результатов. Эти гены включают, но не ограничиваются ими, например, pagP, кодирующий липид IVАпальмитоилтрансферазу в E.coli; и pagP,кодирующий устойчивость к противомикробным пептидам и белок ацилирования липида А в S. typhi.

2. Ауксотрофия питательных веществ

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии можно аттенуировать, делая их ауксотрофными по одному или нескольким необходимым питательным веществам, таким как пурины (например, аденин), нуклеозиды (например, аденозин), аминокислоты (например, ароматические аминокислоты, аргинин и лейцин).), аденозинтрифосфат (АТФ) или другие питательные вещества, известные и описанные в данной области.

a. Делеция/разрушение purI

Фосфорибозиламиноимидазолсинтетаза, фермент, кодируемый геном purI (синоним гена purM), участвует в пути биосинтеза пуринов. Нарушение, делеция или инактивация гена purI, таким образом, делает бактерии ауксотрофными по пуринам. В дополнение к аттенуации, мутанты purI- обогащаются в опухолевой среде и обладают значительной противоопухолевой активностью (см., например, Paweleketal. (1997) CancerResearch 57:4537-4544). Ранее было описано, что эта колонизация является результатом высокой концентрации пуринов, присутствующих в интерстициальной жидкости опухолей в результате их быстрого клеточного обмена. Поскольку PurI- бактерии не способны синтезировать пурины, им необходим внешний источник аденина.

Хотя изначально сообщалось, что штамм VNP20009 содержит делецию гена purI (см., например, Lowetal. (2003) MethodsinMolecularMedicineVol.90, SuicideGeneTherapy: MethodsandReviews, стр. 47-59), последующий анализ всего генома VNP20009 показал, что ген purI не удален, а нарушен хромосомной инверсией (см., например, Broadwayetal. (2014) JournalofBiotechnology 192:177-178). Весь ген purI содержится в двух частях хромосомы VNP20009, окруженных последовательностями вставки, одна из которых имеет активную транспозазу.

В то время как нарушение гена purI ограничивает репликацию в опухолевой ткани/микроокружении, оно все же делает возможной внутриклеточную репликацию и вирулентность. Делеция или нарушение каждого из генов msbB и purI, как показано в настоящем документе (см. Пример 2), требуется для ограничения роста внеклеточного пространства в опухолевой ткани и предотвращения внутриклеточной репликации. В настоящем документе предусмотрены штаммы, в которых кодирующая часть этих генов полностью удалена, чтобы исключить любую возможную реверсию к дикому типу путем рекомбинации.

Помимо делеций или нарушений гена purI, ауксотрофия питательных веществ может быть введена в иммуностимулирующие бактерии путем делеций/мутаций в таких генах, как, например, aro, gua, thy, nad и

asd. Питательные вещества, продуцируемые путями биосинтеза с участием этих генов, часто недоступны в клетках-хозяевах, и поэтому выживание бактерий является сложной задачей. Например, аттенуацияSalmonella и других видов бактерий может быть достигнута путем делеции гена aroA, который является частью пути шикимата, соединяющего гликолиз с биосинтезом ароматических аминокислот (см., например, Felgneretal. (2016) mBio7(5):e01220-16). Делеция aroA приводит к бактериальной ауксотрофии ароматических аминокислот и последующей аттенуации (см, например., патентные публикации США 2003/0170276, 2003/0175297, 2012/0009153, и 2016/0369282; и WO 2015/032165 иWO 2016/025582).

Аналогичным образом, другие ферменты, участвующие в пути биосинтеза ароматических аминокислот, включая aroC и aroD, были удалены для достижения аттенуации (см., например, публикацию США № 2016/0369282 и публикацию международной заявки № WO 2016/025582). . Например, штаммSL7207 S. typhimuriumявляетсяауксотрофомароматическихаминокислот (apoA-мутант); штаммыA1 иA1-R — лейцин-аргининовыеауксотрофы; aVNP20009/YS1646 — пуриновыйауксотроф (мутантpurI-). Как показано в данном документе, VNP20009/YS1646 также является ауксотрофным по отношению к иммуносупрессивному нуклеозиду аденозину и по ATP (см., например, пример 1).

Соответствующие гены, кодирующие гомологи или ортологифосфорибозиламиноимидазолсинтетазы (PurI), и другие гены, необходимые для синтеза пуринов у других видов бактерий, также могут быть удалены или разрушены для достижения аналогичных результатов.

Эти гены включают, но не ограничиваются ими, например, purM, кодирующий фосфори-бозилформилглицинамидциклолигазу в E.coli; purM, кодирующий фосфорибозилформилглицинамидинциклолигазуS.typhi; purA, кодирующий аденилосукцинатсинтетазу, purQ, кодирующий фосфорибозилформилглицинамидинсинтазуII, и purS, кодирующий субъединицу PurSфосфорибозилформилглицинамидинсинтазы в L.

monocytogenes; purM (BL1122), кодирующий фосфорибозилформилглицинамидинциклолигазу в Bifidobacteriumlongum; и NT01CX_RS09765, кодирующий AIR-синтазу, и NT01CX_RS07625 (purM), кодирующий фосфорибозилформилглицинамидинциклолигазу в*Clostridiumnovyi.*

b. Ауксотрофия по аденозину

Метаболиты, полученные из триптофанового и аденозинтрифосфатного (АТФ)/аденозинового путей, являются основными факторами формирования иммунодепрессивной среды внутри опухоли/опухолевого микроокружения (ОМО). Аденозин, который существует в свободной форме внутри и вне клеток, является эффектором иммунной функции. Аденозин снижает индуцированную Т-клеточным рецептором активацию NF-κB и ингибирует IL-2, IL-4 и IFN-γ. Аденозин снижает цитотоксичность Т-клеток, увеличивает анергию Т-клеток и увеличивает дифференцировку Т-клеток в Foxp3 $^{+}$ или Lag3 $^{+}$ регуляторные Т-клетки (клетки T-reg, T-regs или Tregs). На естественных клетках-киллерах (NK) аденозин снижает выработку IFN-γ и подавляет цитотоксичность NK-клеток. Аденозин блокирует адгезию и экстравазацию нейтрофилов, уменьшает фагоцитоз и снижает уровни супероксида и оксида азота. Аденозин также снижает экспрессию TNF-α, IL-12 и MIP-1α (CCL3) на макрофагах, ослабляет экспрессию главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса II и повышает уровни IL-10 и IL-6.

Иммуномодулирующая активность аденозина возникает после его высвобождения во внеклеточное пространство опухоли и активации аденозиновых рецепторов (ADP) на поверхности иммунных, раковых или эндотелиальных клеток-мишеней. Высокий уровень аденозина в микроокружении опухоли приводит к местной иммуносупрессии,

Внеклеточный аденозин продуцируется последовательной активностью ассоциированных с мембраной эктоферментовCD39 (экто-нуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза1, или NTPDase1) и CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), которые экспрессируются на опухолевых стромальных клетках, вместе продуцируя аденозин путем фосфогидролиза ATP или ADP из мертвых или умирающих клеток.

CD39 превращает внеклеточный ATP (или ADF) в 5'-AMP, который с помощью CD73 превращается в аденозин. Экспрессия CD39 и CD73 на эндотелиальных клетках увеличивается в условиях гипоксии микроокружения опухоли, что приводит к повышению уровня аденозина. Гипоксия опухоли может быть результатом неадекватного кровоснабжения и дезорганизованной сосудистой сети опухоли, нарушающей доставку кислорода (см., например, CarrollandAshcroft (2005) Expert. Rev. Mol. Med. 7(6), DOI: 10.1017/S1462399405009117). Гипоксия, возникающая в микроокружении опухоли, также ингибирует аденилаткиназу (АК), которая превращает аденозин в AMP, что приводит к очень высоким внеклеточным концентрациям аденозина.

Внеклеточная концентрация аденозина в гипоксическом микроокружении опухоли была измерена на уровне 10-100 мкМ. что примерно в 100-1000 раз превышает типичную концентрацию внеклеточного аденозина, составляющую примерно 0,1 мкМ (см., например, Vaupeletal. (2016) Adv. Exp. Med. Biol. 876:177-183; и Antonioli et al. (2013) Nat.Rev.Can.13:842-857). Поскольку гипоксические участки в опухолях расположены дистально от микрососудов, локальная концентрация аденозина в одних участках опухоли может быть выше, чем в других.

Для прямого воздействия на иммунную систему аденозин также может контролировать рост и распространение раковых клеток, воздействуя на пролиферацию раковых клеток, апоптоз и ангиогенез. Например, аденозин может способствовать ангиогенезу, в первую очередь за счет стимуляции A_{2A} и A_{2B} рецепторов. Стимуляция рецепторов на эндотелиальных клетках может регулировать экспрессию молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) и E-

селектина на эндотелиальных клетках, поддерживать целостность сосудов и способствовать их росту (см., например, Antoniolietal. (2013) Nat. ,Откр.Can.13:842-857). Активация одного или нескольких из A2A, A2B или A3 на различных клетках аденозином может стимулировать выработку проангиогенных факторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), интерлейкин-8 (IL-8) или ангиопоэтин 2. см., например, Antoniolietal. (2013) Nat. Rev. Can. 13:842-857).

Аденозин также может напрямую регулировать пролиферацию, апоптоз и метастазирование опухолевых клеток посредством взаимодействия с рецепторами на раковых клетках. Например, исследования показали, что активация рецепторов A_1 и A_{2A} способствует пролиферации опухолевых клеток в некоторых клеточных линиях рака молочной железы, а активация рецепторов A2B обладает свойством стимулировать рост рака в клетках карциномы толстой кишки (см., например, Antoniolietal. (2013) Nat.Rev.Can.13:842-857). Аденозин также может запускать апоптоз раковых клеток, и различные исследования связывают эту активность с активацией внешнего пути апоптоза через A3 или внутреннего пути апоптоза через A_{2A} и A_{2B} (см., например,Antoniol*ietal.* (2013) *Nat. Rev. Can.* 13:842-857). Аденозин может способствовать миграции и метастазированию опухолевых клеток за счет увеличения подвижности клеток, адгезии к внеклеточному матриксу и экспрессии белков и рецепторов прикрепления клеток, что способствует движению и подвижности клеток.

Внеклеточное высвобождение аденозинтрифосфата (ATP) происходит из стимулированных иммунных клеток, а также из поврежденных, умирающих или подвергшихся стрессу клеток. Инфламмасома семейства NLR, содержащая пириновый домен 3 (NLRP3), при стимуляции этим внеклеточным высвобождением ATP активирует каспазу-1 и приводит к секреции цитокинов IL-1β и IL-18, которые, в свою очередь, активируют врожденный и адаптивный иммунный ответ. ответы (см., например, StaggandSmyth (2010) Oncogene 29:5346–5358). ATP может накапливаться в опухолевой ткани до концентраций, превышающих 100 мМ, в то время как уровни ATP, обнаруживаемые в здоровых тканях, очень низкие (~1–5 мкМ) (см., например, Songetal. (2016) Am.

J. Physiol. CellPhysiol. .310(2):C99–C114). ATP катаболизируется в аденозин ферментами CD39 и CD73.

Активированный аденозин действует как сильно иммунодепрессивный метаболит через механизм отрицательной обратной связи и оказывает плейотропное действие против множества типов иммунных клеток в гипоксическом микроокружении опухоли (см., например, StaggandSmyth (2010) Oncogene 29:5346–5358). Аденозиновые рецепторы A_{2A} и A_{2B} экспрессируются на различных иммунных клетках и стимулируются аденозином, чтобы способствовать опосредованным cAMФ изменениям передачи сигналов, что приводит к иммуносупрессивным фенотипам Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, дендритных клеток (DC), тучных клеток, макрофагов, нейтрофилов и естественных Т-киллеров (NKT).

В результате уровни аденозина могут накапливаться более чем в сто раз по сравнению с нормальной концентрацией в патологических тканях, таких как солидные опухоли, которые, как было показано, сверхэкспрессируютэктонуклеотидазы, такие как CD73. Также было показано, что аденозин способствует ангиогенезу и развитию опухоли. Таким образом, сконструированная бактерия, ауксотрофная по аденозину, будет демонстрировать усиленное нацеливание на опухоль и колонизацию.

Иммуностимулирующие бактерии, такие как Salmonellatyphi, можно сделать ауксотрофными по аденозину, например, путем делеции гена tsx (см., например, Bucareyetal. (2005) Infection and Immunity 73(10):6210–6219) илипутемделециярurD (см., например, Husseiny (2005) Infection and Immunity 73(3):1598–1605). Было показано, что у грамотрицательных бактерий Xanthomonasoryzae нокаут гена purD является ауксотрофным по аденозину (см., например, Parketal. (2007) FEMSMicrobiol. Lett. 276:55-59). Как показано здесь, штамм S. typhimuriumVNP20009 является ауксотрофным по аденозину из-за его модификациию Следовательно, дальнейшая модификация для придания ему ауксотрофности по аденозину не требуется. Следовательно, варианты осуществления иммуностимулирующих бактериальных штаммов, представленных в настоящем документе, являются ауксотрофными по

аденозину. Такие ауксотрофные бактерии избирательно размножаются в микроокружении опухоли, дополнительно увеличивая накопление и размножение введенных бактерий в опухолях и снижая уровни аденозина в опухолях и вокруг них, тем самым уменьшая или устраняя иммуносупрессию, вызванную накоплением аденозина. Примером таких бактерий, предложенных в настоящем документе, является модифицированный штамм S. typhimurium, содержащий мутации purI-/msbB- для обеспечения ауксотрофии по аденозину.

Для других штаммов и бактерий ген purI может быть нарушен, как это было в VNP20009, или он может содержать делецию всего или части гена purI, что гарантирует невозможность возврата к гену дикого типа. Как описано здесь в другом месте, в штамме VNP20009 ген purI- был инактивирован путем инверсии. Точно так же ген msbB в VNP20009 не был полностью удален.

Используются иммуностимулирующие бактерии, модифицированные путем придания им ауксотрофности по одному или нескольким основным питательным веществам, таким как пурины (например, аденин), нуклеозиды (например, аденозин), аминокислоты (например, ароматические аминокислоты, аргинин и лейцин) или аденозин трифосфат (АТФ). В частности, в вариантах осуществления иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, таких как штаммы S. typhimurium, бактерии становятся ауксотрофными по аденозину и,возможно, по АТФ, и предпочтительно накапливаются в микроокружении опухоли (TME). Следовательно, описанные здесь штаммы иммуностимулирующих бактерий являются аттенуированными, поскольку им для роста требуются пурины, аденозин и/или АТФ, и они предпочтительно колонизируют TME, которые, как обсуждается ниже, содержат большое количество этих метаболитов.

Иммуносупрессивнаяауксотрофия аденозина устраняет иммуносупрессию от аденозина, который накапливается в микроокружении опухоли для некоторых видов рака.

3. Обслуживание и доставка плазмиды

a. Удаление asd

Ген asd у бактерий кодирует аспартатполуальдегиддегидрогеназу. asd-мутанты S. typhimurium имеют облигатную потребность в диаминопимелиновой кислоте (DAP), которая необходима для синтеза клеточной стенки, и будут подвергаться лизису в среде, лишенной DAP. Эта ауксотрофностьDAP может быть использована для селекции плазмид и поддержания стабильности плазмид invivo без применения антибиотиков, когда ген asd дополняется в транс на плазмиде в бактерии. Системы селекции плазмид, не основанные на антибиотиках, имеют преимущество и позволяют 1) использовать вводимые антибиотики в качестве механизма быстрого очищения в случае неблагоприятных симптомов и 2) увеличивать производство без антибиотиков, где такого использования обычно избегают. Система комплементации гена asd обеспечивает такую селекцию плазмид, не основанную на антибиотиках (см., например, Galánetal. (1990) *Gene* 94(1):29-35).

Ожидается, что использование системы комплементации гена asd для поддержания плазмид в микроокружении опухоли повысит эффективность S. typhimurium, сконструированного для доставки плазмид, кодирующих генетические полезные нагрузки/терапевтические продукты, такие как иммуностимулирующие белки (например, цитокины, хемокины, костимулирующие молекулы); цитозольные сенсоры ДНК/РНК, которые индуцируют IFN типа I, такие как STING и IRF3, и их мутанты с приобретением функции/конститутивно активные; антитела и их фрагменты (например, ингибиторы контрольных точек или антитела против IL-6 или против VEGF); биспецифические активаторы Т-клеток (продаются под торговой маркой BiTEs®); интерферирующие РНК; и другие терапевтические продукты, как обсуждалось в другом месте в данном документе и известно в данной области техники; и дополнительные комбинации всех предшествующих терапевтических продуктов.

Альтернативным применением мутанта asdS. typhimurium является использование ауксотрофииDAP для получения аутолитического (или суицидального) штамма для доставки терапевтических продуктов/макромолекул в инфицированные клетки без способности устойчиво колонизировать опухоли хозяина. Делеция гена asd делает бактерии ауксотрофными по DAP при выращивании invitro или invivo. Пример, описанный в настоящем документе, обеспечивает штамм с делецией asd, который является ауксотрофным для DAP и который содержит плазмиду, пригодную для доставки иммуномодулирующих белков, которая не содержит гена, комплементарного asd, приводя к штамму, дефектному для репликации invivo. Этот штамм размножается invitro в присутствии DAP и растет нормально, а затем вводится в качестве иммунотерапевтического агента хозяину-млекопитающему, у которого DAP отсутствует. Суицидальный штамм способен внедряться в клетки-хозяева, но не может реплицироваться из-за отсутствия DAP в тканях млекопитающих, автоматически лизируясь и доставляя свое цитозольное содержимое (например, плазмиды или белки).

Соответствующие гены, кодирующие гомологи или ортологиаспартат-полуальдегиддегидрогеназы (asd) у других видов бактерий, также могут быть удалены или разрушены для достижения аналогичных результатов. Этигенывключают, нонеограничиваютсяими, например, asd, кодирующийаспартат-полуальдегиддегидрогеназу в E.coli; asd (STY4271), кодирующийаспартат-полуальдегиддегидрогеназу S. typhi; asd (lmo1437), кодирующийаспартат-полуальдегиддегидрогеназу в L. monocytogenes; asd (BL0492), кодирующийаспартатполуальдегиддегидрогеназу Bifidobacterium longum; и NT01CX_RS04325 (asd), кодирующийаспартат-полуальдегиддегидрогеназу в Clostridium novyi.

b. Делеция/разрушениеendA

ГенendA (см., например, SEQ ID NO:250) кодируетэндонуклеазу (ДНК-специфическуюэндонуклеазу I; см., например, SEQ ID NO:251),

котораяопосредуетдеградациюдвухцепочечной ДНК (dsДНК) в периплазмеграмотрицательныхбактерий. Наиболее распространенными штаммами лабораторной E. coli являются штаммы endA-, поскольку мутация в гене endA позволяет получить более высокие выходы плазмидной ДНК. Этот ген консервативен среди видов.

Чтобы облегчить доставку интактной плазмидной ДНК, ген endA сконструированных иммуностимулирующих бактерий удаляют или мутируют, чтобы предотвратить его эндонуклеазную активность. Примером таких мутаций является аминокислотная замена E208K (см., например, Durfeeetal. (2008) J. Bacteriol. 190(7):2597-2606) или соответствующая мутация у представляющих интерес видов. endA, включая остаток E208, консервативен среди видов бактерий, включая Salmonella. Таким образом, мутация E208K может быть использована для устранения эндонуклеазной активности у других видов, включая виды Salmonella. Специалисты в данной области могут ввести другие мутации или делеции для устранения активности endA. Воздействие на эту мутацию или удаление или разрушение гена для устранения активности endA в иммуностимулирующих бактериях, таких как Salmonella, повышает эффективность доставки интактной плазмидной ДНК, тем самым повышая экспрессию любого одного, двух или более того, иммуномодулирующих белков/терапевтических продуктов, закодированных на плазмиде, и усиливающих противоопухолевый иммунный ответ и противоопухолевую эффективность.

4. Штаммы с нокаутом флагеллина

Флагеллы- это органеллы на поверхности бактерий, состоящие из длинной нити, которая прикреплена через крючок к вращающемуся органу, который может вращаться по часовой стрелке или против часовой стрелки, обеспечивая средство передвижения. Флагеллы, например, у S. typhimurium важны для хемотаксиса и для установления инфекции оральным путем из-за способности опосредовать подвижность через слизистый слой в желудочно-

кишечном тракте. В то время как было показано, что флагеллы необходимы для хемотаксиса и колонизации опухолевых цилиндроидов invitro (см., например, KasinskasandForbes (2007) CancerRes.67(7):3201-3209), было показано, что подвижность важна для проникновения в опухоль (см., например, ToleyandForbes (2012) Integr. Biol. (Camb) 4(2):165-176), флагеллы не требуются для колонизации опухолей у животных при внутривенном введении бактерий (см., например, Stritzkeretal. (2010) InternationalJournalofMedicalMicrobiology 300:449–456).

Каждая флагеллярная нить состоит из десятков тысяч субъединиц флагеллина. Хромосома S. typhimurium содержит два гена, fliC и fljB, которые кодируют антигенно различные мономеры флагеллина. Мутанты, дефектные как по fliC, так и по fljB, неподвижны и авирулентны при пероральном введении, но сохраняют вирулентность при парентеральном введении.

Флагеллин является основной провоспалительной детерминантой Salmonella (см., например, Zengetal. (2003) J. Immunol. 171:3668-3674) и непосредственно распознается TLR5 на поверхности клеток и NLCR4 на поверхности клеток в цитозоле (см., например, Lightfieldetal. (2008) Nat. Immunol.9(10):1171–1178). Оба пути приводят к провоспалительным реакциям, приводящим к секреции цитокинов, включая IL-1β, IL-18, TNF-α и IL-6. Были предприняты попытки сделать иммунотерапию рака на основе Salmonella более мощной за счет усиления провоспалительной реакции на флагеллин путем конструирования бактерий, секретирующих флагеллинBVibriovulnificus, который вызывает более сильное воспаление, чем флагеллин, кодируемый fliC и fljB (см., например, Zheng и др. (2017) Sci. Transl. Med.9(376):eaak9537).

Здесь бактерии сальмонеллы, такие как S. typhimurium, сконструированы так, чтобы не иметь как субъединиц флагеллинafliC, так и fljB, чтобы уменьшить опосредованную TLR5 провоспалительную сигнализацию. Другие бактерии, содержащие флагеллы, могут быть сконструированы таким же образом для устранения флагелл. Например, как показано в настоящем документе, штамм

Salmonella, лишенный msbB и/или pagP, что приводит к снижению индукции TNF-альфа, сочетается с нокаутами fliC и fljB.

Это приводит к штамму Salmonella, который имеет комбинированное снижение индукции TNF-альфа и снижение распознавания TLR5. Эти бактериальные модификации, msbB-, pagP-, fliC- и fljB-, можно комбинировать с иммуностимулирующей плазмидой,возможно содержащей CpG, кодирующей терапевтические продукты, такие как иммуномодулирующие белки, отдельно или в их комбинациях. Полученные бактерии обладают сниженной провоспалительной сигнализацией, но обладают сильной противоопухолевой активностью. Эти модификации генома также можно комбинировать с другими модификациями генома, описанными в настоящем документе.

Например, как проиллюстрировано и представлено в настоящем документе, двойной мутант fliC и fljB был сконструирован в asd-делетированном штамме S. typhimurium, VNP20009. VNP20009, аттенуированный по вирулентности путем разрушения purI/purM, содержит модификацию гена msbB (частичная делеция), которая приводит к продукции субъединицы липида А, менее токсигенной, чем липид А дикого типа. Это приводит к снижению получения TNF-α в мышиной модели после внутривенного введения по сравнению со штаммами с липидом А дикого типа. Полученный штамм является примером штаммов, у которых аттенуировано бактериальное воспаление путем модификации липида А для снижения передачи сигналов TLR2/4 и делеции экспрессии субъединиц флагеллина для снижения распознавания TLR5 и индукции воспаления.

Патогенез некоторых видов бактерий, включая виды сальмонелл, таких как S. typhimurium, включает группу генов, называемых островами патогенности сальмонелл (SPI). Сальмонелла проникает в нефагоцитирующие эпителиальные клетки кишечника, используя систему секреции типа 3 (T3SS), кодируемую островом патогенности Salmonella 1 (SPI-1), который образует игольчатую структуру, которая вводит эффекторные белки непосредственно в цитозоль клеток-хозяев. Эти эффекторные белки приводят к перестройке цитоскелета эукариотических клеток для облегчения инвазии эпителия кишечника, а также индуцируют провоспалительные цитокины. SPI, обозначенныйкак SPI-1, опосредуетинвазиюэпителиальныхклеток. Гены SPI-1 включают, нонеограничиваютсяими: *avrA*,*hilA*,*hilD*,*invA*,*invB*,*invC*,*invE*,*invF*,*invG*,*invH*,*invI*,*invJ*,*iacP*,*iagB*,*spaO*,*spaP*,*spaQ*,*spaR*,*spaS*,*orgA*,*orgB*,*orgC*,*prgH*,*prgI*,*prgJ*,*prgK*,*sicA*, *sicP*,*sipA*,*sipB*,*sipC*,*sipD*,*sirC*,*sopB*,*sopD*,*sopE*, *sopE2*,*sprB*,and*sptP*.

Делеция одного или нескольких из этих генов снижает или устраняет способность бактерии инфицировать эпителиальные клетки, но не влияет на их способность инфицировать или внедряться в фагоцитирующие клетки, включая фагоцитарные иммунные клетки. Например, было продемонстрировано, что делеция генов fliC и fljB значительно снижает экспрессию генов SPI-1, таких как hilA, hilD, invA, invF и sopB, тем самым снижая способность проникать в нефагоцитирующие клетки (см., например, ,Elhadadetal. (2015) Infect. Immun.83(9):3355-3368).

У таких бактерий, как Salmonella, флагеллин, в дополнение к системе секреции SPI-1 типа 3 (T3SS), необходим для запуска пироптоза в макрофагах и может быть обнаружен инфламмасомой макрофага NLRC4. Устранение субъединиц флагеллина уменьшает пироптоз в макрофагах. Например, S. typhimurium с делециями в fliC и fljB приводит к значительному снижению секреции IL-1β по сравнению со штаммом дикого типа, тогда как клеточное поглощение и

внутриклеточная репликация бактерии остаются неизменными. Это показывает, что флагеллин играет значительную роль в активации инфламмасом. Кроме того, было обнаружено, что штаммы S. typhimurium, сконструированные для конститутивной экспрессии fliC, вызывают пироптоз макрофагов (см., например, Lietal. (2016) Scientific Reports 6:37447; Fink and Cookson (2007) Cellular Micro-biology 9(11): 2562-2570; и Winter*et al.*(2015) *Infect. Immun.* 83(4):1546-1555).

Геном иммуностимулирующих бактерий по настоящему изобретению может быть модифицирован для удаления или мутации генов флагеллинафliC и fljB в S. typhimurium, что приводит к уменьшению гибели резидентных в опухоли иммунных клеток, таких как макрофаги, и усилению противоопухолевого иммунного ответа иммуностимулирующих бактерий.

Делеция субъединиц флагеллина в сочетании с модификацией LPS обеспечивает большую переносимость у хозяина, ограничивает поглощение только фагоцитирующими клетками и уменьшает их пироптозную гибель клеток, а также направляет иммуностимулирующий ответ на доставку терапевтических продуктов, таких как иммуномодулирующие белки, к TME, особенно к резидентным опухолевым миелоидным клеткам. Полученные иммуностимулирующие бактерии вызывают противоопухолевый ответ и способствуют адаптивному иммунному ответу на опухоль.

Соответствующие гены, кодирующие флагеллин у других видов бактерий, также могут быть удалены для достижения аналогичных результатов. Этигенывключают, нонеограничиваютсяими, например, fliC, кодирующийструктурныйбелокфлагеллярнойнити, ufliE, кодирующийбелокFliEбазальноготельцафлагеллыв E. coli; fliC, кодирующийфлагеллин, uflgB, кодирующийпалочковыйбелокбазальноготелафлагеллыFlgBy S. typhi; flaA, кодирующийфлагеллин, fliE, кодирующийбелокфлагеллярногокрючковидногобазальноготельцаFliE, uflgB,

кодирующийбелокфлагеллярногобазальноготельцаFlgB, в L. monocytogenes; и NT01CX_RS04995, NT01CX_RS04990, NT01CX_RS05070.

5. Сконструированные бактрии для промотирования адаптивного иммунитета и повышения Т-клеточной функции

Делеция/разрушение L-аспарагиназыII (*ansB*)

L-аспарагиназаII представляет собой фермент, катализирующий превращение L-аспарагина в аммиак и аспарагиновую кислоту. Некоторые бактериальные штаммы, такие как E. coli и S. typhimurium, используют L-аспарагиназу для удаления фруктозы-аспарагина в качестве источника углерода и азота (см., например, Sabag-Daigleetal. (2018) Appl. Environ. Microbiol.84(5):e01957-17). Злокачественные Т-клетки, например, при остром лимфобластном лейкозе (ALL), требуют аспарагина, поскольку им не хватает ферментов для его синтеза. Введение L-аспарагиназ было передовой терапией ALL с начала 1970-х годов (см., например, Batooletal. (2016) Appl. Biochem. Biotechnol. 178 (5): 900-923).

Продукция L-аспарагиназыIIS. typhimurium одновременно необходима и достаточна для ингибирования Т-клеток, поскольку она непосредственно индуцирует подавление Т-клеточного рецептора (TCR), снижает продукцию цитокинов Т-клетками и ингибирует цитолитическую функцию опухоли (см., например, ,Kullasetal. (2012) Cell Host Microbe.12(6)791-798 и van der Velden et al. (2005) Proc.Natl.Acad.Sci.USA102(49):17769-17774). В условиях быстрой клональной экспансии, например, при активации Т-клеток в микроокружении опухоли, требуется аспарагин. и его истощение L-аспарагиназойII приводит к подавлению Т-клеток. Таким образом, L-аспарагиназаII использовалась в качестве противоракового терапевтического средства для лечения рака, при котором подавление Т-клеток является терапевтическим методом.

В отличие от предыдущих применений L-аспарагиназы в качестве противоракового терапевтического средства, здесь показано, что устранение

активности L-аспарагиназы в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем документе, усиливает функцию Т-клеток в микроокружении опухоли. Устранение активности L-аспарагиназы может быть осуществлено путем модификации бактериального генома для устранения экспрессии активного фермента. Модификации включают вставки, делеции, инверсии и замены нуклеиновых кислот, в результате чего кодируемый фермент становится неактивным, не экспрессируется или устраняется. Здесь показано, что делеция всего или части гена, кодирующего L-аспарагиназуII, ansB, или его разрушение для устранения экспрессии кодируемого фермента в иммуностимулирующих бактериях усиливает функцию Т-клеток в бактериально -колонизированном микроокружении опухоли. Ингибирование активности L-аспарагиназыII достигается делецией всего или части гена ansB в иммуностимулирующих бактериях, или прерыванием/разрушением, при этом L-аспарагиназаII не продуцируется. Таким образом, предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, геномы которых модифицированы таким образом, что L-аспарагиназаII не продуцируется. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии используют для колонизации резидентных в опухоли иммунных клеток для усиления противоопухолевого иммунного ответа; Среди модификаций генома включены делеции, вставки, разрывы и/или другие модификации, устраняющие экспрессию L-аспарагиназыII. предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, геномы которых модифицированы таким образом, что L-аспарагиназаII не продуцируется.

Как показано в настоящем документе, геном иммуностимулирующих бактерий может быть модифицирован для удаления ansB или для его разрушения или иной модификации, что приводит к неактивной кодируемой L-аспарагиназеII или для устранения аспаргиназы, предотвращая подавление Т-клеток и усиливая противоопухолевую функцию Т-клеток invivo. Здесь показано, что штаммы, в которых ansB интактен, вызывают глубокую иммуносупрессию Т-клеток в Т-клетках, инфицированных штаммом. Штаммы, в которых делетированansB, не индуцируют иммуносупрессию, таким образом, решая

другую проблему в данной области, связанную с использованием бактерий для доставки закодированных терапевтических продуктов к опухолям. Таким образом, иммуностимулирующие бактерии, сочетают делеции или нарушения гена ansB, в результате чего функционально кодируемый фермент не экспрессируется,

Соответствующие гены, кодирующие гомологи или ортологиL-аспарагиназыII (ansB) у других видов бактерий, также могут быть удалены или разрушены для достижения аналогичных результатов. Этигенывключают, нонеограничиваютсяими, например, ansB, кодирующий L-аспарагиназу 2 в E.coli; ansB (STY3259), кодирующий L-аспарагиназуS.typhi; ansB (lmo1663), кодирующийаспарагинсинтетазу в L. monocytogenes; и BL1142, кодирующийпредшественник L-аспарагиназы в Bifidobacterium longum.

6. Делеции/разрушения в генах *Salmonella*требуемые для экспрессииCurliFimbriae

Бактерии и грибы способны образовывать многоклеточные структуры, называемые биопленками. Бактериальные биопленки заключены в смесь секретируемых и ассоциированных с клеточной стенкой полисахаридов, гликопротеинов и гликолипидов, а также внеклеточной ДНК, известных под общим названием внеклеточные полимерные вещества. Эти внеклеточные полимерные вещества защищают бактерии от многочисленных воздействий, таких как чистящие средства, антибиотики и противомикробные пептиды. Бактериальные биопленки позволяют заселять поверхности и являются причиной значительной инфекции протезов, таких как инъекционные порты и катетеры. Биопленки также могут образовываться в тканях в ходе инфекции, что приводит к увеличению продолжительности персистенции и выделения бактерий и ограничивает эффективность антибактериальной терапии.

У сальмонелл, таких как S. typhimurium, образование биопленок регулируется с помощью csgD, который активирует оперон csgBAC и приводит

к увеличению продукции субъединиц CsgA и CsgB (см., например, Zakikhanyetal. (2010) MolecularMicrobiology77(3):771–786). CsgA распознается TLR2 как PAMP и индуцирует продукцию IL-8 макрофагами человека (см., например, Tukeletal. (2005) MolecularMicrobiology 58(1):289–304). Кроме того, csgD косвенно увеличивает выработку целлюлозы путем активации гена adrA, который кодирует дигуанилатциклазу. Небольшая молекула циклического дигуанозинмонофосфата (c-di-GMP), продуцируемая adrA, является вездесущим вторичным мессенджером, встречающимся почти у всех видов бактерий. Увеличение c-di-GMP усиливает экспрессию гена целлюлозосинтазыbcsA, что, в свою очередь, увеличивает выработку целлюлозы за счет стимуляции оперонов bcsABZC и bcsEFG, что приводит к образованию целлюлозной биопленки.

В результате бактерии, такие как S. typhimurium, могут образовывать биопленки в солидных опухолях в качестве защиты от фагоцитоза иммунными клетками хозяина. Бактериальные мутанты, такие как мутанты Salmonella, которые не могут образовывать биопленки, быстрее поглощаются фагоцитирующими клетками хозяина и легче очищаются от инфицированных опухолей (см., например, Crulletal. (2011) CellularMicrobiology 13(8):1223). -1233). Это увеличение внутриклеточной локализации в фагоцитирующих клетках может снизить персистенцию внеклеточных бактерий и, как показано в настоящем документе, может повысить эффективность плазмидной доставки терапевтических продуктов, таких как иммуномодулирующие белки и другие противораковые терапевтические средства, как описано в настоящем документе.

Здесь показано, что конструирование иммуностимулирующих бактерий для уменьшения образования биопленки увеличивает скорость очищения от опухолей/тканей, повышая переносимость терапии и предотвращая колонизацию протезов у пациентов, тем самым увеличивая терапевтическую пользу этих штаммов. Известно, что миметики аденозина ингибируют образование биопленки S. typhimurium, указывая на то, что высокая концентрация аденозина в микроокружении опухоли может способствовать образованию биопленки, ассоциированной с опухолью (см., например,

Koopmanetal. (2015) Antimicrob. AgentsChemother. 59:76-84). Здесь показано, что штаммы с делецией csgD демонстрируют повышенную противоопухолевую эффективность из-за большего поглощения бактерий резидентными в опухоли миелоидными клетками.

Соответствующие гены, кодирующие гомологи и ортологиcsgD, и другие гены, которые необходимы для образования фимбрий и биопленок у других видов бактерий, также могут быть удалены, разрушены или иным образом модифицированы для достижения аналогичных результатов. Эти гены включают, но не ограничиваются ими, например, csgD, кодирующий ДНК-связывающий двойной регулятор транскрипции CsgD в E.coli; csgD (STY1179), кодирующий регуляторный белок CsgD у S.typhi; и lcp, кодирующий белок, связывающий целлюлозу Listeria, который участвует в формировании биопленки у L. monocytogenes.

Модификация бактериального генома, например, путем делеции или нарушения генов, превращающих бактерии в csgD-, приводит к элиминации фимбрийcurli и воспалительных циклических динуклеотидов (CDN) и удалению секреции целлюлозы. Это устраняет воспалительные и иммунодепрессивные элементы, предотвращает распознавание TLR4 за счет измененного ацилирования LPS, устраняет секрецию целлюлозы и, таким образом, возможное образование биопленки, тем самым повышая безопасность и эффективность.

Как описано в настоящем документе, бактериальные штаммы, такие как штаммы S. typhimurium, сконструированы так, чтобы быть ауксотрофными по аденозину; и снижена их способность индуцировать провоспалительные цитокины за счет модификации LPS и/или делеции флагеллина; и/или которые не экспрессируют L-аспарагиназуII для улучшения функции Т-клеток; и/или которые содержат делеции генов, необходимых для образования биопленки; и/или которые дополнительно модифицированы для поддержания значительного числа копий плазмиды на клетку, по меньшей мере, от низкого до среднего числа копий или выше, в отсутствие селекции антибиотиков; и которые доставляют кассеты генетической экспрессии, кодирующие

терапевтические продукты, способствуют сильным противоопухолевым иммунным ответам. Плазмиды включают регуляторные последовательности, способствующие секреции закодированных терапевтических продуктов в микроокружение опухоли.

7. Улучшение устойчиости к комплементу

Система комплемента является первой линией иммунной защиты от вторжения патогенов, которые непосредственно активируют лектиновый путь или каскады альтернативного пути (АР) у человека-хозяина. Система комплемента включает более 30 растворимых и связанных с клеточной мембраной белков, которые функционируют во врожденном иммунном ответе для распознавания и уничтожения патогенов, таких как бактерии, инфицированные вирусом клетки и паразиты, а также играют роль в опосредованном антителами иммунном ответе. Активация каскада комплемента приводит к опсонизации чужеродных микробов, высвобождению хемотаксических пептидов и, наконец, к разрушению клеточных мембран бактерий. Три гомологичных гликопротеина в системе комплемента, C3, C4 и C5, играют центральную роль в функции комплемента и взаимодействуют с другими компонентами комплемента. C3b и C4b, полученные из C3 и C4 соответственно, являются важными компонентами конвертаз, которые способствуют активации каскада комплемента. Фрагментами расщепления C5 являются C5a, который индуцирует миграцию фагоцитов в очаг инфекции, и C5b, который инициирует образование мембраноатакующего комплекса и лизис бактерий (см., например, Ramuetal. (2007) FEBSLetters 581:1716). -1720).

Чтобы выжить, патогены разработали стратегии предотвращения пагубных последствий активации комплемента. Например, члены семейства белков наружной мембраны Ail/Lom обеспечивают защиту от зависимого от комплемента уничтожения ряда патогенных бактерий. Членами семейства Ail/Lom, которые включают Ail (локус инвазии прикрепления) видов Yersinia, например, Y. enterocolitica и Y. pseudotuberculosis, Rck (резистентность к уничтожению комплемента) и PagC видов Salmonella и OmpXEscherichiacoli,

являются белки внешней мембраны, которые имеют значительное сходство аминокислотной последовательности и идентичность, а также сходную топологию мембраны. В то время как члены этого семейства белков проявляют различные функции, некоторые из них, в том числе AilY. enterocolitica и Y. pseudotuberculosis, а также RckS. enterica, функционируют, по крайней мере частично, для защиты бактерий от лизиса, опосредованного комплементом (см., например, Bartraetal. (2008) *InfectionandImmunity*76:612–622).

Другим бактериальным продуктом, помогающим избегать комплемента или смягчать его действие, является поверхностная протеаза, обозначаемая как PgtE (сериновая протеаза наружной мембраны) у сальмонелл и других членов семейства омптинов. Поверхностная протеаза PgtES. enterica принадлежит к семейству омптиноваспартатных протеаз наружной мембраны энтеробактерий. Для активности PgtE и других омптинов требуется шероховатый LPS, но они стерически ингибируются О-антигеном. Экспрессия pgtE повышается во время роста Salmonella внутри макрофагов, а бактерии, высвобождаемые из макрофагов, проявляют сильную PgtE-опосредованную протеолитическую активность. PgtEпротеолитически активирует профермент плазминогена плазмы млекопитающих в плазмин, инактивирует основной физиологический ингибитор плазмина, альфа-2-антиплазмин, и опосредует бактериальную адгезию к внеклеточному матриксу клеток человека.

PgtE опосредует деградацию компонентов внеклеточного матрикса и вызывает мощную локализованную протеолитическую активность, которая может способствовать миграции сальмонелл через внеклеточный матрикс. PgtE также расщепляет альфа-спиральные антимикробные пептиды, которые могут быть важны во время внутриклеточного роста сальмонелл. ОмптинPlaYersiniapestis является близким ортологомPgtE и разделяет функции с PgtE. Pla расщепляет C3, а PgtE повышает резистентность Salmonella к сыворотке путем расщепления компонентов комплемента C3b, C4b и C5. Ген pgtE и его ортологи из других видов бактерий могут быть включены в иммуностимулирующие бактерии по настоящему изобретению для повышения устойчивости к комплементу. что может способствовать миграции сальмонелл

через внеклеточный матрикс. PgtE также расщепляет альфа-спиральные антимикробные пептиды, которые могут быть важны во время внутриклеточного роста сальмонелл.

Здесь показано, что эффекты комплемента в сыворотке человека объясняют неэффективность терапевтических иммуностимулирующих бактерий, таких как штамм SalmonellaVNP20009, которые, как было показано, эффективно колонизируют опухоли на моделях грызунов. Системное введение VNP20009 приводило к колонизации опухолей мышей (см., например, Clairmontetal. (2000) J. Infect. Dis. 181:1996-2002; и Bermudesetal. (2001) Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 18:219-33); тогда как системное введение VNP20009 пациентам-людям приводило к очень небольшой колонизации.

В Фазе 1 исследования пациентов с прогрессирующей меланомой очень небольшое количество VNP20009 было обнаружено в опухолях человека после 30-минутной внутривенной инфузии (см. Tosoetal. (2002) J. Clin. Oncol. 20:142-52). Пациенты, участвовавшие в последующем исследовании, оценивающем более длительную четырехчасовую инфузию VNP20009, также продемонстрировали отсутствие обнаруживаемого VNP20009 после биопсии опухоли (см. Heimannetal. (2003) J. Immunother. 26:179–180). После внутриопухолевого введения была обнаружена колонизация производного VNP20009 (см. Nemunaitisetal. (2003) CancerGeneTher.10:737-744). Прямое внутриопухолевое введение VNP20009 в опухоли человека приводило к гораздо более высокой колонизации опухолей, что указывает на то, что опухоли человека могут быть колонизированы на высоком уровне, и что разница в колонизации опухолей между мышами и людьми возникает только после системного введения.

Здесь показано и описано, что, хотя ранее не было известно, что VNP20009 встречается в диком типе S. typhimurium, он инактивируется человеческим комплементом, что объясняет низкую колонизацию опухоли, наблюдаемую у людей при системном введении VNP20009. Представленные здесь штаммы проявляют устойчивость к комплементу. Они могут быть модифицированы для экспрессии Rck и других белков, участвующих в опосредовании устойчивости

или избегания комплемента, таких как AilYersiniaenterocolitica или PgtESalmonellatyphimurium, или, если они нативно экспрессируют такой белок, они могут быть модифицированы для сверхэкспрессииRck и/ или других подобных белков. Rck можно вводить в бактерии, такие как E. coli, у которых отсутствует гомолог.

Экспрессия*Rck*

Rck (резистентность к уничтожению комплементом) представляет собой белок наружной мембраны массой 17 кДа, кодируемый крупной вирулентной плазмидой видов Salmonella, таких как S. enteritidis и S. typhimurium, который индуцирует адгезию и инвазию эпителиальных клеток. Было показано, что белок Rck защищает S. enterica от комплемента, ингибируя полимеризацию C9 и последующую сборку функционального мембраноатакующего комплекса. Мутант rck показал 2-3-кратное снижение инвазии эпителиальных клеток по сравнению со штаммом дикого типа, в то время как сверхэкспрессиярck в диком типе приводит к усилению инвазии. Белок Rck индуцирует проникновение в клетку с помощью рецептор-опосредованного процесса, способствуя локальному ремоделированию актина и слабому и тесно прилегающему расширению мембраны.

Таким образом, сальмонелла может проникать в клетки по двум различным механизмам: триггерный механизм, опосредованный комплексом T3SS-1, и механизм Zipper, индуцированный rck (см., например, Manonetal. (2012), Salmonella, Chapter 17, eds. AnnousandGurtler, Rijeka, pp. 339-364). Экспрессия rck на плазмиде вирулентности Salmonella придает высокий уровень устойчивости к нейтрализации человеческим комплементом, предотвращая образование мембраноатакующего комплекса. Когда плазмида вирулентности S.typhimurium, содержащая rck, экспрессировалась в высокочувствительном к сыворотке штамме E.coli, Rck был способен восстанавливать устойчивость к комплементу.

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии сохраняют или содержат Rck для придания устойчивости к человеческому комплементу. Здесь показано, что иммуностимулирующие бактерии, такие как E. coli, можно модифицировать путем кодирования rck на плазмиде в бактериях, чтобы тем самым придать устойчивость к комплементу.

Иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные в настоящем документе, кодируют rck либо эндогенно, либо могут быть модифицированы для его кодирования с целью повышения устойчивости к комплементу. Также предложены способы придания устойчивости к комплементу. Например, терапевтические виды E. coli, описанные в публикациях заявок США №№ 2018/0325963 и 2018/0273956, а также в патентах США №№ 9,889,164 и 9,688,967, могут быть улучшены путем модификации бактерий в них, например путем введения нуклеиновой кислоты, кодирующей ген rckSalmonella на плазмиде, чтобы таким образом улучшить или обеспечить устойчивость к комплементу. Бактерии, устойчивые к комплементу, можно вводить системно, и достаточное количество бактерий может выжить, чтобы быть терапевтически эффективными

Нуклеиновые кислоты, кодирующие ген rckSalmonella, вводят в бактерии, такие как терапевтическая E. coli, чтобы тем самым придать или повысить устойчивость к комплементу.Другиеортологи и гомологи rck из других видов бактерий аналогичным образом могут экспрессироваться в иммуностимулирующих бактериях. Например, Ail представляет собой гомолог Rck из Yersiniaenterocolitica, который усиливает устойчивость к комплементу при гетерологичной экспрессии. PgtE представляет собой поверхностную протеазу S. typhimurium, которая, как также было показано, повышает устойчивость к комплементу при гетерологичной экспрессии.

8. Делеции в генах, необходимые для экспресиилипопротина в *Salmonella*и других грамотрицательных бактериях.

LPS и липопротеин Брауна (муреин) (Lpp) являются основными компонентами внешней мембраны грамотрицательных кишечных бактерий, которые действуют как мощные стимуляторы воспалительных и иммунных реакций. Липопротеин Брауна (муреин) (Lpp) является одним из наиболее распространенных компонентов наружной мембраны S. typhimurium и приводит к индукции TLR2 провоспалительных цитокинов, таких как TNFα, IL-6 и IL-8 (у людей). Две функциональные копии гена липопротеина (lppA (SEQIDNO:387) и lppB (SEQIDNO:388)), расположенные на бактериальной хромосоме Salmonella, способствуют вирулентности бактерий. Делеция генов lppA и lppB и элиминация экспрессии липопротеинов снижает вирулентность и снижает выработку провоспалительных цитокинов (см., например, Shaetal. (2004) Infect. Immun. 72(7):3987-4003; Fadletal. и др. (2005) Infect. Immun. 73(2):1081-1096).

Можно ожидать, что делеция генов Lpp уменьшит инфицирование клеток и, таким образом, уменьшит доставку плазмиды и экспрессию кодируемых терапевтических продуктов или белков. Однако, как показано в примере 18 ниже, хотя делеция этих генов действительно уменьшала колонизацию опухоли, количество плазмиды, доставляемой в клетки-мишени, иммунные клетки, резидентные опухоли, особенно макрофаги, значительно увеличивались.

9. Надежные иммуностимулирующие бактерии, геномы которых модифицированы для оптимизации для противоопухолевой терапии и которые кодируют терапевтические продукты, включая их множество

Как описано в настоящем документе, бактериальные штаммы, такие как штаммы S. typhimurium, которые сконструированы так, чтобы быть ауксотрофными по аденозину, и у которых снижена их способность индуцировать провоспалительные цитокины путем модификации LPS и/или делеции флагеллина, и/или модифицированы делецией или элиминацией экспрессии L-аспарагиназыII для улучшения функции Т-клеток, и/или

модифицированы делецией или разрушением генов, необходимых для образования биопленки, и/или демонстрируют повышенную выживаемость в сыворотке крови человека из-за повышенной экспрессии rck, дополнительно модифицированы для доставки терапевтических продуктов, таких как иммуномодулирующие белки, и стимулирования сильных противоопухолевых иммунных ответов.

В таблице ниже приведены бактериальные генотипы/модификации, их функциональные эффекты и некоторые из достигнутых здесь эффектов/преимуществ.

Генотип/Модификация	**Функциональный эффект**	**Эффект/Преимущество**
Δ*asd* (в геноме)	Поддержание плазмиды	Улучшает доставку плазмиды. Поддержание плазмиды *invivo*через*asd*кассетуна плазмиде
Δ*purI*	Ауксотропия пурин/аденозин	Опухолеспецифическое обогащение Ограниченная репликация в здоровых тканях
Δ*msbB*	LPS поверхностнаяпокровнаямодификация	Уменьшает распознавание TLR4 Снижает иммуносуппрессивныйцитокиновый профиль (TNF-α) Улучшает безопасность Предохраняет от интраклеточной репликации
Δ*fliC*/Δ*fljB*(ΔFLG)	Нокаут флагеллы	Удаляет основные воспалительные и

Генотип/Модификация	**Функциональный эффект**	**Эффект/Преимущество**
		иммуносуппрассивные элементы Удаляет распознавание TLR5 Снижает иммуносуппрассивныйцитокиновыйпрфиль Улучшает безопасность Снижает способность вторгаться в нефагоцитарные клетки (т.е., стромальные и опухолевые клетки)
Δ*pagP*	LPSповерхностная покровная модификация	Удаляет основные воспалительные и иммуносуппрассивные элементы Снижает распознавание TLR5 Снижает продукцию IL-6 Улучшает безопасность
Δ*ansB*	Нокаут L-аспарагиназыII	Повышает функцию опухолевыхТ-клеток
Δ*csgD*	Удаляет curli fimbriae, полученицеллюлозы, c-di-GMP	
Плазмида	Экспрессирует продукцию генаподконтролем узнаваемого хозяином промотора	Эукариотический промотер ограничивает экспрессию клеток, содержащих плазмиду Длительная экспрессия TME (те.., *asd*кодирована на плазмиде под контролем

Генотип/Модификация	Функциональный эффект	Эффект/Преимущество
		узнаваемого хозяином промотера) Экспрессия любой комбинации терапевтических продуктов при большой мощностиty CpGsиндуцирует правильный вирусоподобный иммунный ответ

Предусмотренные здесь штаммы представляют собой ΔFLG, и/или ΔpagP, и/или ΔansB, и/или ΔcsgD. Кроме того, штаммы представляют собой один или несколько из ΔpurI (ΔpurM), ΔmsbB и Δasd (в бактериальном геноме). В частности, этоштаммы ΔpurI (ΔpurM), ΔmsbB, ΔpagP, ΔansB и Δasd. Штаммы также могут быть lppA- и/или lppB-, особенно lppA-/lppB- . Плазмида модифицируется для кодирования терапевтических продуктов под контролем промоторов, распознаваемых хозяином (например, эукариотических промоторов, таких как промоторы РНК-полимеразы II, в том числе из эукариот, и вирусов животных). Плазмиды могут кодировать asd, обеспечивающий репликацию бактерий invivo, и могут кодировать нуклеиновые кислоты с другими полезными функциями (например, CpG), а также могут кодировать генные продукты, как описано в другом месте настоящего документа.

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии можно модифицировать для устранения способности инфицировать эпителиальные клетки, например, путем удаления флагелл. Ликвидация способности инфицировать эпителиальные клетки, как описано здесь в других местах, также может быть достигнута путем инактивации SPI-1-зависимой инвазии путем инактивации или нокаута одного или нескольких генов, участвующих в пути SPI-1. Этигенывключают, нонеограничиваютсяими, ещеодиниз: avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invI, invJ, iacP, iagB, spaO, spaP, spaQ,

spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgI, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA, sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB и sptP. Дополнительно или альтернативно, иммуностимулирующие бактерии могут содержать нокауты или делеции в генах для инактивации продуктов, участвующих в SPI-1-независимой инфекции/инвазии, таких как один или несколько генов fljB, fliC, rck, pagN, hlyE, pefI, srgD, srgA, srgB, и srgC, и/или иммуностимулирующие бактерии могут содержать нокауты или делеции для инактивации продуктов генов, индуцирующих клеточную гибель резидентных в опухоли иммунных клеток, таких как гены, кодирующие белки, непосредственно распознаваемые инфламмасомой, включая fljB, fliC, prgI (белок иглы) и prgJ (белок палочки).

Однако ген rck желателен, поскольку он защищает от инактивации против комплемента. Бактерии, которые эндогенно не кодируют rck, могут быть модифицированы для кодирования гетерологичного гена rck. и/или иммуностимулирующие бактерии могут содержать нокауты или делеции для инактивации продуктов генов, индуцирующих гибель резидентных в опухоли иммунных клеток, таких как гены, кодирующие белки, которые непосредственно распознаются инфламмасомой, включая fljB, fliC, prgI (белок иглы) и prgJ (палочковый белок).

Иммуностимулирующие бактерии получают из подходящих бактериальных штаммов. Бактериальные штаммы могут быть аттенуированными штаммами или штаммами, аттенуированными стандартными методами или аттенуированными в силу модификаций, представленных в настоящем документе, в том смысле, что их способность к колонизации ограничена в первую очередь иммунопривилегированными тканями и органами, в частности резидентными в опухоли иммунными клетками, TME и опухолевыми клетками, включая солидные опухоли. Бактериивключают, нонеограничиваютсяими, например, штаммы*Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *E. coli*, and *Bifidobacteriae*.Например, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, and *Salmonella enteritidis*. Другиештаммывключают*Rickettsia*, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*,*Francisella*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*,*Haemophilus*,

Brucella, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*,*Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Vibrio*, *Bacillus*, и*Erysipelothrix*.Например, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia tsutsugamuchi*, *Rickettsia mooseri*, *Rickettsia sibirica*,*Bordetella bronchiseptica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Francisellatularensis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Citrobacter freundii*, *Chlamydia pneumoniae*,*Haemophilussomnus*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium intracellulare*, *Legionella pneumophila*,*Rhodococcusequi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter mustelae*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*,*Erysipelothrixrhusiopathiae*, *Yersinia enterocolitica*,*Rochalimaeaquintana*, and *Agrobacterium tumerfacium*.

Примерами иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, являются виды Salmonella. Примерами бактерий для модификации, как описано в настоящем документе, являются штаммы Salmonella дикого типа, такие как штамм, обладающий всеми идентифицирующими характеристиками штамма, депонированного в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа 14028. Сконструированные штаммы Salmonellatyphimurium, такие как штамм YS1646 (каталог ATCC № 202165, также обозначаемый как VNP20009; см. также публикацию международной заявки PCT № WO 99/13053), сконструированы с использованием плазмид для комплементациинокаутного гена asd и для позволяют поддерживать плазмиды без антибиотиков. Затем штаммы модифицируют, чтобы удалить гены флагеллина и/или удалить pagP. Комбинация нокаута флагелл и делеции pagP придает штамму высокую устойчивость к комплементу сыворотки крови человека.

Штаммы также становятся ауксотрофными по пуринам, особенно по аденозину, и являются asd- и msbB-. Как видно из примера, штаммы, в которых полностью делетированыpurI и msbB, более приспособлены (растут быстрее), чем штамм VNP20009, в котором эти гены не делетированы, а модифицированы для устранения экспрессии. Ген asd может быть предоставлен на плазмиде для репликации invivo в эукариотическом хозяине. Штаммы также имеют модификацию, такую как делеция, разрушение или другая модификация гена

ansB, препятствующую выработке ими иммунодепрессивной L-аспарагиназыII и улучшающую функцию опухолевых Т-клеток. Штаммы также модифицированы для устранения образования биопленки, например, путем делеции csgD, что делает их неспособными продуцировать фимбрии завитков, целлюлозу и c-di-GMP, уменьшая нежелательные воспалительные реакции, предотвращая от образования биопленки.

Эти геномные делеции и плазмиды описаны и проиллюстрированы в другом месте настоящего документа. Любая из нуклеиновых кислот, кодирующих терапевтические продукты, такие как иммуностимулирующие белки и другие продукты, описанные в других разделах настоящего документа и/или известные специалистам в данной области, могут быть включены в плазмиду. Плазмида обычно присутствует в количестве копий от низкого до среднего, как описано в другом месте настоящего документа. Терапевтические продукты включают мутанты цитозольных сенсоров ДНК/РНК с усилением функции, которые могут конститутивно вызывать/индуцировать экспрессию IFN типа I, и другие иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, которые способствуют противоопухолевому действию. иммунный ответ в микроокружении опухоли и другие подобные продукты, описанные здесь.

Плазмиды также могут кодировать антитела и их фрагменты, например одноцепочечные антитела, которые нацелены на иммунные контрольные точки и другие мишени рака, такие как VEGF, IL-6 и TGF-β, и другие молекулы, такие как биспецифические активаторы Т-клеток или BiTEs®. Плазмиды также могут кодировать рецепторы-ловушки, связывающие IL-6, рецепторы-ловушки, связывающие TGF-бета, и полипептидные антагонисты TGF-бета. Как описано ниже, плазмида может кодировать один или несколько терапевтических продуктов/генетических полезных нагрузок (т.е. мультиплексированных) для доставки противораковых терапевтических продуктов в опухоль/микроокружение опухоли. Продукты могут быть оперативно связаны с транспортными сигналами, такими как сигналы секреции. Продукты также могут быть разработаны для экспрессии на клеточной поверхности, такой как миелоидные клетки, резидентные в опухоли.

10. Преобразование макрофагов фенотипа M2 в макрофаги фенотипа M1 и M1-подобного фенотипа.

Как описано в настоящем документе, иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные в настоящем документе, накапливаются в макрофагах и/или нацелены на них. Макрофаги представляют собой фагоцитирующие иммунные клетки; они играют роль в очищении стареющих и апоптотических клеток, а также в фагоцитозе иммунных комплексов и патогенов и в поддержании гомеостаза. Фенотип и функция макрофагов могут быть поляризованы микроокружением. Различают два типа: M1-тип (классически активируемые макрофаги) и M2-тип (альтернативно активируемые макрофаги).Роль макрофагов M1 заключается в секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также в представлении антигенов и, таким образом, в участии в положительном иммунном ответе и функционировании в качестве иммунного монитора. Макрофаги M1 продуцируют провоспалительные цитокины, включая IL-6, IL-12 и TNF-α.

Макрофаги M2 секретируют аргиназу 1,IL -10, TGF-β и другие противовоспалительные цитокины, которые уменьшают воспаление, способствуют росту опухоли и иммуносупрессивной функции. Таким образом, для лечения рака и других подобных заболеваний и расстройств предпочтительным является M1 или M1-подобный фенотип.

Макрофаги M2 могут превращаться в макрофаги M1 или в макрофаги с M1-подобным фенотипом. Представленные в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии, которые инфицируют макрофаги, могут преобразовывать макрофаги M2 в M1 или M1-подобный фенотип. Фенотипические маркеры макрофагов M1 включают CD80 (также известный как B7, B7.1 или BB1), CD86 (также известный как B7.2), CD64 (также известный как высокоаффинный гамма-Fc-рецептор I высокой аффинности), CD16 и CD32 (также известный как B7.2). известный как низкоаффинный гамма-рецептор Fc иммуноглобулина IIb).

Экспрессия синтазы оксида азота (iNOS) в макрофагах M1 также может служить фенотипическим маркером. CD163 и CD206 являются маркерами для идентификации макрофагов M2. Аргиназа 1 (Arg1) и DECTIN-1 также являются идеальными фенотипическими индикаторами для идентификации макрофагов M2. Таким образом, опухолеассоциированные макрофаги (TAM) связаны с иммуносупрессивным фенотипом M2. Предлагаемые здесь иммуностимулирующие бактерии могут преобразовывать такие макрофаги в M1 или M1-подобный фенотип.

Предусмотренные здесь иммуностимулирующие бактерии, которые кодируют терапевтический продукт, который приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN), могут осуществлять такое превращение. Это свойство является уникальным для иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, и использует способность бактерий, которые включают геномные модификации, приводящие к инфицированию макрофагов. Закодированные терапевтические продукты включают те, которые являются частью пути цитозольного ДНК/РНК-сенсора, такие как варианты STING (подробно описанные здесь). Кодирующие иммуностимулирующие бактерии могут вызывать превращение в фенотип M1 (или M1-подобный фенотип) при инфицировании резидентных в опухоли макрофагов и экспрессии терапевтического продукта (продуктов). Эта способность преобразовывать фенотипы макрофагов продемонстрирована и проиллюстрирована в примере 12 ниже. Экспрессия модифицированного белка STING иммуностимулирующими бактериями по настоящему изобретению, которые инфицируют макрофаги и экспрессируют белок STING, преобразует фенотип макрофагов M1 в макрофаги M2.

Представленные в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии, которые включают модификации генома, как описано в настоящем документе, такие как устранение флагелл и модификация LPS, превращают инфицированные макрофаги M2 в те, которые индуцируют профили цитокинов макрофагов M1. Иммуностимулирующие бактерии, которые экспрессируют вариант белка STING, который приводит к конститутивной экспрессии IFNI

типа в первичных макрофагах M2 человека, превращают эти клетки в M1-подобные (имеющие фенотипические маркеры и/или профили экспрессии, типичные для макрофагов M1) клетки, продуцирующие IFNI типа.

Примеры демонстрируют это изменение от M2 к M1-подобному или M1 фенотипу. Сравнение профилей цитокинов в неинфицированных макрофагах M2 с индуцированными цитокинами в макрофагах M2, инфицированных штаммом сальмонеллы, который представляет собой Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgDM2, индуцирует высокий уровень секреции IFNγ, CXCL10 и CXCL11. Инфекциятемжештаммом, которыйбылтрансформированплазмидами, кодирующимиhuSTINGtazCTT N154S + вариант R284G, WT huIL-12 и huSTINGtazCTT N154S + вариант R284G или WT huIL-15, вызывалаболеевысокиесекреции CXCL10 и CXCL11, чемнетрансформированный ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgDштамм, несодержащийплазмиды. Профили цитокинов, характерные для M1 или M1-подобных фенотипов, индуцировались различными полезными нагрузками в штаммах. Типичные результаты подробно описаны в примерах.

D. ИММУНОСТИМУЛЯТОРНЫЕ БАКТЕРИИ С ПОВЫШЕННЫМ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ИНДЕКСОМ, КОДИРУЮЩИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛЕЗНЫЕ НАГРУЗКИ, СТИМУЛИРУЮЩИЕ ИММУННЫЙ ОТВЕТ В МИКРООКРУЖЕНИИ ОПУХОЛИ

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии модифицированы таким образом, что они накапливаются в микроокружении опухоли и в резидентных в опухоли миелоидных клетках, где экспрессируются терапевтические продукты под контролем эукариотических промоторов. Бактерии кодируют терапевтические продукты, в частности, противораковые продукты, включая продукты, стимулирующие иммунную систему и/или реверсирующие или смягчающие иммунодепрессивные эффекты

опухолей. Как описано в настоящем документе, бактерии могут кодировать множество продуктов, где экспрессия каждого продукта находится под контролем отдельного промотора, или они находятся под контролем одного промотора, и могут включать последовательности, которые приводят к экспрессии отдельных продуктов, и, при необходимости включать регуляторные последовательности для обеспечения секреции кодируемых продуктов в микроокружение опухоли.

Продукты могут кодироваться на плазмиде. Как обсуждалось, плазмида может кодировать один продукт или их множество.

Каждый продукт может находиться под контролем другого эукариотического промотора, или несколько кодируемых продуктов могут экспрессироваться под контролем одного промотора, например, путем включения саморасщепляющихся пептидов 2A между кодирующими частями, таких как T2A (SEQIDNO:327) ,P2A (SEQIDNO:328), E2A (SEQIDNO:329) и F2A (SEQIDNO:330). Кодируемые продукты включают продукты, описанные в настоящем документе, и они могут быть противораковыми иммуностимулирующими продуктами, активности которых дополняют друг друга. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии позволяют комбинаторно вводить несколько иммуномодулирующих продуктов или полезных нагрузок (мультиплексных полезных нагрузок), которые в противном случае были бы слишком токсичными при системном введении. Примеры мультиплексированных полезных нагрузок включают один или несколько цитокинов, иммуностимулирующий белок для стимуляции или индукции экспрессии IFN типа I, такой как STING или его вариант, обладающий повышенной активностью или являющийся конститутивно активным, и костимулирующую молекулу, такую как сконструированная костимулирующая молекула 4-1BBL. В настоящем документе предложен модифицированный полипептид 4-1BBL и кодирующая нуклеиновая кислота, которая проявляет улучшенную экспрессию и активность при кодировании на плазмиде в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем документе,

которые доставляют плазмиды в миелоидные клетки для экспрессии под контролем транскрипционного и трансляционного аппарата хозяина. .

Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии обладают сильным противоопухолевым действием, включая обеспечение излечения, например, после внутривенного введения мультиплексных полезных нагрузок или полезных нагрузок с одним агентом. Иммуностимулирующие бактерии при системном введении проникают и обогащаются в солидных опухолях, TME и резидентных в опухоли миелоидных клетках, в которых экспрессируются закодированные терапевтические продукты, а затем локально доставляются в микроокружение опухоли. При поглощении (фагоцитозе) резидентными опухолевыми миелоидными клетками бактерии доставляют плазмиду, кодирующую генетическую полезную нагрузку, которая обеспечивает эктопическую, одиночную или мультиплексную экспрессию полезной нагрузки опухолеспецифическим образом.

1. Иммуностимулирующие белки

Иммуностимулирующие бактерии по настоящему изобретению могут быть модифицированы для кодирования одного или нескольких иммуностимулирующих белков, которые стимулируют, индуцируют или усиливают противоопухолевый ответ. Как показано и описано в примерах, порядок расположения кодирующих нуклеиновых кислот на плазмиде может улучшить общую экспрессию, а модификации плазмид могут улучшить приспособленность бактерий, содержащих плазмиды, кодирующие белки.

Иммуностимулирующий белок может быть закодирован на плазмиде в бактерии под контролем эукариотического промотора, такого как промотор, распознаваемый РНК-полимеразой II, для экспрессии у эукариотического субъекта, в частности у субъекта, которому должна быть введена иммуностимулирующая бактерия , например человек. Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуностимулирующий белок (белки), может включать, помимо

эукариотического промотора, другие регуляторные сигналы для экспрессии или переноса в клетки, такие как секреция или экспрессия на поверхности клетки.

Иммуностимулирующие белки представляют собой белки, которые в подходящей среде, такой как микроокружение опухоли (TME), могут стимулировать противоопухолевый ответ субъекта, которому вводят иммуностимулирующую бактерию, или участвовать в нем, или усиливать его. Иммуностимулирующие белки включают, но не ограничиваются ими, цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы.

К ним относятся цитокины, такие как, но не ограничиваясь ими,IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), комплекс альфа-цепи IL-15/IL-15R, IL-36γ, GM-CSF, IFNα, IFNβ, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra и IL-2, модифицированный таким образом, что он не связываться с IL-2Ra; хемокины, такие как, но не ограничиваясь ими, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11; и/или костимулирующие молекулы, такие как, но не ограничиваясь ими, CD40, CD40L, OX40, OX40L, 4-1BB, 4-1BBL, с цитоплазматическим доменом, делетированным или укороченным (4-1BBLΔcyt), членами суперсемействаTNF/TNFR (например, CD27 andCD27L), и члены семейства B7-CD28 (например, CD80, CD86, ICOS, и лигандICOS (B7RP1)).

Предполагается, что другие такие иммуностимулирующие белки, которые используются для лечения опухолей или которые могут стимулировать, усиливать или иным образом усиливать или вызывать противоопухолевый ответ, известные специалистам в данной области, могут быть кодированы иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе. . Например, иммуностимулирующие бактерии могут доставлять генетическую нагрузку, кодирующую укороченную костимулирующую молекулу (например, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 и OX40L) с полной или частичной делецией цитоплазматического домена, для экспрессии на APC, где продукт укороченного гена способен к конститутивной

иммуностимулирующей передаче сигналов Т-клетке посредством участия костимулирующего рецептора и неспособен к контррегуляторной передаче сигнала к APC из-за удаленного или укороченного цитоплазматического домена. Как описано в других местах настоящего документа, модифицированный укороченный цитоплазматический домен, например, 4-1BBL содержит определенные остатки для обеспечения правильной ориентации белковых доменов, что увеличивает экспрессию белка.

Делеция (полная или частичная) и модификация цитоплазматического домена костимулирующих молекул, как описано в настоящем документе, усиливает активацию костимулирующей молекулы без иммуносупрессивной обратной передачи сигналов. Это проиллюстрировано в отношении 4-1BBL, как описано в примерах и следующим образом; те же самые модификации, включая замену остатков в усеченном цитоплазматическом домене для обеспечения правильной ориентации в мембране, могут быть применены к любой костимулирующей молекуле, а также к другим трансмембранным полипептидам.

Полноразмерная последовательность человеческого 4-1BBL (SEQIDNO:389, см. также UniprotP41273):

*MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLP***WALVAGLLLLLLLAAACAVFL**ACP
WAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID
GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG
EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA
GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE,

где цитоплазматический домен соответствует аминокислотам 1-28 (выделено курсивом), трансмембранный домен соответствует аминокислотам 29-49 (жирный шрифт), а внеклеточный домен соответствует аминокислотам 50-254 (подчеркнуто). Последовательность 4-1BBLΔcyt человека (см. SEQ ID NO: 390):

M**WALVAGLLLLLLLAAACAVFL**ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSP
DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED

TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA
LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG
ATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE,

которыйтакойже, какиполноразмерныйбелок,
ноцитоплазматическийдоменотсутствует,
такчтотрансмембранныйдоменсоотвествуетаминокислотнымостаткам(жирныйш
рифт), ивнеклеточныйдоменсоответствуетаминокислотнымостаткам23-227
(подчеркнуто).

Пример человеческого 4-1BBL, где укороченный цитоплазматический домен таков (see, SEQIDNO:391):
*MRVLP***WALVAGLLLLLLLLAAACAVFL**ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGP
ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY
KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA
ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT
QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE,

При этом укороченный цитоплазматический домен соответствует остаткам RLVP (выделены курсивом), с инициирующей M, трансмембранный домен соответствует остаткам 6-26 (жирный шрифт), а внеклеточный домен соответствует остаткам 27-231 (подчеркнуто).

Что касается полноразмерного 4-1BBL, положительно заряженные аминокислоты, такие как R и K, имеют тенденцию располагаться в цитоплазме (внутри/цитоплазматического домена), что ориентирует трансмембранный домен так, что N-конец находится внутри. Но когда цитоплазматический домен усечен, это изменяет баланс зарядов, так что снаружи (во внеклеточном домене) остаются только положительные заряды. Это способствует конфигурации, в которой N-конец белка находится снаружи, а не по направлению к цитоплазме, что приводит к конфигурации «наизнанку». Если это наблюдается, например, по явно более низкой активности или экспрессии или другим параметрам, вариант 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом можно модифицировать,

включив в него положительные остатки, чтобы обеспечить правильную ориентацию белка в клеточной мембране при экспрессии. Примерами возможных модификаций 4-1BBL являются те, в которых остатки заменены положительно заряженными остатками или включена метка c-myc. Специалист может предусмотреть другие подобные замены/добавления для достижения того же результата.

Примеры модифицированных вариантов человеческого 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом включают следующие, в которых дополнительные положительные остатки (аргинин (R), лизин (K), выделены курсивом) включены в область цитоплазматического домена следующим образом, так что полученный белок , когда экспрессируется в клетке, правильно ориентирован (имеет правильную конфигурацию, а не конфигурацию «наизнанку»). См. SEQIDNO: 391 и 392 соответственно:

Усеченныйцитоплазматическийдомен:

M*R*VLP**WALVAGLLLLLLLAAACAVFL**ACPWAVSGA*R*ASPGSAASPRLREG PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

Этодобавляетположительныйзарядобратнок N-концу (R), чтоспособствуетконфигурации, вкоторой N-конецправильноориентированвнутрицитоплазмы. В другом примере добавляется тег MYC.

Усеченный цитоплазматический домен с меткой MYC:

M*EQKLISEEDL**R*VLP**WALVAGLLLLLLLAAACAVFL**ACPWAVSGARASPGS AASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL

QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

Для последовательностей полноразмерного мышиного 4-1BBL и типичных последовательностей mu4-1BBLΔcyt (мышиный 4-1BBL с делецией цитоплазматического домена), mu4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом и mu4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом и тег MYC, см. пример 19 ниже; см. также SEQIDNO: 393-396 соответственно.

Дополнительные или альтернативные аминокислотные замены могут быть включены в костимулирующие молекулы для обеспечения правильной ориентации экспрессируемого белка в мембране. Специалист в данной области может легко приготовить другие подобные модификации, чтобы гарантировать правильную ориентацию трансмембранного белка с укороченным цитоплазматическим доменом.

В дополнение к делеции или укорочению цитоплазматического домена костимулирующие молекулы (например, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 и OX40L) для экспрессии на APC также можно модифицировать путем введения аминокислотных модификаций. такие как инсерции, делеции и/или замены в цитоплазматическом домене, так что модифицированный генный продукт способен к конститутивной иммуностимулирующей передаче сигнала Т-клетке посредством вовлечения костимулирующего рецептора и неспособен к контррегуляторному сигналу к APC из-за модификаций цитоплазматического домена. Например, иммуносупрессивная обратная (внутриклеточная) передача сигналов может быть устранена путем модификации сайтов фосфорилирования цитоплазматического домена, например, путем замены одного или нескольких остатков Ser в соответствующем локусе или локусах остатком, который снижает или устраняет обратную передачу сигналов. Например, для человеческого 4-1BBLиммуносупрессивная обратная (внутриклеточная) передача сигналов может быть устранена путем модификации сайтов фосфорилирования цитоплазматического домена, включая Ser5 и Ser8, относительно последовательности полноразмерного человеческого 4-1BBL (SEQIDNO:

389). Остатки серина в цитоплазматическом домене могут быть заменены любым другим остатком, который уменьшает или устраняет обратную передачу сигналов.

Дополнительные или альтернативные аминокислотные замены могут быть включены в костимулирующие молекулы для устранения иммуносупрессивной внутриклеточной (обратной) сигнализации. Специалист в данной области техники может легко приготовить другие подобные модификации для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов, сохраняя при этом способность костимулирующей молекулы активировать конститутивную иммуностимулирующую передачу сигналов к Т-клетке посредством взаимодействия с костимулирующим рецептором.

a. Цитокины и хемокины

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии по настоящему изобретению сконструированы для экспрессии цитокинов для стимуляции иммунной системы, включая, помимо прочего, IL-2, IL-7, IL-12, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35) , IL-15 (и комплекс альфа-цепи IL-15:IL-15R), IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra, IL-2 который модифицирован таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, IFN-α и IFN-β.

Цитокины стимулируют иммунные эффекторные клетки и стромальные клетки в месте опухоли и усиливают распознавание опухолевых клеток цитотоксическими клетками. В некоторых вариантах осуществления можно сконструировать иммуностимулирующие бактерии для экспрессии хемокинов, таких как, например, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11.

IL-2

Интерлейкин-2 (IL-2), который был первым цитокином, одобренным для лечения рака, участвует в активации иммунной системы посредством нескольких механизмов, включая активацию и стимулирование роста цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), генерацию лимфокин-активированных клеток-киллеров (LAK), стимулирование роста и пролиферации Treg-клеток, стимуляцию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), а также стимулирование пролиферации и дифференцировки Т-клеток, В-клеток и NK-клеток. Рекомбинантный ИЛ-2 (rIL-2) одобрен FDA для лечения метастатической почечно-клеточной карциномы (RCC) и метастатической меланомы (см., например, Sheihietal. (2016) IranJ. Immunol.13(3):148). -166).

IL-7

IL-7, который является членом суперсемействаIL-2, участвует в выживании, пролиферации и гомеостазе Т-клеток. Было показано, что мутации в рецепторе IL-7 приводят к потере Т-клеток и развитию тяжелого комбинированного иммунодефицита (CSID), что подчеркивает критическую роль, которую IL-7 играет в развитии Т-клеток. IL-7 представляет собой гомеостатический цитокин, который обеспечивает непрерывные сигналы покоящимся наивным Т-клеткам и Т-клеткам памяти и накапливается в условиях лимфопении, что приводит к увеличению как пролиферации Т-клеток, так и разнообразия репертуара Т-клеток. По сравнению с IL-2, IL-7 является селективным в отношении размножения $CD8^+$ Т-клеток по сравнению с $CD4^+$ $FOXP3^+$ регуляторные Т-клетки. Было показано, что рекомбинантный IL-7 усиливает антиген-специфические Т-клеточные ответы после вакцинации и адоптивной клеточной терапии у мышей. IL-7 также может способствовать восстановлению Т-клеток после химиотерапии или трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Ранние клинические испытания на пациентах с прогрессирующим злокачественным новообразованием показали, что рекомбинантный IL-7 хорошо переносится и обладает ограниченной токсичностью в биологически активных дозах (т.е. при которых количество циркулирующих $CD4^+$ и $CD8^+$Т-

клеток увеличивается в 3-4 раза) (см., например, Lee, S. andMargolin, K. (2011) Cancers 3:3856-3893). Было показано, что IL-7 обладает противоопухолевым действием при опухолях, таких как глиомы, меланомы, лимфомы, лейкемия, рак предстательной железы и глиобластома, а введение IL-7 invivo в мышиных моделях приводило к снижению роста раковых клеток. Также было показано, что IL-7 усиливает противоопухолевое действие IFN-γ в опухолях глиомы крыс и индуцирует продукцию IL-1α, IL-1β и TNF-α моноцитами, что приводит к ингибированию роста меланомы.

Кроме того, введение рекомбинантного IL-7 после лечения детской саркомы приводило к стимуляции восстановления иммунитета (см., например, Linetal. (2017) AnticancerResearch 37:963-968).

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

Биоактивный IL-12 (IL-12p70), который способствует клеточно-опосредованному иммунитету, представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц p35 и p40, тогда как мономеры и гомодимерыIL-12p40 действуют как антагонисты IL-12. IL-12, который секретируется антигенпрезентирующими клетками, способствует секреции IFN-γ из NK- и T-клеток, ингибирует опухолевый ангиогенез, приводит к активации и пролиферации NK-клеток, $CD8^+$ T-клеток и $CD4^+$ T -клеток. -клеток, усиливает дифференцировку наивных $CD4^+$T-клетки в клетки Th1 и способствует антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) против опухолевых клеток. Было показано, что IL-12 проявляет противоопухолевое действие на мышиных моделях меланомы, рака толстой кишки, рака молочной железы и саркомы (см., например, Kalinskietal. (2001) Blood 97:3466-3469; Sheihi et al. (2016) Iran J. Immunol.13(3):148-166 и Lee, S. and Margolin, K. (2011) Cancers 3:3856-3893).

IL-15 andIL-15:IL-15Rα

IL-15 структурно подобен IL-2, и хотя и IL-2, и IL-15 обеспечивают раннюю стимуляцию пролиферации и активации Т-клеток, IL-15 блокирует индуцируемый IL-2 апоптоз, который представляет собой процесс, который приводит к элиминации стимулированных Т-клеток и индукции толерантности Т-клеток, ограничивая ответы Т-клеток памяти и потенциально ограничивая терапевтическую эффективность одного IL-2. IL-15 также поддерживает персистенцию CD8 + Т-клеток памяти для поддержания долгосрочного противоопухолевого иммунитета и продемонстрировал значительную противоопухолевую активность в доклинических мышиных моделях посредством прямой активации $CD8^+$ эффекторных Т-клеток в антигеннезависимым способом. В дополнение к $CD8^+$Т-клеткам, IL-15 отвечает за развитие, пролиферацию и активацию эффекторных естественных клеток-киллеров (NK) (см., например, Lee, S. andMargolin, K. (2011) Cancers 3:3856-3893; и Han и др. (2011) Cytokine 56(3):804-810).

IL-15 и альфа-рецептор IL-15 (IL-15Rα) координированно экспрессируются антигенпрезентирующими клетками, такими как моноциты и дендритные клетки, и IL-15 презентируется в транс IL-15Rα до IL-15RβγC, экспрессируемому на поверхности $CD8^+$ Т-клеток и NK-клеток. Было показано, что растворимые комплексы 1L-15:IL15-Rα модулируют иммунные ответы через комплекс IL-15RβγC, и было показано, что биологическая активность IL-15 увеличивается в 50 раз при введении его в предварительно сформированном комплексе IL-15. 15 и растворимого IL-15Rα, который имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с одним IL-15. Это значительное увеличение терапевтической эффективности IL-15 за счет предварительной ассоциации с IL-15Rα было продемонстрировано на моделях опухолей мышей (см., например, Hanetal. (2011) Cytokine 56(3):804-810).

IL-18

IL-18 индуцирует секрецию IFN-γNK- и $CD8^+$ Т-клетками, усиливая их токсичность. IL-18 также активирует макрофаги и стимулирует развитие Th1-хелперных $CD4^+$ Т-клеток. IL-18 продемонстрировал многообещающую

противоопухолевую активность на нескольких доклинических моделях мышей. Например, введение рекомбинантного IL-18 (rIL-18) приводило к регрессии меланомы или саркомы у сингенных мышей за счет активации ответов CD4+T-клеток и/или NK-клеток. Другие исследования показали, что противоопухолевые эффекты IL-18 опосредуются IFN-γ и включают антиангиогенные механизмы. Комбинация IL-18 с другими цитокинами, такими как IL-12, или с костимулирующими молекулами, такими как CD80, усиливает опосредованные IL-18 противоопухолевые эффекты. Клинические испытания фазы I у пациентов с солидными опухолями и лимфомами на поздних стадиях показали, что введение IL-18 было безопасным и приводило к иммуномодулирующей активности и повышению уровней IFN-γ и GM-CSF в сыворотке у пациентов, а также к умеренным клиническим проявлениям. ответы. Клинические испытания показали, что IL-18 можно комбинировать с другими противораковыми терапевтическими агентами, такими как моноклональные антитела, цитотоксические препараты или вакцины (см., например, Fabbietal. (2015) J. Leukoc. Biol. 97:665- 675 и Lee, S. and Margolin, K. (2011) Cancers 3:3856-3893).

Было обнаружено, что аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium, сконструированный таким образом, чтобы экспрессировать IL-18, ингибировал рост подкожных (SC) опухолей или легочных метастазов у сингенных мышей без каких-либо токсических эффектов после системного введения. Лечение этой сконструированной бактерией индуцировало накопление Т-клеток, NK-клеток и гранулоцитов в опухолях и приводило к внутриопухолевой продукции цитокинов (см., например, Fabbietal. (2015) J. Leukoc. Biol. 97:665- 675).

Хемокины

Хемокины представляют собой семейство небольших цитокинов, которые опосредуют миграцию лейкоцитов в области повреждения или воспаления и участвуют в опосредовании иммунных и воспалительных реакций. Хемокины подразделяются на четыре подсемейства в зависимости от положения остатков цистеина в их последовательностях, а именно XC-, CC-,

CXC- и CX3C-хемокиновыелиганды, или XCL, CCL, CXCL и CX3CL. Лигандыхемокинов связываются с родственными им рецепторами и регулируют циркуляцию, самонаведение и удержание иммунных клеток, при этом каждая пара хемокиновыйлиганд-рецептор избирательно регулирует определенный тип иммунных клеток. Различные хемокины привлекают разные популяции лейкоцитов и формируют градиент концентрации invivo, при этом привлеченные иммунные клетки движутся по градиенту в сторону более высокой концентрации хемокина (см., например, ArgyleD. andKitamura, T. (2018) Front. Immunol.9 : 2629; и Dubinett и др. (2010) CancerJ.16(4):325-335).

Хемокины могут улучшать противоопухолевый иммунный ответ, усиливая инфильтрацию иммунных клеток в опухоль и облегчая перемещение антигенпрезентирующих клеток (АПК) в лимфатические узлы, дренирующие опухоль, что приводит к активации наивных Т-клеток и В-клеток (см. например, Lechneretal. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340). Иммуностимулирующие бактерии по настоящему изобретению могут быть сконструированы так, чтобы они кодировали хемокины, включая, но не ограничиваясь ими, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11.

CCL3, CCL4, CCL5

CCL3, CCL4 и CCL5 имеют высокую степень гомологии и связываются с CCR5 (CCL3, CCL4 и CCL5) и CCR1 (CCL3 и CCL5) на нескольких типах клеток включая незрелые DC и Т-клетки как у людей, так и у мышей. Было показано, что терапевтические Т-клетки индуцируют хемотаксис клеток врожденного иммунитета к опухолевым участкам посредством опухолеспецифической секреции CCL3, CCL4 и CCL5 (см., например, Dubinettetal. (2010) CancerJ.16(4)). :325-335).

Индукция ответа Т-хелперных клеток типа 1 (Th1) высвобождает CCL3. Исследования на мышах invivo и invitro показали, что CCL3 является хемотаксическим как для нейтрофилов, так и для моноцитов; в частности, CCL3

может опосредовать мобилизацию миелоидных клеток-предшественников (MPC) из костного мозга и обладает регуляторными и стимулирующими эффектами MPC. Клетки карциномы яичников человека, трансфицированныеCCL3, показали усиленную инфильтрацию Т-клеток и макрофагов в опухоли, что привело к улучшенному противоопухолевому ответу и показало, что CCL3-опосредованный хемотаксис нейтрофилов подавляет рост опухоли. ДК, трансфицированные опухолевым антигеном, геном, ассоциированным с меланомой человека (MAGE)-1, которые были рекрутированы CCL3, проявляли превосходные противоопухолевые эффекты, включая увеличение пролиферации лимфоцитов, цитолитическую способность и выживаемость, а также снижение роста опухоли. в мышиной модели меланомы. Комбинированное использование CCL3 с антиген-специфической платформой для MAGE-1 также использовалось при лечении рака желудка. Продукция CCL3 CT26, высокоиммуногенной опухолью толстой кишки мышей, замедляла рост опухоли invivo; этот процесс был обусловлен CCL3-зависимым накоплением естественных клеток-киллеров (NK) и, следовательно, IFNγ, что приводило к продукции CXCL9 и CXLC10 (см., например, Allenetal. (2017) Oncoimmunology 7(3):e1393598). и Schaller et al. (2017) ExpertRev. Clin. Immunol.13(11):1049-1060).

CCL3 использовался в качестве адъюванта для лечения рака.

Введение активного варианта CCL3, ECI301, после радиочастотной абляции при гепатоцеллюлярной карциноме мыши увеличивало опухолеспецифические ответы, и было также показано, что этот механизм зависит от экспрессии CCR1. CCL3 также продемонстрировал успех в качестве адъюванта при системном раке, в результате чего мыши, вакцинированные CCL3 и IL-2 или гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF), на модели лейкемии/лимфомы показали повышенную выживаемость (см., например, , Schalleretal. (2017) ExpertRev. Clin. Immunol.13(11):1049-1060).

CCL3 и CCL4 играют роль в направлении инфильтрации $CD8^+$ Т-клеток в первичные опухолевые участки при меланоме и раке толстой

кишки. Опухолевая продукция CCL4 приводит к накоплению $CD103^+$ DC; подавление CCL4 через WNT/β-катенин-зависимый путь предотвращало инфильтрацию $CD103^+$ DC опухолей меланомы (см., например, Sprangeretal. (2015) Nature 523(7559):231-235). Также было показано, что CCL3 усиливает инфильтрацию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в очаг первичной опухоли на мышиной модели рака толстой кишки (см., например, Allenetal. (2017) Oncoimmunology 7(3):e1393598).

Связывание CCL3 или CCL5 с их рецепторами (CCR1 и CCR5) перемещает незрелые DC, моноциты, эффекторные клетки памяти и Т-клетки из кровотока в очаги воспаления или инфекции. Например, экспрессия CCL5 в колоректальных опухолях способствует хемоаттракции и выживанию Т-лимфоцитов. CCL3 и CCL5 использовались по отдельности или в комбинированной терапии для индукции регрессии опухоли и иммунитета в нескольких доклинических моделях. Например, исследования показали, что подкожная инъекция клеток яичника китайского хомячка, генетически модифицированных для экспрессии CCL3, приводит к ингибированию опухоли и нейтрофильной инфильтрации. В другом исследовании рекомбинантный онколитический аденовирус, экспрессирующий CCL5 (Ad-RANTES-E1A), приводил к регрессии первичной опухоли и блокировал метастазирование в мышиной модели карциномы молочной железы (см., например, Lechneretal. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340).

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

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

CXCL9, CXCL10, CXCL11

CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10) и CXCL11 (ITAC) индуцируются продукцией IFN-γ. Эти хемокины связывают CXCR3, преимущественно экспрессируемый на активированных Т-клеток и функционируют как ангиостатически, так и при привлечении и активации лейкоцитов. Прогноз при колоректальном раке сильно коррелирует с инфильтрирующими опухоль Т-клетками, особенно с эффекторными Т-клетками Th1 и $CD8^{+}$; высокая внутриопухолевая экспрессия CXCL9, CXCL10 и CXCL11 свидетельствует о хорошем прогнозе. Например, в выборке из 163 пациентов с раком толстой кишки у пациентов с высоким уровнем CXCL9 или CXCL11 наблюдалась повышенная послеоперационная выживаемость, а у пациентов с высоким уровнем экспрессии CXC было значительно более высокое количество $CD3^{+}$ Т-клеток, $CD4^{+}$ Т-хелперных клеток и $CD8^{+}$цитотоксических Т-клеток. При метастазах в печень у пациентов с колоректальным раком уровни CXCL9 и CXCL10 были повышены на границе инвазии и коррелировали с плотностью эффекторных Т-клеток. Стимуляция миграции лимфоцитов посредством действия CXCL9 и CXCL10 на CXCR3 приводит к продукции CCL5 на границе инвазии (см., например, Halamaetal. (2016) CancerCell 29(4):587-601; и Kistneretal. и др. (2017) Oncotarget 8(52):89998-90012).

InvivoCXCL9 действует как хемоаттрактант для инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), активированных лимфоцитов периферической крови, естественных киллеров (NK) и лимфоцитов Th1. CXCL9 также имеет решающее значение для опосредованного Т-клетками подавления кожных

опухолей. Например, было показано, что в сочетании с системным IL-2 CXCL9 ингибирует рост опухоли за счет повышенной внутриопухолевой инфильтрации $CXCR3^+$ мононуклеарных клеток. В мышиной модели карциномы толстой кишки комбинация слитого белка huKS1/4-IL-2 с генной терапией CXCL9 достигла превосходного противоопухолевого эффекта и увеличения продолжительности жизни за счет хемоаттракции и активации $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-лимфоцитов (см., например, Dubinettetal. (2010) CancerJ.16(4):325-335 и Ruehlmannetal. (2001) CancerRes.61(23):8498-8503).

CXCL10, продуцируемый активированными моноцитами, фибробластами, эндотелиальными клетками и кератиноцитами, является хемотаксическим для активированных Т-клеток и может действовать как ингибитор ангиогенеза invivo. Было показано, что экспрессия CXCL10 в колоректальных опухолях способствует хемоаттракции цитотоксических Т-лимфоцитов и более длительному выживанию. Было показано, что введение иммуностимулирующих цитокинов, таких как IL-12, усиливает противоопухолевое действие, генерируемое CXCL10. Вакцина дендритных клеток (ДК), примированнаялизатом опухолевых клеток и трансфицированнаяCXCL10, обладала повышенной иммунологической защитой и эффективностью у мышей; животные показали устойчивость к заражению опухолью, замедление роста опухоли и более длительное время выживания. Исследования invivo и invitro на мышах с использованием слитого белка CXCL10-муцин-GPI привели к опухолям с более высоким уровнем привлеченных NK-клеток по сравнению с опухолями, не обработанными слитым белком. Интерфероны (которые могут продуцироваться плазмоцитоидными дендритными клетками; эти клетки связаны с первичными очагами меланомы и могут рекрутироваться в участок опухоли с помощью CCL20) могут действовать на подмножества опухолевых DC, например, $CD103.^+$ DC, которые, как было показано, продуцируют CXCL9/10 на модели меланомы у мышей и ассоциированы с CXCL9/10 при заболевании человека. CXCL10 также показал более высокую экспрессию в образцах метастатической меланомы человека по сравнению с образцами первичной меланомы. С терапевтической точки зрения адъювантная терапия

меланомы IFN-α повышает продукцию CXCL10, тогда как химиотерапевтический агент цисплатин индуцирует CXCL9 и CXCL10 (см., например, Dubinettetal. (2010) CancerJ.16(4):325-335; Kuoetal. (2018) Front.Med.(Lausanne) 5:271, Li и др. (2007) Scand.J.Immunol.65(1):8-13 и Muenchmeier и др. (2013) PLoSOne 8(8): e72749).

Экспрессия CXCL10/11 и CXCR3 была установлена в кератиноцитах человека, полученных из базальноклеточной карциномы (BCC). CXCL11 также способен стимулировать экспрессию иммуносупрессивной индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) при базальноклеточной карциноме человека, а также усиливать пролиферацию кератиноцитов, что может снижать противоопухолевую активность любых инфильтрирующих CXCR3 $^{+}$ эффекторных Т-клеток (см. например, Kuoetal. (2018) Front.Med.(Lausanne) 5:271).

CXCL9, CXCL10 и CXCL11 могут быть закодированы в онколитических вирусах для лечения рака (см., например, публикацию США № 2015/0232880 и публикацию международной заявки № WO 2015/059303). Псевдотипированныеонколитические вирусы или генетически сконструированные бактерии, кодирующие ген CXCL10, также можно использовать для лечения рака (см., например, публикации международных заявок № WO 2018/006005 и WO 2018/129404).

b. Костимулирующие молекулы

Костимулирующие молекулы усиливают иммунный ответ против опухолевых клеток, а костимулирующие пути ингибируются опухолевыми клетками, что способствует онкогенезу. Иммуностимулирующие бактерии по настоящему изобретению могут быть сконструированы для экспрессии костимулирующих молекул, таких как, например, CD40, CD40L, 4-1BB, 4-1BBL, 4-1BBL с делецией цитоплазматического домена (4-1BBLΔcyt), 4-1BBL. 1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом, OX40 (CD134), OX40L (CD252), другие представители TNFRсуперсемейства (например, CD27, лигандCD27,

GITR, CD30, рецептор Fas, TRAIL-R, TNF-R, HVEM и RANK), B7, CD80, CD86, ICOS, лигандICOS (B7RP1) и CD28. Кроме того, иммуностимулирующие бактерии могут кодировать и экспрессировать укороченные костимулирующие молекулы (например, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1, OX40L) с полной или частичной (полной, или усеченной, или модифицированной для обеспечения правильной ориентации при экспрессии в клетке) делецией цитоплазматического домена для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC).

Здесь показано, что продукт гена с укороченным цитоплазматическим доменом, включая полную делецию, обеспечивает конститутивную иммуностимулирующую передачу сигналов Т-клетке за счет участия костимулирующего рецептора и не способен передавать контррегуляторный сигнал к АПК из-за укороченного или удаленного (или иным образом модифицированного, как описано здесь) цитоплазматического домена. Усечения достаточно для обеспечения сигнализации и невозможности контррегулятивного сигнала для APC. Полная или частичная делеция цитоплазматического домена костимулирующей молекулы, как описано в настоящем документе, усиливает активацию костимулирующей молекулы без иммуносупрессивной обратной передачи сигналов. Частичная делеция (или усечение) цитоплазматического домена является достаточной делецией для достижения этих эффектов, не влияя на экспрессию костимулирующей молекулы или ориентацию экспрессируемой костимулирующей молекулы без иммуносупрессивной обратной передачи сигналов.

Костимулирующие молекулы также можно модифицировать для устранения или уменьшения иммуносупрессивной внутриклеточной/обратной передачи сигналов путем модификаций аминокислот в цитоплазматическом домене, включая вставки, делеции и/или замены. В частности, костимулирующие молекулы модифицируются путем модификации, такой как замена, сайтов фосфорилирования цитоплазматического домена. Например, замена одного или нескольких остатков Ser в подходящем локусе или локусах, таких как для

человека 4-1BBL, со ссылкой на SEQIDNO: 389, Ser5 и Ser8, остатком, который снижает или устраняет обратную передачу сигналов.

Иммуностимулирующие бактерии по настоящему изобретению также могут быть сконструированы для экспрессии агонистических антител против костимулирующих молекул (например, 4-1BB) для усиления противоопухолевого иммунного ответа.

Рецепторное суперсемействоTNF

СуперсемействолигандовTNF (TNFSF) и их рецепторы (TNFRSF) участвуют в пролиферации, дифференцировке, активации и выживании опухолевых и иммунных эффекторных клеток. Члены этого семейства включают CD30, Fas-L, TRAIL-R и TNF-R, которые индуцируют апоптоз, и CD27, OX40L, CD40L, GITR-L и 4-1BBL, которые регулируют иммунный ответ B- и T-клеток. Другие члены включают медиатор входа герпесвируса (HVEM). Экспрессия TNFSF и TNFRSF иммуностимулирующими бактериями может усиливать противоопухолевый иммунный ответ. Было показано, например, что экспрессия 4-1BBL в мышиных опухолях повышает иммуногенность и что внутриопухолевая инъекция дендритных клеток (ДК) с повышенной экспрессией OX40L может привести к отторжению опухоли в мышиных моделях. Исследования также показали, что инъекция аденовируса, экспрессирующего рекомбинантный GITR, в клетки меланомы B16 способствует инфильтрации T-клеток и уменьшает объем опухоли. Стимулирующие антитела против таких молекул, как 4-1BB, OX40 и GITR, также могут кодироваться иммуностимулирующими бактериями для стимуляции иммунной системы. Например, было показано, что моноклональные антитела-агонисты анти-4-1BB усиливают противоопухолевый ответ CTL, а антитела-агонисты анти-OX40 усиливают противоопухолевую активность в моделях трансплантируемых опухолей. Кроме того, было показано, что агонистические антитела против GITR усиливают

противоопухолевый ответ и иммунитет (см., например, Lechneretal. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340; иPeggs et al. (2009) Clinical and *Experimental Immunology* 157:9-19).

CD40 иCD40L

CD40, который является членом надсемейства рецепторов TNF, экспрессируется APC и B-клетками, тогда как его лиганд, CD40L (CD154), экспрессируется активированными Т-клетками. Взаимодействие между CD40 и CD40L стимулирует B-клетки к выработке цитокинов, что приводит к активации Т-клеток и гибели опухолевых клеток. Исследования показали, что противоопухолевые иммунные ответы нарушаются при сниженной экспрессии CD40L на Т-клетках или CD40 на дендритных клетках. CD40 экспрессируется на поверхности некоторых B-клеточных опухолей, таких как фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфобластный лейкоз и хронический лимфолейкоз, и было показано, что его взаимодействие с CD40L увеличивает экспрессию B7-1/CD80, B7- 2/CD86 и молекулы человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса II в CD40 $^{+}$опухолевых клеток, а также усиливают их антигенпрезентирующие способности. Трансгенная экспрессия CD40L в мышиной модели множественной миеломы приводила к индукции CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клеток, локальному и системному противоопухолевому иммунному ответу и снижению роста опухоли. Анти-CD40-агонистические антитела также индуцировали противоопухолевые Т-клеточные ответы (см., например, Marin-Acevedoetal. (2018) Journal of Hematology & Oncology 11:39; Dotti et al. (2002) Blood 100(1):200-207; и Murugaiyan и др. (2007) J. Immunol. 178:2047-2055).

4-1BBи 4-1BBL

4-1BB (CD137) представляет собой индуцируемый костимулирующий рецептор, который экспрессируется преимущественно Т-клетками и NK-клетками; он связывает свой лиганд 4-1BBL, который экспрессируется на APC, включая DC,

В-клетки и моноциты, чтобы вызвать пролиферацию и активацию иммунных клеток. 4-1BB приводит к более длительным и более распространенным ответам активированных Т-клеток. Было показано, что агонисты анти-4-1BB и слитые белки 4-1BBL повышают иммуноопосредованную противоопухолевую активность, например, в отношении опухолей саркомы и мастоцитомы, опосредованную $CD4^+$ Th1 и опухолеспецифическая активность CTL (см., например, Lechneretal. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340; и Marin-Acevedoetal. (2018) JournalofHematology&Oncology 11:39)4. -1BBL отрицательно регулируется своим цитоплазматическим сигнальным доменом. В поздней фазе лигирования 4-1BBL на макрофагах с Т-клетками обратная передача сигналов цитоплазматического домена 4-1BBL индуцирует поверхностную транслокацию 4-1BBL для связывания с образованием сигнального комплекса с TLR4. Это индуцирует высокие уровни TNF-α, сравнимые с активацией LPSTLR4, что приводит к иммуносупрессии адаптивного иммунного ответа (см., например, Maetal. (2013) Sci. Signaling 295(6):1-11).

4-1BBL, член суперсемействаTNF, экспрессируется в В-клетках, дендритных клетках, активированных Т-клетках и макрофагах. 4-1BBL связывается со своим рецептором, 4-1BB, и обеспечивает костимулирующий сигнал для Т-клеток, активацию и расширение клеток. Ген 4-1BBL человека кодирует трансмембранный белок типа II из 254 аминокислот, содержащий цитоплазматический домен из 28 аминокислот, домен трансмембранного белка из 21 аминокислоты и внеклеточный домен из 205 аминокислот (см. SEQIDNO:389). Делеция всего или части цитоплазматического домена 4-1BBL (соответствует аминокислотным остаткам 1-28 SEQIDNO: 342 или 389), как описано в настоящем документе, усиливает активацию 4-1BBL без иммуносупрессивной обратной передачи сигнала. Удаленной части достаточно для потенцирования активации 4-1BBL, но без иммуносупрессивной обратной передачи сигналов. Как описано ниже, усеченный цитоплазматический домен может включать аминокислоты или замены для обеспечения правильной ориентации экспрессируемого белка в клеточной мембране (аналогичные модификации могут быть осуществлены в других трансмембранных белках, в которых цитоплазматический домен укорочен или делетирован).

В настоящем документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие вариант 4-1BBL, в котором отсутствует цитоплазматический домен или который имеет укороченный цитоплазматический домен для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов. Пример такой нуклеиновой кислоты и кодируемого белка описан в примерах (см., например, SEQIDNO: 391 и 395). Рецепторы также могут быть цитоплазматически усечены или делетированы. укороченный цитоплазматический домен может включать аминокислоты или замены для обеспечения правильной ориентации экспрессируемого белка в клеточной мембране (аналогичные модификации могут быть осуществлены в других трансмембранных белках, в которых цитоплазматический домен укорочен или удален).

OX40 иOX40L

OX40 (CD134) является членом суперсемейства рецепторов TNF, который экспрессируется на активированных эффекторных Т-клетках, в то время как его лиганд, OX40L, экспрессируется на APC, включая DC, B-клетки и макрофаги, после активации агонистами TLR и передачи сигнала CD40-CD40L. . Передача сигналов OX40-OX40L приводит к активации, потенцированию, пролиферации и выживанию Т-клеток, а также к модуляции функции NK-клеток и ингибированию супрессивной активности Treg. Передача сигналов через OX40 также приводит к секреции цитокинов (IL-2, IL-4, IL-5 и IFN-γ), усиливающих ответы клеток Th1 и Th2. Распознавание опухолевых антигенов опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (TIL) приводит к повышенной экспрессии OX40 TIL, что коррелирует с улучшением прогноза. Исследования показали, что обработка антителами против агониста OX40 или слитыми белками Fc-OX40L приводит к повышенным Т-клеточным ответам и повышенной выживаемости в мышиных моделях меланомы, саркомы, карциномы толстой кишки и рака молочной железы, в то время как Fc-OX40L, включенный в вакцины опухолевых клеток, защищал мышей от последующего заражения клетками карциномы молочной железы (см., например, Lechneretal.

(2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340 и Marin-Acevedo et al. (2018) Journal of Hematology & Oncology 11:39).

Семейство B7-CD28

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

Для оптимального примирования Т-клеток требуется два сигнала: (1) распознавание Т-клеточным рецептором (TCR) антигенов, представленных MHC, и (2) костимулирующие сигналы, возникающие в результате лигирования Т-клеточного CD28 с B7-1 (CD80) или B7-2 (CD86), экспрессированного на APC.

После активации Т-клеток индуцируются рецепторы CTLA-4, которые затем вытесняют CD28 за связывание с лигандамиB7-1 и B7-2. Представление антигена опухолевыми клетками плохое из-за отсутствия у них экспрессии костимулирующих молекул, таких как B7-1/CD80 и B7-2/CD86, что приводит к неспособности активировать комплекс Т-клеточного рецептора. В результате активация этих молекул на поверхности опухолевых клеток может повысить их иммуногенность. Иммунотерапия солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований успешно индуцируется B7, например, посредством экспрессии B7 опухолевыми клетками или растворимых слитых белков B7-иммуноглобулин. Опосредованная вирусом опухолевая экспрессия B7 в сочетании с другими костимулирующимилигандами, такими как ICAM-3 и LFA-3, была успешна в доклинических и клинических испытаниях для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза и метастатической меланомы. Кроме того, растворимые слитые белки B7 продемонстрировали многообещающие

результаты в иммунотерапии солидных опухолей в качестве иммунотерапии с одним агентом (см., например, Lechneretal. (2011) Immunotherapy 3(11):1317-1340; и Dottietal. (2002)). Blood 100(1):200-207).

2. Молекулы, активирующие пролекарства

Плазмиды в иммуностимулирующих бактериях по настоящему изобретению могут включать нуклеиновые кислоты, которые кодируют молекулы, такие как ферменты, которые активируют, например, путем расщепления части терапевтических продуктов, таких как пролекарства, включая химиотерапевтические пролекарства, особенно токсины, которые активируются ферментативное расщепление. В результате неактивное пролекарство можно вводить системно, и оно является неактивным. Кодируемая плазмидой активирующая молекула, такая как фермент, экспрессируется в микроокружении опухоли после доставки иммуностимулирующих бактерий, предусмотренных в настоящем документе, так что неактивное пролекарство активируется в микроокружении опухоли, где оно проявляет свое противоопухолевое действие. Существует много примеров таких пролекарств, включая определенные нуклеозиды и конъюгаты токсинов. Известно много таких пролекарств и ферментов (см., например,Malekshah*etal.*, (2016) *Curr. Pharmacol. Rep.* 2:299-308). К ним относятся пролекарства 5-фторурицил, аксазафозорины, препараты платины и ферменты, такие как деаминазы, нитроредуктазы, фосфорилазы, ферменты цитохрома P450 и многие другие.

3. Конститутивно активные белки, стимулирующие иммунный ответ, и/или IFNI типа, нечеловеческие белки STING, химеры и модифицированные формы

Интерфероны типа I (IFN; также называемые интерферонами типа 1) включают IFN-α и IFN-β и представляют собой плейотропные цитокины с противовирусной, противоопухолевой и иммунорегуляторной

активностью. IFN-β продуцируется большинством типов клеток; IFN-α в основном продуцируется гемопоэтическими клетками, особенно плазмоцитоидными дендритными клетками. IFN типа I продуцируются после восприятия ассоциированных с патогенами молекулярных паттернов (PAMP) рецепторами распознавания паттернов (PRR). Они участвуют во врожденном иммунном ответе против патогенов, в основном вирусных, и являются мощными иммуномодуляторами, которые способствуют презентации антигена, опосредуют созревание дендритных клеток (ДК), активируют цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), естественные киллеры (NK) и макрофаги.

IFN типа I проявляют антипролиферативное и проапоптотическое действие на опухоли и оказывают антиангиогенное действие на новую сосудистую сеть опухоли. Они индуцируют экспрессию молекул MHC класса I на поверхности опухолевых клеток, повышают иммуногенность опухолевых клеток и активируют цитотоксичность по отношению к ним. IFN типа I использовался в качестве терапевтического средства для лечения рака и вирусных инфекций. Например, IFN-α (продается под торговой маркой Intron®/Roferon®-A) одобрен для лечения волосатоклеточного лейкоза, злокачественной меланомы, связанной со СПИДом саркомы Капоши и фолликулярной неходжкинской лимфомы; он также используется при лечении хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), почечно-клеточного рака, нейроэндокринных опухолей, множественной миеломы, нефолликулярнойнеходжкинской лимфомы, десмоидных опухолей и кожной Т-клеточной лимфомы,хотя использование ограничено иммунотоксичностью(см, напр, IvashkivиDonlin (2014) *Nat. Rev. Immunol.* 14(1):36-49; KallioliasиIvashkiv (2010) *Arthritis Research & Therapy* 12(Suppl 1):S1; и Lee, S. и Margolin, K. (2011) *Cancers* 3:3856-3893).

Экспрессия интерферонов типа I в опухолях и микроокружении опухоли относится к числу иммунных ответов, которые призваны вызывать иммуностимулирующие бактерии. Индукция или активация интерферона типа I обеспечивает противоопухолевый иммунитет для лечения рака.

a. Конститутивная экспрессия STING и мутации с усилением функции

Индукция IFN типа I, провоспалительных цитокинов и хемокинов необходима для формирования иммунного ответа, который предотвращает или ингибирует инфекцию вирусными возбудителями. Этот ответ также может быть эффективным в качестве противоопухолевого агента. Представленные здесь иммуностимулирующие бактерии кодируют белки, которые конститутивно индуцируют IFN типа I. Среди этих белков есть те, которые встречаются у людей с различными заболеваниями или расстройствами, связанными с перепроизводством модуляторов иммунного ответа. Например, перепроизводство или избыточное производство или дефектная негативная регуляция интерферонов типа I и провоспалительных цитокинов могут привести к нежелательным эффектам, таким как воспалительные и аутоиммунные заболевания. Нарушения, связанные с перепроизводством, как правило, хронического типа IFNI, называются интерферонопатиями (см., например, LuandMacDougall (2017) Front. Genet.8:118; и Konnoetal. (2018) CellReports 23:1112). -1123). Нарушения и клинические фенотипы, связанные с интерферонопатиями типа I, включают синдром Айкарди-Гутьера (AGS), STING-ассоциированную васкулопатию с началом в младенчестве (SAVI), синдром Синглтона-Мертена (SMS), атипичный SMS, семейную обмороженную волчанку (FCL), системную красную волчанку. красную волчанку (СКВ), двусторонний стриарный некроз (BSN), цереброваскулярное заболевание (ССЗ), симметричный наследственный дисхроматоз (ДСГ), спастический парапарез (СП), Х-сцепленное ретикулярное пигментное расстройство (ХЛПДР), аутовоспалительный синдром, ассоциированный с протеасомами (ПРААС), внутричерепную кальцификацию (ICC), менделевскую восприимчивость к микобактериальному заболеванию (MSMD) и спондилоэнхондродисплазию (SPENCD) (см., например, Roderoetal. (2016) J. Exp. Med.213(12):2527-2538).

Эти фенотипы связаны с определенными генотипами, включающими мутации в генах, которые ведут к конститутивной активности продуктов, вовлеченных в индукцию IFN типа 1.

Устойчивая активация передачи сигналов интерферона может быть обусловлена: 1) мутациями с потерей функции, ведущими к увеличению количества цитозольной ДНК (например, мутации в TREX1 и SAMHD1), или увеличению числа цитозольных гибридов РНК/ДНК (например, мутациям в RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C и POLA1); 2) мутации с потерей функции, приводящие к дефекту редактирования РНК и аномальному восприятию видов собственной нуклеиновой кислоты РНК в цитозоле (например, мутации в ADAR1); 3) мутации с усилением функции, ведущие к конститутивной активации цитозольных сигнальных путей IFN/повышенной чувствительности к лигандамцитозольных нуклеиновых кислот (например, мутации в RIG-I, MDA5 и STING); 4) мутации с потерей функции, приводящие к аберрантной передаче сигналов РНК через MAVS, вызванные нарушением ответа развернутого белка (например, мутации в SKIV2L); передача сигналов, приводящая к неконтролируемой продукции IFN-стимулированного гена (ISG) (например, мутации в USP18 и ISG15); 5) мутации с потерей функции в молекулах, ответственных за ограничение сигнализации рецепторов IFN (IFNAR1/2), что приводит к неконтролируему производству гена, стимулированного IFN (ISG) (например, мутации в *USP18* и *ISG15*); 6) протеасомная дисфункция, приводящая к усилению передачи сигналов IFN посредством неизвестного механизма (например, мутации в PSMA3, PSMB4 и PSMB8); и 7) мутации с потерей функции в TRAP/ACP5 и C1q, где механизмы, ведущие к передаче сигналов IFN типа I, остаются неясными (см., например, Roderoetal. (2016) J. Exp. Med.213(12): 2527-2538).

В данном случае представляют интерес мутации, которые приводят к усилению функции (GOF). Известны мутации в STING, MDA5 и RIG-I, которые связаны с конститутивной активацией кодируемых белков и/или повышенной чувствительностью или повышенной аффинностью или связыванием с эндогенными лигандами. Мутации GOF в STING, например, связаны с SAVI и

FCL; Мутации GOF в MDA5 связаны с AGS и SMS; и мутации GOF в RIG-I связаны с атипичным SMS.

***TMEM173*STINGаллели**

Стимулятор генов интерферона (STING) кодируется геном трансмембранного белка 173 (TMEM173), который представляет собой ген длиной ~7 кб. Ген TMEM173 человека характеризуется значительной гетерогенностью и популяционной стратификацией аллелей. Наиболее распространенный аллель TMEM173 человека обозначается как R232 (ссылаясь на аминокислоту, присутствующую в остатке 232; см., например, SEQIDNO: 305-309, где представлены последовательности различных аллелей TMEM173 человека. Более половины американского населения не используют R232/R232. Второй по распространенности аллель — R71H-G230A-R293Q (HAQ). Другие распространенные аллели включают AQ (G230A-R293Q), Q (Q293) и R232H (названный REF в честь эталонного аллеляSTING, впервые идентифицированного и каталогизированного в базе данных Гленом Барбером).

R232/R232 является наиболее распространенным генотипом у европейцев, тогда как HAQ/R232 является наиболее распространенным генотипом у выходцев из Восточной Азии. У африканцев нет генотипов HAQ/HAQ, но есть аллель Q, и около 4% африканцев относятся к AQ/AQ, что отсутствует в других этнических популяциях (см., например, PatelandJin (2018) Genes&Immunity, doi:10.1038). /s41435-018-0029-9). Аллели REF, AQ и Q обладают высокой рефрактерностью к CDN бактериального происхождения, таким как 3'3' c-di-GMP (см., например, Corralesetal. (2015) CellReports 11:1018-1030).

Мутации STINGс приобретением функции

Несколько мутаций активации или приобретения функции (GOF) в TMEM173, гене STING, унаследованном и denovo, были связаны с редким аутовоспалительным заболеванием SAVI (STING-ассоциированная васкулопатия с началом в младенчестве). SAVI является аутосомно-доминантным заболеванием и характеризуется системным воспалением, интерстициальным заболеванием легких, кожным васкулитом и рецидивирующей бактериальной инфекцией. SAVI с мутациями denovoTMEM173 обычно характеризуется ранним началом (< 8 недель) и тяжелым фенотипом, в то время как семейные мутации приводят к позднему началу (от подростков до взрослых) и более легким клиническим симптомам. Унаследованныемутации, активирующие TMEM173, включают G166E и V155M, тогдакакмутации de novo включают N154S, V155M, V147M, V147L, C206Y, R284G, R281Q и S102P/F279L (см., например, Patel and Jin (2019) Genes & Immunity 20:82-89). Другие идентифицированные активирующие мутации TMEM173 включают R284M, R284K, R284T, E316Q и R375A (см., например, публикацию США № 2018/0311343). Другой мутацией с приобретением функции в TMEM173 является R284S, которая приводит к высокой конститутивной активности STING и, как было обнаружено, запускает передачу сигналов врожденного иммунитета в отсутствие активирующих CDN, что приводит к хронической продукции провоспалительных цитокинов (см., например, Konno и др. (2018) CellReports 23:1112-1123).

Мутации TMEM173, такие как N154S, V155M и V147L, и/или любые из мутаций, перечисленных в таблице ниже, отдельно или в любой комбинации с этими и любыми другими подобными мутациями, такими как N154S/R284G, приводят к приобретению функцию STING, которая конститутивно активна и не требует или гиперчувствительна к стимуляции лигандом, что приводит к хронической активации STING-интерферонового пути. Это было продемонстрировано (см., например, Liuetal. (2014) N. Engl. J. Med. 371:507-518).

Конструкции мутантного TMEM173 (с каждой заменой V147L, N154S, V155M и мутанта с потерей функции V155R) и немутированногоTMEM173 трансфицировали в STING-отрицательные клетки HEK293T и стимулировали лигандомSTING, cGAMP. Клетки, трансфицированные мутантами N154S, V155M и V147L, демонстрировали сильно повышенную репортерную активность IFNB1 (ген, кодирующий IFN-β), которая существенно не повышалась при стимуляции лигандомSTINGcGAMP. Клетки, которые были трансфицированы мутантом с потерей функции (V155R), немутантнойTMEM173 или контрольной плазмидой, не имели значительной исходной активации. Стимуляция cGAMP приводила к дозозависимому ответу в клетках с немутированнымTMEM173 и приводила к минимальному ответу только при самой высокой концентрации cGAMP в клетках, экспрессирующих мутант с потерей функции (см., например, Liu*etal.* (2014) *N. Engl. J. Med.* 371:507-518). Эти результаты показывают, что активирующие мутации TMEM173 приводят к конститутивной активации STING даже в отсутствие стимуляции cGAMP.

G207E — еще одна мутация STING с приобретением функции, вызывающая алопецию, фотосенсибилизацию, дисфункцию щитовидной железы и признаки SAVI. Мутация G207E вызывает конститутивную активацию путей, связанных с воспалением, в клетках HEK, а также аберрантную сигнатуру интерферона и активацию воспаления в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов (PBMC). Используя варианты STING с аллелемR232 или H232 и мутацией GOFG207E, было показано, что после стимуляции CDN вариант R232 + G207E приводит к небольшому увеличению активности путей IFN-β и STAT1/2, в то время как с мутацией H232 + G207E, уровни IFN-β оставались постоянными, а активность STAT1/2 снижалась. Оба варианта показали аналогичную активацию путей STAT3 и NF-κB после стимуляции. Эти результаты показывают, что остаток R в положении 232 важен для связывания cGAMP и индукции IFN, и показывают, что мутанты G207E приводят к конститутивной активации сигнальных путей STING и лиганд-зависимой гиперактивации пути NF-κB. Пациенты с аллелемR232 и мутацией G207Еимели

более тяжелое течение болезни; этот полиморфизм усиливает конститутивную активацию мутантного STING, что приводит к сверхэкспрессии нижестоящих мишеней, таких как IFN, IL1-β и IL-18 (см., например, Keskitaloetal. (2018), доступно по адресу: doi.org/ 10.1101/394353).

67 аминокислот в мышином STING (SEQIDNO:369) были мутированы (см. Burdetteetal. (2011) Nature 478(7370):515-518) по отдельности или группами, чтобы идентифицировать аминокислоты, участвующие в циклическом связывании di-GMP (c-di-GMP) и/или индукции IFN. Средиидентифицированныхмутантовбылигиперактивныемутанты R196A/D204A, S271A/Q272A, R309A/E315A, E315A, E315N, E315Q и S271A (соответствующие R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, , соответственно, соссылкойнапоследовательность STING человека, какуказанов SEQ ID NO: 305-309), котораяспонтанноиндуцирует IFN принизкихуровняхтрансфекцииинеотвечаетна c-di-GMP, имутанты R374A, R292A/T293A/E295A/E299A, D230A, R231A, K235A, Q272A, S357A/E359A/S365A, D230A/R231A/K235A/R237A и R237A (соответствует R375A, R293A/T294A/E299 в E299 неэквивалентен STING человека), D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A и R238A, соответственно, вотношении STING человека, какуказанов SEQ ID NO:305-309), которыеиндуцировали IFN присверхэкспрессии, нонереагировалина c-di-GMP. Эти аллели все еще могут реагировать на эндогенный CDN 2'3' c-di-GAMP, поскольку позже было обнаружено, что некоторые мутации STING человека имеют низкое сродство к 3'3' CDN, продуцируемым бактериями, таким как c-di-GMP. (см., например, Corralesetal. (2015) CellReports 11:1018-1030).

Представленные в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии, которые кодируют эти белки с мутациями с приобретением функции, используют конститутивную активацию этих белков для увеличения продукции IFN типа I и провоспалительных цитокинов. В настоящем документе

представлены иммуностимулирующие бактерии, нацеленные на опухоль, которые кодируют STING, IRF3, IRF5, IRF7, MDA5 и/или RIG-I с мутациями с приобретением функции. Иммуностимулирующие бактерии увеличивают продукцию IFN-опосредованных цитокинов и хемокинов типа I в микроокружении опухоли, потенцируя противоопухолевый иммунный ответ и улучшая терапевтическую эффективность иммуностимулирующих бактерий. Ген, кодирующий STING, обозначается как TMEM173, ген, кодирующий MDA5, — IFIH1, а ген, кодирующий RIG-I, — DDX58. Для каждого гена существует множество аллелей, и известные мутации, которые могут возникать в генах с любым из аллелей, приводя к приобретению функции или конститутивной активации. Перечисленные ниже мутации могут возникать по отдельности или использоваться в любой комбинации. Другие мутации, которые приводят к приобретению функции, могут быть идентифицированы с помощью рутинных протоколов скрининга/мутации. В таблиценижеперечисленыиллюстративныемутации с приобретениемфункции в каждойизSTING/TMEM173 (SEQ ID NO:305-309), MDA5/IFIH1 (SEQ ID NO:310), RIG-I/DDX58 (SEQ ID NO:311). , IRF3 (SEQ ID NO:312) и IRF7 (SEQ ID NO:313).

Другие мутации, такие как делеция или замена сайта или сайтов фосфорилирования, таких как S324/L325/S326 → S324A/L325/S326A в STING, и другие замены для устранения сайта фосфорилирования для снижения ядерного фактора-κB (NF -kB) передача сигналов в STING или другие белки, которые используют такую передачу сигналов, также могут быть введены.

Полученные белки могут быть закодированы в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем описании. Белки кодируются на плазмидах иммуностимулирующих бактерий.

Введение нуклеиновых кислот, кодирующих STING дикого типа, может вызвать иммунный ответ; введение мутантов STING с усилением функции с конститутивной активностью, как предусмотрено в настоящем документе, в иммуностимулирующих бактериях, нацеленных на опухоль, приводит к более

сильному иммунному ответу и более эффективному противораковому терапевтическому действию. Усиленный иммунный ответ путем направленного на опухоль введения конститутивно активного STING или других подобных модифицированных сенсоров ДНК/РНК, таких как мутанты MDA5, RIG-I, IRF3 или IRF7 с усилением функции, как предусмотрено в настоящем документе, обеспечивает терапевтически более эффективное противораковое лечение. Например, как описано в настоящем документе, модификация иммуностимулирующих бактерий таким образом, чтобы они не инфицировали эпителиальные клетки, но сохраняли способность инфицировать фагоцитирующие клетки, включая иммунные клетки, резидентные в опухоли, эффективно нацеливает иммуностимулирующие бактерии на микроокружение опухоли, повышая терапевтическую эффективность и предотвращая нежелательные системные иммунные реакции. Эти нацеленные на опухоль бактерии сконструированы так, чтобы кодировать мутанты STING, MDA5, RIG-I, IRF3 или IRF7 с приобретением функции, которые конститутивно активны, например, даже в отсутствие стимуляции лигандом, обеспечивая мощный IFN типа I. ответ для улучшения противоракового иммунного ответа в микроокружении опухоли.

Таким образом, например, введение постоянно активированного STING может обеспечить альтернативные средства усиления передачи сигналов STING для иммунотерапевтического лечения рака. В некоторыхвариантахосуществлениииммуностимулирующиебактерии, нацеленныенаопухоль, представленные в настоящемдокументе, могутбытьмодифицированыдлякодирования STING/TMEM173 (SEQ ID NO: 305-309) с мутациями с приобретениемфункции, выбраннымииз S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E. , R197A, D205A, R197A/D205A, C206Y, G207E, D231A, R232A, K236A, R238A, D231A/R232A/K236A/R238A, S272A, Q273A, S272A/Q273A, F279L, S102P/F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M , R284K, R284T, R293A, T294A, E296A, R293A/T294A/E296A, R310A, E316A, E316N, E316Q, R310A/E316A, S324A/S326A, S358A, E360A, S366A, S358A/S3460A, и R258A/E3660A, и R375A, а такжеихконсервативныемутации. Кроме того,

комбинации мутаций STING с приобретением функции могут значительно усилить передачу сигналов STING по сравнению с их отдельными аналогами мутаций.

5

Таблица иллюстративных мутантов с приобретением функции

Мутации с приобретением функции, приводящие к стойкой экспрессии IFNI типа

STING	**RIG-I**	**MDA5**	**IRF3**	**IRF7**
V147L	E373A	T331I	S396D	S477D/S479D
N154S	C268F	T331R	S396D/S398D	S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D
V155M		A489T	S396D/S398D/S402D/T404D/S405D	Δ247–467
G166E		R822Q		S475D/S477D/S479D
C206Y		G821S		
G207E		A452T		
R281Q		A946T		
R284G		R337G		

STING	**RIG-I**	**MDA5**	**IRF3**	**IRF7**
R284S		D393V		
R284M		G495R		
R284K		R720Q		
R284T		R779H		
S102P/F279L		R779C		
S102P		L372F		
F279L				
R197A				
D205A				
R197A/D205A				
S272A/Q273A				
R310A/E316A				
R310A				
E316A				
E316N				
E316Q				
S272A				
R375A				
R293A				
T294A				

STING	RIG-I	MDA5	IRF3	IRF7
E296A				
R293A/ T294A/ E296A				
D231A				
R232A				
K236A				
Q273A				
S358A				
E360A				
S366A				
S358A/ E360A/ S366A				
D231A/ R232A/ K236A/ R238A				
R238A				
V147M				
S324A/ S326A				
N154S/R284G				

Аминокислотные остатки R197, D205, R310, R293, T294, E296, S272, Q273, E316, D231, R232, K236, S358, E360, S366 и R238 относительно последовательности STING человека, как указано в любом SEQIDNO:305-309, соответствуют аминокислотным остаткам R196, D204, R309, R292, T293, E295,

S271, Q272, E315, D230, R231, K235, S357, E359, S365 и R237, соответственно, с ссылка на последовательность мышиного STING, как указано в SEQIDNO:369.

Здесь показано, что комбинация замен N154S/R284G приводит к конститутивной экспрессии интерферона I типа. Также включены консервативные замены каждой из замен (см. таблицу в разделе «Определения», в которой перечислены типичные консервативные мутации для каждой аминокислоты).

b. Конститутивная экспрессия IRF3 и мутации с приобретением функции

IRF3 (фактор регуляции интерферона 3, или IRF-3) и IRF7 (или IRF-7) являются ключевыми активаторами генов IFNI типа. После индуцированного вирусом С-концевого фосфорилирования (с помощью TBK1) активированные IRF3 и IRF7 образуют гомодимеры, перемещаются из цитоплазмы в ядро и связываются с IFN-стимулированными ответными элементами (ISRE), чтобы индуцировать ответы IFNI типа. IRF3 конститутивно экспрессируется в нестимулированных клетках и существует в виде неактивной цитоплазматической формы, в то время как IRF7 конститутивно не экспрессируется в клетках и индуцируется интерфероном, липополисахаридом и вирусной инфекцией.

СверхэкспрессияIRF3 значительно увеличивает опосредованную вирусом экспрессию генов IFNI типа, что приводит к индукции противовирусного состояния. Также было показано, что активация IRF3 активирует транскрипцию СС-хемокинаRANTES (CCL5) после вирусной инфекции (см., например, Linetal. (1999) Mol. CellBiol.19(4):2465-2474). .

Остатки S385, S386, S396, S398, S402, T404 и S405 в С-концевом домене IRF3 фосфорилируются после заражения вирусом, вызывая конформационные изменения, приводящие к активации IRF3. Активация IRF3 индуцируется не только вирусной инфекцией, но также липополисахаридом (LPS) и поли(I:C). Из

семи остатков, которые могут фосфорилироваться в С-концевом кластере IRF3, одной точечной мутации, S396D, достаточно для образования конститутивно активной формы IRF3. IRF3(S396D) усиливает трансактивацию промоторов IFNα1, IFN-β и RANTES в 13, 14 и 11 раз соответственно по сравнению с IRF3 дикого типа.

Другой мутант, IRF3(S396D/S398D), усиливает трансактивацию промоторов IFNα1, IFN-β и RANTES в 13, 12 и 12 раз соответственно по сравнению с IRF3 дикого типа. Другим конститутивно активным мутантом IRF3 является IRF3(5D), в котором остатки серина или треонина в положениях 396, 398, 402, 404 и 405 заменены остатками фосфомиметической аспарагиновой кислоты (IRF3(S396D/S398D/S402D/T404D/S405D).)). Аналогичные мутации с приобретением функции, приводящие к конститутивной активности медиаторов иммунного ответа, например, к индукции интерферона типа I, могут быть достигнуты путем мутации остатков серина в фосфомиметическуюаспарагиновую кислоту в других белках, таких как RIG-I, MDA5 и STING. , которые находятся в сигнальных путях иммунного ответа.

IRF3(5D) демонстрирует конститутивное ДНК-связывание и трансактивационную активность, образование димеров, ассоциацию с коактиваторами транскрипции p300 (также называемую EP300 или E1A-связывающим белком p300)/CBP (также известную как CREB-связывающий белок или CREBBP) и локализацию в ядре. . Его трансактивационная активность не индуцируется далее вирусной инфекцией. IRF3(5D) является очень сильным активатором экспрессии генов IFN-β и ISG-15; IRF3(5D) сам по себе стимулирует экспрессию IFN-β так же сильно, как вирусная инфекция, и усиливает трансактивацию промоторов IFNα1, IFN-β и RANTES в 9, 5,5 и 8 раз соответственно по сравнению с диким типом IRF3 (см., например, Linetal. (2000) J. Biol. Chem. 275(44):34320-34327; Lin et al. (1998) Mol. Cell Biol. 18(5):2986-2996; и Servant и др. (2003) J. Biol. Chem. 278(11):9441-9447). Любое положение S385, S386, S396, S398, S402, T404 и S405 может быть мутировано по отдельности или в комбинации с получением конститутивно активных

мутантов IRF3 в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем документе.

c. Нечеловеческие белки STING и их варианты с повышенной или конститутивной активностью, а также химеры STING и их варианты с повышенной или конститутивной активностью

Как обсуждалось выше, цитозольнаядвухцепочечная ДНК (dsДНК) стимулирует выработку интерферона I типа (IFN) через эндоплазматический ретикулум (ER) – резидентный адапторный белок STING (стимулятор генов IFN), который активирует фактор транскрипции интерферон-регуляторный фактор 3. (IRF3). Ось TANK, связывающая киназу 1 (TBK1)/IRF3, приводит к индукции IFN типа I, активации дендритных клеток (DC) и перекрестной презентации опухолевых антигенов для активации $CD8^+$ Т-клеточно-опосредованного противоопухолевого иммунитета. Передача сигналов STING также активирует сигнальную ось ядерного фактора каппа-легкой цепи активированных В-клеток (NF-κB), что приводит к провоспалительному ответу, но не к активации необходимых DC и $CD8^+$ Т-клеток для противоопухолевого иммунитета.

После узнавания 2'3' cGAMPSTING перемещается из эндоплазматического ретикулума через аппарат Гольджи, обеспечивая рекрутирование TANK-связывающей киназы 1 (TBK1) и активацию факторов транскрипции IRF3 и NF-κB. Область карбоксиконцевого хвоста (С-концевой хвост или CTT) STING необходима и достаточна для активации TBK1 и стимуляции фосфорилирования IRF3; он также участвует в передаче сигналов NF-κB. CTT представляет собой неструктурированный отрезок примерно из 40 аминокислот, который содержит звенья последовательности, необходимые для фосфорилирования STING и рекрутирования IRF3. Нисходящая передача сигналов IRF3 и NF-κB приписывается специфическим звеньям последовательности в С-концевом хвосте (CTT) STING, которые консервативны среди видов позвоночных. Модульные звенья в CTT, которые включают IRF3-,

TBK1- и TRAF6-связывающие модули, управляют силой и специфичностью клеточной сигнализации и иммунных ответов.

В зависимости от видов и соответствующих характеристик их дискретных элементов STINGCTT могут влиять нисходящие реакции IRF3 и NF-κB, а иногда и противоположные. Элементы STINGCTT диктуют и точно настраивают баланс между двумя сигнальными путями, что приводит к различным биологическим ответам. В иммунных клетках человека и мыши, например, STING-зависимая активация IRF3 приводит преимущественно к ответу интерферона I типа. Передача сигналов STING в клетках человека также вызывает провоспалительный ответ посредством канонических и, возможно, неканонических путей NF-κB посредством рекрутирования TRAF6. Остаток S366 STING человека (см., например, SEQIDNO: 305-309) представляет собой первичный сайт фосфорилирования TBK1, который является частью звена LxISв CTT, который необходим для связывания IRF3, в то время как второе звено PxPLR, включающий остаток L374 , требуется для связывания TBK1. Звенья LxIS и PxPLRвысококонсервативны во всех аллелях STING позвоночных. У других видов передача сигналов STING приводит преимущественно к активации оси передачи сигналов NF-κB. Например, CTT рыбок данио, который отвечает за гиперактивацию передачи сигналов NF-κB, содержит удлинение с высококонсервативным звеном PxExxD на крайнем С-конце, которого нет в аллелях STING человека и других млекопитающих; это звено имеет сходство с сайтами связывания фактора 6, ассоциированного с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF6). В то время как роль TRAF6 в передаче сигналов STING человека несущественна, рекрутирование TRAF6 необходимо для STING-индуцированной активации NF-κB у рыбок данио. Химера STING человека и рыбки данио, в которой STING человека был сконструирован так, чтобы содержать модуль STINGCTTDPVETDY рыбок данио, индуцировала более чем 100-кратную активацию NF-κB, указывая на то, что эта область необходима и достаточна для направления усиленного сигнала NF-κB. Добавление CTT рыбок данио также приводило к усилению

интерферонового ответа STING (см. deOliveiraMannetal. (2019) CellReports 27:1165-1175).

Различия между видами в балансе между передачей сигналов IRF3 и NF-kB используются в данном документе для получения модифицированных белков STING, которые имеют сниженную передачу сигналов NF-kB и/или, возможно, повышенную передачу сигналов IRF3, так что, когда белок STING доставляется и экспрессируется в TME результирующий ответ представляет собой повышенный противоопухолевый / противовирусный ответ по сравнению с немодифицированным белком STING.

В некоторых вариантах реализации STING-белки из видов, которые обладают низкой сигнальной активностью NF-κB или вообще не имеют ее, представлены в носителях для доставки, включая любые иммуностимулирующие бактерии, описанные в настоящем документе или известные специалистам в данной области, а также в других носителях для доставки. такие как вирусные векторы, включая онколитические векторы, миниклетки, экзосомы, липосомы и клетки, такие как Т-клетки, которые используются в клеточной терапии и используются для доставки носителей, такие как бактерии и онколитические векторы.

Нечеловеческие STING-белки могут представлять собой, помимо прочего, STING-белки следующих видов: тасманский дьявол (Sarcophilusharrisii; SEQIDNO:349), мартышка (Callithrixjacchus; SEQIDNO:359), крупный рогатый скот (Bos телец; SEQIDNO:360), кошка (Feliscatus; SEQIDNO:356), страус (Struthiocamelusaustralis; SEQIDNO:361), хохлатый ибис (Nipponianippon; SEQIDNO:362), целакант (Latimeriachalumnae; SEQIDNO:363-364), кабан (Susscrofa; SEQIDNO:365), летучая мышь (Rousettusaegyptiacus; SEQIDNO:366), ламантин (Trichechusmanatuslatirostris; SEQIDNO:367), акула-призрак (Callorhinchusmilii; SEQIDNO:368) и мышь (Musmusculus; SEQIDNO:369). Эти STING-белки позвоночных легко активируют иммунную передачу сигналов в клетках человека, указывая на то, что молекулярный механизм передачи сигналов STING является общим для позвоночных (см., deOliveiraMann*etal.* (2019) *CellReports* 27:1165-1175).

В других вариантах осуществления нечеловеческие белки STING содержат любую из конститутивных мутаций активации STING и приобретения функции в соответствующих локусах в нечеловеческом STING, соответствующих локусам в STING человека, описанным выше (см. Пример 17 ниже, который обеспечивает иллюстративные выравнивания и соответствующие мутации у различных видов; см. также рисунки 1-13).

В других вариантах осуществления предусмотрены химеры белков STING. В химерах область CTT или ее часть (части), которая придает или участвует в передаче сигналов/активности NF-κB белка STING первого вида, заменена соответствующей CTT или ее частью (частями) из второго вида, чей белок STING имеет более низкую или очень небольшую, меньшую, чем у человека, сигнальную активность NF-κB. Как правило, первым видом является человек, а замещающий CTT или его часть (части) происходит от STING таких видов, как тасманский дьявол, мартышка, крупный рогатый скот, кошка, страус, кабан, летучая мышь, ламантин, хохлатый ибис, целакант и акулы-призраки, которые имеют гораздо более низкую активность NF-κB. Таким образом, это приводит к белку STING, который индуцирует интерферон типа I, который важен для противоопухолевой активности и который имеет ограниченную или не имеет активности NF-κB. что нежелательно при противоопухолевой терапии. Химеры могут дополнительно включать конститутивную активацию STING человека и мутации с приобретением функции в соответствующих локусах для увеличения или придания конститутивной активности интерферона I типа. Во всех вариантах осуществления звено связывания TRAF6 может быть делетировано для дальнейшего снижения или устранения активности, нежелательной для противоопухолевого терапевтического средства.

Эти нечеловеческие белки, химеры и мутанты STING представлены в носителях для доставки, таких как любые описанные в настоящем документе или известные специалистам в данной области, включая онколитические вирусные векторы, клетки, такие как стволовые клетки и Т-клетки, которые используются в клеточной терапии экзосомы, миниклетки, липосомы и иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе,

которые накапливаются в резидентных в опухоли иммунных клетках и доставляют кодируемые белки в микроокружение опухоли и в опухоли. Нечеловеческие белки STING, модифицированные белки STING и химеры STING предназначены для применения в качестве терапевтических средств для лечения опухолей, как описано в настоящем документе, или для применения в других способах, известных специалистам в данной области. Также предлагаются фармацевтические композиции, содержащие белки STING, носители для доставки и кодирующие нуклеиновые кислоты.

d. Другие генные продукты, действующие как цитозольные сенсоры ДНК/РНК, и их конститутивные варианты

Другими генными продуктами, которые воспринимают или взаимодействуют с цитозольными нуклеиновыми кислотами, являются индуцируемые ретиноевойкислотой ген I (RIG-I)-подобные рецепторы (RLR), которые включают RIG-I и MDA5 (белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы). RLR являются цитоплазматическими сенсорами вирусной dsРНК и нуклеиновых кислот, секретируемых бактериями, и включают RIG-I, MDA5 и LGP2 (лаборатория генетики и физиологии 2). При связывании лиганда, такого как вирусная dsРНК, RIG-I и MDA5 активируют митохондриальный противовирусный сигнальный адаптерный белок, или MAVS, который рекрутирует факторы, ассоциированные с рецептором фактора некроза опухоли (TNF) (TRAF), для сборки сигнального белка. комплекса на наружных мембранах митохондрий. Нижестоящие сигнальные компоненты далее рекрутируются TRAF, что приводит к фосфорилированию и активации IRF3 (фактор регуляции интерферона 3), IRF7, NF-κB (усилитель ядерного фактора каппа-легкой цепи активированных B-клеток) и AP-1 (белок-активатор 1). В результате индуцируется экспрессия IFN, провоспалительных цитокинов и других генов, участвующих в элиминации патогенов (см., например, LuandMacDougall (2017) Front. Genet.8:118). Как и STING, конститутивная активация MDA5 и RIG-I из-за мутаций с приобретением функции приводит к

индукции IFN типа I, что можно использовать для усиления противоопухолевого иммунного ответа у иммуностимулирующих бактерий.

i. RIG-I

Ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), также известный как DDX58 (хеликаза 58 DEXD/H-box), представляет собой еще один белок, конститутивная активация которого связана с развитием интерферонопатий, таких как атипичный синдром Смита-Магениса. RIG-I, как и MDA5/IFIH1, является членом семейства RIG-I-подобных рецепторов (RLR) и представляет собой рецептор распознавания цитозольного паттерна из 925 остатков, который функционирует при обнаружении вирусной dsРНК. RIG-I инициирует врожденный иммунный ответ на вирусную РНК через независимые пути, которые способствуют экспрессии IFN типа I и типа III и провоспалительныхцитокинов (см., например, Jangetal. (2015) Am. J. Hum. Genet. 96: 266-274 и Lu and MacDougall (2017) Front. Genet.8:118).

Было обнаружено, что атипичный синдром Смита-Магениса без характерных зубных аномалий, но с различными фенотипами, включая глаукому, кальцификацию аорты и скелетные аномалии, вызван мутациями в гене DEXD/H-boxгеликаза 58 (DDX58), который кодирует индуцируемый ретиноевой кислотой ген I (RIG-I). В частности, мутации E373A и C268F в DDX58 были идентифицированы как вызывающие приобретение функции в RIG-I. Повышенные количества мутантного DDX58 были связаны со значительным увеличением базовых уровней активности репортерного гена NF-κB, и эта активность дополнительно увеличивалась при стимуляции аналогом dsРНК поли(I:C). Мутации RIG-I также индуцировали фосфорилирование и димеризациюIRF3 на базальном уровне и приводили к увеличению экспрессии IFNB1, интерферон-стимулируемого гена 15 (ISG15), и хемокиновый (звено CC) лиганд 5 (CCL5) как в базальных, так и в поли(I:C) трансфицированных клетках HEK293FT.

Эти результаты показывают, что мутированный DDX58/RIG-I приводит к конститутивной активации, приводящей к повышенной активности IFN и стимулированной IFN экспрессии генов (см., например, Jangetal. (2015) Am. J. Hum. Genet. 96: 266 -274 и Lu and MacDougall (2017) Front. Genet.8:118). Иммуностимулирующие бактерии, нацеленные на опухоль, представленные в настоящем документе, могут быть модифицированы для кодирования RIG-I/DDX58 (см., например, SEQIDNO: 311) с мутациями с приобретением функции, такими как, но не ограничиваясь ими, E373A и C268F, по отдельности и в виде комбинации.

ii. MDA5/IFIH1

Другим геном интерферонопатии является IFN-индуцированный белок 1, содержащий домен Схеликазы (IFIH1), также известный как белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5), который является членом RIG-I-подобного семейства цитоплазматических рецепторов DExD/Hbox-РНК. MDA5, кодируемый IFIH1, представляет собой цитоплазматический рецептор распознавания образов из 1025 аминокислот, который распознает вирусную двухцепочечную РНК (dsРНК) и секретируемые бактериальные нуклеиновые кислоты в цитоплазме и активирует передачу сигналов IFNI типа через адаптерную молекулу, MAVS (митохондриальный противовирусный агент). сигнальный белок). MAVS рекрутирует факторы, ассоциированные с рецептором фактора некроза опухоли (TNF) (TRAF), которые, в свою очередь, рекрутируют нижестоящие сигнальные компоненты, что приводит к фосфорилированию и активации IRF3 (регуляторный фактор интерферона 3), IRF7, NF-κB (ядерный фактор каппа-легкой цепи -энхансер активированных В-клеток), и AP-1 (белок-активатор 1). Это приводит к экспрессии интерферонов, провоспалительных цитокинов и других генов, участвующих в элиминации патогенов (см., например, Rutschetal. (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:275-282; Rice et al. (2014).) Nat.Genet.46(5):503-509 иLuandMacDougall (2017) Front.Genet.8:118).

Варианты IFIH1 с усилением функции (GOF) встречаются у субъектов с аутоиммунными заболеваниями, включая синдром Айкарди-Гутьера (AGS) и

синдром Синглтона-Мертена (SMS), которые характеризуются выраженным сосудистым воспалением. AGS представляет собой воспалительное заболевание, особенно поражающее головной мозг и кожу, и характеризуется активацией индуцированных интерфероном транскриптов. AGS обычно возникает из-за мутаций в любом из генов, кодирующих экзонуклеазу ДНК TREX1, три неаллельных компонента эндонуклеазного комплекса РНКазыН2, дезоксинуклеозидтрифосфаттрифосфогидролазуSAMHD1 и фермент редактирования двухцепочечной РНК ADAR1. Некоторые пациенты с AGS не имеют мутаций ни в одном из этих генов, но имеют мутации GOF в IFIH1, что указывает на то, что этот ген также вовлечен в AGS. Синдром Синглтона-Мертена представляет собой аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся аномалиями кровеносных сосудов (например, кальцификация), зубов (например, ранний периодонтит, резорбция корней) и костей (например, остеопения, акроостеолиз, остеопороз). Сигнатурные гены интерферона активируются у пациентов с синдромом Синглтона-Мертена, что было связано с мутациями GOF в IFIH1 (см., например, Riceetal. (2014) Nat. Genet.46(5):503-509; и Rutsch et al. (2015) Am.J.Hum.Genet.96:275-282). 503-509; и Rutsch et al. (2015) Ам. Дж. Хам. Быт.96:275-282). 503-509; и Rutsch *et al.* (2015) *Am. J. Hum. Genet.* 96:275-282).

Стимулирующуюактивностьрепортера IFN-β IFIH1 дикоготипаишестимутантов GOF IFIH1, идентифицированныхупациентовсСАГ (R720Q, R779H, R337G, R779C, G495R, D393V), сравниваливклетках HEK293T, которыеэкспрессируютнизкиеуровнирецепторовэндогеннойвирусной РНК. IFIH1 дикоготипаиндуцировалсяприсвязываниидлинного (> 1 kb) аналогadsРНКполиинозиновойполицитидиловойкислоты (поли(I:C)), нонекороткойdsРНК 162 bp, иобладалминимальнойактивностьювотсутствиеэкзогеннойРНК. Мутанты IFIH1продемонстрировали значительную индукцию передачи сигналов IFN в ответ на короткую dsRNA 162 bp в дополнение к надежной передаче сигналов в ответ на поли(I:C). Мутанты также демонстрировали в 4-10 раз более высокий

уровень исходной сигнальной активности в отсутствие экзогенного лиганда (см., например, Riceetal. (2014) Nat. Genet. 46(5):503-509).

Другая мутация IFIH1 с приобретением функции, R822Q, была идентифицирована как вызывающая синдром Синглтона-Мертена путем запуска продукции IFNI типа и приводящая к ранней кальцификации артерий, а также воспалению и резорбции зубов. Клетки HEK293T (которые имеют самые низкие уровни эндогенной экспрессии IFIH1) использовали для сверхэкспрессииMDA5 дикого типа и R822Q. Экспрессия IFIH1 дикого типа приводила к увеличению экспрессии IFNB1 (интерферон, бета-1, фибробласт) дозозависимым образом, тогда как мутантный IFIH1 приводил к примерно в 20 раз большей экспрессии IFNB1. После стимуляции аналогом dsРНК поли(I:C) R822QIFIH1 приводил к более высоким уровням экспрессии IFNB1, чем IFIH1 дикого типа, что указывает на то, что R822QIFIH1 гиперактивен в отношении чужеродных dsРНК. Такженаблюдаласьболеевысокаяэкспрессиясигнатурныхгеновинтерферона, такихкак IFI27, IFI44L, IFIT1,*IFI27*, *IFI44L*, *IFIT1*, *ISG15*, *RSG15*, *RSAD2*,*uSIGLEC1*, (см, напр, Rutsch *et al.* (2015) *Am. J. Hum. Genet.* 96:275-282).

Сигнатура интерферона, наблюдаемая у пациентов с другой мутацией IFIH1 GOF, A489T, указывает на интерферонопатиюI типа; IFIH1 A489T связан с повышенной продукцией интерферона и фенотипами, напоминающими ознобленную волчанку, AGS и SMS (см., например, Bursztejnetal. (2015) Br. J. Dermatol.173(6):1505-1513). Вариант A489T приводил к индукции IFN не только после стимуляции аналогом длинной dsРНК поли(I:C), но также и короткой dsРНК. Две дополнительные мутации с приобретением функции в IFIH1, T331I и T331R, были идентифицированы у пациентов с фенотипами SMS, у которых наблюдалась значительная активация транскриптов, индуцированных IFN. Варианты T331I и T331R приводили к повышенной экспрессии IFN-β даже в отсутствие экзогенного лигандадцРНК, что согласуется с наблюдаемой конститутивной активацией MDA5 (см, напр., LuuMacDougall (2017) *Front. Genet.* 8:118).

A946T является еще одной мутацией IFIH1 GOF, которая приводит к увеличению продукции IFN типа I, способствуя воспалению и увеличивая риск аутоиммунитета. Мутация A946T в IFIH1 приводит к аддитивным эффектам в сочетании с аллелемTMEM173 R232 и мутацией G207EGOF в STING, что приводит к тяжелому фенотипу с ранним началом с признаками, сходными с SAVI (см., например, препринт Keskitaloetal. (2018), доступно на doi.org/10.1101/394353). G821S представляет собой мутацию GOF в IFIH1, которая, как было показано, приводит к спонтанно развивающимся волчаночноподобным аутоиммунным симптомам на мышиной модели (см., например, Rutschetal. (2015) Am. J. Hum. Genet. 96:275-282), в то время как миссенс-мутации IFIH1 A452T, R779H и L372F, идентифицированные у лиц с AGS, вызывают перепроизводство интерферона I типа (см., например, Odaetal. (2014) Am. J. Hum. Genet.95:121-125).

Предложенные в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии, нацеленные на опухоль, могут быть модифицированы для кодирования MDA5/IFIH1 (см., например, SEQIDNO:310) с мутациями с приобретением функции, выбранными из T331I, T331R, R337G, L372F, D393V, A452T, A489T, G495R, R720Q, R779H, R779C, G821S, R822Q и A946T по отдельности или в любой комбинации.

iii. IRF7

Конститутивно активные формы IRF7 (или IRF-7) включают мутанты, в которых различные C-концевые серины заменены фосфомиметическимAsp, включая IRF7(S477D/S479D), IRF7(S475D/S477D/S479D) и IRF7(S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D). IRF7(S477D/S479D) является сильным трансактиватором экспрессии генов IFNA и RANTES и стимулирует экспрессию генов даже в отсутствие вирусной инфекции. IRF7(S475D/S477D/S479D) и IRF7(S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D) дополнительно не усиливают трансактивационную активность IRF7(S477D/S479D), но трансактивационная активность всех трех мутантов дополнительно стимулируется. путем заражения

вирусом. Мутантный IRF7(Δ247-467), локализующийся в ядре неинфицированных клеток, представляет собой очень сильную конститутивную форму IRF7; (см., напр., Lin*etal.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275(44):34320-34327).

Представленные в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии могут кодировать и экспрессировать конститутивно активные мутанты IRF7, включая мутанты с заменами в остатках 475-477, 479, 483 и 487, а также мутанты с аминокислотными делециями. Иммуностимулирующие бактерии кодируют эти белки на плазмидах под контролем промоторов и любых других желаемых регуляторных сигналов, распознаваемых хозяевами-млекопитающими, включая человека.

e. Другие регуляторные белки IFNI типа

Другие белки, участвующие в распознавании ДНК/РНК, которые активируют ответы IFN типа I, могут быть мутированы для создания конститутивной экспрессии IFN типа I. Немодифицированные и/или модифицированные белки могут быть закодированы в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем документе, для использования для доставки белка в микроокружение опухоли, например, в иммунные клетки, резидентные опухоли, для повышения экспрессии IFNI типа.

Эти белки включают, но не ограничиваются ими, белки, обозначенные как TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF2, TRAF3, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9 (DDX9), DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 и SNRNP200.

1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111

Ген	Кодируемый белок	Активность/Функция
TRIM56	Трехстонний звено-содержащий белокубиквитин-протеинлигазаTRIM56	ПромотируетдимеризациюSTINGв ответ на стимуляцию dsДНК, приводящую к получению; потенцирует внеклеточную dsРНК-индуцированнуюэкспрессиюIFNB1 иIFN-стимулированных генов*ISG15*, *IFIT1/ISG56*, *CXCL10*, *OASL*and*CCL5*; позитивный регулятор сигнализацииTLR3
RIP1/RIPK 1	Взимодействующий с рецептором серин /треонинпротеин (киназа) 1	Преобразует воспалительные сигналы и сигналы гибели клеток (программируемый некроз) следующие за лигированием рецепторов гибели, активация рецепторов распознавания патогена и повреждения ДНК; косвенно активирует NF-κB; направляет LPS-индуцированныйIFN-βсинтез у мышей
Sec5 (EXOC2)	Компонент 2 комплексаэкзоциста	Компонент комплекса экзоциста, включенный в везикулыс сайтами слияния на мембране; солокализуется со STINGиTBK1 после внутриклеточной стимуляции ДНК, индуцирующей получение IFNтипа 1.
TRAF2	Фактор 2 связанный с рецептором TNF	Регулирует активацию NF-κBиJNK/MAPK8; опосредует

Ген	Кодируемый белок	Активность/Функция
		индукцию IFN типа 1
TRAF3	Фактор 3, связанный с рецептором TNF	Регулирует активацию NF-кВиMAPкиназ; опосредуетактивациюIRF3; опосредует индукцию IFNтипа 1, опосредует получение цитокина
TRAF6	Фактор 6, связанный с рецептором TNF	АктивируетNF-кВ, JUNиAP-1; индуцирует получениеIFNтипа 1 в ответ на вирусную инфекцию и внутриклеточныйdsРНК; индуцируетполучениепровоспалительных цитокинов.
STAT1	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 1	Образует часть фактора транскрипцииISGF3, связывающую стимулированныеIFNэлементы ответа (ISRE) для активациитранкрипцииIFN-стимулированных генов (ISG)
LGP2 (DHX58)	Лаборатория генетики и физиологии 2 / Вероятная АТР-зависимаяРНКгеликазаDHX58	Регулирует опосредованную RIG-I/DDX58- иIFIH1/MDA5 антивирусную сигнализацию.
DDX3 (DDX3X)	АТР-зависимая RNAгеликазаDDX3X	Промотирует получениеIFN типа 1; действует как вирусный сенсор РНК; вовлечен в TBK1 иIKBKE-зависимую активацию IRF3, ведущую к индукцииIFNB; связан с промотерамиIFNBpromoters; связан с MAVSиRIG-I, что вызывает

Ген	Кодируемый белок	Активность/Функция
		сигнализацию на ранних стадиях инфекции; связывает MDA5 для повышения распознаванияdsRNA
DHX9/DDX9	DExD/H-боксгеликаза 9 / ATP-зависимаяРНКгеликазаА	Обнаруживает вирусные нуклеиновые кислоты; запускает ответы хозяина не-selfДНКспособом, зависимым от MyD88; взаимодействует с MAVSдля стимуляции опосредованного NF-κBврожденногоиммунитета против вирусной инфекции и активирует путиIRF3 иMAPK; потенцирует запущеную вирусом индукцию IL-6 иIFN-β
DDX1	ATP-зависимаяРНКгеликазаDDX1	Компонент комплекса мульти-геликаза-TRIFкоторый обнаруживает вирусную двухцепочечную РНК (dsРНК), активирует NF-κBсигнальный путь, и индуцирует полученіIFN типа 1и провоспалительных цитокинов
DDX21	Ядерная РНК геликаза 2	Компонент комплекса мульти-геликаза -TRIF который обнаруживает вирусную двухцепочечную РНК (dsРНК), активирует NF-κB сигнальный путь, и индуцирует получениеIFN типа 1 и провоспалительных цитокинов
DHX15	Пре-mРНК-сплайсинга	Вирусный сенсор РНК который

Ген	Кодируемый белок	Активность/Функция
(DDX15)	факторATP-зависимойRNAгеликазыDHX 15	взаимодействует с MAVSиндуцируя получение IFNтипа 1 и провоспалительных цитокинов; активирует сигнализацию IRF3, NF-κB, иMAPK
DHX33 (DDX33)	ATP-зависимая РНКгеликазаDHX33	Вирусный сенсор dsRNA, который взаимодействует с MAVSи запускает ответ IFNтипа 1; активирует сигнальные пути NF-κB, IRF3, иMAPK; активирует инфламмасомыNLRP3, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов
DHX36 (DDX36)	ATP-зависимаяДНК/РНКгеликаза DHX36	Компонент комплекса мульти-геликаза -TRIF который обнаруживает вирусную двухцепочечную РНК (dsРНК), активирует NF-κB сигнальный путь, и индуцирует получение IFN типа 1 и провоспалительных цитокинов
DDX60	Возможная ATP-зависимая РНКгеликазаDDX60	Обнаруживает вирусные РНК и ДНК; образует комплекс с RIG-Iподобными рецепторами, промотируя антивирусную активность; положительно регулирует RIG-IиMDA5-зависимый IFNтипа 1 andэкспрессию IFN-индуцибельногогена в ответ на вирусную инфекцию; связывает

Ген	Кодируемый белок	Активность/Функция
		ssРНК, dsРНК, ИdsДНК; промотирует связывание RIG-IидsРНК
SNRNP200	U5 малая ядернаярибонуклеопротеин 200 kДагеликаза	Обнаруживает/присоединяетвирусную РНКи взаимодействует с TBK1, промотируя активацию IRF3 и получение IFN типа 1

Варианты с приобретением функции могут быть получены, например, путем скрининга и/или мутагенеза. Сайт-направленный мутагенез можно проводить invitro для выявления мутаций с повышенной активностью, которые приводят к более высокому уровню и/или конститутивной экспрессии IFNI типа. Интактная геномная ДНК может быть получена от неродственных пациентов, страдающих аутоиммунными и аутовоспалительными симптомами, и от здоровых людей для скрининга и идентификации других продуктов, экспрессия которых приводит к повышенной или конститутивной экспрессии IFNI типа. Можно выполнить секвенирование всего экзома и проанализировать интроны и экзоны, чтобы идентифицировать белки с мутациями в путях, связанных с повышенной или конститутивной экспрессией интерферона типа I. После идентификации мутаций молекулы сДНК, кодирующие полноразмерный ген, с идентифицированной(ыми) мутацией(ями) и без нее трансфицируют в линию репортерных клеток, которая измеряет экспрессию интерферона типа I. Например, можно создать репортерную клеточную линию, в которой экспрессия люциферазы находится под контролем промотора IFN-β. Мутант с приобретением функции, который является конститутивно активным, будет способствовать экспрессии IFN-β, тогда как нестимулированный белок дикого типа этого не делает. Стимуляция может быть вызвана вирусной инфекцией, бактериальной инфекцией, бактериальными нуклеиновыми кислотами, LPS, dsRNA, поли(I:C) или повышением экзогенных уровней белкового лиганда (например, CDN). Идентифицированные белки также включают те, которые усиливают иммунный ответ на представляющий интерес антиген(ы) у

субъекта. Иммунный ответ включает клеточный или гуморальный иммунный ответ, характеризующийся одним или несколькими из следующих признаков: (i) стимуляция передачи сигналов интерферонового пути I типа; (ii) стимуляция передачи сигналов пути NF-κB; (iii) стимуляция воспалительной реакции; (iv) стимуляция продукции цитокинов; (v) стимуляция развития, активности или мобилизации дендритных клеток; (vi) любые другие ответы, указывающие на продукт, экспрессия которого усиливает иммунный ответ; и (vii) комбинация любого из (i)-(vi).

4. Антитела и фрагменты антител

Достижения в области инженерии антител привели к созданию фрагментов рекомбинантных антител, которые имеют много улучшений по сравнению с обычными моноклональными антителами, особенно с точки зрения производства, проникновения в ткани и простоты использования. Примером этого является одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), состоящий из вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей сайта связывания антитела, соединенных друг с другом гибким пептидным линкером, который имеет обычно последовательность (G4S)3 (см., например, Weisseretal. (2009) Biotechnol. Adv. 27(4):502-520). Другие примеры включают фрагменты антител scFv-Fc, в которых V_Hдомен scFv связан с Fc-областью. Такие фрагменты антител позволяют нацеливать антигены способом, который может быть закодирован на плазмиде и доставлен, как показано здесь, иммуностимулирующей бактерией. Примеры потенциальных антигенов для нацеливания включают, но не ограничиваются ими, перечисленные ниже.

a. TGF-β

Трансформирующий фактор роста бета (TGF-β) представляет собой плейотропный цитокин, играющий многочисленные роли в эмбриогенезе, заживлении ран, ангиогенезе и иммунной регуляции. В клетках млекопитающих он существует в трех изоформах: TGF-β1, TGF-β2 и TGF-β3; TGF-β1 является наиболее преобладающим в иммунных клетках (см., например, Esebanmenetal.

(2017) Immunol. Res.65:987-994). Роль TGF-β как иммунодепрессанта, возможно, является его наиболее доминирующей функцией. Его активация из латентной формы в микроокружении опухоли, в частности, оказывает сильное иммунодепрессивное действие на ДК и их способность толерантности к антиген-специфическим Т-клеткам. TGF-β также может напрямую конвертировать Th1 CD4 $^{+}$Т-клетки к иммуносупрессивнымTreg, что дополнительно способствует толерантности опухоли (см., например, Travisetal. (2014) Annu. Rev. Immunol. 32: 51-82). Основываясь на его опухолеспецифических иммуносупрессивных функциях и независимо от его известных свойств роста раковых клеток и метастазирования, ингибирование TGF-β является целью терапии рака. Высокие уровни передачи сигналов TGF-β были продемонстрированы при нескольких типах опухолей человека, включая колоректальный рак (CRC), гепатоцеллюлярную карциному (HCC), аденокарциному протоков поджелудочной железы (PDAC) и немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) (см. например, Colak и др. (2017) TrendsCancer 3(1):56-71). Системное ингибирование TGF-β может привести к неприемлемой аутоиммунной токсичности, и его ингибирование должно быть локализовано в микроокружении опухоли. Одним из способов достижения этого является создание растворимого рецептора TGF-β, который действует как приманка для связывания TGF-β (см., например, Zhangetal. (2008) J. Immunol. 181:3690-3697).

Как таковые, иммуностимулирующие бактерии, нацеленные на опухоль, содержащие рецептор-приманку TGF-β , предложенные в настоящем документе, могут связывать и удалять TGF-β из микроокружения опухоли, тем самым нарушая иммунную толерантность опухоли и стимулируя противоопухолевый иммунитет.

В дополнение к рецепторам-ловушкам, связывающим ТФР-бета, другие полипептидные антагонисты ТФР-бета, которые могут связывать и удалять ТФР-бета из микроокружения опухоли, тем самым нарушая иммунную толерантность опухоли и стимулируя противоопухолевый иммунитет, включают антитела против ТФР-бета или фрагменты антител, антитела или

фрагменты антител против рецептора TGF-бета и растворимые полипептиды-антагонисты TGF-бета.

В настоящем документе предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, которые накапливаются в микроокружении опухоли, в опухолях и, в частности, в резидентных опухолевых иммунных клетках, которые содержат плазмиды, кодирующие антагонисты полипептида TGF-бета, включая, например, рецепторы-приманки, связывающие TGF-бета (TGF -β-рецептора-приманки), антитела против TGF-бета или фрагменты антител, антитела против рецептора TGF-бета или фрагменты антител и растворимые полипептиды-антагонисты TGF-бета. Фрагменты антител могут включать любые известные в данной области техники или описанные в настоящем документе, такие как, но не ограничиваясь ими, scFv и scFv-Fc.

b. БиспецифическиеscFvsиT-клеточныеконструкции

Использование scFv улучшилось за счет увеличения валентности связывания с мишенью, часто за счет использования одного или нескольких фрагментов scFv (биспецифических, триспецифических и т. д.), соединенных между собой длинным линкером. Биспецифические привлекающие Т-клетки конструкции (продаются под торговой маркой BiTE®) представляют собой класс искусственных биспецифическихмоноклональных антител, которые используются в иммунотерапии рака и образуются путем связывания двух одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), так что один scFv связывает CD3 на поверхности цитотоксических Т-клеток, а другой связывает специфический опухолеассоциированный антиген. Таким образом, BiTE® нацеливают Т-клетки на опухолевые клетки, стимулируя активацию Т-клеток, продукцию цитокинов и цитотоксичность опухолевых клеток, независимо от MHC класса I или костимулирующих молекул. Два примера BiTE® были одобрены FDA, включая катумаксомаб, который направлен против опухолевого антигена EpCAM и CD3 и используется при лечении злокачественного асцита, и блинатумомаб, антитело BiTE® против CD19 и CD3, которое используется для

лечения рецидивирующего, рефрактерного острого лимфобластного лейкоза (ALL) (см, напр., Ahamadi-Fesharaki*etal.* (2019) *Mol. Ther. Oncolytics* 14:38-56).

Другие BiTE® нацелены на другие антигены, включая карциноэмбриональный антиген (CEA), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), EGFR, EphA2, Her2, ADAM17/TACE, антиген стволовых клеток простаты (PSCA) и ассоциированный с меланомой хондроитинсульфатпротеогликан (MCSP). Как показано в данном документе, антитело BiTE® также может быть экспрессировано из плазмиды после доставки иммуностимулирующей бактерией.

c. Антитела против PD-1/PD-L1

Белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1) представляет собой иммуноингибирующий рецептор, участвующий в негативной регуляции иммунных реакций. Его родственный лиганд, лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1), экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (APC) и при связывании с PD-1 на Т-клетках приводит к потере эффекторной функции $CD8^+$ Т-клеток , вызывая толерантность к Т-клеткам. Экспрессия PD-L1 часто связана с агрессивностью опухоли и снижением выживаемости при некоторых видах рака человека (см., например, Gaoetal. (2009) Clin. CancerRes.15(3):971-979).

Антитела, предназначенные для блокирования иммунных контрольных точек, такие как антитела к PD-1 (например, пембролизумаб и ниволумаб) и антитела к PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб), могут предотвращать анергию Т-клеток и разрушать иммунную толерантность. Однако только у части пролеченных пациентов наблюдается клиническая польза, а у тех, у кого она есть, часто проявляются аутоиммунные проявления токсичности (см., например, Ribas (2015) N. Engl. J. Med. 373(16):1490-1492). и Topalianetal. (2012) N. Engl. J. Med.366(26):2443-2454). Помимо приобретения токсичности, терапия анти-PD-1/анти-PD-L1 часто приводит к резистентности, а одновременное применение антител к CTLA-4 (например, ипилимумаба) показало ограниченный успех в клинических испытаниях со значительной

дополнительной токсичностью. Для ограничения токсичности и повышения эффективности блокады PD-1/PD-L1 иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую антитело или фрагмент антитела, такие как scFvилиscFv-Fc, и другие, известные из уровня техники или описанные здесь, противPD-1 или противPD-L1, будут проявлять синергизм с активацией иммунных клеток, усиливая противоопухолевый иммунитет.

d. Антитела против CTLA-4

CTLA-4 (цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами), также известный как CD152 (кластер дифференцировки 152), представляет собой еще один иммуноингибирующий рецептор, который функционирует как иммунная контрольная точка и подавляет иммунные реакции. CTLA-4 конститутивно экспрессируется в регуляторных Т-клетках (Treg или Tregs) и способствует их ингибирующей функции, но активируется в обычных Т-клетках только после активации. CTLA-4 функционирует как иммунная контрольная точка, передавая ингибирующие сигналы Т-клеткам. CTLA-4 гомологичен Т-клеточному костимулирующему белку CD28, и обе молекулы связываются с лигандамиCD80 (также известными как B7-1 или B7.1) и CD86 (также известными как B7-2 или B7.2). на антигенпрезентирующих клетках (АПК). Связывание CTLA-4 с лигандами передает ингибирующий сигнал Т-клеткам, тогда как связывание CD28 передает стимулирующий сигнал.

После активации Т-клеток индуцируются рецепторы CTLA-4, которые затем превосходят рецепторы CD28 на Т-клетках за связывание с лигандамиCD80 и CD86 на поверхности APC. CTLA-4 связывается с CD80 и CD86 с большей аффинностью и авидностью, чем CD28, что позволяет ему конкурировать с CD28 за его лиганды, что приводит к передаче ингибирующих сигналов Т-клеткам и иммунному ингибирующему ответу. Активация Т-клеток через Т-клеточный рецептор и CD28 приводит к увеличению экспрессии CTLA-4.

Оптимальное праймирование Т-клеток требует костимулирующих сигналов, возникающих в результате лигирования Т-клеточного CD28 с CD80 и/или CD86. Блокада связывания CTLA-4 с этими лигандами, таким образом, усиливает праймирование Т-клеток и позволяет индуцировать противоопухолевый иммунный ответ.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующие бактериальные штаммы, представленные в настоящем документе, содержат плазмиды, кодирующие антитела против CTLA-4, включая их фрагменты, такие как, но не ограничиваясь ими, scFv против CTLA-4 (см., например, SEQIDNO:403 для иллюстративного фрагмента scFv человека против CTLA-4) и scFv-Fc анти-CTLA-4 (см., например, SEQIDNO: 402, иллюстративный фрагмент scFv-Fc человека анти-CTLA-4; см. также пример 20).

e. Дополнительные примеры контрольных точек

Примеры мишеней иммунных контрольных точек, для которых может быть получен scFv или любой другой фрагмент рекомбинантного антитела против них, или приведены в качестве примеров в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, мишени, перечисленные в таблице ниже:

Мишень контрольной точки
CTLA-4
PD-L1 (B7-H1)
PD-L2
PD-1, PD-2
IDO1
IDO2
SIRP альфа (CD47)

Мишень контрольной точки
VISTA (B7-H5)
LIGHT
HVEM
CD28
LAG3, TIM3, TIGIT
Galectin-9
CEACAM1, CD155, CD112, CD226, CD244 (2B4)
B7-H2, B7-H3, CD137, ICOS, GITR, B7-H4, B7-H6
CD137, CD27, CD40, CD40L, CD48, CD70, CD80, CD86, CD137 (4-1BB), 4-1BBL, CD200, CD272 (BTLA), CD160
A2a рецептор, A2b рецептор, HHLA2, ILT-2, ILT-4, gp49B, PIR-B
OX40, OX-40L, HLA-G, ILT-2/4
KIR, TIM1, TIM4
CLEVER-1/Стабилин-1

5. Комбинации иммуномодуляторных белков могут иметь синергические эффекты и/или комплиментарные эффекты

Цитокины являются мощными модуляторами противоопухолевого иммунного ответа.

Известно, что комбинации цитокинов обладают сильным синергетическим действием на различные иммунные компартменты, включая Т-клетки, NK-клетки и миелоидные клетки (включая дендритные клетки и макрофаги). Известно, что цитокины играют главную роль в праймировании антигена дендритными клетками, выживании и пролиферации клеток врожденного иммунитета и антигенспецифических Т-клеток, а также в цитотоксической активности NK и Т-клеток. Комбинации цитокинов должны быть правильно подобраны для максимизации биологических реакций и усиления противоопухолевого иммунитета. Например, в мышиной модели гепатита было обнаружено, что только IFN-α усиливает CD8 $^{+}$Т-клеточную цитолитическую функцию инфицированных вирусом клеток, в то время как IL-15 сам по себе усиливал пролиферацию активированных лимфоцитов. Вместе они максимально подавляли инфекцию гепатита В (HBV) (см., например, DiScalaetal. (2016) J. Virol.90(19):8563-8574). В другом примере комбинации цитокинов IL-15 + IL-18 и IL-15 + IL-21 были способны усиливать продукцию IFN-γNK- и Т-клетками человека (см., например, Strengelletal. (2003) J. Immunol.170(11):5464-5469).

В другом примере IL-2 + IL-18 совместно усиливали продукцию IFN-γ и повышали цитолитическую функцию CD4 $^{+}$ Т-клеток, CD8 $^{+}$Т-клеток и NK-лимфоцитов (см., например, Sonetal. (2001) CancerRes. 61(3):884-888). Кроме того, было обнаружено, что IL-12 и IL-18 проявляют синергизм, способствуя независимой от лигирования антиген-CD3 Т-клеток продукции IFN-γ из Т-клеток человека (см., например, Tominagaetal. (2000) Int. Immunol. 12(2):151-160). Комбинации цитокинов являются мощными усилителями функции Т-клеток, но одобренные FDA противораковые цитокины слишком токсичны для системного дозирования и поэтому используются редко, а комбинации системно вводимых цитокинов только усугубляют токсичность (см., например, Conlonetal. (2019) J. InterferonCytokineRes.39(1):6-21).

Предлагаемые здесь иммуностимулирующие бактерии решают эти проблемы.

Предложены иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиды, кодирующие несколько терапевтических продуктов, таких как иммуномодулирующие белки, которые обеспечивают опухолеспецифическую доставку комбинаций цитокинов и/или комбинаций с другими терапевтическими продуктами, такими как индукторы интерферона типа I, обсуждаемые в настоящем документе, и другие, включая костимулирующиемолекулы, хемокины и антитела и их фрагменты. Эти иммуностимулирующие бактерии обеспечивают мощную и синергическую иммуноактивацию без системной токсичности и фармакокинетических (PK) обязательств, связанных с прямым внутривенным введением цитокинов и других терапевтических продуктов.

Комбинации терапевтических продуктов, которые могут быть закодированы на плазмидах иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, например, два или более цитокинов; один или несколько цитокинов и индуктор IFN типа I(например, STING, IRF3, IRF7, MDA5, RIG-I и их конститутивно активные варианты GOF), и/или костимулирующую молекулу (например, 4-1BBL, 4-1BBLΔcyt и другие варианты 4-1BBL, обсуждаемые в настоящем документе); рецептор-приманку TGF-β и один или несколько цитокинов; рецептор-приманку TGF-β и индуктор IFNI типа; рецептор-приманку TGF-β, один или несколько цитокинов и/или индуктор IFN типа I, и/или костимулирующую молекулу; антитело (например, против иммунного контрольного пункта, такого как CTLA-4) и один или несколько цитокинов; антитело и индуктор IFNI типа; антитело, один или несколько цитокинов и/или индуктор IFNI типа, и/или костимулирующую молекулу; агонист костимулирующей молекулы (например, агонист CD40) и один или несколько цитокинов; агонист костимулирующей молекулы и индуктор IFNI типа; и агонист костимулирующей молекулы, один или несколько цитокинов, и/или индуктор IFN типа I, и/или костимулирующую молекулу.

Как обсуждается ниже, множественные экспрессионные кассеты терапевтического продукта могут включать конструкции с одним промотором и/или конструкции с двойным/множеством промоторов, а также посттранскрипционные регуляторные элементы и другие регуляторные элементы, такие как энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы, сигнальные пептиды, и т.д. Последовательности нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы по кодонам для повышения экспрессии белка и, как правило, находятся под контролем эукариотического промотора. Конкретные конструкции и их детали описаны здесь в другом месте.

Среди иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, есть те, которые содержат плазмиды, кодирующие иммуностимулирующие белки (например, цитокины, хемокины, костимулирующие молекулы), и/или продукты генов с мутациями с усилением функции, которые усиливают иммунные ответы в микроокружении опухоли (например, цитозольные сенсоры ДНК/РНК, которые индуцируют IFN типа I), и/или антитела и их фрагменты, и/или другие терапевтические продукты, которые усиливают противоопухолевый ответ, такие как рецепторы-приманки TGF-β и/или IL-6, и/или или антагонистические полипептиды TGF-β.

Эти иммуностимулирующие бактерии, которые кодируют цитокины, продукты приобретения функции/белки пути IFN типа I, и/или хемокины, и/или костимулирующие молекулы, и/или антитела и их фрагменты, такие как одноцепочечные антитела, и другие терапевтические продукты, обсуждаемые здесь, включают иммуностимулирующие бактерии, которые предпочтительно инфильтрируют микроокружение опухоли, опухоли и резидентные иммунные клетки опухоли. К иммуностимулирующим бактериям также относятся бактерии, геном которых модифицирован таким образом, что они вызывают меньшую гибель клеток в резидентных в опухоли иммунных клетках, в результате чего иммуностимулирующие бактерии накапливаются в резидентных в опухоли миелоидных клетках для достижения высокого уровня эктопической экспрессии мультиплексных генетических полезных нагрузок в опухолевых клетках. клетки-мишени и доставляют терапевтические

продукты/иммуномодулирующие белки в микроокружение опухоли (TME) для стимуляции иммунного ответа против опухоли.

Эти иммуностимулирующие бактерии кодируют цитокины, продукты. В частности, представленные в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии включают примерно до 8 или 8 модификаций, как описано в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь ими, ауксотрофию по аденозину, csgD-, pagP-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-), purI -, ansB-, *asd*-,и другиемодификации, известные или описанные здесь, для улучшения нацеливания или накопления в микроокружении опухоли, и/или резидентных в опухоли миелоидных клетках, или для улучшения безопасности и переносимости (позволения более высокой дозы), снижения иммуносуппрессивногоцитокинового профиля, улучшения качества и функции Т-клеток, ограничения репликации здоровых тканей, исключения биопленок, улучшения противоопухолевого иммунного ответа, или придания других требуемых свойств.

Иммуностимлирующие бактерии могут кодировать другие терапевтические продукты такие как опухолевые антигеныКроме того, иммуностимулирующие бактерии могут кодировать другие терапевтические продукты, такие как опухолевый антигены из опухоли субъекта, для усиления ответа против конкретной опухоли. Любые из иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе и описанных выше и ниже, могут быть модифицированы для кодирования терапевтических продуктов, таких как цитокины, хемокины, костимулирующие молекулы и продукт(ы) пути IFN типа I с приобретением функции. Терапевтические продукты кодируются на плазмиде под контролем промотора, распознаваемого хозяином, и любых других желательных регуляторных последовательностей, распознаваемых у эукариотического субъекта, такого как человек, или другое животное, или млекопитающее. Как правило, нуклеиновая кислота, кодирующая продукт, находится под контролем промотора РНК-полимеразы II. Крометого, любаяизбактерий, описанныхвнастоящемдокументедлямодификации, например, любойизштаммов*Salmonella, Shigella, E. coli,Bifidobacteriae, Rickettsia, Vibrio,*

Listeria, *Klebsiella*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Aeromonas*,*Francisella*, *Cholera*, *Corynebacterium*, *Citrobacter*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Legionella*,*Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bacillus*, and *Erysipelothrix*, илиихаттенуированныйштамм, илиихмодифицированныйштамм, можномодифицироватьпутемвведенияплазмиды, содержащейиликодирующейнаплазмидевбактерияхнуклеиновуюкислоту, кодирующуютерапевтическийпродукт(ы).) подконтролемпромотораРНК-полимеразы, распознаваемогохозяином. Терапевтические продукты экспрессируются в клетках инфицированного субъекта. Иммуностимулирующие бактерии включают те, которые модифицированы, как описано в настоящем документе, для накопления или преимущественного инфицирования опухолей, TME и/или резидентных в опухоли миелоидных клеток. Например, иммуностимулирующие бактерии, которые кодируют продукты с приобретеним функции, приводящие к экспрессии или конститутивной экспрессии интерферона типа I (IFN), такого как IFN-бета, и/или другие терапевтические продукты, как обсуждается в настоящем документе, также являются модифицированными таким образом, чтобы они обладали сниженной способностью или не обладали способностью инфицировать эпителиальные клетки, но были способны инфицировать фагоцитирующие клетки, включая резидентные в опухоли иммунные клетки, и/или иммуностимулирующие бактерии модифицировали таким образом, чтобы они не убивали инфицированные фагоцитирующие клетки.

Как описано в настоящем документе, гены, участвующие в пути SPI-1, и флагеллы активируют инфламмасомы в фагоцитирующих клетках (иммунных клетках), запуская пироптоз. Выключение генов SPI-1 и генов, кодирующих флагеллы, уменьшает или устраняет пироптозфагоцитирующих клеток, а также устраняет инфицирование эпителиальных клеток, что приводит к усилению инфицирования фагоцитирующих клеток. Предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, которые накапливаются в фагоцитирующих

клетках, особенно резидентных в опухоли иммунных клетках, таких как, например, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), опухолеассоциированные макрофаги (TAM) и дендритные клетки (DC), в которых они экспрессируют генетическое

5 полезные нагрузки/терапевтические продукты, закодированные на плазмидах, которые контролируются эукариотическими промоторами, такими как промоторы, распознаваемые РНК-полимеразой II, и включают другие эукариотические регуляторные сигналы, как обсуждается в настоящем документе.

10 Экспрессированные терапевтические продукты включают те, которые вызывают иммунные ответы, например, посредством путей, которые увеличивают или индуцируют интерфероны типа I, которые усиливают ответ хозяина в микроокружении опухоли. Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать иммуностимулирующие белки, такие как IL-2 и/или другие

15 цитокины, и/или другие иммуностимулирующие белки и терапевтические продукты, как обсуждается в настоящем документе, дополнительно усиливая иммунный ответ в микроокружении опухоли.

Иммуностимулирующие бактерии могут кодировать продукты, называемые цитозольными сенсорами ДНК/РНК, которые вызывают иммунный ответ при

20 воздействии нуклеиновых кислот, таких как РНК, ДНК, нуклеотиды, динуклеотиды, циклические нуклеотиды, циклические динуклеотиды и другие подобные молекулы в цитозоле. клеток. Иммуностимулирующие бактерии здесь кодируют модифицированные терапевтические продукты, которые конститутивно вызывают иммунные ответы и не требуют присутствия

25 ДНК/РНК в цитозоле. Примерами таких являются компоненты путей, которые индуцируют экспрессию интерферона типа I.

30 Эти иммуностимулирующие бактерии кодируют цитокины, продукты. В частности, представленные в настоящем документе иммуностимулирующие

бактерии включают примерно до 8 или 8 модификаций, как описано в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь ими, ауксотрофию по аденозину, csgD-, pagP-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-), purI -.

Рассматриваемые здесь терапевтические продукты включают модифицированные формы этих цитозольных ДНК/РНК-сенсоров, которые обладают конститутивной активностью или повышенной активностью (т.е. продукты с приобретением функции), так что интерферон(ы) типа I экспрессируется или продуцируется в отсутствие нуклеотидов,динуклеотидов, циклических нуклеотидов, динуклеотидов, и других таких лигандов, в клеточном цитозоле.

Экспрессия этих модифицированных продуктов в клетках, особенно в опухолевых клетках, включая резидентные иммунные клетки опухоли, приводит к конститутивной экспрессии интерферонов типа I, включая интерферон-β, в микроокружении опухоли. Поскольку иммуностимулирующие бактерии, которые экспрессируют эти продукты, приобретающие функцию, накапливаются или преимущественно инфицируют опухолевые клетки/TME/опухолевые резидентные иммунные клетки, терапевтические продукты экспрессируются в микроокружении опухоли, что приводит к усилению иммунных ответов в опухолевом микроокружении.

Типичные генные продукты, которые могут быть закодированы в иммуностимулирующих бактериях и других носителях, включают, но не ограничиваются ими, белки, которые воспринимают или участвуют во врожденных путях, которые распознают цитозольную ДНК/РНК и активируют продукцию интерферона типа I. Белки, участвующие в распознавании врожденной ДНК/РНК, которые активируют интерферон типа I, включают, помимо прочего: STING, RIG-I, MDA5, IRF3, IRF7, TRIM56, RIP1/RIPK1, Sec5/EXOC2, TRAF2, TRAF3, TRAF6, STAT1, LGP2/DHX58, DDX3/DDX3X, DHX9/DDX9, DDX1, DDX21, DHX15/DDX15, DHX33/DDX33, DHX36/DDX36, DDX60, иSNRNP200.

Мутации с приобретением функции в любом из этих белков, которые приводят к конститутивной экспрессии интерферона типа I, известны или могут быть идентифицированы, и мутанты могут быть доставлены иммуностимулирующими бактериями в микроокружение опухоли, например, путем инфицирования фагоцитирующих клеток,

Мутации с приобретением функции включают мутации, идентифицированные у людей с нарушениями, возникающими в результате конститутивной экспрессии интерферона I типа. Примерами продуктов с усилением функции являются те, которые возникают у субъектов с интерферонопатиями. Как отмечалось выше, мутации могут быть идентифицированы с помощью скрининга, а также для получения продуктов с приобретением функции.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтические продукты, могут быть дополнительно модифицированы для улучшения свойств экспрессии. Модификации включают, например, оптимизацию кодонов для повышения эффективности транскрипции у млекопитающего, особенно человека, например, снижение содержания GC или содержания динуклеотидовCpG, удаление скрытых сайтов сплайсинга, добавление или удаление (обычно удаление) островков CpG для улучшения экспрессии. в эукариотических клетках и замену TATA-бокса и/или терминальных сигналов для повышения эффективности транскрипции. Кодоны могут быть оптимизированы для повышения эффективности трансляции путем изменения предвзятости использования кодонов, уменьшения содержания GC, уменьшения вторичной структуры мРНК, удаления преждевременных сайтов PolyA, удаления звеньев нестабильности РНК (ARE), снижения стабильной свободной энергии мРНК, модификации внутренних chi-сайтов и мест связывания рибосом, и восстановление вторичных структур РНК.

В иммуностимулирующие бактерии были включены дополнительные модификации для улучшения экспрессии, а также для поддержания или улучшения приспособленности бактерий. Они описаны в разделах ниже, а также подробно и проиллюстрированы примерами в рабочих примерах ниже.

Как описано выше, пути индукции интерферона типа I, опосредованные узнаванием хозяином цитозольных нуклеиновых кислот, таких как одноцепочечные и двухцепочечные РНК, циклические динуклеотиды (CDN) и другие подобные формы нуклеиновых кислот, индуцируют IFN типа I.

Существуют также IFN типа I, независимые от путей Toll-LikeReceptor (TLR), опосредованные узнаванием хозяином одноцепочечной (ss) и двухцепочечной (ds) РНК в цитозоле. Они обнаруживаются РНК-хеликазами, включая ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), ген 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5), и фосфорилирование, опосредованное адаптерным белком, опосредованным стимулятором промотора 1 IFN-β (IPS-1). Как обсуждается в настоящем документе, белки в этих путях могут быть модифицированы или могут существовать в виде вариантов, что приводит к конститутивной экспрессии интерферонов типа I (также называемых интерферонами типа 1, которые включают IFN-α и IFN-β.

Примерами таких белков являются представленные здесь модифицированные полипептиды STING.

Терапия иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе, может быть объединена с любой другой противораковой терапией, включая терапию ингибиторами контрольных точек и, как обсуждалось выше и в других местах в настоящем документе, с другими видами лечения рака и химиотерапией.

6. Иммуностимулирующие бактерии, обеспечивающие комбинированную терапию.

Иммуностимулирующие бактерии по настоящему изобретению могут быть использованы для получения более чем одного терапевтического продукта, особенно тех, которые предназначены для противораковой терапии. В целом, продукты являются дополнительными продуктами для усиления и перепрограммирования противоопухолевого иммунного

ответа. Иммуностимулирующие бактерии благодаря геномным модификациям, описанным в настоящем документе, в частности, комбинации нескольких или всех asd-, флагеллинов- (fliC-/fljB-), pagP-, csgD-, purI-, ауксотрофии по аденозину, msbB-, ansB - и любые другие модификации, описанные где-либо в данном документе или известные специалистам в данной области, накапливаются в микроокружении опухоли (TME) и инфицируют резидентные в опухоли иммунные клетки (миелоидные клетки). Иммуностимулирующие бактерии содержат плазмиды, кодирующие комплементарные терапевтические продукты,под контролем промотера или промотеров, распознавамых хозяином, или другими регуляторными последовательностями, распознаваемыми в эукариотах, таких как человек, или другие животные, или или млекопитающее, для осуществления экспрессии кодируемых продуктов, а также секреции продуктов. Иммуностимулирующие бактерии накапливаются в TME, особенно в резидентных опухолевых иммунных клетках, включая супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), опухолеассоциированные макрофаги (TAM) и дендритные клетки (DC), где кодируемые терапевтические продукты экспрессируются, а затем секретируется в микроокружение опухоли для достижения противоопухолевого эффекта. Путем соответствующей комбинации продуктов противоопухолевый эффект может быть усилен за счет взаимодействия различных продуктов с иммунной системой хозяина.

Как обсуждается в другом месте в данном документе, иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиды, кодирующие терапевтические продукты, с одним промотором и открытой рамкой считывания (ORF), могут экспрессировать два (или более) белка за счет использования вирусных внутренних рибосомных сайтов проникновения (IRES), которые кэп-независимые или посредством трансляционного прочтения пептидов 2A (например, T2A, P2A, E2A или F2A) и последующего саморасщепления на одинаково экспрессируемые ко-белки. Альтернативно, генетические полезные нагрузки/терапевтические продукты могут быть экспрессированы с использованием конструкций с двумя или несколькими промоторами, где каждый белок экспрессируется под контролем отдельного

промотора. Комбинация конструкций с одним и двумя/множественными промоторами для экспрессии трех или более белков также может быть включена в плазмиды. В целом, нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтические продукты, находятся под контролем промоторов РНК-полимеразы II.

Например, промоторы включают, но не ограничиваются ими, промоторы EF-1α, CMV, SV40, UBC, CBA, PGK, GUSB, GAPDH, EIF41A, CAG, CD68 и синтетические промоторы MND. Плазмиды могут содержать другие регуляторные элементы, такие как посттранскрипционные регуляторные элементы (PRE; например, WPRE, HPRE), сигнальные последовательности полиаденилирования, терминаторы, энхансеры, сигналы секреции (также известные как сигнальные пептиды/последовательности, лидерные пептиды/последовательности), Последовательности ДНК, нацеленные на ядро (DTS), и другие регуляторные элементы, описанные в других разделах настоящего документа или известные специалистам в данной области, которые могут усиливать или повышать экспрессию и/или секрецию кодируемых терапевтических продуктов.

Генетическая полезная нагрузка или терапевтические продукты, закодированные на плазмидах, включают иммуностимулирующие белки, такие как цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы; цитозольные сенсоры ДНК/РНК, которые индуцируют интерферон I типа и с приобретением функции/конститутивно активные мутанты/варианты; антитела и их фрагменты; биспецифические агенты привлечения Т-клеток (BiTEs®); растворимые рецепторы TGF-β, которые действуют как приманки для связывания TGF-β или антагонистических полипептидов TGF-β; рецепторы-приманки, связывающие IL-6; интерферирующие РНК (например, miРНК, shРНК, microРНК); и другие терапевтические продукты, как описано ниже и в других местах в данном документе, и как известно в данной области техники; и дополнительные комбинации всех предшествующих терапевтических

продуктов. В некоторых вариантах осуществления цитокины могут быть закодированы на плазмиде иммуностимулирующих бактерий со звеном прикрепления к мембране, таким как трансмембранный домен, и доменом, связывающим коллаген.

Иммуностимулирующие белки включают цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, которые могут быть закодированы на плазмидах, включают, но не ограничиваются ими, IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35) , IL-15, цепной комплекс IL-15/IL-15Rα, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36 гамма, интерферон-α, интерферон-β, IL-2 с ослабленным связыванием с IL- 2Ra, IL-2, который модифицирован таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5, белками, которые участвуют или влияют или усиливают рекрутирование и/или персистенцию Т- клетки, CD40, CD40-лиганд (CD40L), OX40, OX40-лиганд (OX40L), 4-1BB, 4-1BBлиганд (4-1BBL), 4-1BBL с делецией в цитоплазматическом домене (4-1BBLΔcyt), ICOS, CD27, члены семейства B7-CD28 и члены надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

Иммуностимулирующие белки также включают укороченные костимулирующие молекулы, такие как, например, 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 и OX40L, с полноразмерным цитоплазматическим доменом, или с укороченным, или частичным, или частичным с модификацией для обеспечения правильной ориентации, делеции цитоплазматического домена, для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC), где продукт укороченного гена способен к конститутивной иммуностимулирующей передаче сигналов Т-клетке посредством участия костимулирующего рецептора и неспособен противостоять регуляторному сигнал к APC за счет удаленного цитоплазматического домена.для экспрессии на антиген-презентирующей клетке (APC), где продукт укороченного гена способен к конститутивной иммуностимулирующей передаче сигнала к Т-клетке посредством вовлечения костимулирующего рецептора и неспособен к контрреґуляторному сигналу к

APC из-за делеции цитоплазматический домена для экспрессии на антиген-презентирующей клетке (APC)

Сенсоры цитозольной ДНК/РНК, которые индуцируют или активируют продукцию IFN типа I, включают, но не ограничиваются ими, STING, RIG-I, MDA5, IRF3, IRF5 и IRF7, а также приобретение функции (GOF) или конститутивно активные их варианты. Другие белки, участвующие в распознавании ДНК/РНК, которые активируют ответы IFN типа I, которые могут быть мутированы для создания конститутивной экспрессии IFN типа I и могут кодироваться на плазмидах, включают, но не ограничиваются ими, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF2, TRAF3, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 и SNRNP200.

Другие терапевтические продукты, которые могут быть закодированы на плазмидах, доставляемые иммуностимулирующими бактериями по настоящему изобретению, или которые можно вводить совместно с бактериями, которые усиливают или усиливают противоопухолевый ответ, включают, но не ограничиваются ими, антитела и их фрагменты , например, антитела, ингибирующие TGF-β; антитела против IL-6; антитела против ингибиторов контрольных точек, таких как PD-1, PD-L1 и CTLA-4; и антитела против или ингибиторы VEGF, CD73, CD38, Siglec-15, EGFR, Her2, мезотелина и BCMA. Также предполагается экспрессия на плазмиде или совместное введение с иммуностимулирующими бактериями биспецифических агентов вовлечения Т-клеток (BiTEs®), рецепторов-ловушек, связывающих IL-6, рецепторов-ловушек, связывающих TGF-бета, и полипептидных антагонистов TGF-бета.

Любые из этих антител, ингибиторов, или рецепторов-приманок (ловушек) можно вводить совместно с иммуностимулирующими бактериями. В некоторых вариантах осуществления ингибиторы PARP (поли(АДФ)-рибозополимеразы), ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC) и/или химиотерапия также могут вводиться или применяться совместно с любым из терапевтических продуктов, перечисленных выше, отдельно или в любой комбинации.

Примеры комплементарных комбинаций терапевтических продуктов, которые могут быть закодированы на плазмидах в иммуностимулирующих бактериях, включают, но не ограничиваются ими:

IL-2 иIL-12p70; IL-2 иIL-21; IL-2, IL-12p70, и вариант STINGGOF; IL-2, IL-21, и вариантSTINGGOF; IL-2, IL-12p70, вариантSTINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); иIL-2, IL-21, вариантSTINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Rαи вариант STINGGOF; IL-15/IL-15Rα, вариантSTINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); IL-15/IL-15RαиIL-12p70; IL-15/IL-15RαиIL-21; IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, и вариантSTINGGOF; IL-15/IL-15Rα, IL-21, и вариант STINGGOF; IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); иIL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 иIL-21; IL-12p70, IL-21, и вариантSTINGGOF; IL-12p70, IL-21, вариантSTINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); IL-12p70 и вариант STINGGOF; IL-12p70, вариантSTINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); IL-12p70 иIL-18; IL-12p70, IL-18, и вариант STINGGOF; иIL-12p70, IL-18, вариантSTINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

TGF-βрецептор-ловушка, IL-2, иIL-12p70; TGF-βрецептор-ловушка , IL-2, иIL-21; TGF-βрецептор-ловушка, IL-2, IL-12p70, и вариантSTINGGOF ; TGF-βрецептор-ловушка, IL-2, IL-21,и вариантSTINGGOF; аTGF-βрецептор-ловушка, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и TGF-βрецептор-ловушка, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF; рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70; рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα и IL-21; рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF; рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF; рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70,

вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70 и IL-21; рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF; рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); рецептор-ловушкаTGF-β и IL-12p70; рецептор-ловушкаTGF-β, IL-12p70 и вариант STINGGOF; рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); рецептор-ловушкаTGF-β, IL-12p70 и IL-18; рецептор-ловушкаTGF-β, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF; рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и рецептор-ловушка TGF-β и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-12p70; антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-21; антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF; антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF; антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF; антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70; антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-21; антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF; антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF; антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-21; антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF; антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); антитело против CTLA-4 и IL-12p70; антитело против CTLA-4, IL-12p70 и вариант STINGGOF; антитело

против CTLA-4, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-18; антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF; антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и антитело против CTLA-4 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2 и IL-12p70; агонист CD40, IL-2 и IL-21; агонист CD40, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF; агонист CD40, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF; агонист CD40, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL(включая 4-1BBLΔcyt); и агонист CD40, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF; агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70; агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-21; агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF; агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF; агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и

агонист CD40, IL-12p70 и IL-21; агонист CD40, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF; агонист CD40, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); агонист CD40 и IL-12p70; агонист CD40, IL-12p70 и вариант STINGGOF; агонист CD40, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); агонист CD40, IL-12p70 и IL-18; агонист CD40, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF; агонист CD40, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и агонист CD40 и вариант STINGGOF.

Во всех комбинациях, включая 4-1BBL, молекула 4-1BBL может быть полноразмерным белком (см., например, SEQIDNO: 389 и 393 для человеческого и мышиного 4-1BBL соответственно); вариант 4-1BBL с делетированным цитоплазматическим доменом (4-1BBLΔcyt; см., например, SEQIDNO: 390 и 394 для человеческого и мышиного 4-1BBLΔcyt

соответственно); вариант 4-1BBL с укороченным (т.е. не полностью делетированным) цитоплазматическим доменом (4-1BBLcyttrunc; см., например, SEQIDNO:391-392 и SEQIDNO:395-396, например, человеческие и мышиные 4-укороченные варианты 1BBLcyt); или молекула 4-1BBL с модифицированным цитоплазматическим доменом, в котором один или несколько остатков Ser, которые действуют как сайты фосфорилирования, заменены в соответствующем локусе или локусах, например, для 4-1BBL человека, со ссылкой на SEQIDNO :389, Ser5 и Ser8, с остатком, который уменьшает или устраняет обратную передачу сигналов. Кроме того, все комбинации, включающие антитело против CTLA-4, могут включать фрагмент антитела против CTLA-4, такой как scFv против CTLA-4 (см., например, SEQIDNO: 403 и 404, например, человеческие и мышиные антигены). -CTLA-4 scFv-фрагменты соответственно) или анти-CTLA-4 scFv-Fc (см., например, SEQIDNO: 402 и 405, иллюстративные человеческие и мышиные анти-CTLA-4 scFv-Fc-фрагменты, соответственно) . Кроме того, рецептор-ловушка TGF-β может быть заменен другими антагонистами полипептида TGF-бета, которые могут связывать и удалять TGF-β из микроокружения опухоли, включая, например, анти-TGF-бета-антитела или фрагменты антител, анти-TGF-бета-антитела, антитела к бета-рецепторам или фрагменты антител и растворимые полипептиды-антагонисты TGF-бета для иллюстративных фрагментов scFv человека и мыши против CTLA-4 соответственно) или scFv-Fc анти-CTLA-4 (см., например, SEQIDNO: 402 и 405, для иллюстративных scFv анти-CTLA-4 человека и мыши) -Fc-фрагменты соответственно). Кроме того, рецептор-ловушка TGF-β может быть заменен другими антагонистами полипептида TGF-бета, которые могут связывать и удалять TGF-β из микроокружения опухоли, включая, например, анти-TGF-бета-антитела или фрагменты антител, анти-TGF-бета-антитела, антитела к бета-рецепторам или фрагменты антител и растворимые полипептиды-антагонисты TGF-бета для иллюстративных фрагментов scFv человека и мыши против CTLA-4 соответственно) или scFv-Fc анти-CTLA-4 (см., например, SEQIDNO: 402 и 405, для иллюстративных scFv анти-CTLA-4 человека и мыши) -Fc-фрагменты соответственно).

Кроме того, рецептор-ловушка TGF-β может быть заменен другими антагонистами полипептида TGF-бета, которые могут связывать и удалять TGF-β из микроокружения опухоли, включая, например, анти-TGF-бета-антитела или фрагменты антител, анти-TGF-бета-антитела, антитела к бета-рецепторам или фрагменты антител и растворимые полипептиды-антагонисты TGF-бета.

В следующей таблице перечислены типичные продукты, которые могут быть закодированы в плазмидах иммуностимулирующих бактерий, и некоторые эффекты/характеристики таких продуктов.

Кодированный продукт	**Эффект/Характеристика**
СоздаваемыйSTING–для увеличения экспресииIFN типа 1	Градиенты хемокина мобилизуют Т-клетки. ИндукцияIFN типа 1, активация Т-клеток, кросс-презентация опухолевого антигена APC. Конститутивные варианты STINGподтверждаются у пациентовSAVIc интерферонопатией типа 1.
IL-12	Сильный драйвер иммунного ответа Th1. Производится активированными APC, в особенности макрофагами M1 и DC* Данные показывают, что он сильный драйвер IFN-γ
IL-15	СтимулируетТ-клеткии пролиферацию NKклеток. Отсутствие стимуляции T_{reg}наблюдается с IL-2.
IL-21	Плеиотропный цитокин, стимулирующий Т-клеткиandNKклетки. ПревращаетM2 макрофагивM1 макрофаги. Получается при активации TLR3(виральноеопределение РНК).
IL-36γ	Промотирует производство Th1 APCиIFN-γТ-

Кодированный продукт	**Эффект/Характеристика**
	клетками, NKклеткамиandγδT-клетками.
Модифицированный 4-1BBL	ПроизводиткостимуляциюT-клеток, улучшает цитотоксичность и фетотип памяти T-клеток; модифицируется с делецией или укорочением цитоплазматического домена, и добавлением дополнительных позитивных остатков к N-концевомуукороченному цитоплазматическому домену.
Анти-CTLA-4 scFV-Fc	ПовышаетпраймингT-клеток и активацию против более слабых опухолевых антигенов.
TGF-βрецептор ловушки	Связывает и удаляет TGF-бета, облегчает иммуносуппрессиюT-клетокиTh1 APC.

*DC = Дендритные клетки

В любой из комплементарных комбинаций, указанных выше, рецептор-ловушка TGF-β может быть заменен полипептидом, антагонистом TGF-β. Как обсуждалось выше, рецепторы-ловушки TGF-β представляют собой любые рецепторы-ловушки для связывания TGF-β с целью его удаления, или представляют собой полипептиды, противодействующие TGF-β (например, антитела против TGF-бета или фрагменты антител и анти-TGF-бета-антитела). рецепторные антитела или фрагменты антител). Белок STING или другой сенсор ДНК/РНК, который индуцирует или активирует продукцию IFN типа I, может представлять собой GOF/конститутивно активный вариант или может представлять собой белок дикого типа, включая модифицированные полипептиды STING и химерные полипептиды STING, описанные и предоставленные в настоящем документе. Любую из указанных выше комплементарных комбинаций также можно вводить в комбинации с любым одним или несколькими из следующего: антитело к PD-1, антитело к CTLA-4,

антитело к PD-L1, к CTLA-4 к PD-L1, к IL-6, к Siglec-15, к VEGF, к CD73, к CD38, к EGFR, к Her2, к Mesothelin, к BCMA, фрагменты этих антител, и также ингибиторы PARP, HDAC, и химиотерапия и их комбинации.

Предлагаемые здесь плазмиды и иммуностимулирующие бактерии кодируют комбинации терапевтических полезных нагрузок. Они включают комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих любой или все продукты, перечисленные в таблице выше.

Были оценены комбинации дополнительных полезных нагрузок, и примерные комбинации и их эффекты описаны в примерах. Оценивали влияние различных комбинаций полезных нагрузок на активацию антигенспецифических Т-клеток и на секрецию CXCL10 миелоидными клетками, ключевого хемокина, участвующего в рекрутировании противоопухолевых Т-клеток. Например, комбинации полезных нагрузок могут вызывать сильную секрецию CXCL10 дендритными клетками костного мозга (BMDC). Комбинация IL-36γ с IL-12p70 и STINGR284GtazCTT приводила к более высокой секреции CXCL10 и IFN-γBMDC (см. пример 26). Многие из комбинаций индуцируют активацию CD8 $^{+}$Т-клеточных ответов (например, экспрессия 4-1BB) и секреция IFN-γ.

Результаты рабочих примеров (см. пример 26) показывают, что определенные комбинации цитокинов могут активировать Т-клетки. Например, комбинацииIL-12p70 + IL-15; IL-12p70 + IL-15 + IFN-α2; IL-12p70 + IL-15 + анти-4-1BB агонистическоеантитело; IL-12p70 + IL-15 + IL-36γ; IL-12p70 + IL-15 + IL-21; IL-12p70 + IL-21 + IL-36γ; IL-12p70 + IL-36γ + IFN-α2; IL-12p70 + IL-36γ + анти-4-1BB агонистическоеантитело; IL-15 + IL-36γ + IFN-α2; и IL-15 + IL-36γ + анти-4-1BB агонистическоеантитело,приводят к секрециивысокихуровней IFN-γ, ноотносительнонизкихуровней IL-6 Т-клетками, чтоделаетихидеальнымикомбинациямидляоптимальнойактивации Т-клеток, дляиндукциипротивоопухолевогоиммунитета в микроокруженииопухоли.

Кроме того, несколько комбинаций цитокинов (IL-12p70, IL-15, IL-21 и IL-36γ) и участие 4-1BB активируют Т-клетки для секреции высоких уровней IFN-γ со стимуляцией TCR и без нее с помощью агонистического антитела против CD3ε для $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. Описанные здесь варианты STING, а также IL-12 могут усиливать антигенспецифическую активацию $CD8^+$ Т-клеток человека. Данные (см. пример 24) также показали на мышиной модели колоректальной карциномы, что иммуностимулирующие бактериальные штаммы, экспрессирующие IL-15 или комбинацию 4-1BBLΔcyt + IL-12, более сильно ингибируют ингибирование роста опухоли, чем те же штаммы, экспрессирующие 4-1BBL(Δcyt) или IL-12в одиночку и приводят к высокой степени полного ответа (50% излечения). Были протестированы и другие комбинации, которые показали мощную противоопухолевую активность invivo.

Комбинации полезных нагрузок могут включать костимулирующую молекулу, такую как полипептид OX40L или полипептид 4-1BBL, или один из их цитоплазматическиделетированных или укороченных вариантов, и/или их модифицированные формы, описанные и проиллюстрированные в настоящем документе; или антитело против контрольной точки иммунного ответа или его фрагмент, такое как scFv-Fc против CTLA-4 или scFv против CTLA-4 (см. пример 20 и SEQIDNO: 402 и 403 соответственно); один или несколько цитокинов/хемокинов, таких как IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IFN-β, IFN-α2 и CXCL10; рецепторы-приманки, связывающие TGF-β, и другие антагонисты полипептида TGF-бета, такие как, например, человеческий растворимый рецептор IITGFβ, слитый с FcIgG1 человека (husTGFβRII-Fc; SEQIDNO:407), анти-TGF-бета антитела или фрагменты антител, антитела против рецептора TGF-бета или фрагменты антител, и растворимые полипептиды-антагонисты TGF-бета; и один или несколько белков STING или модифицированных и/или химерных белков STING, как описано и проиллюстрировано в настоящем документе.

Как обсуждается в настоящем документе, эти полезные нагрузки/продукты/полипептиды могут быть закодированы в виде полицистронной конструкции под контролем одного промотора (т.е. одной

промоторной системы) и, при необходимости, других регуляторных последовательностей, а также могут включать полипептиды 2A или другие такие полипептиды, которые приводят к трансляции отдельных продуктов. Полезные нагрузки также могут быть экспрессированы на плазмидах, содержащих две отдельные открытые рамки считывания (ORF), каждая из которых находится под контролем другого промотора (т.е. система с двойным промотором). Примеры комбинаций полезных нагрузок в порядке их кодирования на плазмиде, включая пептид 2A, который кодируется в полицистронной конструкции, представлены в следующей таблице.

Типичные комбинации продуктов и примерный порядок плазмид

1ыйкодированный продукт	**1ый 2A пептид**	**2ойкодированный продукт**	**2ой 2A пептид**	**3ийкодированный продукт**	**3ий 2A пептид**	**4ыйкодированный продукт**
4-1BBL*	T2A	IL-12p70				
4-1BBL*	T2A	химерный STING**				
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	химерный STING**		
IL-12p70	T2A	химерный STING**				
IL-12p70	T2A	IL-15				
IL-12p70	T2A	IL-21				
IL-12p70	T2A	IL-15				
IL-12p70	T2A	IL-21				
IL-21	T2A	IL-12p70				
IL-12p70	T2A	IL-36γ				
IL-36γ	T2A	IL-12p70				
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-15		
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-21		

4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-36γ		
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-15	T2A	химерный STING**
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-21	T2A	химерный STING**
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	IL-36γ	T2A	химерный STING**
IL-12p70	T2A	IL-21	P2A	химерный STING**		
IL-21	T2A	IL-12p70	P2A	химерный STING**		
IL-12p70	T2A	IL-15	P2A	химерный STING**		
IL-12p70	T2A	IL-36γ	P2A	химерный STING**		
IL-36γ	T2A	IL-12p70	P2A	химерный STING**		
Анти-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70				
Анти-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70	P2A	химерный STING**		
Анти-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70	P2A	IL-15	T2A	
Анти-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70	P2A	IL-21	T2A	
Анти-CTLA-4 scFv-Fc	T2A	IL-12p70	P2A	IL-36γ	T2A	
4-1BBL*	T2A	sTGFβRIIFc#			T2A	
sTGFβRIIFc#	T2A	IL-12p70	P2A	химерный STING**		
4-1BBL*	T2A	sTGFβRIIFc#	P2A	IL-12p70	T2A	
4-1BBL*	T2A	IL-12p70	P2A	sTGFβRIIFc#	T2A	
IL-36γ	T2A	IL-23	P2A	OX40L		

*4-1BBL = модифицированный 4-1BBL с цитоплазматическим усечением и модификациями остатков, чтобы сделать оставшийся цитоплазматический домен более позитивным, чтобы сохранить правильную ориентацию по отношению к клеточной мембране.

**Химерный STING = STING с CTT Тасманского Дьявола и заменами R284G/N154S. sTGFβRIIFc # = бетагликан рецептора II типа.

Свойства иммуностимулирующих бактерий, представленные в настоящем документе, такие как накопление в резидентных опухолевых миелоидных клетках и в TME, а также комбинации продуктов/полезных нагрузок, которые могут быть экспрессированы, могут быть выбраны для покрытия ракового иммунного цикла.

Каждый шаг в цикле, а также роль иммуностимулирующих бактерий и полезной нагрузки резюмируются следующим образом:

1) Высвобождение антигенов раковых клеток – в опухолерезидентных миелоидных клетках накапливаются иммуностимулирующие бактерии;

2) Представление ракового антигена - иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе, кодируют и экспрессируют иммуностимуляторы, такие как полипептиды STING и их варианты, и IL-12, что приводит к экспрессии интерферонов типа I, включая IFN-α и IFN-β;

3) праймирование и активация – иммуностимулирующие бактерии кодируют полипептиды STING и их варианты, а также костимулирующие белки, такие как 4-1BBL и IL-12;

4) Доставка Т-клеток в опухоль – экспрессируются кодируемые варианты STING, что приводит к последующей экспрессии IFN-α и IFN-β;

5) инфильтрация Т-клеток в опухоль – просачивание сосудов и реполяризацияиммуносупрессивных миелоидных клеток;

6) Распознавание раковых клеток Т-клетками – IFNI типа и IFNγ, а также активация MHC; и

7) Уничтожение раковых клеток – комбинация кодируемых цитокинов/хемокинов, таких как IL-12, IL-15, IL-21 и/или IL-36γ, которые

индуцируют пролиферацию Т-клеток и высвобождение IFN-γ, и экспрессия растворимого рецептора-ловушки TGF-β.

Специалист в данной области, основываясь на раскрытии в настоящем документе и своих знаниях, может идентифицировать другие комбинации полезной нагрузки продуктов и другие порядки продуктов, закодированные в полицистронной конструкции, которые обладают иммуноактивирующим и/или иммуносупрессивным действием для усиления активности противоопухолевого действия иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем описании.

E. КОНСТРУКЦИЯ ПРИМЕРНЫХ ПЛАЗМИД, КОДИРУЮЩИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ ДЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ

Иммуностимулирующие бактерии по настоящему изобретению могут быть модифицированы для кодирования одного или нескольких терапевтических продуктов, включая иммуномодулирующие белки, которые стимулируют, индуцируют или усиливают противоопухолевый ответ. Терапевтический продукт может быть закодирован на плазмиде в бактерии под контролем эукариотического промотора, такого как промотор, распознаваемый РНК-полимеразой II, для экспрессии у эукариотического субъекта, в частности у субъекта, которому должна быть введена иммуностимулирующая бактерия. , например человек. Нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический продукт(ы), может включать, помимо эукариотического промотора, другие регуляторные сигналы для экспрессии или переноса в клетки, такие как секреция или экспрессия на поверхности клетки. Иммуностимулирующие белки — это белки, которые в соответствующей среде, такой как микроокружение опухоли (TME), может стимулировать, или участвовать, или усиливать

противоопухолевый ответ у субъекта, которому вводят иммуностимулирующую бактерию. Иммуностимулирующие белки включают, но не ограничиваются ими, цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы. К ним относятся цитокины, такие как, но не ограничиваясь ими, IL-2, IL-7, IL-12, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, цепной комплекс IL-15/IL-15Rα. , IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra, IL-2, модифицированный таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, IFN-α, и ИФН-β; хемокины, такие как, но не ограничиваясь ими, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11; белки, которые участвуют или которые влияют или усиливают рекрутирование и/или персистенцию Т-клеток; и/или костимулирующие молекулы, такие как, но не ограничиваясь ими, CD40, CD40L, OX40, OX40L, 4-1BB, 4-1BBL, 4-1BBL с делецией цитоплазматического домена (4-1BBLΔcyt), 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом или иным образом модифицированным усеченным цитоплазматическим доменом, ICOS, лигандICOS, CD27, лигандCD27, CD80, CD86, представители TNF/ надсемейство TNFR и члены семейства B7-CD28.

Другие такие иммуностимулирующие белки, которые используются для лечения опухолей или которые могут стимулировать, усиливать или иным образом усиливать или вызывать противоопухолевый ответ, известные специалистам в данной области, предполагаются для кодирования в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем документе.

Другие терапевтические продукты, кодируемые описанными здесь иммуностимулирующими бактериями, включают цитозольные сенсоры ДНК/РНК, которые индуцируют или активируют выработку интерферона типа I, включая STING, MDA5, RIG-I, IRF3 и IRF7, а также активаторы функции и конститутивно их активные варианты. Например, конститутивно активные варианты STING включают варианты с мутациями V147L, N154S, V155M, C206Y, R281Q и/или R284G, такие как N154S/R284G, и другие, описанные в настоящем документе и известные в данной области, в то время как конститутивно активные варианты IRF3 включают мутации S396D, S398D,

S402D, T404D и/или S405D и другие, описанные здесь и известные в данной области техники.

Другие терапевтические продукты, кодируемые иммуностимулирующими бактериями в настоящем документе, включают антитела и фрагменты антител, включая переменные одноцепочечные фрагменты (scFv), Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')2-фрагменты, Fv-фрагменты, дисульфид-связанные Fv (dsFvs)), фрагменты Fd, фрагменты Fd', одноцепочечные Fab (scFab), диатела, антиидиотипические (анти-Id) антитела, синтетические антитела, рекомбинантно полученные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие антитела, нечеловеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела и интратела или антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. Антитела могут быть направлены против иммунных контрольных точек, таких как PD-1, PD-L1, CTLA-4, IDO 1 и 2, CTNNB1 (β-катенин), SIRPα, VISTA и TREX-1, и другие, известные в данной области. или описано здесь, или против других мишеней, таких как TGF-β, VEGF, HER2, EGFR, STAT3 и IL-6, и других подобных мишеней, ингибирование которых улучшает противоопухолевый ответ. Иммуностимулирующие бактерии также могут кодировать РНК-интерференцию, такую как miРНК (shРНК и microРНК), против иммунных контрольных точек, таких как TREX1, и других мишеней, ингибирование, подавление или разрушение которых улучшает противоопухолевый ответ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммуностимулирующие бактерии сконструированы так, чтобы кодировать и экспрессировать один или несколько цитокинов для стимуляции иммунной системы, включая, но не ограничиваясь ими, IL-2, IL-7, IL-12 (IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35)), IL-15 (и комплекс альфа-цепи IL-15:IL-15R), IL-18, IL-21, IL-23, IL-36 гамма, IFN-альфа и IFN-бета . Цитокины стимулируют иммунные эффекторные клетки и стромальные клетки в месте опухоли и усиливают распознавание опухолевых клеток цитотоксическими клетками. В некоторых вариантах осуществления можно сконструировать иммуностимулирующие бактерии, кодирующие и экспрессирующие хемокины, такие как, например,

один или несколько из CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11. Дополнительные комбинации любых терапевтических продуктов могут быть закодированы и доставлены в микроокружение опухоли для усиления противоопухолевой эффективности иммуностимулирующих бактерий. Эти модификации и иммуностимулирующие бактерии обсуждаются выше и приведены в примерах ниже.

1. Конститутивные промотеры для гетерологичной экспрессии белков

Предложенные здесь плазмиды предназначены для кодирования терапевтического продукта, такого как иммуностимулирующий белок, который при экспрессии у субъекта-млекопитающего придает или способствует противоопухолевому иммунитету в микроокружении опухоли; иммуностимулирующий белок или другой терапевтический продукт кодируется на плазмиде в бактерии под контролем эукариотического промотора, такого как промотор, который распознается РНК-полимеразой II (РНКП II). Обычно промотор представляет собой конститутивный промотор, такой как промотор позднего эукариотического вируса. Примерыпромотороввключают, нонеограничиваютсяими, промоторцитомегаловируса (CMV), промоторфактораэлонгации-1 альфа (EF-1α), промоторубиквитинаС (UBC), раннийпромоторобезьяньеговируса 40 (SV40), фосфоглицератпромоторкиназы 1 (PGK), промотор ^β-актинакурицы (CBA) иегопроизводныепромоторы CAGG или CAG, промотор β-глюкуронидазы (GUSB),ипромотерGAPDH promoter, (см, напр., Powell *et al.*(2015) *Discov. Med.* 19(102):49–57).

Промотор CAG состоит из: (C) элемента раннего энхансера цитомегаловируса (CMV); (A) промотор, первый экзон и первый интрон гена бета-актина цыпленка; и (G) акцептор сплайсинга гена бета-глобина кролика. MND представляет собой синтетический промотор, который содержит область U3 модифицированного LTRMoMuLV (вирус мышиного лейкоза Молони) с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы и удаленной областью отрицательного контроля (промотор MND, полученный из вируса лейкемии

мышей (энхансер вируса миелопролиферативной саркомы, область отрицательного контроля удалена, сайт связывания праймерadl587rev заменен); см, напр., Li*etal.* (2010) *J. Neurosci. Methods*189:56-64).

Два или более из этих промоторов могут быть закодированы в множестве открытых рамок считывания (ORF) на плазмиде. Некоторые промоторы, включая, но не ограничиваясь ими, CMV, содержат множество сайтов, связывающих белок ответного элемента cAMP (CREB). Когда плазмиды, содержащие эти элементы, высвобождаются в цитозоль, например плазмиды, содержащиеся в S. typhimurium, которые высвобождаются в цитозоль после разрушения бактерий, они могут быть эффективно перемещены в ядро с использованием CREB-опосредованного механизма микротрубочек хозяина (см., например, Bai*etal.* (2017) *Biosci. Rep.* 37(6):BSR20160616).

Плазмиды могут включать несколько промоторов, включая бактериальные промоторы, например, для экспрессии asd, и эукариотические промоторы для экспрессии терапевтических продуктов. Было оценено, что различные конфигурации промоторов и других регуляторных последовательностей улучшают экспрессию терапевтических продуктов и улучшают рост и приспособленность бактерий. Как показано в приведенных ниже примерах (см. пример 30), среди протестированных конфигураций изменение ориентации эукариотической экспрессионной кассеты на плазмиде и включение одного или нескольких бактериальных терминаторов может повысить эффективность экспрессии кодируемой полезной нагрузки и может улучшить бактериальная пригодность.

2. Кассеты для экспрессии нескольких терапевтических продуктов

a. Конструкции с одним промоутером

Экспрессия нескольких генов в одной и той же клетке может быть достигнута с помощью одной конструкции, и это выгодно, когда требуется совместная

экспрессия нескольких белков для получения желаемого биологического эффекта, такого как противоопухолевый ответ. Последовательности внутреннего сайта посадки рибосомы (IRES) использовались для разделения двух кодирующих последовательностей под контролем одного промотора, однако уровень экспрессии второго белка может быть снижен по сравнению с первым белком, а длина последовательности IRES может быть уменьшена, запрещены в определенных случаях, например, при использовании вирусов с небольшой емкостью упаковки. Открытие коротких (длиной ~18-22 аминокислот) пептидных последовательностей вирусного происхождения, известных как пептиды 2A, которые опосредуют событие пропуска рибосомы, позволяет генерировать несколько отдельных пептидных продуктов на одинаковых уровнях из одной мРНК. .

Пептиды IRES и 2A используют разные механизмы коэкспрессии нескольких генов в одном транскрипте. Например, при использовании IRES для экспрессии нескольких генов в одной мРНК ген непосредственно ниже промотора транслируется с помощью канонического кэп-зависимого механизма, а ген ниже по течению от IRES транслируется с помощью кэп-независимого механизма, который имеет более низкую эффективность трансляции, чем кэп-зависимый механизм, что приводит к несбалансированной экспрессии с более низкой экспрессией гена, управляемого IRES (см., например, Chngetal. (2015) mAbs 7(2):403-412).

Сцепленные гены 2A, с другой стороны, транслируются в одной открытой рамке считывания (ORF). Расщепление белков, разделенных последовательностью 2A, происходит котрансляционно, в нетрадиционном процессе, при котором пептидная связь часто не образуется (т. е. пептидная связь «пропускается») между С-концевым глицином и пролином в пептиде 2A. . Несмотря на это, трансляция продолжается, и два различных белка продуцируются в равных количествах. Короткий отрезок, кодирующий примерно 20 аминокислот пептидной последовательности 2A, достаточен, чтобы вызвать пропуск связи. Однако, если пропуск связи не происходит,

образуется слитый белок, который впоследствии не расщепляется (см., например, Danielsetal. (2014) PLoSOne 9(6):e100637).

Многие из этих пептидов 2A были описаны, включая, но не ограничиваясь ими, T2A (SEQIDNO:327) из вируса Теса асигна, P2A (SEQIDNO:328) из свиного тешовируса-1, E2A (SEQIDNO:329), из вируса ринита лошадей A и F2A (SEQIDNO: 330), из вируса ящура, среди прочих. В различных исследованиях сообщалось о противоречивой эффективности расщепления различных пептидов 2A, и на эффективность расщепления пептида 2A может влиять природа экспрессируемого белка, порядок генов, фланкирующих последовательность 2A, длина используемого пептида 2A и линкер между вышележащим белком и пептидом 2A. Эффективность расщепления и повышенная экспрессия белка часто могут быть улучшены за счет использования расположенных выше последовательностей расщепления вируса, таких как, но не ограничиваясь ими, последовательность расщепления пептидом фурином, RRKR, а также введением пептидных инкеровGSGиSGS, V5 эпитопаepitope (GKPUPNPLLGLDST), или 3xFlagэпитопа непосредственно перед 2Апептидом (см, напр., Chng*etal.* (2015) *mAbs* 7(2):403-412).

Описанные здесь иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиды, кодирующие терапевтические продукты, такие как иммуномодулирующие белки, с одним промотором и ORF, могут экспрессировать два или более белков за счет использования вирусных внутренних рибосомных сайтов входа (IRES), которые являются независимыми от кэпа, или через трансляционное прочтение пептидов 2A и последующее саморасщепление на одинаково экспрессируемые ко-белки. Плазмиды могут содержать другие регуляторные элементы, как описано ниже и в других местах настоящего документа. Например, типовой конструкцией (см. пример 14) является CMV-muIL-2 CO_T2A_muIFN-α2-WPRE, где мышиный IL-2 с оптимизированным кодоном коэкспрессируется с мышиным IFN-α2 с использованием промотора CMV и пептида T2A. Кроме того, для усиления экспрессии включен посттранскрипционный регуляторный

элемент (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP). Если, например, третий терапевтический продукт должен экспрессироваться плазмидой, последовательность 2A фланкирована первыми двумя белками, которые экспрессируются под контролем первого промотора, например, CMV, а третий белок кодируется под контролем второго промотор, например, EF-1α. Примеромтакойконструкцииявляется CMV-muIL-15Rα/IL-15sc_T2A_muSTING-R283G + EF-1α-muIL-18-WPRE, гдемышиный 15Rα/IL-15sc имышиный STING сзаменой R283G коэкспрессируютсяподконтролем. Промотор CMV с использованием T2A и мышиный IL-18 экспрессируют отдельно под контролем промотора EF-1α. Эта иллюстративная конструкция также включает WPRE для усиленной экспрессии, и третий белок кодируется под контролем второго промотора, например, EF-1α.

Additionally, a Woodchuck Hepatitis Virus (WHP) Posttranscriptional Regulatory Element (WPRE) is included, to enhance expression. If, for example, a third therapeutic product is to be expressed by the plasmid, a 2A sequence is flanked by the first two proteins, which are expressed under the control of a first promoter, *e.g.*, CMV, and a third protein is encoded under the control of a second promoter, *e.g.*, EF-1α. Exemplary of such a construct is CMV-muIL-15Rα/IL-15sc_T2A_muSTING-R283G + EF-1α-muIL-18-WPRE, where murine 15Rα/IL-15sc and murine STING with the replacement R283G are co-expressed under control of a CMV promoter, using T2A, and murine IL-18 is expressed separately under control of an EF-1α promoter. This exemplary construct also includes a WPRE for enhanced expression.

b. Двойные/множестенныепромоутерные конструкции

Альтернативно, генетические полезные нагрузки/терапевтические продукты могут быть экспрессированы с использованием конструкций с двумя или несколькими промоторами, где каждый белок экспрессируется под контролем отдельного промотора. Таким образом, плазмиды, кодирующие терапевтические продукты, такие как иммуномодулирующие белки, экспрессируемые в виде комбинаций, могут содержать несколько промоторов,

каждый из которых контролирует отдельную интактную ORF с надлежащим процессингом стоп-кодона (т.е. конструкции с двойным/множественным промотором); или несколько белков могут быть экспрессированы в одной ORF посредством использования пептидов 2A (т.е. конструкций с одним промотором); или плазмида может содержать смесь конструкций с одним и двумя/множественными промоторами для экспрессии трех или более белков, как описано выше.

3. Регуляторные элементы

a. Пост-транскрипционные регуляторные элементы

Для усиления экспрессии одного или нескольких терапевтических продуктов/иммуномодулирующих белков из одной плазмиды можно использовать регуляторные элементы, которые усиливают транскрипцию и трансляцию интересующего(их) белка(ов). Например, посттранскрипционный регуляторный элемент (PRE) вируса гепатита сурка (WPRE) при вставке в 3'-нетранслируемую область ORF может в несколько раз повышать уровни экспрессии (см., например, Zuffereyetal. (1999)). J.Virol., 73(4):2886-2892). Точно так же другие такие элементы, включая, но не ограничиваясь этим, PRE вируса гепатита B (HPRE), также могут усиливать экспрессию. Их комбинацию можно использовать на 3'-концах нескольких ORF для улучшения экспрессии нескольких белков на одной плазмиде.

PRE, WPRE и HPRE представляют собой цис-действующие РНК-элементы гепаднавируса, которые могут увеличивать накопление цитоплазматической мРНК, стимулируя мРНК экспорт из ядра и может усиливать посттранскрипционный процессинг и стабильность.

b. Сигнальные последовательности полиаденилирования и терминаторы

Другие элементы плазмиды, которые могут усиливать экспрессию белка, включают сигнальные последовательности полиаденилирования и терминаторы. Полиаденилирование представляет собой посттранскрипционное

добавление поли(А)-хвоста к 3'-концу транскрипта мРНК, что является частью процесса, в результате которого образуется зрелая мРНК для трансляции. Сигнальные последовательности полиаденилирования важны для ядерного экспорта, стабильности мРНК и эффективной трансляции. Терминатор представляет собой последовательность, которая определяет конец транскрипта, создает свободный 3'-конец и инициирует высвобождение вновь синтезированной мРНК из транскрипционного аппарата. Затем свободный 3'-конец доступен для добавления поли(А)-хвоста. Терминаторы находятся ниже транскрибируемого гена и обычно располагаются непосредственно после любых 3'-регуляторных элементов таких как сигнал полиаденилирования или поли(А). Обычно используемые терминаторы млекопитающих в экспрессионных плазмидах включают последовательности полиА обезьяньего вируса 40 (SV40), гормона роста человека (hGH), гормона роста крупного рогатого скота (BGH или bGH) и бета-глобина кролика (rbGlob), которые включают звено последовательности AAUAAA(SEQIDNO:398) и способствуют как полиаденилированию, так и терминации.

При размещении на 3'-конце ORF такие последовательности, как поли-А вируса обезьян 40 (SV40pA) или поли-А гормона роста крупного рогатого скота (bGHpA), приводят к многократному увеличению экспрессии как invitro, так и invivo (см. , например, Powell и др. (2015) Discov.Med.19(102):49–57). Эти и другие подобные элементы могут дополнительно усиливать экспрессию и трансляцию множества терапевтических продуктов, включая иммуномодулирующие белки, экспрессируемые из одной плазмиды.

c. Энхансеры

Промоторы и энхансеры находятся выше сайта множественного клонирования (MCS) в плазмиде и взаимодействуют для определения скорости транскрипции. Энхансеры представляют собой последовательности, которые связывают белки-активаторы, чтобы образовать петлю ДНК и доставить специфический промотор к комплексу инициации, тем самым увеличивая

скорость транскрипции. Они могут располагаться рядом или далеко от промотора, на который они влияют, и включать CMV, EF-1α, SV40 и синтетические энхансеры или промотор MND, который представляет собой синтетический промотор, содержащий область U3 модифицированного MoMuLV (мышиный Moloney вирус лейкемии) LTR с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы. Иммуностимулирующие бактерии в настоящем документе содержат плазмиды, которые могут содержать энхансер(ы) для усиления экспрессии терапевтических продуктов/белков, закодированных на плазмидах.

d. Сигналы секреции

Сигнал секреции, также известный как сигнальная последовательность или пептид, лидерная последовательность или пептид, или сигнал или последовательность локализации, представляет собой короткий пептид на N-конце вновь синтезированного белка, который должен быть секретирован. Сигнальные пептиды способствуют перемещению белка клеткой, обычно к клеточной мембране. Эффективность секреции белка во многом определяется сигнальным пептидом. Таким образом, иммуностимулирующие бактерии в настоящем документе содержат плазмиды, которые могут содержать сигнальный пептид/сигнальный пептид секреции, для облегчения и/или увеличения экспрессии или секреции кодируемого(ых) терапевтического продукта(ов).

e. Улучшение бактериальной пригодности

Плазмиды в иммуностимулирующих бактериях, которые кодируют терапевтические продукты, включают гены и регуляторные элементы, предназначенные для экспрессии бактериальных генов, а также для экспрессии сложных полицистронных эукариотических полезных нагрузок. Переключение между такими эволюционно расходящимися организмами создает проблемы для

правильного функционирования прокариот и эукариот. Бактерии культивируют invitro, затем вводят эукариотическому субъекту, где плазмиды доставляются в клетки, особенно в миелоидные клетки, находящиеся в опухоли, у раковых субъектов, где полезные нагрузки экспрессируются, обрабатываются и передаются. Как описано в примерах (см. пример 30), утечка транскрипции от эукариотического промотора, такого как промотор CMV, у бактерий в сочетании с большими эукариотическими генами и регуляторными последовательностями,может приводить к пониженной бактериальной пригодности и пониженной скорости роста в культуре.

Как показано в примерах (см. пример 30), для сведения к минимуму негативного воздействия на приспособленность бактерий при сохранении высокой эктопической экспрессии в клетках млекопитающих плазмиду для доставки систематически модифицировали для улучшения приспособленности бактерий, а также для поддержания или улучшения эукариотической экспрессии. Возможные примерные негативные воздействия и решения включают, например, следующее:

1) скрытые последовательности бактериального промотора, закодированные в энхансерной области промотора CMV, идентифицировали с помощью PromoterHunter (доступно онлайн по адресу phisite.org/promoterhunter/; см., например, Klucar*etal.* (2010) *NucleicAcidsRes.* 38(Databaseissue):D366-D370), и эти предполагаемые промоторные последовательности были заменены сайтами связывания CREB и сайтами частичного связывания CREB для обеспечения эффективной доставки плазмиды;

2) для ингибирования утечки транскрипции от промотора CMV ряд бактериальных терминаторов встраивали в 5'-UTRORF 1 для ингибирования экспрессии в бактериях (см. таблицу в примере 30 ниже);

3) для снижения уровня сквозной транскрипции от точки начала репликации ориентация экспрессионной кассеты от промотора CMV до конца сигнала полиаденилирования была изменена на противоположную, с терминатором

транскрипции, вставленным между кассетой экспрессии, и без него, и начало репликации; и

4) модификации из числа 1)-3), приведенные выше, которые привели к повышению жизнеспособности инъекционного материала с повышенной экспрессией полезной генетической нагрузки invitro, были объединены для дальнейшего улучшения.

Результаты, подробно описанные в примерах (см. пример 30), показывают, что, когда экспрессионная кассета была перевернута на плазмиде и бактериальный терминатор BBa_B0015 был вставлен после кодирующей области, а бактериальный терминатор T4 был вставлен ниже промотора CMV. (см., например, Фигуру 14), наблюдалось повышение жизнеспособности бактериальных клеток, уменьшение времени удвоения, рост до более высокой стационарной OD_{600} и повышенная экспрессия кодируемой полезной нагрузки invitro по сравнению с плазмидой без модификаций.

Терминатор BBa_B0015 представляет собой составной терминатор, в котором соединены терминатор, полученный из E. coli (BBa_B0010), и терминатор, полученный из фага T7 (BBa_B0012).

Таким образом, в настоящем документе предусмотрены плазмиды, в которых эукариотический промотор, такой как вирусный промотор, находится в ориентации, противоположной бактериальному промотору, такому как бактериальный промотор, контролирующий экспрессию экзогенного гена asd на плазмиде. Например, экзогенная кассета asd (включает регуляторные последовательности для экспрессии и экзогенный ген asd, закодированный на плазмиде в asd-бактериях) находится в противоположной ориентации от эукариотических регуляторных последовательностей и оперативно связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полезную нагрузку. Это уменьшает считывание (утечку) эукариотического промотора. Эти конструкции также включают бактериальные терминаторы, фланкирующие экспрессионную кассету полезной нагрузки, которая включает эукариотический промотор, что

снижает считывание с бактериальных промоторов. На фиг.14, например, представлена примерная конфигурация конструкции.

Таким образом, приспособленность бактерий при желании можно улучшить с помощью одной или нескольких из нескольких стратегий, включая ориентацию экспрессионных кассет, включающих эукариотические промоторы, в направлении, противоположном направлению, находящемуся под контролем бактериальных промоторов, и включение распознаваемых бактериями терминаторов для терминации бактериальных экспрессий в стратегических локусах. Другие такие модификации могут быть включены для усиления роста бактерий invitro и для благоприятствования экспрессии или для того, чтобы не препятствовать экспрессии, с эукариотических промоторов invivo в эукариотическом хозяине, таком как человек. Таким образом, конструкции были улучшены за счет включения бактериальных промоторов; и путем изменения ориентации нуклеиновой кислоты, кодирующей полезную нагрузку, относительно экзогенной кассеты, кодирующей asd.

4. Начало репликации и число копий плазмиды

Плазмиды представляют собой автономно реплицирующиесявнехромосомные кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, которые поддерживаются в бактериях с помощью точки начала репликации. Число копий влияет на стабильность плазмиды. Высокое число копий обычно приводит к большей стабильности плазмиды, когда происходит случайное разделение при делении клетки. Большое количество копий плазмид обычно снижает скорость роста, что, возможно, позволяет бактериальным клеткам с небольшим количеством плазмид доминировать в культуре, поскольку они растут быстрее. Это можно улучшить, используя стратегии аттенуации генов и дозирования генов, которые ограничивают экспрессию определенных генов на плазмиде, которые могут быть токсичными для бактерий, если они присутствуют в большом количестве копий. Начало репликации также определяет совместимость плазмиды, т.е. его способность реплицироваться вместе с другой плазмидой в той же

бактериальной клетке. Плазмиды, использующие одну и ту же систему репликации, не могут сосуществовать в одной и той же бактериальной клетке; говорят, что они принадлежат к одной и той же группе совместимости. Введение нового начала в виде второй плазмиды из той же группы совместимости имитирует результат репликации резидентной плазмиды. Таким образом, любая дальнейшая репликация предотвращается до тех пор, пока две плазмиды не будут разделены на разные клетки для создания правильного количества копий до репликации, имитирует результат репликации резидентной плазмиды.

Специалистам в данной области известны многочисленные бактериальные начала репликации. Происхождение может быть выбрано для достижения желаемого количества копий. Начала репликации содержат последовательности, которые распознаются как сайты инициации репликации плазмиды с помощью ДНК-зависимых ДНК-полимераз (см., например, delSolaretal. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(2):434-464).

Различные начала репликации обеспечивают различные уровни копий плазмид в каждой клетке и могут варьироваться от одной до сотен копий на клетку. Обычно используемые бактериальные плазмидные начала репликации включают, но не ограничиваются ими, производные pMB1, которые имеют производные с очень высоким числом копий, такие как pUC, и производные с более низким числом копий, такие как pBR322, а также ColE1, p15A и pSC101, и другие начала, которые имеют низкое число копий. Это хорошо известно специалистам в данной области. Например, начало pUC19 приводит к числу копий 500-700 копий на клетку. Начало pBR322 имеет известное число копий 15-20 копий на клетку. Это начало различается только одной парой оснований. Исходное число копий ColE1 составляет 15–20, а производные, такие как pBluescript, имеют числа копий в диапазоне 300–500. Начало p15A, которое находится в плазмиде pACYC184, например, дает число копий приблизительно 10. Начала pSC101 дают число копий приблизительно 5. Другие векторы с низким числом копий, из которых могут быть получены

начала репликации, включают, например, pWSK29, pWKS30, pWSK129 и pWKS130 (см., например, Wangetal. (1991) Gene 100:195-199).

Количество копий от среднего до низкого составляет менее 150 или менее 100. Низкое количество копий составляет менее 20, 25 или 30. Как правило, количество копий меньше среднего составляет менее 150 копий, и число копий менее чем низкое составляет менее примерно 25 или менее 25 копий, и обычно число копий относится к среднему количеству копий плазмиды на бактерию в препарате. Специалисты в данной области техники могут идентифицировать плазмиды с низким, средним или высоким числом копий. Например, один из методов экспериментального определения того, является ли количество копий высоким или низким, заключается в выполнении минипрепарата. Высококопийная плазмида должна давать от 3 до 5 мкг ДНК на 1 мл культуры LB; низкокопийная плазмида дает от 0,2 до 1 мкг ДНК на мл культуры LB. Последовательности бактериальных плазмид, включая идентификацию и последовательность начала репликации, хорошо известны (см., например, snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/).

Примеры начал репликации, число копий их плазмид, собраны в нижеследующей таблице.

Начало репликации	**Число копий**	**SEQ ID NO.**
pMB1	~~Меняется~~	254
p15A	10-12	255
pSC101	~5	256
pBR322	15-20	243
ColE1	15-20	257
pPS10	15-20	258
RK2	~5	259
R6K (альфа начало)	15-20	260
R6K (бета начало)	15-20	261
R6K (гамма начало)	15-20	262

P1 (oriR)	Низкое	263
R1	Низкое	264
pWSK	Низкое	265
ColE2	10-15	266
pUC (pMB1)	500-700	267
F1	300-500	268

Высококопийные плазмиды выбирают для гетерологичной экспрессии белков invitro, так как дозировка генов увеличена по сравнению с хромосомными генами, имеют более высокие удельные выходы белка, а для терапевтических бактерий - более высокие терапевтические дозы кодируемых терапевтических средств. Однако в настоящем документе показано, что для доставки плазмид, кодирующих терапевтические продукты (например, иммуномодулирующие белки), таких как S.typhimurium, в некоторых вариантах осуществления может быть выгодна высококопийная плазмида.

Требование к бактериям поддерживать высококопийные плазмиды может быть проблемой, если экспрессируемая молекула токсична для организма. Метаболические потребности для поддержания этих плазмид могут возникать за счет репликативной пригодности invivo. Оптимальное число копий плазмиды для доставки терапевтических продуктов может зависеть от механизма аттенуации штамма, сконструированного для доставки плазмиды. При необходимости специалист в данной области, принимая во внимание раскрытие в данном документе, может выбрать подходящее количество копий для конкретных иммуностимулирующих видов и штаммов бактерий.

5. Звенья CpGMotifsи островки CpG

Неметилированныецитидин-фосфат-гуанозиновые (CpG) звенья преобладают в геномной ДНК бактерий, но не позвоночных. Патогенная ДНК и синтетические олигодезоксинуклеотиды (ODN), содержащие звенья CpG, активируют защиту хозяина по механизмам, приводящим к врожденным и приобретенным

иммунным ответам. Неметилированные звенья CpG содержат центральный неметилированныйдинуклеотидCG плюс фланкирующие области. У людей было идентифицировано четыре различных класса CpGODN на основе различий в структуре и характере иммунного ответа, который они вызывают. ODNK-типа (также называемые B-типом) содержат от 1 до 5 звеньев CpG, обычно на фосфоротиоатном остове. ODND-типа (также называемые A-типом) имеют смешанный фосфодиэфирно-фосфоротиоатный остов и имеют единственный мотив CpG, окруженный палиндромными последовательностями, которые позволяют формировать структуру «стебель-петля», а также поли-G-звенья в 3' и 5' концах. ODNC-типа имеют фосфоротиоатный остов и содержат множественные палиндромныеCpG-звенья, которые могут образовывать структуры стержневых петель или димеры. CpGODNP-класса имеют фосфоротиоатную основу и содержат несколько CpG-звеньев с двойными палиндромами, которые могут образовывать шпильки на своих GC-богатых 3'-концах (см., например, Scheiermannetal. (2014) Vaccine 32(48):6377- 6389). Для целей настоящего изобретения CpG кодируются в плазмидной ДНК; они могут быть введены как звено или в ген.

Толл-подобные рецепторы (TLR) являются ключевыми рецепторами для восприятия патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) и активации врожденного иммунитета против патогенов (см., например, Akiraetal. (2001) Nat. Immunol.2(8):675-680).). TLR9 распознает гипометилированные мотивы CpG в ДНК прокариот, которые не встречаются в природе в ДНК млекопитающих (см., например, McKelveyetal. (2011) J. Autoimmun. 36:76-86).

Распознавание звеньев CpG при фагоцитозе патогенов в эндосомы в субпопуляциях иммунных клеток индуцирует IRF7-зависимую передачу сигналов интерферона I типа и активирует врожденный и адаптивный иммунитет.

Иммуностимулирующие бактерии, такие как виды Salmonella, такие как штаммы S.typhimurium, несущие плазмиды, содержащие CpG-островки или звенья, представлены в настоящем документе. Эти бактерии могут активировать TLR9 и индуцировать врожденный и адаптивный иммунитет, опосредованный интерфероном I типа. Как показано в данном документе, бактериальные плазмиды, содержащие гипометилированныеCpG-островки, могут вызывать врожденные и адаптивные противоопухолевые иммунные ответы, которые в сочетании с терапевтическими продуктами, закодированными на плазмиде, такими как иммуностимулирующие белки и конститутивно активные варианты STING, IRF3 и других цитозольных сенсоров ДНК/РНК могут обладать синергической или усиленной противоопухолевой активностью. Например, ген asd (SEQIDNO:48) кодирует высокую частоту гипометилированныхCpG-островков. Звенья CpG могут быть включены в комбинацию с любым из терапевтических продуктов, описанных или очевидных из этого описания, для повышения или улучшения состояния субъекта.

Иммуностимулирующие CpG могут быть включены в плазмиды путем включения нуклеиновой кислоты, обычно из бактериального гена, которая кодирует генный продукт, а также путем добавления нуклеиновой кислоты, которая кодирует звенья CpG. Плазмиды по настоящему изобретению могут включать звенья CpG. Типичные звенья CpG известны (см., например, патенты США №№ 8232259, 8426375 и 8241844). К ним относятся, например, синтетические иммуностимулирующие олигонуклеотиды длиной от 10 до 100, от 10 до 20, от 10 до 30, от 10 до 40, от 10 до 50 или от 10 до 75 пар оснований, имеющие общую формулу: (CpG) n, где n — количество повторений. Как правило, используется по крайней мере один или два повтора; основания без CG могут быть перемешаны. Специалисты в данной области хорошо знакомы с общим использованием звеньев CpG для индуцирования иммунного ответа путем модулирования TLR, в частности TLR9.

6. Компоненты обслуживания/отбора плазмиды

Поддержание плазмид в лабораторных условиях обычно обеспечивается включением в плазмиду гена устойчивости к антибиотикам и использованием антибиотиков в питательной среде. Как описано выше, использование делеционного мутанта asd, дополненного функциональным геном asd на плазмиде, позволяет проводить отбор плазмиды invitro без использования антибиотиков и позволяет поддерживать плазмиду invivo. Система комплементации гена asd обеспечивает такой отбор/поддержание (см., например, Galánetal. (1990) Gene 94(1):29-35). Использование системы комплементации генов asd для поддержания плазмид в микроокружении опухоли повышает активность S. typhimurium и других штаммов иммуностимулирующих бактерий, сконструированных для доставки плазмид, кодирующих терапевтические продукты, такие как иммуностимулирующие белки, конститутивно активные цитозольные сенсоры ДНК/РНК, антитела, фрагменты антител, или другие подобные продукты, обсуждаемые здесь.

7. Последовательности ядерного таргетинга ДНК

Последовательности ДНК, нацеленные на ядро (DTS), такие как SV40 DTS, опосредуют транслокацию последовательностей ДНК через комплекс ядерных пор. Сообщается, что механизм этого транспорта зависит от связывания ДНК-связывающих белков, которые содержат последовательности ядерной локализации. Было продемонстрировано включение DTS в плазмиду для увеличения ядерного транспорта и экспрессии (см., например, Dean, DAetal. (1999) Exp. CellRes.253(2):713-722), и оно использовалось для увеличения экспрессии генов из плазмид, доставляемых S. typhimurium (см., например, Kongetal. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA109(47):19414–19419).

Rho-независимые терминаторы транскрипции или терминаторы класса I, такие как терминатор T1 гена rrnBE. coli, содержат последовательности ДНК, образующие вторичные структуры, вызывающие диссоциацию комплекса элонгации транскрипции.

Терминаторы транскрипции включены в плазмиду, чтобы предотвратить экспрессию гетерологичных белков транскрипционным аппаратом S. typhimurium. Это гарантирует, что экспрессия терапевтических продуктов ограничивается механизмом транскрипции клетки-хозяина.

Плазмиды, используемые для трансформации Salmonella, такой как S. typhimurium, в качестве описанной здесь терапии рака, содержат все или некоторые из следующих признаков: 1) один или несколько конститутивных промоторов для гетерологичной экспрессии белков; 2) одну или несколько иммуномодулирующих экспрессионных кассет человека; 3) бактериальныое начало репликации и оптимизированное число копий плазмиды; 4) иммуностимулирующие CpG-островки; 5) селективный маркер гена asd для поддержания и селекции плазмиды; 6) последовательности ядерной мишени ДНК; и 7) терминаторы транскрипции.

F. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО, КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

В настоящем документе предусмотрены способы производства, а также фармацевтические композиции и составы, содержащие любую из иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемые эксципиенты или добавки. Фармацевтические композиции можно использовать при лечении заболеваний, таких как гиперпролиферативные заболевания или состояния, такие как опухоль или рак. Иммуностимулирующие бактерии можно вводить в виде терапии с одним агентом или можно вводить в составе комбинированной терапии с дополнительным(и) агентом(ами) или лечением(ями).

Комбинированная терапия включает комбинированную терапию иммуностимулирующими бактериями и/или другими носителями, представленными в настоящем документе, с любой другой противораковой терапией или лечением, включая, помимо прочего, иммунотерапию, такую как

терапия CAR-T и ингибиторы контрольных точек, облучение, хирургическое вмешательство. , химиотерапевтические агенты, такие как аналоги нуклеозидов и соединения платины, и клеточная терапия.

Композиции могут быть составлены для введения однократной дозы или для введения многократной дозы. Агенты могут быть приготовлены для прямого введения. Композиции могут быть представлены в виде жидкого или сухого состава.

1. Производство

a. Производство банков клеток

Поскольку активный ингредиент иммунотерапевтического средства, описанного в настоящем документе, состоит из сконструированных самовоспроизводящихся бактерий, выбранная композиция будет расширена до ряда банков клеток, которые будут поддерживаться для длительного хранения и в качестве исходного материала для производства лекарственного вещества. . Банки клеток производятся в соответствии с действующей надлежащей производственной практикой (cGMP) на соответствующем производственном предприятии в соответствии с Кодексом федеральных правил (CFR) 21 часть 211 или другим соответствующим регулирующим органом. Поскольку активным агентом иммунотерапевтического средства является живая бактерия, описанные здесь продукты по определению являются нестерильными и не могут быть окончательно стерилизованы. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы обеспечить использование асептических процедур на протяжении всего производственного процесса для предотвращения загрязнения.

Растворы и исходные материалы следует стерилизовать перед процессом производства.

Примеры криозащитных агентов включают: белки, такие как человеческий или бычий сывороточный альбумин, желатин и иммуноглобулины; углеводы, в том числе моносахариды (например, галактоза, D-манноза, сорбоза и т. д.) и их невосстанавливающие производные (например, метилглюкозид), дисахариды (трегалоза, сахароза и другие), циклодекстрины и полисахариды (например, раффиноза, мальтодекстрины , декстраны и др.); аминокислоты (например, глутамат, глицин, аланин, аргинин или гистидин, триптофан, тирозин, лейцин, фенилаланин и т.д.); метиламины, такие как бетаин; полиолы, такие как трехатомные или высшие сахарные спирты, например, глицерин, эритрит, глицерин, арабит, ксилит, сорбит и маннит; пропиленгликоль; полиэтиленгликоль; поверхностно-активные вещества, например Pluronic®; или сероорганические соединения, такие как диметилсульфоксид (ДМСО) и их комбинации.

Суспензия бактерий в растворе для криоконсервации может быть достигнута добавлением концентрированного криозащитного агента или агентов к культуральному материалу для достижения конечной концентрации, которая сохраняет жизнеспособность бактерий в процессе замораживания и оттаивания (например, от 0,5% до 20% конечной концентрации). концентрации глицерина) или путем сбора бактерий (например, путем центрифугирования) и суспендирования в растворе криоконсерванта, содержащем соответствующую конечную концентрацию криозащитного агента(ов). Суспензию бактерий в растворе для криоконсервации затем разливают в соответствующие стерильные флаконы (пластиковые или стеклянные) с системой укупорки контейнера, способной сохранять целостность укупорки в условиях замораживания (например, бутиловые пробки и обжимные пломбы). Флаконы с основным банком клеток затем замораживают (либо медленно с помощью морозильной камеры с регулируемой скоростью, либо быстро путем помещения непосредственно в морозильную камеру). Затем МСВ хранят в замороженном виде при температуре, которая сохраняет жизнеспособность в течение длительного времени (например, при -60 °C или ниже). Материал размороженного основного банка клеток тщательно характеризуют для

обеспечения идентичности, чистоты и активности в соответствии с правилами соответствующих органов.

Рабочие банки клеток (WCB) производятся почти так же, как основной банк клеток, но исходный материал получают из MCB. Материал MCB может быть непосредственно перенесен в сосуд для ферментации, содержащий стерильную среду, и расширен, как указано выше. Затем бактерии суспендируют в растворе для криоконсервации, помещают в контейнеры, запечатывают и замораживают при температуре -20 °C или ниже. Несколько WCB могут быть получены из материала MCB, а материал WCB может быть использован для создания дополнительных банков клеток (например, рабочий банк клеток производителя (MWCB)). WCB хранятся в замороженном виде и характеризуются для обеспечения идентичности, чистоты и активности. Материал WCB обычно является исходным материалом, используемым в производстве лекарственного вещества биологических препаратов, таких как сконструированные бактерии.

b. Производство лекарственных веществ

Лекарственное вещество производится с использованием асептических процессов согласно cGMP, как описано выше. Материал рабочего банка клеток обычно используется в качестве исходного материала для производства лекарственного вещества в соответствии с cGMP, однако можно использовать и другие банки клеток (например, MCB или MWCB). Асептическая обработка используется для производства всех клеточных препаратов, включая препараты на основе бактериальных клеток. Бактерии из банка клеток размножаются путем ферментации; это может быть достигнуто путем производства прекультуры (например, во встряхиваемой колбе) или путем прямой инокуляции ферментера. Ферментация осуществляется в стерильном биореакторе или колбе, которая может быть одноразовой или многоразовой. Бактерии собирают концентрированием (например, центрифугированием, непрерывным центрифугированием или фильтрацией с тангенциальным потоком). Концентрированные бактерии очищают от компонентов среды и

бактериальных метаболитов путем замены среды буфером (например, путем диафильтрации). Нерасфасованный лекарственный продукт готовят и консервируют в качестве промежуточного продукта (например, путем замораживания или сушки) или перерабатывают непосредственно в лекарственный продукт. Лекарственное вещество проверяется на идентичность, прочность, чистоту, активность и качество.

c. Производство лекарственного продукта

Лекарственный продукт определяется как конечный состав активного вещества, содержащийся в его конечном контейнере. Лекарственный препарат производится с использованием асептических процессов в соответствии с cGMP. Лекарственный продукт получают из лекарственного вещества. Лекарственное вещество размораживают или восстанавливают, если это необходимо, а затем формулируют с соответствующей целевой концентрацией. Поскольку активным компонентом лекарственного препарата являются живые сконструированные бактерии, сила определяется количеством колониеобразующих единиц (КОЕ), содержащихся в суспензии. Нерасфасованный продукт разбавляют до конечного состава, подходящего для хранения и использования, как описано ниже. Контейнеры заполняются и закрываются с помощью системы закрытия контейнеров, а лекарственный препарат маркируется. Лекарственный продукт хранится при соответствующей температуре для сохранения стабильности и проверяется на идентичность, прочность, чистоту, активность, и допускается для использования на людях, если он удовлетворяет соответствующим криериям.

2. Композиции

Фармацевтически приемлемые композиции готовят с учетом разрешений регулирующего органа или другого агентства и/или готовят в соответствии с общепризнанной фармакопеей для применения у животных и людей. Композиции могут быть приготовлены в виде растворов, суспензий, порошков или составов с замедленным высвобождением.

Обычно соединения вводят в состав фармацевтических композиций с использованием методов и процедур, хорошо известных в данной области (см., например, Ansel, IntroductiontoPharmaceuticalDosageForms, FourthEdition, 1985, стр. 126). Состав должен соответствовать способу введения.

Композиции могут быть приготовлены для введения любым способом, известным специалистам в данной области, включая внутримышечный, внутривенный, внутрикожный, внутриочаговый, внутрибрюшинный, подкожный, внутриопухолевый, эпидуральный, назальный, пероральный, вагинальный, ректальный, местный, местный, ушной, ингаляционный. буккальное (например, подъязычное) и чрескожное введение или любым подходящим путем. Также рассматриваются другие способы введения. Введение может быть местным, местным или системным, в зависимости от очага лечения. Местное введение в область, нуждающуюся в лечении, может быть достигнуто, например, но не ограничиваясь этим, путем местной инфузии во время операции, местного применения, например, в сочетании с раневой повязкой после операции, путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата.

Фармацевтически приемлемые композиции готовят с учетом разрешений регулирующего органа или другого агентства и/или готовят в соответствии с общепризнанной фармакопеей для применения у животных и людей. Композиции могут быть приготовлены в виде растворов, суспензий, порошков или составов с замедленным высвобождением.

Обычно соединения вводят в состав фармацевтических композиций с использованием методов и процедур, хорошо известных в данной области (см., например, Ansel, IntroductiontoPharmaceuticalDosageForms, FourthEdition, 1985, стр. 126). Состав должен соответствовать способу введения.

Композиции могут быть приготовлены для введения любым способом, известным специалистам в данной области, включая внутримышечный, внутривенный, внутрикожный, внутриочаговый, внутрибрюшинный,

подкожный, внутриопухолевый, эпидуральный, назальный, пероральный, вагинальный, ректальный, местный, местный, ушной, ингаляционный. буккальное (например, подъязычное) и чрескожное введение или любым подходящим путем. Также рассматриваются другие способы введения. Введение может быть местным, местным или системным, в зависимости от очага лечения. Местное введение в область, нуждающуюся в лечении, может быть достигнуто, например, но не ограничиваясь этим, путем местной инфузии во время операции, местного применения, например, в сочетании с раневой повязкой после операции, путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата.

Композиции также можно вводить с другими биологически активными агентами либо последовательно, периодически, либо в одной и той же композиции. Введение также может включать системы с контролируемым высвобождением, включая составы с контролируемым высвобождением и устройства с контролируемым высвобождением, например, с помощью насоса.

Наиболее подходящий путь в каждом конкретном случае зависит от множества факторов, таких как природа заболевания, прогрессирование заболевания, тяжесть заболевания и конкретная используемая композиция. Фармацевтические композиции могут быть составлены в виде лекарственных форм, подходящих для каждого пути введения. В частности, композиции могут быть включены в состав любых подходящих фармацевтических препаратов для системного, местного, внутрибрюшинного, перорального или прямого введения. Например, композиции могут быть приготовлены для подкожного, внутримышечного, внутриопухолевого, внутривенного или внутрикожного введения. Для уменьшения подверженности активного агента процессам деградации можно использовать способы введения, такие как иммунологическое вмешательство посредством антигенных и иммуногенных ответов.

Примеры таких способов включают местное введение в место лечения или непрерывную инфузию.

Иммуностимулирующие бактерии могут быть включены в состав подходящих фармацевтических препаратов, таких как растворы, суспензии, таблетки, диспергируемые таблетки, пилюли, капсулы, порошки, составы с замедленным высвобождением или эликсиры для перорального введения, а также трансдермальные пластыри и ингаляторы с сухим порошком. . Обычно соединения вводят в состав фармацевтических композиций с использованием методов и процедур, хорошо известных в данной области (см., например, Ansel, IntroductiontoPharmaceuticalDosageForms, FourthEdition, 1985, стр. 126). Как правило, способ приготовления зависит от пути введения. Композиции могут быть приготовлены в высушенной (лиофилизированной или другой форме витрификации) или жидкой форме. Если композиции предоставляются в высушенном виде, они могут быть обработаны перед использованием путем добавления соответствующего буфера.

3. Составы

a. Жидкости, инъекции эмульсии

Композицию обычно изготавливают в соответствии со способом введения. В настоящем документе рассматривается парентеральное введение, обычно характеризующееся инъекцией или инфузией либо подкожно, внутримышечно, внутриопухолево, внутривенно или внутрикожно. Препараты бактерий для парентерального введения включают суспензии, готовые для инъекций (прямое введение), замороженные суспензии, которые оттаивают перед использованием, сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для смешивания с ресуспендирующим раствором непосредственно перед применением, и эмульсии. Сухие термостабильные составы, такие как лиофилизированные составы, можно использовать для хранения стандартных доз для последующего использования.

Фармацевтический препарат может быть в замороженной жидкой форме, например, в виде суспензии. В случае поставки в замороженной жидкой форме лекарственный продукт может быть предоставлен в виде концентрированного препарата, который необходимо разморозить и разбавить до терапевтически эффективной концентрации перед применением.

Фармацевтические препараты также могут быть представлены в дозированной форме, которая не требует оттаивания или разбавления для применения. Такие жидкие препараты могут быть приготовлены обычными способами с фармацевтически приемлемыми добавками, в случае необходимости, такими как суспендирующие агенты (например, сорбит, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгаторы (например, лецитин или аравийская камедь); неводные носители (например, миндальное масло, масляные сложные эфиры или фракционированные растительные масла); и консерванты, подходящие для использования с микробными терапевтическими средствами. Фармацевтические препараты могут быть представлены в высушенной форме, такой как лиофилизированная или высушенная распылением, для разведения водой или другим подходящим стерильным носителем перед применением.

Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза или глицерин. Растворы могут быть как водными, так и неводными. При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер (PBS) и другие буферные растворы, используемые для внутривенной гидратации. Для внутриопухолевого введения растворы, содержащие загустители, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, масляные эмульсии и их смеси, могут быть подходящими для сохранения локализации инъекционного препарата.

Фармацевтические композиции могут включать носители или другие эксципиенты. Например, фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, могут содержать один или несколько разбавителей, адъювантов, антиадгезивов, связующих веществ, покрытий, наполнителей,

ароматизаторов, краситель(и), смазка(и), скользящее(ие) вещество(а), консервант(ы), детергент(ы) или сорбент(ы) и их комбинация, или носитель, с которым вводят модифицированные терапевтические бактерии. Например, фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгаторы, секвестрирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества.

Лекарственные формы могут включать жидкие препараты. Фармацевтические композиции могут включать носители, такие как разбавитель, адъювант, эксципиент или носитель, с которыми вводят композиции. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в «Remington'sPharmaceuticalSciences» EWMartin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения или агента, обычно в очищенной форме или частично очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло.

Вода является типичным переносчиком. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, особенно для растворов для инъекций. Композиции могут содержать наряду с активным ингредиентом: разбавитель, такой как лактоза, сахароза, дикальцийфосфат или карбоксиметилцеллюлоза; смазывающее вещество, такое как стеарат магния, стеарат кальция и тальк; и связующее, такое как крахмал, натуральные камеди, такие как аравийская камедь, желатин, глюкоза, патока, поливинилпирролидин, целлюлозы и их производные, повидон, кросповидон и другие подобные связующие, известные специалистам в данной области. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат

натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду и этанол. . Например, подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Композиция, при желании, также может содержать другие незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие подобные агенты, такие как, например, ацетат натрия, сорбитан. монолаурат, олеаттриэтаноламина и циклодекстрины.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, антимикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгаторы, секвестрирующие или хелатирующие агенты и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных носителей включают инъекцию хлорида натрия, инъекцию Рингера, инъекцию изотонической декстрозы, инъекцию стерильной воды и инъекцию декстрозы и лактатаРингера. Неводные парентеральные носители включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. К местным анестетикам относится прокаинагидрохлорид..

Суспендирующие и диспергирующие агенты включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают, например, полисорбаты, такие как Polysorbate 80 (TWEEN 80). Могут быть включены связывающие или хелатирующие агенты ионов металлов, такие как ЭДТА. Фармацевтические носители также включают полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой носителей и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH. Могут быть включены непротивомикробные консерванты.

Фармацевтические композиции также могут содержать другие незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости и другие подобные агенты, такие как, например, ацетат натрия, монолауратсорбитана, триэтаноламин. олеат и циклодекстрины. Имплантация системы медленного или замедленного высвобождения, так что поддерживается постоянный уровень дозировки (см., например, патент США № 3710795), также рассматривается в настоящем документе. Процент активного соединения, содержащегося в таких парентеральных композициях, сильно зависит от их конкретной природы, а также от активности соединения и потребностей субъекта.

b. Сухие термостабильные срставы.

Бактерии можно высушить. Сухие термостабильные составы, такие как лиофилизированные или высушенные распылением порошки и витрифицированное стекло, могут быть восстановлены для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Высушенные термостабильные составы могут быть приготовлены из любых жидких составов, таких как суспензии, описанные выше. Фармацевтические препараты могут быть представлены в лиофилизированной или витрифицированной форме для восстановления водой или другим подходящим носителем перед применением.

Термостабильный состав готовят для введения путем восстановления высушенного соединения стерильным раствором. Раствор может содержать вспомогательное вещество, улучшающее стабильность или другие фармакологические свойства активного вещества, или восстановленный раствор, приготовленный из порошка. Термостабильный состав готовят путем растворения эксципиента, такого как декстроза, сорбит, фруктоза, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкоза, сахароза или другой подходящий агент, в подходящем буфере, таком как цитрат, фосфат натрия или калия, или другой такой буфер, известный специалистам в данной области. Затем к полученной смеси добавляют лекарственное вещество и перемешивают до ее

перемешивания. Полученную смесь разливают по флаконам для сушки. Каждый флакон будет содержать разовую дозу, содержащую $1x10^5$ до $1x10^{11}$ КОЕ на флакон. После сушки флакон с продуктом запечатывается с помощью системы укупорки контейнера, которая предотвращает попадание влаги или загрязняющих веществ в запечатанный флакон. Высушенный продукт можно хранить в соответствующих условиях, таких как -20°C, 4°C или комнатная температура. Восстановление этой высушенной композиции водой или буферным раствором дает композицию для применения при парентеральном введении. Точное количество зависит от показаний к лечению и выбранного соединения. Такое количество может быть определено опытным путем.

4. Композиции для других путей введения

В зависимости от излечиваемого состояния в настоящем документе также рассматриваются другие пути введения, помимо парентерального, такие как местное применение, трансдермальные пластыри и пероральное и ректальное введение. Суспензии и порошки, описанные выше, можно вводить перорально или их можно восстанавливать для перорального введения. Фармацевтические лекарственные формы для ректального введения представляют собой ректальные суппозитории, капсулы, а также таблетки и гелевые капсулы системного действия. Ректальные суппозитории включают твердые тела для введения в прямую кишку, которые плавятся или размягчаются при температуре тела, высвобождая один или несколько фармакологически или терапевтически активных ингредиентов. Фармацевтически приемлемые вещества в ректальных суппозиториях представляют собой основания или носители и агенты для повышения температуры плавления. Примеры основ включают масло какао (масло теобромы), глицерин-желатин, карбовакс (полиоксиэтиленгликоль) и соответствующие смеси моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот. Можно использовать комбинации различных оснований. Агенты для повышения точки плавления суппозиториев включают спермацет и воск. Ректальные суппозитории можно приготовить как прессованным способом, так и

формованием. Типичный вес ректального суппозитория составляет от 2 до 3 граммов. Таблетки и капсулы для ректального введения изготавливают с использованием того же фармацевтически приемлемого вещества и теми же способами, что и составы для перорального введения.

Препараты, подходящие для ректального введения, могут быть представлены в виде суппозиториев с разовой дозой. Они могут быть приготовлены путем смешивания лекарственного вещества с одним или несколькими обычными твердыми носителями, например маслом какао, и последующего формования полученной смеси.

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

Препараты, подходящие для трансбуккального (сублингвального) введения, включают, например, пастилки, содержащие активное соединение в ароматизированной основе, обычно сахарозе и акации или трагаканте; и пастилки, содержащие соединение в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и гуммиарабик.

Смеси для местного и системного применения готовят, как описано выше. Полученные смеси могут представлять собой растворы, суспензии, эмульсии и т.п. и изготавливаются в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей,

промываний, спреев, суппозиториев, повязок. , кожные пластыри или любые другие составы, подходящие для местного применения.

Композиции могут быть приготовлены в виде аэрозолей для местного применения, например, путем ингаляции (см., например, патенты США № 4044126, 4414209 и 4364923, в которых описываются аэрозоли для доставки стероида, пригодного для лечения заболеваний легких). Эти составы для введения в дыхательные пути могут быть в форме аэрозоля или раствора для распылителя или в виде мелкодисперсного порошка для инсуффляции, отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы состава обычно имеют диаметр менее 50 микрон или менее 10 микрон.

Соединения могут быть приготовлены для местного применения, например, для местного нанесения на кожу и слизистые оболочки, например, в глаза, в виде гелей, кремов и лосьонов, а также для нанесения на глаза или для интрацистернального введения или интраспинального применения. Предполагается местное введение для трансдермальной доставки, а также для введения в глаза или на слизистую оболочку или для ингаляционной терапии. Также можно вводить назальные растворы активного соединения отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Предложены составы, подходящие для чрескожного введения. Они могут быть представлены в любом подходящем формате, таком как дискретные пластыри, приспособленные для того, чтобы оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение продолжительного периода времени. Такие пластыри содержат активное соединение в возможно забуференном водном растворе с концентрацией, например, от 0,1 до 0,2 М по отношению к активному соединению. Препараты, подходящие для чрескожного введения, также могут быть доставлены с помощью ионофореза (см., например, Tyle, P. (1986) PharmaceuticalResearch 3(6):318-326) и обычно имеют форму возможно забуференного водного раствора активного соединения.

Фармацевтические композиции также можно вводить с помощью составов с контролируемым высвобождением и/или устройств для доставки (см., например, патенты США №№ 3536809; 3598123; 3630200; 3845770; 3916899; 4008719; 4769027; 5059595; 5307354; 5 120 548; 5 591 767; 5 639 476; 5 674 533; и 5 733 566).

5. Дозировка и введение

Композиции могут быть составлены в виде фармацевтических композиций для однократного или многократного введения доз. Иммуностимулирующие бактерии могут быть включены в количестве, достаточном для оказания терапевтически полезного эффекта при отсутствии нежелательных побочных эффектов у пациента, которого лечат. Например, концентрацию фармацевтически активного соединения регулируют таким образом, чтобы инъекция обеспечивала эффективное количество для получения желаемого фармакологического эффекта. Терапевтически эффективную концентрацию можно определить эмпирически путем тестирования иммуностимулирующих бактерий в известных системах invitro и invivo, например, с использованием анализов, описанных в настоящем документе или известных в данной области. Например, можно использовать стандартные клинические методы. Для определения оптимальных диапазонов дозировок можно использовать анализы invitro и модели на животных.

Следовательно, понятно, что точная дозировка и продолжительность лечения зависят от заболевания, которое лечат, и могут быть определены эмпирически с использованием известных протоколов испытаний или путем экстраполяции данных испытаний invivo или invitro. Концентрации и значения доз также могут варьироваться в зависимости от тяжести состояния, которое необходимо облегчить. Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования должны корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным мнением лица, вводящего или контролирующего введение

композиций, и что диапазоны концентраций, указанные в настоящем документе приведены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема или применения содержащих их композиций и комбинаций. Композиции можно вводить ежечасно, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно или однократно. Как правило, режим дозирования выбирают для ограничения токсичности. Следует отметить, что лечащий врач должен знать, как и когда прекратить, прервать или скорректировать терапию для снижения дозы из-за токсичности или дисфункции костного мозга, печени или почек или других тканей. И наоборот, лечащий врач также должен знать, как и когда корректировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ не является адекватным (исключая токсические побочные эффекты).

Иммуностимулирующие бактерии включают в состав в количестве, достаточном для оказания терапевтически полезного эффекта. Например, количество является таким, при котором достигается терапевтический эффект при лечении гиперпролиферативного заболевания или состояния, такого как рак. Примерная доза может составлять примерно 1×10^{9} КОЕ/м^{2}. Как показано в таблице ниже и отмечено выше, можно вводить более высокие дозы. Приведенные ниже данные из эксперимента на мышиной модели показывают, что штаммы с модификациями генома, как описано в настоящем документе, обладают значительно улучшенной переносимостью, по меньшей мере примерно в 15 раз, по сравнению с VNP20009, и, таким образом, их можно вводить в более высоких количествах.

Название штамма	**Генотип штамма**	**LD_{50}в BALB/c**	**Ослабление**	**Улучшение против**	**Человеческий**
VNP20009	Δ*purI* +Δ*msbB*	4.4E6	~44,000	-	6.33E+08
ΔFLG	Δ*purI* + Δ*msbB*+	2.0E7	200,000	4.5	2.88E+09
Δ*pagP*	Δ*purI*+Δ*msbB*+	1.4E7	139,000	3.2	2.00E+09

Название штамма	Генотип штамма	LD_{50}в BALB/c	Ослабление	Улучшение против	Человеческий
ΔFLG/Δ*pagP*	Δ*purI*+ Δ*msbB*+ Δ*asdA* + Δ*FLG* +	>6.2E7	>620,000	>14	>8.91E+09

Фармацевтически и терапевтически активные соединения и их производные обычно составляют и вводят в виде стандартных дозированных форм или многократных дозированных форм. Каждая стандартная доза содержит предварительно определенное количество терапевтически активного соединения, достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем, наполнителем или разбавителем. Единичные лекарственные формы включают, но не ограничиваются ими, таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, парентеральные суспензии, растворы или суспензии для перорального применения и эмульсии масло-в-воде, содержащие подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых производных. Единичные дозированные формы могут содержаться во флаконах, ампулах и шприцах или в индивидуально упакованных таблетках или капсулах. Единичные дозированные формы можно вводить в виде фракций или их кратных частей. Многодозовая форма представляет собой множество идентичных стандартных дозированных форм, упакованных в один контейнер, для введения в виде отдельной стандартной дозированной формы. Примеры многодозовых форм включают флаконы, флаконы с таблетками или капсулами или флаконы с пинтами или галлонами. Следовательно, многодозовая форма представляет собой несколько стандартных доз, которые не разделены в упаковке. Как правило, могут быть приготовлены лекарственные формы или композиции, содержащие активный ингредиент в диапазоне от 0,005% до 100%, а остальное составляется из нетоксичного носителя. Фармацевтические композиции могут быть составлены в виде лекарственных форм, подходящих для каждого пути введения. или бутылки пинты или галлоны. Фармацевтические композиции могут быть составлены в виде лекарственных форм, подходящих для каждого пути введения.

Разовые дозы парентеральных препаратов расфасованы в ампулу, флакон или шприц с иглой. Объем жидкого раствора или восстановленного порошкообразного препарата, содержащего фармацевтически активное соединение, зависит от заболевания, подлежащего лечению, и конкретного изделия, выбранного для упаковки. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными, как это известно и практикуется в данной области.

Как указано, композиции, представленные в настоящем документе, могут быть приготовлены для любого пути, известного специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутрикожный, внутриочаговый, внутрибрюшинный, эпидуральный, вагинальный, ректальный, местный, ушной, или чрескожное введение, или любой способ введения. Композиции, подходящие для таких путей, известны специалистам в данной области. Композиции также можно вводить с другими биологически активными агентами либо последовательно, периодически, либо в одной и той же композиции.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью составов с контролируемым высвобождением и/или устройств для доставки (см., например, патенты США № 3536809; 3 598 123; 3 630 200; 3 845 770; 3 847 770; 3 916 899; 4 008 719; 4 687 660; 4 769 027; 5 059 595; 5 073 543; 5 120 548; 5 354 556; 5 591 767; 5 639 476; 5 674 533; и 5 733 566). Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения выбранных композиций, их применение предполагается здесь, и такие частицы можно легко изготовить.

6. Упаковка и изделия производства

Также предусмотрены промышленные изделия, содержащие упаковочные материалы, любую фармацевтическую композицию,

представленную в настоящем документе, и этикетку, указывающую, что композиции должны использоваться для лечения заболеваний или состояний, как описано здесь. Например, на этикетке может быть указано, что проводится лечение опухоли или рака.

Комбинации иммуностимулирующих бактерий, описанных в настоящем документе, и другого терапевтического агента также могут быть упакованы в промышленное изделие. В одном примере изделие производства содержит фармацевтическую композицию, содержащую композицию иммуностимулирующих бактерий, и не содержит дополнительного агента или лечения. В других примерах изделие производства содержит другое дополнительное терапевтическое средство, такое как другое противораковое средство. В этом примере агенты могут поставляться вместе или по отдельности для упаковки в виде готовых изделий.

Представленные здесь изделия содержат упаковочные материалы. Упаковочные материалы для использования в упаковке фармацевтических продуктов хорошо известны специалистам в данной области. См., например, патенты США №№ 5323907, 5052558 и 5033252, каждый из которых полностью включен в настоящее описание. Примеры фармацевтических упаковочных материалов включают, но не ограничиваются ими, блистерные упаковки, флаконы, тюбики, ингаляторы, помпы, пакеты, флаконы, контейнеры, шприцы, флаконы и любой упаковочный материал, подходящий для выбранного состава и предполагаемого способа введения и лечения. . Примерами готовых изделий являются контейнеры, в том числе однокамерные и двухкамерные контейнеры. Контейнеры включают, но не ограничиваются ими, пробирки, флаконы и шприцы. Контейнеры могут дополнительно включать иглу для внутривенного введения.

Выбор упаковки зависит от агентов и от того, будут ли такие композиции упакованы вместе или по отдельности. Как правило, упаковка не вступает в реакцию с содержащимися в ней композициями. В других примерах некоторые компоненты могут быть упакованы в виде смеси. В других примерах все

компоненты упакованы отдельно. Так, например, компоненты могут быть упакованы в виде отдельных композиций, которые после смешивания непосредственно перед введением можно вводить вместе непосредственно.

В качестве альтернативы компоненты могут быть упакованы в виде отдельных композиций для раздельного введения.

Выбранные композиции, включая изделия из них, также могут быть предоставлены в виде наборов. Наборы могут включать фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и предмет для введения, поставляемый в виде готового изделия. Композиции могут содержаться в изделии для введения или могут поставляться отдельно для последующего добавления. Набор может включать инструкции по применению, включая дозировки, режимы дозирования и инструкции по способам введения. Наборы также могут включать описанную здесь фармацевтическую композицию и предмет для диагностики.

G. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

Предложенные здесь способы включают способы введения или использования иммуностимулирующих бактерий для лечения субъектов, страдающих заболеванием или состоянием, симптомы которого могут быть улучшены или ослаблены введением таких бактерий, например раком. В конкретных примерах заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак.

Кроме того, также предусмотрены способы комбинированной терапии с одним или несколькими дополнительными агентами для лечения, такими как противораковый агент или антигиалуронановый агент. Бактерии можно вводить любым подходящим способом, включая, но не ограничиваясь этим, парентеральный, системный, местный, такой как внутриопухолевый, внутривенный, ректальный, пероральный, внутримышечный, через слизистую оболочку и другие пути. Благодаря модификациям бактерий, описанных здесь, решаются проблемы, связанные с системным введением. Предложены составы,

подходящие для каждого пути введения. Квалифицированный специалист может установить подходящие схемы и дозы и может выбрать пути введения.

1. Диагностика для отбора пациентов для лечения и мониторинга лечения

a. Отбор пациентов

Биомаркеры можно использовать для выявления пациентов, которые, вероятно, ответят на терапию иммуностимулирующими бактериями, предложенными в настоящем документе. Например, аденозиновая сигнатура и миелоидная сигнатура могут быть оценены с помощью панелей экспрессии генов NanoString, а Т-клеточная инфильтрация опухолей может быть оценена с помощью теста Immunoscore®, который представляет собой диагностический тест invitro, используемый для прогнозирования риска рецидива в пациентов с раком толстой кишки на ранней стадии путем измерения иммунного ответа хозяина в месте опухоли. Пациенты, у которых опухоли или биологические жидкости указывают на иммунную реактивность или иммунный ответ, с большей вероятностью будут реагировать на лечение иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе.

Другие биомаркеры включают инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), CD73, CD39, TNAP (тканеспецифическая щелочная фосфатаза), CD38, CD68, PD-L1 и FoxP3. Например, опухоли, которые можно лечить иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе, исключают Т-клетки, демонстрируют высокие уровни пуринов/аденозина и не реагируют на таргетную терапию PD-1/PD-L1.

Профили экспрессии генов (GEP), которые можно определить с помощью различных панелей экспрессии генов NanoString, можно анализировать, например, для выявления «аденозиновой сигнатуры» опухолей. Высокие концентрации аденозина обнаружены в некоторых опухолях, включая колоректальную карциному (CRC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) и рак поджелудочной железы, среди прочих. Пациенты с опухолями, которые

обнаруживают высокие концентрации пуринов/аденозина, скорее всего, будут реагировать на терапию, поскольку иммуностимулирующие бактерии здесь накапливаются и размножаются в богатом пуринами/аденозином микроокружении опухоли. Таким образом, выявление опухолей, экспрессирующих «аденозиновую сигнатуру», можно использовать для прогнозирования реакции пациента на терапию.

Кроме того, иммуностимулирующие бактерии предпочтительно накапливаются в резидентных опухолевых миелоидных клетках и инфицируют их. Таким образом, «миелоидную сигнатуру» также можно использовать для прогнозирования реакции пациента на терапию иммуностимулирующими бактериями. Например, было показано, что «аденозиновая сигнатура» почти идентична «миелоидной сигнатуре», которая связана с плохим ответом на монотерапиюатезолизумабом (анти-PD-L1) у пациентов с почечно-клеточным раком (ПКР), что является показательным. роли аденозина в ускользании опухоли от анти-PD-L1-терапии (см., например, McDermottetal. (2018) NatureMedicine 24:749-757). Имеются опухоле-миелоидные и опухоле-аденозиновые сигнатурные панели NanoString, которые можно использовать для отбора пациентов.

Макрофаги ограничивают инфильтрацию Т-клеток в твердые опухоли и подавляют их функцию, например, при тройном негативном раке молочной железы (см., например, Kerenetal. (2018) Cell 174:1373-1387). При некоторых видах рака, таких как CRC, макрофаги доминируют во внутриопухолевой иммунной популяции и способствуют исключению Т-клеток, и в результате макрофаги, ассоциированные с опухолью, связаны с неблагоприятным прогнозом при CRC (см., например, Bindeaetal. (2013) Immunity). 39:782-795). Immunoscore®, метод оценки прогноза онкологических больных, основанный на иммунных клетках, которые инфильтрируют опухоль и окружают ее, может использоваться для измерения исключения Т-клеток или инфильтрации Т-клеток.

Immunoscore® включает эффекты иммунного ответа хозяина в классификацию рака и повышает точность прогноза. Он измеряет плотность двух популяций Т-лимфоцитов (CD3/CD8, CD3/CD45RO или CD8/CD45RO) в центре и на периферии опухоли, и дает оценку от 0 (I0), когда низкие плотности обоих типов клеток обнаруживаются в обеих областях, до Immunoscore 4 (I4), когда высокие плотности обнаруживаются в обеих областях. Низкая инфильтрация Т-лимфоцитов приводит к низкому Immunoscore®, который коррелирует с высоким риском, в то время как высокая инфильтрация Т-лимфоцитов приводит к высокому Immunoscore®, который коррелирует с низким риском.

Immunoscore®, таким образом, может быть оценен как предполагаемый биомаркер для выявления пациентов, которые будут реагировать на терапию иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе. Например, можно лечить опухоли с низким содержанием Т-клеток/невоспаленные опухоли, поскольку предусмотренные здесь иммуностимулирующие бактерии индуцируют инфильтрацию Т-клеток в холодных опухолях. Такие опухоли представляют собой популяцию с высокой неудовлетворенной потребностью, которая невосприимчива к ингибированию контрольных точек.

Внеклеточный аденозин продуцируется последовательной активностью ассоциированных с мембраной эктоферментовCD39 (экто-нуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1, или NTPDase1) и CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), которые экспрессируются на опухолевых стромальных клетках, вместе продуцирующих аденозин путем фосфогидролиза АТФ или АДФ, который вырабатывается из мертвых или умирающих клеток. CD39 превращает внеклеточный АТФ (или АДФ) в 5'-АМФ, который с помощью CD73 превращается в аденозин. Экспрессия CD39 и CD73 на эндотелиальных клетках увеличивается в условиях гипоксии микроокружения опухоли, что приводит к повышению уровня аденозина. Таким образом, CD39 и CD73 можно использовать в качестве биомаркеров, указывающих на богатые аденозином

опухоли, на которые можно воздействовать иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе.

CD38, также известный как циклическая АДФ-рибозогидролаза, представляет собой гликопротеин, который находится на поверхности многих иммунных клеток, включая $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$Т-клетки, В-лимфоциты и естественные клетки-киллеры. Потеря CD38, который является маркером клеточной активации, связана с нарушением иммунного ответа и связана с лейкозами, миеломами и солидными опухолями. Кроме того, повышенная экспрессия CD38 является неблагоприятным диагностическим маркером при хроническом лимфоцитарном лейкозе и связана с усилением прогрессирования заболевания. CD38 также используется в качестве мишени для даратумумаба (Darzalex®), который был одобрен для лечения множественной миеломы. CD68 в высокой степени экспрессируется моноцитами, циркулирующими макрофагами и тканевыми макрофагами (например, клетками Купфера, микроглией). FoxP3 участвует в реакциях иммунной системы и действует как регулятор развития и функционирования регуляторных Т-клеток (или Treg), обладающих иммуносупрессивным действием. При раке избыток регуляторной активности Т-клеток может помешать иммунной системе уничтожить раковые клетки. Таким образом, CD38, CD68 и FoxP3 также можно использовать в качестве биомаркеров для отбора пациентов, которые, вероятно, ответят на терапию иммуностимулирующими бактериями, описанными в настоящем документе.

b. Диагностика для оценки или обнаружения активности иммуностимулирующих бактерий свидетельствует об эффективности лечения

Биомаркеры можно использовать для мониторинга иммуностимулирующих бактерий после лечения. Биомаркеры встречаются в образцах опухолей и/или в образцах жидкостей организма, таких как кровь, плазма, моча, слюна и другие жидкости. Валидированныебиомаркеры периферической крови используются

для оценки иммунного статуса пациентов до и во время лечения, для определения изменений иммунного статуса, коррелирующих с эффективностью лечения. Изменение или усиление статуса противоопухолевого иммунного ответа указывает на то, что лечение иммуностимулирующими бактериями дает эффект.

Иммуномодулирующую активность иммуностимулирующих бактерий, предложенных в настоящем документе, можно оценить, например, в исследованиях увеличения и увеличения дозы. Исследование биомаркеров выявляет прогностические факторы, относящиеся к состоянию заболевания (например, опухоли) и его лечению, что может помочь в мониторинге лечения. Например, оценка микроокружения опухоли дает представление о механизме ответа опухоли на иммунотерапию. Сывороточные биомаркеры для выявления иммуномодулирующей активности иммуностимулирующих бактерий включают, но не ограничиваются ими, CXCL10 (IP-10), CXCL9, интерферон-β, интерферон-γ, провоспалительные сывороточные цитокины (например, IL-6, TNF-α, MCP). -1/CCL1) и белок, связывающий IL-18.

CXCL10 и CXCL9 представляют собой хемокины, которые необходимы для активации $CD8^+$ Т-клеток и доставки их в опухоли, например, в ответ на иммунотерапию. В фазе 3 исследования ниволумаба, ингибитора иммунных контрольных точек анти-PD-1, для лечения ранее леченных пациентов с метастатической почечно-клеточной карциномой (мRCC), иммунные фармакодинамические эффекты, характерные для большинства пациентов, независимо от дозы введены, были идентифицированы. Оценку регулируемых IFN-γ сывороточных хемокиновCXCL9 и CXCL10 проводили с использованием мультиплексной панели на основе технологии Luminex (Myriad® Rules-BasedMedicine (RBM)) и результаты показали, что повышенные уровни CXCL9 и CXCL10 в сыворотке, а также повышенная транскрипция в опухоли коррелируют с клиническим ответом.Среднее повышение уровней хемокинов после лечения ниволумабом по сравнению с исходным уровнем составило 101% для CXCL9 и 37% для CXCL10 в периферической крови (см., например,

Choueirietal. (2016) Clin. CancerRes.22(22):5461- 5471). Кроме того, лечение пациентов с прогрессирующими солидными опухолями или лимфомами агонистом MK-1454 STING (Merck) приводило к дозозависимому увеличению уровня CXCL10 в сыворотке после внутриопухолевого введения (см., напр., Harringtonetal. ESMOAnnualMeeting (2018).

Дозозависимое повышение уровня IFN-β в сыворотке наблюдалось после внутриопухолевого введения агониста STINGADU-S100 (Aduro) (см., например, Meric-Bernstametal. ASCOAnnualMeeting (2019)). Кроме того, внутривенное введение VNP20009 индуцирует зависимое от дозы увеличение уровня в сыворотке провоспалительных цитокинов IL-6, TNF-α, IL-1β, и IL-12 (см., напр., Tosoetal. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(1):142-152).

IL-18 участвует в защитных иммунных реакциях на внутриклеточные бактерии, грибы и вирусы и продемонстрировал противоопухолевую активность на доклинических моделях рака легких, рака молочной железы, саркомы и меланомы. Биологическая активность IL-18 модулируется в петле отрицательной обратной связи белком, связывающим IL-18 (IL-18BP), индуцируемым через IFN-γ. Таким образом, уровни IL-18BP в сыворотке крови являются предикторами клинической активности IFN-γ. Внутривенное введение рекомбинантного человеческого IL-18 (rhIL-18) пациентам с распространенным раком приводило к дозозависимому увеличению концентрации связывающего IL-18 белка в сыворотке крови, а также к увеличению IFN-γ, GM-CSF, и растворимоголигандаFas (см., например, Robertsonetal. (2006) Clin. CancerRes.12(14):4265-4273).

Кроме того, было обнаружено, что уровни IL-18BP в моче и сыворотке коррелируют со статусом опухоли у пациентов с раком предстательной железы; между пациентами с раком предстательной железы и без него были обнаружены значительные различия в уровнях IL-18BP в моче, а повышенные уровни IL-18BP в сыворотке коррелировали с увеличением балла по шкале Глисона для рака предстательной железы, демонстрируя, что повышенная секреция IL-18BP клетками рака предстательной железы может

свидетельствовать о попытке рака избежать иммунного надзора (см., например, Fujitaetal. (2011) Int. J. Cancer 129(2):424-432). Таким образом, IL-18BP можно использовать в качестве биомаркера иммунных ответов опухоли.

2. Опухоли

Иммуностимулирующие бактерии, комбинации, применения и способы, представленные в настоящем документе, применимы для лечения всех типов опухолей, включая рак, в частности солидные опухоли, включая рак легких, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак головы и шеи, рак яичников, рак печени, рак поджелудочной железы, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак и рак предстательной железы. Способы также могут быть использованы для лечения гематологического рака.

Опухоли и раковые заболевания, подлежащие лечению иммуностимулирующими бактериями, композициями, комбинациями, применениями и способами, представленными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, те, которые возникают в иммунной системе, скелетной системе, мышцах и сердце, молочной железе, поджелудочной железе, желудочно-кишечном тракте,органах таких как центральная и периферическая нервная система, почечная система, репродуктивная система, дыхательная система, кожа, системы соединительной ткани, включая суставы, жировые ткани, и система кровообращения, включая стенки кровеносных сосудов. Примеры опухолей, которые можно лечить иммуностимулирующими бактериями по настоящему изобретению, включают карциному, глиому, саркому (включая липосаркому), аденокарциному, аденосаркому и аденому. Такие опухоли могут возникать практически во всех частях тела, включая, например, молочную железу, сердце, легкие, тонкую кишку, толстую кишку, селезенку, почки.

Опухоли костной системы включают, например, саркомы и бластомы, такие как остеосаркома, хондросаркома и хондробластома. Опухоли мышц и сердца включают опухоли как скелетных, так и гладких мышц, например, лейомиомы

(доброкачественные опухоли гладких мышц), лейомиосаркомы, рабдомиомы (доброкачественные опухоли скелетных мышц), рабдомиосаркомы и саркомы сердца. Опухоли желудочно-кишечного тракта включают, например, опухоли рта, пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки и колоректальные опухоли, а также опухоли желудочно-кишечных секреторных органов, таких как слюнные железы, печень, поджелудочная железа и желчевыводящие пути.
тракт. Опухоли центральной нервной системы (ЦНС) включают опухоли головного мозга, сетчатки и спинного мозга, а также могут возникать в ассоциированной соединительной ткани, костях, кровеносных сосудах или нервной ткани. Также рассматривается лечение опухолей периферической нервной системы. Опухоли периферической нервной системы включают злокачественные опухоли оболочек периферических нервов. К опухолям почечной системы относятся опухоли почек, например, почечно-клеточная карцинома, а также опухоли мочеточников и мочевого пузыря.

Опухоли репродуктивной системы включают опухоли шейки матки, матки, яичников, предстательной железы, яичек и связанных с ними секреторных желез. Опухоли иммунной системы включают как гемобластозы, так и солидные опухоли, включая лимфомы, например как лимфомы Ходжкина, так и неходжкинские лимфомы. К опухолям дыхательной системы относятся опухоли носовых ходов, бронхов и легких. Опухоли молочной железы включают, например, как лобулярную, так и протоковую карциному.

Другие примеры опухолей, которые можно лечить с помощью иммуностимулирующих бактерий и способов, представленных в настоящем документе, включают саркому Капоши, новообразования ЦНС, нейробластомы, капиллярные гемангиобластомы, менингиомы и метастазы в головной мозг, меланому, желудочно-кишечные и почечные карциномы и саркомы, рабдомиосаркому, глиобластому (такую как мультиформнаяглиобластома).) и лейомиосаркома. Примеры других видов рака, которые можно лечить согласно настоящему описанию, включают, но не ограничиваются ими, лимфому, бластому, нейроэндокринные опухоли, мезотелиому, шванному, менингиому, меланому и лейкемию или лимфоидные злокачественные

новообразования. Примеры таких видов рака включают гематологические злокачественные новообразования, такие как лимфома Ходжкина, неходжкинские лимфомы (лимфома Беркитта, малая лимфоцитарная лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз, грибовидный микоз, мантийно-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, лимфома маргинальной зоны, волосатоклеточный лейкоз и лимфоплазмоцитарный лейкоз), опухоли клеток-предшественников лимфоцитов, включая В-клеточный острый лимфобластный лейкоз/лимфому и Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз/лимфому, тимому, опухоли зрелых Т- и NK-клеток, включая периферические Т-клеточные лейкозы, взрослые Т-клеточные лейкозы/Т-клеточные лимфомы и крупный гранулярный лимфоцитарный лейкоз, лангергансоклеточныйгистиоцитоз, миелоидные неоплазии, такие как острые миелогенные лейкозы, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) с созреванием, ОМЛ без дифференцировки, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз и острый моноцитарный лейкоз, миелодиспластические синдромы и хронические миелопролиферативные заболевания, включая хронический миелогенный лейкоз; опухоли центральной нервной системы, такие как глиома, глиобластома, нейробластома, астроцитома, медуллобластома, эпендимома и ретинобластома; солидные опухоли головы и шеи (например, рак носоглотки, рак слюнных желез и рак пищевода), легких (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого и плоскоклеточный рак легкого), пищеварительной системы (например, рак желудка или желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак желчных протоков или желчных путей, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак и карциному анального канала), репродуктивной системы (например, яичек, полового члена, предстательной железы, рак матки, влагалища, вульвы, шейки матки, яичников и эндометрия), кожи (например, меланома, базально-клеточная карцинома, плоскоклеточный рак, актинический кератоз и меланома кожи), печени (например, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, и гепатома), кости (например, остеокластома), других тканей и органов.

3. Введение

При практическом применении и способах, описанных в настоящем документе, иммуностимулирующие бактерии, предложенные в настоящем документе, можно вводить субъекту, включая субъекта, имеющего опухоль или неопластические клетки, или субъекта, подлежащего иммунизации. Одна или несколько стадий могут быть выполнены до, одновременно с или после введения иммуностимулирующих бактерий субъекту, включая, помимо прочего, диагностику состояния субъекта, подходящего для введения иммуностимулирующих бактерий, определение иммунокомпетентности субъекта, иммунизация субъекта, лечение субъекта химиотерапевтическим средством, лечение субъекта облучением или хирургическое лечение субъекта.

Для вариантов осуществления, которые включают введение иммуностимулирующих бактерий субъекту-носителю опухоли в терапевтических целях, у субъекта обычно ранее было диагностировано неопластическое состояние. Способы диагностики также могут включать определение типа неопластического состояния, определение стадии неопластического состояния, определение размера одной или нескольких опухолей у субъекта, определение наличия или отсутствия метастатических или неопластических клеток в лимфатических узлах субъекта, или определение наличия метастазов у субъекта.

Некоторые варианты осуществления терапевтических способов введения иммуностимулирующих бактерий субъекту могут включать стадию определения размера первичной опухоли или стадии неопластического заболевания, и, если размер первичной опухоли равен пороговому объему или превышает его или если стадия неопластического заболевания находится на пороговой стадии или превышает ее, субъекту вводят иммуностимулирующие бактерии. В подобном варианте осуществления, если размер первичной опухоли ниже порогового объема или если стадия неопластического заболевания

находится на пороговой стадии или ниже, иммуностимулирующая бактерия еще не вводится субъекту; такие способы могут включать наблюдение за субъектом до тех пор, пока размер опухоли или стадия неопластического заболевания не достигнет порогового значения, а затем введение субъекту иммуностимулирующей бактерии. Величина порога может варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая скорость роста опухоли, способность иммуностимулирующей бактерии инфицировать опухоль и иммунокомпетентность субъекта. Как правило, пороговым размером будет размер, достаточный для накопления и размножения иммуностимулирующей бактерии в опухоли или рядом с ней без полного удаления иммунной системой хозяина, а также, как правило, размер, достаточный для поддержания бактериальной инфекции в течение некоторого времени достаточно долгого для того, чтобы у хозяина развился иммунный ответ против опухолевых клеток, обычно около одной недели или более, около десяти дней или более или около двух недель или более. Примеры пороговых стадий представляют собой любую стадию после самой низкой стадии (например, Стадия I или ее эквивалент) или любую стадию, при которой первичная опухоль превышает пороговый размер,

Можно использовать любой способ введения микроорганизма субъекту при условии, что способ введения позволяет иммуностимулирующим бактериям проникнуть в опухоль или метастаз. Способы введения могут включать, помимо прочего, внутривенный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, местный, внутриопухолевый, множественный прокол, ингаляцию, интраназальный, пероральный, внутриполостной (например, введение в мочевой пузырь через катетер или введение в кишечник с помощью суппозиториев или клизм), оральное, ректальное и глазное введение.

Специалист в данной области может выбрать любой способ введения, совместимый с субъектом и бактериями, который также может привести к тому, что бактерии достигнут опухолей и/или метастазов. Способ введения может быть выбран специалистом в данной области в соответствии с любым из множества факторов, включая природу заболевания, вид опухоли и конкретные бактерии, содержащиеся в фармацевтической композиции. Введение может

быть выполнено, например, с помощью баллистической доставки, или в виде коллоидной дисперсионной системы, или системное введение можно осуществлять путем инъекции в артерию.

Режим дозирования может быть любым из множества способов и доз и может быть определен специалистом в данной области в соответствии с известными клиническими факторами. Однократная доза может быть терапевтически эффективной для лечения заболевания или расстройства, при котором иммунная стимуляция влияет на лечение. Примером такой стимуляции является иммунный ответ, который включает, помимо прочего, один или оба из специфического иммунного ответа и неспецифического иммунного ответа, как специфические, так и неспецифические ответы, врожденный ответ, первичный иммунный ответ, адаптивный иммунитет вторичный иммунный ответ, иммунный ответ памяти, активация иммунных клеток, пролиферация иммунных клеток, дифференцировка иммунных клеток и экспрессия цитокинов.

Как известно в области медицины, дозы для субъекта могут зависеть от многих факторов, включая вид субъекта, размер, площадь поверхности тела, возраст, пол, иммунокомпетентность и общее состояние здоровья, конкретные бактерии, которые необходимо вводить, продолжительность и способ введения. введения, вид и стадия заболевания, например размер опухоли, и другие соединения, такие как лекарственные средства, которые вводятся одновременно. В дополнение к вышеупомянутым факторам на такие уровни может влиять инфекционность бактерий и природа бактерий, что может быть определено специалистом в данной области. В настоящих способах соответствующие минимальные уровни дозировки бактерий могут быть уровнями, достаточными для выживания, роста и размножения бактерий в опухоли или метастазах.Минимум на 65 кг веса может быть 5 x 10^6колониеобразующих единиц (КОЕ), по меньшей мере примерно 1×10^7 КОЕ, по меньшей мере примерно 5×10^7 КОЕ, по меньшей мере примерно 1×10^8 КОЕ или по меньшей мере примерно 1×10^9 КОЕ. В настоящих способах соответствующие максимальные уровни дозировки бактерий могут быть уровнями, которые не являются токсичными для хозяина, уровнями, которые не вызывают

спленомегалию в 3 раза или более, или уровнями, которые не приводят к образованию колоний или бляшек в нормальных тканях или органах примерно через 1 день, или примерно через 3 дня, или примерно через 7 дней. Примерные максимальные уровни для введения бактерии человеку весом 65 кг могут включать не более примерно 5×10^{11} КОЕ, не более примерно 1×10^{11} КОЕ, не более примерно 5×10^{10}КОЕ, не более примерно 1×10^{10} КОЕ или не более примерно 1×10^{9} КОЕ.

Способы и применения, представленные в настоящем документе, могут включать однократное введение иммуностимулирующих бактерий субъекту или многократное введение иммуностимулирующих бактерий субъекту или другие различные схемы, включая комбинированную терапию с другими противоопухолевыми терапевтическими средствами и/или методами лечения. К ним относятся, например, клеточная терапия, такая как введение модифицированных иммунных клеток; CAR-T-терапия; CRISPR-терапия; ингибиторы контрольных точек, такие как антитела (например, антитела к PD-1, антитела к PD-L1 и антитела к CTLA-4 и другие подобные иммунотерапевтические средства); химиотерапевтические соединения, такие как аналоги нуклеозидов; операция; и радиотерапия. Другие средства для лечения рака также включают антитела против VEGF, против VEGFR, против VEGFR2, против TGF-β или против IL-6 или их фрагменты, противораковые вакцины и онколитические вирусы.

В некоторых вариантах осуществления однократного введения достаточно для установления иммуностимулирующих бактерий в опухоли, где бактерии могут колонизироваться и вызывать или усиливать противоопухолевый ответ у субъекта. В других вариантах осуществления иммуностимулирующие бактерии, предусмотренные для применения в способах, описанных в настоящем документе, можно вводить в различных случаях, разделенных во времени, как правило, по меньшей мере на один день. Отдельные введения могут увеличить вероятность доставки бактерии к опухоли или метастазу, когда предыдущее введение могло быть неэффективным для доставки бактерии к опухоли или метастазу. В некоторых вариантах осуществления отдельные введения могут

увеличивать участки опухоли или метастазы, где может происходить бактериальная колонизация/пролиферация, или могут иным образом повышать титр бактерий, накопленных в опухоли.

Когда осуществляют раздельные введения, каждое введение может представлять собой дозу, которая является одинаковой или отличной от других дозировок для введения. В одном варианте осуществления все дозы для введения одинаковы. В других вариантах осуществления первая дозировка может быть большей дозировкой, чем одна или несколько последующих дозировок, например, по меньшей мере в 10 раз больше, по меньшей мере в 100 раз больше или по меньшей мере в 1000 раз больше, чем последующие дозы дозировки. В одном примере способа раздельного введения, в котором первое количество дозы больше, чем одно или несколько последующих дозировок, все последующие дозы могут быть одинаковыми, меньшими количествами по сравнению с первым введением.

Отдельные введения могут включать любое количество из двух или более введений, включая два, три, четыре, пять или шесть введений. Специалист в данной области может легко определить количество введений, которое необходимо выполнить, или желательность выполнения одного или нескольких дополнительных введений, в соответствии со способами, известными в данной области для мониторинга терапевтических методов, и другими способами мониторинга, представленными в настоящем документе. Соответственно, способы, представленные в настоящем документе, включают способы предоставления субъекту одного или нескольких введений иммуностимулирующих бактерий, где количество введений может быть определено путем наблюдения за субъектом и, на основе результатов наблюдения, определения того, следует ли предоставлять или нет. одну или несколько дополнительных введений.

Период времени между введениями может быть любым из множества периодов времени. Период времени между введениями может быть функцией любого из множества факторов, включая этапы мониторинга, как описано в отношении

количества введений, периода времени, в течение которого у субъекта может развиться иммунный ответ, периода времени, в течение которого субъект может удалять бактерий из нормальной ткани или период времени для бактериальной колонизации/пролиферации в опухоли или метастазировании. В одном примере период времени может быть функцией периода времени, в течение которого у субъекта разовьется иммунный ответ; например, период времени может быть больше, чем период времени, в течение которого у субъекта разовьется иммунный ответ, например, более примерно одной недели, более примерно десяти дней, более примерно двух недель или более примерно месяца. В другом примере период времени может быть меньше, чем период времени, в течение которого у субъекта разовьется иммунный ответ, например, менее примерно одной недели, менее примерно десяти дней, менее примерно двух недель или менее примерно месяца. В другом примере период времени может быть функцией периода времени колонизации/пролиферации бактерий в опухоли или метастазировании; например, период времени может быть больше, чем время появления обнаруживаемого сигнала в опухоли или метастазе после введения микроорганизма, экспрессирующего обнаруживаемый маркер, например, примерно 3 дня, примерно 5 дней, примерно неделя, примерно десять дней, около двух недель или около месяца. период времени может быть функцией периода времени для бактериальной колонизации/пролиферации опухоли или метастазирования; например, период времени может быть больше, чем время появления обнаруживаемого сигнала в опухоли или метастазе после введения микроорганизма, экспрессирующего обнаруживаемый маркер, например, примерно 3 дня, примерно 5 дней, примерно неделя, примерно десять дней, около двух недель или около месяца. Период времени может быть функцией периода времени для бактериальной колонизации/пролиферации опухоли или метастазирования; например, период времени может быть больше, чем время появления обнаруживаемого сигнала в опухоли или метастазе после введения микроорганизма, экспрессирующего обнаруживаемый маркер, например, примерно 3 дня, примерно 5 дней, примерно неделя, примерно десять дней, около двух недель или около месяца.

Способы, используемые в настоящем документе, также могут быть осуществлены путем введения композиций, таких как суспензии и другие составы, содержащие иммуностимулирующие бактерии, представленные в настоящем документе. Такие композиции содержат бактерии и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель, как предусмотрено в настоящем документе или известно специалистам в данной области.

Как обсуждалось выше, применения и способы, предусмотренные в настоящем документе, также могут включать введение субъекту одного или нескольких терапевтических соединений, таких как противоопухолевые соединения или другие противораковые терапевтические средства, в дополнение к введению субъекту иммуностимулирующих бактерий. Терапевтические соединения могут действовать независимо или в сочетании с иммуностимулирующими бактериями для терапевтического воздействия на опухоль. Терапевтические соединения, которые могут действовать независимо, включают любое из множества известных химиотерапевтических соединений, которые могут ингибировать рост опухоли, ингибировать рост и/или образование метастазов, уменьшать размер опухоли или метастазов или устранять опухоль или метастазы без снижения способности иммуностимулирующих бактерий накапливаться в опухоли, размножаться в опухоли и вызывать или усиливать противоопухолевый иммунный ответ у субъекта. Примеры таких химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими, алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан и тестолактон; средства против надпочечников, такие как аминоглютетимид, митотан и трилостан; антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; антибиотики, такие как аклациномицин, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицин, кактиномицин, калихеамицин, каррубицин, карминомицин, карзинофиллин, хромомицин, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины,

микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфиромицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (Fareston®); антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин и триметрексат; азиридины, такие как бензодепа, карбохон, метуредепа и уредепа; этиленимины и метилмеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилолмеламин; восполнители фолиевой кислоты, такие как фолиновая кислота; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; белки, такие как аргининдеиминаза и аспарагиназа; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин и 5-ФУ; таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел, и их альбуминированные формы (т.е. наб-паклитаксел и наб-доцетаксел); ингибиторы топоизомеразы, такие как RFS-2000; ингибиторы тимидилатсинтазы, такие как Tomudex®; и дополнительные химиотерапевтические средства, включая ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бесстрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефосфамид; демекол цин; диазиквон; дифторметилорнитин (ДФМО); эфлорнитин; ацетат эллиптиния; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; м опидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая

кислота; 2-
этилгидразид; прокарбазин; ПСК®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуа зоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-
трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронито
5 л; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-
С»); циклофосфамид; тиотепа; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-
тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; этопозид (ВП-
16); ифосфамид; митомицин
С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; Навельбин;
10 новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; Кселода®; ибандронат; CPT-
11; ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и ингибиторы топоизомеразы, такие как иринотекан. Фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных также могут быть использованы.

15 Терапевтические соединения, которые действуют в сочетании с иммуностимулирующими бактериями, включают, например, соединения, которые усиливают иммунный ответ, вызывая свойства бактерий, например, за счет увеличения экспрессии закодированных терапевтических продуктов, таких как цитокины, хемокины, костимулирующие молекулы, белки, которые
20 конститутивно индуцируют IFN типа I, молекулы РНК-интерференции, которые ингибируют, подавляют или нарушают экспрессию гена(ов) контрольной точки, антитела-ингибитора контрольной точки и антитела или их фрагменты против других мишеней, или соединения, которые могут дополнительно усиливать бактериальную колонизацию/пролиферацию. Например, соединение,
25 изменяющее экспрессию гена, может индуцировать или усиливать транскрипцию гена в бактерии, такого как экзогенный ген, закодированный на плазмиде, вызывая тем самым иммунный ответ. Любое из большого разнообразия соединений, которые могут изменять экспрессию генов, известно в данной области, включая IPTG и RU486. Типичные гены, экспрессия которых
30 может повышаться, включают гены, кодирующие белки и молекулы РНК, включая токсины, ферменты, которые могут превращать пролекарство в

противоопухолевое лекарство, цитокины, белки, регулирующие транскрипцию, shRNA, siRNA и рибозимы. В других вариантах осуществления терапевтические соединения, которые могут действовать вместе с иммуностимулирующими бактериями для усиления свойств бактерий, вызывающих колонизацию/пролиферацию или иммунный ответ, представляют собой соединения, которые могут взаимодействовать с кодируемым бактериями генным продуктом, и такое взаимодействие может приводить к повышенному уничтожению опухолевых клеток или повышенному противоопухолевому иммунному ответу у субъекта. Терапевтическое соединение, которое может взаимодействовать с продуктом гена, кодируемым бактериями, может включать, например, пролекарство или другое соединение, обладающее незначительной токсичностью или не обладающее другой биологической активностью в форме, которую вводит субъект, но после взаимодействия с продуктом, кодируемым бактериями. генный продукт, соединение может проявлять свойство, которое приводит к гибели опухолевых клеток, включая, но не ограничиваясь этим, цитотоксичность, способность индуцировать апоптоз или способность запускать иммунный ответ. Вданнойобластиизвестныразличныепролекарственныевещества, втомчислеганцикловир, 5-фторурацил, 6-метилпуриндезоксирибозид, цефалоспорин-доксорубицин, 4-[(2-хлорэтил)(2-месулоксиэтил)амино]бензоил-L-глутаминоваякислота, ацетаминофен, индол-3-уксуснаякислота, CB1954, 7-этил-10-[4-(1-пиперидино)-1-пиперидино]карбонилоксикамптотецин,бис-(2-хлорэтил)амино-4-гидроксифениламинометанон 28, 1-хлорметил-5-гидрокси-1,2-дигидро-3H-бенз[e]индол, эпирубицин-глюкуронид, 5'-деокси5-фтороуридни, цитозинарабинозид, илунамарин.

4. Мониторинг

Предлагаемые здесь способы могут дополнительно включать один или несколько этапов наблюдения за субъектом, наблюдения за опухолью и/или наблюдения за иммуностимулирующими бактериями, вводимыми

субъекту. Любые из множества этапов мониторинга могут быть включены в способы, представленные в настоящем документе, включая, помимо прочего, мониторинг размера опухоли, мониторинг наличия и/или размера метастазов, мониторинг лимфатических узлов субъекта, мониторинг веса субъекта или других показателей здоровья. индикаторы, включая маркеры крови или мочи, мониторинг титра антибактериальных антител, мониторинг бактериальной экспрессии обнаруживаемого генного продукта и непосредственный мониторинг титра бактерий в опухоли, ткани или органе субъекта.

Цель мониторинга может заключаться просто в оценке состояния здоровья субъекта или прогресса терапевтического лечения субъекта, или может заключаться в определении того, оправдано ли дальнейшее введение той же или другой иммуностимулирующей бактерии, или для определения того, вводить или нет соединение субъекту, когда соединение может действовать, повышая эффективность терапевтического метода, или соединение может действовать, снижая патогенность бактерий, вводимых субъекту.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем документе, могут включать мониторинг одного или нескольких генов, экспрессируемых бактериями. Бактерии, такие как представленные в настоящем документе или иным образом известные в данной области техники, могут экспрессировать один или несколько обнаруживаемых генных продуктов, включая, но не ограничиваясь ими, обнаруживаемые белки.

Как указано в настоящем документе, измерение обнаруживаемого продукта гена, экспрессируемого в бактерии, может обеспечить точное определение уровня бактерий, присутствующих в субъекте. Как дополнительно предусмотрено в настоящем документе, определение местоположения обнаруживаемого продукта гена, например, методами визуализации, включая томографические методы, может определить локализацию бактерий у субъекта. Соответственно, способы, представленные в настоящем документе, которые включают мониторинг обнаруживаемого продукта бактериального

гена, можно использовать для определения присутствия или отсутствия бактерий в одном или нескольких органах или тканях субъекта и/или присутствия или отсутствия бактерий в опухоли или метастазы субъекта. В дальнейшем, предложенные здесь способы, которые включают мониторинг обнаруживаемого продукта бактериального гена, можно использовать для определения титра бактерий, присутствующих в одном или нескольких органах, тканях, опухолях или метастазах. Способы, включающие мониторинг локализации и/или титра бактерий у субъекта, могут быть использованы для определения патогенности бактерий, поскольку бактериальная инфекция и, в частности, уровень инфекции нормальных тканей и органов может указывать на патогенность бактерий. Способы, включающие мониторинг локализации и/или титра иммуностимулирующих бактерий у субъекта, могут выполняться в несколько моментов времени и, соответственно, могут определять скорость репликации бактерий у субъекта, включая скорость репликации бактерий в одном или нескольких органах или ткани субъекта; соответственно, методы, которые включают мониторинг продукта бактериального гена, могут быть использованы для определения способности бактерий к репликации. Предложенные здесь способы также могут быть использованы для количественного определения количества иммуностимулирующих бактерий, присутствующих в различных органах или тканях, а также в опухолях или метастазах, и, таким образом, могут указывать степень предпочтительного накопления бактерий у субъекта; соответственно, мониторинг продукта бактериального гена можно использовать в методах определения способности бактерий накапливаться в опухолях или метастазах, а не в нормальных тканях или органах. Поскольку иммуностимулирующие бактерии, используемые в способах, предложенных в настоящем документе, могут накапливаться во всей опухоли или могут накапливаться в нескольких участках опухоли, а также могут накапливаться в метастазах, предложенные здесь способы мониторинга продукта бактериального гена можно использовать для определения размера опухоли или количества метастазов, присутствующих у субъекта. Мониторинг такого присутствия продукта бактериального гена в опухоли или метастазах в течение определенного периода времени можно использовать для оценки

изменений в опухоли или метастазах, включая рост или уменьшение опухоли, или развитие новых метастазов, или исчезновение метастазов, и также может использоваться для определения скорости роста или уменьшения опухоли, или скорости развития новых метастазов, или исчезновения метастазов, или изменения скорости роста или уменьшения опухоли, или изменения скорости развитие новых метастазов или исчезновение метастазов. Соответственно, мониторинг продукта бактериального гена можно использовать для мониторинга неопластического заболевания у субъекта.

Любой из множества поддающихся обнаружению белков может быть обнаружен с помощью мониторинга, например любой из множества флуоресцентных белков (например, зеленые флуоресцентные белки), любая из множества люцифераз, трансферрин или другие железосвязывающие белки; или рецепторы, связывающие белки и антитела, где соединение, которое специфически связывается с рецептором, связывающим белком или антителом, может быть обнаруживаемым агентом или может быть помечено обнаруживаемым веществом (например, радионуклидом или визуализирующим агентом).

Размер опухоли и/или метастазов можно контролировать с помощью любого из множества способов, известных в данной области, включая методы внешней оценки или методы томографической или магнитной визуализации. В дополнение к методам, известным в данной области техники, способы, предусмотренные в настоящем документе, например мониторинг экспрессии бактериального гена, могут быть использованы для мониторинга размера опухоли и/или метастазов.

Мониторинг размера в течение нескольких моментов времени может предоставить информацию об увеличении или уменьшении размера опухоли или метастазов, а также может предоставить информацию о наличии дополнительных опухолей и/или метастазов у субъекта. Мониторинг размера опухоли в течение нескольких моментов времени может предоставить

информацию о развитии неопластического заболевания у субъекта, включая эффективность лечения неопластического заболевания у субъекта.

Предложенные здесь способы также могут включать мониторинг титра антител у субъекта, включая антитела, вырабатываемые в ответ на введение субъекту иммуностимулирующих бактерий. Бактерии, вводимые способами, предложенными в настоящем документе, могут вызывать иммунный ответ на эндогенные бактериальные антигены. Бактерии, вводимые способами, предложенными в настоящем документе, также могут вызывать иммунный ответ на экзогенные гены, экспрессируемые бактериями. Бактерии, вводимые в способах, предложенных в настоящем документе, также могут вызывать иммунный ответ на опухолевые антигены. Мониторинг титра антител против бактериальных антигенов, продуктов экзогенных генов, экспрессируемых бактериями, или опухолевых антигенов можно использовать для мониторинга токсичности бактерий, для мониторинга эффективности методов лечения,

Мониторинг титра антител можно использовать для мониторинга токсичности бактерий. Титр антител против бактерий может меняться в течение периода времени после введения бактерий субъекту, при этом в определенные моменты времени низкий титр антител против (бактериального антигена) может указывать на более низкую токсичность, в то время как в другие моменты времени высокий титр антител против (бактериального антигена) может указывать на более высокую токсичность. Бактерии, используемые в предлагаемых здесь способах, могут быть иммуногенными и, следовательно, могут вызывать иммунный ответ вскоре после введения бактерий субъекту. Как правило, иммуностимулирующие бактерии, против которых иммунная система субъекта может вызвать сильный иммунный ответ, могут быть бактериями с низкой токсичностью, когда иммунная система субъекта может удалять бактерии из всех нормальных органов или тканей. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления высокий титр антител против бактериальных антигенов вскоре после введения бактерий субъекту может указывать на низкую токсичность бактерий.

В других вариантах осуществления мониторинг титра антител можно использовать для мониторинга эффективности способов лечения. В способах, представленных в настоящем документе, титр антител, таких как титр антител против (опухолевого антигена), может указывать на эффективность терапевтического метода, такого как терапевтический метод лечения неопластического заболевания. Предлагаемые здесь терапевтические способы могут включать в себя вызывание или усиление иммунного ответа против опухоли и/или метастазов. Таким образом, контролируя титр антител против (опухолевого антигена), можно контролировать эффективность терапевтического метода в отношении вызывания или усиления иммунного ответа против опухоли и/или метастазов.

В других вариантах осуществления мониторинг титра антител можно использовать для мониторинга уровня продукта(ов) гена или антител для получения и/или сбора. Как предусмотрено в настоящем документе, способы могут быть использованы для получения белков, молекул РНК или других соединений путем экспрессии экзогенного гена в микроорганизме, который накопился в опухоли, в микроокружении опухоли и/или в резидентных опухолевых иммунных клетках. Мониторинг титра антител к белку, молекуле РНК или другому соединению может указывать на уровень продукции белка, молекулы РНК или другого соединения опухолевым микроорганизмом, а также может непосредственно указывать на уровень антител, специфичных для такого соединения. белок, молекула РНК или другое соединение.

Представленные здесь способы также могут включать в себя способы наблюдения за состоянием здоровья субъекта. Некоторые из предложенных здесь способов являются терапевтическими способами, включая способы лечения неопластических заболеваний. Мониторинг состояния здоровья субъекта можно использовать для определения эффективности терапевтического способа, как это известно в данной области. Представленные в настоящем документе способы также могут включать стадию введения субъекту иммуностимулирующей бактерии, как предусмотрено в настоящем документе. Мониторинг состояния здоровья субъекта можно использовать для

определения патогенности иммуностимулирующей бактерии, введенной субъекту. Как известно в данной области техники, можно контролировать любой из множества способов диагностики состояния здоровья для мониторинга заболевания, такого как неопластическое заболевание, инфекционное заболевание или заболевание, связанное с иммунитетом. Например, вес, кровяное давление, пульс, дыхание, цвет, температура или другое наблюдаемое состояние субъекта может указывать на состояние здоровья субъекта. Кроме того, наличие, отсутствие или уровень одного или нескольких компонентов в образце, взятом у субъекта, может указывать на состояние здоровья субъекта. Типичные образцы могут включать образцы крови и мочи, в которых присутствие, отсутствие или уровень одного или нескольких компонентов можно определить, например, с помощью анализа крови или диагностического анализа мочи. Типичные компоненты, свидетельствующие о состоянии здоровья субъекта, включают, но не ограничиваются ими, количество лейкоцитов, гематокрит и концентрацию С-реактивного белка.

Предложенные здесь способы могут включать мониторинг терапии, при этом терапевтические решения могут быть основаны на результатах мониторинга. Терапевтические способы, предусмотренные в настоящем документе, могут включать введение субъекту иммуностимулирующих бактерий, при этом бактерии могут предпочтительно накапливаться в опухоли, микроокружении опухоли или в иммунных клетках, резидентных опухоли, и/или в метастазах, и при этом бактерии могут вызывать или усиливать противоопухолевый иммунный ответ. Такие терапевтические способы могут включать множество стадий, включая многократное введение конкретной иммуностимулирующей бактерии, введение второй иммуностимулирующей бактерии или введение терапевтического соединения.

Определение количества, времени или типа иммуностимулирующих бактерий или соединений для введения субъекту может быть основано на одном или нескольких результатах наблюдения за субъектом. Например, титр антител у субъекта можно использовать для определения целесообразности введения

иммуностимулирующей бактерии и, возможно, соединения, количества бактерий и/или соединения для введения, а также типа бактерий и/или соединения. или соединение для введения, где, например, низкий титр антител может указывать на желательность введения дополнительной иммуностимулирующей бактерии, другой иммуностимулирующей бактерии и/или терапевтического соединения, такого как соединение, которое индуцирует экспрессию бактериального гена, или терапевтическое соединение, эффективное независимо от иммуностимулирующих бактерий.

В другом примере общее состояние здоровья субъекта можно использовать для определения целесообразности введения иммуностимулирующей бактерии и, возможно, соединения, количества бактерии и/или соединения для введения и типа бактерии. и/или соединение для введения, где, например, определение того, что субъект здоров, может указывать на желательность введения дополнительных бактерий, различных бактерий или терапевтического соединения, такого как соединение, которое индуцирует экспрессию бактериального гена/генетической полезной нагрузки/терапевтического продукта . В другом примере мониторинг обнаруживаемого бактериально-экспрессируемого генного продукта можно использовать для определения того, желательно ли вводить иммуностимулирующую бактерию и, возможно, соединение, количество бактерии и/или соединения для введения, и тип бактерии и/или соединения для введения, где, например, определение того, что субъект здоров, может указывать на желательность введения дополнительных бактерий, других бактерий или терапевтического соединения, такого как соединение, которое индуцирует бактериальный ген/генетический выражение полезной нагрузки/терапевтического продукта. Такие методы мониторинга можно использовать для определения того, эффективен ли терапевтический метод, является ли терапевтический метод патогенным для субъекта, накопились ли бактерии в опухоли или метастазах и накопились ли бактерии в нормальных тканях или органах. На основании таких определений можно определить желательность и форму дальнейших терапевтических методов, определение

того, что субъект здоров, может указывать на желательность введения дополнительных бактерий, различных бактерий или терапевтического соединения, такого как соединение, которое индуцирует экспрессию бактериального гена/генетической полезной нагрузки/терапевтического продукта.

В другом примере мониторинг может определить, накопились ли иммуностимулирующие бактерии в опухоли или метастазах субъекта. После такого определения может быть принято решение о дополнительном введении субъекту дополнительных бактерий, другой иммуностимулирующей бактерии и, возможно, соединения.

H. ПРИМЕРЫ

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

Пример 1

Ауксотрофные штаммы*S. typhimurium*

Штамм*Salmonella*YS1646является ауксотрофным по аденозину

Представленные здесь штаммы сконструированы так, чтобы быть ауксотрофными по аденозину. В результате они аттенуируютсяinvivo, поскольку неспособны к репликации при низких концентрациях аденозина в нормальной ткани, а колонизация происходит преимущественно в микроокружении солидной опухоли (TME), где уровни аденозина высоки.

Штамм сальмонеллы YS1646 является производным штамма дикого типа ATCC 14028 и был сконструирован так, чтобы быть ауксотрофным по пуринам из-за разрушения гена purI (синоним purM) (см., например, Lowetal. (2004) MethodsMed. Мед.90:47-60). Последующий анализ всего генома YS1646

показал, что ген purI на самом деле не был делетирован, а вместо этого был нарушен хромосомной инверсией (см., например, Broadwayetal. (2014) J. Biotechnol. 192:177-178). и что весь ген все еще содержится в двух частях хромосомы YS1646, окруженных последовательностями вставки, одна из которых имеет активную транспозазу. Присутствие полной генетической последовательности гена purI, нарушенной посредством хромосомной рецепции, оставляет открытой возможность реверсии к гену дикого типа.

Здесь показано, что при наличии аденозина штамм YS1646 способен размножаться в минимальной среде, тогда как родительский штамм дикого типа, ATCC 14028, может расти в минимальной среде, не содержащей аденозин. Штамм YS1646 выращивали в течение ночи в среде лизогенного бульона (LB), промывали минимальной средой M9 и разбавляли минимальной средой M9, не содержащей аденозин или увеличивающей концентрацию аденозина. Рост измеряли с помощью спектрофотометра SpectraMax® M3 (MolecularDevices) при 37 °C, измеряя OD_{600} каждые 15 минут.

Тогда как ранее было показано, что пуриновая ауксотрофияYS1646 стабильна после более 140 прохождений invitro, была неясной скорость реверсии (см., напр., Clairmon*etal.* (2000)*J.Infect. Dis.* 181:1996-2002).

Результаты показали, что, в отличие от штамма дикого типа (ATCC 14028), который был способен расти при любых концентрациях аденозина, штамм YS1646 был способен реплицироваться только при введении аденозина в концентрациях от 11 до 300 мкмоль, и полностью не может реплицироваться только в M9 или в M9 с добавлением 130 наномолярного аденозина. Эти данные демонстрируют, что мутанты purI способны реплицироваться при концентрациях аденозина, обнаруживаемых в микроокружении опухоли, но не при концентрациях, обнаруживаемых в нормальных тканях. Примеры сконструированных ауксотрофных по аденозину штаммов включают штаммы, в которых вся открытая рамка считывания purI или ее части удалены из хромосомы для предотвращения реверсии к дикому типу. Такие делеции гена

могут быть достигнуты любым способом, известным специалисту в данной области, включая систему лямбда-красный.

Штамм сальмонеллы YS1646 является ауксотрофным по АТФ.

В дополнение к ауксотрофии по пурину и аденозину было определено, может ли штамм с делецией PurI также удалять АТФ. АТФ накапливается до высоких уровней в микроокружении опухоли из-за утечки из умирающих опухолевых клеток. Здесь показано, что при наличии АТФ штамм YS1646 способен размножаться в минимальной среде, но не может расти без добавления АТФ. Чтобы продемонстрировать это, штамм YS1646 выращивали в течение ночи в среде LB, промывали минимальной средой M9 и разбавляли минимальной средой M9, не содержащей АТФ или увеличивающей концентрацию АТФ (Fisher). Рост измеряли с помощью спектрофотометра SpectraMax® M3 (MolecularDevices) при 37 °C с показаниями OD_{600} каждые 15 минут. Результаты показали, что штамм YS1646 способен к репликации, когда АТФ предоставляется в концентрации 0,012 мМ, но не только в M9.

Пример 2

Defects in Intracellular Replication are Attributed to the *msbB* Mutation

Дефекты внутриклеточной репликации связаны с мутацией msbB. Штамм YS1646 содержит мутации в purI, которые ограничивают репликацию сайтами, содержащими высокие концентрации пуринов, аденозина или АТФ, и мутации в msbB, которые изменяют липополисахаридную (ЛПС) поверхностную оболочку, для уменьшения TLR4-опосредованной провоспалительной передачи сигналов. Также было установлено, что, в отличие от Salmonella дикого типа, штамм YS1646 неспособен к репликации в макрофагах. Были проведены эксперименты, чтобы определить, какая из этих генетических мутаций ответственна за придание этого фенотипа штамму дикого типа, ATCC 14028.

В этом анализе мышиные макрофагальные клетки RAW (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния) инфицировали штаммами Salmonella дикого типа, содержащими делеции в purI, msbB или в обоих, при множественности заражения (MOI) примерно 5 бактерий на клетку в течение 30 минут, затем клетки промывали PBS и добавляли среду, содержащую гентамицин, для уничтожения внеклеточных бактерий. Гентамицин не уничтожает внутриклеточные бактерии, так как не может проникнуть через клеточную мембрану. В различные моменты времени после инфицирования клеточные монослоилизировали осмотическим шоком с водой, клеточные лизаты разводили и высевали на LB-агар для подсчета выживших колониеобразующих единиц (КОЕ).

Как показано в таблице ниже, штаммы Salmonella дикого типа, содержащие только мутацию purI-, все еще были способны к репликации. Это объясняет, почему при одной только делеции purI наблюдается лишь умеренное улучшение переносимости при достижении высокой степени специфичности к микроокружению опухоли. Штаммы, содержащие только мутацию msbB-, а также штаммы, содержащие мутации purI- и msbB-, неспособны к репликации и быстро элиминируются из клеток в течение 48 часов.

Часы	**КОЕ/Well**					
	ATCC 14028 *ΔpurI*		**ATCC 14028 *ΔpurI/ΔmsbB***		**ATCC 14028 *ΔmsbB***	
1	104000	108000	68000	68000	88000	40000
2.5	5600	6000	760	960	3200	3200
5	5600	4000	1120	880	800	680
27	11200	5600	4	4	20	4

Пример 3

Разработка и характеристика штамма Salmonella с нокаутом гена asd

Был получен штамм YS1646 Δasd. Это аттенуированный штамм Salmonellatyphimurium, полученный из штамма YS1646 (который можно приобрести в ATCC, № по каталогу 202165), который был сконструирован так, чтобы иметь делецию в гене asd. В этом примере штамм SalmonellatyphimuriumYS1646 Δasd был сконструирован с использованием модификаций метода Даценко и Ваннера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA97:6640–6645 (2000)), как описано ниже.

Введение плазмиды LambdaRedHelper в штамм YS1646

Штамм YS1646 был получен электрокомпетентным, как описано ранее (SambrookJ. (1998) MolecularCloning, ALaboratoryManual, 2ndEd., ColdSpringHarbor, NY: ColdSpringHarbourLaboratory), путем выращивания культуры в LB и концентрирования 100-кратно, а затем тройной промывкой ледяным 10% глицерином. Электрокомпетентный штамм подвергали электропорации с красной хелперной плазмидой pKD46 Lambda (SEQIDNO:218) с использованием кюветы с зазором 0,2 см при следующих настройках: 2,5 кВ, 186 Ом и 50 мкФ. Трансформанты, несущие pKD46, выращивали в 5 мл среды SOC с ампициллином и 1 мML-арабинозы при 30 °C и отбирали на чашках с агаром LB, содержащих ампициллин. Клон YS1646, содержащий хелперную плазмиду лямбда-красный pKD46, затем делали электрокомпетентным, как описано выше для штамма YS1646.

Construction of *asd* Gene Knockout Cassette

Конструирование кассеты с нокаутом гена asd

Ген asd из генома штамма YS1646 (Broadwayetal. (2014) J. Biotechnology 192:177-178) использовали для конструирования кассеты с нокаутом гена asd.

Плазмиду, содержащую 204 и 203 пары оснований (bps), гомологичную левой и правой областям гена asd, соответственно, трансформировали в компетентные

клетки DH5-альфа (ThermoFisherScientific). В эту плазмиду клонировали кассету гена канамицина, фланкированную сайтами loxP. Затем кассету с нокаутом гена asdамплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеровasd-1 и asd-2 (см. табл. 1) и очищали в геле.

Делеция гена *asd*

Штамм YS1646, несущий плазмиду pKD46, подвергали электропорации с гель-очищенной кассетой с линейным нокаутом гена asd. Электропорированныеклетки извлекали в среде SOC и высевали на чашки с агаром LB с добавлением канамицина (20 мкг/мл) и диаминопимелиновой кислоты (DAP, 50 мкг/мл). На этом этапе рекомбиназа лямбда-красный индуцирует гомологичную рекомбинацию хромосомного гена asd с кассетой kan (благодаря наличию гомологичных фланкирующих последовательностей выше и ниже хромосомного гена asd), и происходит нокаут хромосомной копии гена asd. Наличие нарушенного гена asd в отобранных устойчивых к канамицину клонах было подтверждено с помощью PCR с праймерами из генома YS1646, фланкирующими участки разрыва (праймераsd-3), и из сайта множественного клонирования (праймерscFv-3).) (см. табл. 1). Колонии также высевали в репликах на чашки LB с дополнительным DAP и без него, чтобы продемонстрировать ауксотрофиюDAP. Все клоны с делецией гена asd не могли расти в отсутствие дополнительного DAP, демонстрируя ауксотрофиюDAP.

Table 1. Информация о праймере

Наименование праймера	**Последовательностьпраймера**	**SEQ ID NO.**
asd-1	ccttcctaacgcaaattccctg	219
asd-2	ccaatgctctgcttaactcctg	220
asd-3	gcctcgccatgtttcagtacg	221
asd-4	ggtctggtgcattccgagtac	222

Наименование праймера	**Последовательностьпраймера**	**SEQ ID NO.**
scFv-3	Cataatctgggtccttggtctgc	223
APR-001	Aaaaaagcttgcagctctggcccgtg	226
APR-002	aaaaaagcttttagaaaaactcatcgagcatcaaatga	227
APR-003	Acactagaaggacagtatttggtatctg	228
APR-004	Agccgtagttaggccacc	229
flic-1	Cgttatcggcaatctggaggc	232
flic-2	Ccagcccttacaacagtggtc	233
flic-3	Gtctgtcaacaactggtctaacgg	234
flic-4	Agacggtcctcatccagataagg	235
fljb-1	Ttccagacgacaagagtatcgc	236
fljb-2	Cctttaggtttatccgaagccagaatc	237
fljb-3	Caccaggtttttcacgctgc	238
fljb-4	Acacgcatttacgcctgtcg	239
pagp-1	Gcgtgacggttctgagtgct	315
pagp-2	Cgtctttgctgccatcttccg	316
pagp-3	Acaataacgacgactccgataagg	317
pagp-4	Ctgctgaatgtgctgattaacctg	318
ansb-1	Accttagaagatagccgcaaagc	319
ansb-2	Cagagacatgacacccacgattatc	320
ansb-3	Gcaaaccgctatccagaacga	321
ansb-4	Agtttaagtatgccgtggtactgc	322
csgd-1	Cacttgctttaagatttgtaatggctag	323
csgd-2	Ggtgtattcgctttcccatttgtc	324
csgd-3	Tgtgctgtccaggttaatgcc	325
csgd-4	Gacgacggttttctcgaagtctc	326

Удалениекассетысгеномканамицина

Селектируемый маркер kan удаляли с помощью системы сайт-специфической рекомбинации Cre/loxP. Мутант YS1646 Δasd гена Kan ^{R} трансформировали

pJW168, чувствительной к температуре плазмидой, экспрессирующей рекомбиназуCre (SEQIDNO:224). Колонии Amp ^{R} отбирали при 30°C; Затем pJW168 удаляли путем роста при 42 °C. Отобранный клон тестировали на потерю kan путем посева реплик на чашки с агаром LB с канамицином и без него и подтверждали с помощью ПЦР с использованием праймеров из генома YS1646, фланкирующих участки разрушения (праймерыasd-3 и asd-4; для последовательности праймеров , см. Таблицу 1).

Подтверждение наличия мутантного штамма YS1646Δasd с функциональной делецией asd (также обозначенного как AST-101)

Мутант Δasd не мог расти на чашках с агаром LB при 37 °C, но был способен расти на чашках LB, содержащих 50 мкг/мл диаминопимелиновой кислоты (DAP). Скорость роста мутанта Δasd оценивали в жидких средах LB; он не мог расти в жидкой LB, но мог расти в LB с добавлением 50 мкг/мл DAP, что определяли путем измерения поглощения при 600 нМ.

Подтверждение последовательности локуса asd в штамме YS1646Δasd после делеции гена asd

Штамм с делецией гена asd подтверждали секвенированием ДНК с использованием праймеровasd-3 и asd-4 (см. табл. 1). Было выполнено секвенирование области, фланкирующей локус asd, и последовательность подтвердила, что ген asd был удален из хромосомы YS1646.

Комплементация делеции asd экспрессией asd из плазмид

Плазмида pATIU6 (SEQIDNO:225) была химически синтезирована и собрана. Плазмида содержала следующие особенности: начало репликации высокой копии (pUC19), промотор U6 для управления экспрессией короткой шпильки, ген устойчивости к ампициллину, фланкированный сайтами рестрикции HindIII для последующего удаления, и ген asd, содержащий 85 пар оснований последовательности выше стартового кодона (SEQIDNO:246). В этот вектор shРНК, нацеленные на мышиный TREX1, вводили путем

рестрикционного расщепления с помощью SpeI и XhoI, а также лигирования и клонирования в клетки DH5-альфа E. coli. Полученная плазмида была обозначена pATI-shTREX1.

Электропорация плазмид в штаммы иммуностимулирующих бактерий

Выбранные плазмиды, содержащие экспрессионные кассеты, кодирующие иммуностимулирующие белки и функциональный ген asd, электропорировали в штаммы S. typhimurium, лишенные гена asd, с помощью электропоратораBTX® ECM600, используя кювету с зазором 0,2 см (BTX, SanDiego, Калифорния) при следующих настройках: 2,5 кВ, 186 Ом и 50 мкФ. Электропорированные клетки добавляли к 1 мл SOC с добавлением 50 мкМ диаминопимелиновой кислоты (DAP), инкубировали в течение 1 часа при 37 °C, а затем распределяли на чашках с агаром, не содержащих DAP, для отбора штаммов, получивших плазмиды с функциональным геном asd. После выделения одиночной колонии банки клеток получали путем инокуляции флакона со стерильным лизогенным бульоном (LB) одной хорошо изолированной колонией S. typhimurium, и инкубировали при 37°C при перемешивании при 250 об/мин. После выращивания культуры до стационарной фазы бактерии промывали в PBS, содержащем 10% глицерина, и хранили в виде аликвот, замороженных при температуре ниже -60°C.

Плазмиду pATI-shTREX1 амплифицировали в E. coli и очищали для трансформации в штамм YS1646 Δasd путем электропорации и клональной селекции на чашках LBAmp с получением штамма YS1646 Δasd-shTREX1. Мутанты YS1646 Δasd, дополненные плазмидами, полученными из pATIU6, были способны расти на агаре LB и жидких средах в отсутствие DAP.

В последующей итерации ген устойчивости к ампициллину (Amp^R) из pATI-shTREX1 был заменен геном устойчивости к канамицину. Это было достигнуто расщеплением плазмиды pATI-shTREX1 HindIII с последующей очисткой на геле для удаления гена Amp^R. Ген устойчивости к канамицину (Kan^R)

амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеровAPR-001 и APR-002 (SEQIDNO: 226 и SEQIDNO: 227 соответственно) с последующим расщеплением HindIII и лигированием в очищенный гель расщепленной плазмиды pATIU6.

В последующих итерациях в плазмиду pATIKan вводили одну точечную мутацию в точке начала репликации pUC19 с использованием набора для направленного мутагенеза Q5® (NewEnglandBiolabs) и праймеровAPR-003 (SEQIDNO:228) и APR -004 (SEQIDNO:229), чтобы заменить нуклеотид T в положении 148 на C. Эта мутация делает точку начала репликации гомологичной точке начала репликации pBR322, которая представляет собой точку начала репликации с низким содержанием копий, чтобы уменьшить число копии плазмиды.

Поддержание плазмиды, продемонстрированное invivo с использованием системы комплементацииasd

В этом примере мышей с опухолями CT26 лечили штаммом YS1646, содержащим плазмиду, которая экспрессирует shРНК, нацеленную на TREX1 (YS1646-shTREX1), или штаммом YS1646 с делецией asd, содержащим плазмиду с функциональным геном asd и shРНК, нацеленную на TREX1 (YS1646 Δasd-shTREX1).

CT26 (опухоль толстой кишки № 26) представляет собой модель опухоли, которая возникла в результате воздействия на мышей BALB/cN-нитро-N-метилуретана (NMU), что привело к высокометастатической карциноме, повторяющей агрессивную, недифференцированную и рефрактерную к контрольным точкам колоректальную карциному человека (см., например, Castleetal. (2014) BMCGenomics 15(1):190). При подкожной имплантации в бок, в отличие от ортотопической в толстой кишке, иммунофенотип опухоли гораздо более иммуносупрессивен и рефрактерен к контрольным точкам. Несмотря на отсутствие Т-клеточной инфильтрации, опухоль богата миелоидными клетками, такими как макрофаги и супрессорные клетки миелоидного происхождения

(MDSC) (см., например, Zhaoetal. (2017) Oncotarget 8(33):54775-54787).). Поскольку эта модель больше напоминает микросателлитный стабильный (MSS) колоректальный рак человека,

5

она является идеальной моделью для оценки представленного здесь терапевтического подхода.

Для этого эксперимента самкам мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель (3 мыши в группе) инокулировали подкожно (SC) в правый бок опухолевыми клетками
10 CT26 (приобретенными у ATCC) (2×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с установленными 8-дневными опухолями на боку внутривенно (в/в) вводили три дозы 5×10^6 КОЕ штамма YS1646 Δasd-shTREX1 или родительского штамма YS1646-shTREX1 на 8, 15 и 23 дни. Плазмида кодирует shTREX1 в качестве типичного терапевтического продукта; любой другой желаемый
15 терапевтический продукт или продукты могут быть заменены.

Массу тела и опухоли измеряли два раза в неделю. Измерения опухоли проводили с использованием электронных штангенциркулей (Fowler, Newton, MA). Объем опухоли рассчитывали по модифицированной формуле эллипсоида 1/2 (длина × ширина ^{2}). Мышей подвергали эвтаназии, когда размер опухоли
20 достигал >20% массы тела или становился некротическим, в соответствии с правилами IACUC.

Через 12 дней после последней инъекции сальмонеллы опухоли гомогенизировали, гомогенаты серийно разбавляли и высевали на чашки с агаром LB для подсчета общего количества присутствующих
25 колониеобразующих единиц (КОЕ) или на чашки с канамициномLB для подсчета количества устойчивых к канамицину колоний.

Результаты показали, что штамм S. typhimuriumYS1646-shTREX1 не подвергался селективному давлению для сохранения плазмид shРНК и продемонстрировал значительную потерю плазмид, поскольку процент

колоний, устойчивых к канамицину (Kan ^{R}), составлял менее 10%. Штамм, который использовал систему комплементации гена asd для поддержания плазмид, YS1646 Δasd-shTREX1, имел почти одинаковое количество устойчивых к канамицину и чувствительных к канамицину КОЕ. Эти данные демонстрируют, что системы комплементации гена asd достаточно для поддержания плазмид в контексте микроокружения опухоли у мышей.

Повышенная противоопухолевая эффективность с использованием системы комплементациияsd

Система комплементациияsd предназначена для предотвращения потери плазмид и усиления противоопухолевой эффективности доставки терапевтического продукта штаммами S. typhimuriuminvivo. Чтобы проверить это, штаммы YS1646 Δasd, содержащие плазмиду shTREX1 (YS1646 Δasd-shTREX1), или скремблированный контроль (YS1646 Δasd-shSCR), которые содержат функциональную кассету гена asd, сравнивали на противоопухолевую эффективность в модели карциномы толстой кишки мышей, к штамму YS1646, содержащему плазмиду pEQU6-shTREX1 (YS1646-shTREX1), плазмиду, в которой отсутствует кассета гена asd, и следовательно, не имеет механизма поддержания плазмиды. shTREX1 является образцовым терапевтическим продуктом.

Для этого эксперимента 6-8-недельным самкам мышей BALB/c (8 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки CT26 (2×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с установленными опухолями на боку дважды, на 8-й и 18-й день, внутривенно вводили 5×10^6 КОЕ YS1646 Δasd-shTREX1 или YS1646-shTREX1 и сравнивали с контролем PBS.

Штамм YS1646-shTREX1 продемонстрировал улучшенный контроль над опухолью по сравнению с PBS (70% ингибирование роста опухоли (TGI), день 28), несмотря на продемонстрированную потерю плазмиды с течением времени. Штамм Δasd, содержащий плазмиду с системой комплементации гена asd и shTREX1 (YS1646 Δasd-shTREX1), продемонстрировал превосходное

ингибирование роста опухоли по сравнению с PBS (82% TGI, p = 0,002, день 25). Эти данные демонстрируют, что улучшенная эффективность достигается за счет предотвращения потери плазмиды, использования системы комплементацииasd и доставки shTREX1 по сравнению с плазмидами, содержащими YS1646, без системы комплементации гена asd. Таким образом, штаммы с системами комплементацииasd являются превосходными противораковыми терапевтическими средствами.

Пример 4

Нокаут флагеллинаS. typhimurium делецией генов fliC и fljB, разработка и характеристика штамма

В приведенном здесь примере живой аттенуированный штамм S. typhimuriumYS1646, содержащий делецию гена asd, был дополнительно сконструирован для удаления генов fliC и fljB, чтобы удалить обе субъединицы флагеллина. Это устраняет провоспалительную активацию TLR5, чтобы уменьшить провоспалительную передачу сигналов и улучшить противоопухолевый адаптивный иммунитет.

Делеция гена*fliC*

В этом примере fliC удаляли из хромосомы штамма YS1646Δasd с использованием модификаций метода Даценко и Ваннера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640–6645 (2000)), как подробно описано в предыдущем примере. Вкратце, синтетические последовательности плеча гомологии гена fliC, которые содержали 224 и 245 оснований гомологичной последовательности, фланкирующей ген fliC, клонировали в плазмиду, названную pSL0147 (SEQIDNO:230). Кассету гена канамицина, фланкированную сайтами cre/loxP, затем клонировали в плазмиду pSL0147, а

кассету с нокаутом гена fliC затем амплифицировали с помощью PCR с праймерамиflic-1 (SEQIDNO:232) и flic-2 (SEQIDNO:233), очищенный в геле, а затем введенный в штамм YS1646Δasd, несущий термочувствительную лямбда-красную рекомбинационную плазмиду pKD46, путем электропорации. Электропорированные клетки восстанавливали в среде SOC + DAP, и высевали на чашки с агаром LB с добавлением канамицина (20 мкг/мл) и диаминопимелиновой кислоты (ДАП, 50 мкг/мл). Колонии отбирали и подвергали скринингу на вставку нокаутного фрагмента с помощью PCR с использованием праймеровflic-3 (SEQIDNO:234) и flic-4 (SEQIDNO:235). Затем pKD46 обрабатывали путем культивирования выбранного устойчивого к канамицину штамма при 42°C и скрининга на потерю устойчивости к ампициллину. Затем маркер устойчивости к канамицину обрабатывали электропорацией чувствительной к температуре плазмиды, экспрессирующей рекомбиназуCre (pJW168), и Amp колонии отбирали при 30oC. Затем pKD46 обрабатывали путем культивирования выбранного устойчивого к канамицину штамма при 42°C и скрининга на потерю устойчивости к ампициллину. Затем pJW168 удаляли путем выращивания культур при 42 °C. Отобранные нокаутные клоны fliC затем тестировали на потерю канамицинового маркера с помощью PCR с использованием праймеров, фланкирующих участки разрушения (flic-3 и flic-4), и оценивая электрофоретическую подвижность на агарозных гелях.

Делеция гена *fljB*

Затем ген fljB удаляли из штамма YS1646 Δasd/ΔfliC с использованием модификаций способов, описанных выше. Синтетические последовательности плеч гомологии гена fljB, содержащие 249 и 213 оснований левой и правой последовательностей, соответственно, фланкирующие ген fljB, были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0148 (SEQIDNO:231). Кассетугенаканамицина, фланкированнуюсайтамисre/loxP, затемклонировали в pSL0148, а нокаутнуюкассетугенафljВподвергали ПЦР-амплификации с праймерами fljb-1 (SEQ ID NO:236) и fljb-2 (SEQ ID NO:237)

(см. , таблица 1), очищенный в геле и введенный в штамм YS1646 Δasd/ΔfliC, несущийчувствительную к температурелямбда-краснуюрекомбинационнуюплазмиду pKD46, путемэлектропорации. Затем ген устойчивости к канамицину обработали с помощью Cre-опосредованной рекомбинации, как описано выше. а чувствительные к температуре плазмиды отверждали путем выращивания при недопустимой температуре. Последовательности нокаута гена fliC и fljBамплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеровflic-3 и flic-4 или fljb-3 (SEQIDNO:238) и fljb-4 (SEQIDNO:239) соответственно и подтверждали с помощью секвенирования ДНК. Это мутантное производное штамма YS1646 было обозначено как YS1646Δasd/ΔfliC/ΔfljB или сокращенно YS1646Δasd/ΔFLG.

InVitro характеристика сконструированного штамма S. typhimurium, нокаутного по флагеллину

asd-мутантный штамм YS1646, содержащий делеции как fliC, так и fljB, обозначаемый здесь как YS1646Δasd/ΔFLG, оценивали на плавательную подвижность путем нанесения 10 мкл ночных культур на пластины для плавания (LB, содержащие 0,3% агара и 50 мг/мл DAP). В то время как для штамма YS1646Δasd наблюдалась подвижность, для штамма YS1646Δasd/ΔFLG подвижность отсутствовала. Затем штамм YS1646Δasd/ΔFLG подвергали электропорации с плазмидой, содержащей ген asd, и оценивали скорость его роста в отсутствие DAP. Штамм YS1646Δasd/ΔFLG с плазмидой, комплементарной asd, был способен реплицироваться в LB в отсутствие дополнительного DAP и рос со скоростью, сравнимой со скоростью штамма YS1646Δasd, содержащего плазмиду, комплементарную asd. Эти данные показывают, что удаление флагеллина не снижает приспособленности S.. *typhimuriuminvitro*.

Удаление флагелл уменьшаетпироптоз в мышиных макрофагах

5 ×10 ^{5} мышиных макрофаговых клеток RAW (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния) инфицировали штаммом YS1646Δasd/ΔFLG или родительским штаммом YS1646Δasd, содержащими asd-комплементированную плазмиду, при MOI приблизительно 100 в анализе защиты от гентамицина. Через 24 часа после инфицирования супернатанты культуры собирали и оценивали на высвобождение лактатдегидрогеназы в качестве маркера гибели макрофаговых клеток с использованием набора для анализа цитотоксичности Pierce™ LDH(ThermoFisherScientific, Waltham, MA). Штамм YS1646Δasd индуцировал максимальное высвобождение LDH на 75%, в то время как штамм YS1646Δasd/ΔFLG индуцировал максимальное высвобождение LDH на 54%, демонстрируя, что делеция генов флагеллина снижает индуцированный S. typhimuriumпироптоз инфицированных макрофагов.

Мутанты с делетированнымифлагеллами приводят к меньшему пироптозу в инфицированных моноцитах человека.

typhimuriumYS1646 и YS1646Δasd/ΔFLG, причем штамм Δasd содержит плазмиды, кодирующие функциональный ген asd, для обеспечения поддержания плазмиды. 5x10 ^{4}клетки помещали в 96-луночный планшет с DMEM и 10% FBS.

Для демонстрации того, что штаммы YS1646Δ*asd*/ΔFLGимеют пониженную способность вызывать гибель клеток в макрофагах, клетки человеческих макрофагов THP-1 (ATCCкаталожный номер #202165) инфицировали штаммами *S. typhimurium* YS1646 andYS1646Δ*asd*/ΔFLG, причем штамм Δasd содержит плазмиды, кодирующие функциональный ген asd, для обеспечения поддержания плазмиды. 5x10 ^{4} клеток помещали в 96-луночный планшет с DMEM и 10% FBS.

Клетки инфицировали промытыми культурами S. typhimurium в течение 1 часа при множественности заражения 100 КОЕ на клетку, затем клетки промывали PBS и заменяли среду на среду, содержащую 50 мкг/мл гентамицина для уничтожения внеклеточных бактерий. и 50 нг/мл IFNγ для превращения моноцитов в макрофагальный фенотип. Через 24 часа клетки THP-1 окрашивали

CellTiter-Glo® реагентом (Promega), и процент жизнеспособных клеток определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток с использованием планшет-ридера SpectraMax® M3 (MolecularDevices) для количественной оценки люминесценции. Клетки, инфицированные штаммом YS1646, имели только 38% жизнеспособности, в то время как клетки, инфицированные штаммом YS1646Δasd/ΔFLG, имели жизнеспособность 51%, что указывает на то, что делеция генов флагеллина вызывала меньшую гибель клеток макрофагов человека, несмотря на очень высокую и супрафизиологическую MOI.

Флагеллы не требуются для колонизации опухоли после системного введения.

Чтобы оценить влияние штаммов, нокаутирующих флагеллин, вводимых в мышиную модель карциномы толстой кишки, самкам мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) инокулировали подкожно в правый бок с клетками CT26 (2×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися в течение 10 дней опухолями на боку внутривенно вводили однократную дозу 3×10^5 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1 или родительского штамма YS1646Δasd-shTREX1. На 35-й день после имплантации опухоли мышей подвергали эвтаназии, а опухоли гомогенизировали и высевали на чашки LB для подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм опухолевой ткани. Штамм YS1646Δasd-shTREX1 колонизировал опухоли в среднем $5,9\times 10^7$ КОЕ на грамм опухолевой ткани, в то время как штамм YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1 с делецией флагелл колонизировал опухоли с почти двукратным увеличением в среднем до $1,1\times 10^8$ КОЕ/г опухолевой ткани. Колонизация селезенки штамма YS1646Δasd-shTREX1 была рассчитана как среднее значение $1,5 \times 10^3$ КОЕ/г ткани селезенки, тогда как колонизация селезенки штамма YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1 с делецией флагелл была немного ниже, в среднем $1,2 \times 10^3$ КОЕ/г ткани селезенки.

Эти данные демонстрируют, что отсутствие флагелл не только не оказывает отрицательного влияния на колонизацию опухоли после внутривенного

введения, но и усиливает колонизацию опухоли по сравнению со штаммом с интактными флагеллами. Важно отметить, что делеция флагелл немного снижает колонизацию селезенки, увеличивая соотношение опухоли и селезенки в 100 000 раз. Эти данные показывают, что, вопреки ожиданиям в области техники,не только флагеллы не требуются для колонизации опухоли, но и их устранение усиливает колонизацию опухоли, в то же время уменьшая колонизацию селезенки.

Штамм с удаленными флагеллами демонстрирует повышенную противоопухолевую активность у мышей

Для оценки воздействия нокаутных по флагеллину штаммов, введенных в мышиную модель карциномы толстой кишки, самкам мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки CT26 (2×10^5 клеток). в 100 мклPBS). Мышам с установленными опухолями на боку внутривенно вводили однократную дозу 3×10^5 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1 или штамма YS1646Δasd-shTREX1 и сравнивали с контролем PBS. За мышами следили с помощью штангенциркуля для определения роста опухоли.

Результаты показали, что штамм YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1, неспособный образовывать жгутики, продемонстрировал улучшенный контроль опухоли по сравнению с родительским штаммом YS1646Δasd-shTREX1 (27% TGI, день 24) и значительный контроль над опухолью по сравнению с контролем PBS (73% TGI, p = 0,04, 24-е сутки). Эти данные демонстрируют, что не только флагеллы не требуются для колонизации опухоли, но и их потеря может повысить противоопухолевую эффективность.

Штаммы с удаленными флагеллами демонстрируют повышенный адаптивный иммунитет в модели опухоли мыши

Оценивали влияние делеции флагеллина на иммунный ответ и то, будет ли активация STING из опухолевых миелоидных клеток с доставкой sh РНК в ген

контрольной точки STINGTREX1 способствовать адаптивной иммунной сигнатуре IFNI типа. Использовали мышиную модель карциномы толстой кишки CT26, где 6-8-недельным самкам мышей BALB/c (5 мышей в группе) инокулировали подкожно в правый бок клетками CT26 (2×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися опухолями на боках через 11 дней после имплантации опухоли внутривенно вводили 5×10^6 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1, или родительского YS1646Δasd-shTREX1, или контрольного штамма со скремблированной плазмидой, YS1646Δasd-shSCR, по сравнению с контролем PBS. У мышей брали кровь через 7 дней после введения дозы в пробирки, покрытые гепарином натрия (BectonDickinson). Затем некоагулированную кровь разводили в том же объеме PBS и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) отделяли от интерфазного слоя цельной крови с использованием реагента для разделения клеток Lympholyte®-M (Cedarlane).

Изолированные PBMC промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут при комнатной температуре и ресуспендировали в проточном буфере. На лунку 96-луночного планшета с V-образным дном высевали один миллион PBMC. Клетки центрифугировали при 1300 об/мин в течение 3 минут при комнатной температуре (КТ) и ресуспендировали в 100 мкл проточного буфера, содержащего флуорохром-конъюгированный пептид AH1: тетрамеры MHC класса I (MBLInternational) и антитела для проточной цитометрии на поверхности клеток CD4 FITC клон RM4 -5; CD8aBV421 клон 53-6,7; клон F4/80 APCBM8; CD11bPE-Cy7 клон M1/70; CD45 BV570 клон 30-F11; CD3 PE клон 145-2C11; клон Ly6CBV785 HK1.4; IA/IEAPC-Cy7 клон M5/114.15.2; клон 1A8 Ly6GBV605; и CD24 PercP-Cy5.5 клон M1/69 (все от BioLegend), в течение 45 минут при комнатной температуре и в темноте. Через 45 мин. клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1200 об/мин в течение 3 мин. Затем клетки ресуспендировали в PBS + 2% FBS, содержащем DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол; мертвая/живая окраска), и данные немедленно получали с использованием проточного цитометраNovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и

анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

Следующие типы клеток были перечислены в процентах от общего количества живых клеток: CD11b $^{+}$ Gr1 $^{+}$ нейтрофилы (возможно, MDSC, хотя потребуется дальнейшее фенотипирование в функциональном анализе exvivo), CD11b $^{+}$ F4/80 $^{+}$ макрофаги, CD8 $^{+}$ Т-клетки и CD8 $^{+}$ Т-клетки, которые распознают антиген отторжения опухоли CT26 gp70 (AH1), продукт оболочечного гена антигена клеточной поверхности, родственного вирусу лейкемии мышей (MuLV) (см., например, Castleetal. (2014) BMC*Genomics* 15(1):190).

Результаты, обобщенные в таблице ниже, показывают, что штамм YS1646Δasd-shSCR, содержащий плазмиду, кодирующую неспецифическую скремблированную shРНК, вызывает типичный антибактериальный иммунный профиль значительного увеличения нейтрофилов по сравнению с PBS ($p = 0,02$). , к штамму YS1646Δasd-shTREX1 с интактными флагеллами ($p = 0,02$) и к штамму YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1 с делецией флагелл ($p = 0,01$), которые имели самые низкие уровни циркулирующих нейтрофилов. Точно так же бактериально-индуцированные макрофаги также были значительно увеличены в штамме YS1646Δasd-shSCR по сравнению с PBS ($p = 0,01$), в штамме YS1646Δasd-shTREX1 ($p = 0,01$) и в штамме YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1 ($p = 0,01$). Таким образом, оба штамма, несущие полезную нагрузку, индуцирующую IFNI типа, были способны перезаписывать нормальный антибактериальный иммунный ответ. который устраняет бактериальные инфекции через нейтрофилы и макрофаги и не индуцирует адаптивный иммунитет, опосредованный Т-клетками. Однако, несмотря на то, что общий уровень циркулирующего CD8^{+} Т-клеток был одинаковым во всех группах, штамм YS1646Δasd/ΔFLG-shTREX1 с делецией флагелл продемонстрировал значительно повышенный процент AH1-тетрамера $^{+}$ CD8 $^{+}$ Т-клеток по сравнению с PBS ($p = 0,04$).

Эти данные демонстрируют возможность конструирования бактерий для доставки вирусоподобных IFN-индуцирующих плазмид I типа в резидентные опухолевые миелоидные клетки. Это приводит к резкому перепрограммированию иммунного ответа в сторону более вирусного и менее бактериального иммунного профиля. Удаление флагелл еще больше усилило сдвиг от рекрутируемых бактериями нейтрофилов и макрофагов к значительному увеличению опухолевых антиген-специфических $CD8^+$ Т-клеток. Таким образом, устранение бактериального воспаления, опосредованного TLR5, может усилить адаптивный иммунитет.

Иммунные клетки	**% живых клеток в среднем±SD**			
	PBS	**YS1646Δ*asd*-shSCR**	**YS1646Δ*asd*-shTREX1**	**YS1646Δ*asd*/ ΔFLG-shTREX1**
Нейтрофилы	6.27 ± 2.62	19.21 ± 9.46	5.87 ± 3.94	4.01 ± 1.65
Макрофаги	10.08 ± 2.11	23.14 ± 9.04	9.12 ± 3.84	7.39 ± 2.11
$CD8^+$ Т-клетки	6.64 ± 0.56	7.17 ± 0.60	7.14 ± 2.30	6.44 + 1.43
$AH1^+$ $CD8^+$ Т-клетки	0.83 ± 0.12	1.06 ± 1.11	2.27 ± 1.44	4.12 ± 3.08

SD = стандартное отклонение

Штаммы с удаленными флагеллами ограничены фагоцитарным миелоидным компартментом иммунных клеток invivo

Согласно литературным данным, штаммы ΔfljB/ΔfliC демонстрируют супрессию многих нижестоящих генов, связанных с SPI-1-опосредованным проникновением в нефагоцитирующие клетки. Чтобы определить, является ли штамм YS1646Δasd/ΔFLG недостаточным для нефагоцитарного поглощения клетками, штамм YS1646Δasd/ΔFLG, конститутивно экспрессирующий mCherry (красный флуоресцентный белок) под бактериальным промотором rpsM, вводили внутривенно в мышей, несущих подкожную опухоль MC38 на боку.

Модель MC38 (мышиная аденокарцинома толстой кишки № 38) была получена аналогично модели CT26 с использованием мутагенеза, но с диметилгидралазином и на мышиной линии C57BL/6 (см., например, Corbettetal. (1975) CancerRes.35(9):2434-2439). Подобно CT26, подкожная имплантация приводит к большему исключению Т-клеток и иммуносупрессивному микроокружению опухоли, чем при ортотопической имплантации в толстую кишку (см., например, Zhaoetal. (2017) Oncotarget 8(33):54775-54787). MC38 имеет более высокую мутационную нагрузку, чем CT26, и аналогичный антиген gp70 вирусного происхождения (p15E), который можно обнаружить с помощью $CD8^+$Т-клетки, хотя и не считается антигеном отторжения. Хотя было обнаружено, что варианты MC38 частично реагируют на терапию контрольных точек, большинство вариантов клеточной линии считаются рефрактерными к контрольным точкам и исключают Т-клетки (см., например, Mariathasanetal. (2018) Nature 555:544-548), включая используемые здесь клетки MC38.

Для этого эксперимента 6-8-недельным самкам мышей C57BL/6 (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки MC38 (5×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с установленными большими опухолями на боках на 34-й день внутривенно вводили 1×10^6 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG-mCherry. Опухоли резецировали через 7 дней после внутривенного введения и разрезали на кусочки 2–3 мм в пробирки softMACS™ C (MiltenyiBiotec), заполненные 2,5 мл ферментной смеси (RPMI-1640, содержащей 10% FBS с 1 мг/мл коллагеназыIV и 20 мкг/мл ДНКазыI). Кусочки опухоли диссоциировали с использованием специальной программы диссоциации OctoMACS™ (MiltenyiBiotec) (опухоли, имплантированные мышам), и весь клеточный препарат инкубировали при перемешивании в течение 45 минут при 37°C. После 45-минутной инкубации проводили второй раунд диссоциации с использованием программы OctoMACS™ (опухоль, имплантируемая мышам), и полученные суспензии отдельных клеток фильтровали через нейлоновую сетку 70 мкМ в пробирку объемом 50 мл. Нейлоновую сетку однократно промывали 5 мл RPMI-1640 + 10% FBS, и клетки фильтровали второй раз, используя новую нейлоновую сетку 70 мкМ, в новую пробирку на 50 мл. Нейлоновую сетку

промывали 5 мл RPMI-1640 + 10% FBS, после чего отфильтрованные клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 минут. Полученные диссоциированные клетки ресуспендировали в PBS и хранили на льду до процесса окрашивания.

Для окрашивания методом проточной цитометрии 100 мкл суспензии отдельных клеток высевали в лунки 96-луночного планшета с V-образным дном. PBS, содержащий мертвый/живой краситель (ZombieAqua™, BioLegend) и реагенты, блокирующие Fc (BDBiosciences), добавляли по 100 мкл на лунку, и клетки инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут. Затемклеткиресуспендировали в PBS + 2% FBS, содержащиеантитела, конъюгированные с флуорохромом (CD4 FITC клон RM4-5; CD8a BV421 клон 53-6.7; F4/80 APC клон BM8; CD11b PE-Cy7 клон M1/70; CD45 BV570 клон 30-F11; CD3 PE клон 145-2C11 ; Ly6C BV785, клон HK1.4; IA/IE APC-Cy7, клон M5/114.15.2; Ly6G BV605, клон 1A8; и CD24 PercP-Cy5.5, клон M1/69, всеизBioLegend) и инкубировалинальду в течение 30 минут. вотьме. Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут и ресуспендировали в фиксирующем буфере для проточной цитометрии (ThermoFisherScientific). Данные проточной цитометрии были получены с использованием проточного цитометраNovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

Результаты показали, что 7,27% инфильтрирующих опухоль моноцитов захватили штамм mCherry с делецией флагелл в микроокружении опухоли.

Точно так же 8,96% популяции опухолеассоциированных макрофагов (TAM) и 3,33% инфильтрирующих опухоль дендритных клеток (ДК) поглощали штамм

mCherry с удаленными флагеллами. Напротив, в популяции CD45-, соответствующей стромальным и опухолевым клеткам, только 0,076% показали положительную экспрессию mCherry (по сравнению с 0,067% фонового окрашивания). Эти данные демонстрируют, что флагеллы и их последующее сигнальное воздействие на SPI-1 необходимы для обеспечения инфекционности эпителиальных клеток, и что их отсутствие ограничивает поглощение бактерий только компартментом фагоцитарных иммунных клеток микроокружения опухоли (т. е. опухолерезидентные иммунные/миелоидные клетки).

Удаление флагелл дает множественные преимущества иммуностимулирующему штамму S. typhimurium, включая устранение TLR5-индуцированных воспалительных цитокинов, которые подавляют адаптивный иммунитет, снижение пироптоза макрофагов, а также поддержание (или усиление) опухолеспецифического обогащения при системном введении, где поглощение ограничивается резидентными опухолевыми фагоцитами.

Пример 5

Разработка и характеристика штамма Salmonella с нокаутом гена pagP

В этом примере штамм YS1646Δ*asd*/ΔFLGдополнительно модифицировали для удаления pagP. Ген pagP индуцируется во время инфекционного жизненного цикла S. typhimurium и кодирует фермент (липид А-пальмитоилтрансферазу), который модифицирует липид А пальмитатом. У S. typhimurium дикого типа экспрессия pagP приводит к образованию гептаацилированной молекулы липида А. У мутанта msbB-, в котором нельзя добавить терминальную ацильную цепь липида А, экспрессия pagP приводит к образованию гексаацилированной молекулы липида А. Было показано, что LPS с гексаацилированным липидом А обладает сильным провоспалительным действием и имеет высокое сродство к TLR4 (гептаацилированныйLPS, обнаруженный у дикого типа, имеет самое высокое сродство к TLR4). В этом примере штамм с делецией pagP и msbB может продуцировать только пентаацилированный липид А.

Конструирование штамма Δ*pagP*

Ген pagP удаляли из штамма YS1646Δ*asd*/ΔFLG с использованием модификаций способов, описанных в предыдущих примерах. Синтетические последовательности плеч гомологии гена pagP, содержащие 203 и 279 оснований левой и правой последовательностей, соответственно, фланкирующие ген pagP, были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0191 (SEQIDNO:331). Кассетугенаканамицина, фланкированнуюсайтамисre/loxP, затемклонировали в pSL0191, а нокаутнуюкассетугенарagPподвергали PCR-амплификации с праймерами pagp-1 (SEQ ID NO:315) и pagp-2 (SEQ ID NO:316) (см. , таблица 1), очищали в геле и вводили в штамм YS1646Δasd/ΔFLG, несущийтермочувствительнуюлямбда-краснуюрекомбинационнуюплазмиду pKD46, путемэлектропорации. Затем ген устойчивости к канамицину обрабатывали с помощью Cre-опосредованной рекомбинации, как описано выше. а чувствительные к температуре плазмиды отверждали путем выращивания при недопустимой температуре. Последовательности нокаута гена pagРамплифицировали с помощью PCR с использованием праймеровpagp-3 (SEQIDNO:317) и pagp-4 (SEQIDNO:318) и подтверждали секвенированием ДНК. Полученное мутантное производное YS1646 было обозначено YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP.

Делеционные мутанты pagP обладают пента-ацилированнымLPS и индуцируют пониженное количество воспалительных цитокинов

Ген pagP также был удален из штамма YS1646Δasd с использованием полученной из лямбда системы рекомбинации Red, как описано у Даценко и Ваннера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA97:6640–6645 (2000)) и выше, для получения штамма YS1646Δasd/ΔpagP. Затем этот штамм подвергли электропорации с плазмидой, содержащей функциональный ген asd, чтобы дополнить удаленный ген asd и обеспечить плазмиды

поддержание в естественных условиях. Липид А затем экстрагировали из этого штамма и оценивали с помощью масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией с матрицей (MALDIMS) и сравнивали с липидом А из штамма S. typhimurium дикого типа ATCC 14028, штамма YS1646 (в котором удален msbB и purI), а также штамм YS1646Δasd. Сальмонелла дикого типа имела второстепенный пик липида А с массой 2034 и главный пик с массой 1796, что соответствует гепта-ацилированному и гекса-ацилированному виду, соответственно, из-за присутствия функционального гена msbB. Штаммы YS1646 и YS1646Δasd с делецией msbB имели основные пики при 1828 и 1585, соответствующие смеси гекса-ацилированного и пентаацилированного липида А. Штамм YS1646Δasd/ΔpagP с делецией msbB и pagP имел только один пик с массой 1585, что соответствует пентаацилированному липиду А.

Чтобы определить, снижает ли LPS с пентаацилированным липидом А из мутантных штаммов ΔpagP сигнальный путь TLR4, к THP-1 добавляли 4 мкг очищенного LPS из штамма дикого типа, штамма YS1646 или штамма YS1646 Δasd/ΔpagP. моноцитарные клетки человека (каталог ATCC № TIB-202), а через 24 часа супернатанты оценивали на наличие воспалительных цитокинов с использованием набора CytometricBeadArray (CBA) (BDBiosciences). Результаты показали, что LPS из штамма YS1646Δasd/ΔpagP индуцирует 25% количества TNF-альфа по сравнению с LPS дикого типа и индуцирует в 7 раз меньше IL-6, чем LPS дикого типа. LPS из штамма YS1646Δasd/ΔpagP индуцировал в 22 раза меньше IL-6, чем штамм YS1646, демонстрируя, что пентаацилированные виды LPS из мутанта ΔpagP значительно менее воспалительны в клетках человека.

Делеция pagP индуцирует значительно меньше IL-6 в первичных макрофагах M2 человека

Чтобы продемонстрировать, что штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP также вырабатывает меньше воспалительного и ограничивающего дозу IL-6 из первичных макрофагов M2 человека, штамм был оценен и сравнен с YS1646Δasd/ΔFLG и родительскими штаммами YS1646. Макрофаги M2,

полученные от доноров-людей, являются репрезентативными для иммуносупрессивных фенотипов, которые сильно обогащены исключенными Т-клетками.

Замороженные PBMC человека, выделенные от здоровых доноров-людей, оттаивали в полной среде (RPMI-1640 + 1X заменимых аминокислот + 5% сыворотки человека AB) и промывали центрифугированием в течение 10 минут при 800 об/мин при комнатной температуре. PBMCресуспендировали в PBS + 2% FBS, и моноциты выделяли отрицательно с использованием набора для истощения CD16 (StemCellTechnologies).

Затем изолированные нетронутые моноциты промывали центрифугированием в PBS + 2% FBS и ресуспендировали в полной среде, содержащей 100 нг/мл колониестимулирующего фактора макрофагов человека (M-CSF) и 10 нг/мл человеческого IL-4. Затем изолированные моноциты (3e5 на лунку) высевали в 24-луночный планшет с конечным объемом 750 мкл. Через два дня после посева среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой, содержащей 100 нг/мл человеческого M-CSF и 10 нг/мл человеческого IL-4. Через два дня (на 4-й день) добавляли по 500 мкл полной среды, содержащей 100 нг/мл человеческого M-CSF и 10 нг/мл человеческого IL-4, на лунку на 48 часов. На 6-й день среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой без цитокинов, отдельно или на среду, содержащую культуры штаммов S. typhimurium при MOI 20. Клетки инфицировали в течение 1 часа, затем промывали PBS и среду заменяли свежей средой, содержащей 50 мкг/мл гентамицина для уничтожения внеклеточных бактерий. Затем лунки промывали, заменяли свежей средой и инкубировали при 37 °C и 5% CO2. Среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой без цитокинов, отдельно или средой, содержащей культуры штаммов S. typhimurium в при MOI 20.

Клетки инфицировали в течение 1 часа, затем промывали PBS. , и среду заменяли свежей средой, содержащей 50 мкг/мл гентамицина для уничтожения внеклеточных бактерий. Затем лунки промывали, заменяли свежей средой и инкубировали при 37 °C и 5% CO2.

Через 48 часов супернатанты собирали и анализировали на содержание цитокинов с использованием набора цитометрических шариков (CBA) человеческого IL-6 (BDBiosciences) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты показали, что уровни секретируемого IL-6 из первичных макрофагов M2 человека, инфицированных родительским штаммом YS1646, составляли в среднем 14839 ± 926 пг/мл, в то время как уровни IL-6 из штамма YS1646Δasd/ΔFLG были значительно ниже — 2075 пг/мл. ± 723 пг/мл (p = 0,004). Это дополнительно подтверждает влияние делеции флагелл и элиминации передачи сигналов TLR5 на индукцию IL-6. Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP вызывал самые низкие уровни IL-6, 332 ± 100 пг/мл, демонстрируя сниженную способность этого модифицированного покрытия LPS стимулировать TLR4, и в результате резко снижалась продукция воспалительного IL-6.

Комбинированные делеции флагелл и pagP значительно улучшают переносимость у мышей

Чтобы определить, являются ли модифицированные штаммы, описанные выше, более аттенуированными, чем родительский штамм YS1646, было проведено исследование средней летальной дозы (LD50). от 3e5 до 3e7 КОЕ штамма YS1646 или производных штаммов YS1646Δasd/ΔFLG, YS1646Δasd/ΔpagP и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP. В отличие от штамма YS1646 производные штаммы также несли плазмиду, кодирующую мышиный IL-2, цитокин, одобренный FDA, который продемонстрировал значительную токсичность при системном введении.

Было обнаружено, что LD50 для штамма YS1646 составляет 4,4 x 10^6 КОЕ (среднее значение двух исследований) в соответствии с ранее опубликованными сообщениями о LD_{50} для YS1646 и более чем в 1000 раз лучше по сравнению с S. typhimurium дикого типа (см. например, Clairmontetal. (2000) J. Infect. Dis.181:1996-2002). Было определено, что LD50 для штамма YS1646Δasd/ΔFLG составляет 2,07×10^7 КОЕ, демонстрируя более чем 4,5-кратное снижение вирулентности по сравнению со штаммом YS1646. Было определено, что LD50 для штамма YS1646Δasd/ΔpagP составляет 1,39 x 10^6 КОЕ, демонстрируя, по крайней мере, 3,2-кратное снижение вирулентности по сравнению со штаммом YS1646, что ожидается, учитывая, что штамм все еще имеет сильно воспалительные флагеллы. LD_{50} для штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP установить не удалось, так как ни одна мышь не умерла при самой высокой введенной дозе, но была >6,2 x 10^7 КОЕ. Таким образом, штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP демонстрирует более чем 14-кратное снижение вирулентности по сравнению с родительским штаммом YS1646. Эти данные демонстрируют, что генетические модификации, описанные выше, снижают вирулентность клинического штамма S. typhimurium, YS1646 (известного также как VNP20009), и, следовательно, приводят к повышенной переносимости у человека.

В фазе I клинических испытаний VNP20009 (см., например, Tosoetal. (2002) J. Clin. Oncol. 20(1):142-152) присутствие бактерий в опухолях пациентов наблюдалось лишь частично при двух самых высоких испытанных дозах, 3×10^8 КОЕ/$м^2$ (присутствие 33%) и 1×10^9 КОЕ/$м^2$ (присутствие 50%), указывая на то, что переносимая доза VNP20009 была слишком низкой для достижения колонизации опухоли. Улучшая переносимость штаммов с помощью модификаций, описанных выше, при необходимости можно вводить более чем в 14 раз более высокие дозы, улучшая процент пациентов, у которых опухоли будут колонизированы, и повышая уровень терапевтической колонизации на опухоль, тем самым решая проблему cVNP20009.

Комбинированные делеции флагелл и pagP значительно ограничивают образование антител анти-S. typhimurium у мышей

Выживших мышей из группы, получавшей 3 x 10 ^{6} КОЕ, как описано выше (N=5, за исключением N=4 в группе, получавшей YS1646), содержали в течение 40 дней после внутривенного введения, после чего у них брали кровь на сыворотку и оценивали титры антител к S. typhimurium с помощью модифицированной проточной системы титрования антител. Ночные культуры штамма YS1646Δasd/ΔFLG-mCherry промывали и фиксировали буфером для фиксации проточной цитометрии. Сыворотки от ранее обработанных мышей и от ранее не получавших лечение мышей высевали в 96-луночный планшет и проводили серийные разведения в PBS. Затем 25 мкл культур YS1646Δasd/ΔFLG-mCherry, содержащих 1 x 10 ^{6}КОЕ добавляли к сыворотке и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре. Затем бактерии дважды промывали PBS, вращая их при 4000 об/мин в течение 5 минут. После последней промывки бактерии ресуспендировали в PBS, содержащем вторичное козье антитело против мышиного FcAF488 (разведение 1/400 от запаса), и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре и в защищенном от света месте. Затем бактерии трижды промывали PBS, вращая их при 4000 об/мин в течение 5 минут. После последней промывки бактерии ресуспендировали в PBS, и данные получали с использованием проточного цитометраNovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и анализировали с использованием программного обеспечения MFIFlowJo™ (TreeStar, Inc.).

Для оценки результатов с помощью проточной цитометрии выбирали самое высокое разведение с сигналом во всех группах (1250-кратное разведение сыворотки) и наносили на график соответствующие значения средней интенсивности флуоресценции (MFI). Предел обнаружения (LOD) был выбран при MFI 1000, так как это MFI, полученный без окрашивания, а также с фоновым окрашиванием только козьим антителом против мышиного FcAF488. Таким образом, MFI выше 1000 считался положительным сигналом, а все, что было равно или меньше этого значения, считалось отрицательным результатом, несмотря на наличие значения MFI.

Результаты этого анализа выявили высокий титр MFI анти-S. typhimurium сывороточных антител от мышей, получавших 3 x 10 ^{6}КОЕ штамма YS1646 (MFI 29196,3 ± 20730) в соответствии с ранее опубликованными данными о том, что YS1646 способен генерировать сывороточные антитела (которые не нейтрализуют). Меньшее количество антител было обнаружено у мышей, обработанных штаммом YS1646Δasd/ΔFLG (MFI 11257 ± 9290), что может быть связано с отсутствием адъювантной активности флагелл. У мышей, обработанных штаммом YS1646Δasd/ΔpagP, вырабатывалось значительно меньше антител (MFI 4494 ± 3861) по сравнению со штаммом YS1646 (p = 0,033), что может быть связано с измененным покрытием поверхности LPS. Наиболее значительное снижение сывороточных антител было продемонстрировано в группе обработки YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP (MFI 1930 плюс минус 2445), где несколько мышей имели титры MFI ниже 1000 и, таким образом, считались отрицательными в отношении сывороточных антител (p = 0,021, против штамма YS1646).

Таким образом, объединенные делеции флагелл и гена pagP способны как к улучшению безопасности так и к значительному снижению иммуногенности.

Штаммы pagP и с удаленными флагеллами и их комбинация демонстрируют значительно более высокую жизнеспособность в сыворотке крови человека по сравнению со штаммом YS1646.

Штамм YS1646 демонстрирует ограниченную колонизацию опухолей у людей после системного введения. Здесь показано, что штамм YS1646 инактивируется факторами комплемента в крови человека. Чтобы продемонстрировать это, штаммы YS1646 и E. coliD10B сравнивали с иллюстративными иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе, которые содержат дополнительные мутации, изменяющие поверхность

бактерий. Этитипичныемодифицированныештаммыпредставлялисобой YS1646Δasd/ΔpagP, YS1646Δasd/ΔFLG и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP. Эти три штамма, в дополнение к культурам YS1646 и E. coliD10B, инкубировали с сывороткой или сывороткой, инактивированной нагреванием (HI), либо из пула

крови мыши, либо из пула крови здоровых людей (n = 3) в течение 3 часов при 37 °C.

В сыворотке мыши все штаммы сохраняли 100% жизнеспособность и были полностью устойчивы к инактивации комплемента. В сыворотке человека все штаммы были на 100% жизнеспособны в сыворотке, инактивированной нагреванием. Штамм E. coliD10B полностью элиминировался через 3 часа из цельной сыворотки крови человека. В цельной человеческой сыворотке штамм YS1646 показал только 6,37% живых колоний, демонстрируя, что опухолевая колонизация клинического штамма YS1646 была ограничена из-за инактивации комплемента в крови человека. Для штамма YS1646Δasd/ΔFLG осталось 31,47% живых колоний, а для штамма YS1646Δasd/ΔpagP осталось 72,9% живых колоний после инкубации с сывороткой человека в течение 3 часов. Комбинированный штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP был полностью устойчив к комплементу в сыворотке крови человека.

Эти данные объясняют, почему штамм YS1646 (VNP20009) имеет очень низкую колонизацию опухоли при системном введении. Здесь показано, что штамм YS1646 высокочувствителен к инактивации комплемента в сыворотке человека, но не в сыворотке мыши. Эти данные объясняют, почему у людей наблюдалась ограниченная колонизация опухолей, тогда как опухоли мышей были колонизированы на высоком уровне. Делеции fljB/fliC или pagP или комбинация этих мутаций частично или полностью восстанавливают этот фенотип. Таким образом, повышенная стабильность, наблюдаемая в сыворотке человека штаммами YS1646Δasd/ΔpagP, YS1646Δasd/ΔFLG и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP, обеспечивает повышенную колонизацию опухолей человека.

Пример 6

Разработка и характеристика штамма Salmonella с нокаутом гена ansB

В этом примере штамм YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP* был дополнительно модифицирован для удаления ansB, гена, кодирующего бактериальную L-

аспарагиназуII. Было показано, что секреция L-аспарагиназыIIS. typhimurium в присутствии Т-клеток напрямую нарушает функцию Т-клеток за счет снижения экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) и нарушения продукции цитолитических цитокинов. В результате аспарагиназы бактериального происхождения успешно использовались для лечения острого лимфобластного лейкоза (ALL) на протяжении десятилетий. Делеция ansB устраняет способность S. typhimurium продуцировать L-аспарагиназуII, тем самым усиливая функцию Т-клеток в микроокружении опухоли, колонизированной бактериями.

Создание штамма Δ*ansB*

Ген ansB был удален из штамма YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*с использованием модификаций способов, описанных в предыдущих примерах. Были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0230 (SEQIDNO:332), синтетические последовательности плеч гомологии гена ansB, содержащие 236 и 251 основание левой и правой последовательностей, соответственно, фланкирующие ген ansB. Кассетугенаканамицина, фланкированнуюсайтамиcre/loxP, затемклонировали в плазмиду pSL0230, а кассету с нокаутомгенаansBподвергалиPCR-амплификации с праймерами ansb-1 (SEQ ID NO:319) и ansb-2 (SEQ ID NO:320), гельочищены и введены в штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP, несущийтермочувствительнуюлямбда-краснуюрекомбинационнуюплазмиду pKD46, путемэлектропорации. Затем ген устойчивости к канамицинуобработали с помощью Cre-опосредованной рекомбинации, как описано выше, итермочувствительные плазмиды обработали путем выращивания при недопустимой температуре. Последовательности нокаута гена ansBамплифицировали с помощью PCR с использованием праймеровansb-3 (SEQIDNO:321) и ansb-4 (SEQIDNO:322) (см. Таблицу 1) и подтверждали секвенированием ДНК. Полученное мутантное производное YS1646 было обозначено как YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB.

Делеция ansB устраняет активность аспарагиназыinvitro.

Чтобы определить, продуцирует ли штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB меньше L-аспарагиназыII, культуры этого штамма вместе с интактным штаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP выращивали в LB и позволяли достичь стационарной фазы. В это время 50 мкл кондиционированной среды из культур анализировали на активность аспарагиназы с использованием набора для колориметрического анализа аспарагиназы (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителя. После 40-минутной инкубации единицы поглощения считывали на спектрофотометре SpectraMax® M3 (MolecularDevices) при поглощении 570 нм.

По сравнению с положительным контролем рекомбинантной L-аспарагиназыII, которая давала поглощение 1,95, поглощение ansB-интактного штамма YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP* составляло 0,82. Однако делеция ansB в штамме YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB приводила к фоновым уровням активности аспарагиназы, обнаруженным при поглощении 0,109. Эти данные подтверждают, что мутация ΔansB полностью устраняет активность аспарагиназы.

Делеция ansB восстанавливает функцию Т-клеток в анализе совместного культивирования invitro

Инфицированные мышиные первичные макрофаги костного мозга (BMM) находились в культуре с очищенными Т-клетками селезенки. Для этого анализа были выделены и диссоциированы селезенки здоровых мышей BALB/c, а селезеночные $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клетки выделяли с использованием набора для выделения мышиных Т-клеток (StemCellTechnologies) в соответствии с инструкциями производителя. Из выделенных Т-клеток добавляли по 2e5 клеток на лунку в 96-луночный планшет с плоским дном, который предварительно был покрыт 5 мкг/мл антитела против мышиного CD3ε (клон 145-2C11, ThermoFisherScientific). Кондиционированные среды LB из культур

YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB, выращенных до стационарной фазы, фильтровали через нейлоновую сетку 0,45 мкМ и добавляли к Т-клеткам с добавлением или без добавления 10 мкг/ мл агонистического антитела к CD28 для костимуляции. Контрольные группы, содержащие рекомбинантную аспарагиназу в количестве 20 ЕД/мл и нормальную культуральную среду, использовали в качестве контроля в анализе. Планшет инкубировали при 37°C в среде с 5% CO2 инкубатор. Через 24 часа после инкубации из лунок собирали 100 мклсупернатантов совместной культуры и выполняли массив гранул цитокинов, специфичных для мышиных Th1 (CBA, BioLegend). Одновременно собирали Т-клетки и анализировали на экспрессию поверхностного Т-клеточного рецептора β (TCRβ) на $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках с помощью проточной цитометрии, а также на внутриклеточное окрашивание IFNγ, TNFα и IL-2. .

Результаты подтвердили, что ans- В-интактный штамм (YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP), используемый для заражения макрофагов и впоследствии совместно культивируемый с Т-клетками, вызывает сильную иммуносупрессию Т-клеток. Это проявлялось заметным подавлением поверхностной экспрессии TCRβ как в $CD4^+$, так и в $CD8^+$ Т-клетках (см. таблицу ниже) по сравнению с контролем среды и положительным контролем рекомбинантной аспарагиназы при 20 ед./мл. Делеция ansB в штамме YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB значительно восстанавливала поверхностную экспрессию TCRβ как в $CD4^+$ ($p = 0,004$), так и в $CD8^+$ Т-клетках ($p = 0,002$) по сравнению с родительским штаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP.

Обработка	**TCRβэкспрессия (MFIсреднее±SD)**	
	$CD4^+$ T-Cells	**$CD8^+$ T-Cells**
Контроль среды	8141± 405.9	12655 ± 534.6
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*	3817 ± 200.8	6492 ± 260.2
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*	7047.5 ± 204.4	13350 ± 339.4

Рекомбинантная аспарагиназаII (20 ед/мл)	4253.5 ± 576.3	6305 ± 687.3

SD = Стандартное отклонение

Секрецию цитокинов Т-клетками через 24 часа после совместного культивирования измеряли как маркер цитолитической функции Т-клеток. Как показано в таблице ниже, продукция Т-клетками цитокинов IFNγ, TNFα и IL-2 была заметно ниже после обработки штаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP по сравнению с контрольной средой и значительно восстанавливалась при делеции ansB в штамме YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB (IFNγ (p = 0,05), TNFα (p = 0,012) и IL-2 (p = 0,006)). Эти данные показывают, что делеция ansB в штамме YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB значительно восстанавливает цитолитическую функцию Т-клеток по сравнению с родительским штаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP.

Обработка	**Т-клеточнаяэкспрессия цитокина (пг/мл, среднее±SD)**		
	IFNγ	**TNFα**	**IL-2**
Контроль среды	4176.1 ± 20.8	136.0 ± 11.1	3118.2 ± 154.3
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*	238.1 ± 0.6	35.7 ± 7.1	134.9 ± 12.7
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*	1788.9 ± 515.5	120.5 ± 11.2	1947.6 + 190.5
Рекомбинантная аспарагиназаII (20 ед/мл)	166.2 ± 19.7	33.2 ± 3.4	114.5 ± 4.8

SD = Стандартное отклонение

Делеция ansB восстанавливает экспрессию TCRβInVivo

В анализах совместного культивирования invitro экспрессия ansB продемонстрировала иммуносупрессивное действие на функцию Т-клеток, включая подавление TCRβ на Т-клетках с помощью проточной цитометрии. Чтобы оценить, будет ли это происходить аналогичным образом invivo, использовали модель колоректального рака на мышах MC38.

Для этого эксперимента 6-8-недельным самкам мышей C57BL/6 (4 мыши в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки MC38 (5×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с установленными большими опухолями на боках на 17-й день внутривенно вводили 1×10^7 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG-mCherry. Опухоли резецировали через 7 дней после внутривенного введения и разрезали на кусочки по 2-3 мм в пробирки softMACS™ C (MiltenyiBiotec), заполненные 2,5 мл ферментной смеси (RPMI-1640, содержащей 10% FBS с 1 мг/мл коллагеназыIV и 20 мкг/мл). мл ДНКазыI). Кусочки опухоли диссоциировали с использованием специальной программы диссоциации OctoMACS™ (MiltenyiBiotec) (опухоли, имплантированные мышам), и весь клеточный препарат инкубировали при перемешивании в течение 45 минут при 37°C. После 45 минут инкубации проводили второй цикл диссоциации с использованием программы OctoMACS™ (опухоль, имплантируемая мышам), и полученные суспензии отдельных клеток фильтровали через нейлоновую сетку 70 мкМ в пробирку объемом 50 мл. Нейлоновую сетку один раз промывали 5 мл RPMI-1640 + 10% FBS, и клетки фильтровали второй раз, используя новую нейлоновую сетку 70 мкМ в новую пробирку 50 мл. Нейлоновую сетку промывали 5 мл RPMI-1640 + 10% FBS, после чего отфильтрованные клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 минут. Полученные диссоциированные клетки ресуспендировали в PBS и хранили на льду до процесса окрашивания.

Для окрашивания методом проточной цитометрии 100 мкл суспензии отдельных клеток высевали в лунки 96-луночного планшета с V-образным дном. PBS, содержащий мертвый/живой краситель (ZombieAqua™, BioLegend) и реагенты, блокирующие Fc (BDBiosciences), добавляли по 100 мкл на лунку, и клетки инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. Через 30 минут

клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут. Затемклеткиресуспендировали в PBS + 2% FBS, содержащемконъюгированные с флуорохромомантитела (CD45 BV570, клон 30-F11; TCR β PE, клон H57-597; и CD4 FITC, клон RM4-5; всеотBioLegend) и DAPI (BioLegend). инкубировалинальду в течение 30 минут в темноте. Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут. и ресуспендировали в буфере для фиксации проточной цитометрии (ThermoFisherScientific). Данные проточной цитометрии были получены с использованием проточного цитометраACEANovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

Как показано в таблице ниже, средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для поверхностной экспрессии TCRβ на инфильтрирующих опухоль CD4 $^{+}$ Т-клетках после их взаимодействия внутри опухолей с колонизированным родительским штаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP была значительно ниже. чем у штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB с делецией ansB (p = 0,042), который был выше, чем даже у мышей, получавших контроль PBS.

	MFIдляэкспресииTCRβнаопухолеинфильтрующихCD4^{+}Т-клетках		
	PBS	**YS1646 Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP***	**YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB***
	13980	13933	14412
	14543	13480	14957
	14177	12087	14844
	13931	14010	14233
AVG	**14157.8**	**13377.5**	**14611.5**
SD	**278.0**	**891.5**	**344.7**

MFI = средняя интенсивность флюоресценции; AVG = среднее; SD = стандартное отклонение В совокупности эти данные подтверждают необходимость удаления гена ansB для восстановления функции Т-клеток вследствие продукции бактериями иммуносупрессивнойL-аспарагиназыII и демонстрируют усиленную функцию Т-клеток, наблюдаемую при делеции ansB в штамме YS1646Δasd /ΔFLG/ ΔpagP/ ΔansB.

Пример 7

Разработка и характеристика штамма с нокаутным геном csgDSalmonella

Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB был дополнительно модифицирован для удаления csgD, главного гена, который контролирует образование фимбрийS. typhimuriumcurli, целлюлозы и c-di-GMP. Делеция csgD устраняет возможность образования биопленки, опосредованной целлюлозой, снижает провоспалительную сигнализацию и усиливает поглощение фагоцитарными клетками хозяина. Таким образом, это увеличение внутриклеточной локализации должно повысить эффективность доставки плазмиды и продукции иммуномодулирующего белка.

Создание штамма *ΔcsgD*

Ген csgD был удален из штамма YS1646 asd/FLG/pagP/ansB с использованием модификаций способов, описанных в предыдущих примерах.

Синтетические последовательности плеч гомологии гена csgD, содержащие 207 и 209 оснований левой и правой последовательностей, соответственно, фланкирующие ген csgD, были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0196 (SEQIDNO:333). Кассетугенаканамицина, фланкированнуюсайтамиcre/loxP, затемклонировали в плазмиду pSL0196, а нокаутнуюкассетугенacsgDподвергали PCR-амплификации с праймерами csgd-1

(SEQ ID NO:323) и csgd-2 (SEQ ID NO:324), очищали в геле и вводили в штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ansB, несущийтермочувствительнуюлямбда-краснуюрекомбинационнуюплазмиду pKD46, путемэлектропорации. Затем ген устойчивости к канамицину обработали с помощью Cre-опосредованной рекомбинации, как описано выше, а чувствительные к температуре плазмиды обработали путем роста при непереносимой температуре. Последовательности нокаута гена csgDамплифицировали с помощью PCR, с использованием праймеровcsgd-3 (SEQIDNO:325) и csgd-4 (SEQIDNO:326) и подтверждали секвенированием ДНК. Полученное мутантное производное родительского штамма YS1646 было обозначено как YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD.

Штаммы с делецией csgD не могут образовывать колонии RDAR на чашках с конго красным

Способность образовывать колонии RoughDryAndRed (RDAR) после роста на чашках с конго красным является хорошо проверенным анализом образования бактериальной биопленки. Шероховатая и сухая текстура возникает из-за производства целлюлозы, а красный - из-за накопления пигмента поверхностными структурами бахромчатых завитков. Дляэтогоанализаштамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansBсравнивалисоштаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgDнаспособностьформироватьфенотип RDAR послеинкубацииначашках с агаром с конгокрасным.

Чашки с агаром с конго красным готовили с соейтоном (10 г/л) и дрожжевым экстрактом (5 г/л) (модифицированный LB без NaCl) и добавляли конго красный (40 мг/л) и кумасси бриллиантовый синий G-250 (20 мг/л). Пять микролитров бактериальной культуры в стационарной фазе наносили на чашки с красным конго и инкубировали при 37°C в течение 16 часов, затем переносили при 30°C и инкубировали еще в течение 120 часов. Визуальный анализ морфологии и цвета колоний выполняли и ежедневно регистрировали, чтобы подтвердить наличие или отсутствие морфотипа колоний RDAR.

При сравнении морфотипов колоний между двумя штаммами штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD имел гладкий фенотип, а в колониях отсутствовал пигмент. Для сравнения, штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB, все еще содержащий ген csgD, демонстрировал классический грубый и сухой вид и явные признаки поглощения пигмента. Таким образом, функциональный анализ подтверждает, что штамм ΔcsgD не способен образовывать биопленки, поскольку у него отсутствуют фимбриикурли и продукция целлюлозы.

Штаммы с делецией csgD демонстрируют превосходную противоопухолевую эффективность на высокорезистентной мышиной модели тройного негативного рака молочной железы

Было оценено влияние делеции csgD на модели, где иммуностимулирующая бактериальная терапия колонизирует опухоли, но показала ограниченную эффективность. Это может указывать на присутствие продуцируемой бактериями целлюлозы, которая может ограничивать поглощение резидентными опухолевыми миелоидными клетками, тем самым ограничивая терапевтический эффект (см., например, Crulletal. (2011) CellularMicrobiology 13(8):1223–1233). Была использована трудно поддающаяся лечению модель EMT6, которая является репрезентативной моделью тройного негативного рака молочной железы человека (см., например, Yuetal. (2018) PLoSONE 13(11):e0206223). Когда опухолевые клетки EMT6 вводят ортотопически в жировую ткань молочной железы, а не подкожно в бок, модель исключает Т-клетки, сильно метастазирует и очень резистентна к иммунотерапии, в том числе ко всем утвержденным антителам контрольных точек (см., например, Mariathasan и др.(2018) *Nature* 554: 544–548).

Для этого эксперимента самкам мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) вводили в жировую ткань левой молочной железы опухолевые клетки EMT6 (ATCC # CRL-2755) (2×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившейсяопухольюмолочнойжелезы 13-дневного возраста (~55 $мм^3$)внутривенновводилиоднократнуюдозу 1×10^7 КОЕ csgD-делетированногоштамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgDилиисходного

YS1646Δasd/ΔFLG/ ШтаммΔpagP/ΔansB и посравнению с контролем PBS. Бактериальные штаммы содержали плазмиду, экспрессирующую конститутивно активный мышиный STING (EF-1αmuSTINGR283G).

Опухоли у мышей, получавших PBS, росли равномерно, достигая максимального объема опухоли на 35-й день (1199,0 ± 298,1 мм^3). Мыши, получавшие интактный штамм csgD, YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB, не демонстрировали доказательств противоопухолевой эффективности в этой модели, также достигая максимального объема опухоли на 35-й день (1689,1 ± 537,0). Exvivo посев LB этих опухолей показал, что все опухоли были колонизированы. Однако csgD-делетированный штамм, YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, приводил к полному излечению 3 из 5 мышей как от их первичного, так и от любого метастатического заболевания (день 60+). Общее ингибирование роста опухоли (TGI) составило 45,7%, при этом одна из двух оставшихся опухолей частично отреагировала, прежде чем в конечном итоге выросла. Два бактериальных штамма содержали одинаковую плазмидную нагрузку, но только один продемонстрировал значительную противоопухолевую эффективность. Таким образом, в одной из наиболее трудноизлечимых и высокометастатическихсингенных моделей опухолей, ортотопической EMT6, штамм с делецией *csgD*был спообен индуцировать системную противоопухолевую эффективность, и результат в 60% полных ответов.

Штаммы с удаленным csgD демонстрируют повышенное внутриклеточное поглощение invivo

Чтобы определить, продемонстрировал ли штамм с делецией csgD повышенную эффективность из-за большего поглощения бактериями резидентных опухолевых миелоидных клеток, был проведен exvivo анализ защиты гентамицином (см. Crulletal. (2011) CellularMicrobiology 13(8): 1223–1233). Для этого эксперимента 6-8-недельным самкам мышей C57BL/6 (4 мыши в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки MC38 (5×10 ^{5} клеток в 100 мклPBS). Мышам с установленными большими опухолями на боках на 17-й

день внутривенно вводили 1×10^7 КОЕ csgD-делетированного штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD (N=12) или родительского штамма YS1646 (N=4). Опухоли резецировали через 7 дней после внутривенного введения, взвешивали и измельчали в среде RPMI с добавлением 1 мг/мл коллагеназыIV и 20 мг/мл ДНКазыI и инкубировали при встряхивании при 37 °C в течение 30 минут для получения суспензии отдельных клеток. Через 30 минут суспензию пропускали через 70-мм фильтр, а извлеченный объем делили на две отдельные идентичные пробы. Гентамицин (ThermoFisherScientific) добавляли в количестве 200 мг/мл к одному из каждого из парных образцов для уничтожения внеклеточных бактерий, и образцы инкубировали при встряхивании при 37 °C в течение 90 минут. Затем образцы клеточной суспензии промывали и лизировали 0,05% TritonX и высевали на чашки с агаром LB для подсчета КОЕ.

Результаты показывают, что по сравнению с КОЕ из опухолей, обработанных YS1646, без обработки гентамицином (11925 ± 19859 КОЕ), обработка гентамицином привела к очень небольшому количеству КОЕ, обнаруженных в опухолях (51 ± 45 КОЕ). Это указывает на то, что бактерии находятся в основном внеклеточно в этих опухолях и, таким образом, чувствительны к элиминации гентамицина. В группе лечения YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD с делецией csgD опухоли, не обработанные гентамицином, давали высокие КОЕ, как и ожидалось от хорошо колонизированных опухолей, а лечение гентамицином давало меньше КОЕ (1276 ± 2410 КОЕ), и намного больше, чем в опухолях, обработанных родительским штаммом YS1646. Это связано с тем, что большее количество csgD-делетированных бактерий находится внутриклеточно и, таким образом, защищено от гентамицина. Эти данные демонстрируют, что делеция csgD улучшает внутриклеточное поглощение бактерий, что может повысить доставку иммуномодулирующих белков *invivo.*

Пример 8

Создание вектора pATI-1.75

Была разработана и синтезирована плазмида (pATI-1.75), которая содержит следующие признаки: точка начала репликации pBR322, ген asd, ген устойчивости к канамицину, фланкированный сайтами HindIII для отверждения, и сайт множественного клонирования для вставки экспрессионной кассеты. Кассета экспрессии состоит из множества элементов, включая эукариотические промоторы, открытые рамки считывания (ORF), посттранскрипционные регуляторные элементы и сигналы полиаденилирования, которые собраны в различных конфигурациях.

Типичные промоторы включают в себя непосредственно ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV), кодируемый непосредственно ниже последовательности немедленно раннего энхансера CMV, и коровый промотор фактора элонгации человека-1 альфа (EF-1альфа).

Открытые рамки считывания (ORF) могут включать одну или несколько последовательностей, каждая из которых транслируется в белок, и могут быть разделены на отдельные полипептиды путем вставки последовательности 2A, при этом эукариотические рибосомы не могут вставить пептидную связь между остатками Gly и Pro внутри последовательность 2A. Примерами последовательностей 2A являются пептид T2A (SEQIDNO:327) из капсидного белка вируса Thoseaasigna (TaV) и пептид P2A (SEQIDNO:328) из свиного тешовируса (PTV). Вышестоящие сайты фуринового расщепления (RRKR) и другие энхансерные элементы располагаются выше, чтобы облегчить расщепление для разделения экспрессируемых белков.

Примеры посттранскрипционных регуляторных элементов (PRE) включают PRE вируса гепатита сурка (WPRE; SEQIDNO:346) и PRE вируса гепатита B (HPRE; SEQIDNO:347), которые увеличивают накопление цитоплазматической мРНК гена, способствуя ядерному экспорту мРНК в цитоплазму, усиливая процессинг 3'-конца и стабильность. Примеры сигнальных последовательностей

полиаденилирования включают сигнал полиаденилированияSV40 и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста, оба из которых являются 3'-регуляторными элементами, которые служат для стимуляции терминации транскрипции, и содержат звено последовательности, распознаваемое комплексом расщепления РНК.

Пример 9

Сконструированные плазмиды для экспрессии гетерологичных белков индуцируют выработку функционального белка клетками человека

Оптимальная экспрессия цитокинов, установленная в клетках человека

Чтобы проиллюстрировать, что иммуностимулирующие цитокины могут экспрессироваться из сконструированных плазмид в клетках человека, панель цитокинов клонировали в плазмиду pATI-1.75 под контролем промотора EF-1α. Цитокины включают, но не ограничиваются ими, мышиный IL-2 (muIL-2), muIL-12p70, muIL-23 и человеческий IL-2 (huIL-2). Для muIL-15 Receptor-α, слитого с одноцепочечной IL-15 (muIL-15R α-IL-15sc), тестировали EF-1 α и промотор CMV. Клетки HEK293TSTINGNull (InvivoGen) высевали в 24-луночные планшеты, покрытые поли-L-лизином, по 200 000 клеток на лунку, в течение ночи при 37 °C в среде с 5% CO_2 инкубаторе, чтобы достичь 80% слияния. На следующий день 200 нг каждой цитокиновойплазмидной ДНК разбавляли в бессывороточной среде и добавляли к реагенту для трансфекции FuGENE® (Promega) при соответствующем соотношении реагент:ДНК с нетрансфицированными лунками в качестве отрицательного контроля (в дублях). Супернатанты клеточных культур из каждого образца собирали через 24 часа после трансфекции и оценивали экспрессию белка с помощью ELISA, специфичного для каждого цитокина.

Конструкцию muIL-2 оценивали с помощью ELISA мышиного IL-2 (R&DSystems) в соответствии с инструкциями производителя, а также

оценивали дополнительную версию muIL-2 с оптимизацией кодонов (muIL-2 CO). Были проверены концентрации чистого супернатанта, и они дали в среднем 1680 пг/мл muIL-2 для конструкции muIL-2 и 1812 пг/мл muIL-2 для конструкции muIL-2 CO. Эти данные подтвердили функциональность конструкций и продемонстрировали, что выход может быть улучшен за счет оптимизации кодонов. Конструкцию muIL-12p70 оценивали с помощью иммуноферментного анализа мышиного IL-12 (R&DSystems) в соответствии с протоколом производителя. Когда супернатанты добавляли в чистом виде, среднее значение секретируемого muIL-12p70 составляло 400 мкг/мл, хотя это выходило за пределы линейного диапазона. При разбавлении супернатантов в 5 раз было обнаружено в среднем 105 пг/мл секретируемого muIL-12p70. Для плазмиды muIL-23 определение белка было достигнуто с использованием мышиного IL-23 ELISA (BioLegend) в соответствии с инструкциями набора. При добавлении чистого супернатанта было обнаружено среднее значение 966 пг/мл muIL-23. Для плазмиды человеческого IL-2 определение белка было достигнуто с использованием человеческого IL-2 ELISA (Invitrogen) в соответствии с инструкциями набора. При добавлении чистого супернатанта было обнаружено в среднем 1422 пг/мл huIL-2. Для конструкции muIL-15Rα-IL-15sc, экспрессированной с использованием промоторов EF-1 α или CMV, использовали ELISA мышиного IL-15 (eBioscience, Inc.) в соответствии с инструкциями к набору. При добавлении в чистом виде плазмида muIL-15Rα-IL-15sc с промотором EF-1 α давала в среднем 131 пг/мл, в то время как плазмида muIL-15Rα-IL-15sc с промотором CMV давала в среднем 131 пг/мл. 289 пг/мл.

Эти данные подтверждают экспрессионные конструкции плазмид, кодирующие иммуномодулирующие цитокины, как мышиные, так и человеческие, в клетках человека. Кроме того, они указывают, что оптимизация кодонов и использование промоторов, таких как CMV, могут усиливать экспрессию белка.

Посттранскрипционные регуляторные элементы усиливают экспрессию цитокинов

Чтобы определить, усиливают ли посттранскрипционные регуляторные элементы (PRE), добавленные на 3'-конце ORF, экспрессию иммуностимулирующих цитокинов в клетках человека, экспрессию huIL-2 под контролем промотора EF-1 α, тестировали с добавлением или без добавления посттранскрипционного регуляторного элемента вируса гепатита сурков (WPRE) в плазмиде pATI-1.75.

Клетки HEK293TSTING (InvivoGen) высевали в 24-луночные планшеты, покрытые поли-L-лизином, по 200 000 клеток на лунку, в течение ночи при 37 °C в инкубаторе с 5% CO2 для достижения 80% слияния. На следующий день 200 нг каждой цитокиновойплазмидной ДНК разбавляли в бессывороточной среде и добавляли к реагенту для трансфекции FuGENE® (Promega) при соответствующем соотношении реагент:ДНК с нетрансфицированнымилунками в качестве отрицательного контроля (в дублях). Супернатанты клеточных культур из каждого образца собирали через 24 часа после трансфекции и оценивали на активность с помощью ELISA человеческого IL-2 (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Супернатанты добавляли в чистом виде или разбавляли в 5 раз.

Результаты показали, что при добавлении чистого супернатанта по сравнению с конструкцией huIL-2 без WPRE, которая секретировала в среднем 1540 пг/мл, конструкция huIL-2 с WPRE секретировала 5511 пг/мл, что в 3,6 раза большее увеличение. В 5-кратно разбавленных супернатантах конструкция huIL-2 без WPRE секретировала 315 пг/мл huIL-2, в то время как конструкция huIL-2 с WPRE секретировала 1441 пг/мл, то есть увеличение в 4,6 раза. Таким образом, добавление 3'-посттранскрипционных регуляторных элементов, например, но не ограничиваясь этим, WPRE, может значительно улучшить экспрессию белка в клетках человека.

Оптимизация промотора и посттранскрипционные регуляторные элементы усиливают продукцию цитокинов в первичных макрофагах M2

В то время как экспрессия цитокинов, таких как muIL-15Rα-IL-15sc, усиливалась в клетках HEK293T человека при использовании промотора CMV, было определено, может ли экспрессия цитокинов аналогичным образом усиливаться в первичных макрофагах M2 человека, полученных от донора, преобладающий фенотип макрофагов в исключенных Т-клетках, солидных опухолях человека. Кроме того, было определено, могут ли посттранскрипционные регуляторные элементы, такие как WPRE, усиливать экспрессию в этих клетках.

Чтобы определить, можно ли улучшить экспрессию белка, промоторы EF-1 α и CMV тестировали на предмет контроля экспрессии muIL-2, а посттранскрипционный регуляторный элемент WPRE тестировали на экспрессию huIL-2.

Замороженные PBMC человека, выделенные от здоровых доноров-людей, оттаивали в полной среде (RPMI-1640 + 1X заменимых аминокислот + 5% человеческой сыворотки AB) и промывали центрифугированием в течение 10 минут при 800 об/мин при комнатной температуре. PBMCресуспендировали в PBS + 2% FBS, и моноциты выделяли отрицательно с использованием набора для истощения CD16 (StemCellTechnologies). Выделенные моноциты культивировали в течение 6 дней в среде RPMI, содержащей M-CSF и IL-4, для получения макрофагов M2. Для этого изолированные нетронутые моноциты промывали центрифугированием в PBS + 2% FBS и ресуспендировали в полной среде, содержащей 100 нг/мл человеческого M-CSF и 10 нг/мл человеческого IL-4. Затем изолированные моноциты (3e5 на лунку) высевали в 24-луночный планшет с конечным объемом 750 мкл. Через два дня после посева среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой, содержащей 100 нг/мл человеческого M-CSF и 10 нг/мл человеческого IL-4. Через два дня (на 4-й день) в каждую лунку добавляли по 500 мкл полной среды, содержащей 100 нг/мл человеческого M-CSF и 10 нг/мл человеческого IL-4, и инкубировали в течение 48 часов. На 6-й день среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной

средой без цитокинов для трансфекции реагентом для трансфекции мРНК и плазмиды Viromer® RED (Lipocalyx).

Трансфекцию Viromer® RED проводили в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 500 нгплазмидной ДНК, содержащей конструкцию EF-1 α-muIL-2, конструкцию CMV-muIL-2, конструкцию EF-1 α-huIL-2 или конструкцию EF-1 α-huIL-2 + Конструкцию WPRE, а также нетрансфицированный контроль разводили в предоставленном буфере, смешивали с 0,2 мклViromer® RED и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут для образования комплексов Viromer®. Затем комплексы ДНК/Viromer® RED медленно добавляли в каждую лунку 24-луночного планшета (в повторах) и планшет инкубировали при 37 °C в CO2-инкубаторе в течение 24 часов. Супернатанты собирали через 24 часа и анализировали на содержание цитокинов с использованием либо мышиного IL-2 ELISA (R&DSystems), либо человеческого IL-2 ELISA (Invitrogen) в соответствии с инструкциями набора.

Результаты показали, что экспрессия muIL-2 из чистых супернатантов, собранных из первичных макрофагов M2 человека, трансфицированных конструкцией muIL-2 под контролем промотора EF-1 α, приводила к секреции в среднем 59,7 пг/мл muIL. -2. Конструкция muIL-2 с промотором CMV давала в среднем 275 пг/мл muIL-2, что почти в 5 раз больше. Для человеческого IL-2 ELISA чистые супернатанты клеток, трансфицированных плазмидой, не содержащей WPRE, давали в среднем 170 пг/мл huIL-2. Конструкция huIL-2, содержащая WPRE, давала в среднем 219 пг/мл huIL-2. Эти данные подтверждают, что промоторы, такие как CMV, и посттранскрипционные регуляторные элементы, такие как WPRE, могут значительно улучшать экспрессию цитокинов во многих типах клеток, включая первичные макрофаги M2 человека.

Лиганд ко-стимулирующего рецептора 4-1BBL, экспрессированный из клеток человека

Костимулирующие молекулы, такие как 4-1BBL, при экспрессии на антигенпрезентирующих клетках (APC) могут взаимодействовать с 4-1BB, экспрессируемыми на Т-клетках, для обеспечения оптимальной функции Т-клеток. 4-1BBL отрицательно регулируется цитоплазматической передачей сигналов на домен. В поздней фазе лигирования макрофагов 4-1BBL с Т-клетками обратная передача сигналов цитоплазматического домена 4-1BBL индуцирует поверхностную транслокацию 4-1BBL для связывания и образования сигнального комплекса с TLR4. Это индуцирует высокие уровни TNF-α, сравнимые с активацией LPSTLR4, что приводит к иммуносупрессии адаптивного иммунного ответа (см., например, Maetal. (2013) Sci. Signal.6(295):ra87).

В этом примере последовательность, кодирующая мышиный 4-1BBL, была клонирована в вектор pATI-1.75. Чтобы максимально задействовать Т-клетки, обратный сигнал цитоплазматического домена 4-1BBL был устранен путем делеции цитоплазматического домена (соответствующего аминокислотным остаткам 1-82 SEQIDNO:344), что привело к образованию mu4-1BBLΔcyt. Чтобы определить, может ли mu4-1BBLΔcyt функционально экспрессироваться на поверхности клеток человека, использовали клетки HEK-293T. Клетки HEK293TSTING (InvivoGen) высевали в 24-луночные планшеты, покрытые поли-L-лизином, по 200 000 клеток на лунку, в течение ночи при 37 °C в инкубаторе с CO2 для достижения 80% слияния. На следующий день 200 нгплазмидной ДНК, кодирующей mu4-1BBLΔcyt, разводили в бессывороточной среде и добавляли к реагенту для трансфекции FuGENE® (Promega) при соответствующем соотношении реагент:ДНК с нетрансфицированными лунками в качестве отрицательного контроля (в повторах). Через 48 часов клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут. Затем клетки ресуспендировали в PBS + 2% FBS и окрашивали PE-конъюгированным мышиным антителом против 4-1BBL (клон TKS-1, BioLegend) и DAPI (мертвое/живое окрашивание). Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300

об/мин в течение 3 минут и ресуспендировали в PBS + 2% FBS. Данные проточной цитометрии были получены с использованием ACEA. Клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут и ресуспендир В процентном отношении к живым клеткам нетрансфицированные контрольные клетки показали процент положительного окрашивания на мышиный 4-1BBL, равный 14,6. Для сравнения, 93,4% клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей mu4-1BBLΔcyt, были положительными в отношении поверхностной экспрессии 4-1BBL. Эти данные демонстрируют, что плазмиду pATI-1.75 можно эффективно использовать для экспрессии 4-1BBL на высоких уровнях на поверхности клеток человека. овали в PBS + 2% FBS.

В процентном отношении к живым клеткам нетрансфицированные контрольные клетки показали процент положительного окрашивания на мышиный 4-1BBL, равный 14,6. Для сравнения, 93,4% клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей mu4-1BBLΔcyt, были положительными в отношении поверхностной экспрессии 4-1BBL. Эти данные демонстрируют, что плазмиду pATI-1.75 можно эффективно использовать для экспрессии 4-1BBL на высоких уровнях на поверхности клеток человека.

Растворимый рецептор TGFβII, экспрессированный из клеток человека

Варианты растворимого мышиного TGFβ-рецептора II были сконструированы путем удаления цитоплазматической и трансмембранной частей полного TGFβ-рецептора II. Кроме того, для обнаружения был добавлен FLAG или Fc. Эти варианты были клонированы в вектор pATI-1.75 под контролем промотора CMV и 3'-элемента WPRE. Последовательности были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. 1,5 x 10^6 клетокHEK293T высевали за день до этого на 6-луночные планшеты, покрытые поли-L-лизином, для достижения 80% слияния. В день трансфекции 3 мкг ДНК разводили в среде, не содержащей сыворотки, и добавляли к реагенту для трансфекции FuGENE® (Promega) при соответствующем соотношении реагент:ДНК. Супернатанты клеточных культур из каждого образца собирали после 48 часов инкубации. Некоторое количество

супернатанта концентрировали на спин-колонке 10 кДа (Millipore). Прямой ELISA с мышиным TGF-β1 (системы R&D) проводили на супернатантетрансфицированных клеток HEK293T. Данные ELISA с поглощением при 450 нм представлены в таблице ниже.

Конструкция	**Поглощенепри 450 нм**
Концентрированный растворимый мышиный TGFβрецепторII-Fc	1.522 ± 0.025
Растворимый мышиный TGFβрецепторII-Fc	1.508 ± 0.018
Среда (контрол)	0.041 ± 0.002

Функциональность этих конструкций тестировали в анализе Т-клеток. Мышиные Т-клетки собирали из селезенки с использованием набора для магнитной изоляции (StemCellTechnologies). Т-клетки инкубировали с антителом против мышиного CD3ε, с растворимым рецептором или без него, при различных концентрациях TGF-бета мыши. Активацию Т-клеток количественно определяли с использованием набора CBA для мыши TH1 (BioLegend) и мечения CD4, CD8, 4-1BB и CD69 с помощью проточной цитометрии.

Эти данные демонстрируют способность экспрессировать гетерологичные молекулы, такие как внеклеточные рецепторы, слитые с доменом Fc, из плазмиды, сконструированной для доставки иммуностимулирующими бактериями в эукариотические клетки, такие как клетки человека.

Экспрессия биспецифического Т-клеточного активатора CD3xCD19 из клеток человека

Биспецифический активатор CD3xCD19 Т-клеток (BiTE®), содержащий метку FLAG и метку His, клонировали в вектор pATI-1.75 под контролем промотора

CMV и с 3'-элементом WPRE. Последовательности были подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

$1{,}5\times10^{6}$ клеток HEK293T высевали за день до этого на 6-луночные планшеты, покрытые поли-L-лизином, для достижения 80% слияния. В день трансфекции 3 мкг ДНК разводили в среде, не содержащей сыворотки, и добавляли к реагенту для трансфекции FuGENE® (Promega) при соответствующем соотношении реагент:ДНК. Супернатанты клеточных культур из каждого образца собирали после 48 часов инкубации. Некоторое количество супернатанта концентрировали на спин-колонке 10 кДа (Millipore).

Функциональность этой конструкции тестировали путем связывания CD3xCD19 BiTE® с клетками Raji и Jurkat-Lucia™ NFAT (InvivoGen). BiTE® обнаруживали с помощью анти-FLAG-APC (BioLegend) с использованием проточной цитометрии. Для каждого условия запускали одну лунку на 50000 клеток. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) положительных событий APC и количество клеток, отобранных как положительные APC, представлены в таблице ниже.

Образец	**Числоклеток APC^+**	**Средняяинтенсивность флюоресценции (MFI) клетокAPC$^+$**
Только клетки Rajic анти-FLAG-APC	41	1439
Клетки Rajic CD3xCD19 BiTE®	10307	7408
Клетки Rajic концентрированнымCD3xCD19 BiTE®	11248	16045
Только клетки Jurkatc анти-FLAG-APC	100	1519
КлеткиJurkatc CD3xCD19 BiTE®	18482	4584

Клетки Jurkatc концентрированнымCD3xCD19 BiTE®	17563	14089

Кроме того, эту конструкцию тестировали в совместной культуре клеток Raji и Jurkat-Lucia™ NFAT. Клетки инкубировали с CD3xCD19 BiTE® или без него, и люминесценцию (соответствующую показаниям NFAT) определяли через 6 и 24 часа после добавления BiTE®. Показания люминесценции этого анализа представлены в таблице ниже.

Экспериментальные условия	**Концентрированный CD3xCD19 BiTE® (Люминисценция)**	**CD3xCD19 BiTE® (Люминисценция)**	**Среда (Люминисценция)**
2 Raji: 1 Jurkat, 6 hour time point	12110.5 ± 837.9	3445.0 ± 717.0	44.5 ± 10.6
1 Raji: 1 Jurkat, 6 часов	4337.0 ± 219.2	2057.5 ± 20.5	26.0 ± 15.6
2 Raji: 1 Jurkat, 24 часа	47159.5 ± 1038.7	11274 ± 408.7	114.5 ± 57.3
1 Raji: 1 Jurkat, 24 часа	18614 ± 1540.1	6017 ± 31.1	122 ± 15.6

Эти данные демонстрируют способность экспрессировать гетерологичные молекулы, такие как scFv, альтернативные конструкции антител и биспецифическиепривлекатели Т-клеток, в эукариотических, таких как человеческие, клетках из сконструированной плазмиды, которая может быть доставлена иммуностимулирующими бактериями по настоящему изобретению.

Пример 10

Flagella-Deleted Strains Containing Plasmids Encoding Murine IL-2 Induce Functional IL-2 Protein Expression Following Infection in Human Monocytes

Иммуностимулирующие бактериальные штаммы эффективно доставляют плазмиды и экспрессируют цитокины в клетках человека

Штаммы с удаленными флагеллами, содержащие плазмиды, кодирующие мышиный IL-2, индуцируют функциональную экспрессию белка IL-2 после инфицирования моноцитами человека.

Как описано выше, гены флагеллина, fljB и fliC, были удалены из штамма YS1646 S. typhimurium с делетированным геном asd, образуя штамм YS1646 Δasd/ ΔFLG. Этот штамм подвергали электропорации с плазмидой, содержащей кассету экспрессии с промотором EF-1α и мышиным цитокином IL-2 (muIL-2). Кроме того, штамм YS1646 Δasd/ΔFLG подвергали электропорации с экспрессией плазмиды, кодирующей мышиный IL-15δ, в качестве контроля неродственного цитокина. Дополнительные конструкции были созданы с использованием промотора CMV.

Чтобы определить, могут ли эти штаммы, содержащие экспрессионные плазмиды, инфицировать моноциты человека и индуцировать продукцию мышиного IL-2, моноцитарные клетки человека THP-1 высевали в количестве 50 000 клеток/лунку в RPMI 1640 (Gibco™) + 10% Nu-Serum™ (Corning®), за один день до заражения. Клетки инфицировали различными штаммами при множественности заражения 50 в течение одного часа в RPMI, затем промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в RPMI + 100 мкг/мл гентамицина (Sigma). Через 48 часов супернатанты собирали из 96-луночного планшета и оценивали концентрацию мышиного IL-2 с помощью ELISA (R&DSystems).

Концентрация muIL-2, обнаруженная в контрольных лунках YS1646 Δasd/ΔFLG-IL15δ, была очень низкой (6,52 пг/мл), как и ожидалось, и, вероятно, отражала некоторую перекрестную реактивность с эндогенным рецептором IL-2 человека. Напротив, штамм YS1646 Δasd/ΔFLG-muIL-2 индуцировал в среднем

35,1 пг/мл muIL-2. Эти данные демонстрируют возможность экспрессии и секреции функциональных гетерологичных белков, таких как IL-2, из штаммов иммуномодулирующей платформы S. typhimurium в моноцитах человека.

Штаммы с делецией флагелл и pagP, содержащие плазмиды, кодирующие мышиный IL-2, демонстрируют повышенную экспрессию IL-2 по сравнению с трансфицированной ДНК muIL-2 в первичных макрофагах M2 человека

Сравнивали относительную эффективность трансфекции (т.е. прямого переноса плазмидной ДНК) и бактофекции (т.е. переноса плазмидной ДНК иммуностимулирующими бактериальными штаммами в настоящем документе) в первичных макрофагах M2 человека для экспрессии muIL-2. Замороженные PBMC человека, выделенные от здоровых доноров-людей, оттаивали в полной среде (RPMI-1640 + 1X заменимых аминокислот + 5% человеческой сыворотки AB) и промывали центрифугированием в течение 10 минут при 800 об/мин при комнатной температуре. PBMCресуспендировали в PBS + 2% FBS, и моноциты выделяли отрицательно с использованием набора для истощения CD16 (StemCellTechnologies). Затем изолированные нетронутые моноциты промывали центрифугированием в PBS + 2% FBS и ресуспендировали в полной среде, содержащей 100 нг/мл человеческого M-CSF и 10 нг/мл человеческого IL-4. Затем изолированные моноциты (3e5 на лунку) высевали в 24-луночный планшет. с конечным объемом 750 мкл. Через два дня после посева среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой, содержащей 100 нг/мл человеческого M-CSF и 10 нг/мл человеческого IL-4. Через два дня (на 4-й день) добавляли по 500 мкл полной среды, содержащей 100 нг/мл человеческого M-CSF и 10 нг/мл человеческого IL-4, на лунку и инкубировали в течение 48 часов. На 6-й день среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой без цитокинов для трансфекции с помощью мРНК Viromer® RED и реагента для трансфекции плазмиды (Lipocalyx).

Трансфекцию Viromer® RED проводили в соответствии с инструкциями набора. Вкратце, 500 нгплазмидной ДНК из конструкций, кодирующих muIL-2 под контролем промотора EF-1α (EF-1α-muIL-2), или под контролем промотора CMV (CMV-muIL-2), или нетрансфицированного контроля, разбавляли предоставленным буфером, смешивали с 0,2 мкл реагента для трансфекции Viromer® RED и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут для образования комплексов ДНК/Viromer® RED. Затем комплексы ДНК/Виромер® RED медленно добавляли в каждую лунку 24-луночного планшета, содержащего моноциты (в двух экземплярах), и планшет инкубировали при 37°C в среде с CO2 инкубатор на 24 часа. Дополнительные лунки клеток инфицировали при MOI 450 штаммом YS1646 Δasd/ ΔFLG/ ΔpagP, содержащим конструкцию EF-1 α-muIL-2, или штаммом YS1646 Δasd/ ΔFLG/ ΔpagP, содержащим конструкцию CMV-muIL-2, в течение одного часа в RPMI, затем 3 раза промывали PBS и ресуспендировали в RPMI + 100 мкг/мл гентамицина (Sigma).

Через 24 часа клетки лизировали 350 мкл буфера RLT с β-меркаптоэтанолом (β-ME) (Qiagen) и проводили экстракцию РНК с помощью набора QiagenRNeasyMiniKit со следующими модификациями. Этап элиминации геномной ДНК с использованием набора РНКазы-свободной ДНКазы (Qiagen) был включен в набор для удаления геномной ДНК из тотальной РНК. Концентрациюобщей РНК измеряли с помощьюNanoDrop™ One ^{C}УФ-видимыйспектрофотометр (Thermo Fisher Scientific). Чистоту каждого образца также оценивали по соотношению поглощения A260/A230. РНК хранили при температуре -80°C без замораживания-оттаивания до проведения обратной транскрипции. Синтез сДНК проводили с использованием 0,4-1 мкг матричной РНК с использованием термоциклераC1000 Touch (Bio-Rad) и SuperScript™ VILO™ MasterMix (Invitrogen) в 30 мкл реакционной смеси в соответствии с инструкциями производителя. qPCR (количественную полимеразную цепную реакцию) проводили с помощью системы обнаружения PCR в реальном времени CFX96™ (Bio-Rad).

ПраймерыSYBR® для мышиного IL-2 (идентификатор анализа: qMmuCED0060978) были приобретены у Bio-Rad. Реакцию количественной

PCR (20 мкл) проводили в соответствии с протоколом с использованием iTaq™ UniversalSYBR® GreenSupermix (Bio-Rad). Стандартная программа термоциклирования в системе реального времени Bio-RadCFX96™ состояла из денатурации при 95 °C в течение 30 секунд, за которыми следовали 40 циклов при 95 °C в течение 5 секунд и при 60 °C в течение 30 секунд. Реакции с контролем без матрицы были включены для каждого набора праймеров на каждом планшете. Все образцы анализировали дважды и рассчитывали средние значения Cq. Количественное определение мРНК-мишени нормализовали с использованием эталонной мРНК Gapdh (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) (Bio-Rad, идентификатор анализа: qMmuCED0027497).

ΔCq рассчитывали как разницу между геном-мишенью (mu-IL2) и эталонным (Gapdh) геном. Количественное определение мРНК-мишени нормализовали с использованием эталонной мРНК Gapdh (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) (Bio-Rad, идентификатор анализа: qMmuCED0027497). $\Delta\Delta C_q$ получали путем нормализации значений ΔC_q для лечения к значениям ΔC_q для контроля без лечения. Кратность увеличения рассчитывали как 2^-ΔΔCq. Увеличение кратности относительно нетрансфицированного/неинфицированного контроля показано в таблице ниже.

Группа обработки	**УвеличениевmuIL-2**
YS1646	<1
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*,EF-1α-muIL-2 (инфекция)	74
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*,CMV-muIL-2 (инфекция)	668.2
Трансфекция, EF-1α-muIL-2	249.4
Трансфекция, CMV-muIL-2	1527

Результаты показывают, что как при трансфекции, так и при бактофекции промотор CMV демонстрировал превосходную экспрессию muIL-2 по сравнению с промотором EF-1 α в первичных макрофагах M2 человека. В то время как трансфекция с использованием наиболее эффективного реагента, доступного в настоящее время, давала самые высокие уровни экспрессии muIL-2, бактофекция также вызывала высокие уровни экспрессии muIL-2, демонстрируя высокую эффективность переноса гетерологичного гена с бактериальными платформами, представленными в настоящем документе.

Пример 11

Бактериальные штаммы эффективно доставляют иммуномодулирующие плазмиды invivo и демонстрируют мощную противоопухолевую активность

Штаммы с удаленными флагеллами, содержащие плазмиды, кодирующие мышиный IL-2, вызывают сильное ингибирование опухоли без токсичности в мышиной модели колоректальной карциномы

Чтобы продемонстрировать, что штаммы S. typhimurium, содержащие плазмиды, экспрессирующие muIL-2, могут индуцировать противоопухолевую эффективность без дополнительной токсичности, штамм YS1646Δasd/ΔFLG, содержащий плазмиду muIL-2, сравнивали с контролем PBS на безопасность и эффективность при подкожном введении в бок в модели колоректальной аденокарциномы MC38. Для этого исследования 6-8-недельным самкам мышей C57BL/6 (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки MC38 (5×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися опухолями на боках на 11-й день внутривенно вводили 5×10^5 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG-muIL-2 или контрольный носитель PBS. Измерения опухоли и массу тела регистрировали два раза в неделю.

Результаты показали, что штамм YS1646Δasd/ΔFLG-muIL-2 продемонстрировал значительное ингибирование роста опухоли (TGI) по сравнению с PBS (76,7% TGI, P = 0,005, 21-й день), при этом опухоли хорошо контролировались вплоть

до 40-го дня после имплантации. , когда мышей PBS подвергли эвтаназии. Терапия хорошо переносилась, даже без дальнейшего ослабления штамма, а потеря веса на раннем этапе была временной и приводила к снижению массы тела всего на 3,4% по сравнению с контролем PBS на 40-й день. Таким образом, иммуностимулирующий штамм, экспрессирующий muIL-2, сильно ингибирует рост опухоли безопасным и нетоксичным образом на модели колоректальной карциномы.

Штаммы с удаленными флагеллами, содержащие плазмиды, кодирующие мышиный IL-2, индуцируют опухолеспецифическую продукцию IL-2 invivo

Уровень экспрессии опухолевого muIL-2 относительно селезенки определяли для подтверждения опухолеспецифического характера доставки. Самкам мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) инокулировали подкожно в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы MC38 ($5x10^5$ клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися опухолями на боках на 10-й день внутривенно вводили 5×10^5КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG-muIL-2 или с контрольным носителем PBS. На 31-й день после имплантации опухоли и селезенки вырезали и обрабатывали для извлечения опухолевых экстрактов с использованием окто-диссоциатораGentleMACS™ и пробирок M (MiltenyiBiotec) для установки молекул в 2 мл PBS. Гомогенаты центрифугировали при 1300 об/мин в течение 10 минут, супернатант собирали и анализировали с использованием набора muIL-2 CBA (BDBiosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты количественно оценивали как пг/мл muIL-2 и стандартизировали на грамм ткани.

Контрольные опухоли PBS демонстрировали фоновые уровни muIL-2 в опухоли со средним значением 134 пг/мл на грамм опухолевой ткани. Опухоли, обработанные YS1646Δasd/ΔFLG-muIL-2, давали гораздо более высокое среднее значение 389,9 пг/мл muIL-2 на грамм опухолевой ткани, демонстрируя

способность обнаруживать повышенные уровни muIL-2 из-за доставки плазмиды в резидентные опухолевые миелоидные клетки. . Уровень muIL-2 в селезенке мышей, инъецированных штаммом YS1646Δasd/ΔFLG-muIL-2, составлял в среднем 6,6 пг/мл на грамм ткани, что было ниже, чем в контрольной группе PBS. Эта специфичность к опухоли позволяет доставлять иммуномодулирующие уровни IL-2 гораздо более безопасным способом, чем обычная цитокиновая терапия, которая не нацелена на опухоль.

Аттенуированные бактериальные штаммы, содержащие плазмиды, кодирующие лиганд мышиного костимулирующего рецептора 4-1BBL, демонстрируют лечебное действие invivo.

Штамм, содержащий плазмиду, кодирующую 4-1BBL(Δcyt) (описанную выше), под контролем промотора CMV и содержащий 3'-элемент WPRE, оценивали на мышиной модели колоректальной аденокарциномы MC38. Для этого исследования 6-8-недельным самкам мышей C57BL/6 (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^{5} клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися опухолями на боках на 10-й день внутривенно вводили 1×10^{7}КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB, содержащие плазмиду CMV-4-1BBL(Δcyt)-WPRE или с контрольным носителем PBS.

Терапия очень хорошо переносилась, только первоначальная потеря веса составила 2,2%, которая полностью восстановилась через 3 дня. По сравнению с PBS терапия 4-1BBL(Δcyt) была высокоэффективной и лечебной (90,7% TGI, 60% полный ответ (CR), день 30). Эти данные демонстрируют эффективность и безопасность введения иммуностимулирующих бактерий, содержащих плазмиды, кодирующие костимулирующие молекулы опухолеспецифическим образом.

Пример 12

Идентификация мутаций с приобретением функции в генах, которые способствуют конститутивной продукции интерферона I типа

Встречаются случаи, когда у субъектов возникают тяжелые аутовоспалительные состояния и васкулопатии неизвестной этиологии, которые часто возникают в результате мутаций. Причина этих состояний установлена и может быть установлена. Шаги по выявлению мутационной основы такой патологии следующие. На первом этапе получают интактную геномную ДНК пациентов, испытывающих симптомы, и здоровых людей. Выполняется секвенирование всего экзома, затем анализируются интроны и экзоны. Проводят анализ генов и идентификацию мутаций в продуктах путей, связанных с экспрессией интерферона I типа (IFN). В результате этого анализа были обнаружены мутации в генах, которые, как известно, приводят к конститутивной функциональной активации кодируемых белков и последующей стойкой экспрессии IFNI типа.

После идентификации мутаций сДНК, кодирующие полноразмерный ген, с идентифицированной(ыми) мутацией или без нее, трансфицируют в репортерную клеточную линию, которая измеряет экспрессию IFNI типа. Например, можно создать репортерную клеточную линию, в которой экспрессия люциферазы находится под контролем промотора IFN-β. Мутант с приобретением функции (GOF), который конститутивно активен, будет стимулировать экспрессию IFN-β , тогда как нестимулированный белок дикого типа (WT) этого не сделает. В случае известных мутантов STINGSAVI (STING-ассоциированная васкулопатия с началом в младенчестве) стимуляция WT-STINGIFN-β требует добавления увеличивающихся экзогенных уровней cGAMP для прямой активации WT-STING. Конститутивно активные мутации стимулируют экспрессию IFN-β независимым от cGAMP образом.

Типичные мутации с приобретением функции в каждом из STING, RIG-I, MDA5, IRF3 и IRF7 представлены ниже в примере 15 и обсуждаются в другом месте настоящего документа. Другиетакиегены, в которыхмутации с приобретениемфункциимогутбытьидентифицированы у

субъектовилиполученыпутеммутации и скрининга in vitro, включают, помимопрочего, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3. , DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 и SNRNP200.

Экспрессия функциональных конститутивных мутантов IFN типа I в клетках человека.

Человеческие мутанты STING (аллель R232) и IRF3 с набором функции (GOF) (см. таблицу ниже) клонировали в вектор pATI-1.75, и последовательности подтверждали с помощью PCR. Чтобы определить, могут ли плазмиды, экспрессирующие STING и IRF3 GOF, индуцировать функциональный IFN типа I в клетках человека, плазмиды оценивали с использованием репортерных клеток HEK293TSTING (InvivoGen), которые не содержат эндогенного STING. Эти клетки экспрессируют секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), помещенную под контроль эндогенного промотора IFN-стимулированного элемента ответа (ISRE), где кодирующая последовательность ISRE была заменена ORFSEAP с использованием технологии нокаута. Активность интерферона типа I можно оценить путем мониторинга продукции SEAP, стимулированной интерфероном типа I, в супернатантах клеток.

Чтобы проверить относительную продукцию IFN типа I каждым из мутантов GOF, 1x10 ^{5} клеток 293T-Dual™ Null (InvivoGen) высевали за день до этого на планшеты, покрытые поли-L-лизином, для достижения 80% слияния в 24-луночном планшете. В день трансфекции 200 нг плазмид, кодирующих панель мутантов STING и IRF3 GOF, включая контроль STING дикого типа (WT) и IRF3 WT, а также мутацию отрицательного контроля, которая, как сообщалось в литературе, не является функциональной в клетках человека (отрицательный контроль STINGV155R (NC)), разводили в бессывороточной среде и добавляли к трансфекционному реагенту FuGENE® (Promega) при надлежащем

соотношении реагент:ДНК. Супернатанты клеточных культур из каждого образца собирали после инкубации в течение ночи, и 10 мклсупернатантов клеточных культур добавляли к 50 мкл реагента QUANTI-Blue™ (InvivoGen), который используется для измерения SEAP.

Активацию интерферона типа Iопределяли измерением индуцированной ISRE активности SEAPна SpectraMax® M3 спектрофотометре (MolecularDevices), при 650 nm.

Как показано в таблице ниже, все мутанты GOF были способны индуцировать активность IFNI типа независимым от лигандаSTING образом в клетках человека по сравнению с диким типом и отрицательным контролем, которые не индуцировали активность IFNI типа. Самые высокие уровни индукции IFN типа I наблюдались с вариантом STINGR284G человека и фосфомиметическим вариантом IRF3 S396D человека. Эти данные подтверждают способность плазмид, кодирующих мутанты GOF, продуцировать функциональный, конститутивный STING и конститутивный фосфомиметическийIRF3, которые могут индуцировать IFN типа I независимым от cGAMP образом.

.

Мутант GOF	**Среднеепоглощение (650нм)**	**Стандартное отклонение**
Плазмидный контроль	0.049	0.002
huSTING WT	0.144	0.004
huSTING V147L	1.399	0.015
huSTING N154S	1.382	0.008
huSTING V155M	1.360	0.048
huSTING C206Y	1.566	0.121
huSTING R281Q	1.546	0.132
huSTING R284G	1.831	0.039
huSTING V155R (NC)	0.181	0.014

Мутант GOF	Среднеепоглощение (650нм)	Стандартное отклонение
huIRF3 WT	0.781	0.073
huIRF3 S396D	1.922	0.131

Инфекция штаммов с удаленными флагеллами, содержащих плазмиды, кодирующие конститутивные мутанты IFNI типа, превращает макрофаги M2 человека в макрофаги M1, продуцирующие IFNI типа

Было определено, могут ли первичные макрофаги M2 человека, инфицированные штаммами с делецией флагелл, содержащими плазмиды, кодирующие конститутивные варианты GOFIFNI типа, превращаться в продуценты IFNI типа и нижестоящих хемокинов, таких как CXCL10 (также известный как IP-10).

Замороженные PBMC человека, выделенные от здоровых доноров-людей, оттаивали в полной среде (RPMI-1640 + 1X заменимых аминокислот + 5% человеческой сыворотки AB) и промывали центрифугированием в течение 10 минут при 800 об/мин при комнатной температуре. PBMCресуспендировали в PBS + 2% FBS, и моноциты выделяли отрицательно с использованием набора для истощения CD16 (StemCellTechnologies). Для получения первичных макрофагов M2 человека изолированные нетронутые моноциты промывали центрифугированием в PBS + 2% FBS и ресуспендировали в полной среде, содержащей 100 нг/мл M-CSF человека и 10 нг/мл человеческого IL-4. Затем изолированные моноциты (3e5 на лунку) высевали в 24-луночный планшет с конечным объемом 750 мкл. Через два дня после посева среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой, содержащей 100 нг/мл человеческого M-CSF и 10 нг/мл человеческого IL-4. Через два дня (на 4-й день) добавляли по 500 мкл полной среды, содержащей цитокины, в каждую лунку и инкубировали в течение 48 часов. На 6-й день среду для культивирования клеток полностью отсасывали и заменяли свежей полной средой без цитокинов.

Двойные лунки инфицировали при MOI 450 в течение одного часа в RPMI следующими штаммами: YS1646Δasd/ΔFLG, содержащим плазмиду, кодирующую дикий тип (WT) человека (hu) STING; YS1646Δasd/ΔFLG, содержащий плазмиду, кодирующую вариант huSTINGR284G; YS1646Δasd/ΔFLG, содержащий плазмиду, кодирующую WThuIRF3; YS1646Δasd/ΔFLG, содержащий плазмиду, кодирующую вариант huIRF3 S396D; или штамм, содержащий плазмидный контроль. Затем клетки промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в RPMI + 100 мкг/мл гентамицина (Sigma). В качестве контроля к клеткам добавляли STING-агонист 3'5' RpRpc-di-AMP (InvivoGen), аналог клинического соединения ADU-S100, в концентрации 10 мкг/мл.

Через 24 часа клетки лизировали 350 мкл буфера RLT с β-ME (Qiagen) и проводили экстракцию РНК с помощью набора QiagenRNeasyMiniKit со следующей модификацией. Для удаления геномной ДНК из тотальной РНК был включен этап элиминации геномной ДНК с использованием набора ДНКазы без РНКазы (Qiagen). Концентрацию общей РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop™ One ^{C} UV-Vis (ThermoScientific). Чистоту каждого образца также оценивали по A_{260}/A_{230} .Коэффициент поглощения. РНК хранили при температуре -80°C без замораживания-оттаивания до проведения обратной транскрипции. Синтез сДНК проводили из 0,4-1 мкг матричной РНК с использованием термоциклераC1000 Touch (Bio-Rad) и SuperScript™ VILO™ MasterMix (Invitrogen) в реакционной смеси объемом 30 мкл в соответствии с инструкциями производителя.

количественную PCR выполняли с помощью системы реального времени CFX96™ (Bio-Rad). Праймеры SYBR® для huCXCL10 (qHsaCED0046619), huIRF3 (qHsaCID0013122), huSTING (qHsaCID0010565) и huIFNβ1 (qHsaCED0046851) былиприобретены у Bio-Rad. Реакцию количественной PCR (20 мкл) проводили в соответствии с протоколом с использованием iTaq™ UniversalSYBR® GreenSupermix (Bio-Rad). Стандартная программа термоциклирования в системе реального времени BioRadCFX96™ состояла из

денатурации при 95 °C в течение 30 секунд, за которыми следовали 40 циклов при 95 °C в течение 5 секунд и при 60 °C в течение 30 секунд. Реакции с контролем без матрицы были включены для каждого набора праймеров на каждом планшете. Все образцы анализировали дважды, и среднее значение C_q было рассчитано. Количественное определение мРНК-мишени нормализовали с использованием эталонной мРНК Gapdh (Bio-Rad, qMmuCED0027497). ΔCq рассчитывали как разницу между целевым и референсным геном. ΔΔCq получали путем нормализации значений ΔCq для лечения к значениям ΔCq для контроля без лечения. Кратность увеличения рассчитывали как $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Значения показаны в таблице ниже как среднее значение для лунок-дубликатов.

Как показано в таблице ниже, по сравнению с заражением плазмидным контролем, штаммы YS1646Δasd/ΔFLG, содержащие плазмиды, кодирующие huSTINGWT и huSTINGR284G, индуцировали высокие уровни экспрессии STING, которые были значительно выше по сравнению с плазмидным контролем или малой молекулой агониста STING.

Точно так же штаммы, содержащие плазмиды, кодирующие WThuIRF3 и huIRF3-S396D, индуцировали высокие уровни экспрессии IRF3, которые были значительно выше, чем контрольная плазмида или низкомолекулярный агонист STING. Бактериальный штамм, содержащий плазмиду, кодирующую вариант huSTINGR284G, индуцировал гораздо более высокую экспрессию IFNβ и CXCL10 по сравнению со штаммом, содержащим плазмиду, кодирующую huSTING дикого типа. Это демонстрирует способность штамма, содержащего плазмиду, кодирующую конститутивный вариант STINGGOF, превращать первичный иммуносупрессивный макрофаг M2 человека в клетку M1, продуцирующую IFNI типа. В то время как штаммы, содержащие плазмиды, кодирующие WThuIRF3 и huIRF3-S396D, оба индуцировали более высокие или близкие уровни IFNβ, они индуцировали меньшую CXCL10, чемвариант huSTING-R284G.

GOF мутант	Экспрессия выше нетрансфецрованного контроля			
	STING	**IRF3**	**IFNβ**	**CXCL10**
Плазмидный контроль	22.3	0	ND	ND
huSTING WT	24017.1	ND	3.4	3934.5
huSTING R284G	36542.7	ND	20	23484.5
huIRF3 WT	22.7	478.9	17.5	10766.2
huIRF3-S396D	30.8	346.4	26.3	15696.1
3'5' RpRp c-di-AMP	244.8	1.11	1.77	594.1

ND = Нет данных

Эти данные демонстрируют экспрессию конститутивных вариантов IFN типа IGOF в первичных макрофагах M2 человека и превращение этих клеток в M1-подобные клетки, продуцирующие IFN типа I.

Пример 13

Human GOF STING Mutants Show Anti-Tumor Activity in Mouse M

Иммуностимулирующие бактерии, содержащие плазмиды, кодирующие конститутивные варианты IFNI типа, демонстрируют сильный противоопухолевый иммунитет в мышиной модели колоректального рака Мутанты GOFSTING человека проявляют противоопухолевую активность в моделях на мышах.

Чтобы продемонстрировать, что иммуностимулирующие бактериальные штаммы, содержащие экспрессионные плазмиды, кодирующие конститутивно активные варианты STING, индуцируют противоопухолевую эффективность, штамм YS1646Δasd/ΔFLG (нокаут обоих генов флагеллиновfljB и fliC) подвергали электропорации. с плазмидой, содержащей экспрессионную кассету

для STING человека с аллелемR232 и мутацией GOFV155M (huSTINGV155M), за промотором фактора элонгации человека-1 альфа (EF-1 α), и сравнивали только со штаммом YS1646 и с контролным носителем PBS. Ген, кодирующий huSTINGV155M, был получен с помощью синтеза ДНК и клонирован в вектор pATI-1.75. Чтобы оценить, может ли конститутивный вариант STING человека демонстрировать противоопухолевую активность у мышей,$5x10^5$ клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися опухолями на боках на 8-й день внутривенно вводили 5×10^5 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG-huSTINGV155M, штамма YS1646 или контрольного PBS.

Результаты показали, что исходный штамм YS1646 обладал лишь умеренной эффективностью в качестве противоопухолевой терапии и не был излечивающим (35% TGI, p = NS (незначительно), день 28), в соответствии с ранее опубликованными данными. Однако более аттенуированный штамм, содержащий плазмиду, кодирующую конститутивно активный STING человека, YS1646Δasd/ΔFLG-huSTINGV155M, вызывал значительный контроль над опухолью (60% TGI, p<0,05, день 28) по сравнению с PBS и имел показатель излечения 20 %. Таким образом, иммуностимулирующий бактериальный штамм, который доставляет конститутивно активный вариант STING, сильно ингибирует рост опухоли и демонстрирует лечебные эффекты на модели колоректальной аденокарциномы.

Мышиный фосфомиметикIRF3 демонстрирует целебный эффект invivo

Мышиная версия фосфомиметического варианта человеческого IRF3 была разработана, обозначена как muIRF3-S388D, и оценена на мышиной модели колоректальной аденокарциномы. Штамм YS1646Δasd/ΔFLG подвергали электропорации с плазмидой, содержащей экспрессионную кассету для мышиного IRF3 с мутацией GOFS388D (muIRF3-S388D), за промотором человеческого фактора элонгации-1 альфа (EF-1α), и сравнивали с контрольным носителем PBS. Ген, кодирующий muIRF3-S388D, был получен с помощью

синтеза ДНК и клонирован в вектор pATI-1.75. Самкам мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель (5 мышей в группе) инокулировали подкожно в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися опухолями на боках на 10-й день внутривенно вводили 5×10^5КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG-EF-1 α-muIRF3-S388D по сравнению с контрольным носителем PBS.

Терапия очень хорошо переносилась, начальный минимум потери веса составил всего 0,3%. По сравнению с PBS бактериальный штамм, содержащий плазмиду, кодирующую мутант muIRF3-S388DGOF, был высокоэффективным и лечебным (81,8% TGI, 60% CR, день 42). Эти данные демонстрируют эффективность и безопасность доставки конститутивных вариантов, индуцирующих IFNI типа, опухолеспецифическим образом.

Варианты STINGGOF у мышей проявляют мощную и лечебную противоопухолевую активность.

Была разработана панель мышиных ортологов вариантов STING человека, обнаруженных у пациентов-людей. Эти ортологи отличаются на один кодон от человеческих вариантов и были клонированы в вектор pATI-1.75 под контролем промотора EF-1 α, чтобы получить следующий набор мутантов: muSTINGN153S, muSTINGV154M, MUSTINGR280Q, MUSTINGV146L ,MUSTINGR283G и MUSTINGC205Y, среди прочих. Варианты STING оценивали на модели аденокарциномы мышей MC38 на противоопухолевую эффективность. Для исследований 6-8-недельным самкам мышей C57BL/6 (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися опухолями на боках на 10-й день внутривенно вводили 5×10^5 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG, содержащие плазмиду с EF-1α, управляющую экспрессией muSTINGN153S, muSTINGV154M, muSTINGR280Q,

muSTINGV146L, илиmuSTINGR283G или скремблированной плазмидной контрольной shPHK, и по сравнению с контрольным носителем PBS.

В этом эксперименте штамм YS1646Δasd/ΔFLG-EF-1 α-shSCR (контроль со скремблированными плазмидами) продемонстрировал противоопухолевую эффективность по сравнению с контролем PBS (73% TGI, день 26), который был намного более мощным, чем родительский штамм YS1646. показано исторически. Это может быть связано с наличием в самой плазмиде иммуностимулирующих элементов, таких как стимулирующие элементы CpG и РНК. Тем не менее, эта терапия была наименее хорошо переносимой из группы, продемонстрировав снижение веса на 9,9%, которое разрешилось только в самом конце исследования. Напротив, конститутивно активные мышиные мутанты STING приводили к более низкой потере веса, которая была временной и исчезала в течение нескольких дней. Относительная противоопухолевая эффективность этих вариантов выявила различия в активности, и только два варианта продемонстрировали лечебные эффекты и повышенную эффективность по сравнению с плазмидным контролем, muSTINGN153SandmuSTINGR283G.

МышиныйSTING GOF мутант	**TGI против PBS, День 26**	**Полный ответ**	**ПотерявесаДень**
Плазмидный контроль	73.0%	0/5	9.9%, день 19
muSTING N153S	81.7%	1/5	6.2%, день 12
muSTING V154M	69.4%	0/5	4.3%, день 12
muSTING R280Q	68.7%	0/5	5.4%, день 12
muSTING V146L	63.4%	0/5	2.8%, день 12
muSTING R283G	81.2%	1/5	6.9%, день 12

В последующем исследовании мышиный вариант STINGC205Y был протестирован вместе с вариантами R283G и N153S для сравнения их противоопухолевой эффективности. Самкам мышей C57BL/6 в возрасте 6–8 недель (5 мышей в группе) вводили подкожно в правом фланге с клетками

колоректальной аденокарциномы MC38 (5x10 ^{5} клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися опухолями на боках на 9-й день внутривенно вводили 5×10 ^{5}КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG, содержащего плазмиду с EF-1α, управляющую экспрессией muSTINGN153S, muSTINGR283G или muSTINGC205Y, по сравнению с контрольным носителем PBS. Как и прежде, варианты STING хорошо переносились, и наблюдалось лишь кратковременное снижение массы тела, которое быстро разрешилось. Это, вероятно, связано с целевой терапией, поскольку это также наблюдается с низкомолекулярными агонистами STING. Эффективность двух конститутивно активных мышиных вариантов STING, muSTINGN153S и muSTINGR283G, была почти идентична предыдущему исследованию, хотя потеря веса была намного меньше по неясным причинам. Вариант muSTINGC205Y также оказался высокоэффективным, хотя и не лечебным.

Мышиный STING GOF мутант	**TGI против PBS, день 29**	**Полный ответ**	**Потерявесаидень**
muSTING C205Y	79.4%	0/5	2.6%, день 13
muSTING N153S	79.3%	1/5	2.2%, день 13
muSTING R283G	85.1%	1/5	1.8%, день 13

Мышей, излеченных с помощью STING из этих исследований, повторно заражали на 40-й день после первоначальной имплантации опухоли на противоположном боку, SC, клетками колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10 ^{5} клеток в 100 мклPBS). По сравнению с «наивными» мышами (N=5), у которых выросли все опухоли, у всех мышей, вылеченных STING, опухоли отторгались, что свидетельствует о включении адаптивного иммунитета.

Эти данные подтверждают безопасность и активность мышиных версий конститутивно активных вариантов STING человека в мышиной модели колоректальной карциномы и выявляют небольшое подмножество вариантов, которые обладают повышенной эффективностью по сравнению с другими

вариантами STING. Эти высокоактивные варианты также вызывают защитный иммунитет, демонстрируя эффективность опухолеспецифической продукции интерферона I типа.

Варианты STINGGOF у мышей демонстрируют значительное ремоделирование опухоли после внутривенного введения

Было определено, демонстрируют ли бактериальные штаммы, содержащие плазмиды, кодирующие конститутивные варианты STING, различия в их способности реконструировать микроокружение опухоли (TME) после внутривенного введения. Чтобы проверить это, 6-8-недельным самкам мышей C57BL/6 (5 мышей в группе) инокулировали подкожно в правый бок клетками колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимися опухолями на боках на 8-й день внутривенно вводили 5×10^5 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG, содержащего плазмиду с EF-1 α, управляющую экспрессией muSTINGN153S, muSTINGV154M, muSTINGR280Q, muSTINGV146L, muSTINGR283G или плазмидный контроль и по сравнению с контролем-носителем PBS.

На 28-й день после имплантации опухоли опухоли вырезали для анализа. Опухоли нарезали на кусочки размером 2-3 мм в пробирки softMACS™ C (MiltenyiBiotec), заполненные 2,5 мл смеси ферментов (RPMI-1640 + 10% FBS с 1 мг/мл коллагеназыIV и 20 мкг/мл ДНКазыI). Кусочки опухоли были диссоциированы с использованием OctoMACS™ (MiltenyiBiotec) по специальной программе диссоциации (опухоли, имплантированные мышам), и препарат цельных клеток инкубировали при перемешивании в течение 45 минут при 37°C. После 45 минут инкубации проводили второй цикл диссоциации с использованием программы OctoMACS™ (опухоль, имплантируемая мышам), и полученные суспензии отдельных клеток фильтровали через нейлоновую сетку 70 мкМ в пробирку объемом 50 мл. Нейлоновую сетку один раз промывали 5 мл RPMI-1640 + 10% FBS, и клетки фильтровали второй раз, используя новую нейлоновую сетку 70 мкМ, в новую пробирку на 50 мл. Нейлоновую сетку

промывали 5 мл RPMI-1640 с 10% FBS, после чего отфильтрованные клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 минут. Полученные диссоциированные клетки ресуспендировали в PBS и хранили на льду до процесса окрашивания.

Процент живых инфильтрирующих опухоль лейкоцитов (TIL), в том числе CD4 $^{+}$ Treg, CD4 $^{+}$ Th1 клеток, CD8 $^{+}$Т-клетки, нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки (ДК), макрофаги M1 и макрофаги M2 после введения штамма YS1646Δasd/ΔFLG, содержащего плазмиды, кодирующие различные мутанты GOFmuSTING, определяли с помощью проточной цитометрии. Для окрашивания методом проточной цитометрии 100 мкл суспензии отдельных клеток высевали в лунки 96-луночного планшета с V-образным дном. PBS, содержащий мертвый/живой краситель (ZombieAqua™, BioLegend) и реагенты, блокирующие Fc (BDBiosciences), добавляли по 100 мкл на лунку и инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте.

Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут. Затемклеткиресуспендировали в PBS + 2% FBS, содержащемантитела, конъюгированные с флуорохромом (CD4 FITC клон RM4-5; CD8a BV421 клон 53-6.7; F4/80 APC клон BM8; CD11b PE-Cy7 клон M1/70; CD45 BV570 клон 30-F11; CD3 PE клон 145-2C11; клон Ly6C BV785 HK1.4; IA/IE APC-Cy7 клон M5/114.15.2; клон 1A8 Ly6G BV605; и CD24 PercP-Cy5.5 клон M1/69; всеотBioLegend) и инкубировалинальду в течение 30 минут в темноте.

Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут и ресуспендировали в буфере для фиксации проточной цитометрии (ThermoFisherScientific). Данные проточной цитометрии были получены с использованием проточного цитометраACEANovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

Как показано в таблицах ниже, штамм YS1646Δasd/ΔFLG с контролем плазмиды EF-1 α продемонстрировал преимущественно высокую нейтрофильную инфильтрацию, несмотря на некоторое рекрутирование

CD8 $^{+}$ Т-клеток, вероятно, из-за иммуностимулирующих элементов на плазмиде. Напротив, разные варианты muSTING имели уникальные сигнатуры иммунных клеток, проникающих в опухоль, причем некоторые, такие как muSTINGV146L и muSTINGR283G, приводили к меньшему количеству иммуносупрессивных нейтрофилов, чем контроль PBS. Наиболее благоприятные иммунные профили наблюдались в опухолях мышей, которым вводили мутанты muSTINGR283G и muSTINGN153S с высоким содержанием клеток CD4 $^{+}$ Th1 и CD8 $^{+}$ Т-клетки и низкое количество нейтрофилов, что указывает на весьма благоприятные условия для формирования адаптивного иммунного ответа. Кроме того, мутанты muSTINGR283G и muSTINGN153S имели значительно более высокие опухоле-антиген-специфические CD8 $^{+}$ Т-клетки p15e в опухоли по сравнению с PBS. Эти тенденции были также отражены в общем количестве клеток, как показано ниже. Таким образом, доставка конститутивно активных вариантов STING к резидентным опухолевым миелоидным клеткам приводит к полному ремоделированиюиммуносупрессивного микроокружения опухоли в сторону адаптивного противоопухолевого фенотипа и отхода от бактериального фенотипа, который характеризуется усилением врожденного иммунитета. и подавление адаптивного иммунитета.

% живых лейкоцитов инфильтрующихопуколь (TIL)

% среди TIL	**GOFmuSTINGмутанты, кодированные на плазмидах во внуривенно введенном штамме YS1646Δ*asd*/ΔFLG**						
	PBS	**Плазмидный контроль**	**muSTING N153S**	**muSTING V154M**	**muSTING R280Q**	**muSTING V146L**	**muSTING R283G**
CD4^{+}Treg	2.9 ± 1.7	1.8 ± 0.5	3.3 ± 2.6	1.5 ± 0.5	2 ± 0.9	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.4
CD4^{+}	6.6 ±	13 ± 4.3	20.7 ±	13.2 ±	22.6 ±	19.5 ±	25.6 ±

Th1 клетки	3.2		10.4	6.1	7.4	4.9	7.8
CD8$^+$ T клетки	16.2 ± 10.2	24.5 ± 11.6	25.8 ± 9.2	16.5 ± 4.4	20.2 ± 7.2	20.8 ± 3.6	27.8 ± 8.7
Нейтрофилы	11.3 ± 14.2	30.6 ± 17.4	13.5 ± 12.4	21.4 ± 12.5	15.9 ± 11.6	9.1 ± 6.5	6.6 ± 5.9
Моноциты	16.6 ± 3.5	12.7 ± 2.7	13.7 ± 3.9	16.4 ± 5.4	15.8 ± 6.5	15.6 ± 2.2	13.5 ± 1.3
DCs	1.4 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.9 ± 0.7	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3
M1 Макрофаги	10.2 ± 6.2	3.1 ± 2.1	4.6 ± 2.1	9.4 ± 5	5.6 ± 4.2	8.6 ± 3.7	5.4 ± 2
M2 Макрофаги	14.9 ± 10.6	4.6 ± 2.6	7.3 ± 3.1	11.6 ± 5.2	8.6 ± 6.3	12.8 ± 5	9.2 ± 4

Всего клеток

	PBS	**Плазмидный контроль**	**muSTING N153S**	**muSTING V154M**	**muSTING R280Q**	**muSTING V146L**
CD4$^+$Treg	437 ± 230	148 ± 102	530 ± 117	310 ± 114	520 ± 169	297 ± 207
CD4$^+$ Th1 клетки	1108 ± 599	1059 ± 711	3765 ± 917	3349 ± 2869	5864 ± 1618	2961 ± 1800
CD8$^+$ T клетки	2948 ± 3119	1571 ± 601	6152 ± 3820	3898 ± 2823	5446 ± 2454	3266 ± 1277
Нейтрофилы	1531 ± 1604	2604 ± 1975	3699 ± 4400	4815 ± 3423	4301 ± 3502	1240 ± 1160
Моноциты	2871 ±	912 ± 369	3182 ± 1708	3350 ± 1183	4132 ± 1595	2524 ± 1420

	1472					
DC	233 ± 97	28 ± 18	161 ± 45	82 ± 31	130 ± 90	78 ± 48
M1 макрофаги	2163 ± 2025	227 ± 213	881 ± 316	1797 ± 750	1421 ± 910	1325 ± 856
M2 макрофаги	3046 ± 2996	334 ± 275	1391 ± 373	2183 ± 608	2189 ± 1402	2043 ± 1237

Пример 14

Экспрессия множественных иммуномодулирующих белков с использованием комбинаторных плазмидных экспрессионных кассет Многомодульные плазмидные экспрессионные кассеты демонстрируют способность продуцировать множественные иммуномодулирующие белки в клетках человека.

Комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих варианты, индуцирующие IFN типа IGOF, и цитокины, клонировали в вектор pATI-1.75 с использованием двух отдельных ORF под контролем промоторов CMV и EF-1α (система с двумя промоторами) или с использованием пептидов T2A внутри ORF и одного промотора (система с одним промотором). Конструкции также могли включатьпосттранскрипционные регуляторные элементы (PRE), такие как 3'-WPRE или HPRE, и/или сигнальные последовательности полиаденилирования, такие как сигналы полиаденилированияSV40 или бычьего гормона роста (bGH). Полученныеконструкциивключаликонструкции, кодирующиецитокины muIL-2, muIL-2 с оптимизациейкодонов (muIL-2 CO), muIL-21, muIL-12p70, muIL-15Rα-IL-15sc, muIL-18 и muIL-α2, и ихкомбинации; вариантmuSTING с мутацией R283G; и/иликостимуляторнуюмолекулумыши 4-1BBL с делециейцитоплазматическогодомена (mu4-1BBLΔcyt). Последовательности были подтверждены с помощью PCR.

Чтобы определить, могут ли комбинированные плазмиды, содержащие варианты, индуцирующие IFNGOF типа I, индуцировать функциональный IFNтипа I в клетках человека, плазмиды оценивали с использованием нулевых репортерных клеток HEK293TSTING (InvivoGen), которые не содержат эндогенного STING. Эти клетки экспрессируют секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), поставленную под контроль эндогенного IFN-стимулируемого промотора элемента ответа (ISRE), где кодирующая последовательность ISRE была заменена ORFSEAP с использованием технологии нокаута. Активность интерферона типа I можно оценить путем мониторинга продукции SEAP, стимулированной интерфероном типа I, в супернатантах клеток. Кроме того, супернатанты собирали и оценивали относительные концентрации цитокинов с помощью ELISA.

Чтобы проверить относительную продукцию IFN типа I и коэкспрессируемых цитокинов, 2x10 ^{5} клеток 293T-Dual™ Null (InvivoGen) высевали за день до этого на 24-луночные планшеты, покрытые поли-L-лизином, для достижения 80% слияния. В день трансфекции 500 нг плазмид, кодирующих панель вариантов GOF, цитокинов и костимулирующих молекул, отдельно или в различных комбинациях, разводили в бессывороточной среде и добавляли к реагенту для трансфекции FuGENE® (Promega) при правильное соотношение реагент:ДНК. Супернатанты клеточных культур из каждого образца собирали после инкубации в течение ночи, и 20 мклсупернатантов клеточных культур добавляли к 180 мкл реагента QUANTI-Blue™ (InvivoGen). Активацию интерферона типа I определяли путем измерения ISRE-индуцированной активности SEAP на спектрофотометре SpectraMax® M3 (MolecularDevices) при поглощении 650 нм. Конструкции muIL-2 оценивали на экспрессию muIL-2 с помощью ELISA мышиного IL-2 (R& системы D) в соответствии с инструкциями производителя. Конструкции muIL-12p70 оценивали с помощью иммуноферментного анализа мышиного IL-12 (R&DSystems) в соответствии с рекомендациями производителя. Для конструкций muIL-15Rα-IL-15sc использовали мышиный IL-15 ELISA (eBioscience) в соответствии с инструкциями набора. IFN-α2 измеряли с использованием репортерной

клеточной линии RAW-Lucia™ ISG (InvivoGen). Мышиный IL-18 и мышиный IL-21 измеряли с помощью ELISA (Invitrogen).

Как показано в таблице ниже, анализы, проведенные для обнаружения присутствия секретируемых функциональных белков, продемонстрировали высокую экспрессию множественных комбинированных полезных нагрузок. К ним относятся комбинации цитокинов, а также комбинации с IFN типа I, индуцирующие варианты GOF, и/или костимулирующие полезные нагрузки. Эти данные подтверждают способность представленной здесь платформы экспрессировать несколько иммуномодулирующих белков из одной кассеты экспрессии.

Конструкция	**Экспрессия белка**							
	STING (погл 650 нм)	**IL-2 (погл 650 nm)**	**IL-12 (погл 650 nm)**	**IL-15 (пг/мл)**	**IL-15 (погл 650 нм)**	**IFN-α2 (Люминисценция)**	**IL-21 (OD при 450 нм)**	**IL-18 (пг/мл)**
CMV-mu-IL-2		1.995						
CMV-muIL-2 CO-WPRE		2.0073						
EF-1α-muIL-21							1.138 ± 0.1853	
CMV-muIL-21							0.4758 ± 0.0461	
EF-1α-			0.9052					

Конструкция	Экспрессия белка							
	STING (погл 650 нм)	**IL-2 (погл 650 nm)**	**IL-12 (погл 650 nm)**	**IL-15 (пг/мл)**	**IL-15 (погл 650 нм)**	**IFN-α2 (Люминисценция)**	**IL-21 (OD при 450 нм)**	**IL-18 (пг/мл)**
muIL-12p70								
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc-WPRE				30140.8 ±535.5	0.8224			
EF-1α-muIFN-α2						14570		
CMV-muIFN-α2-WPRE						18658		
CMV-muIL-2 CO_T2A _muIFN-α2-WPRE		2.0998				13066		
CMV-muIL-15Rα-sc _T2A_ muIFN-				29895.9 ±630.9	1.0125	8571		

Конструкция	Экспрессия белка							
	STING (погл 650 нм)	**IL-2 (погл 650 nm)**	**IL-12 (погл 650 nm)**	**IL-15 (пг/мл)**	**IL-15 (погл 650 нм)**	**IFN-α2 (Люминисценция)**	**IL-21 (OD при 450 нм)**	**IL-18 (пг/мл)**
α2-WPRE								
CMV-muIL-2 CO + EF-1α-muIFN-α2		2.0589				8297		
CMV-muIL-21 + EF-1α-muIFN-α2						8682	0.3797 ± 0.0830	
CMV-muIL-2 CO + EF-1α-muIL-21		2.0085					0.7565 ± 0.1271	
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc + EF-1α-muIL-21				12605 ± 278.6	0.2362		0.2963 ± 0.0155	
CMV-			1.0893				0.1479	

Конструкция	Экспрессия белка							
	STING (погл 650 нм)	**IL-2 (погл 650 nm)**	**IL-12 (погл 650 nm)**	**IL-15 (пг/мл)**	**IL-15 (погл 650 нм)**	**IFN-α2 (Люминисценция)**	**IL-21 (OD при 450 нм)**	**IL-18 (пг/мл)**
muIL-12p70 + EF-1α-muIL-21							± 0.001	
CMV-muIL-2 CO-HPRE-bGHpolyA		1.207 ± 0.121						
EF-1α-muSTING-R283G	0.4874 ± 0.0045							
CMV-muSTING-R283G-WPRE	0.4866 ± 0.0511							
CMV-muIL-2 CO + EF-1α-muIL-12p70		0.9971 ± 0.0104	0.3303 ± 0.0157					

Конструкция	Экспрессия белка							
	STING (погл 650 нм)	**IL-2 (погл 650 nm)**	**IL-12 (погл 650 nm)**	**IL-15 (пг/мл)**	**IL-15 (погл 650 нм)**	**IFN-α2 (Люминисценция)**	**IL-21 (OD при 450 нм)**	**IL-18 (пг/мл)**
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc + EF-1α-muIL-12p70			0.3629 ± 0.0242		0.1464 ± 0.0034			
CMV-muIL-18 + EF-1α-muSTING-R283G-WPRE	0.7096 ± 0.0169							5991.4 ± 1642.0
CMV-muIL-12p70_T2A_muIFN-α2 + EF-1α-IL-18-WPRE			0.6538 ± 0.0205			577.3 ± 122.5		12685.0 ± 4402.8
CMV-muIL-12p70_T	0.454 ± 0.123		0.4581 ± 0.0158					3805.8 ± 1369.5

Конструкция	Экспрессия белка							
	STING (погл 650 нм)	**IL-2 (погл 650 nm)**	**IL-12 (погл 650 nm)**	**IL-15 (пг/мл)**	**IL-15 (погл 650 нм)**	**IFN-α2 (Люминисценция)**	**IL-21 (OD при 450 нм)**	**IL-18 (пг/мл)**
2A_muSTING-R283G + EF-1α-muIL-18-WPRE								
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc_T2A_muSTING-R283G + EF-1α-muIL-18-WPRE	0.5867 ± 0.0333				0.2326 ± 0.0049			3626 ± 1248
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc_T2A_muIFN-α2 + EF-1α-					0.3512 ± 0.0172	1802 ± 216.5		6872 ± 1671

Конструкция	Экспрессия белка							
	STING (погл 650 нм)	**IL-2 (погл 650 nm)**	**IL-12 (погл 650 nm)**	**IL-15 (пг/мл)**	**IL-15 (погл 650 нм)**	**IFN-α2 (Люминисценция)**	**IL-21 (OD при 450 нм)**	**IL-18 (пг/мл)**
muIL-18-WPRE								
CMV-4-1BBL(Δcyt) + EF-1α-muSTING-R283G-WPRE	0.2525 ± 0.0144							

Конститутивные варианты, индуцирующие IFNI типа, имеют уникальные профили цитокинов и хемокинов

Супернатанты, собранные в ходе экспериментов по трансфекции HEK293T с использованием панели IFNI типа человека, индуцирующих варианты GOF, тестированные, как описано выше, оценивали на предмет различий в передаче сигналов ниже («по течению») с использованием панели CBA человеческого антивируса (BDBiosciences) в соответствии с протоколом производителя. Каждую трансфекцию проводили дважды и измеряли уровни цитокинов. Рассчитывали среднее значение двух измерений. Рассчитывали кратное увеличение средней секреции цитокинов по сравнению с нетрансфицированными лунками, в которых среднюю секрецию цитокинов принимали за 1,00.

Как показано в таблице ниже, в клетках продуцировались низкие уровни человеческого IL-12p70. Однако несколько вариантов GOF, индуцирующих IFNI типа человека, индуцировали продукцию IFN-α2 и/или IFN-β типа I, включая фосфомиметический вариант IRF3 (huIRF3-S396D), а также несколько конститутивно активных вариантов STING. Ряд этих вариантов GOF продуцировал высокие уровни секретируемого CXCL10, демонстрируя способность этих экспрессируемых вариантов рекрутировать Т-клетки в микроокружение опухоли. Самые высокие уровни экспрессии CXCL10 наблюдались после экспрессии варианта huSTING с мутацией R284G.

Эти данные подтверждают использование мультиплексированных плазмидных экспрессионных конструкций, содержащих IFN типа I, индуцирующих варианты GOF, для индукции функциональных нижестоящих цитокинов и хемокинов, таких как CXCL10/IP10. Все эти варианты имеют уникальные сигнатуры, и варианты STINGGOF индуцируют самые высокие уровни секреции CXCL10, особенно huSTING-R284G (соответствует muSTING-R283G).

Конструкции	**Секретированные иммуностимулирующие хемокины и цитокины**			
	IL-12p70	**IFN-α2**	**IFN-β**	**CXCL10**
Нетрансфицированный контроль	1.00	1.00	1.00	1.00
EF-1α-mCherryконтроль	1.50	1.59	1.50	2.05
EF-1α-huSTINGотрицательный контроль	1.32	2.10	1.43	2.16
EF-1α-huSTING WT	1.66	1.69	1.46	2.77
EF-1α-huSTING-V147L	1.78	2.35	21.35	332.14
EF-1α-huSTING-N154S	1.52	2.23	23.37	398.99
EF-1α-huSTING-V155M	2.00	2.09	6.02	121.38
EF-1α-huSTING-C206Y	1.39	2.02	16.51	218.38

Конструкции	Секретированные иммуностимулирующие хемокины и цитокины			
	IL-12p70	IFN-α2	IFN-β	CXCL10
EF-1α-huSTING-R281Q	1.35	1.35	8.17	301.18
EF-1α-huSTING-R284G	1.46	2.14	13.41	429.40
EF-1α-huIRF3-WT	1.50	1.49	1.50	1.11
EF-1α-huIRF3-S396D	1.93	9.37	38.06	65.89
CMV-muIFN-α2-WPRE	1.03	3.63	1.37	146.49
CMV-muIL-2 CO_T2A_muIFN-α2-WPRE	1.03	1.63	1.37	86.02
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc_T2A_muIFN-α2-WPRE	1.03	0.80	1.37	40.85

Анализы кокультуры иммунных клеток определяют оптимальные комбинации иммуномодулирующих мишеней

Для определения оптимальных комбинаций цитокинов, вызывающих рекрутирование и активацию Т-клеток, панель тестировали в анализе совместного культивирования макрофагов и Т-клеток. Мышиные первичные мышиные макрофаги GoldenTicket (с дефицитом STING) костного мозга (BMM) получали, как описано выше (см. Пример 6), с использованием 24-луночного планшета. Каждую лунку трансфицировали соответствующими конструкциями ДНК с использованием реагентов для трансфекции FuGENE® (Promega). Конструкциивключаликонструкции, кодирующие muIL-2 CO, muIL-12p70, muSTING-R283G, muIL-2 CO + muIL-12p70, muIL-15Rα-IL-15sc + muIL-12p70 и muIL-12p70 + muSTING-R283G + muIL- 18.

Через 24 часа после трансфекции из лунок собирали 100 мклсупернатантов клеточных культур для массива цитокиновых шариков (CBA) на основе проточной цитометрии. Параллельно иссекали две селезенки мышей линии

C57BL/6 и селезенки $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки выделяли в соответствии с инструкциями из набора для выделения мышиных Т-клеток (StemCellTechnologies). 200 000 выделенных Т-клеток на лунку затем добавляли к трансфицированным клеткам с антителом против CD3ε или без него (клон 145-2C11, BioLegend) при конечной концентрации 0,5 мкг/мл на лунку. Через 24 и 48 часов после добавления Т-клеток к трансфицированным клеткам из лунок собирали 100 мклсупернатантов совместной культуры для массива гранул цитокинов на основе проточной цитометрии. Супернатанты от трансфицированных макрофагов костного мозга (BMM) и совместных культур макрофагов костного мозга/Т-клеток анализировали на содержание в них цитокинов с использованием мышиных антивирусных и мышиных Th1-специфических цитокиновых матриц, соответственно.

Как показано в таблице ниже, только плазмиды, кодирующие muSTING-R283G, индуцировали продукцию CXCL10 макрофагами, в то время как плазмиды, кодирующие muIL-12p70, отдельно или в комбинации с другими белками, индуцировали самые высокие уровни IFNγ из совместно культивируемых Т- клеток, которые превышали фоновое количество в результате стимуляции CD3 ε. Комбинация muIL-12p70 + muIL-18 + muSTING-R283G была способна индуцировать как продукцию CXCL10 макрофагами, так и продукцию IFNγ совместно культивируемыми Т-клетками.

Эти данные демонстрируют возможность экспрессии нескольких иммуномодулирующих полезных нагрузок из одной плазмиды, а также синергетическую активность этих комбинаций.

Конструкции	**Продукция BMMCXCL10 (пг/мл)**	**Продукция Т-клетокIFNγ (пг/мл)**

Нетрансфицированный	3.82	3170.28
CMV-muIL-2 CO-WPRE	5.92	7633.19
EF-1α-muIL-12p70	12.24	11495.65
CMV-muSTING-R283G	662.03	1060.82
CMV-muIL-2 CO + EF-1α-muIL-12p70	4.59	8511.19
CMV-muIL-15Rα-IL-15sc + EF-1α-muIL-12p70	5.82	11694.78
CMV-muIL-12p70_T2A_muSTING-R283G + EF-1α-muIL-18	324.92	9331.51

Комбинаторная иммунотерапия демонстрирует повышенную противоопухолевую активность в мышиной модели колоректальной аденокарциномы

Чтобы определить, повышает ли опухолеспецифическая доставка комбинации цитокинов противоопухолевую эффективность, использовали конструкцию, кодирующую комбинацию muIL-12p70, muIL-18 и muSTING-R283G (CMV-muIL-12p70_T2A_ muIL-18 + EF- 1 α-muSTING-R283G-WPRE) оценивали на мышиной модели колоректальной аденокарциномы MC38. Для этого исследования 6-8-недельным самкам мышей C57BL/6 (5 мышей в группе) подкожно инокулировали в правый бок клетки колоректальной аденокарциномы MC38 (5×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышамсразвившимисяопухоляминабокахна 10-йденьвнутривенновводили 1×10^7 КОЕштамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB, содержащегоплазмиду, кодирующуюкомбинацию muIL-12p70, muIL-18 и muSTING-R283G (CMV-muIL-12p70_T2A_muIL-18 + EF-1α-muSTING-R283G-WPRE), илис PBS носителем.

Комбинированная терапия очень хорошо переносилась, только первоначальная потеря веса составила 3,6%, которая полностью восстановилась через 3 дня. Это резко контрастирует с токсичностью, наблюдаемой при системном введении этих цитокинов (IL-12p70 и IL-18). По сравнению с контролем PBS

комбинированная терапия была высокоэффективной и лечебной (92,3% TGI, 60% уровень излечения, 30-й день). Эти данные демонстрируют эффективность и безопасность доставки комбинаций цитокинов опухолеспецифическим образом с использованием описанных здесь иммуностимулирующих бактериальных штаммов.

Пример 15

Скрининг белковой инженерии для выявления мутаций с улучшенным приобретением функции в генах STING, RIG-I, MDA5, IRF3, IRF7 и других путях интерферона

Аминокислотные мутанты с приобретением функции (GOF), которые конститутивно активны и способствуют развитию интерферонопатий, идентифицированы у людей. Многие мутации GOF происходят из-за изменений нуклеотидов в одной паре оснований, которые изменяют кодон аминокислоты в этом конкретном положении в гене. Например, при STING мутация V147L возникает из-за мутации c.439G ^C; N154S возникает из-за мутации c.461A ^G; а V155M возникает из-за мутации c.463G ^A. Цель скрининга состояла в том, чтобы идентифицировать конститутивно активные мутанты, которые приводят к высоким уровням экспрессии интерферона I типа. Разработанные мутации в сайтах, которые, как известно, способствуют интерферонопатии при мутациях у пациентов-людей, позволяют протестировать большее количество аминокислотных замен.

В этом примере направленный на сайт мутагенез с обозначенными аминокислотами позволен в положениях известных мутаций (см. Таблицу ниже).

Примеры белков с нормальной функцией, куда вводятся мутации	Мутации с приобретением функции
STING/TMEM173 (SEQ ID NOs: 305-309)	S102P
	V147L
	V147M
	N154S
	V155M
	G166E
	C206Y
	G207E
	S102P/F279L
	F279L
	R281Q
	R284G
	R284S
	R284M
	R284K
	R284T
	R197A
	D205A
	R310A
	R293A
	T294A
	E296A
	R197A/D205A
	S272A/Q273A
	R310A/E316A
	E316A
	E316N
	E316Q
	S272A

Примеры белков с нормальной функцией, куда вводятся мутации	Мутации с приобретением функции
	R375A
	R293A/T294A/E296A
	D231A
	R232A
	K236A
	Q273A
	S358A/E360A/S366A
	D231A/R232A/K236A/R238A
	S358A
	E360A
	S366A
	R238A
	S324A/S326A
MDA5/IFIH1 (SEQ ID NO: 310)	T331I
	T331R
	A489T
	R822Q
	G821S
	A946T
	R337G
	D393V
	G495R
	R720Q
	R779H
	R779C
	L372F
	A452T
RIG-I (SEQ ID NO: 311)	E373A
	C268F

Аминокислотные остатки R197, D205, R310, R293, T294, E296, S272, Q273, E316, D231, R232, K236, S358, E360, S366 и R238 относительно последовательности STING человека, как указано в SEQIDNO:305-309, соответствуют аминокислотным остаткам R196, D204, R309, R292, T293, E295, S271, Q272, E315, D230, R231, K235, S357, E359, S365 и R237, соответственно, со ссылкой на последовательность мышиного STING, как указано в SEQIDNO:369.

Создают праймеры для ПЦР со сконструированными заменами, фланкированными на 5'- и 3'-концах гомологичными последовательностями сДНК из гена. Набор QuikChange® Site-DirectedMutagenesis (Agilent) или другой сопоставимый имеющийся в продаже набор используется для создания продукта PCR, включающего сконструированную мутацию. Плазмиды, амплифицированные с помощью PCR, обрабатывают DpnI, затем электропорируют в компетентные клетки E.coli.

Отдельные клоны выделяют, проводят минипрепарирование плазмид и подтверждают идентичность последовательности желаемой мутации. Затем проводят крупномасштабное препарирование плазмид (с использованием набора Qiagen), и ДНК трансфицируют в репортерные клетки HEK293TSTING (InvivoGen), которые не содержат эндогенного STING. Эти клетки экспрессируют люциферазуLucia™, секретируемую люциферазу, находящуюся под контролем эндогенного промотора IFN-β; кодирующая последовательность IFN-β была заменена ORFлюциферазыLucia™ с использованием технологии нокаута. Конститутивно активированные мутанты затем идентифицируют и ранжируют путем измерения индуцированной промотором IFN-β экспрессии активности люциферазы.

Пример 16

Различные виды иммуностимулирующих бактерий с инактивирующими делециями, соответствующими делециям в Salmonellatyphimurium.

В приведенных выше примерах описываются типичные модификации генома Salmonellatyphimurium для увеличения нацеливания и накопления Salmonellatyphimurium в иммунорезидентных миелоидных клетках и в микроокружении опухоли, для доставки терапевтических продуктов/полезных нагрузок к опухолям, а также для снижения токсичности бактерий за счет устранения их способности инфицировать другие типы клеток. Эти генетические модификации аналогичным образом могут быть введены в другие бактериальные штаммы и виды, например, путем удаления соответствующих генов у других видов, как описано ниже.

Escherichiacoli

Внутрирамочные хромосомные делеции генов lpxM, purM, asd, fliC, fliE, pagP, ansB и csgD последовательно вносят в штаммы E. coli с использованием методики, основанной на методах рекомбинации, описанных Даценко и Ваннером (Proc. Natl. Acad. ,Sci. USA97:6640–6645 (2000)). Гены E. coli следующие:

1) lpxM, кодирующий миристоилацил-носитель белок-зависимую ацилтрансферазу [E. coli штамм K-12, субштаммMG1655; ID гена NCBI: 945143];

2) purM, кодирующая фосфорибозилформилглицинамидциклолигазу [E. coli штамм K-12, субштаммMG1655; ID гена NCBI: 946975];

3) asd, кодирующий аспартат-полуальдегиддегидрогеназу [E. coli штамм K-12, субштаммMG1655; ID гена NCBI: 947939];

4) fliC, кодирующий структурный белок флагелловых нитей [E. coli штамм K-12, субштаммMG1655; ID гена NCBI: 949101];

5) fliE, кодирующий белок базального тельца флагеллFliE [E. coli штамм K-12, субштаммMG1655; ID гена NCBI: 946446];

6) pagP, кодирующий пальмитоилтрансферазуLipidIVA [E. coli штамм K-12, субштаммMG1655; ID гена NCBI: 946360];

7) ansB, кодирующий L-аспарагиназу 2 [E. coli штамм K-12, субштаммMG1655; ID гена NCBI: 947454];

8) csgD, кодирующий ДНК-связывающий двойной регулятор транскрипции CsgD [E. coli штамм K-12, субштаммMG1655; ID гена NCBI: 949119]; и

9) rpsM, кодирующий 30Sрибосомную субъединицу белка S13 (промотор) [E. coli штамм K-12, субштаммMG1655; Идентификатор гена NCBI: 947791].

Вкратце, конкретная хромосомная последовательность заменяется селектируемым маркером устойчивости к антибиотикам, окруженным гомологическими плечами, и затем удаляется с помощью системы cre/loxP. 5'- и 3'-фланкирующие последовательности каждого целевого гена идентифицируют и клонируют в плазмидный вектор на противоположных сторонах гена устойтивостик антибиотикам.

Кассету делеции гена, содержащую ген устойчивости к антибиотикам и фланкирующие 5'- и 3'-гомологические плечи, амплифицируют с помощью PCR, очищают в геле и вводят в штамм E. coli путем электропорации. Электропорированные клетки извлекают, и трансформанты отбирают для планшетов с антибиотиками. Затем антибиотический маркер обрабатывают с использованием системы рекомбинации cre/loxP, в которой клоны, устойчивые к антибиотикам, трансформируются с помощью cre-экспрессирующей температурно-зависимой плазмиды. Колонии отбирают при 30°C и затем удаляют путем серийного пассирования при 42°C, после чего проводят скрининг на предмет потери устойчивости к антибиотикам. В клонах, чувствительных к антибиотикам, делецию гена подтверждают с помощью PCR колоний и анализа последовательности.

Повышение устойчивости или придание E. coli устойчивости к комплементу человека

Экспрессия гена Salmonellatyphimuriumrck (устойчивость к уничтожению комплемента), гомолога Yersiniaenterocoliticaail (локус инвазии прикрепления) или гена SalmonellatyphimuriumpgtE (сериновая протеаза наружной мембраны) в штамм E. coliΔlpxM/ ΔpurM/ Δasd/ ΔfliC/ ΔfliE/ ΔpagP/ ΔansB/ ΔcsgD получают путем кодирования последовательности гена rck, ail или pgtE ниже конститутивного промотора, такого как E. coli или S. typhimuriumrpsM, на плазмиде (совместимой с системой комплементацииasd) или путем вставки в бактериальную хромосому (в любом из локусов lpxM, purM, asd, fliC, fliE, pagP, ansB или csgD).

Salmonellatyphi

Хромосомные делеции внутри рамки считывания генов msbB, purM, asd, fliC, flgB, pagP, ansB и csgD последовательно осуществляют в штаммах S.typhi с использованием методики, описанной выше для штаммов на основе E.coli.

Достигнута экспрессия гена Salmonellatyphimuriumrck (резистентность к уничтожению комплемента), гомолога Yersiniaenterocoliticaail или гена SalmonellatyphimuriumpgtE в штамме S. typhiΔmsbB/ ΔpurM/ Δasd/ ΔfliC/ ΔflgB/ ΔpagP/ ΔansB/ ΔcsgD путем кодирования последовательности гена rck, ail или pgtE ниже конститутивного промотора, такого как rpsMS. typhimurium или S. typhi, на плазмиде (совместимой с системой комплементацииasd) или путем вставки в бактериальную хромосому (в любой из локусов msbB, purM, asd, fliC, flgB, pagP, ansB или csgD). Гены S. typhi следующие:

1) msbB (STY2097), кодирующийацилтрансферазулипидаA [Salmonella enterica subspecies enterica серовар Typhi, штамм CT18; ID гена NCBI: 1248440];

2) purM (STY2740), кодирующийфосфорибозилформилглицинамидинциклолигазу [Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi, штамм CT18; ID гена NCBI: 1249054];

3) asd (STY4271), кодирующийаспартат-полуальдегиддегидрогеназу [Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi, штамм CT18; ID гена NCBI: 1250488];

4) fliC (STY2167), кодирующийфлагеллин [Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi, штамм CT18; ID гена NCBI: 1248507];

5) flgB (STY1213), кодирующийбелокфлагеллыбазальноготельцаFlgB [Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi, штамм CT18; ID гена NCBI: 1247617];

6) pagP (STY0677), кодирующийантимикробныйпептидустойчивости и белокацилированиялипида A [Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi, штамм CT18; ID гена NCBI: 1247137];

7) ansB (STY3259), кодирующий L-аспарагиназу [Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi, штамм CT18; ID гена NCBI: 1249541];

8) csgD (STY1179), кодирующийрегуляторныйбелокCsgD [Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi, штамм CT18; ID гена NCBI: 1247585]; и 9) rpsM (STY4380), кодирующийбелок S13 субъединицы 30S рибосомы (промотор) [Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi, штамм CT18; Идентификаторгена NCBI: 1250594].

Listeriamonocytogenes

Внутрирамочные хромосомные делеции генов purA, purQ, purS, asd, flaA, fliC, flgB и ansB у Listeriamonocytogenes достигаются с помощью метода аллельного обмена с использованием термочувствительного челночного вектора, такого как

pKSV7, который придает устойчивость к антибиотикам. и допускает репликацию при низких температурах (30 ° C), но не может воспроизводиться при более высокой температуре (43 ° C). 5'- и 3'-фланкирующие последовательности каждого гена-мишени идентифицируют и клонируют в тандеме в вектор pKSV7, который трансформируют в реципиентнуюListeriamonocytogenes и отбирают путем посева на чашки с агаром с антибиотиком. Хромосомную интеграцию плазмиды индуцируют серийным пассажем устойчивых к антибиотикам трансформантов при 42°C в условиях селекции. Последующее последовательное субкультивирование штамма при 30 °C приводит к субпопуляциям клеток, в которых плазмиды вырезаются посредством второго события кроссинговера, вызывая реверсии исходного гена дикого типа или включение 5'- и 3'-фланкирующих плеч гомологии последовательности. для создания целевого делеционного мутанта. На этом этапе проводят скрининг клонов, чувствительных к антибиотикам, с помощью PCR колоний и анализа последовательности.

Для повышения устойчивости комплемента экспрессия гена Salmonellatyphimuriumrck (резистентность к уничтожению комплемента), гомолога Yersiniaenterocoliticaail или гена SalmonellatyphimuriumpgtE в ListeriamonocytogenesΔpurA/ ΔpurQ/ ΔpurS/ Δasd/ ΔflaA/ ΔfliC/ ΔflgB/ ΔansB достигается путем кодирования последовательности гена rck, ail или pgtE ниже конститутивного промотора, такого как Phyper или Phelper, на плазмиде (совместимой с системой комплементацииasd) или путем вставки в бактериальную хромосому (в любой из purA, локусы purQ, purS, asd, flaA, fliC, flgB или ansB). Гены L. monocytogenes следующие:

1) purA (lmo0055), кодирующаяаденилосукцинатсинтетазу [Listeria monocytogenes штамм EGD-e; ID гена NCBI: 986069];

2) purQ (lmo1769), кодирующийфосфорибозилформилглицинамидинсинтазу II [Listeria monocytogenes штамм EGD-e; ID гена NCBI: 985972];

3) purS (lmo1771), кодирующаясубъединицуPurSфосфорибозилформилглицинамидинсинтазы [Listeria monocytogenes штамм EGD-e; ID гена NCBI: 985970];

4) asd (lmo1437), кодирующийаспартат-полуальдегиддегидрогеназу [Listeria monocytogenes штамм EGD-e; ID гена NCBI: 986492];

5) flaA (lmo0690), кодирующийфлагеллин [Listeria monocytogenes штамм EGD-e; ID гена NCBI: 987167];

6) fliE (lmo0712), кодирующийбелокфлагеллиновогокрюка-базальноготельцаFliE [Listeria monocytogenes штамм EGD-e; ID гена NCBI: 985062];

7) flgB (lmo0710), кодирующийбелокфлагеллыбазальноготельцаFlgB [Listeria monocytogenes штамм EGD-e; ген NCBI ID 985059]; и

8) ansB (lmo1663), кодирующийаспарагинсинтетазу [Listeria monocytogenes штамм EGD-e; Идентификаторгена NCBI: 985663].

Гены msbB и pagP отсутствуют у Listeriamonocytogenes, грамположительной бактерии. CsgD также отсутствует у Listeriamonocytogenes. Вместо этого Listeria экспрессирует lcp, кодирующий целлюлозосвязывающий белок Listeria, участвующий в формировании биопленки, который также может быть делетирован.

Bifidobacteriumlongum

Хромосомные делеции BL1122 (purM), BL0492 (asd) и BL1142 (кодирующий предшественник L-аспарагиназы) в рамке считывания в Bifidobacteriumlongum достигаются методом аллельного обмена с использованием несовместимой плазмидной векторной системы, в которой вектор условной репликации, такие как pBS423-ΔrepA, в котором отсутствует ген репликации плазмиды, repA, изначально интегрируется в геном, обеспечивая устойчивость к антибиотикам. Вторую плазмиду, такую как pTBR101-CM, кодирующую ген

repA, впоследствии трансформируют и облегчают второе событие кроссинговера, которое отбирает исходный интегрант для вырезания. 5'- и 3'-фланкирующие последовательности каждого гена-мишени идентифицируют и клонируют в тандеме в вектор условной репликации, лишенный repA, и трансформируют в Bifidobacteriumlongum.

Штамм ΔBL1122/ ΔBL0492/ ΔBL1142. События перекрестной рекомбинации могут происходить в последовательностях плеч гомологии, и удачные плазмидныеинтегранты отбираются и выделяются на планшетах с антибиотиками. Затем интегранты трансформируют несовместимой плазмидой, кодирующей функциональную копию repA, что облегчает второй случай кроссинговера и вырезание плазмиды с дефицитом repA, которая впоследствии теряется из-за несовместимости плазмиды. Геномные делеции подтверждаются PCR колоний и анализом последовательности, а оставшаяся плазмида излечивается удалением селекции и последующей обработкой Rif.

Экспрессия гена rck (устойчивости к уничтожению комплемента) Salmonellatyphimurium, гомолога ailYersiniaenterocolitica или гена pgtESalmonellatyphimurium в штамме BifidobacteriumlongumΔBL1122/ ΔBL0492/ ΔBL1142 достигается путем кодирования последовательности гена rck, ail или pgtE ниже (“по течению”) сильного конститутивного промотора, такого как P_{gap}, на плазмиде (совместимой с системой комплементацииasd) или путем вставки в бактериальную хромосому (в любом из локусов BL1122, BL0492 или BL1142). Гены Bifidobacterium longumследующие:

1) purM (BL1122), кодирующаяфосфорибозилформилглицинамидинциклолигазу [Bifidobacterium longumштамм NCC2705; ID гена NCBI: 1022669];

2) asd (BL0492), кодирующийаспартатполуальдегиддегидрогеназу [Bifidobacterium longumштамм NCC2705; ID гена NCBI: 1023089];

3) BL1142, кодирующийпредшественник L-аспарагиназы (Ntn_Asparaginase_2_like; ферменты, подобные L-аспарагиназетипа 2,

суперсемейства NTN-гидролаз) [штамм Bifidobacterium longum NCC2705; ID гена NCBI: 1023120]; и

4) BL1363 (промотор) [штамм Bifidobacterium longum NCC2705; Идентификаторгена NCBI: 1022828].

Bifidobacteriumlongum неподвижны и лишены флагеллина, грамположительны и лишены msbB и pagP. ГенansBприсутствует, нокодируетаспартат-аммиак-лиазу, котораякатализируетобразованиефумаратаизаспартата (aspA/ansB) [BL0338, штамм Bifidobacterium longum NCC2705; Идентификаторгена NCBI: 1023259].

Clostridium novyi

Внутрирамочныехромосомныеделеции NT01CX_RS09765, NT01CX_RS07625 и NT01CX_RS04325 (asd); геновфлагеллина NT01CX_RS04995, NT01CX_RS04990, NT01CX_RS05070 и NT01CX_RS05075; и геновбелкапалочкибазальноготелафлагелл NT01CX_RS05080 (flgB), NT01CX_RS05085 (flgC) и NT01CX_RS05215 (flgG) у Clostridium достигаются с помощьюметодааллельногообмена, требующегометодавстречногоотбора, включающегосистемытоксин-антитоксин, которыйтребуетиндуцибельногопромотора и токсическийген, такойкакмРНК-интерфераза E. coli mazF. 5'- и 3'-фланкирующие последовательности каждого гена-мишени идентифицируют и клонируют в конфигурации на противоположных сторонах кассеты устойчивости к антибиотикам с передним флангом в векторе, содержащем аллельный обмен, и трансформируют в Clostridiumnovyi. Ген mazF кодируется под контролем индуцибельного промотора lac на векторе аллельного обмена и обеспечивает возможность селекции события двойного кроссинговера путем роста на агаровых чашках с добавлением лактозы. Геномные делеции подтверждаются PCR колоний и анализом последовательности. Затем рекомбинацию Flp-frt можно использовать для излечения кассеты устойчивости к антибиотикам от хромосомы.

Экспрессия гена Salmonellatyphimuriumrck (устойчивость к гибели комплемента), theYersiniaenterocoliticahomologail, или гена Salmonellatyphimuriumpgt E в штамме *Clostridiumnovyi*ΔNT01CX_RS09765/ΔNT01CX_RS07625/ΔNT01CX_RS04325/ΔNT01CX_RS04995/ΔNT01CX_RS04990/ΔNT01CX_RS05070/ΔNT01CX_RS05075/ΔNT01CX_RS05080/ΔNT01CX_RS05085/ΔNT01CX_RS05215 достигается путем кодирования гена rck, ail или pgtE гена, последовательность ниже сильного конститутивного промотора, такого как Pthl, Pptb или другие варианты, на плазмиде (совместимой с системой комплементацииasd) или путем вставки в бактериальную хромосому (в любой из NT01CX_RS09765, NT01CX_RS07625, NT01CX_RS04325, NT01CX_RS04995, локусы NT01CX_RS05070, NT01CX_RS05075, NT01CX_RS05080, NT01CX_RS05085 или NT01CX_RS05215). Гены Clostridium novyiследующие:

1) NT01CX_RS09765, кодирующий AIR-синтазу [Clostridium novyiштамм NT; ID гена NCBI: 4541583];

2) NT01CX_RS07625, кодирующийфосфорибозилформилглицинамидинциклолигазу [Clostridium novyiштамм NT; ID гена NCBI: 4540669];

3) NT01CX_RS04325 (asd), кодирующийаспартат-полуальдегиддегидрогеназу [Clostridium novyiштамм NT; ID гена NCBI: 4541762];

4) NT01CX_RS04995, кодирующийфлагеллин [Clostridium novyiштамм NT; ID гена NCBI: 4541703];

5) NT01CX_RS04990, кодирующийфлагеллин [Clostridium novyiштамм NT; ID гена NCBI: 4539984];

6) NT01CX_RS05070, кодирующийфлагеллин [Clostridium novyi NT; ID гена NCBI: 4539886];

7) NT01CX_RS05075, кодирующийфлагеллин [Clostridium novyi NT; ID гена NCBI: 4539699];

8) NT01CX_RS05080 (flgB), кодирующийбелокпалочкибазальноготелафлагеллыFlgB [Clostridium novyiштамм NT; ID гена NCBI: 4540637];

9) NT01CX_RS05085 (flgC), кодирующийбелокпалочкибазальноготелафлагеллыFlgC [Clostridium novyiштамм NT; ID гена NCBI: 4540143]; и

10) NT01CX_RS05215 (flgG), кодирующийбелокпалочкибазальноготелафлагеллыFlgG [Clostridium novyiштамм NT; Идентификаторгена NCBI: 4540245].

Clostridiumnovyi является грамположительной и не имеет msbB и pagP.

Пример 17

Иммуностимулирующие бактерии, модифицированные для экспрессии вариантов STING позвоночных, которые индуцируют более сильную передачу сигналов IFNI типа и/или более слабую передачу сигналов NF-κB, чем STING человека

Передача сигналов STING активирует два сигнальных пути. Во-первых, это ось TANK, связывающая киназу 1 (TBK1)/IRF3, что приводит к индукции IFN типа I, активации дендритных клеток (DC) и перекрестной презентации опухолевых антигенов для активации $CD8^+$ Т-клеточно-опосредованного антигена. - противоопухолевый иммунитет. Вторым является ядерный фактор каппа-легкая цепь-энхансер сигнальной оси активированных В-клеток (NF-κB), приводящий к провоспалительному ответу, но не к активации ДК и $CD8^+$ Т-клеток, которые необходимы для противоопухолевого иммунитета. Иммунотерапия рака на основе бактерий ограничена в своей способности индуцировать IFN типа I для рекрутирования и активации $CD8^+$Т-клетки, которые необходимы для обеспечения перекрестной презентации опухолевого антигена и стойкого противоопухолевого иммунитета. Следовательно, в данном документе предусмотрены иммуностимулирующие бактерии, которые индуцируют и/или усиливают передачу сигналов IFN типа I и которые снижают передачу сигналов

NF-κB, тем самым увеличивая индукцию опосредованного $CD8^+$ Т-клетками противоопухолевого иммунитета и усиление терапевтической эффективности бактерий. Иммуностимулирующие бактерии, описанные выше, кодируют модифицированные белки STING, которые представляют собой мутанты STING с приобретением функции, которые могут усиливать индукцию IFN типа I по сравнению с STING дикого типа или делать экспрессию IFN типа I конститутивной. В этом примере (и также описанном в подробном описании) белок STING модифицирован для снижения или устранения сигнальной активности NF-κB и для сохранения способности индуцировать IFN типа I, и/или модифицирован для повышения или конститутивной экспрессии IFN типа I. Это приводит к появлению иммуностимулирующих бактерий, которые индуцируют противоопухолевый иммунитет и не индуцируют (или индуцируют в меньшей степени) передачу сигналов NF-κB, которая обычно возникает в результате заражения бактериальными патогенами.

Белки STING разных видов проявляют разные уровни сигнальной активности IFNI типа и NF-kB. Например, передача сигналов STING в клетках человека и мыши приводит к сильному ответу IFN типа I и слабому провоспалительному ответу NF-κB. Для сравнения, передача сигналов STING у рыб с лучевыми плавниками, таких как лосось и данио, вызывает устойчивую активацию преимущественно NF-κB-зависимого ответа, который более чем в 100 раз выше по сравнению с ответом, управляемымIRF3 (т. е. индуцируемым IFN типа I). У других видов, таких как тасманский дьявол, передача сигналов STING приводит к ответу IFN типа I, но практически не вызывает ответа NF-κB. Представленные в настоящем документе иммуностимулирующие бактерии кодируют STING нечеловеческих видов, таких как STING тасманийского дьявола, для того, чтобы использовать способность STING индуцировать ответ IFN типа I, но без сопутствующей индукции ответа NF-κB. Как описано здесь, эти нечеловеческие белки STING также модифицируются путем мутации, чтобы увеличить ответ IFN типа I или сделать его конститутивным. Идентифицированные мутации, которые имеют этот эффект в STING человека, вводятся в нечеловеческие белки STING. Соответствующие остатки идентифицируют путем сравнения.

Также предусмотрены химеры, в которых С-концевой хвост (CTT) STING заменен у одного вида, такого как человек, на CTT белка STING второго (например, не относящегося к человеку) вида, который проявляет небольшую сигнальную активность NF-κB или совсем не проявляет ее. CTT представляет собой неструктурированный отрезок примерно из 40 аминокислот, который содержит звенья последовательности, необходимые для фосфорилирования STING и рекрутирования IRF3. Он может формировать иммунитет, изменяя баланс между передачей сигналов IFNI типа и NF-κB. Это контролируется через независимые модули в CTT, включая модули привязки IRF3, TBK1 и TRAF6. Например, остаток S366 STING человека (см., например, SEQIDNO: 305-309) представляет собой первичный сайт фосфорилирования TBK1, который является частью звена LxIS в CTT, которое необходимо для связывания IRF3, в то время как второе звено PxPLR, включая остаток L374, необходимо для связывания TBK1. Звенья LxIS и PxPLRвысококонсервативны во всех аллелях STING позвоночных. Замена CTT STING человека на STING, например, тасманского дьявола, приводит к варианту STING, который индуцирует ответ IFN типа I, но не ответ NF-κB.

В этом примере иммуностимулирующие бактерии сконструированы для экспрессии варианта STING с повышенной передачей сигналов IFNI типа и/или сниженной передачей сигналов NF-κB по сравнению с STING человека дикого типа (WT) (см., например, SEQIDNO:305 -309). Варианты STING могут происходить от позвоночных, отличных от человека, таких как млекопитающие, птицы, рептилии, амфибии или виды рыб. Виды, изкоторыхполученынечеловеческиебелки STING, включают, нонеограничиваютсяими, тасманскийдьявол (Sarcophilus harrisii; SEQ ID NO:349), мартышка (Callithrix jacchus; SEQ ID NO:359), крупныйрогатыйскот (Bos taurus; SEQ ID NO:360), кошка (Feliscatus; SEQ ID NO:356), страус (Struthio camelus australis; SEQ ID NO:361), хохлатыйибис (Nipponianippon; SEQ ID NO:362), целакант (Latimeriachalumnae; SEQ ID NO: 363-364), кабан (Sus scrofa; SEQ ID NO: 365), летучаямышь (Rousettus aegyptiacus; SEQ ID NO:

366), ламантин (Trichechus manatuslatirostris; SEQ ID NO:367), акула-призрак (Callorhinchusmilii; SEQ ID NO:368) и мышь (Mus musculus; SEQ ID NO:369). Эти STING-белки позвоночных легко активируют иммунную сигнализацию в клетках человека, указывая на то, что молекулярный механизм передачи сигналов STING является общим для позвоночных (см., например, deOliveiraMannetal. (2019) CellReports 27:1165-1175).

БелкиSTINGэтихвидоввызываютменьшуюактивациюсигналаNF-кВи/илибольшуюактивациюсигналаIFNIтипа, чемSTINGчеловека (см., например, deOliveiraMannetal. (2019), Fig.1A). Белки STING дикого типа или модифицированные белки различных видов, отличных от человека, могут быть экспрессированы иммуностимулирующими бактериями, описанными в настоящем документе, как и химеры белков STING человека и не человека.

Различные нечеловеческие белки STING модифицированы таким образом, что нечеловеческий STING имеет более низкую активацию NF-κB и, возможно, более высокую активацию интерферона типа I, чем человеческий STING. Эти нечеловеческие белки STING модифицированы для включения мутации, так что они обладают повышенной активностью IFN типа I или действуют конститутивно в отсутствие лигандовцитозольных нуклеиновых кислот (например, CDN). Мутации обычно представляют собой мутации аминокислот, такие как мутации с приобретением функции, которые связаны с интерферонопатиями у людей. Соответствующие мутации вводятся в белки STING нечеловеческих видов, где соответствующие аминокислотные остатки идентифицируются путем сравнения.

Например, мутациивключают, нонеограничиваютсяими, S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R294A/R294A, E316N, E316Q, S272A, R294A/R294A, E316N, E316Q, S294A, E316N, E316, S294A, E316N, E316N, E316, S294A, E316. E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A и S324A/S326A соссылкойнапоследовательность STING человека, какуказано в

SEQ ID NO:305-309. Соответствующие мутации в STING от других видов перечислены в таблицах ниже. Полученные варианты нечеловеческих белков STING включают одну или несколько из этих мутаций и возможно замену CTT и возможно делецию в сайте связывания TRAF6. и S324A/S326A, в отношении последовательности STING человека, как указано в SEQIDNO:305-309. Соответствующие мутации в STING от других видов перечислены в таблицах ниже.

Варианты STING включают одну или несколько замен аминокислот серина (S) или треонина (T) в сайте фосфорилирования на аспарагиновую кислоту (D), которая является фосфомиметической, что приводит к повышенной или конститутивной активности. Другие мутации включают делецию или замену сайта или сайтов фосфорилирования, таких как 324-326 SLS → ALA при STING, и другие замены для устранения сайта фосфорилирования для уменьшения передачи сигналов NF-κB при STING. Кроме того, предоставлены химеры STING человека с STING других видов, в которых C-концевой хвост (CTT) STING человека заменен на CTTSTING другого вида, который имеет более низкую сигнальную активность NF-κB и/или более высокую сигнальная активность IFNI типа. Варианты белков STING могут включать делецию в сайте связывания TRAF6 CTT для уменьшения передачи сигналов NF-κB.

Человеческий STING (SEQ ID NOs: 305-309)	**ТасманскгодьяволаSTING (SEQ ID NO:349)**	**Марты шки STING (SEQ ID NO:359)**	**Крупного рогатого скотаSTING (SEQID NO:360)**	**Кошки STING (SEQ ID NO:356)**	**Страуса STING (SEQ ID NO:361)**	**Хохлатогоибиса STING (SEQ ID NO:362)**	**ЦелакантаSTING (SEQ ID NO:363)**
S102P	S102P	S102P	S102P	S102P	C107P	V106P	A102P
V147L	V147L	V145L	I147L	V146L	M152L	M151L	I147L
V147M	V147M	V145M	I147M	V146M	-	-	I147M
N154S	N154S	N152S	N154S	N153S	N159S	N158S	G154S
V155M	V155M	V153M	V155M	V154M	V160M	V159M	V155M
G166E	G166E	G164E	G166E	G165E	G171E	G170E	G166E
C206Y	C206Y	C204Y	C206Y	C205Y	C211Y	C210Y	C206Y
G207E	S207E	G205E	G207E	G206E	N212E	D211E	S207E
S102P/F279L	S102P/F279L	S102P/F277L	S102P/F279L	S102P/F278L	C107P/F283L	V106P/F283L	A102P/F279L
F279L	F279L	F277L	F279L	F278L	F283L	F283L	F279L
R281Q	R281Q	R279Q	R281Q	R280Q	R285Q	R285Q	K281Q
R284G	R284G	R282G	R284G	R283G	R288G	R288G	R284G
R284S	R284S	R282S	R284S	R283S	R288S	R288S	R284S

Человеческий STING (SEQ ID NOs: 305-309)	**ТасманскгодьяволаSTING (SEQ ID NO:349)**	**Мартышки STING (SEQ ID NO:359)**	**Крупного рогатого скотаSTING (SEQID NO:360)**	**Кошки STING (SEQ ID NO:356)**	**Страуса STING (SEQ ID NO:361)**	**Хохлатогоибиса STING (SEQ ID NO:362)**	**ЦелакантаSTING (SEQ ID NO:363)**
R284M	R284M	R282M	R284M	R283M	R288M	R288M	R284M
R284K	R284K	R282K	R284K	R283K	R288K	R288K	R284K
R284T	R284T	R282T	R284T	R283T	R288T	R288T	R284T
R197A	R197A	R195A	R197A	R196A	K202A	K201A	R197A
D205A	D205A	D203A	D205A	D204A	S210A	S209A	S205A
R310A	R310A	R308A	R310A	R309A	R314A	R314A	R310A
R293A	R293A	R291A	R293A	R292A	R297A	R297A	R293A
T294A	T294A	T292A	T294A	I293A	T298A	T298A	T294A
E296A	E296A	E294A	E296A	E295A	E300A	E300A	K296A
R197A/ D205A	R197A/ D205A	R195A/ D203A	R197A/ D205A	R196A/ D204A	K202A/ S210A	K201A/ S209A	R197A/ S205A
S272A/ Q273A	S272A/ Q273A	S270A/ Q271A	S272A/ Q273A	S271A/ Q272A	S276A/ Q277A	S276A/ Q277A	S272A/ K273A
R310A/ E316A	R310A/ E316A	R308A/ E314A	R310A/ E316A	R309A/ E315A	R314A/ E320A	R314A/ E320A	R310A/ E318A
E316A	E316A	E314A	E316A	E315A	E320A	E320A	E318A
E316N	E316N	E314N	E316N	E315N	E320N	E320N	E318N
E316Q	E316Q	E314Q	E316Q	E315Q	E320Q	E320Q	E318Q
S272A	S272A	S270A	S272A	S271A	S276A	S276A	S272A
R375A	R377A	R373A	R374A	R373A	R371A	R379A	K376A
R293A/	R293A/	R291A/	R293A/	R292A/	R297A/	R297A/	R293A/

Человеческий STING (SEQ ID NOs: 305-309)	**ТасманскгодьяволаSTING (SEQ ID NO:349)**	**Мартышки STING (SEQ ID NO:359)**	**Крупного рогатого скотаSTING (SEQID NO:360)**	**Кошки STING (SEQ ID NO:356)**	**Страуса STING (SEQ ID NO:361)**	**Хохлатогоибиса STING (SEQ ID NO:362)**	**ЦелакантаSTING (SEQ ID NO:363)**
T294A/ E296A	T294A/ E296A	T292A/ E294A	T294A/ E296A	I293A/ E295A	T298A/ E300A	T298A/ E300A	T294A/ K296A
D231A	D231A	D229A	D231A	D230A	T236A	T235A	N231A
R232A	R232A	R230A	R232A	R231A	R237A	R236A	R232A
K236A	K236A	K234A	K236A	K235A	K241A	K240A	K236A
Q273A	Q273A	Q271A	Q273A	Q272A	Q277A	Q277A	K273A
S358A/ E360A/ S366A	S360A/ E362A/ S368A	S356A/ E358A/ S364A	S357A/ E359A/ S365A	S356A/ E358A/ S364A	S354A/ D356A/ S362A	S362A/ E364A/ S370A	S359A/ E361A/ S367A
D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D229A/ R230A/ K234A/ R236A	D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D230A/ R231A/ K235A/ R237A	T236A/ R237A/ K241A/ R243A	T235A/ R236A/ K240A/ R242A	N231A/ R232A/ K236A/ R238A
S358A	S360A	S356A	S357A	S356A	S354A	S362A	S359A
E360A	E362A	E358A	E359A	E358A	D356A	E364A	E361A
S366A	S368A	S364A	S365A	S364A	S362A	S370A	S367A
R238A	R238A	R236A	R238A	R237A	R243A	R242A	R238A
S324A/ S326A	S326A/ S328A	L322A/ S324A	S324A/ S326A	S323A/ S325A	F328A/ S330A	S328A/ S330A	S327A

Человеческий STING (SEQ ID NOs: 305-309)	**Кабана STING (SEQ ID NO:365)**	**Летучеймыши STING (SEQ ID NO:366)**	**Ламантина STING (SEQ ID NO:367)**	**Акуты-призрака STING (SEQ ID NO:368)**	**Мыши STING (SEQ ID NO:369)**
S102P	S102P	S103P	S105P	S98P	S102P
V147L	I147L	V148L	I150L	I148L	V146L
V147M	I147M	V148M	I150M	I148M	V146M
N154S	N154S	N155S	N157S	N155S	N153S
V155M	V155M	V156M	V158M	V156S	V154M
G166E	G166E	G167E	G169E	G167E	G165E
C206Y	C206Y	C207Y	C209Y	C206Y	C205Y
G207E	G207E	G208E	G210E	K207E	G206E
S102P/F279L	S102P/F279L	S103P/F280L	S105P/F282L	S98P/F280L	S102P/F278L
F279L	F279L	F280L	F282L	F280L	F278L
R281Q	R281Q	-	R284Q	K282Q	R280Q
R284G	R284G	R285G	R287G	R285G	R283G
R284S	R284S	R285S	R287S	R285S	R283S
R284M	R284M	R285M	R287M	R285M	R283M
R284K	R284K	R285K	R287K	R285K	R283K
R284T	R284T	R285T	R287T	R285T	R283T
R197A	R197A	R198A	R200A	K197A	R196A
D205A	D205A	D206A	D208A	S205A	D204A
R310A	R310A	R311A	R313A	R311A	R309A
R293A	R293A	R294A	R296A	R294A	R292A
T294A	T294A	T295A	T297A	T295A	T293A
E296A	E296A	-	E299A	K297A	E295A
R197A/D205A	R197A/D205A	R198A/D206A	R200A/D208A	K197A/S205A	R196A/D204A
S272A/Q2	S272A/Q2	S273A/Q27	S275A/Q27	T273A/N2	S271A/Q27

Человеческий STING (SEQ ID NOs: 305-309)	**Кабана STING (SEQ ID NO:365)**	**Летучей мыши STING (SEQ ID NO:366)**	**Ламантина STING (SEQ ID NO:367)**	**Акуты-призрака STING (SEQ ID NO:368)**	**Мыши STING (SEQ ID NO:369)**
73A	73A	4A	6A	74A	2A
R310A/E316A	R310A/E316A	R311A/E317A	R313A/E319A	R311A/D317A	R309A/E315A
E316A	E316A	E317A	E319A	D317A	E315A
E316N	E316N	E317N	E319N	D317N	E315N
E316Q	E316Q	E317Q	E319Q	D317Q	E315Q
S272A	S272A	S273A	S275A	T273A	S271A
R375A	S374A	R376A	R383A	R374A	R374A
R293A/ T294A/ E296A	R293A/ T294A/ E296A	R294A/T295A	R296A/ T297A/ E299A	R294A/ T295A/ K297A	R292A/ T293A/ E295A
D231A	D231A	D232A	D234A	D231A	D230A
R232A	R232A	R233A	C235A	R232A	R231A
K236A	K236A	K237A	K239A	K236A	K235A
Q273A	Q273A	Q274A	Q276A	N274A	Q272A
S358A/ E360A/ S366A	S357A/ E359A/ S365A	H359A/ E361A/ S367A	S366A/ E368A/ S374A	S359A/ E361A/ S367A	S357A/ E359A/ S365A
D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D232A/ R233A/ K237A/ R239A	D234A/ C235A/ K239A/ R241A	D231A/ R232A/ K236A/ R238A	D230A/ R231A/ K235A/ R237A
S358A	S357A	H359A	S366A	S359A	S357A
E360A	E359A	E361A	E368A	E361A	E359A
S366A	S365A	S367A	S374A	S367A	S365A
R238A	R238A	R239A	R241A	R238A	R237A

Человеческий STING (SEQ ID NOs: 305-309)	**Кабана STING (SEQ ID NO:365)**	**Летучей мыши STING (SEQ ID NO:366)**	**Ламантина STING (SEQ ID NO:367)**	**Акулы-призрака STING (SEQ ID NO:368)**	**Мыши STING (SEQ ID NO:369)**
S324A/S326A	S324A/S326A	S325A/S327A	S327A/S329A	G325A/S330A	S323A/S325A

Например, модифицированныеварианты STING включают STING тасманскогодьявола с мутациями C206Y (SEQ ID NO:350) или R284G (SEQ ID NO:351); вариант, в котором CTT STING человеказзамененна CTT STING тасманскогодьявола (SEQ ID NO:352); STING человека с мутацией C206Y (SEQ ID NO:353) или R284G (SEQ ID NO:354), где CTT замененна CTT STING тасманскогодьявола; человеческий STING дикоготипа с делецией в доменесвязывания TRAF6 (соответствуетостаткам 377-379 (DFS)) (SEQ ID NO:355); STING кошки с мутациями C205Y (SEQ ID NO:357) или R283G (SEQ ID NO:358); и другиеподобныемодифицированныеварианты STING.

Чтобы определить соответствующие аминокислотные остатки для мутаций STING, каждую последовательность белка STING дикого типа из различных видов, отличных от человека, сравнивали с последовательностью белка STING дикого типа человека (аллельных вариантов SEQIDNO: 305 (аллель R232)) или SEQIDNO:306 (аллель H232)). Сравнение выполняли с использованием инструмента сравнения последовательностей Kalign, доступного по адресу ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/, или инструмента сравнения последовательностей игл EMBOSS, доступного по адресу ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/. На Фигурах 1-13 показаны иллюстративные сравнения последовательностей для STING человека по сравнению с белками STING тасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, хохлатого ибиса, латимерии, данио, кабана, летучей мыши, ламантина, акулы-призрака и видов мышей, соответственно.

Гибридные варианты STINGGOF демонстрируют значительно повышенное отношение активности интерферона I типа к активности NF-кВ в дендритных клетках

Чтобы определить оптимальный мутант STINGGOF, который будет вызывать самые высокие уровни CD8 $^{+}$ Т-клеточного хемокинаCXCL10 у мышей, группа мутантов STING была протестирована на мышиных первичных дендритных клетках костного мозга (BMDC). Книмотносятся STING тасманийскогодьяволасконститутивнойчеловеческой

мутацией GOF C206Y (tazSTING C206Y; SEQ ID NO:350) или R284G (tazSTING R284G; SEQ ID NO:351); мышиный STING сконститутивнымимутантами GOF C205Y (muSTING C205Y; SEQ ID NO:399) или R283G (muSTING R283G; SEQ ID NO:400); cat STING сконститутивнымимутантами GOF C205Y (catSTING C205Y; SEQ ID NO:357) или R283G (catSTING R283G; SEQ ID NO:358); атакжеварианты, вкоторыхCTT STING человека (SEQ ID NO:370) былзамененнаCTT STING тасманскогодьявола (SEQ ID NO:371), исодержащиелибо STING человекадикоготипа (huSTINGtazCTT; см., например, , SEQ ID NO:352), иличеловеческиемутации C206Y GOF STING (huSTING C206Y tazCTT; см., например, SEQ ID NO:353), или R284G (huSTING R284G tazCTT; см., например, SEQ ID NO:354). Также были включены человеческие варианты STING с конститутивными мутациями GOFC206Y (huSTINGC206Y) или R284G (huSTINGR284G).

Для проверки костный мозг мышей выделяли и помещали в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл, после чего центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 минут для сбора клеток костного мозга. Клетки один раз промывали в RPMI-1640 + 10% FBS, затем высевали в 96-луночные планшеты, обработанные ТС, в RPMI-1640 + 10% FBS с 20 нг/мл GM-CSF. Каждые 2 дня 50% среды заменяли свежей полной средой. Через шесть дней неадгезивные клетки удаляли пипеткой из лунок и повторно высевали по 1e5 клеток на лунку в RPMI-1640 + 10% FBS в 96-луночном планшете для трансфекции. Клетки трансфицировали с использованием Viromer® RED в соответствии с

инструкциями производителя. Вкратце, 200 нгплазмидной ДНК из панели мутантов STINGGOF, а также нетрансфицированный контроль разводили в предоставленном буфере и смешивали с 0. 08 мклViromer® RED и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут для образования комплексов Viromer®. Затем комплексы ДНК/Viromer® RED медленно добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета (в повторах) и планшет инкубировали при 37 °C в CO2-инкубаторе.

Супернатанты собирали через 48 часов и анализировали на мышиный CXCL10 (IP-10) с использованием массива цитокиновых шариков (CBA) на основе проточной цитометрии в соответствии с протоколом производителя.

Как показано в таблице ниже, конструкция, которая индуцировала самую высокую экспрессию CXCL10 мыши, представляла собой STING человека, содержащую мутацию GOFR284G и содержащую замену CTT STING человека на CTT STING тасманского дьявола (huSTINGR284GtazCTT). Следующая по величине экспрессия CXCL10 была индуцирована вариантом STING человека, содержащим мутацию GOFC206Y (huSTINGC206Y), и конструкцией STING тасманийского дьявола, содержащей мутацию R284GGOF человека STING (tazSTINGR284G). Мутанты STING GOF человека (huSTING C206Y ихuSTING R284G) былиболееэффективны, чемсоответствующиемышиныемутанты STING GOF (muSTING C205Y имuSTING R283G соответственно), которыебылидажеменееэффективны, чеммутанты STING кошки, содержащиетежемутации GOF (catSTING C205Y) исatSTING R283G соответственно) впервичныхмышиныхдендритныхклетках.

Конструкция	**muCXCL10 (пг/мл)**
Нерансфецировано	11.48 ± 3.889
huSTING C206Y	861.0 ± 58.48
huSTING R284G	769.7 ± 95.16
muSTING C205Y	194 ± 27.15

Конструкция	**muCXCL10 (пг/мл)**
muSTING R283G	230.1 ± 1.018
huSTING C206Y tazCTT	366.6 ± 42.61
huSTING R284G tazCTT	1326 ± 137.9
tazSTING C206Y	808.8 ± 95.78
tazSTING R284G	831.3 ± 30.15
catSTING C205Y	480.7 ± 24.94
catSTING R283G	376.2 ± 6.682

Эти данные демонстрируют, что белки STING, полученные от других видов, таких как тасманский дьявол, могут быть объединены с конститутивными мутациями GOFSTING человека, чтобы вызвать мощные хемокины, рекрутирующие Т-клетки.

Гибридные варианты STINGGOF демонстрируют значительно улучшенное соотношение активности интерферона I типа и активности NF-κB в моноцитах человека

Чтобы продемонстрировать, что отношение STING-индуцированного интерферона типа I к передаче сигналов NF-κB может быть изменено с использованием гибридных вариантов STINGGOF от других видов, панель была протестирована на клеточной линии моноцитов человека. Панельвключалачеловеческий STING дикоготипа (huSTING) имутантыhuSTINGсконститутивнымимутациями C206Y или R284G GOF человека; STING тасманскогодьяволадикоготипа (tazSTING) имутантыtazSTINGсконститутивнымимутациями GOF C206Y или R284G; STING кошкидикоготипаимутантысatSTINGсконститутивнымимутациями GOF C205 или R283G; мышиныемутанты STING сконститутивнымимутациями GOF C205Y или R283G; иварианты, вкоторыхCTT STING человекабылзамененнаCTT STING тасманскогодьяволаисодержащиемутации C206Y или R284G либо

STING человекадикоготипа, либо STING GOF человекасмутациямиC206Y, или R284G.\

Также включены STINGчеловека дикого типа с делецией TRAF6 домена (соотвественно остаткам 377-379, DFS, см, напр., SEQIDNO:355).

Для этого эксперимента использовали клетки THP1-Dual™ KOSTING, которые были изменены для отсутствия эндогенного STING, а также для экспрессии люциферазыLucia™, секретируемой люциферазы, помещенной под контроль эндогенного промотора IFN-β. Затем идентифицировали конститутивно активные мутанты STINGGOF и ранжировали путем измерения индуцированной промотором IFN-β экспрессии активности люциферазы. Эти клетки также экспрессируют секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), помещенную под контроль эндогенного промотора NF-kB, где кодирующая последовательность NF-kB была заменена ORFSEAP с использованием технологии нокаута. Активность NF-κB, индуцированную мутантами STINGGOF, можно оценить, отслеживая продукцию SEAP в супернатантах клеток.

Для этого эксперимента клетки THP1-Dual™ KOSTINGтрансфицировали с использованием Viromer® RED в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 200 нгплазмидной ДНК из панели мутантов STINGGOF, а также нетрансфицированный контроль разводили в предоставленном буфере, смешивали с 0,08 мклViromer® RED и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут, чтобы Viromer® комплексы образовываться. Затем комплексы ДНК/Viromer® RED медленно добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета (в двух экземплярах) и планшет инкубировали при 37 °C в среде вCO_2 инкубаторе. Кроме того, варианты STING дикого типа обрабатывали агонистом STING 3'5' RpRpc-di-AMP (CDN, InvivoGen) или без него, аналогом клинического соединения ADU-S100,

который добавляли к клеткам после 24 часа инкубации при 10 мкг/мл. Супернатанты собирали через 48 часов и анализировали на наличие репортерных сигналов NF-κB-SEAP и IFN-Lucia в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, 10 мклсупернатантов клеточной культуры добавляли к 50 мкл реагента QUANTI-Blue™ (InvivoGen) (который используется для измерения SEAP). Активацию NF-κBопределялипутемизмеренияактивности SEAP, индуцированной NF-κB, наспектрофотометреSpectraMax® M3 (Molecular Devices) припоглощении (Abs) 650 нм. Для измерения активности интерферона типа I от IFN-Lucia 10 мклсупернатантов клеточной культуры добавляли к 50 мклQUANTI-Luc™, содержащему коэлентеразин субстрат для реакции люциферазы, которая производит световой сигнал, который количественно определяется с помощью люминометраSpectraMax® M3 и выражается в относительных световых единицах (RLU).

Как показано в таблице ниже, самые высокие ответы IFN типа I наблюдались для варианта, в котором CTT STING человека был заменен на CTT STING тасманского дьявола, и который содержал мутацию R284GGOFSTING человека (huSTINGR284GtazCTT), а также от STING рыбки данио дикого типа с агонистом STINGCDN (zfSTINGWT + CDN). Однако, в отличие от STING рыбок данио дикого типа, у которых была очень высокая передача сигналов NF-κB, вариант huSTINGR284GtazCTT имел высокую передачу сигналов IFNI типа с гораздо более низкой активностью передачи сигналов NF-κB. Наилучшее соотношение более высокого уровня IFNI типа к более низкому уровню передачи сигналов NF-κB было обнаружено у варианта STING тасманского дьявола, содержащего мутацию R284G STING GOF человека (tazSTING R284G).

Вариант STING	ISRE-Lucia (RLU)	± SD	NF-κB-SEAP (Abs)	± SD
Untransfected	47.96	33.91	0.065	0.007
huSTING WT + CDN	170.8	38.15	0.100	0.014
huSTING WT delTRAF6 + CDN	164.8	8.48	0.120	0.014
huSTING WT tazCTT + CDN	31.47	10.59	0.060	0.000
tazSTING WT + CDN	143.9	4.24	0.090	0.014
zfSTING WT + CDN	310.2	23.31	0.690	0.028
CMV catSTING WT WPRE + CDN	202.3	6.36	0.125	0.007
huSTING C206Y	175.3	36.03	0.105	0.007
huSTING R284G	143.9	29.67	0.100	0.000
huSTING C206Y tazCTT	137.9	21.19	0.095	0.007
huSTING R284G tazCTT	301.2	61.46	0.250	0.127
tazSTING C206Y	199.3	2.12	0.120	0.000
tazSTING R284G	217.3	19.08	0.105	0.007
muSTING C205Y	43.46	2.12	0.070	0.000
muSTING R283G	32.97	4.24	0.070	0.000
catSTING C205Y	202.3	23.31	0.135	0.007
catSTING R283G	157.4	10.60	0.120	0.000

SD = Стандартное отклонение

Эти данные дополнительно демонстрируют использование нечеловеческих белков STING, таких как белок STING тасманского дьявола, и их комбинирование с человеческими конститутивными мутациями STING с приобретением функции, чтобы повысить полезную активность интерферона типа I при минимизации иммуносупрессивногоNF. -κB активность в моноцитах человека.

Пример 18

Нокаут липопротеинов S. typhimurium путем делеции генов lppA и lppB

Живой аттенуированный штамм S. typhimuriumYS1646, содержащий делеции гена Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, был сконструирован для делеции lppA (SEQIDNO:387) и lppB (SEQIDNO:388) для удаления поверхностных липопротеинов мембраны. Это снижает провоспалительную активацию TLR2, что снижает уровень иммуносупрессивных цитокинов и улучшает противоопухолевый адаптивный иммунитет. Как показано ниже, это также увеличивает доставку плазмиды и экспрессию кодируемого белка в опухоли.

Разработка штаммов и характеристика

Делеция гена lppA

lppA удаляли из хромосомы штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD с использованием модификаций метода Даценко и Ваннера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA97:6640–6645 (2000)), как подробно описано выше. Были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0148 (SEQIDNO:231), синтетические последовательности плеч гомологии гена lppA, которые содержали 231 и 200 оснований левой и правой последовательностей, соответственно, фланкирующие ген lppA. Последовательность гена lppA показана в SEQIDNO:387; соответствующие праймеры для PCR-амплификации были разработаны с использованием последовательности гена. Кассетугенаканамицина, фланкированнуюсайтамисre/loxP, затемклонировали в плазмиду pSL0148, а кассетунокаутногогенаlppAзатемподвергали PCR-амплификации с праймерами lppA-1 и lppA-2, очищалинагеле, и затемпутемэлектропорацииввodили в штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, несущийтермочувствительнуюлямбда-краснуюрекомбинационнуюплазмиду pKD46. Электропорированные клетки извлекали в среде SOC + DAP и высевали на чашки с агаром LB с добавлением канамицина (20 мкг/мл) и диаминопимелиновой кислоты (DAP, 50 мкг/мл). Колонии отбирали и подвергали скринингу на вставку нокаутного

фрагмента с помощью PCR с использованием праймеровlppA-3 и lppA-4. Затем pKD46 излечивали путем культивирования выбранного устойчивого к канамицину штамма при 42°C и скрининга на потерю устойчивости к ампициллину. Затем маркер устойчивости к канамицинуотверждалиэлектропорацией и высевали на чашки с агаром LB с добавлением канамицина (20 мкг/мл) и диаминопимелиновой кислоты (ДАП, 50 мкг/мл). Колонии отбирали и подвергали скринингу на вставку нокаутного фрагмента с помощью PCR с использованием праймеровlppA-3 и lppA-4. Затем pKD46 обрабатывали путем культивирования выбранного устойчивого к канамицину штамма при 42°C и скрининга на потерю устойчивости к ампициллину. Затем маркер устойчивости к канамицинуотверждалиэлектропорацией и высевали на чашки с агаром LB с добавлением канамицина (20 мкг/мл) и диаминопимелиновой кислоты (ДАП, 50 мкг/мл). Колонии отбирали и подвергали скринингу на вставку нокаутного фрагмента с помощью ПЦР с использованием праймеровlppA-3 и lppA-4. Затем pKD46 обрабатывали путем культивирования выбранного устойчивого к канамицину штамма при 42°C и скрининга на потерю устойчивости к ампициллину.

Затем маркер устойчивости к канамицинуотверждалиэлектропорацией и высевали на чашки с агаром LB с добавлением канамицина (20 мкг/мл) и диаминопимелиновой кислоты (ДАП, 50 мкг/мл). Колонии отбирали и подвергали скринингу на вставку нокаутного фрагмента с помощью ПЦР с использованием праймеровlppA-3 и lppA-4. Затем pKD46 излечивали путем культивирования выбранного устойчивого к канамицину штамма при 42°C и скрининга на потерю устойчивости к ампициллину. Затем маркер устойчивости к канамицинуотверждалиэлектропорацией и высевали на чашки с агаром LB с добавлением канамицина (20 мкг/мл) и диаминопимелиновой кислоты (ДАП, 50 мкг/мл). Колонии отбирали и подвергали скринингу на вставку нокаутного фрагмента с помощью ПЦР с использованием праймеровlppA-3 и lppA-4. Затем pKD46 излечивали путем культивирования выбранного устойчивого к канамицину штамма при 42°C и скрининга на потерю устойчивости к

ампициллину. Затем маркер устойчивости к канамицинуотверждалиэлектропорацией чувствительной плазмиды, экспрессирующей рекомбиназуCre (pJW168), и колонии Amp ^{R} отбирали при 30°C; Затем pJW168 удаляли путем выращивания культур при 42 °C. Отобранные нокаутные клоны lppAзатем тестировали на потерю канамицинового маркера с помощью PCR с использованием праймеров, фланкирующих участки разрушения (lppA-3 и lppA-4), и проводили оценку электрофоретической подвижности на агарозных гелях. Это мутантное производное штамма YS1646 было обозначено как YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppA.

Делеция гена *lppB*

Затем lppB удаляли в штамме YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/lppA с использованием модификаций способов, описанных выше. Были синтезированы и клонированы в плазмиду, названную pSL0148 (SEQIDNO:231), синтетические последовательности плеч гомологии гена lppB, которые содержали 224 и 231 основание левой и правой посЗледовательностей, соответственно, фланкирующие ген lppB. Последовательность гена lppB показана в SEQIDNO:388; соответствующие праймеры для ПЦР-амплификации были разработаны с использованием последовательности гена. Кассетугенаканамицина, фланкированнуюсайтамиcre/loxP, затемклонировали в плазмиду pSL0148, а нокаутнуюкассетугенаlppBподвергали PCR-амплификации с праймерами lppB-5 и lppB-6, очищалинагеле и вводили в штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB. /ΔcsgD/lppA, несущийтермочувствительнуюрекомбинационнуюплазмидулямбда-красного pKD46, путемэлектропорации. Затем ген устойчивости к канамицину обработали с помощью Cre-опосредованной рекомбинации, как описано выше, а чувствительные к температуре плазмиды обработали путем роста при непереносимой температуре. Последовательности нокаутных генов lppA и lppBамплифицировали с помощью PCR с использованием праймеров, обозначенных как lppA-3 и lppA-4, и lppB-7 и lppB-8 соответственно, и

подтверждали секвенированием ДНК. Этомутантноепроизводноештамма YS1646 былообозначено YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppABили YS1646ΔlppAB.

Invitro характеристика сконструированного штамма с нокаутом липопротеинов S. typhimurium

Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB, несущий делеции lppA и lppB, оценивали на рост с помощью ночных культур в LB. Рост измеряли с помощью спектрофотометра SpectraMax® M3 (MolecularDevices) при 37 °C, измеряя OD600 каждые 15 минут. Результатыпоказали, чтоштамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppABбылспособенреплицироваться в LB соскоростьюроста, сравнимой с родительскимштаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD. Эти данные показывают, что элиминация липопротеина не снижает приспособленности S.typhimuriuminvitro.

Делеция липопротеина увеличивает доставку плазмиды в опухоль после системного введения

Поскольку TLR2 экспрессируется на эндотелиальных клетках сосудов, а активация TLR2 повышает проницаемость сосудов, оценивали влияние ΔlppAB и последующее снижение агонизмаTLR2 на колонизацию опухоли. Также оценивалось влияние на экспрессию полезной нагрузки. Как показано ниже, в то время как колонизация опухолей несколько снижалась, доставка плазмиды и экспрессия кодируемого гена значительно увеличивались после системного введения.

Чтобы продемонстрировать влияние штаммов с нокаутом липопротеинов на мышиную модель трижды негативного рака молочной железы, самкам мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель (4 мыши в группе) ортотопическиинокулировали клетки EMT6 в жировую ткань 4й молочной железы. (5×10^{5} клеток в 100 мклPBS). Мышам с 10-дневными развившимися опухолями на боках внутривенно вводили однократную дозу 1 x $^{10}{}^{7}$ КОЕ

штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB или родительского штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, каждая из которых содержит плазмиду, кодирующую белок люциферазы (NanoLuciferase® luciferase, или NanoLuc®, Promega), которые секретируются (secNanoLuc®) под контролем промотора CMV. На 7-й день после внутривенного введения мышей подвергали эвтаназии, а опухоли гомогенизировали и высевали на чашки LB для подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм опухолевой ткани. Родительский штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD колонизировал опухоли в среднем 3,3 $\times 10^{6}$ КОЕ на грамм опухолевой ткани, в то время как штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB с делецией липопротеинов колонизировал опухоли с 2-кратным снижением среднего значения 1,18 x 10^{6} КОЕ/г опухолевой ткани.

Для измерения доставки плазмиды в опухоль и последующей экспрессии гетерологичного гена и секреции белка измеряли активность secNanoLuc®. Для этого гомогенизированные опухоли оценивали на активность люциферазы с использованием реагента для обнаружения NanoGlo® (Promega) и считывали на спектрофотометре/люминометреSpectraMax® M3 (MolecularDevices). В то время как родительский штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD индуцировал средние относительные световые единицы (RLU) люминесценции, равные 4482,6, штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB индуцировал почти 10-кратное увеличение в среднем до 33 926,6 RLU. Эти данные демонстрируют способность липопротеин-делетированного штамма улучшать колонизацию опухоли и усиливать экспрессию полезной нагрузки.

Эти данные показывают, что хотя делеция липопротеина несколько снижает колонизацию опухоли после внутривенного введения, она значительно увеличивает доставку плазмиды и экспрессию полезной нагрузки в опухоли. Эти данные демонстрируют, что, вопреки ожиданиям специалистов, что делеция этих генов уменьшит колонизацию, делеция липопротеинов усиливает доставку плазмиды и экспрессию белка в микроокружении опухоли и в опухолях.

Пример 19

Человеческие и мышиные 4-1BBL с укороченным цитозольным доменом экспрессируются так же, как и 4-1BBL дикого типа

Как обсуждалось в настоящем документе, варианты костимулирующей молекулы 4-1BBL, в которых отсутствует цитоплазматический домен (4-1BBLΔcyt), усиливают активацию 4-1BBL без иммуносупрессивной обратной передачи сигналов, которая происходит через цитоплазматический домен молекулы. В примере 9 показано, что мышиный 4-1BBLΔcyt может экспрессироваться на поверхности клеток человека. Как показано ниже, варианты 4-1BBL, полностью лишенные цитоплазматического домена, плохо экспрессируются. Для решения этой проблемы предусмотрены варианты 4-1BBL, в которых цитоплазматический домен укорочен, так что устраняется иммуносупрессивная обратная передача сигналов.

Полноразмерные человеческие и мышиные 4-1BBL содержат положительные заряды внутри цитоплазматического домена, который находится на N-конце белка. Это способствует расположению N-конца в цитоплазме и обеспечивает правильную ориентацию трансмембранного домена и, следовательно, внеклеточного домена. Таким образом, полноразмерные человеческие и мышиные 4-1BBL экспрессируются на высоких уровнях. При удалении полного цитоплазматического домена из 4-1BBL человека и мыши с образованием вариантов 4-1BBLΔcyt положительные заряды на N-конце удаляются, что способствует расположению N-конца вне клетки. Это приводит к неправильной ориентации трансмембранного домена (который теперь находится на N-конце) и конфигурации «наизнанку» для вариантов 4-1BBLΔcyt, экспрессируемых на клеточной поверхности. Таким образом, варианты 4-1BBLΔcyt экспрессируются на гораздо более низких уровнях, чем полноразмерные белки 4-1BBL.

Чтобы улучшить экспрессию 4-1BBL, не индуцируя иммуносупрессивную обратную передачу сигналов, варианты 4-1BBL человека и мыши были рационально сконструированы с укорочением до цитоплазматического домена, а не с полной делецией цитоплазматического домена. Варианты 4-1BBL человека и мыши с укороченными цитоплазматическими доменами содержат последние 4 (RVLP) и последние 5 (SRHPK) аминокислотных остатков соответственно цитоплазматического домена, которые примыкают к трансмембранному домену. Это повторно вводит положительно заряженные остатки обратно в N-конец, способствуя его положению внутри клетки и корректируя ориентацию трансмембранного домена и конфигурацию «изнутри наружу». Это приводит к повышенной экспрессии вариантов 4-1BBL с укороченными цитоплазматическими доменами по сравнению с экспрессией вариантов 4-1BBLΔcyt.

Кроме того, были созданы варианты человеческого и мышиного 4-1BBL с укороченными цитоплазматическими доменами и с меткой Myc, добавленной к N-концу, с гипотезой о том, что добавление метки Myc добавит дополнительные положительные остатки к N-концу укороченного цитоплазматического домена, исправляя конфигурацию наизнанку и увеличивая экспрессию белка.

Последовательности полноразмерных белков 4-1BBL человека и мыши, а также варианты с частично укороченными цитоплазматическими доменами (CytTrunc) и удаленными цитоплазматическими доменами (Δcyt) представлены в таблице ниже. Цитоплазматический домен выделен жирным шрифтом и подчеркнут; **трансмембранная область** выделена жирным шрифтом; внеклеточная область подчеркнута; а MycTagподчеркнута дважды.

Последовательности полноразмерных человеческих и мышиных 4-1BBL и вариантов с укороченными или удаленными цитоплазматическими доменами

Вариант	Последовательность белка	SEQ ID NO.
Человеческий 4-1BBL, полноразмерный	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE	389
Человеческий 4-1BBLΔcyt	MWALVAGLLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE	390
Человеческий 4-1BBL укороченный цитоплазматический	MRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE	391
Человеческий 4-1BBL CytTrunc + MycTag	MEQKLISEEDLRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW	392

Вариант	Последовательность белка	SEQ ID NO.
	QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE	
Мышиный 4-1BBL, полноразмерный	MDQHTLDVEDTADARHPAGTSCPSDAALLRDTGLLADAALLSDTVRPTNAALPTDAAYPAVNVRDREAAWPPALNFCSRHPKLYGLVALVLLLLIAACVPIFTRTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKPDNPWE	393
Мышиный 4-1BBLΔcyt	MLYGLVALVLLLLIAACVPIFTRTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKPDNPWE	394
Мышиный 4-1BBL укороченный цитоплазматический	MSRHPKLYGLVALVLLLLIAACVPIFTRTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKPDNPWE	395

Вариант	Последовательность белка	SEQ ID NO.
Мышиный 4-1BBL CytTrunc + Myc Tag	MEQKLISEEDLSRHPKLYGLVALVLLLLIAACVPIFT RTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNT TQQGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHSQDGAGSS YLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFT NTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPC SMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQ DAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKPDNPWE	396

Чтобы српвнить уровни экспрессии сконструированных вариантов 4-1BBL с уровнями экспрессии полноразмерных белков 4-1BBL, клетки HEK293Ттрансфицировали 500 нг ДНК, кодирующей полноразмерный белок или его вариант, с использованием реагента для трансфекции FuGENE® (Promega), при правильном соотношении реагент:ДНК, с нетрансфицированными клетками в качестве отрицательного контроля. Через 48 часов после трансфекции собирали трансфицированные клетки HEK293T и окрашивали либо антителом против мышиного 4-1BBL, либо антителом против человеческого 4-1BBL, в зависимости от ситуации. Окрашивание мышиного 4-1BBL проводили с использованием биотинилированного антитела против мышиного 4-1BBL (клон TKS-1; BioLegend), а затем конъюгатастрептавидин-аллофикоцианин (APC) (BioLegend). Окрашивание человеческого 4-1BBL проводили с использованием APC-конъюгированного антитела против человеческого 4-1BBL (клон 5F4; BioLegend). Нетрансфицированные клетки также окрашивали для измерения фоновой флуоресценции. Экспрессию мембраносвязанного 4-1BBL измеряли с помощью проточной цитометрии, и результаты представлены в виде средней интенсивности флуоресценции (dMFI) за вычетом фона (т. е. путем вычитания MFI отрицательного контроля (окрашенные нетрансфицированные клетки), из MFI образца).

Как показано в таблицах ниже, как для человека, так и для мыши 4-1BBL экспрессия вариантов с укороченным цитоплазматическим доменом была

значительно выше, чем экспрессия вариантов с полной делецией цитоплазматического домена.

Несмотря на отсутствие полноразмерного цитоплазматического домена, вариант 4-1BBL человека с укороченным цитоплазматическим доменом экспрессировался на уровне 93% от уровня экспрессии полноразмерного 4-1BBL человека, тогда как для варианта 4-1BBL человека с полным цитоплазматическим доменом делеция домена была выражена на уровне 42% от уровня экспрессии полноразмерного человеческого 4-1BBL. Для ортологичной мыши 4-1BBL вариант с укороченным цитоплазматическим доменом экспрессировался на уровне 63% от уровня экспрессии полноразмерного мышиного 4-1BBL, тогда как вариант с полной делецией цитоплазматического домена экспрессировался на уровне 13% от уровня экспрессии полноразмерной мыши 4-1BBL.

Для каждого из укороченных вариантов мышиного и человеческого 4-1BBL тестировали конструкцию с меткой Мус, чтобы определить, повысит ли уровень экспрессии добавление дополнительных положительных аминокислотных остатков к укороченной цитоплазматической части 4-1BBL. Однако, как показано в таблицах ниже, добавление метки Мус к вариантам с укороченным цитоплазматическим доменом снижало экспрессию по сравнению с вариантами с усеченным цитоплазматическим доменом и без метки Мус. Неизвестно, почему тег Мус снижает экспрессию, однако добавление тега Мус потенциально может привести к неоптимальной последовательности для экспрессии 4-1BBL.

Уровни экспрессии вариантов 4-1BBL человека с укороченными или удаленными цитоплазматическими доменами

Варианы 4-1BBL человека	Свянанный с мембраной - 1BBLЭеспресс	% экспресии полноразмерного 4-1BBL

	ия в клеткахHEK293T (dMFI)	
Человеческий 4-1BBL, полноразмерный	1.04E+04	100.00
Человеческий 4-1BBL, цитоплазматический домен удален	4.39E+03	42.21
Человеческий 4-1BBL, цитоплазматический домен укорочен	9.71E+03	93.37
Человеческий 4-1BBL, цитоплазматический домен укорочен + Myctag	1.77E+03	17.02

Уровни экспрессии вариантов мышиных 4-1BBL с укороченными или удаленными цитоплазматическими доменами

5

Варианты мышиных 4-1BBL	**Связанный с мембраной 4-1BBLЭкспрессия в клетках HEK293T (dMFI)**	**% экспрессии полноразмерного 4-1BBL**
Мышиный 4-1BBL, полноразмерный	4.06E+05	100.00
Мышиный 4-1BBL, цитоплазматический домен удален	5.43E+04	13.37
Мышиный 4-1BBL, цитоплазматическй домен укорочен	2.56E+05	63.05
Мышиный 4-1BBL, цитоплазматический домен укорочен + Myctag	7.54E+04	18.57

Пример 20

cFv-Fc анти-CTLA-4 демонстрирует превосходную блокаду взаимодействий CD80/CTLA-4 и CD86/CTLA-4 по сравнению с scFv анти-CTLA-4 scFv.

Анти scFv-Fc, специфичный в отношении CTLA-4 человека (см. SEQIDNO: 401 и 402 для последовательностей нуклеиновых кислот и белков соответственно) был разработан с использованием аминокислотной последовательности ипилимумаба. Ипилимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1κ, которое специфически связывается с CTLA-4 человека (см., например, антитело, обозначенное как 10D1 в публикации патента США № 2002/0086014 и в патенте США № 6984720), блокируя иммуноингибирующее взаимодействие CTLA-4 с CD80 (также известный как B7.1 или B7-1) и CD86 (также известный как B7.2 или B7-2).

Для получения фрагмента антитела ипилимумабscFv (см. SEQIDNO: 403) вариабельную область легкой цепи (V_L) и вариабельную область тяжелой цепи (V_H) ипилимумаба связывали с линкером глицин-серин (GS) длиной 20 аминокислот. $((ГГГГС)_4$). Для создания фрагмента антитела scFv-Fc (см. SEQIDNO:402) вариабельную тяжелую цепь scFvипилимумаба связывали с FcIgG1 человека, содержащим мутацию свободного цистеина в шарнирной области на серин (при положение 272 в SEQIDNO:402). Лидерная последовательность (METPAQLLFLLLLWLPDTTG; соответствующая остаткам 1-20 в SEQIDNO: 402) была получена из последовательности белка каппа-переменной 3-20 человеческого иммуноглобулина (IGKV3-20). Последовательность была оптимизирована по кодонам с использованием инструмента оптимизации кодонов GenScripGenSmart™.

Нейтрализующую способность scFv-Fc анти-CTLA-4 сравнивали со способностью scFv анти-CTLA-4 (без Fc-части человеческого IgG1) с использованием конкурентного ELISA для измерения способности каждого из фрагментов антител блокировать взаимодействия. между CTLA-4 и его лигандами, CD80 и CD86. Клетки HEK293Tтрансфицировали 3 мкг ДНК,

кодирующей конструкции анти-CTLA-4 scFv-Fc или анти-CTLA-4 scFv-фрагмента антитела, с использованием реагента для трансфекции FuGENE® (Promega) при надлежащих соотношениях реагент:ДНК. Через сорок восемь часов после трансфекции бесклеточные супернатанты культуры HEK293T собирали, фильтровали и использовали в конкурентном ELISA для оценки блокирующей активности фрагментов антитела против CTLA-4.

Для конкурентного ELISA рекомбинантные белки CD80 или CD86 мыши (R&DSystems) наносили в течение ночи при 4 °C на 96-луночный планшет с высоким связыванием белка в концентрации 100 нг/мл. Затем лунки промывали один раз PBS 0,05% Tween-20 и лунки блокировали блокирующим буфером ELISA на 1 час при комнатной температуре. Затем лунки однократно промывали PBS 0,05% Tween-20. Супернатанты клеточной культуры HEK293T, содержащие каждый из фрагментов антитела против CTLA-4, смешивали с 10 нг/мл рекомбинантной мышиной CTLA-4-человеческой химеры FcIgG1 (R&DSystems), добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем лунки трижды промывали PBS, 0,05% Tween-20, и в лунки добавляли антитело против IgG1 человека, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) (JacksonImmunoResearch). и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Затем лунки трижды промывали PBS 0,05% Tween-20 и добавляли в лунки реагент для обнаружения (3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB), ThermoFisherScientific). Ферментативную реакцию останавливали серной кислотой (BioLegend) и измеряли оптическую плотность при 450 нм.

Результаты конкурентных ELISA суммированы в таблице ниже. Анти-CTLA-4 scFv-Fc блокировал связывание CTLA-4 с CD86 на 75,5% и блокировал связывание CTLA-4 с CD80 на 40,6%, тогда как анти-CTLA-4 scFv блокировал связывание CTLA- 4 к CD86 на 32,5% и блокировал связывание CTLA-4 с CD80 на 7%. Более высокая степень блокирующей активности CD86/CTLA-4 (по сравнению с блокирующей активностью CD80/CTLA-4) наблюдалась с обоими

фрагментами антител, а более высокая нейтрализующая активность наблюдалась с анти-CTLA-4 scFv-Fc по сравнению с анти-CTLA-4 scFv.

Конкурентныерезультаты ELISA

ФрагментантителаAnti-CTLA-4	**% блокирующей активностиCD86**	**% блокирующей активности CD80**
анти-CTLA-4 scFv	32.5	7.0
анти-CTLA-4 scFv-Fc	75.5	40.6

В число иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе, включены те, которые кодируют на плазмиде антитела против CTLA-4 и их фрагменты, включая фрагменты антител против CTLA-4 scFv и фрагменты антител против CTLA-4 scFv-Fc, как предусмотрено в настоящем документе, а также комбинации с молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими другие терапевтические продукты.

Пример 21

Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD ограничен фагоцитарным миелоидным компартментом иммунных клеток invivo

Штамм YS1646 Δasd/ΔFLG дефицитен в отношении нефагоцитарного поглощения клеток, как показано выше (см. пример 4). Дляподтвержденията го, чтоштамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgDтакженедостаточендлянефагоцитарногоп оглощенияклетками, штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, конститутивноэкспрессирующийmCherry (красныйфлуоресцентныйбелок) подбактериальнымпромоторомrpsM ,вводиливнутривенномышам с ортотопическойопухолью EMT6.

Для этого эксперимента 6-8-недельным самкам мышей Balb/c (4 мыши в группе) ортотопически имплантировали клетки EMT6 (2×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с установленными большими опухолями на боках на 10-й день внутривенно вводили 3×10^6 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-mCherry. Опухоли резецировали через 8 дней после внутривенного введения и разрезали на кусочки по 2-3 мм в пробирки softMACS™ C (MiltenyiBiotec), заполненные 2,5 мл ферментной смеси (RPMI-1640, содержащей 10% FBS с 1 мг/мл коллагеназыIV и 20 мкг /мл ДНКазыI). Кусочки опухоли диссоциировали с использованием специальной программы диссоциации OctoMACS™ (MiltenyiBiotec) (опухоли, имплантированные мышам), и весь клеточный препарат инкубировали при перемешивании в течение 45 минут при 37°C. После 45-минутной инкубации проводили второй раунд диссоциации с использованием программы OctoMACS™ (опухоль, имплантируемая мышам), и полученные суспензии отдельных клеток фильтровали через нейлоновую сетку 70 мкМ в пробирку объемом 50 мл. Нейлоновую сетку однократно промывали 5 мл RPMI-1640, содержащего 10% FBS, и клетки фильтровали второй раз, используя новую нейлоновую сетку 70 мкМ, в новую пробирку на 50 мл. Нейлоновую сетку промывали 5 мл RPMI-1640, содержащего 10% FBS, после чего отфильтрованные клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 минут. Полученные диссоциированные клетки ресуспендировали в PBS и хранили на льду до процесса окрашивания.

Для окрашивания методом проточной цитометрии 100 мкл суспензии отдельных клеток высевали в лунки 96-луночного планшета с V-образным дном. PBS, содержащий мертвый/живой краситель (ZombieAqua™, BioLegend) и реагенты, блокирующие Fc (BDBiosciences), добавляли по 100 мкл на лунку, и планшет инкубировали на льду в течение 30 минут в темноте. Через 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут. Затемклеткиресуспендировали в PBS + 2% FBS, содержащемантитела, конъюгированные с флуорохромом (CD4 FITC, клон RM4-5; CD8a BV421, клон 53-6.7; F4/80 APC, клон BM8; CD11b PE-Cy7, клон

M1/70; CD45 BV570, клон 30). -F11; CD3 PE клон 145-2C11; Ly6C BV785 клон HK1.4; IA/IE APC-Cy7 клон M5/114.15.2; Ly6G BV605 клон 1A8 и CD24 PercP-Cy5.5 клон M1/69; всеотBioLegend) и инкубировалинальду в течение 30 минут в темноте. После 30 минут, клетки дважды промывали PBS + 2% FBSпутем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут и ресуспендировали в буфере для фиксации проточной цитометрии (ThermoFisherScientific). Данные проточной цитометрии были получены с использованием проточного цитометраNovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

Результаты показывают, что опухоли от мышей, которым вводили штамм YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-mCherry, показали положительную экспрессию mCherry, в то время как опухоли мышей, которым вводили PBS, имели фоновые сигналы 0,20% в TAM M1 и 0,50% в TAM M2. Напротив, в популяции CD45-, соответствующей стромальным и опухолевым клеткам (т. е. клеткам, которые не являются резидентными в опухоли иммунными/миелоидными клетками), только 0,081% показали положительную экспрессию mCherry (по сравнению с 0,002% фонового окрашивания из PBS-инъецированных мышей).

% экспрессии mCherry в опухолях мышей, которым внутривенно вводили штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-mCherry

Эксперимент	% mCherryэкспресии по типам клеток						
	CD45⁻ клетки	**DC**	**M1 TAM**	**M2 TAM**	**TAM**	**Моноциты**	**TAN**
1	0.00248	0.00000	0.28000	0.29000	0.57000	0.33000	0.00000
2	0.20000	10.50000	5.84000	1.06000	6.90000	4.37000	7.61000

3	0.09100	6.02000	3.25000	0.52000	3.77000	2.23000	5.55000
4	0.02900	0.82000	0.20000	0.25000	0.45000	0.88000	0.29000
Average	**0.08062**	**4.33500**	**2.39250**	**0.53000**	**2.92250**	**1.95250**	**3.36250**
SD	0.08781	4.89877	2.70125	0.37283	3.07408	1.79852	3.81108

SD = стандартное отклонение; DC = дендритные клетки; TAM = связанные с опухолью макрофаги; TAN = связанные с опухолью нейтрофилы

% экспрессии mCherry в опухолях мышей, которым внутривенно вводили PBS

	% экспрессииmCherryпо типам клеток						
Эксперимент #	**CD45⁻ клетки**	**DC**	**M1 TAM**	**M2 TAM**	**TAM**	**моноциты**	**TAN**
1	0.00307	0.19000	0.15000	0.43000	0.58000	0.28000	0.01300
2	0.00129	0.58000	0.10000	0.64000	0.74000	1.38000	0.01100
3	0.00283	0.97000	0.36000	0.60000	0.96000	0.69000	0.00350
4	0.00169	0.25000	0.19000	0.34000	0.53000	0.21000	0.00599
Average	**0.00222**	**0.49750**	**0.20000**	**0.50250**	**0.70250**	**0.64000**	**0.00837**
SD	0.00086	0.35864	0.11284	0.14151	0.25435	0.53684	0.00439

SD = стандартное отклонение; DC = дендритные клетки; TAM = связанные с опухолью макрофаги; TAN = связанные с опухолью нейтрофилы

Эти данные показывают, что делеция pagP, ansB и csgD из штамма с удаленными флагеллами не оказывает существенного влияния на специфичность поглощения бактерий компартментом фагоцитарных иммунных клеток в микроокружении опухоли (т. е. резидентными опухолевыми иммунными/миелоидными клетками). Как обсуждалось выше и в других местах в данном документе, флагеллы и их сигнальное воздействие на SPI-1 необходимы для инфекционности эпителиальных клеток, и их отсутствие ограничивает поглощение бактерий только иммунными/миелоидными клетками, резидентными в опухоли. Устранение флагелл дает многочисленные преимущества иммуностимулирующим бактериям, включая штаммы S. typhimurium. Эти преимущества включают устранение индуцированных TLR5 воспалительных цитокинов, которые подавляют адаптивный иммунитет, снижение пироптоза макрофагов.

Здесь показано, что удаление pagP, ansB и csgD из штамма с удалением флагелл не оказывает существенного влияния на специфичность поглощения бактерий резидентными опухолевыми иммунными клетками и дает дополнительные преимущества, включая, например, снижение уровня TLR4-индуцированных провоспалительных цитокинов со сниженим иммуногенности и повышенем переносимости (ΔpagP); восстановлением функции Т-клеток (ΔansB); и улучшением внутриклеточного поглощения бактериями, что усиливает доставку плазмид кодируемых иммуномодулирующих белков invivo и улучшает терапевтическую эффективность (ΔcsgD).

Пример 22

Разработка и характеристика штамма Salmonella с делецией гена purI и msbB

Ген purI у штамма YS1646 (VNP20009) не был делетирован; он был нарушен вставкой транспозона (Tn10), что привело к геномной инверсии размером 16,6 т.п.н. (пара килобаз), в результате чего в геном впоследствии

были включены два элемента последовательности вставки (IS), один внутри гена purI (purM), а другой другие на 16,6 т.п.н. выше, в межгенной области, непосредственно фланкирующей 3'-конец гена acrD. Область между двумя IS-элементами инвертирована и содержит 18 генов, включая yffB, DC51_2568, upp, uraA, yfgE, yfgD, DC51_2573, perM, purC и другие. Элемент последовательности вставки в межгенной области кодирует полностью функциональную транспозазу и представляет потенциальную угрозу генетической стабильности (см., например, Broadwayetal. (2014) J. Biotechnology 192:177-178)

Наличие полной генетической последовательность гена purI, нарушенной посредством хромосомной рецепции, оставляет открытой возможность реверсии к гену дикого типа.

Ген msbB в штамме YS1646 также не был полностью делетирован, но был нарушен генно-инженерной делецией 511 п.н. (гена 972 п.н.), которая привела к удлинению гена pykA (кодирующего пируваткиназу) с заменой последних 5 аминокислот. кодоны с 13 новыми кодонами (см., например, Broadwayetal. (2014) J. Biotechnology 192:177-178).

Чтобы устранить любую возможную реверсию генов purI и msbB в их соответствующие гены дикого типа и определить эффекты чистых делеций этих генов, штамм YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD был дополнительно модифицирован для удаления оставшейся части гена purI и фрагментов последовательности гена msbB, а также двух связанных с транспозоном элементов последовательности вставки и удлинения гена pykA.

Делеция фрагментов гена purI и связанных с транспозоном элементов последовательности вставки

Первая область, расположенная между генами yffB и purN и содержащая: 1) элемент последовательности вставки транспозона длиной 1209 п.н., аннотированный как DC51_2586 в последовательности, полученной от

Broadwayet. al (2014) (см. регистрационные номера GenBankCP007804 и CP008745); и 2) 740 п.н. оставшегося фрагмента гена purI размером 891 п.н. (называемого здесь большим фрагментом гена purI) подвергали делеции с использованием модификаций метода Даценко и Ваннера (см. Proc. Natl. Acad. Sci. США97:6640–6645 (2000)). Небольшая часть фрагмента гена purI размером 891 п.н. (большой) размером 151 п.н. была оставлена нетронутой, чтобы избежать воздействия на соседний нижестоящий ген, purN (кодирующий фосфорибозилглицинамидформилтрансферазу). Плазмида pSL0165, содержащая 284 и 262 п.н. гомологии с левой и правой областями соответственно, элемента последовательности вставки DC51_2586 и большого фрагмента гена purI трансформировали в компетентные клетки DH5-альфа (ThermoFisherScientific). Кассета гена канамицина, фланкированная сайтами loxP, была клонирована в эту плазмиду, и полученный вектор был обозначен как pSL0174. Затем элемент последовательности вставки DC51_2586 и нокаутную кассету большого фрагмента гена purIамплифицировали с помощью PCR с использованием праймеровpurm-1 и purm-2 (SEQIDNO: 410 и 411 соответственно; см. таблицу 2), очищали на геле и вводили в штамм YS1646Δasd. /ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, несущий чувствительную к температуре лямбдукрасную рекомбинационную плазмиду pKD46 с помощью электропорации. Затем ген устойчивости к канамицинуобработали рекомбинацией, как описано выше, а чувствительные к температуре плазмиды обработали путем роста при непереносимой температуре. Нокаутные последовательности элемента последовательности вставки DC51_2586 и большого фрагмента гена purI были подвергнуты PCR с использованием праймеровpurm-3 и purm-4 (SEQIDNO: 412 и 413 соответственно; см. таблицу 2) и подтверждены секвенированием
ДНК. Полученноемутантноепроизводноеродительскогоштамма YS1646asd/FLG/pagP/ansB/csgDбылообозначенокак YS1646asd/FLG/pagP/ansB/csgD/purI(large clean).

Вторая область, расположена между генами acrD и DC51_2568 и содержала: 1) элемент последовательности вставки транспозона длиной 1209 п.н.,

аннотированный как DC51_2566 в последовательности, полученной от Broadwayet. al (2014) (см. регистрационные номера GenBankCP007804 и CP008745); оставшийся фрагмент гена purI длиной 231 п.н. (обозначаемый здесь как небольшой фрагмент гена purI) подвергали делеции с использованием модификаций метода Даценко и Ваннера (см. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640–6645). (2000)). Плазмиду pSL0210, содержащую 241 и 265 п.н. гомологии с левой и правой областями, соответственно, элемента последовательности вставки DC51_2566 и небольшого фрагмента гена purI, трансформировали в клеткиDH5-альфа (ThermoFisherScientific). В эту плазмиду клонировали кассету гена канамицина, фланкированную сайтами loxP. и полученный вектор был обозначен как pSL0212. Затем элемент последовательности вставки DC51_2566 и нокаутную кассету небольшого фрагмента гена purIамплифицировали с помощью PCR с использованием праймеровacrd-1 и purm-5 (SEQIDNO: 416 и 414 соответственно; см. таблицу 2), очищали на геле и вводили в штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(largeclean), несущий термочувствительную лямбда-красную рекомбинационную плазмиду pKD46, посредством электропорации. Затем ген устойчивости к канамицинуобработали рекомбинацией, как описано выше, а чувствительные к температуре плазмиды обработали путем роста при непереносимой температуре. Нокаутные последовательности элемента последовательности вставки DC51_2566 и нокаутные последовательности небольшого фрагмента гена purI были подтверждены с помощью PCR с использованием праймеровpurm-6 и acrd-3 (SEQIDNO: 415 и 417 соответственно; см. Таблицу 2) и подтверждены секвенированием ДНК.

Полученный мутантный штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI (largeclean) был обозначен как YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI (clean).

Делеция фрагмента гена msbB и расширения pykA

Ген msbB в штамме YS1646 был нарушен с помощью генно-инженерной делеции длиной 511 п.н. (гена длиной 972 п.н.), которая привела к удлинению гена pykA с заменой последних 5 кодонов аминокислот на 13 новых кодонов (см., например, Broadwayetal. и др. (2014) J. Biotechnology 192:177-178). Участок, содержащий оставшийся фрагмент гена msbB и последовательность, кодирующую последние 13 аминокислотных кодонов в pykA, подвергали делеции с использованием модификаций метода Даценко и Ваннера (см. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640–6645 (2000)). Плазмиду SL0209 (см. SEQIDNO:408), содержащую 200 и 196 п.н. гомологии с левой и правой областями, соответственно, оставшегося фрагмента гена msbB и удлинения гена pykA, трансформировали в DH5-альфа клетки (ThermoFisherScientific). Кассета гена канамицина, фланкированная сайтами loxP, была клонирована в эту плазмиду, и полученный вектор был обозначен как pSL0211 (см. SEQIDNO:409). ФрагментгенамsbBинокаутнуюкассетуудлинениягенарykAзате мамплифицировалиметодомPCRсиспользованиемпраймеровmsbB-1 имsbB-2 (SEQIDNO: 418 и 419 соответственно; см. таблицу 2), очищалинагелеивводиливштаммYS1646Δasd/ΔFLG. /ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean), несущиетермочувствительнуюлямбда-краснуюрекомбинационнуюплазмидурKD46 спомощьюэлектропорации. Затем ген устойчивости к канамицину обработали рекомбинацией, как описано выше, а чувствительные к температуре плазмиды обработали путем роста при непереносимой температуре. Фрагмент гена msbB и нокаутные последовательности удлинения гена pykA подтверждали с помощью PCR с использованием праймеровmsbB-3 и msbB-4 (SEQIDNO: 420 и 421 соответственно; см. Таблица 2) иподтверждалисеквенированиемДНК. Полученноемутантноепроизводноеродительскогоштамма YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean) былj обозначенокак YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean).

Таблица 2. Информация о последовательностипраймера

Прайм мер	**Последовательност праймера**	**Описание праймера**	**SEQ ID NO.**
purm-1	ccagatgtggcttgtttatacttcgc	Fwdпраймердля усиления введенияDC51_2586 элемента последовательностии большого фрагмента гена *purI* (740 bp) кассеты KO	410
purm-2	ccttattgctgaatactgccctgag	Revпраймер для усиления введения DC51_2586 элемента последовательнсти и большого фрагмента гена *purI* (740 bp) кассеты KOe	411
purm-3	cgtgtcgcaattcttaatgccatag	Fwdпраймер для проверки введенияDC51_2586 элемента последовательности и большого фрагмента гена *purI* (740 bp) кассеты KO	412
purm-4	caaacatcggactcagaatacgc	Revпраймер для проверки введенияDC51_2586 элемента последовательности и большого фрагмента гена *purI* (740 bp) кассеты KO	413
purm-5	caggcgataaaggctaacaaccg	Revпраймер для усиления введенияDC51_2566 элемента последовательности и малого фрагмента гена *purI* (231bp) кассеты KO	414

Прайм мер	**Последовательност праймера**	**Описание праймера**	**SEQ ID NO.**
purm-6	ttgacctggatcaaccaaaagcg	Revпраймер для проверки введенияDC51_2566 элемента последовательности и малого фрагмента гена *purI* (231bp) кассеты KO	415
acrd-1	cctgcgaccgatactgatgac	Fwdпраймер для усиления введенияDC51_2566 элемента последовательности и малого фрагмента гена *purI* (231bp) кассеты KO	416
acrd-3	gctactcgctacctggatgc	Fwdпраймер для проверки введенияDC51_2566 элемента последовательности и малого фрагмента гена *purI* (231bp) кассеты KO	417
msbB-1	ggtcagatcgtcgtgaatacctg	Fwdпраймер для усиления фрагмента гена msbB и удлинения гена pykA кассеты KO	418
msbB-2	atgaacgcacgctgaacctg	Revпраймер для усиления фрагмента гена msbB и удлинения гена pykA кассеты KO	419

Прайм мер	Последовательност праймера	Описание праймера	SEQ ID NO.
msbB-3	acaccacacgttacatgcactg	Fwdпраймер для проверки фрагмента гена msbB и удлинения гена pykA кассеты KO	420
msbB-4	aagccattgccatgtctgcg	Revпраймер для проверки фрагмента гена msbB и удлинения гена pykA кассеты KO	421

Fwd= прямой; Rev = обратный; KO = нокаут

Информация о плазмиде

Последовательнсть гена	Синтетический ДНК вектор	Наименвание вектора после канамициновогоклонированя	Гомология плеч	
			Левая сторона	Праваі сторон
*purI*большой (740 bp) фрагмент	pSL0165	pSL0174	284 bp	262 bp
*purI*малый (231 bp)фрагмент	pSL0210	pSL0212	241 bp	265 bp
*msbB*фрагмент	pSL0209	pSL0211	200 bp	196 bp

Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean) демонстрируетусиленныйрост в бульоннойсреде

Чтобы оценить влияние делеций оставшихся фрагментов генов purI и msbB, связанных с транспозонами вставочных элементов последовательности и удлинения гена pykA из бактериального генома на приспособленность иммуностимулирующих бактерий invitro, профили роста бульона штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(cleen) /ΔmsbB(cean) и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, экспрессирующие одну и ту же

плазмиду, кодирующую nanoLuciferase® под контролем промотора CMV (плазмида, обозначенная как ADN- 256), сравнивались непосредственно с помощью анализа роста в бульоне. Ночные культуры в стационарной фазе доводили до OD $_{600\ нм.}$= 1 путем разведения в среде LB, и 5 мкл полученной нормализованной культуры использовали для инокуляции 250 мкл среды LB в 96-луночном планшете в техническом дубликате. Планшет инкубировали при встряхивании при 37 °C и OD $_{600\ нм.}$значение контролировалось с 15-минутными интервалами в течение 16 часов. Значения OD600нм наносили на график для построения кривых роста, а наклон логарифмической фазы роста рассчитывали и использовали для определения времени удвоения для каждого штамма. Былипостроенычетыренезависимыекривыероста, ирезультаты, представленныевтаблицениже, показывают, чтоштамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-(ADN-256) имелсреднеевремяудвоения 67,74 минуты (стандартноеотклонение (SD) = 3.21), тогдакакштамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean)-(ADN-256) имелсреднеевремяудвоения 60,13 минуты (SD = 3,08).

Влияние чистых делеций purI и msbB на рост иммуностимулирующих бактерий в бульонных средах

Штамм	Время удвоения (минуты)				Среднеевремяудвоения(мин)	SD
	Кривая роста 1	Кривая роста 2	Кривая роста 3	Крвая роста 4		
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-(ADN-256)	65.39	72.20	65.39	67.96	67.74	3.21
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*pu*	58.25	64.18	57.28	60.80	60.13	3.08

rI$_{(clean)}$/Δ*msbB*$_{(clean)}$ - (ADN-256)						

SD = Стандартное отклонение

Штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgDи YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean) /ΔmsbB(clean), содержащиеоднуитужеплазмиду (ADN-480, кодирующуюмышиный 4-1BBLΔcyt, мышиный IL-12p , имодифицированныйхимерныйбелок STING человека) оценивалинароствбульоневусловияхбольшой, сильноаэрируемойшейкернойколбысбогатойсредой (4XYT).50мклсреды 4XYTвшейкерныхколбахна 125 млсперегородкамиивентилируемымикрышками, икультурыинкубировалипри 37 °Спривстряхиваниисоскоростью225 об/мин. Наблюдали с интервалом примерно в 1 час в течение 18 часов. Значения OD600nm наносили на график для построения кривых роста, а наклон логарифмической фазы роста рассчитывали и использовали для определения времени удвоения для каждого штамма.

Результаты показали, что штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean)-(ADN-480), время удвоения которого составляло 41,83 минуты, рос немного быстрее и быстрее достигал стационарной фазы, чем штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-(ADN-480), который имел время удвоения 48,33 минуты. Этиданныедемонстрируютулучшенныйпрофильростадляштамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean) /ΔmsbB(clean) (чистый), посравнению с родительскимштаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD. Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean) рос с более быстрым временем удвоения в двух независимых анализах кривых роста (среда LB в 96-луночном планшете и богатая среда 4XYT в шейкере на 250 мл), что указывает на то, что геномные делеции purI и msbB не только облегчают потенциальную проблему генетической стабильности, но также обеспечивают

метаболическое преимущество, которое обеспечивает более быстрый рост и превосходную приспособленность.

Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean) демонстрирует повышенную жизнеспособность инъекционных стоковых клеток

Чтобы оценить влияние делеций оставшихся фрагментов генов purI и msbB, связанных с транспозоном элементов последовательности вставки и удлинения гена pykA из бактериального генома, на приспособленность иммуностимулирующих бактерий invitro, жизнеспособность клеток штаммов YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean) /ΔmsbB(clean) и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащие одну и ту же плазмиду (ADN-542, кодирующую модифицированный химерный белок STING человека), оценивали. путем прямого сравнения жизнеспособных КОЕ после обработки культур для замороженных инъекционных растворов. 100 мкл ночных культур в стационарной фазе с использовали для инокуляции 25 мл среды 4XYT в 250-мл шейкерных колбах с перегородками и вентилируемыми крышками, и культуры инкубировали при 37 °C при встряхивании со скоростью 225 об/мин в течение примерно 6 часов. Культуры собирали в стационарной фазе при эквивалентных значениях оптической плотности (11,4 для штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-(ADN-542) и 11,7 для штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI (clean) /ΔmsbB(clean)-(ADN-542)),дважды промывали, доводили до OD600 нм = 2, разделяли на аликвоты и замораживали при -80 °C. На следующий день две аликвоты каждого штамма размораживали, измеряли значения OD600 нм и культуры высевали на чашки с агаром для определения титра и жизнеспособности. % жизнеспособности определяли путем расчета отношения $OD_{600\ нм}$ к КОЕ/мл. Жизнеспособностьпрепаратадляинъекцийштамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-(ADN-542) составила 52%, а жизнеспособностьштаммаYS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean) / ΔmsbB(clean) - (ADN-542) составила 96%.

Этиданныедемонстрируютулучшенныйпрофильприспособленностидляштамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean) посравнению с родительскимштаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD. Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean) продемонстрировал повышенную жизнеспособность после приготовления замороженного раствора для инъекций, что указывает на то, что геномные делеции purI и msbB не только уменьшают потенциальную проблему генетической стабильности, но также дают метаболическое преимущество, которое позволяет повысить жизнеспособность клеток.

Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean) проявляет улучшенную доставку полезной нагрузки плазмиды и экспрессию эктопического гена в микроокружении опухоли

Для оценки доставки плазмиды и последующей экспрессии эктопического гена в микроокружении опухоли использовали штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean) /ΔmsbB(clean), содержащие одну и ту же плазмиду (ADN-480), кодирующий мышиный IL-12 (muIL-12p70) (а также мышиный 4-1BBLΔCyt и модифицированный химерный белок STING человека), оценивали на модели ортотопической карциномы молочной железы EMT6 invivo. Мышамлинии BALB/c ортотопическиимплантировали 5 $\times 10^5$ клеток EMT6 с последующейвнутривеннойинъекцией 1 $\times 10^7$ КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-(ADN-480) илиштамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB. /ΔcsgD/ΔpurI(clean) /ΔmsbB(clean)-(ADN-480) или PBS, через 10 днейпослеимплантации. Через четыре дня после инъекции мышей умерщвляли, а опухоли собирали и обрабатывали для анализа экспрессии мышиного IL-12p70 с помощью количественной PCR с обратной транскрипцией в реальном времени (RT-qPCR).

Опухоли резецировали через четыре дня после внутривенного введения и разрезали на кусочки 2–3 мм в пробирки softMACS™ C (MiltenyiBiotec),

заполненные 2,5 мл ферментной смеси (RPMI-1640, содержащей 10 % FBS с 1 мг/мл коллагеназыIV и 20 мкг/мл ДНКазыI). Кусочки опухоли диссоциировали с использованием специальной программы диссоциации OctoMACS™ (MiltenyiBiotec) (опухоли, имплантированные мышам), и весь клеточный препарат инкубировали при перемешивании в течение 45 минут при 37°C. После 45-минутной инкубации проводили второй раунд диссоциации с использованием программы OctoMACS™ (опухоль, имплантируемая мышам), и полученные суспензии отдельных клеток фильтровали через нейлоновую сетку 70 мкМ в пробирку объемом 50 мл. Нейлоновую сетку один раз промывали 5 мл RPMI-1640, содержащей 10% FBS, и клетки фильтровали второй раз, используя новую нейлоновую сетку 70 мкМ, в новую пробирку на 50 мл. Нейлоновую сетку промывали 5 мл RPMI-1640, содержащего 10% FBS, после чего отфильтрованные клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 минут. Полученные диссоциированные клетки ресуспендировали в PBS, затем лизировали с помощью 200 мкл буфера для лизиса РНК (ZymoResearch) и экстракцию РНК проводили с использованием набора ZymoResearchQuick-RNA™ 96 в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию общей РНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop™ 2000 UV-Vis (ThermoFisherScientific). Чистоту каждого образца также оценивали по соотношению поглощения A260/A230.

Синтез сДНК проводили из 0,5–1 мкг матричной РНК с использованием системы обнаружения PCR в реальном времени CFX96™ (Bio-Rad) и супермикса обратной транскрипции iScript™ для RT-qPCR (Bio-Rad) в 20 мкл реакции, согласно к инструкциям производителя. Анализ зонда PrimePCR™ для мышиного IL-12p70 (muIL-12p70) был приобретен у Bio-Rad. Реакцию количественной ПЦР (20 мкл) проводили в соответствии с протоколом с использованием iQ™ MultiplexPowermix (Bio-Rad). Стандартная программа термоциклирования на системе обнаружения PCR в реальном времени Bio-RadCFX96™ состояла из денатурации при 95 °C в течение 150 секунд, за которыми следовали 39 циклов при 95 °C в течение 15 секунд и при 60 °C в течение 55 секунд. Все образцы анализировали в трех повторениях и

рассчитывали средние значения Cq. Количественное определение мРНК-мишени нормализовали с использованием эталонной мРНК актина (Bio-Rad, идентификатор анализа:
qHsaCEP0036280). ΔC_q рассчитываликакразницумеждуцелевым и эталоннымгеном. ΔΔCqполучалинормированиемзначенийΔCqдля YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-(ADN-480) и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB((clean) -(ADN-480) кСинтезкДНКпроводилиз 0,5–1 мкгматричной РНК с использованиемсистемыобнаружения ПЦР в реальномвремени CFX96™ (Bio-Rad) и супермиксаобратнойтранскрипцииiScript™ для RT-qPCR (Bio-Rad) в 20 мклреакции, согласно к инструкциямпроизводителя. Анализ зонда PrimePCR™ для мышиного IL-12p70 (muIL-12p70) был приобретен у Bio-Rad. Реакцию количественной ПЦР (20 мкл) проводили в соответствии с протоколом с использованием iQ™ MultiplexPowermix (Bio-Rad). Стандартная программа термоциклирования на системе обнаружения ПЦР в реальном времени Bio-RadCFX96™ состояла из денатурации при 95 °C в течение 150 секунд, за которыми следовали 39 циклов при 95 °C в течение 15 секунд и при 60 °C в течение 55 секунд. Все образцы анализировали в трех повторностях и рассчитывали средние значения Cq. Количественное определение мРНК-мишени нормализовали с использованием эталонной мРНК актина (Bio-Rad, идентификатор анализа:
qHsaCEP0036280). ΔC_q рассчитываликакразницумеждуцелевым и эталоннымгеном. ΔΔCqполучалинормированиемзначенийΔCqдля YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-(ADN-480) и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI $_{(чистый)}$ /ΔmsbB $_{(чистый)}$ -(ADN-480).) к среднемузначениюΔCq контрольной группы, обработанной PBS, и кратное увеличение экспрессии мышиного IL-2p70 по сравнению с PBS рассчитывали как 2^-ΔΔCq. Экспрессию мышиного IL-12p70 в обработанных PBS опухолях нормализовали до значения 1,0, исходя из средних значений ΔC_q.

Как показано в таблице ниже, внутривенная инъекция штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-(ADN-480) приводила к среднему

кратному увеличению экспрессии muIL-12p70 по сравнению с PBS (2^-ΔΔC $_q$) на 5,19, в то время как внутривенное введение штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(cean) /ΔmsbB(clean) -(ADN-480) приводило к среднему кратному увеличению экспрессии muIL-12p70 по сравнению с PBS (2^-ΔΔCq) 6,52.

Эти данные демонстрируют повышенную способность к доставке плазмиды и индукции экспрессии эктопического гена штаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean) по сравнению с родительским штаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB. /ΔcsgD. Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔpurI(clean)/ΔmsbB(clean) демонстрировал повышенную доставку плазмиды и эктопическую экспрессию гена muIL-12p70 в микроокружении опухоли, указывая на то, что геномные делеции purI и msbB не только снижают потенциал проблема генетической стабильности, но также придают повышенную способность к доставке полезной нагрузки и повышенный потенциал терапевтической эффективности.

Влияние чистых делеций purI и msbB на экспрессию генов в опухолях

Штамм	**ЭкспрессияIL-12p70 в мышиной опухоли**					**Среднее увеличение**	**SD**
	Опухоль 1	**Опухоль 2**	**Опухоль 3**	**Опухоль 4**	**Опухоль 5**		
PBS	1	1	1	1	1	1	0
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-(ADN-480)	6.69	2.51	2.93	7.59	6.25	5.19	2.31
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*purI*$_{(clean)}$/Δ*msbB*$_{(clean)}$ -(ADN-480)	7.17	6.64	10.8	2.97	5.04	6.52	2.90

SD = Стандартное отклонение

Пример 23

Инфицирование иммуностимулирующими бактериями и иммуностимулирующими бактериями, трансформированными плазмидами, кодирующими иммуномодулирующие белки, превращает макрофаги фенотипа M2 человека в макрофаги фенотипа M1.

Штамм, содержащий плазмиду, кодирующую иммуностимулирующие белки (такие как варианты STING, IL-12, IL-15 и IL-21), может быть преобразован в фенотип M1 (или M1-подобный фенотип) и экспрессировать провоспалительные поверхностные рецепторы, такие как CD80 и CCR7, и цитокины/хемокины, такие как IFNγ и CXCL10 (см., например, Gerricketal. (2018) PLoSONE 13(12):e0208602).

Замороженные человеческие моноциты, выделенные от здоровых доноров-людей, оттаивали в полной среде (RPMI-1640 + 10% FBS) и промывали центрифугированием в течение 10 минут при 600×g при комнатной температуре. Для получения первичных макрофагов M2 человека моноциты ресуспендировали в среде для макрофагов ImmunoCult™-SF (StemCellTechnologies), содержащей 100 нг/мл колониестимулирующего фактора макрофагов человека (M-CSF) + 10 нг/мл человеческого IL-4 + 10 нг/мл человеческого IL-10.

Затем моноциты (7e5 на лунку) высевали в 24-луночный планшет с конечным объемом 500 мкл. Через три дня (на 3-й день) в каждую лунку добавляли 500 мкл макрофагальной среды ImmunoCult™-SF, содержащей 200 нг/мл M-CSF человека + 20 нг/мл человеческого IL-4 + 20 нг/мл человеческого IL-10. , и клетки инкубировали в течение 72 часов.

На 6-й день лунки в трех повторах инфицировали при множественности заражения 20 в течение одного часа в RPMI следующими штаммами: YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащими плазмиду, кодирующую

вариант STING человека (hu) с мутациями GOF. N154S/R284G и с заменой С-концевого хвоста (CTT) huSTING на CTT STING тасманского дьявола (huSTINGN154S/R284GtazCTT; SEQIDNO:397); YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащий плазмиду, кодирующую huIL-12 дикого типа (WT) и вариант huSTINGN154S/R284GtazCTT; YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащий плазмиду, кодирующую huIL-15 дикого типа; или YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащий плазмиду, кодирующую huIL-21 дикого типа. Затем клетки промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в RPMI + 100 мкг/мл гентамицина (Sigma) для уничтожения любых внеклеточных бактерий (гентамицин не может проникать в макрофаги). В качестве контроля использовали макрофаги M1 человека, полученные в 10 нг/мл LPS + 50 нг/мл IFNγ; макрофаги M2 человека, обработанные агонистом STING 3'5' RpRpc-di-AMP (InvivoGen), аналогом клинического соединения ADU-S100; макрофаги M2 человека реполяризовали в 10 нг/мл LPS + 50 нг/мл IFNγ; и макрофаги M2, инфицированные штаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, не содержащими плазмиды; были включены.

Через 48 часов супернатанты собирали и оценивали на предмет различий в передаче сигналов ниже «по течению» с использованием пользовательской панели M2/M1 U-PLEX для человека (MesoScaleDiscovery) в соответствии с протоколом производителя. Измеряли секрецию цитокинов и рассчитывали среднее значение трех повторных измерений. Рассчитывали кратное увеличение средней секреции цитокинов по сравнению с необработанными макрофагами M2, в которых среднюю секрецию цитокинов принимали за 1,00.

Для измерения уровней экспрессии провоспалительных поверхностных рецепторов CD80 и CCR7 клетки лизировали с помощью 200 мкл буфера для лизиса РНК (ZymoResearch), а экстракцию РНК проводили с использованием набора ZymoResearchQuick-RNA™ 96, согласно инструкции производителя. протокол. Концентрацию общей РНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop™ 2000 UV-Vis (ThermoFisherScientific). Чистоту каждого образца также оценивали по соотношению поглощения

A260/A230. Синтез кДНК проводили из 0,5–1 мкг матричной РНК с использованием системы обнаружения PCR в реальном времени CFX96™ (Bio-Rad) и супермикса обратной транскрипции iScript™ для RT-qPCR (Bio-Rad) в 20 мкл реакции, согласно к инструкциям производителя. cPCR проводили с помощью системы обнаружения PCR в реальном времени CFX96™ (Bio-Rad). Анализ зонда PrimePCR™ для CD80 человека (идентификатор анализа: qHsaCIP0026764) и CCR7 человека (идентификатор анализа: qHsaCIP0033364) были приобретены у Bio-Rad. Реакцию количественной PCR (20 мкл) проводили в соответствии с протоколом с использованием iQ™ MultiplexPowermix (Bio-Rad). Стандартная программа термоциклирования на системе обнаружения PCR в реальном времени Bio-RadCFX96™ состояла из денатурации при 95 °C в течение 150 секунд, за которыми следовали 39 циклов при 95 °C в течение 15 секунд и при 60 °C в течение 55 секунд. Все образцы анализировали в трех повторах, и среднее значение было рассчитано. Количественное определение мРНК-мишени нормализовали с использованием эталонной мРНК актина (Bio-Rad, идентификатор анализа: qHsaCEP0036280). ΔCq рассчитывали как разницу между целевым и эталонным геном. $\Delta\Delta C_q$ получали путем нормализации значений ΔC_q для лечения к значениям ΔC_q для контроля без лечения. Кратность увеличения рассчитывали как 2^-ΔΔCq. Значения показаны в таблице ниже как среднее значение для трех лунок.

Как показано в таблице ниже, по сравнению с контрольными необработанными макрофагами M2, в которых средняя секреция цитокинов была установлена за 1,00, все штаммы YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD индуцировали высокие уровни секреции IFNγ,CXCL10 и CXCL11. Штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, трансформированныеплазмидами, кодирующимивариантtazCTThuSTING N154S/R284G; или WT huIL-12 и вариантhuSTING N154S/R284G tazCTT; или WT huIL-15 индуцировалиболеевысокиеуровнисекреции CXCL10 и CXCL11, чемштамм YS1646ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, несодержащийплазмиды. В частности, штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащийплазмиду,

кодирующую WT huIL-15, индуцировалзначительноболеевысокиеуровни CXCL10 и CXCL11, чемобработанныеагонистом STING макрофаги M2 и необработанныемакрофаги M1. Кроме того, штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащиеплазмиду, кодирующуювариантhuSTING N154S/R284G tazCTT; или WT huIL-12 и вариантhuSTING N154S/R284G tazCTT; или WT huIL-15, индуцировалболеевысокиеуровниэкспрессии CD80 и CCR7, чемштамм YS1646ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, несодержащийплазмиды.

В товремякакштаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащиеплазмиды, кодирующиевариантhuSTING N154S/R284G tazCTT; или WT huIL-12 и вариантhuSTING N154S/R284G tazCTT; или WT huIL-15, индуцировалиболеевысокиеуровни CXCL10, CXCL11, CD80 и CCR7, ониндуцировалименьшеIFNγ, чемштамм YS1646ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, несодержащийплазмиды. Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащийплазмиду, кодирующую WT huIL-21, индуцировалзначительноболеевысокиеуровниэкспрессии CD80, чемдругиештаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, ноиндуцировалболеенизкиеуровниэкспресииIFNγ, CXCL10, CXCL11 и CCR7.

Эти данные демонстрируют способность штамма, такого как штамм, обозначенный как YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, сам по себе, или такого штамма, содержащего плазмиды, кодирующие один или несколько иммуностимулирующих белков, преобразовывать макрофаги первичного иммуносупрессивного фенотипа M2 человека, в макрофаги с M1 или M1-подобным фенотипом, с ослабленными или устраненными иммуносупрессивными свойствами и усиленными или добавленными иммуностимулирующими, противоопухолевыми или противовирусными свойствами.

Экспрессия IFNγ, CXCL10, CXCL11, CD80 и CCR7 в макрофагах M2, инфицированных иммуностимулирующими бактериями

Обработка	Секреция цитокин/хемокинпо отношению м неифицированному контролю M2			Рецепторная экспрессия по отношению к неинфицированнму контролю M2	
	IFNγ	CXCL10	CXCL11	CD80	CCR7
M1 макрофаги, необработанные	25131.7	106.6	89.5	335.0	2186.7
M2 + STING агонист	5.2	106.9	199.3	54.0	47.8
M2 + LPS + IFNγ	25065.8	92.5	186.3	81.9	1002.3
M2 + YS1646ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*	732.2	46.6	45.1	0.8	0.7
M2 + YS1646Δasd/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* + STING вариант	657.1	93.9	65.7	6.3	2.9
M2 + YS1646Δasd/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* + STING вариант + IL-12	398.4	111.2	84.0	2.1	79.0
M2 + YS1646Δasd/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* + IL-15	383.5	144.3	223.8	5.4	31.3
M2 + YS1646Δasd/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* + IL-21	176.7	15.8	14.5	55.9	0.3

STING агонист = 3'5' RpRp c-di-AMP; LPS = липополисахарид; STING вариант = huSTING N154S/R284G tazCTT

Пример 24

Внутривенно доставленные штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащие плазмиды, кодирующие IL-15 или кодирующие комбинацию 4-1BBL и IL-12, демонстрируют повышенную эффективность и индуцируют стойкий противоопухолевый иммунитет в мышиной модели колоректальной карциномы

Противоопухолевая эффективность штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащего плазмиды, кодирующие мышиный IL-15 (muIL-15Rα-IL-15sc); или мышиный IL-12p70 (muIL-12p70); или мышиный 4-1BBL, содержащий делецию цитоплазматического домена (mu4-1BBL(Δcyt)); или комбинацию muIL-12p70 и mu4-1BBL(Δcyt) оценивали на подкожной модели колоректальной аденокарциномы MC38 по бокам. Для этого исследования 6-8-недельным самкам мышей C57BL/6 (8 мышей в группе) инокулировали подкожно в правый бок клетки MC38 (5×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с развившимисяопухоляминабокахна 7-й деньвнутривенновводили 2×10^7КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-muIL-15R α-IL-15sc илиштамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-muIL-12p70 илиштамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔgDpagP/ΔansB mu4-1BBL(Δcyt), илиштамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-muIL-12p70 + 4-1BBL(Δcyt), иликонтрольныйноситель. Измерения опухоли и массу тела регистрировали два раза в неделю.

Результаты показали, что штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-muIL-15Rα-IL-15sc продемонстрировал значительное ингибирование роста опухоли (TGI) по сравнению с PBS (70,9% TGI, день 24) с уровнем излечения 4 из 8 мышей (50%). Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-muIL-12p70 продемонстрировал значительный TGI по сравнению с PBS (81,1% TGI, день 24) с уровнем излечения 2 из 8 мышей (25%). Штамм

YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-mu4-1BBL(ΔCyt) также продемонстрировал высокую степень TGI по сравнению с PBS (81,0% TGI, день 24), а также привел к излечению 2 из 8 мышей (25%). Штамм, экспрессирующий комбинацию muIL-12p70 и mu4-1BBL(Δcyt), продемонстрировал самый высокий TGI (90,6% TGI, день 24), при этом 4 из 8 мышей достигли полного излечения (показатель излечения 50%). Таким образом, иммуностимулирующие бактериальные штаммы, экспрессирующие muIL-15Rα-IL-15sc или комбинацию 4-1BBL(Δcyt) и IL-12p70, более сильно ингибируют ингибирование роста опухоли, чем штаммы, экспрессирующие 4-1BBL(Δcyt) или только IL-12p70,

Все вылеченные мыши продолжали оставаться без опухолей, и на 66-й день после имплантации опухоли мышам повторно заражали противоположный бок клетками MC38 ($5x10^5$ клеток в 100 мклPBS) и сравнивали с интактными (без предшествующей опухоли), мышами соответствующего возраста. По сравнению с «наивными» мышами, у которых средний размер опухоли достигал 1384,7 $мм^3$ к 26 дню после имплантации опухоли каждая из ранее вылеченных (и повторно зараженных) мышей оставалась свободной от опухоли. Этиданныедемонстрируютспособностьмышей, получавшихлюбойизштаммов YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-muIL-15Rα-IL-15sc, YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-muIL-12p70, YS1646Δasd/ΔFLG/ ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-mu4-1BBL(Δcyt) или YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-muIL-12p70 + mu4-1BBL(Δcyt) длясозданияустойчивогопротивоопухолевогоиммунитета, которыйпредотвращаетрецидивопухоли и защищаетотповторноговведенияопухоли.

Пример 25

Делеция и/или нарушение csgD, lppAB, pagP и FLG, а также их комбинация приводит к штаммам со значительно более высокой жизнеспособностью в сыворотке крови человека по сравнению со штаммом YS1646.

Штамм YS1646 демонстрирует ограниченную колонизацию опухолей у людей после системного введения. Здесь показано, что штамм YS1646 инактивируется факторами комплемента в крови человека (см. пример 5). В этом примере штаммы YS1646 и E. coliD10B сравнивали с иллюстративными иммуностимулирующими бактериями, представленными в настоящем документе, которые содержат дополнительные мутации, изменяющие поверхность
бактерий. Этитипичныемодифицированныештаммыпредставлялисобой YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP, YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB,
каждыйизкоторыхсодержалплазмиду ADN®secN-256,
котораякодируетсекретируемыйNanoLucanocyferase ®подконтролемпромотора CMV. Эти три штамма, в дополнение к культурам YS1646 и E. coliD10B, инкубировали в технической трехкратной повторности с сывороткой или сывороткой, инактивированной нагреванием (HI), от здоровых доноров-людей (n = 3) в течение 3 часов при 37 °C. После инкубации с сывороткой бактерии серийно разбавляли и высевали на чашки с агаром LB и определяли колониеобразующие единицы (КОЕ). % выживаемости определяли путем подсчета КОЕ, присутствующих в цельной сыворотке, по сравнению с КОЕ, присутствующих в сыворотке, инактивированной нагреванием.

Результаты показали, что все штаммы были на 100% жизнеспособны в сыворотке человека, инактивированной нагреванием. Штамм E. coliD10B полностью элиминировался через 3 часа из цельной сыворотки человека, в то время как штамм YS1646 демонстрировал в среднем только 12,22% выживаемости, демонстрируя, что колонизация опухоли клинического штамма YS1646 была ограничена из-за инактивации комплемента в крови человека. Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagPпродемонстрировал в среднем 74,56% выживаемостипослеинкубации с сывороткойчеловека в течение 3 часов, в товремякаштаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/%lppABпоказалисреднюювыживаемость 129,56% и 158,33% соответственно. Штаммы

YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppABпродемонстрироваливыживаемостьболее 100%.

Эти данные объясняют, почему штамм YS1646 (VNP20009) имеет очень низкую колонизацию опухоли при системном введении. Здесь показано, что штамм YS1646 высоко чувствителен к инактивации комплемента в сыворотке крови человека. Делеции/нарушения fljB/fliC (FLG), pagP, csgD и lppAB или комбинация этих мутаций частично или полностью восстанавливают этот фенотип. Такимобразом, повышеннаястабильность, наблюдаемаявсывороткечеловекас YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP, YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgDи YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppABобеспечиваетповышеннуюколонизациюопухолейчеловека.

Пример 26

Комбинации терапевтических продуктов, закодированных на плазмидах, включая цитокины, варианты STING, антитела против CTLA-4, 4-1BBL и агонистические антитела против 4-1BBL, сильно индуцируют секрецию CXCL10 из миелоидных клеток и индуцируют активацию Т клеток.

Было определено влияние экспрессии иммуномодулирующих полезных нагрузок и их комбинаций, закодированных на плазмидах иммуностимулирующих бактерий, на активацию и функцию Т-клеток и миелоидных клеток. Секрецию цитокинов и хемокинов, таких как IFN-γ и CXCL10, миелоидными клетками и Т-клетками в ответ на экспрессию различных иммуномодулирующих полезных нагрузок измеряли как показатель защитного противоопухолевого иммунитета. Параллельно также контролировали секрецию проопухолевого воспалительного цитокина IL-6.

В этом примере описывается и демонстрируется влияние доставки различных комбинаций иммуномодулирующей полезной нагрузки иммуностимулирующими бактериями по настоящему документу на активацию антиген-специфических Т-клеток и на секрецию CXCL10, ключевого хемокина, участвующего в рекрутировании противоопухолевых Т-клеток, миелоидных клеток. Это оценивали путем трансфекции дендритных клеток мыши плазмидами, кодирующими различные комбинации полезной нагрузки, совместного культивирования трансфицированных дендритных клеток с аутологичными Т-клетками мыши, а также идентификации и количественного определения цитокинов, секретируемых каждым типом клеток.

Плазмиды, кодирующие иммуномодулирующие полезные нагрузки/белки, включали плазмиды, кодирующие отдельные полезные нагрузки, а также плазмиды, кодирующие комбинации полезных нагрузок. Например, какпоказано в таблицениже, отдельныеполезныенагрузкивключалисекретируемыйNanoLuc®; мышиный IL-12p70 (muIL-12p70); STING R284G tazCTT (химерныйбелок, содержащий STING человека с мутацией R284G и заменой С-концевогохвоста (CTT) STING человекана CTT STING тасманскогодьявола); мышиное анти-CTLA-4 scFv (клон 9D9); мышиный 4-1BBL с делетированнымцитоплазматическимдоменом (mu4-1BBL(Δcyt)); мышиный IL-18 (muIL-18); и мышиный IL-21 (muIL-21).

Комбинации полезных нагрузок, включая две или три полезные нагрузки, экспрессировали на одной плазмиде с использованием пептидов T2A и/или P2A, так что несколько белков кодировались под контролем одного и того же промотора.

Комбинации полезных нагрузок включали, например: 1) мышиный IL-18 и мышиный IL-12p70; 2) мышиный IL-21 и мышиный IL-12p70; 3) мышиный IL-12p70 и STINGR284GtazCTT; 4) мышиный IL-12, антимышиныйCTLA-4 scFv и STINGR284GtazCTT; 5) scFv против мышиного CTLA-4, мышиный IL-12p70 и STINGR284GtazCTT; 6) антимышиныйCTLA-4 scFv и мышиный IL-12p70; 7) scFv против мышиного CTLA-4 и tazCTTSTINGR284G; 8) мышиный IL-21,

мышиный IL-12p70 и STINGR284GtazCTT; 9) мышиный 4-1BBL(Δcyt) и STINGR284GtazCTT; 10) мышиный 4-1BBL(ΔCyt) и мышиный IL-12p70; и 11) мышиный 4-1BBL(ΔCyt), мышиный IL-12p70 и STINGR284GtazCTT.

Дендритные клетки костного мозга (BMDC) были получены от мышей Goldenticket, у которых дефицит STING, и были трансфицированы плазмидами, кодирующими различные комбинации исследуемых полезных нагрузок. Через 24 часа после трансфекции собирали супернатанты и измеряли уровни секретируемого CXCL10 в супернатантах культуры BMDC с использованием платформы для анализа U-Plex от MesoScaleDiscovery в соответствии с протоколом производителя.

Для измерения активации $CD8^+$ Т-клеток трансфицированныеBMDC обрабатывали пептидом куриного овальбумина (OVA) SIINFEKL (OVA257-264), основным комплексом гистосовместимости (MHC) класса I (H-2Kb), рестриктированным пептидным эпитопом, распознаваемым $CD8^+$ Т-клетки. Селезеночные Т-клетки, выделенные от мышей $Rag1^{-/-}$ OT-I, которые экспрессируют Т-клеточные рецепторы (TCR), специфичные для SIINFEKL, представленные молекулой MHC класса IH-2Kb, добавляли к BMDC для совместного культивирования. . Через 72 часа совместного культивирования BMDC/Т-клеток супернатанты собирали и измеряли уровни секретируемого IFN-γ в супернатантах клеточных культур с использованием набора цитометрических шариков (CBA).

Результаты обобщены в таблице ниже, в которой показаны уровни CXCL10, секретируемого BMDC в ответ на трансфекцию плазмидами, кодирующими различные одиночные и комбинированные полезные нагрузки, а также уровни IFN-γ, секретируемого $CD8^+$ Т-клетками, после совместного культивирования с трансфицированнымиBMDC.

Результаты показывают конкретные комбинации закодированных полезных нагрузок, которые вызывают высокие уровни секреции CXCL10 BMDC, и показывают, что при объединении полезных нагрузок наблюдается

синергизм. Например, наблюдалась синергия между экспрессией muIL-12p70 и STINGR284GtazCTT. Комбинации mu4-1BBL(Δcyt) или фрагмента антитела против мышиного CTLA-4 с экспрессией STINGR284GtazCTT также приводят к более высоким уровням секреции CXCL10 BMDC. Результаты также показывают, что экспрессия muIL-12p70, а также несколько комбинаций полезных нагрузок, таких как muIL-18 и muIL-12p70; muIL-21 и muIL-12p70; muIL-12p70 и STING R284G tazCTT; muIL-12p70, scFV против мышиного CTLA-4 и tazCTT STING R284G; антимышиный CTLA-4 scFV и muIL-12p70; и mu4-1BBL(Δcyt) и muIL-12p70 с помощью BMDC индуцируют активацию CD8 $^{+}$ Т-клеточных ответов и секрецию IFN-γ.

Эффекты доставки отдельных и комбинированных полезных нагрузок на секрецию CXCL10 BMDC и на активацию CD8 $^{+}$ Т-клеток

Обработка BMDC (Трансфекция)	CXCL10 секретированный BDMCs (пг/мл)		IFN-γ секретированный CD8^{+} Т-клетками (пг/мл)	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM
Нетрансфицированный BMDC (контроль)	70	14	1195	9
Секретированный NanoLuc®	142	36	2003	157
muIL-12p70	155	27	15149	987
STING R284G tazCTT	253	49	1686	52
Анти-мышиный CTLA-4 scFv	80	3	1873	27
mu4-1BBL(Δcyt)	236	66	1450	330
muIL-18	69	20	1891	149
muIL-21	84	6	2028	188
muIL-18_T2A_muIL-12p70	95	7	6730	879
muIL-21_T2A_muIL-12p70	143	19	7944	342
muIL-12p70_T2A_STING R284G tazCTT	1843	248	11669	1399

muIL-12p70_T2A_анти-мышиный CTLA-4 scFv_P2A_STING R284G tazCTT	1508	34	11652	1351
Анти-мышиный CTLA-4 scFv_T2A-_muIL-12p70_P2A_STING R284G tazCTT	157	42	2675	326
Анти-мышиный CTLA-4 scFv_T2A_muIL-12p70	128	45	6696	888
Анти-мыщиный CTLA-4 scFv_T2A_STING R284G tazCTT	604	100	1891	96
muIL-21_T2A_muIL-12p70_P2A_STING R284G tazCTT	164	23	2209	305
mu4-1BBL(Δcyt)_T2A_STING R284G tazCTT	469	38	1648	271
mu4-1BBL(Δcyt)_T2A_muIL-12p70	98	12	6105	482
mu4-1BBL(Δcyt)_T2A_muIL-12p70_P2A_STING R284G tazCTT	213	64	2218	936

SEM = стандартная ошибка среднего

Те же биологические реакции исследовались при комбинировании перечисленных выше полезных нагрузок с одним или несколькими мышиными (mu) IL-36γ, muIL-23, muOX40L и muIFN-α2. BMDC выделяли из STING-дефицитных мышей Goldenticket и трансфицировали плазмидами, кодирующими различные комбинации полезных нагрузок, как показано в таблице ниже. Через 24 часа после трансфекции уровни секретируемых CXCL10, IFN-γ и IL-6 измеряли в супернатантах культур BMDC с использованием набора цитометрических шариков (CBA). Как описано выше, BMDC обрабатывали антигенными пептидами овальбумина SIINFEKL перед добавлением Т-клеток селезенки из Rag1 $^{-/-}$мыши OT-I (клетки OT-I). Через 30 часов совместного культивирования BMDC/Т-клеток уровни секретируемого IFN-γ измеряли в супернатантах клеточных культур с использованием набора

CBA. Т-клетки окрашивали APC-конъюгированным антителом против мышиного 4-1BB (клон 17B5, BioLegend) для контроля экспрессии маркера активации 4-1BB.

Результаты, суммированные в таблице ниже, показывают, что определенные комбинации полезных нагрузок, такие как muIL-36γ + muIL-12p70 + STINGR284GTazCTT и muIL-36γ + muIL-23 + STINGR284GTazCTT, вызывают высокие уровни секреции CXCL10 от BMDC. Комбинация muIL-36γ с muIL-12p70 и STINGR284GtazCTT также индуцирует высокие уровни секреции IFN-γBMDC, но относительно низкие уровни секреции IL-6, что представляет собой терапевтически полезную комбинацию для индукции противоопухолевого иммунитета. .

Результаты также показывают, что многие из комбинаций, перечисленных в таблице ниже, индуцируют активацию ответов $CD8^+$ Т-клеток, что оценивается по экспрессии 4-1BB и секреции IFN-γ. Например, комбинация muIL-36γ + muIL-12p70 + STINGR284GTazCTT индуцировала самые высокие уровни секреции IFN-γ$CD8^+$ Т-клетками и индуцировала высокий уровень экспрессии 4-1BB, что указывает на эффективную активацию и функциональность $CD8^+$ Т-клеток, что имеет решающее значение для формирования надлежащего противоопухолевого иммунитета.

Секреция цитокинов BMDC и активация $CD8^+$ Т-клеток после трансфекции BMDC плазмидами, кодирующими комбинации иммуномодулирующих полезных нагрузок

Обработка BMDC Treatments (трансфекция)	**Секреция цитокина BMDC (пг/мл)**	**Секреция IFN-γT-клетками $CD8^+$ (пг/мл)**	**% экспресси и**

	CXCL10	IFN-γ	IL-6	IFN-γ	SEM	4-1BB
Нетрансфицированный BMDC (контроль)	26	0	6	1616	46	12
СекретированныйNanoLuc®	99	0	16	1606	48	16
STING R284G tazCTT	576	0	22	1920	49	17
muIL-12p70	181	14	21	7077	932	30
mu4-1BBL(Δcyt)	181	0	11	1628	53	26
muIFN-α2	347	0	47	1841	350	23
muIL-36γ	216	0	18	1532	8	26
muIL-23	143	1	15	1352	83	29
muOX40L	125	0	18	1827	140	29
muIL-36γ_T2A_muIL-12p70	131	14	18	3550	587	37
muIL-36γ_T2A_muIL-12p70_P2A_STING R284G tazCTT	2788	49	33	4286	51	33
muIL-36γ_T2A_muIL-23	848	0	85	1880	56	28
muIL-36γ_T2A_STING R284G tazCTT	637	0	266	1341	37	33
muIL-36γ_T2A_muIL-23_P2A_STING R284G tazCTT	1270	1	49	1375	28	30
muIL-36γ_T2A_muIL-23_P2A_muOX40L	101	0	39	1554	25	34
muIL-36γ_T2A_muIL-12p70_P2A_muOX40L	240	11	39	3939	268	35
muIFN-α2_T2A_muIL-36γ	339	0	31	1409	142	28
muIL-36γ_T2A_muIFN-α2	208	0	26	1361	84	31
mu4-	177	0	12	1492	13	15

Обработка BMDC Treatments (трансфекция)	Секреция цитокина BMDC (пг/мл)			Секреция IFN-γT-клетками $CD8^+$ (пг/мл)		% экспрессии
	CXCL10	IFN-γ	IL-6	IFN-γ	SEM	4-1BB
1BBL(Δcyt)_T2A_muIL-36γ						

SEM = стандартная ошибка среднего

Влияние на функцию Т-клеток различных комбинаций полезных нагрузок и взаимодействий рецептор-лиганд также исследовали путем обработки мышиных пулов $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток рекомбинантными цитокинами и агонистическими антителами. Т-клетки селезенки ($CD4^+$ и $CD8^+$) от мышей BALB/c выделяли отрицательно, а затем обрабатывали 2,5 нМ одного или нескольких рекомбинантных цитокинов (например, muIL-12p70; комплекс muIL-15 (muIL-15Rα-IL- 15sc); muIL-21; muIL-36γ; muIFN-α2 и их комбинации) и/или 1,5 мкг/мл агонистического антитела против мышиного 4-1BB (Clone 17B5, BioLegend). Через 24 часа после обработки уровни секретируемых IFN-γ и IL-6 измеряли в супернатантах культур Т-клеток с использованием набора CBA.

Результаты, представленные в таблице ниже, демонстрируют, что несколько комбинаций цитокинов с добавлением или без добавления антитела против мышиного агониста 4-1BB активируют Т-клетки. Например, комбинациикомплекса muIL-12p70 + muIL-15 (muIL-15Rα-IL-15sc); комплекс muIL-12p70 + muIL-15 + muIFN-α2; комплекс muIL-12p70 + muIL-15 + антитело-агонистпротивмышиного 4-1BB; комплекс muIL-12p70 + muIL-15 + muIL-36γ; комплекс muIL-12p70 + muIL-15 + muIL-21; muIL-12p70 + muIL-21 + muIL-36γ; muIL-12p70 + muIL-36γ + muIFN-α2; muIL-12p70 + muIL-36γ + агонистическоеантителопротивмышиного 4-1BB; комплекс muIL-15 + muIL-36γ + muIFN-α2; и комплекс muIL-15 + muIL-36γ + агонистическоеантителопротивмышиного 4-1BB приводят к

секрециивысокихуровней IFN-γ, ноотносительнонизкихуровней IL-6 из Т-клеток, чтоделаетихидеальнымикомбинациямидляоптимальнойактивации Т-клетокдляиндукциипротивоопухолевогоиммунитета в микроокруженииопухоли.

5

Влияние обработки различными цитокинами и анти-мышиными агонистичными антителами 4-1BB и/или их комбинациями на активацию Т-клеток

Обработка	Секреция мышиными $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клетками			
	IFN-γ (пг/мл)		IL-6 (пг/мл)	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM
Нет цитокина (контроль)	1	0	125	8
muIL-12p70	83	8	151	2
muIL-15 комплекс (muIL-15Rα-IL-15sc)	21	2	187	22
muIL-21	1	0	135	20
muIL-36γ	5	3	496	23
muIFN-α2	3	1	129	19
Анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	1	0	139	15
muIL-12p70 + muIL-15 комплекс	1808	93	120	23
muIL-12p70 + muIL-21	122	33	140	23
muIL-12p70 + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	100	9	160	1
muIL-12p70 + muIL-36γ	6655	115	467	61
muIL-12p70 + muIFN-α2	84	2	140	10
muIL-15 комплекс + muIFN-α2	97	12	57	1
muIL-15 комплекс + muIL-21	23	1	108	1
muIL-15 комплекс + muIL-36γ	2790	262	377	29

Обработка	Секреция мышиными $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клетками			
	IFN-γ (пг/мл)		IL-6 (пг/мл)	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM
muIL-15 комплекс + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	40	5	134	23
muIL-21 + muIFN-α2	2	0	77	15
muIL-21 + muIL-36γ	62	13	304	31
muIL-21 + анти-мышиное 4-1BBагониститичное антитело	10	5	85	4
muIL-36γ + muIFN-α2	55	8	234	14
muIL-36γ + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	18	1	393	69
muIFN-α2 + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	1	0	58	1
muIL-12p70 + muIL-15 комплекс + muIFN-α2	1655	542	64	5
muIL-12p70 + muIL-15 комплекс + анти-мышиноое 4-1BBагонистичное антитело	3703	1104	127	22
muIL-12p70 + muIL-15 комплекс + muIL-36γ	24293	3266	260	13
muIL-12p70 + muIL-15 комплекс + muIL-21	1496	83	74	4
muIL-12p70 + muIL-21 + muIFN-α2	61	7	56	13
muIL-12p70 + muIL-21 + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	91	10	84	8
muIL-12p70 + muIL-21 + muIL-36γ	6587	538	243	12
muIL-12p70 + muIL-36γ + muIFN-α2	5559	470	243	7
muIL-12p70 + muIL-36γ + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	10191	2139	191	9

Обработка	Секреция мышиными $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клетками			
	IFN-γ (пг/мл)		IL-6 (пг/мл)	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM
muIL-12p70 + muIFN-α2 + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	99	3	48	0
muIL-15 комплекс + muIL-21 + muIFN-α2	70	3	44	5
muIL-15 комплекс + muIL-36γ + muIFN-α2	1539	24	145	11
muIL-15 комплекс + muIL-36γ + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	2764	672	261	2
muIL-15 комплекс + muIFN-α2 + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	104	3	49	15
muIL-15 комплекс + muIL-21 + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	37	3	50	1
muIL-21 + muIL-36γ + muIFN-α2	62	7	111	3
muIL-21 + muIL-36γ + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	25	8	175	11
muIL-36γ + muIFN-α2 + анти-мышиное 4-1BBагонистичное антитело	47	7	158	21

SEM = стандартная ошибка среднего; IL-15 комплекс = muIL-15Rα-IL-15sc

Оценивали влияние обработки одним или несколькими рекомбинантными цитокинами человека и/или антителом против человеческого 41BB (клон 4B4-1, BioLegend) на активацию Т-клеток человека. $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки человека отрицательно выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) и обрабатывали 1 нМ рекомбинантных цитокинов со стимуляцией Т-клеточного рецептора (TCR) и 4-1BB или без нее, используя покрытые агонисты против человеческого CD3ε (клон OKT3 ,BioLegend) и антитела против человеческого 4-1BB (клон 4B4-1, BioLegend)

соответственно. Через 24 часа и 72 часа обработки супернатанты собирали и измеряли уровни секретируемого IFN-γ в супернатантах клеточных культур с использованием набора CBA. Т-клетки также окрашивали конъюгированным с фикоэритрином (PE) антителом против CD25 человека (клон BC96, BioLegend) для мониторинга экспрессии маркера активации CD25.

Результаты, которые суммированы в двух таблицах ниже, показывают, что несколько комбинаций цитокинов (IL-12p70, IL-15, IL-21 и IL-36γ) и участие 4-1BB активируют Т-клетки для секреции высоких уровней IFN-γ, со стимуляцией TCR и без нее агонистическим антителом против CD3ε, для $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки экспрессировали маркер активации CD25 в ответ на обработку различными комбинациями цитокинов человека и/или агонистическим антителом против человеческого 4-1BB, особенно после стимуляции агонистическим антителом против CD3ε. Экспрессия CD25 была гораздо более выражена у $CD8^+$ Т-клеток с процентом клеток, положительных по CD25, выше 90% для всех обработанных групп (поэтому средняя интенсивность флуоресценции (MFI) представлена ниже как мера экспрессии CD25 при стимуляции CD3ε в $CD8^+$ Т-клетках). Это связано с тем, что CD25 является хорошо зарекомендовавшим себя маркером активации для $CD8^+$ Т-клеток (в большей степени, чем для $CD4^+$ Т-клеток), а $CD8^+$ Т-клетки более реагируют на стимулы для этого маркера активации.

Влияние обработки различными цитокинами человека и/или антителом против агониста 4-1BB человека и/или их комбинациями на секрецию IFN-γ Т-клетками

Обработка	24 часа, нестимулировано	24 часа, со стимуляцией CD3ε	72 часа, нестимулировано	72 часа, со стимуляцией CD3ε

	Средний секретированный IFN-γ (пг/мл)	**SEM**	**СредниййсекретированныйIFN-γ (пг/мл)**	**SEM**	**Средний секретированный IFN-γ (пг/мл)**	**SEM**	**Средний секретированный IFN-γ (пг/мл)**	**SEM**
Нетцитокина (контроль)	11	0	17335	7241	10	2	2123	852
IL-12p70	10916	194	98371	2829	14060	1786	25143	89
IL-15	1596	514	40517	104	1823	1027	9373	143
IL-21	154	47	17968	437	79	14	1393	82
IL-36γ	30	19	12217	2075	12	0	2104	420
антиi-4-1BB агонистистическоеантитело	19	10	19362	3461	14	5	3330	788
IL-12p70 + IL-15	75903	9641	131979	613	165517	7174	48166	1724
IL-12p70 + IL-21	19165	2843	95734	3754	19830	4954	28214	758
IL-12p70 + IL-36γ	20079	6046	91096	610	29878	10848	26385	2795
IL-12p70 +анти-4-1BBагонистическое антитело	15052	1557	99653	1322	30903	2424	29248	260
IL-15 + IL-21	5394	817	29765	7463	5312	241	5897	2085
IL-15 + IL-36γ	5788	1281	40881	238	5954	721	10295	146

Обработка	24 часа, нестимулировано		24 часа, со стимуляцией CD3ε		72 часа, нестимулировано		72 часа, со стимуляцией CD3ε	
	Средний секретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM	Среднийсекретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM	Среднийсекретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM	Среднийсекретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM
IL-15 + анти-4-1BBагонистическое антитело	1708	259	37833	5210	5208	3977	9015	1679
IL-21 + IL-36γ	638	176	22612	2	356	72	1776	157
IL-21 + анти-4-1BBагоннистическое антитело	128	64	19102	76	95	33	1348	196
IL-36γ + антиі-4-1BBагонистическое антитело	10	1	12714	1165	8	0	2116	356
IL-12p70 + IL-15 + IL-21	64847	1957	124755	6662	126040	7660	49433	2130
IL-12p70 + IL-15 + IL-	70049	3270	122175	1139	158389	3106	49668	21

Обработка	24 часа, нестимулировано		24 часа, со стимуляцией CD3ε		72 часа, нестимулировано		72 часа, со стимуляцией CD3ε	
	Средний секретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM	СреднийсекретированныйIFN-γ (пг/мл)	SEM	Среднийсекретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM	Среднийсекретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM
36γ								
IL-12p70 + IL-15 + анти-4-1BBагонистическое антитело	99206	2970	132011	3779	208361	6574	45361	817
IL-12p70 + IL-21 + IL36γ	14321	237	88340	2001	18015	2207	27797	2142
IL-12p70 + IL-21 + анти-4-1BBагонистическое антитело	4394	395	95440	2439	4816	541	28580	17
IL-12p70 + IL-36γ + анти-4-1BBагоннистическое антитело	8012	2959	98147	2938	11193	4687	31059	2344

Обработка	24 часа, нестимулировано		24 часа, со стимуляцией CD3ε		72 часа, нестимулировано		72 часа, со стимуляцией CD3ε	
	Средний секретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM	Среднийсекретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM	Среднийсекретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM	Среднийсекретированный IFN-γ (пг/мл)	SEM
IL-15 + IL-21 + IL-36γ	5401	2501	41892	2614	4797	2145	7411	812
IL-15 + IL-21 + анти-4-1BBагонистическоеантитело	6398	2097	47003	5628	5522	2046	8950	999
IL-15 + IL-36γ + анти-4-1BBагонистическоеантитело	1337	1	39746	4726	1767	381	7416	600
IL-21 + IL-36γ + анти-4-1BBагонистическое антитело	228	42	21012	2668	142	22	1485	153

SEM = стандартная ошибка среднего

Экспрессия CD25 на $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках после обработки различными комбинациями человеческих цитокинов и/или анти-человеческими 4-1BB агонистическими антителами

Обработка	$CD4^+$ T-Cells		$CD8^+$ T-Cells	
	% CD25 Expression, Unstimulated	% CD25 Expression, with CD3ε Stimulation	% CD25 Expression, Unstimulated	CD25 Expression, with CD3ε Stimulation (MFI*)
Нет цитокина (контроль)	2	37	1	8356
IL-12p70	2	43	2	17025
IL-15	13	78	16	21442
IL-21	2	41	2	8842
IL-36γ	3	37	1	7641
анти-4-1BB агонистическоеанителo	2	37	1	9331
IL-12p70 + IL-15	18	83	25	24511
IL-12p70 + IL-21	3	53	3	17009
IL-12p70 + IL-36γ	2	49	2	15348
IL-12p70 + анти-4-1BBагонистическое антитело	2	43	2	15420
IL-15 + IL-21	14	83	22	22054
IL-15 + IL-36γ	14	75	23	20800
IL-15 + анти-4-1BBагонистическое антитело	13	76	19	20008
IL-21 + IL-36γ	3	43	2	8619
IL-21 + анти-4-1BBагонистическое	2	41	2	8284

Обработка	$CD4^+$ T-Cells		$CD8^+$ T-Cells	
	% CD25 Expression, Unstimulated	% CD25 Expression, with CD3ε Stimulation	% CD25 Expression, Unstimulated	CD25 Expression, with CD3ε Stimulation (MFI*)
антитело				
IL-36γ + анти-4-1BBагонистическое антитело	2	40	1	8551
IL-12p70 + IL-15 + IL-21	18	87	25	23757
IL-12p70 + IL-15 + IL-36γ	18	85	26	22447
IL-12p70 + IL-15 + анти-4-1BBагонистическое антитело	19	83	29	22262
IL-12p70 + IL-21 + IL-36γ	3	54	2	15683
IL-12p70 + IL-21 + анти-4-1BBагонистическое антитело	2	54	2	16589
IL-12p70 + IL-36γ + анти-4-1BBагонистическое антитело	2	49	1	15660
IL-15 + IL-21 + IL-36γ	14	86	24	21383
IL-15 + IL-21 + анти-4-1BBагонистическое антитело	14	81	23	22358
IL-15 + IL-36γ + анти-4-1BBагонистическое антитело	12	73	16	19611
IL-21 + IL-36γ + анти-4-	2	42	1	7297

Обработка	$CD4^+$ T-Cells		$CD8^+$ T-Cells	
	% CD25 Expression, Unstimulated	% CD25 Expression, with CD3ε Stimulation	% CD25 Expression, Unstimulated	CD25 Expression, with CD3ε Stimulation (MFI*)
1BBагонистическое антителоantibody				

SEM = стандартная ошибка среднего

*MFIзначенияприводятся так как %ofCD25 экспрессиипосредствомCD3εстимуляциибылвыше 90% для всех групп.

Была оценена способность иммуномодулирующих полезных нагрузок повышать активацию человеческих антигенных $CD8^+$ Т-клеток. Были созданы дендритные клетки, происходящие из моноцитов человека (ModDC), и трансфицированы плазмидами, кодирующими

секретируемый NanoLuc®; STING человека с заменами N154S/R284G (STINGN154S/R184G; SEQIDNO:398); STING человека с заменами N154S/R284G и с заменой С-концевого хвоста (CTT) STING человека на CTT STING тасманского дьявола (STINGN154S/R284GtazCTT; SEQIDNO:397); или IL-12p70. Через пять часов после трансфекции в дендритные клетки человека вводили рестриктированные пептиды HIV-1 (отрицательный контроль), CEF или CMVMHC-I для стимуляции антиген-специфических $CD8^+$ Т-клеток широким набором вирусных пептидов. $CD8^+$ Т-клетки человека выделяли от того же донора и совместно культивировали с дендритными клетками в течение 48 часов. Через 48 часов совместного культивирования супернатанты собирали и измеряли уровни секретируемого IFN-γ в супернатантах клеточных культур с использованием набора CBA (BioLegend).

Результаты, суммированные в таблице ниже, демонстрируют мощный эффект IL-12p70, а также вариантов STING с мутациями N154S и R284GGOF, с заменой

или без замены STINGCTT человека на STINGCTT тасманского дьявола, в увеличении антиген-специфической активации человеческих CD8 $^{+}$ Т-клеток, измеренной с точки зрения секреции IFN-γ Т-клетками.

Антиген-специфическая активация CD8 $^{+}$ Т-клеток человека после обработки иммуномодулирующими белками

	IFN-γсекреция (пг/мл)					
	HIV пептидная стимуляция		**CEF пептидная стимуляция**		**CMV пептидная стимуляция**	
Обработка	**Средне**	**SEM**	**Среднее**	**SEM**	**Среднее**	**SEM**
Нетрансфектированный контроль	7	1	904	126	61	23
СекретированныйNanoLuc®	352	7	3287	632	577	85
STING N154S/R284G	1122	95	7226	393	1579	201
STING N154S/R284G tazCTT	952	21	6178	640	1724	547
IL-12p70 #1	841	10	5678	232	1404	231
IL-12p70 #2	846	32	4815	110	1328	3

SEM = Стандартная ошибка среднего

Пример 27

Перенос плазмиды после иммуностимулирующей бактериальной гибели обеспечивает устойчивую продукцию белка в первичных макрофагах М2 человека.

Сравнивали иммуностимулирующие бактериальные штаммы в настоящем документе) в первичных макрофагах M2 человека на предмет экспрессии репортерного гена. Оценивали перенос плазмид, кодирующих кассеты генной экспрессии из штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, при бактериальной инфекции в иммуносупрессивныефагоцитирующие клетки (т.е. бактофекцию). Макрофаги M2 человекаполучалиотздоровыхдоноров-людей, а затеминфицировалиштаммом YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, кодирующимрепортерныйгенNanoLuciferase® (NanoLuc®, Promega). Эксперименты по трансфекции (т.е. прямому переносу плазмидной ДНК) также выполняли в качестве контроля и использовали для определения эффективности экспрессии генов по сравнению с бактофекцией (т.е. переносом плазмидной ДНК иммуностимулирующими бактериальными штаммами в данном описании).

Макрофаги M2 человека получали из отрицательно выделенных моноцитов человека с использованием среды для макрофагов ImmunoCult™-SF (StemCellTechnologies). Моноциты ($5x10^5$ клеток на лунку) высевали в 24-луночный планшет с конечным объемом 500 мкл, содержащим 100 нг/мл колониестимулирующего фактора макрофагов человека (M-CSF). Через три дня в каждую лунку добавляли по 500 мкл среды для макрофагов ImmunoCult™-SF, содержащей 200 нг/мл человеческого M-CSF + 20 нг/мл человеческого IL-4 + 20 нг/мл человеческого IL-10, и клетки инкубировали еще трое суток. На 6-й деньмакрофаги M2 инфицировалипримножественностизаражения 150 штаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащимплазмиду, кодирующуюсекретируемыйNanoLuc® (secNanoLuc®) подконтролемпромотора CMV (обозначаемыйздеськакштамм YS1646Δasd). /ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-NanoLuc®). Супернатанты клеточных культур собирали каждые 24 часа в течение пяти дней и измеряли уровни секретируемого NanoLuc® с использованием набора для определения люциферазы (Promega).

Результаты обобщены в таблице ниже. Как показано в таблице ниже, количество секретируемого NanoLuc®, измеренное в относительных световых единицах (RLU), обнаруженное в анализе активности люциферазы, увеличивалось в каждый момент времени, с 24 часов до 120 часов, для инфицированных M2 макрофагов по сравнению с неинфицированными макрофагами M2 (контроль, который давал фоновую люминесценцию 60,0 RLU). Сигналы NanoLuc® значительно усиливались со временем, указывая на эффективную доставку плазмидной ДНК и устойчивую экспрессию мРНК, кодирующего белок, в течение нескольких дней при инфицировании макрофагов M2 штаммом YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-NanoLuc. ®. Эти данные демонстрируют эффективный перенос плазмиды от бактерий к макрофагам M2 при бактериальной инфекции.

Секреция белка после инфицирования макрофагов M2 иммуностимулирующими бактериями, содержащими плазмиды, кодирующие репортерный ген

Обработка (инфицироване)	**Время после инфекции**	**Активность люцифераз ы (RLU)**
Неинфицированныемакрофаги(контроль)	24 часа	60.0
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-NanoLuc® (инфекция)	24 часа	63.7
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-NanoLuc® (инфекция)	48 часов	193.2
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-NanoLuc® (инфекция)	72 часа	308.2
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-NanoLuc® (инфекция)	96 часов	415.7
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-NanoLuc®	120 часов	515.2

(инфекция)		

В параллельномэкспериментемакрофаги M2 трансфицировали 1 мкгтойжеэкспрессионнойплазмидыsecNanoLuc® с использованиемреагентадлятрансфекциимРНКViromer® RED и плазмидной ДНК (OriGene) илиинфицировалиштаммом YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-NanoLuc. ®, как описано выше. Каждые 24 часа в течение пяти дней и в каждый момент времени инфицированные и трансфицированные макрофаги M2 лизировали буфером для лизиса РНК (ZymoResearch), а экстракцию РНК проводили с использованием набора ZymoResearchQuick-RNA™ 96, согласно протоколу производителя. Синтез кДНК проводили из матричной РНК с использованием супермикса обратной транскрипции iScript™ для RT-qPCR (Bio-Rad) в 20 мкл реакционной смеси в соответствии с инструкциями производителя. qPCR для NanoLuc® выполняли с помощью системы обнаружения ПЦР в реальном времени CFX96™ (Bio-Rad) с использованием iQ™ MultiplexPowermix (Bio-Rad). Стандартная программа термоциклирования на системе обнаружения PCR в реальном времени Bio-RadCFX96™ состояла из денатурации при 95 °C в течение 150 секунд, за которыми следовали 39 циклов при 95 °C в течение 15 секунд и при 60 °C в течение 55 секунд. Все образцы анализировали трижды и рассчитывали средние значения Cq. Количественное определение мРНК NanoLuc® нормализовали с использованием эталонной мРНК актина (Bio-Rad, идентификатор анализа: qHsaCEP0036280).

ΔC_q рассчитывали как разницу между целевым (т.е. NanoLuc®) и эталонным геном (т.е. актином). ΔΔCq получали путем нормализации значений ΔCqYS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-NanoLuc®, инфицированных макрофагами M2, имакрофагами M2, трансфицированными плазмидой, кодирующей NanoLuc®, до среднего значения ΔCqнетрансфицированной контрольной группы. Экспрессия NanoLuc® в трансфицированных макрофагах M2 была нормализована до значения 1,0 на основании средних значений ΔCq и кратного увеличения экспрессии NanoLuc® из инфицированных макрофагов M2

(т.е. бактофекция) по сравнению с экспрессией NanoLuc® из трансфицированных макрофагов M2, рассчитано как 2^-ΔΔC $_q$.

Результаты суммированы в таблице ниже, которая показывает, что более высокий уровень экспрессии NanoLuc® был обнаружен с помощью RT-qPCR через 24 часа в макрофагах M2, инфицированных штаммом YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD-NanoLuc®, по сравнению с уровнем экспрессии NanoLuc® в макрофагах M2, трансфицированных плазмидой, кодирующей NanoLuc®. Это указывает на более высокую степень доставки плазмиды при заражении макрофагов M2 иммуностимулирующими бактериями по сравнению с прямой трансфекцией клеток плазмидной ДНК.

Уровни экспрессии генов после бактофекции или трансфекции макрофагов M2

ОбработкамакрофаговM2	**Время после инфекции**	**NanoLuc® mPHKэкспрессия из инфицированных кеток относящаяся ктРНКизтрансфицированных клеток (среднее увеличение)**	
		Среднее	**SEM**
ТрансфекцияплазмидойкодирующейNanoLuc®	24 часа	1	-
ИнфекцияYS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-NanoLuc®	24 часа	4.8	0.4
Инфекция YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*-NanoLuc®	48 часов	4.9	0.3
Инфекция YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*	72 часа	4.4	0.3

-NanoLuc®			
Инфекция YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* -NanoLuc®	96 часов	4.3	0.4
Инфекция YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD* -NanoLuc®	120часов	4.8	0.4

SEM = Стандартная ошибка среднего

Пример 28

Позиционирование кодирующих нуклеиновых кислот в плазмидах, кодирующих множество гетерологичных продуктов, может увеличить выработку обнаруживаемого белка в клетках человека

Этот пример показывает, что экспрессия множества терапевтических продуктов, закодированных на плазмидах в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем документе, может быть улучшена за счет положения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей один продукт, относительно положений молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих другие. товары. Чтобы продемонстрировать это и определить положение каждого гена, кодирующего конкретный продукт (полезную нагрузку) в кассете экспрессии на комбинированных плазмидах, что приводит к наивысшему уровню экспрессии белка в клетках-мишенях, были использованы различные комбинации цитокинов и других иммуностимулирующих белков, которые клонировали в плазмиду, содержащую один или несколько эукариотических промоторов. Плазмиды содержали две отдельные открытые рамки считывания (ORF), каждая из которых находилась под контролем разных промоторов; промотор EF-1α и промотор CMV (т.е. система с двумя промоторами) или содержала пептиды 2A (например, T2A и/или P2A) в одной ORF и один промотор для управления экспрессией двух или более генов (т.е. система с одним промотором). Плазмиды трансфицировали в клетки HEK293T и опред Позиционирование кодирующих нуклеиновых кислот в плазмидах,

кодирующих множество гетерологичных продуктов, может увеличить выработку обнаруживаемого белка в клетках человека

Этот пример показывает, что экспрессия множества терапевтических продуктов, закодированных на плазмидах в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем документе, может быть улучшена за счет положения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей один продукт, относительно положений молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих другие. товары. Чтобы продемонстрировать это и определить положение каждого гена, кодирующего конкретный продукт (полезную нагрузку) в кассете экспрессии на комбинированных плазмидах, что приводит к наивысшему уровню экспрессии белка в клетках-мишенях, были использованы различные комбинации цитокинов и других иммуностимулирующих белков. клонировали в плазмиду, содержащую один или несколько эукариотических промоторов. Плазмиды содержали две отдельные открытые рамки считывания (ORF), каждая из которых находилась под контролем разных промоторов; промотор EF-1α и промотор CMV (т.е. система с двумя промоторами) или содержала пептиды 2A (например, T2A и/или P2A) в одной ORF и один промотор для управления экспрессией двух или более генов (т.е. система с одним промотором). Плазмиды трансфицировали в клетки HEK293T и определяли уровни экспрессии различных кодируемых продуктов (полезных нагрузок) в супернатантах клеточных культур.

Позиционирование кодирующих нуклеиновых кислот в плазмидах, кодирующих множество гетерологичных продуктов, может увеличить выработку обнаруживаемого белка в клетках человека

Этот пример показывает, что экспрессия множества терапевтических продуктов, закодированных на плазмидах в иммуностимулирующих бактериях, представленных в настоящем документе, может быть улучшена за счет положения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей один продукт, относительно положений молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих другие. товары. Чтобы продемонстрировать это и определить положение каждого гена,

кодирующего конкретный продукт (полезную нагрузку) в кассете экспрессии на комбинированных плазмидах, что приводит к наивысшему уровню экспрессии белка в клетках-мишенях, были использованы различные комбинации цитокинов и других иммуностимулирующих белков. клонировали в плазмиду, содержащую один или несколько эукариотических промоторов. Плазмиды содержали две отдельные открытые рамки считывания (ORF), каждая из которых находилась под контролем разных промоторов; промотор EF-1α и промотор CMV (т.е. система с двумя промоторами) или содержала пептиды 2A (например, T2A и/или P2A) в одной ORF и один промотор для управления экспрессией двух или более генов (т.е. система с одним промотором). Плазмиды трансфицировали в клетки HEK293T и определяли уровни экспрессии различных кодируемых продуктов (полезных нагрузок) в супернатантах клеточных культур.

Полезные нагрузки, закодированные на комбинированных плазмидах, включают, но не ограничиваются ими, например, мышиный STING с мутацией C205YGOF (с приобретением функции) (muSTINGC205Y); человеческий STING с мутацией GOFR284G и с заменой C-концевого хвоста (CTT) STING человека на STINGCTT тасманского дьявола (huSTINGR284GtazCTT); STING человека с мутациями GOFN154S и R284G и с заменой STINGCTT человека на STINGCTT тасманского дьявола (huSTINGN154S/R284GtazCTT); человеческий STING с мутациями GOFN154S и R284G (huSTINGN154S/R284G); мышиный IL-12p70 (muIL-12p70); мышиный IL-15Rα-IL-15sc (muIL-15Rα-IL-15sc); мышиный IL-21 (muIL-21); мышиный IL-18 (muIL-18); мышиный CXCL10 (muCXCL10); scFv против мышиного CTLA-4 (scFv против muCTLA-4; SEQIDNO:404); scFv-Fc против мышиного CTLA-4 (scFv-Fc против muCTLA-4; SEQIDNO:405); мышиный 4-1BBLΔCyt (mu4-1BBLΔCyt, где ΔCyt указывает на делецию цитоплазматического домена); мышиный растворимый TGFβ-рецептор II, слитый с мышиным IgG2aFc (musTGFβRII-Fc; SEQIDNO:406); растворимый рецептор IITGFβ человека, слитый с FcIgG1 человека (husTGFβRII-Fc; SEQIDNO:407); мышиный IFN-альфа2 (muIFN-α2); мышиный IFN-бета (muIFN-β); мышиный IL-36 гамма (muIL-36γ); мышиный IL-23 (muIL-23); мышиный OX40L (muOX40L); и различные

комбинации двух или более из них. Последовательности были подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

scFv против мышиного CTLA-4 (SEQIDNO:404) и scFv-Fc против мышиного CTLA-4 (SEQIDNO:405) были получены из клона 9D9. scFv содержит лидерную мышиную последовательность IgK и домены V_L и V_H из клона 9D9, связанные через линкер (Gly4Ser)3. scFv-Fc также содержит мышиный FcIgG2a, связанный с доменом V_H.

HEK293TSTINGNullCells (293-Dual™ NullCells; InvivoGen), которые не содержат эндогенного STING и экспрессируют секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), помещенные под контроль эндогенного промотора IFN-стимулированного элемента ответа (ISRE), где кодирующая последовательность ISRE заменена ORFSEAP с использованием технологии нокаута. Клетки HEK293TSTINGNull (293-Dual™ NullCells; InvivoGen) высевали в 24-луночные планшеты, покрытые поли-L-лизином, по 200 000 клеток на лунку и инкубировали в течение ночи при 37 °C в инкубаторе с 5% CO2 для достижения 80% слияния. На следующий день 500 нг каждой плазмидной ДНК разводили в среде, не содержащей сыворотки, и добавляли к реагенту для трансфекции FuGENE® (Promega) при соответствующем соотношении реагент:ДНК, при этом нетрансфицированные лунки служили в качестве отрицательного контроля (в дублях).
Супернатанты от клеточной культуры от каждого образца собирали через 48 часов после трансфекции.

STING-активность каждого из кодируемых вариантов STING (muSTINGC205Y, huSTINGN154S/R284G, huSTINGR284GtazCTT и huSTINGN154S/R284GtazCTT) оценивали с помощью репортерной клеточной линии HEK 293TSTINGNullISRE-SEAP (293-Dual™ NullCells ;InvivoGen). Используя эти клетки, активность интерферона I типа (индуцированную STING) оценивают путем мониторинга продукции SEAP, стимулированной IFNI типа, в супернатантах клеток. 20 мклсупернатанта клеточной культуры добавляли к 180 мкл реагента QUANTI-Blue™. (InvivoGen), который используется для

измерения SEAP. Активацию интерферона типа I определяли путем измерения ISRE-индуцированной активности SEAP на спектрофотометре SpectraMax® M3 (MolecularDevices) при поглощении 650 нм.

Супернатанты клеточных культур также оценивали на экспрессию кодируемых цитокинов с использованием ELISA, специфичного для каждого цитокина. Дляконструкций muIL-15Rα-IL-15sc использовалимышиный IL-15Rα-IL-15sc ELISA (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями к набору. ELISA, специфичныедлямышиного IL-18 (Invitrogen), мышиного IL-21 (Invitrogen), мышиного IL-12p70 (BioLegend), мышиного IL-23 (BioLegend), мышиного CXCL10 (BioLegend) имышиного IL-36γ (RayBiotech) использовалидляизмеренияуровнейкаждогоизэтихцитокиноввсупернатантахклеточныхкультур. Мышиный IFN-α2 и мышиный IFN-β измеряли с использованием соответствующих анализов U-PLEX (MesoScaleDiscovery).

Прямые ELISA с мышиным TGF-β1 или человеческим TGF-β1 (R&DSystems) выполняли на супернатантах клеточных культур клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами, кодирующими слияния мышиного или человеческого растворимого TGFβ-рецептора II с Fc, соответственно, для измерения уровней экспрессии этих белков. Прямые ELISA с мышиным CTLA-4-Fc (R&DSystems) проводили на супернатантах клеточных культур клеток, трансфицированных плазмидами, кодирующими антимышиныйCTLA-4 scFv и антимышиныйCTLA-4 scFv-Fc, для измерения уровней экспрессиих эти белков.

Экспрессию лигандов 4-1BBLΔcyt и OX40L на поверхности клеток мыши оценивали с помощью проточной цитометрии через 48 часов после трансфекции. Для клеток, трансфицированных плазмидами, кодирующими mu4-1BBLΔcyt, клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут. Затем клетки ресуспендировали в PBS + 2% FBS и окрашивали конъюгированными с биотином антимышиными антителами 4-1BBL (клон TKS-1, BioLegend). После инкубации в течение 30 минут клетки

дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут, ресуспендировали в PBS + 2% FBS и окрашивали стрептавидином, конъюгированным с APC (BioLegend). После инкубации в течение 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут и ресуспендировали в PBS + 2% FBS с DAPI (мертвая/живая окраска). Данные проточной цитометрии были получены с использованием проточного цитометраACEANovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

Клетки, экспрессирующие muOX40L, дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут. Затем клетки ресуспендировали в PBS + 2% FBS и окрашивали APC-конъюгированным антителом против мышиного OX40L (клон RM134L, BioLegend). После инкубации в течение 30 минут клетки дважды промывали PBS + 2% FBS путем центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 минут и ресуспендировали в PBS + 2% FBS с DAPI (мертвая/живая окраска). Данные проточной цитометрии были получены с использованием проточного цитометраACEANovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo™ (TreeStar, Inc.).

Экспрессия отдельных полезных нагрузок в комбинированных плазмидах обобщена в таблице ниже с использованием символов –, +, ++ и +++ для обозначения уровней экспрессии. – обозначает отсутствие экспрессии; + обозначает некоторую экспрессию; ++ означает хорошую экспрессию; и +++ обозначает высокую экспрессию. Символ +/– обозначает уровни экспрессии между + и –, т.е. низкий уровень экспрессии; +/++ обозначает уровни экспрессии между + и ++, т.е. умеренную экспрессию; и ++/++++ обозначает уровни экспрессии между ++ и +++ экспрессией, т.е. высокую экспрессию.

Для систем с одним промотором, в которых плазмида кодирует две или более полезных нагрузки под контролем одного промотора CMV, с пептидом 2A (T2A или P2A), кодируемым между каждой парой генов или ORF, X_T2A означает,

что оцениваемая полезная нагрузка (т.е. «X») кодируется перед пептидом T2A на плазмиде с промотором CMV; T2A_X означает, что оцениваемая полезная нагрузка кодируется после пептида T2A на плазмиде с промотором CMV; P2A_X означает, что оцениваемая полезная нагрузка кодируется после пептида P2A на плазмиде с промотором CMV; и P2A_X_T2A_X*, где X* представляет собой оцениваемую полезную нагрузку, означает, что оцениваемая полезная нагрузка кодируется после пептида T2A, который кодируется после пептида P2A, и полезная нагрузка (X) следует за полипептидом P2A на плазмиде с промотором CMV. .

Для систем с одним промотором, в которых плазмида кодирует две или более полезных нагрузки под контролем одного промотора EF-1α, с пептидом 2A (T2A или P2A), кодируемым между каждой парой генов или ORF, $X^{\#}$ _ T2A и T2A _$X^{\#}$, где $X^{\#}$представляет собой оцениваемую полезную нагрузку, обозначают, что полезная нагрузка экспрессируется до или после пептида T2A, соответственно, на плазмиде с промотором EF-1α. Например, в плазмиде, кодирующей CMV mu4-1BBLΔcyt_T2A_muIL-12p70_P2A_mu sTGFβRII-Fc_T2A_huSTING N154S/R284G tazCTT, X_T2A представляетсобой mu4-1BBLΔcyt; T2A_X представляетсобой muIL-12p70; P2A_X представляетсобой mu sTGFβRII-Fc; и P2A_X_T2A_X* представляетсобойhuSTING N154S/R284G tazCTT. Аналогично, в плазмиде, кодирующей CMV muIL-12p70_T2A_muIL-21 + EF-1α mu4-1BBLΔcyt_T2A_muSTING C205Y, X_T2A представляетсобой muIL-12p70; T2A_X представляетсобой muIL-21; $X^{\#}$ _T2A представляетсобой mu4-1BBLΔcyt; а T2A _$X^{\#}$ представляетсобоймuSTING C205Y.

Для плазмид, кодирующих каждую полезную нагрузку под контролем отдельного промотора (или только одну полезную нагрузку с одним промотором, то есть отдельные экспрессоры), CMV_X и EF-1α_$X^{\#}$ означают, что оцениваемая полезная нагрузка кодируется после промотора CMV (полезная нагрузка X) или после промотора EF-1α (полезная нагрузка $X^{\#}$) соответственно.

Как показано в таблице ниже, одиночные экспрессоры обычно демонстрируют самые высокие уровни экспрессии. Экспрессия имеет тенденцию к снижению для каждой полезной нагрузки по мере того, как на плазмиде кодируется больше белков, независимо от того, является ли она плазмидой с двойным промотором или плазмидой с одним промотором. Экспрессия полезной нагрузки, расположенной в первом положении комбинированной плазмиды (например, перед первым T2A), в целом была выше, чем экспрессия той же полезной нагрузки в других положениях плазмиды. В комбинированных плазмидах, содержащих более одной полезной нагрузки, более высокая экспрессия часто наблюдалась в первой позиции после промотора CMV. Было обнаружено, что мышиный 4-1BBLΔCyt хорошо экспрессируется только тогда, когда кодируется в первом положении после промотора CMV в комбинированных плазмидах.

Уровни экспрессии одиночных и комбинированных полезных нагрузок

Кодируемые полезные нагрузки	**CMVпромотер**				**EF-1α промотер**		**Отдельные экспрессоры**	
	X_ T2A	**T2A _X**	**P2A_ X**	**P2A_ X_ T2A_ X***	**$X^{\#}$_ T2A**	**T2A _$X^{\#}$**	**CMV _X**	**EF-1α _$X^{\#}$**
CMV muSTING C205Y WPRE SV40pA							+	
CMV muSTING C205Y HPRE bGHpA							+	
EF-1α muSTING C205Y								+++

Кодируемые полезные нагрузки	**CMVпромотер**				**EF-1α промотер**		**Отдельные экспрессоры**	
	X_T2A	**T2A_X**	**P2A_X**	**P2A_X_T2A_X***	**$X^{\#}$_T2A**	**T2A_$X^{\#}$**	**CMV_X**	**EF-1α_$X^{\#}$**
WPRE SV40pA								
CMV huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA							+++	
CMV huSTING N154S/R284G HPRE bGHpA							+++	
CMV huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA							+++	
CMV muIL-12p70 WPRE SV40pA							+++	
CMV muIL-12p70 HPRE bGHpA							+++	
CMV muIL-15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA							++	
CMV muIL-21 HPRE bGHpA							++	
CMV muIL-18 HPRE bGHpA							+++	
EF-1α muCXCL10 WPRE SV40pA								+++

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
CMV anti-muCTLA-4 scFv WPRE SV40pA							+++	
EF-1α anti-muCTLA-4 scFv WPRE SV40pA								+++
CMV anti-muCTLA-4 scFv HPRE bGHpA							+++	
CMV anti-muCTLA-4 scFv-Fc WPRE-SV40pA							+++	
EF-1α mu4-1BBLΔCyt WPRE SV40pA								+++
CMV mu4-1BBLΔCyt HPRE bGHpA							++	
CMV mu sTGFβRII-Fc WPRE SV40pA							+++	
CMV mu sTGFβRII-Fc HPRE bGHpA							+++	
CMV hu sTGFβRII-Fc HPRE bGHpA							+++	
CMV muIFN-α2 HPRE bGHpA							+++	
CMV muIFN-β HPRE							+++	

Кодируемые полезные нагрузки	**CMVпромотер**				**EF-1α промотер**		**Отдельные экспрессоры**	
	X_T2A	**T2A_X**	**P2A_X**	**P2A_X_T2A_X***	**$X^{\#}$_T2A**	**T2A_$X^{\#}$**	**CMV_X**	**EF-1α_$X^{\#}$**
bGHpA								
CMV muIL-36γ HPRE bGHpA							+++	
CMV muIL-23 HPRE bGHpA							+++	
CMV muOX40L HPRE bGHpA							+++	
CMV muIL-12p70 HPRE bGHpA + EF-1α muSTING C205Y WPRE SV40pA							+++	++
CMV muSTING C205Y HPRE bGHpA + EF-1α muIL-12p70 WPRE SV40pA							+	+
CMV muIL-12p70 HPRE bGHpA + EF-1α muCXCL10 WPRE SV40pA							+++	++
CMV muIL-12p70_T2A_muIL-	++	+++						+++

Кодируемые полезные нагрузки	**CMVпромотер**				**EF-1α промотер**		**Отдельные экспрессоры**	
	X_ T2A	**T2A _X**	**P2A_ X**	**P2A_ X_ T2A_ X***	**$X^{\#}$_ T2A**	**T2A _$X^{\#}$**	**CMV _X**	**EF-1α _$X^{\#}$**
15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA + EF-1α muSTING C205Y WPRE SV40pA								
CMV muIL-12p70_T2A_muIL-18 HPRE bGHpA + EF-1α muSTING C205Y WPRE SV40pA	++	++						+++
CMV muIL-12p70_T2A_muIL-21 HPRE bGHpA + EF-1α muSTING C205Y WPRE SV40pA	+	++						+++
CMV muIL-12p70_T2A_muIL-18 HPRE bGHpA + EF-1α muCXCL10 WPRE SV40pA	++	++						++
CMV muIL-12p70_T2A_muIL-21	++	++						++

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
HPRE bGHpA + EF-1α muCXCL10 WPRE SV40pA								
CMV muIL-12p70_T2A_ muIL-15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA + EF-1α muCXCL10 WPRE SV40pA	++	+++						++
CMV muIL-12p70_T2A_muSTING C205Y HPRE bGHpA + EF-1α muIL-18 WPRE SV40pA	++	++						+
CMV muIL-12p70_T2A_muSTING C205Y HPRE bGHpA + EF-1α anti-muCTLA-4 scFv WPRE SV40pA	+	+						+
CMV muIL-12p70_T2A_muSTING	+++	++						++

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_ T2A	T2A _X	P2 A_ X	P2 A_ X_ T2 A_ X*	$X^{\#}$_ T2 A	T2A _$X^{\#}$	CM V _X	EF-1α _$X^{\#}$
C205Y HPRE bGHpA + EF-1α mu4-1BBLΔCyt WPRE SV40pA								
CMV muIL-12p70_T2A_ mu4-1BBLΔCyt HPRE bGHpA + EF-1α muSTING C205Y WPRE SV40pA	++	+						+
CMV muIL-12p70_T2A_ muIL-15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA + EF-1α mu4-1BBLΔCyt_ T2A_muSTING C205Y WPRE SV40pA	++	+++			+/-	+		
CMV muIL-12p70_T2A_muIL-21 HPRE bGHpA + EF-1α mu4-1BBLΔCyt_T2A_muSTI	+	+			+/-	+		

Кодируемые полезные нагрузки	**CMVпромотер**				**EF-1α промотер**		**Отдельные экспрессоры**	
	X_T2A	**T2A_X**	**P2A_X**	**P2A_X_T2A_X***	**$X^{\#}$_T2A**	**T2A_$X^{\#}$**	**CMV_X**	**EF-1α_$X^{\#}$**
NG C205Y WPRE SV40pA								
CMV muIL-12p70_T2A_muSTING C205Y HPRE bGHpA + EF-1α anti-muCTLA-4 scFv_T2A_ mu4-1BBLΔCyt WPRE SV40pA	+	+			+/-	+/-		
CMV muIL-12p70_T2A_ muIL-15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA + EF-1α anti-muCTLA-4 scFv_T2A_muSTING C205Y WPRE SV40pA	+	++			+/-	++		
CMV muIL-12p70_T2A_muIL-18 HPRE bGHpA + EF-1α anti-muCTLA-4 scFv_T2A_muSTING	+	+			+/-	+		

Кодируемые полезные нагрузки	**CMVпромотер**				**EF-1α промотер**		**Отдельные экспрессоры**	
	X_ T2A	**T2A _X**	**P2A_ X**	**P2A_ X_ T2A_ X***	**X#_ T2A**	**T2A _X#**	**CMV _X**	**EF-1α _X#**
C205Y WPRE SV40pA								
CMV muIL-12p70_T2A_muIL-21 HPRE bGHpA + EF-1α anti-muCTLA-4 scFv_T2A_muSTING C205Y WPRE SV40pA	+	+			+/-	+		
CMV muIL-12p70_T2A_muSTING C205Y WPRE SV40pA	++	++						
CMV muIL-12p70_T2A_muSTING C205Y HPRE bGHpA	++	++						
CMV muIL-12p70_T2A_ muIL-15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA	++	++						
CMV muIL-15Rα-IL-15sc_T2A_muIL-12p70 HPRE bGHpA	++	++						
CMV muIL-	++	++						

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
12p70_T2A_muIL-18 HPRE bGHpA								
CMV muIL-18_T2A_muIL-12p70 HPRE bGHpA	++	+						
CMV muIL-12p70_T2A_muIL-21 HPRE bGHpA	++	++						
CMV muIL-21_T2A_muIL-12p70 HPRE bGHpA	+++	++						
CMV muIL-12p70_T2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	+	++/+++						
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	+	+++						
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_muIL-	++	++						

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
12p70 HPRE bGHpA								
CMV anti-muCTLA-4 scFv_T2A_muIL-12p70 HPRE bGHpA	+	+						
CMV anti-muCTLA-4 scFv_T2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	+/-	++						
CMV anti-muCTLA-4 scFv-Fc_T2A_muIL-12p70 HPRE bGHpA	+++	+						
CMV anti-muCTLA-4 scFv-Fc_T2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	+++	++						
CMV muIFN-α2_T2A_muIL-12p70 HPRE bGHpA	+	++						
CMV muIFN-α2_T2A_muIL-36γ HPRE bGHpA	+	+++						

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
CMV muIFN-α2_T2A_muIFN-β HPRE bGHpA	+	+++						
CMV muIFN-α2_T2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+++						
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_mu sTGFβRII-Fc HPRE bGHpA	+++	+++						
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_ muIL-15Rα-IL-15sc HPRE bGHpA	+++	+++						
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_muIFN-α2 HPRE bGHpA	+++	++						
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_muIL-36γ HPRE bGHpA	+++	+++						
CMV muIL-21_T2A_ muIL-15Rα-IL-15sc	+++	++						

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
HPRE bGHpA								
CMV muIL-21_T2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	++						
CMV muIL-15Rα-IL-15sc_T2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+++						
CMV muIL-36γ_T2A_muIL-12p70 HPRE bGHpA	++	++						
CMV muIL-36γ_T2A_huSTING R284G tazCTTHPREbGHpA	+++	+++						
CMV muIL-36γ_T2A_muIFN-α2 HPRE bGHpA	++	++						
CMV muIL-36γ_T2A_muIL-23	++	+++						

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
HPRE bGHpA								
CMV mu sTGFβRII-Fc_T2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+++						
CMV muIL-12p70_T2A_anti-muCTLA-4 scFv_P2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	+	+/-	+++					
CMV anti-muCTLA-4 scFv_T2A_muIL-12p70_P2A_ huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	+/-	+	+++					
CMV muIL-12p70_T2A_anti-muCTLA-4 scFv-Fc_P2A_ huSTING R284G tazCTT HPRE	+	++	++					

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
bGHpA								
CMV anti-muCTLA-4 scFv-Fc_T2A_muIL-12p70_P2A_ huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	+++	+	+					
CMV muIL-21_T2A_muIL-12p70_P2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+	+++					
CMV muIL-21_T2A_muIL-12p70_P2A_muIFN-α2 HPRE bGHpA	+++	+	+					
CMV muIL-21_T2A_ muIL-15Rα-IL-15sc _P2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	++	+++					
CMV muIL-12p70_T2A_ muIL-	+	+	++					

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
15Rα-IL-15sc _P2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA								
CMV muIL-12p70_T2A_ muIL-15Rα-IL-15sc _P2A_muIFN-α2 HPRE bGHpA	+	+	+					
CMV muIL-36γ_T2A_muIL-12p70_P2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+	++					
CMV muIL-36γ_T2A_muIL-12p70_P2A_muOX40L HPRE bGHpA	++	+	++					
CMV muIL-36γ_T2A_muIL-23_P2A_muOX40L HPRE bGHpA	++	+++	++					

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
CMV muIL-36γ_T2A_muIL-23_P2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+++	++					
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_muIL-12p70_P2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+	+++					
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_muIL-12p70_P2A_huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+	+++					
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_muIL-12p70_P2A_huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+	+++					
CMV mu4-	+/++	++	++					

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
1BBLΔCyt_T2A_musTGFβRII-Fc_P2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA								
CMV muIL-15Rα-IL-15sc _T2A_muIL-12p70_P2A_huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	+	+	+++					
CMV mu sTGFβRII-Fc_T2A_muIL-12p70_P2A_ huSTING R284G tazCTT HPRE bGHpA	+	+	+++					
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_husTGFβRII-Fc_P2A_muIL-12p70_T2A_huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	++	+	+++				

Кодируемые полезные нагрузки	CMVпромотер				EF-1α промотер		Отдельные экспрессоры	
	X_T2A	T2A_X	P2A_X	P2A_X_T2A_X*	$X^{\#}$_T2A	T2A_$X^{\#}$	CMV_X	EF-1α_$X^{\#}$
CMV mu4-1BBLΔCyt_T2A_muIL-12p70_P2A_husTGFβRII-Fc_T2A_huSTING N154S/R284G tazCTT HPRE bGHpA	++	+	++	+++				

HPRE = Посттранскрипционныйрегуляторныйэлеменвирусагепатита B; WPRE =Вирусагепатитасурка (WHP) посттранскрипционныйрегуляторныйэлемен; bGHpA = бычийгормонростаpoly A; SV40pA = обезьянийвирус 40 poly A.

Пример 29

Изучениебиораспределения, клиренса,колонизацияопухолей, иэкспрессииэктопическогогенавштаммахYS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*иYS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*lppAB*

БиораспределениешаммовYS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*иYS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*lppAB*в различных тканях в не содержащих опухоли мышах, включая печень, селезенку, сердце, легкие, почки, кишечник, мышцы, костный мозг и лимфатические узлы, и их клиренс оценивали и сравнивали с биораспределением и клиренсом родительского штамма YS1646 после системного введения. Колонизацию штаммов в опухолях сравнивали с

колонизацией неопухолевых тканей у мышей с опухолями, а также определяли экспрессию продукта гетерологичного гена, закодированного на плазмиде в бактериях, в опухолях по сравнению с неопухолевыми тканями в мышах, несущих опухоли.

А. Делеционные штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB быстро очищаются от интактных мышей, и экспрессия эктопического гена в здоровых тканях не наблюдается.

Было проведено исследование биораспределения для сравнения клиренса бактерий из тканей с течением времени у мышей, не несущих опухоли, между родительским штаммом YS1646 и штаммами YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB.

. Белоклюциферазыбылкодированнаплазмидахштаммов YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB, а такжеоценивалиэкспрессиюлюциферазы в тканях, чтобыопределитьуровниэкспрессиюэктопическогогена в здоровыхнеопухолевыхтканях, какописанониже. Для этого 6-8-недельным самкам мышей BALB/c (по 3 мыши в группе) внутривенно вводили однократную дозу 2×10^{6}КОЕ каждого бактериального штамма или с контрольным носителем PBS. Через 2 часа, 24 часа и 30 дней после введения дозы мышей подвергали эвтаназии и собирали селезенку, печень, сердце, легкие, почки, кишечник, мышцы, костный мозг и лимфатические узлы. Ткани гомогенизировали с использованием окто-диссоциатораGentleMACS™ и пробирок M (MiltenyiBiotec) для установки молекул в 2 мл PBS, а гомогенаты высевали на чашки LB для подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм ткани.

Как показано в таблицах ниже, все три штамма продемонстрировали КОЕ в селезенке и печени и, в меньшей степени, в сердце, легких и почках через 2 часа после внутривенного введения. В отличие от родительского штамма YS1646, который продолжал демонстрировать высокие КОЕ в селезенке и печени через 24 часа после введения дозы, в селезенке и печени мышей, получавших препарат, были обнаружены значительно более низкие КОЕ.На 30-й день после введения дозы штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB удалялись из всех органов. Родительский штамм YS1646, напротив, продемонстрировал колонизацию во многих тканях через 24 часа после введения, включая колонизацию, которая была обнаружена в селезенке и печени на 30-й день после введения дозы.

Биораспределение штамма YS1646 через 2 часа, 24 часа и 30 дней после внутривенного введения у мышей без опухоли

	Время после внутривенного введения					
	2 часа		**24 часа**		**30 дней**	
Ткань	**Средние CFU**	**SD**	**Средние CFU**	**SD**	**Средние CFUs**	**SD**
Селезенка	23981	6909.2	14214	2199.9	428	261.2
Печень	6914	1784.7	8881	2060.3	54	27.2
Сердце	1334	693.8	768	264.1	<LOD	<LOD
Легкие	1821	629.4	981	137.2	27	27.5
Почки	1868	595.9	668	394.0	<LOD	<LOD
Кишечник	88	31.3	41	50.6	21	1.5
Мышцы	148	45.3	188	31.3	<LOD	<LOD
Костный мозг	214	194.9	834	300.0	<LOD	<LOD
Лимфатический узел	48	11.6	14	4.7	<LOD	<LOD

SD = стандарное отклонение; LOD = предел обнаружения

Биораспределение штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD через 2 часа, 24 часа и 30 дней после внутривенного введения у мышей без опухоли

Ткань	Время после внуривенноговведенения					
	2 часа		24 часа		30 дней	
	Средние CFU	SD	Средние CFU	SD	Средние CFU	SD
Селезенка	19881	6322.1	621	308.4	20	16.2
Печень	8154	5820.9	341	396.7	<LOD	<LOD
Сердце	374	302.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Легкие	308	111.1	101	154.2	<LOD	<LOD
Почки	68	38.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Кишечник	20	16.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Мышцы	21	15.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Костный мозг	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Лимфатический узел	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

SD = Стандартное отклонение; LOD = предел обнаружения

Биораспределение штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB через 2 часа, 24 часа и 30 дней после внутривенного введения дозы мышам без опухоли

Ткань	Время после внутривеннго введения					
	2 часа		24 часа		30 дней	
	Средние	SD	Средние	SD	Средни	SD

	CFU		CFU		e CFU	
Селезенка	2247981	3768949.6	7674	2366.3	14	4.7
Печень	208648	235899.1	4768	2011.0	<LOD	<LOD
Сердце	701	563.8	141	102.7	<LOD	<LOD
Легкие	1434	812.7	301	72.7	<LOD	<LOD
Почки	794	744.5	114	81.7	<LOD	<LOD
Кишечник	47	62.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Мышцы	41	16.2	34	12.1	<LOD	<LOD
Костный мозг	107	91.6	61	33.9	<LOD	<LOD
Лимфатический узел	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

SD = Стандартное отклонение; LOD = предел обнаружения

Эти данные демонстрируют, что делеция или разрушение гена(ов), кодирующего флагеллы, а также генов asd, pagP, ansB, csgD и, (необязательно), lppAB, приводит к более быстрому клиренсу штаммов иммуностимулирующих бактерий у здоровых, не инфицированных. - опухолевых тканей, чем родительский штамм YS1646 (VNP20009, который представляет собой msbB-/purI-), и приводит к полному удалению бактерий из неопухолевых тканей в течение от 24 часов до 30 дней; тогда как штамм YS1646 (VNP20009) все еще можно обнаружить в неопухолевых тканях через 24 часа после введения дозы, а также в печени и селезенке через 30 дней после введения дозы. Это указывает на то, что иммуностимулирующие бактерии с модификациями генома, предусмотренные в настоящем документе, более безопасны для введения и лучше переносятся, чем штамм VNP20009. Таким образом, можно вводить более высокие дозы иммуностимулирующих бактерий, представленных в настоящем документе.

Для измерения доставки плазмиды бактериями в различные неопухолевые ткани и последующей экспрессии гетерологичного гена и секреции белка

измеряли активность секретируемого белка люциферазы (NanoLuciferase®, Promega, сокращенно secNanoLuc®). Внутривенновводилиштаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB, каждыйизкоторыхсодержалплазмиду, кодирующуюsecNanoLuc®, подконтролемпромотораэукариотического CMV.

После гомогенизации тканей мыши, как описано выше, гомогенаты центрифугировали при 1300 об/мин в течение 10 минут, супернатант собирали и анализировали на активность люциферазы с использованием реагента для обнаружения NanoGlo® (Promega), а люминесценцию измеряли с помощью спектрометра SpectraMax. ® M3 Спектрофотометр/люминометр (MolecularDevices).

Во всех тканях и во все моменты времени активность люциферазы не превышала фоновую, несмотря на наблюдение КОЕ в селезенке и печени через 24 часа после введения дозы. Эти данные демонстрируют способность штаммов YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB быстро очищаться от здоровых тканей у неопухолевых мышей и, в отличие от родительского штамма YS1646 , чтобы не требовать антибиотиков для очистки от бактерий на 30-й день после введения дозы.

Важно отметить, что экспрессия эктопического гена не наблюдалась в здоровых тканях ни в какой момент времени.

B. Делеционные штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB преимущественно накапливаются в опухолевой ткани, а экспрессия эктопического гена является исключительно опухолеспецифической.

Для определения относительной колонизации тканей и экспрессии опухолеспецифического гена делеционных штаммов, содержащих плазмиду

secNanoLuc®, по сравнению с родительским штаммом YS1646 было проведено исследование биораспределения на мышах-носителях опухоли. Для этого 6-8-недельным самкам мышей BALB/c (4 мыши в группе) ортотопическиинокулировали в жировую ткань 4 -й молочной железы клетки карциномы молочной железы 4T1 (2×10^5 клеток в 100 мклPBS). Мышам с 10-дневными опухоляминабокувнутривенновводилиоднократнуюдозу 2×10^6 КОЕ штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgDили YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB, каждыйизкоторыхсодержалплазмиду, кодирующуюsecNanoLuc®, или с однократнойдозой 2 x10 ^{6}КОЕ родительскогоштамма YS1646. На 1-й, 4-й и 8-й день после внутривенного введения бактерий мышей подвергали эвтаназии, а опухоли, селезенку, печень, сердце, легкие, почки, кишечник, мышцы, костный мозг и лимфатические узлы собирали и обрабатывали. как описано выше, для подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и для измерения средней люминесценции (в относительных световых единицах (RLU)) на грамм опухолевой ткани. Кроме того, в эти моменты времени у мышей брали кровь и собирали сыворотку для определения уровней системных провоспалительных цитокинов, индуцированных в ответ на введение различных штаммов бактерий, как обсуждается ниже.

Как показано в приведенных ниже таблицах, все три штамма продемонстрировали преимущественную колонизацию (определяемую средним значением КОЕ) в опухолях по сравнению с другими тканями на 1-й день после введения дозы и продемонстрировали увеличение колонизации опухоли на 4-й и 8-й день.

Штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD демонстрировал более быстрый и высокий уровень колонизации опухоли, чем штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB. Кроме того, для штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и, в большей степени, для штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB очень мало колоний наблюдалось в тканях, отличных от опухоли, селезенки, и печени. Напротив,

колонизация родительского штамма YS1646 наблюдалась в здоровых неопухолевых тканях по всей мыши даже на 8-й день после введения дозы.

Биораспределение штамма YS1646 в опухолях по сравнению со здоровыми тканями через 1, 4 и 8 дней после внутривенного введения у мышей с опухолями

Ткань	Дни после внутривенного введения					
	День 1		День 4		День 8	
	Средние CFU	SD	Средние CFU	SD	Средние CFU	SD
Опухоль	30851	54138.9	12999981	726267 1	5899998 1	11489106.3
Селезенка	7621	2683.4	85981	11981	127981	14947.6
Печень	4466	2693.3	124981	73836.7	5969981	5161208.2
Сердце	246	201.3	356	215.6	2096	222.9
Легкие	121	9.3	2016	247.0	6081	3983.4
Почки	106	126.7	471	127.5	5951	4618.0
Кишечник	131	203.0	126	31.0	176	145.8
Мышцы	<LOD	<LOD	196	163.5	21	9.5
Костный мозг	16	0.4	131	152.9	266	36.1
Лимфатический узел	<LOD	<LOD	86	49.5	4346	947.7

SD = Стандартное отклонене; LOD = предел обнаружения

Биораспределение штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD в опухолях по сравнению со здоровыми тканями через 1, 4 и 8 дней после внутривенного введения у мышей с опухолями

Ткань	Дни после внутривенного введения					
	День 1		День 4		День 8	
	Средние CFU	SD	Средние CFU	SD	Средние CFUs	SD
Опухоль	26374	26240.6	2940281	3402144.3	3694981	2787829.6
Селезенка	3991	1050.0	17231	5894.5	17831	2563.6
Печень	13011	3178.9	55981	16554.1	16756	5120.0
Сердце	371	330.3	26	11.0	<LOD	<LOD
Легкие	61	40.2	816	185.2	176	104.7
Почки	71	31.3	121	208.2	<LOD	<LOD
Кишечник	10	1.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Мышцы	<LOD	<LOD	170	321.5	96	171.3
Костный мозг	<LOD	<LOD	136	129.2	331	145.5
Лимфатический узел	<LOD	<LOD	11	1.0	371	428.3

SD = стандартное отклонение; LOD = предел обнаружения

Биораспределение штамма YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB в опухолях по сравнению со здоровыми тканями через 1, 4 и 8 дней после внутривенного введения у мышей с опухолями

Ткань	Дни после внутривенного введения					
	День 1		День 4		День 8	
	Средние CFU	SD	Средние CFU	SD	Средние CFU	SD

Опухоль	4406	8433.7	295331	372484	596881	406961.5
Селезенка	1926	642.6	1516	330.6	2026	699.8
Печень	2241	880.9	2111	213.4	2286	545.4
Сердце	36	22.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Легкие	146	156.7	16	0.7	76	92.2
Почки	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Кишечник	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Мышцы	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Костный мозг	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Лимфатический узел	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

SD = стандартное отклонение; LOD = предел обнаружения

Для определения уровня экспрессии гетерологичных генов и секреции белка в опухолях и в различных неопухолевых тканях мыши активность secNanoLuc®, закодированного на плазмидах бактерий, измеряли в супернатантегомогенатов тканей с помощью анализ активности люциферазы, как описано выше. Как показано в таблицах ниже, экспрессия secNanoLuc® в обоих штаммах была ограничена опухолевой тканью, несмотря на то, что бактериальные КОЕ наблюдались в других тканях (как показано выше). Было установлено, что RLU, наблюдаемые в костном мозге мышей, которым вводили делеционный штамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB, были вызваны контаминацией и не наблюдались в последующем эксперименте. Делеционныйштамм YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppABпоказалотсроченнуюэкспрессию secNanoLuc® вопухоли, посравнениюсYS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*делеционнымштаммом, из-зазадержкивколонизациионухоли(какпоказановтаблицахвыше).

ОпухолеспецическаяэкспрессиясecNanoLuc®, закодированногонаплазмидевштамме YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD

Ткань	Дни после дозировки					
	День 1		День 4		День 8	
	Средние RLU	SD	Средние RLU	SD	Средние RLU	SD
Опухоль	39	-5.0	7014	7606.8	29790	14706.8
Селезенка	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Печень	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Сердце	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Легкие	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Почки	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Кишечник	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Мышцы	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Костный мозг	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Лимфатический узел	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

SD = среднее отклонение; LOD = предел обнаружения

Опухолеспецическая экспрессия secNanoLuc®, закодированного на плазмиде в штамме YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB

Ткань	Дни после дозировки					
	День 1		День 4		День 8	
	Средние RLU	SD	Средние RLU	SD	Средние RLU	SD
Опухоль	<LOD	<LOD	85	80.6	5503	4465.9
Селезенка	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Печень	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Сердце	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Легкие	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Почки	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Кишечник	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Мышцы	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Костный мозг	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	285	70.1
Лимфатический узел	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

SD = Стандартное отклонение; LOD =предел обнаружения

Как обсуждалось выше, у мышей с опухолями брали кровь на 1, 4 и 8 дни после внутривенного введения иммуностимулирующих бактериальных штаммов и собирали сыворотку. В сыворотке оценивали уровни системных провоспалительных цитокинов IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-2 и IL-10 в 1-й день (D1), 4-й день (D4) и день. 8 (D8) дозирование после внутривенного введения с помощью массива цитометрических гранул (MouseInflammationCBA, BDBiosciences).

Как показано в таблицах ниже, на 1-й день после внутривенного введения бактерий сывороточные концентрации всех цитокинов были ниже, чем у мышей, которым вводили штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/. ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB по сравнению с концентрациями в сыворотке мышей, получавших дозу родительского штамма YS1646, за исключением немного более высоких уровней IL-6 для штамма YS1646 Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD. Концентрации IFN-γ, IL-2 и IL-10 в сывороткемышей, получавшихдозыштаммов YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB, былитакимиже, как и в контрольнойгруппе PBS в 1-й деньпослевведениядозы (т. е. 0 пг/мл). Родительский штамм YS1646 продемонстрировал пиковые системные уровни цитокинов на 4-й день для IL-6, IFN-γ и IL-2. в то время как уровни

цитокинов в сыворотке после введения каждого из делеционных штаммов были значительно ниже уровней, наблюдаемых после введения родительского штамма, и ближе к контрольным измерениям носителя PBS. Высокая концентрация IL-10 в сыворотке, который является прямой мишенью передачи сигнала TLR2, в 1-й день после введения дозы родительского штамма отсутствовала после введения дозы каждого из делеционных штаммов, которые содержат делеции или модификации агонистов TLR2 (например, липопротеиды).

Эти данные демонстрируют, что геномные делеции, которые модифицируют передачу сигналов TLR2, TLR4 и TLR5 в делеционных штаммах YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB, в значительной степени устраняют выработку системных провоспалительных цитокинов, несмотря на сильную бактериальную колонизацию опухоли. В результате штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB хорошо переносятся, и, при необходимости, их можно вводить в более высоких концентрациях, чем исходный штамм YS1646, что приводит к усилению терапевтической эффективности.

Сывороточные уровни IL-6, TNF-α и IFN-γ в ответ на внутривенное введение мышам-опухоленосителям иммуностимулирующих бактериальных штаммов

Штамм	IL-6 (пг/мл)			TNF-α (пг/мл)			IFN-γ (пг/мл)		
	D1	D4	D8	D1	D4	D8	D1	D4	D8
PBS контроль	2.7	1.4	1.4	1.7	1.2	4.2	0.0	15.2	0.6
YS1646	48.7	309.1	65.9	4.1	2.1	95.6	149	145.8	52.6

Штамм	IL-6 (пг/мл)			TNF-α (пг/мл)			IFN-γ (пг/мл)		
	D1	D4	D8	D1	D4	D8	D1	D4	D8
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*	77.2	28.1	26.0	3.0	1.2	17.8	0.0	9.1	25.1
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*lppAB*	15.5	1.8	22.8	2.4	1.2	0.8	0.0	4.1	6.6

Сывороточные уровни IL-2 и IL-10 в ответ на внутривенное введение мышам-опухоленосителям иммуностимулирующих бактериальных штаммов

Штамм	IL-2 (пг/мл)			IL-10 (пг/мл)		
	D1	D4	D8	D1	D4	D8
PBS контроль	0.0	25.0	14.2	0.0	1.8	1.8
YS1646	4.1	212.7	201.0	202.1	2.2	8.0
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*	0.0	33.2	61.5	0.0	1.8	8.8
YS1646Δ*asd*/ΔFLG/Δ*pagP*/Δ*ansB*/Δ*csgD*/Δ*lppAB*	0.0	15.9	22.1	0.0	1.8	1.8

Эти данные показывают, что делеционные штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB быстро устраняютсяот наивных мышей после внутривенного введения и не требуют очистки от антибиотиков. У наивных мышей и мышей с опухолями делеционные штаммы преимущественно колонизируют опухоли по сравнению со здоровыми тканями, а экспрессия полезных нагрузок, кодируемых плазмидами, специфична для опухолей. Кроме того, в отличие от родительского штамма YS1646, делеционные штаммы YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD и

YS1646Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD/ΔlppAB не продуцируют провоспалительные системные цитокины, которые являются токсичными и иммуносупрессивными, несмотря на сильную колонизацию опухоли. , что указывает на то, что эти штаммы хорошо переносятся invivo и, при необходимости, их можно вводить в более высоких концентрациях, чем штамм YS1646 (VNP20009), что приводит к более высокой терапевтической эффективности.

Пример 30

Модификации плазмиды доставки, кодирующей иммуномодулирующие полезные нагрузки

Плазмиды доставки кодируют гены и регуляторные элементы, которые необходимы для приспособленности и функционирования бактерий, а также для правильной экспрессии закодированных сложных полицистронных эукариотических полезных нагрузок. Переключение между такими эволюционно расходящимися элементами создает проблемы для правильного функционирования обоих. У бактерий наблюдается утечка транскрипции от эукариотических промоторов, таких как промотор CMV. Промотор считается «дырявым», если в бактериях всегда присутствует некоторый уровень базальной транскрипции эукариотического промотора. Эта утечка промотора в сочетании с большими эукариотическими генами и регуляторными последовательностями при кодировании (например, на плазмидах) в бактериях приводит к снижению приспособленности бактерий, что проявляется в низкой жизнеспособности инъекционного материала и сниженной скорости роста в бульонной культуре. Здесь было обнаружено, что на приспособленность бактерий влияет негерметичность эукариотического промотора. Протекающий промотор может влиять на приспособленность бактерий по нескольким причинам, таким как повышенная транскрипционная/трансляционная нагрузка и частичная экспрессия обычно секретируемых эукариотических белков, которые могут быть токсичными для бактериальных клеток по мере их накопления.

Для уменьшения утечки промотора CMV и улучшения роста и приспособленности бактерий в настоящем документе показано, что утечку бактериального CMV можно уменьшить или ингибировать, например, путем включения специфических для бактерий терминаторных последовательностей, таких как терминаторы фага T4, trpA и BBa_B0015, и /или путем размещения сильного бактериального промотора в противоположной ориентации (т.е. включая обратный промотор). Например, обратный промотор (промотор в антисмысловой ориентации), обозначаемый здесь как RevMTL*, представляет собой сильный промотор, полученный из промотора MTL (доступного от MolecularTechnologiesLaboratories), который, в свою очередь, получен из промотора proD. (см., например, Davisetal. (2011) NucleicAcidsResearch 39(3):1131–1141), и который был мутирован для удаления всех антисмысловыхATG в последовательности, чтобы устранить или уменьшить экспрессию эукариотических генов.

Здесь показано, что сконструированные мутации, которые изменяют предсказанные последовательности бактериального промотора внутри эукариотического промотора, также могут быть использованы для создания вариантов с пониженной утечкой промотора CMV. В дополнение к утечке промотора CMV, надежное считывание экспрессии asd (в asd-штаммах, содержащих плазмиды, включающие систему комплементацииasd) может вызвать утечку через экспрессионную кассету эукариотических полезных нагрузок. В данном документе показано, что стратегии блокирования или уменьшения считывания экспрессии asd включают размещение кассеты экспрессии в обратной ориентации и/или вставку последовательности бактериального терминатора между геном asd и кассетой экспрессии полезной нагрузки.

Чтобы свести к минимуму негативное воздействие на приспособленность бактерий при сохранении высокой экспрессии эктопического гена/полезной нагрузки в клетках млекопитающих, плазмиду доставки систематически модифицировали четырьмя различными способами, а именно:

1) скрытые последовательности бактериального промотора, закодированные в энхансерной области промотора CMV, идентифицировали с помощью PromoterHunter (доступно онлайн по адресу phisite.org/promoterhunter/; см., например, Klucaretal. (2010) NucleicAcidsRes.38 (выпуск базы данных): D366-D370), а затем предполагаемые промоторные последовательности были заменены сайтами связывания CREB и сайтами частичного связывания CREB для обеспечения эффективной доставки плазмиды;

2) для ингибирования утечки транскрипции от промотора CMV ряд бактериальных терминаторов встраивали в 5' нетранслируемую область (UTR) открытой рамки считывания (ORF) 1, чтобы ингибировать экспрессию в бактериях (см. таблицу ниже);

3) для снижения уровня сквозной транскрипции от точки начала репликации ориентация экспрессионной кассеты от промотора CMV до конца сигнала полиаденилирования была изменена на противоположную, с терминатором транскрипции, вставленным между кассетой экспрессии, и без него, и началом репликации; и

4) модификации из числа 1)-3), приведенные выше, которые привели к повышению жизнеспособности инъекционного материала с повышенной экспрессией полезной генетической нагрузки invitro, были объединены для дальнейшего улучшения.

Для измерения экспрессии кодируемых полезных нагрузок из бактериально-инфицированных эукариотических клеток клетки макрофагов человека THP-1 (каталог ATCC № 202165) были инфицированы штаммами S. typhimuriumYS1646Δasd/ΔfliC/ΔfljB/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащими плазмиды, кодирующие функциональный ген asd для обеспечения поддержания плазмиды, а также сложную эукариотическую экспрессионную кассету (CMVmuIL-12p70_T2A_muIL-18 HPREbGHpolyA + EF-1αmuSTINGC205YWPpolyRESV40), с модификациями, рассмотренными выше, и перечисленными в таблице ниже. Плазмида ADN-287 содержит

эукариотическую экспрессионную кассету и не содержит дополнительных модификаций. Каждая из плазмид ADN-397, ADN-398 и ADN-399 содержит по одной уникальной замене скрытого промотора CMV (сайтом связывания CREB или сайтом частичного связывания CREB); каждая из плазмид ADN-400, ADN-401 и ADN-402 содержит две замены криптического промотора CMV; и плазмида ADN-403 содержит три замены криптических промоторов CMV. Плазмида ADN-355 содержит эукариотическую кассету экспрессии из плазмиды ADN-287 в обратной ориентации; плазмида ADN-358 содержит кассету экспрессии от плазмиды ADN-287 с терминатором BBa_B0015, расположенным ниже сайта полиаденилирования, причем кассета экспрессии находится в обратной ориентации;

плазмида ADN-325 содержит бактериальный терминатор T4 между промотором CMV и кассетой экспрессии ADN-287; плазмида ADN-382 такая же, как и плазмида ADN-325, но кассета экспрессии расположена в обратной ориентации; плазмида ADN-373 содержит бактериальный терминатор T4 между промотором CMV и кассетой экспрессии ADN-287, за которым следует терминатор BBa_B0015, причем кассета экспрессии находится в обратной ориентации; плазмида ADN-327 содержит бактериальный терминатор trpA между промотором CMV и кассетой экспрессии ADN-287; плазмида ADN-381 такая же, как и плазмида ADN-327, но кассета экспрессии находится в обратной ориентации; плазмида ADN-372 содержит бактериальный терминатор trpA между промотором CMV и кассетой экспрессии ADN-287, за которым следует терминатор BBa_B0015, причем кассета экспрессии находится в обратной ориентации; плазмида ADN-329 содержит промотор RevMTL* (см. описание выше) между промотором CMV и кассетой экспрессии ADN-287; плазмида ADN-383 такая же, как и плазмида ADN-329, но кассета экспрессии имеет обратную ориентацию; плазмида ADN-374 содержит промотор RevMTL* между промотором CMV и кассетой экспрессии ADN-287, за которым следует терминатор BBa_B0015, причем кассета экспрессии находится в обратной ориентации; и плазмида ADN-328 содержит терминатор BBa_B0015 между промотором CMV и кассетой экспрессии ADN-287. Плазмида ADN-257

содержит ген, кодирующий muIL12-p70, под контролем промотора CMV и без дополнительных модификаций.

$5x10^5$ клеток помещали в каждую лунку 24-луночного планшета с RPMI и 10% FBS. Клетки инфицировали отмытыми стационарными культурами штамма YS1646 S. typhimuriumΔasd/ΔfliC/ΔfljB/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD (содержащими одну из плазмид, описанных выше и перечисленных в таблице ниже), в течение 1 часа при множественности инфекций 200 КОЕ на клетку, затем клетки промывали PBS и заменяли среду на среду, содержащую 200 мкг/мл гентамицина для уничтожения внеклеточных бактерий. Через 24 часа клетки лизировали 350 мкл буфера RLT с β-меркаптоэтанолом (β-ME) (Qiagen) и проводили экстракцию РНК с помощью набора QiagenRNeasyMiniKit со следующими модификациями. Этап элиминации геномной ДНК с использованием набора РНКазы-свободной ДНКазы (Qiagen) был включен в набор для удаления геномной ДНК из тотальной РНК. Тотальную РНК измеряли УФ- спектрофотометром NanoDrop™ One^{C}UV-Vis (ThermoFisherScientific). РНК хранили при температуре -80°C без замораживания-оттаивания до проведения обратной транскрипции. Синтез сДНК проводили с использованием 0,4-1 мкг матричной РНК с использованием термоциклераC1000 Touch™ (Bio-Rad) и SuperScript™ VILO™ MasterMix (Invitrogen) в 30 мкл реакционной смеси в соответствии с инструкциями производителя.

qPCR (количественную полимеразную цепную реакцию) проводили с помощью системы обнаружения PCR в реальном времени CFX96™ (Bio-Rad). ПраймерыSYBR® для мышиного IL-12 (идентификатор анализа: qMmuCID0015668) были приобретены у Bio-Rad. Реакцию количественной ПЦР (20 мкл) проводили в соответствии с протоколом с использованием iTaq™ UniversalSYBR® GreenSupermix (Bio-Rad). Стандартная программа термоциклирования на системе обнаружения ПЦР в реальном времени Bio-RadCFX96™ состояла из денатурации при 95 °C в течение 30 секунд, за которыми следовали 40 циклов при 95 °C в течение 5 секунд и при 60 °C в

течение 30 секунд. Реакции с контролем без матрицы были включены для каждого набора праймеров на каждом планшете. Все образцы анализировали дважды и рассчитывали средние значения Cq. Количественное определение мРНК-мишени нормализовали с использованием эталонной мРНК бета-актина (Bio-Rad, qMmuCED0027505). ΔC_qрассчитывали как разницу между геном-мишенью (т.е. muIL-12p70) и эталонным (т.е. бета-актином) геном. ΔΔCq получали путем нормализации значений ΔCq отдельных штаммов к значениям ΔCq штамма, несущего немодифицированную плазмиду (ADN-287; см. таблицу ниже). Выражение кратности рассчитывали как $2^{-\Delta\Delta C_q}$.

Время удвоения для каждого из отдельных бактериальных штаммов рассчитывали по кривым роста в бульоне, которые были получены путем разбавления стационарных культур, нормализованных по OD600, до OD_{600} = 0,05 и выращивания при 37 °C при встряхивании в течение ночи, а затем с использованием SpectraMax® M3 спектрофотометра (MolecularDevices) для считывания OD600 каждые 15 минут. Время удвоения (G) было получено из фазы экспоненциального роста по формуле G = t/n, где t = временной интервал (tfinal-tstart) в минутах, а $n = (\log OD_{600\,(final)} - \log OD_{600\,(start)})/\log 2$.

Инъекционные стоки готовили путем трехкратного промывания 25 мл ночных стационарных культур каждого штамма S. typhimuriumYS1646Δasd/ΔfliC/ΔfljB/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, выращенных в среде 4XYT в ледяном растворе 10% глицерина в PBS, нормализуя до OD_{600} = 2, и аликвоты по 1 мл в колбе замораживали в сухом льду. Запасы хранили при -80°C. Жизнеспособность раствора для инъекций определяли путем титрования флаконов с размороженным раствором для инъекций путем деления колониеобразующих единиц (КОЕ) на флакон на ожидаемые КОЕ на основе OD600. Результаты для уровней экспрессии muIL-12p70, времени удвоения бактерий, жизнеспособности инъекционного материала и средней стационарной фазы, заканчивающейся OD_{600}.показания для штаммов YS1646Δasd/ΔfliC/ΔfljB/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD, содержащих каждую из описанных плазмид (с обсуждаемыми модификациями и без них), показаны в таблице ниже.

Влияние модификаций плазмиды на уровни экспрессии полезной нагрузки и приспособленность бактерий

Плазмида	**Описание**	**Среднее увеличение экспрессииmuIL-12 (RT-qPCR)**	**Среднее время удвоения (мин)**	**Инъекционные стоки**	**Среднее окончание стационарной фазы OD_{600}**
ADN-287	CMV-muIL-12p70_T2A_muIL-18 + EF-1α_muSTING C205Y	1.0	125	22%	3.62
ADN-397	CMVкриптическогопромотера замена 1 (ADN-287)	1.3	146	23%	3.54
ADN-398	CMVкриптическогопромотера замена 2 (ADN-287)	1.5	150	23%	4.14
ADN-399	CMVкриптическогопромотера замена 3 (ADN-287)	7.2	145	22%	3.78
ADN-400	CMVкриптическогопромотера замена 1 + 2 (ADN-287)	1.4	136	16%	3.88
ADN-401	CMVкриптическогопромотера замена 1 + 3 (ADN-287)	1.3	147	18%	4.16
ADN-402	CMVкриптическогопромотера замена 2 + 3	1.0	138	26%	2.58

	(ADN-287)				
ADN-403	CMVкриптическогопромотера замена 1 + 2 + 3 (ADN-287)	0.6	139	17%	3.96
ADN-355	(ADN-287 кассета) обратная ориентация	2.0	110	31%	4.08
ADN-358	(ADN-287 кассета-BBa_B0015 терминатор) обратная ориентация	1.7	108	24%	4.22
ADN-325	CMV-T4 терминатор-ADN-287 кассета	0.7	96	41%	3.82
ADN-382	(CMV-T4 терминатор-ADN-287 кассета) обратная ориентация	6.1	99	13%	3.96
ADN-373	**(CMV-T4 терминатор-ADN-287 кассета-BBa_B0015 терминатор) обратная ориентация**	**1.5**	**101**	**41%**	**3.98**
ADN-327	CMV-*trpA*терминатор-ADN-287 кассета	1.4	105	40%	3.80
ADN-381	(CMV-*trpA*терминатор-ADN-287 кассета) обратная ориентация	2.5	112	27%	2.58
ADN-372	(CMV-*trpA*терминатор-ADN-287 кассета-BBa_B0015 терминатор) обратная ориентация	11.6	105	13%	3.59
ADN-	CMV-RevMTL*	0.9	105	36%	3.92

329	промотер-ADN-287 кассета				
ADN-383	(CMV- RevMTL* промотер-ADN-287 кассета) обратная ориентация	1.8	121	24%	3.56
ADN-374	(CMV- RevMTL* промотер-ADN-287 кассета-BBa_B0015 терминатор) обратная ориентация	0.8	110	15%	3.17
ADN-328	CMV-BBa_B0015 терминатор- ADN-287 кассета	3.8	108	10%	2.87
ADN-257	CMV- muIL-12p70	4.1	98	-	-

RevMTL* является обратным промотером (промотером с антисмысловой ориентацией) который является сильным бактериальным промотером, полученным из промотераMTL (MolecularTechnologiesLaboratories), который получен из промотера*proD*, и который мутирован для удаления всех антисмысловыхATGsдля снижения или удаления экспрессииэукариотических генов.

Результаты показывают, что, когда кассета экспрессии была обращена на плазмиде и за ней следовал терминатор BBa_B0015, а терминатор T4 был вставлен ниже промотора CMV (терминатор CMV-T4-ADN-287 кассета-терминатор BBa_B0015) обратная ориентация; см. результаты для плазмиды ADN-373), наблюдалось повышение жизнеспособности бактериальных клеток по сравнению со штаммом, несущим родительскую плазмиду ADN-287 (41% жизнеспособности инъекционного раствора по сравнению с 22%). Штамм, несущий эту плазмиду, также экспрессировал более высокие уровни muIL-12p70 invitro (1,5 по сравнению с 1,0), имел меньшее время удвоения (101 мин

по сравнению со 125 мин) и рос до более высокой стационарной OD600 (3,98 по сравнению с 3,62). по сравнению с тем же штаммом, несущим родительскую плазмиду ADN-287. Ни одна другая плазмида не приводила к таким улучшениям по всем показателям.

Таким образом, если плазмида кодирует сложные полицистронные эукариотические полезные нагрузки, комбинация 1) встраивания бактериального терминатора, такого как бактериальный терминатор T4, ниже промотора CMV; 2) после кассеты экспрессии с другим терминатором, таким как бактериальный терминатор BBa_B00015; и 3) изменение ориентации эукариотической экспрессионной кассеты на плазмиде повышает эффективность экспрессии закодированной полезной нагрузки и улучшает приспособленность бактерий.

Поскольку специалистам в данной области техники будут очевидны модификации, предполагается, что это изобретение ограничено только объемом прилагаемой формулы изобретения.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую множество противораковых продуктов в виде полицистронной последовательности под контролем одного промотора.

2. Конструкция по п.1, где полицистронная последовательность содержит пептид 2A между каждой открытой рамкой (ORF), кодирующей каждый продукт.

3. Конструкция по п.1 или 2, в которой противораковые продукты представляют собой белки.

4. Конструкция по п.2 или п.3, где белок 2A представляет собой один или несколько из T2A, P2A, E2A или F2A.

5. Конструкция по любому из пп.1-4, где кодируемые продукты представляют собой один или несколько иммуностимулирующих белков, которые вызывают или способствуют противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли.

6. Конструкция по п.5, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок, который вызывает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, выбран из одного или нескольких из: IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL- 12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra, комплексом альфа-цепи IL-15/IL-15R, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IL-2 модифицирован таким образом,что он не связывается с IL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерфероном-α, интерфероном-β, интерфероном-γ, CCL3, CCL4, CCL5, белками, которые участвуют или которые влияют или усиливают привлечение и/или персистенцию Т-клеток, CD40, лигандCD40 (CD40L), CD28, OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), 4-1BBL, имеющий цитоплазматического домена делецию или усечение для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов, членов семейства B7-CD28, антагонистов CD47,антитело против IL6 или связывающий IL-6 рецептор-

ловушку, антагонисты полипептида TGF-бета и члены надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

7. Конструкция по п.5, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок, который обеспечивает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, выбран из одного или нескольких из: IFN-α, IFN-β, GM-CSF, IL- 2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), комплекс альфа-цепи IL-15/IL-15R, IL-36 гамма, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra, IL-2, модифицированный таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, CXCL9, CXCL10 (IP-10), CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5 , молекулы, участвующие в потенциальном наборе и/или персистенции Т-клеток, CD40, лигандCD40 (CD40L), OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), 4-1BBL с удаленным цитоплазматическим доменом (4-1BBLΔcyt) или с частично делетированным цитоплазматическим доменом, где цитоплазматический домен делетирован или укорочен для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов, члены семейства B7-CD28 и члены надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

8. Конструкция по любому из пп.1-7, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую 4-1BBL с делетированным или частично делетированным цитоплазматическим доменом, или частично делетированным цитоплазматическим доменом и возможно включающая аминокислотные модификации, при этом полученный 4-1BBL предполагает правильную ориентацию при экспресии в клетке.

9. Конструкция по любому из пп.1-8, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую вариант 4-1BBL с делетированным или частично делетированным цитоплазматическим доменом, или модифицированный 4-1BBL с укороченным и модифицированным цитоплазматическим доменом, где последовательность 4 -1BBL представлена в SEQIDNO:390, SEQIDNO:391 и SEQIDNO:392.

10. Конструкция по любому из пп.1-9, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из следующих продуктов и комбинаций продуктов:

один или более из IL-12, или IL-15, или IL12p70, или комплекса IL-15/IL-15R альфа-цепи;

агонист пути цитокинов и стимулятора генов интерферона (STING);

цитокин, агонист пути STING и либо лигандкостимуляторного рецептора, либо ингибитор контрольной точки иммунного ответа;

цитокин, агонист пути STING и антагонист полипептида TGF-бета;

цитокин, агонист пути STING, антагонист полипептида TGF-бета и либо лигандкостимулирующего рецептора, либо ингибитор контрольной точки иммунной системы,

где агонистом пути STING является любой продукт, который увеличивает экспрессию интерферона I типа посредством активации пути STING.

11. Конструкция по любому из пп.1-10, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид стимулятора генов интерферона (STING).

12. Конструкция по любому из пп.1-11, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую комбинацию терапевтических продуктов, выбранную из следующих комбинаций:

антитело против CTLA-4 и полипептид STING,

IL-15 и полипептид STING,

4-1BBL и полипептид STING,

антагонист рецептора-ловушки или антагонист полипептидаTGF-бета и полипептид STING,

IL-12 и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-15 и полипептид STING,

4-1BBL, IL-15 и полипептид STING,

антагонист рецептора-ловушки или антагонист полипептидаTGF-бета, и IL-15, и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, и IL-12, и полипептид STING,

4-1BBL, IL-12 и полипептид STING,

антагонистрецептора-ловушкиTGF-бета или полипептида, IL-12 и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-15, антагонист рецептора-ловушкиTGF-бета или полипептида и полипептид STING,

4-1BBL, IL-15, антагонист рецептора-ловушкиTGF-бета или полипептида и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, антагонистрецептора-ловушки TGF-бета или полипептида и полипептид STING,

4-1BBL, IL-12, антагонист рецептора-ловушкиTGF-бета или полипептида и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-15 и полипептид STING,

4-1BBL, IL-12, IL-15 и полипептид STING,

антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида, IL-12, IL-15 и полипептид STING,

антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида, IL-12, IL-15 и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-15, антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида и полипептид aSTING,

4-1BBL, IL-12, IL-21, антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида и полипептид STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-15 и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида,

4-1BBL, IL-12, IL-21 и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида,

IL-12, IL-15 и полипептид STING,

IL-15, IL-21 и полипептид STING,

IL-12, IL-21 и полипептид STING,

антитело к CTLA-4, IL-15, IL-21 и полипептид STING,

антитело к CTLA-4, IL-12, IL-21 и полипептид STING,

4-1BBL, IL-15, IL-21 и полипептид STING,

4-1BBL, IL-12, IL-21 и полипептид STING,

антитело против CTLA-4 и IL-15,

антитело против CTLA-4, IL-15 и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида,

4-1BBL и IL-15,

4-1BBL, IL-15 и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида, антитело против CTLA-4 и IL-12,

антитело против CTLA-4, IL-12 и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида,

4-1BBL и IL-12,

4-1BBL, IL-12 и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида,

антитело против CTLA-4 и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида,

4-1BBL, и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида,

IL-15 и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида,

IL-12, и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида,

IL-12, IL-15 и антагонист ловушки- рецепторaTGF-бета или полипептида, и

IL-15, IL-21 и антагонист ловушки- рецептора TGF-бета или полипептида, где:

4-1BBL представляет собой 4-1BBL с удаленным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с модифицированным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом или 4-1BBL с укороченным и модифицированным цитоплазматическим доменом;

антитело против CTLA-4 представляет собой scFv или scFv-Fc; и

полипептид STING представляет собой полипептид STING дикого типа или вариант полипептида STING, или химерный полипептид STING, или химерный полипептид STING с заменами аминокислот.

13. Конструкция по любому из пп.1-11, которая кодирует комбинацию терапевтических продуктов, выбранных из:

IL-2 и IL-12p70;

IL-2 и IL-21;

IL-2, IL-12p70 и вариант STING с приобретением функции (GOF);

IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt), где Δcyt представляет собой делетированный цитоплазматический домен;

IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Pα и вариант STINGGOF;

IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

IL-15/IL-15Rα и IL-21;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STING GOF;

IL-15/IL-15Pα, IL-21 ивариант STING GOF;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и IL-21;

IL-12p70, IL-21 ивариант STING GOF;

IL-12p70, IL-21, вариант STING GOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, вариант STINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и IL-18;

IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист ловушки- рецептора TGF-βили полипептида TGF-β, IL-2 и IL-12p70;

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-2 и IL-21;

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист ловушки- рецептора TGF-β или полипептида TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист ловушки- рецептораTGF-β или полипептида TGF-β, IL-12p70 и IL-21;

антагонист ловушки- рецептораTGF-β или полипептида TGF-β, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

антагонист ловушки- рецептораTGF-β или полипептида TGF-β, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист ловушки- рецептораTGF-β или полипептида TGF-β и IL-12p70;

антагонист ловушки-рецептораTGF-β или полипептида TGF-β, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антагонист ловушки- рецептораTGF-β или полипептида TGF-β, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист ловушки- рецептораTGF-β или полипептида TGF-β, IL-12p70 и IL-18;

антагонист ловушки- рецептораTGF-β или полипептида TGF-β, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

антагонист ловушки- рецептораTGF-β или полипептида TGF-β, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист ловушки-рецептораTGF-β или полипептида TGF-β и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF; антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70,

вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF; антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4 и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-18;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2 и IL-12p70;

агонист CD40, IL-2 и IL-21;

агонист CD40, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-12p70 и IL-21;

агонист CD40, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40 и IL-12p70;

агонист CD40, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-12p70 и IL-18;

агонист CD40, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и

агонист CD40 и вариант STINGGOF, где:

4-1BBL представляет собой 4-1BBL с делетированным цитоплазматическим доменом (4-1BBLΔcyt), 4-1BBL с модифицированным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом или 4-1BBL с укороченным и модифицированным цитоплазматическим доменом; и

антитело против CTLA-4 представляет собой scFv или scFv-Fc.

14. Конструкция по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что:

полипептид STING модифицирован, что приводит к повышенной или конститутивной экспрессии интерферона типа I (IFN), или представляет собой химерный полипептид, содержащий человеческий полипептид STING с C-концевым хвостом (CTT) из другого вида, который имеет более низкую NF-

kBсигнальную активность, чем сигнальная активность NF-κBSTING человека, и при этом:

сайт связывания TRAF6 в CTT может быть удален; и

белок STING человека имеет последовательность, указанную в любой из SEQIDNO: 305-309.

15. Конструкция по любому из пп.1-14, отличающаяся тем, что кодируемые терапевтические белки содержат IL-12p70 и химерный полипептид STING человека с CTT тасманского дьявола и аминокислотной заменой, которая приводит к повышенной или конститутивной экспрессии интерферона типа I, или представляет собой полипептид STING с аминокислотной заменой, которая приводит к повышенной или конститутивной экспрессии интерферона типа I, где мутация, которая приводит к усиленной или конститутивной экспрессии интерферона типа I, представляет собой мутацию с приобретением функции (GOF).

16. Конструкция по п.15, отличающаяся тем, что замена аминогруппы в полипептиде STING соответствует R284G со ссылкой для сравнения на любую из SEQIDNO: 305-309.

17. Конструкция по любому из пп.11-16, где полипептид STING дополнительно содержит замену N154S.

18. Конструкция по любому из пп.1-17, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-36γ.

19. Конструкция по любому из пп.1-18, которая кодирует антитело-ингибитор контрольной точки иммунного ответа или его антигенсвязывающую часть.

20. Конструкция по п.19, где иммунная контрольная точка представляет собой CTLA-4, или PD-1, или PD-L1.

21. Конструкция по любому из пп.1-20, где кодируемый продукт представляет собой антитело, которое представляет собой scFv или представляет собой двухцепочечный полипептид scFv-Fc.

22. Плазмида, содержащая конструкцию по любому из пп.1-21.

23. Плазмида по п.22, которая представляет собой бактериальную плазмиду, где конструкция оперативно связана с эукариотическими регуляторными последовательностями транскрипции.

24. Плазмида по п.23, где регуляторные последовательности транскрипции содержат эукариотический промотор.

25. Композиция, содержащая смесь противораковых белковых продуктов, кодируемых конструкцией или плазмидой по любому из пп.1-24.

26. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая конструкцию или плазмиду по любому из пп.1-24.

27. Иммуностимулирующая бактерия по п.26, отличающаяся тем, что геном бактерии модифицирован таким образом, что полученная бактерия является msbB-/purI-.

28. Иммуностимулирующая бактерия по п.26 или 27, отличающаяся тем, что указанная бактерия является msbB- и purI-, посредством чего удалена полная длина по меньшей мере кодирующей части генов msbB- и purI-.

29. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-28, отличающаяся тем, что геном бактерии модифицирован, вследствие чего у бактерии отсутствуют флагеллы.

30. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-29, которая содержит модификации генома, при этом бактерия представляет собой msbB-/pagP-.

31. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-30, которая содержит модификации генома, при этом бактерия не экспрессирует L-аспарагиназуII, так что бактерия является ansB-.

32. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую множество терапевтических продуктов, при этом геном бактерии модифицирован таким образом, что бактерия является msbB- и purI-, при этом полная длина по меньшей мере кодирующей части генов msbB и purI удалена.

33. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, посредством чего бактерия не активирует синтез секретируемой аспарагиназы.

34. Иммуностимулирующая бактерия по п.33, где аспарагиназа представляет собой L-аспарагиназуII, кодируемую геном asnB.

35. Иммуностимулирующая бактерия по п.34, имеющая модификации генома, в результате чего бактерия лишена флагелл и является pagP-, ansB- и csgD-.

36. Иммуностимулирующая бактерия по п.35, которая представляет собой Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD.

37. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.33-36, которая имеет модификации генома, при этом бактерия представляет собой msbB-.

38. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.33-37, которая имеет модификации генома, при этом бактерия является ауксотрофом по аденозину или ауксотрофом по аденозину и аденину.

39. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.33-38, которая имеет модификации генома, при этом бактерия является *purI*.

40. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.33-39, где плазмида кодирует аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (asd).

41. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.33-40, которая является *purI*.

42. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую множество терапевтических продуктов под контролем эукариотического промотора, где: геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, посредством чего бактерия модифицирована для получения пентаацилированноголипополисахарида (LPS);

содержание гексаацилированноголипополисахарида существенно снижено, по меньшей мере, в 10 раз по сравнению с бактерией дикого типа или отсутствует; и

плазмида кодирует множество комплементарных противораковых терапевтических продуктов под контролем одного промотора, при этом каждый из комплементарных терапевтических продуктов лечит другой аспект рака или действует через другой механизм, так что комбинированный эффект является по меньшей мере дополнением эффекта каждого продукта в отдельности.

43. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где:

геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия имеет ослабленное распознавание TLR2, TLR4 и TLR5; и

плазмида кодирует множество комплементарных терапевтических продуктов под контролем одного промотора.

44. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где:

геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или разрушением всего или достаточной части гена или генов, при этом бактерия не активирует синтез фимбрийкурли и/или целлюлозы; и

плазмида кодирует множество комплементарных терапевтических продуктов под контролем одного промотора.

45. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где:

геном иммуностимулирующей бактерии модифицируется делецией или разрушением всего или достаточной части гена или генов, при этом бактерия является ауксотрофной по пуринам, аденозину или АТР, и модифицирован делецией или разрушением всего или одной достаточной части гена или генов, вследствие чего у бактерии отсутствуют флагеллы; и

плазмида кодирует множество терапевтических продуктов под контролем одного эукариотического промотора.

46. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, в результате чего у бактерии отсутствует флагеллы; и плазмида кодирует множество терапевтических продуктов под контролем одного промотора.

47. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, посредством чего бактерия модифицирована для специфического заражения резидентных опухолевых миелоидных клеток; и

плазмида кодирует множество терапевтических продуктов под контролем одного промотора.

48. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, посредством чего бактерия модифицирована для специфического заражения резидентных опухолевых миелоидных клеток и неспособна к репликации в резидентных опухолевых миелоидных клетках.

49. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии содержит две или более модификации, выбранные из числа:

a) делеция или разрушение всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия модифицирована с образованием пентаацилированноголипополисахарида, при этом:

геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, при этом бактерия модифицирована для образования пентаацилированноголипополисахарида; и

содержание гексаацилированноголипополисахарида существенно уменьшено, по меньшей мере, в 10 раз по сравнению с бактерией дикого типа или отсутствует;

b) делеция или разрушение всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия имеет ослабиленное распознавание одним или несколькими TLR2, TLR4 и TLR5;

c) делеция или разрушение всего или достаточной части гена или генов, при котором бактерия не активирует синтез фимбрийкурли и/или целлюлозы;

г) делеция или разрушение всего или достаточной части гена или генов, при котором бактерия не активирует синтез секретируемой аспарагиназы;

e) делеция или разрушение всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия является ауксотрофной по пуринам, аденозину или ATP;

f) делеция или разрушение всего или достаточной части гена или генов, в результате чего у бактерии отсутствуют флагеллы;

g) делеция или разрушение всего или достаточной части гена или генов, посредством чего бактерия модифицирована для специфического инфицирования резидентных опухолевых миелоидных клеток;

h) делеция или разрушение всего или достаточной части гена или генов, в результате чего бактерия модифицирована для специфического инфицирования резидентных опухолевых миелоидных клеток и неспособна к репликации в резидентных опухолевых миелоидных клетках; и

i) делеция или разрушение одного или обоих из lppA и lppB для снижения или устранения экспрессии липопротеинов в мембране, в результате чего экспрессия кодируемого терапевтического белка увеличивается в микроокружении опухоли и/или в резидентных опухолевых иммунных клетках.

50. Иммуностимулирующая бактерия по п.49, содержащая модификации a), d) и f) или содержащая модификации c) и d).

51. Иммуностимулирующая бактерия по п.49, включающая модификации a), c), d), e) и f).

52. Иммуностимулирующая бактерия по п.49, содержащая модификации a), c), d), e), f) и i), или содержащая модификации a), d), f) и i), или содержащая модификации c), d) и i), или содержащая модификации f) и i), или содержащая модификации a)-i).

53. Иммуностимулирующая бактерия по п.49, включающая модификации a), b), d) и f) или включающая модификации a), b), c) и d).

54. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-53, в которой делетированыlppA и lppB.

55. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-54, у которой отсутствуют флагеллы и которая представляет собой msbB-/pagP-, где плазмида кодирует комбинацию двух или более терапевтических белков, выбранных из костимулирующей молекулы, цитокина, STING-пути агониста и антитела-ингибитораиммуннойконтрольной точки.

56. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, где инфицирование макрофага бактерией превращает макрофаг М2 человека в макрофаг фенотипа М1.

57. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, где:

иммуностимулирующая бактерия включает модификации в своем геноме, благодаря чему бактерия инфицирует резидентные в опухоли макрофаги и не инфицирует эпителиальные клетки; и

экспрессия терапевтического продукта в макрофаге превращает макрофаги М2 человека в М1 или М1-подобный фенотип.

58. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-57, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт, где экспрессия терапевтического продукта в макрофаге превращает макрофаги М2 человека в М1 или М1-подобный фенотип.

59. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-58, отличающаяся тем, что терапевтический продукт является частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, что приводит к экспрессии интерферона I типа (IFN).

60. Иммуностимулирующая бактерия по п.59, в которой экспрессия IFNI типа является конститутивной.

61. Иммуностимулирующая бактерия по п. 59 или 60, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой вариант терапевтического продукта с приобретением функции (GOF), который является частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, при этом вариант продукта GOF не требуют цитозольных нуклеиновых кислот, нуклеотидов, динуклеотидов или циклических динуклеотидов, чтобы привести к экспрессии IFNI типа.

62. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-61, где терапевтический продукт представляет собой вариант белка STING.

63. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-62, где инфицирование этой бактерией превращает макрофаги M2 человека в M1-подобные клетки, продуцирующие IFNI типа.

64. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-63, в которой отсутствуют флагеллы, где бактерия дикого типа имеет флагеллы, а иммуностимулирующая бактерия представляет собой pagP-/msbB-.

65. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-64, отличающаяся тем, что указанная иммуностимулирующая бактерия содержит модификации генома, вследствие чего бактерия лишена флагелл и не продуцирует L-аспарагиназуII (ansB).

66. Иммуностимулирующая бактерия по п.65, где иммуностимулирующая бактерия также имеет модификации генома, в результате чего бактерия является msbB- и pagP-.

67. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-66, где иммуностимулирующая бактерия имеет модификации генома, при этом бактериальный фенотип, придаваемый геномом, представляет собой Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD или Δasd/ΔFLG/ΔpagP/ΔansB/ΔcsgD. /ΔmsbB/ΔpurI, где плазмида возможно кодирует аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (asd).

68. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-67, содержащая плазмиду, кодирующую полипептид STING.

69. Иммуностимулирующая бактерия по п.68, отличающаяся тем, что полипептид STING представляет собой вариант полипептида STING, который приводит к повышенной или конститутивной экспрессии интерферона I типа.

70. Иммуностимулирующая бактерия по п.69, отличающаяся тем, что полипептид STING представляет собой химерный полипептид STING человека, который содержит С-концевой хвост (CTT) STING тасманского дьявола.

71. Иммуностимулирующая бактерия по п.69 или п.70, отличающаяся тем, что полипептид STING содержит замену, соответствующую R284, со ссылкой для сравнения на любую из SEQIDNO:305-309.

72. Иммуностимулирующая бактерия по п.71, дополнительно содержащая замену, соответствующую N154S, со ссылкой на любую из SEQIDNO:305-309.

73. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-72, содержащая плазмиду, кодирующую один или несколько IL-12, IL-15 и IL-21.

74. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-73, которая представляет собой штамм Salmonella.

75. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-74, где терапевтический продукт представляет собой противораковое терапевтическое средство.

76. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-75, где бактерия кодирует терапевтический продукт, который представляет собой иммуностимулирующий белок.

77. Иммуностимулирующая бактерия по п.76, где иммуностимулирующий белок представляет собой белок-стимулятор генов интерферона (STING), модифицированный белок STING, цитокин, хемокин или костимулирующий рецептор или лиганд.

78. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-77, где бактерия содержит геномную модификацию, вследствие чего у нее отсутствуют флагеллы.

79. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-78, где бактерия содержит геномную модификацию, посредством которой она является pagP- или msbB-/pagP-.

80. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-79, где: бактерия содержит геномные модификации, в результате чего она не экспрессирует аспарагиназу или не активирует синтез секретируемой аспарагиназы; и/или геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или разрушением всего или достаточной части гена ansB, кодирующего L-аспарагиназуII, в результате чего бактерия является ansB- и не экспрессирует активную L-аспарагиназуII.

81. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или разрушением всей или достаточной части csgD, при этом бактерия является csgD-, и не активирует синтез фимбрийкурли.

82. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена ansB, кодирующего L-аспарагиназуII. , при этом бактерия является ansB- и не экспрессирует активную L-аспарагиназуII.

83. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или разрушением всего или достаточной части гена ansB, кодирующего L-

аспарагиназуII, и путем делеции или разрушения всего или достаточной части гена csgD, в результате чего бактерия является ansB- и не экспрессирует активную L-аспарагиназуII, а также является csgD- и не активирует синтез фимбрийкурли.

84. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-83, дополнительно включающая делецию или нарушение всех или достаточной части генов, кодирующих флагеллы, при этом бактерия представляет собой флагеллин- (fliC-/fljB-) и не продуцирует флагеллы, при этом бактерия дикого типа имеет флагеллы.

85. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или разрушением всех или достаточной части генов lppA и lppB, кодирующих бактериальный липопротеин, при этом липопротеин не продуцируется, и при этом терапевтический продукт, закодированный на плазмиде, представляет собой противораковое терапевтическое средство.

86. Иммуностимулирующая бактерия по п.85, отличающаяся тем, что геном бактерии дополнительно модифицирован путем делеции или нарушения всего или достаточной части гена csgD, посредством чего бактерия является csgD- или имеет другую или дополнительную модификацию в геноме. при этом нарушается образование биопленки.

87. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.82-86, отличающаяся тем, что геном бактерии дополнительно модифицирован делецией или разрушением всех или достаточной части генов, при этом бактерия представляет собой csgD-/msbB-/pagP-.

88. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.82, 83 и 85-87, отличающаяся тем, что бактерия содержит модификации генома, в результате чего у бактерии отсутствуют флагеллы.

89. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая модификации генома, при которых бактерия лишена флагелл и является lppA-/lppB- и возможно является csgD-, или лишена флагелл, является ansB- и возможно является csgD-.

90. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-89, где бактерия является ауксотрофной по пуринам.

91. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-89, где бактерия является ауксотрофной по аденозину.

92. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-89, которая является ауксотрофной по аденозину, аденину и АТР.

93. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-92, отличающаяся тем, что указанная бактерия является *purI*

94. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-93, где бактерия представляет собой pagP-.

95. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-94, где бактерия представляет собой asd-.

96. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-95, представляющая собой аспартат-полуальдегиддегидрогеназу- (asd-), где бактерия представляет собой asd- в силу разрушения или делеции всего или части эндогенного гена, кодирующего аспартат-полуальдегид. дегидрогеназу (asd), при этом эндогенная asd не экспрессируется.

97. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-96, которая кодирует аспартат-полуальдегиддегидрогеназу (asd) на плазмиде под контролем бактериального промотора.

98. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-97, где бактерия представляет собой msbB-.

99. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-98, которая содержит модификации генома, при этом бактерия представляет собой asd-, purI-, msbB-, флагеллин- и pagP-, где бактерия дикого типа имеет флагеллы.

100. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-98, представляющая собой asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- и pagP-, где бактерия дикого типа имеет флагеллы.

101. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-98, представляющая собой ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-) и pagP-, где бактерия дикого типа имеет флагеллы.

102. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.96-100, где бактерия представляет собой флагеллин- (fliC-/fljB-), где бактерия дикого типа имеет флагеллы.

103. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-102, отличающаяся тем, что геном бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена lppA и/или lppB, посредством чего бактерия является lppA- и/или lppB-, при этом экспрессия в микроокружении опухоли и/или резидентных макрофагах терапевтического белка, закодированного на плазмиде, увеличивается по сравнению с той же иммуностимулирующей бактерией, за исключением интактных lppA и/или lppB.

104. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или нарушением всего или достаточной части гена или генов, посредством чего бактерия является ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- и pagP-, где бактерия дикого типа имеет флагеллы.

105. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую терапевтический продукт под контролем эукариотического промотора, где геном иммуностимулирующей бактерии модифицирован делецией или

нарушением всего или достаточной части гена или генов, посредством чего бактерия является ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин-, где бактерия дикого типа имеет флагеллы, и pagP-.

106. Иммуностимулирующая бактерия по п.104 или 105, где бактерия представляет собой флагеллин- (fliC-/fljB-).

107. Иммуностимулирующая бактерия по п.105 или 106, отличающаяся тем, что бактериальный геном содержит дополнительные модификации, при этом бактерия представляет собой ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-), pagP- , lppA- и lppB-.

108. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-107, где терапевтический продукт представляет собой противораковое терапевтическое средство.

109. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-108, где нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический продукт, функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей сигнал секреции, в результате чего при экспрессии терапевтический продукт секретируется.

110. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-109, отличающаяся тем, что один или несколько генов или оперонов, участвующих в инвазии SPI-1, делетированы или инактивированы, в результате чего иммуностимулирующая бактерия не проникает в эпителиальные клетки и не инфицирует их.

111. Иммуностимулирующая бактерия по п.110, отличающаяся тем, что один или более из avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invI, invJ, iacP, iagB, spaO, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgI, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA, sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB и sptP удалены или инактивированы.

112. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-111, где плазмида присутствует в низком или среднем числе копий.

113. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-111, отличающаяся тем, что плазмида содержит начало репликации со средним или низким числом копий.

114. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-111, где плазмида содержит начало репликации с низким числом копий.

115. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-111 и 114, где плазмида присутствует в низком количестве копий.

116. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-111, где плазмида присутствует в количестве копий 150 или менее.

117. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-111, где плазмида присутствует с числом копий более 150.

118. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-111, где плазмида присутствует в большом количестве копий.

119. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-111, отличающаяся тем, что плазмида присутствует в среднем количестве копий, которое составляет от 20 до 150 включительно, меньше 150 или меньше примерно 150 и больше 20 или примерно 20, или составляет от 20 до 150 экземпляров.

120. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-111, отличающаяся тем, что количество копий плазмиды превышает 150.

121. Иммуностимулирующая бактерия по п.116, отличающаяся тем, что количество копий плазмиды составляет 150 копий или меньше или меньше или равно 150.

122. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-115, отличающаяся тем, что плазмида присутствует с низким числом копий, и низкое число копий

составляет менее 25, или менее 20, или менее примерно 25, или менее примерно 20 копий.

123. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-122, где терапевтический продукт представляет собой нуклеиновую кислоту или белок.

124. Иммуностимулирующая бактерия по п.123, где терапевтический продукт представляет собой белок.

125. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-124, где плазмида кодирует два или более терапевтических продукта.

126. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-125, где терапевтический продукт(ы), закодированный(ые) на плазмиде, предоставляет(ют) противораковое лечение(я).

127. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-126, где бактерия кодирует два или более продуктов, выбранных из цитокина, белка, который конститутивно индуцирует IFNI типа, и костимулирующего рецептора или молекулы.

128. Иммуностимулирующая бактерия по п.127, отличающаяся тем, что костимулирующая молекула не имеет цитоплазматического домена или имеет модифицированный укороченный цитоплазматический домен для гарантии того, что кодируемая костимулирующая молекула экспрессируется в клетке с правильной ориентацией, или имеет усеченный цитоплазматический домен, в результате чего иммуносупрессивная обратная передача сигналов устраняется или снижается.

129. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-128, где нуклеиновая кислота, кодирующая один или несколько терапевтических продуктов или продуктов, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнал для секреции терапевтического продукта (продуктов) из клетки, содержащей бактерию или плазмиду.

130. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-129, где нуклеиновая кислота, кодирующая продукт на плазмиде, функционально связана с регуляторными последовательностями, распознаваемыми эукариотическим хозяином.

131. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-130, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия кодирует два или более продуктов, и экспрессия каждого продукта находится под контролем отдельного промотора, или экспрессия всех продуктов находится под контролем одного промотора, и каждый продукт разделяется нуклеиновой кислотой, кодирующей пептид 2A, для осуществления отдельной трансляции каждого кодируемого терапевтического продукта.

132. Иммуностимулирующая бактерия по п.131, где нуклеиновая кислота кодирует пептид T2A, F2A, E2A или P2A для осуществления раздельной экспрессии терапевтических продуктов, экспрессируемых под контролем одного промотора.

133. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-132, где эукариотический промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II или промотор РНК-полимеразы III.

134. Иммуностимулирующая бактерия по п.133, где промотор представляет собой промотор РНК-полимеразы II, который представляет собой промотор вируса или промотор РНК-полимеразы II млекопитающих.

135. Иммуностимулирующая бактерия по п.134, где промотор представляет собой вирусный промотор, выбранный из промотора цитомегаловируса (CMV), промотора SV40, промотора вируса Эпштейна-Барра (EBV), промотора вируса герпеса и промотора аденовируса.

136. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-134, отличающаяся тем, что промотор, который контролирует экспрессию одного или нескольких кодируемых терапевтических продуктов или гетерологичных белков на

плазмиде, представляет собой альфа-промотор фактора элонгации-1 (EF-1) или промотор MND, или промотор UBC, или промотор PGK, или промотор CAG.

137. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-134, отличающаяся тем, что промотор, который контролирует экспрессию одного или нескольких кодируемых терапевтических продуктов или гетерологичных белков на плазмиде, представляет собой EF-1 альфа, аденовирус 2 или 5 поздней стадии, CMV , промотор SV40, MND, PGK, EIF4A1, CAG или CD68.

138. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-134, где промотор, контролирующий экспрессию одного или нескольких терапевтических продуктов или гетерологичных белков на плазмиде, представляет собой вирусный промотор, который является промотором поздней стадии.

139. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-138, отличающаяся тем, что плазмида содержит регуляторные последовательности, которые содержат терминатор и/или промоторы, выбранные из генов SV40, hGH, BGH, MND, куриного бета-глобулина и rbGlob (кроличьего глобулина), для контроля экспрессии терапевтического продукта(ов).

140. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-139, где кодируемый терапевтический продукт(ы) функционально связан(ы) с сигнальной последовательностью для секреции из клетки, содержащей плазмиду.

141. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-140, где плазмида, кодирующая терапевтический продукт, содержит конструкцию, включающую энхансер, промотор, открытую рамку считывания, кодирующую терапевтический продукт или гетерологичный белок, и полиА-хвост.

142. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-141, где плазмида содержит конструкцию, включающую энхансер, промотор, IRES, открытую рамку считывания, кодирующую терапевтический продукт или гетерологичный белок, и полиА-хвост.

143. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-142, где плазмида содержит конструкцию, включающую энхансер, промотор, IRES, последовательность локализации, открытую рамку считывания, кодирующую терапевтический продукт, и полиА-хвост.

144. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-143, отличающаяся тем, что плазмида содержит конструкцию, которая включает бактериальный терминатор, расположенный для уменьшения считывания с бактериального промотора на плазмиде.

145. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-144, где эукариотический промотор на плазмиде ориентирован в направлении, противоположном бактериальному промотору на плазмиде.

146. Иммуностимулирующая бактерия по п.145, где бактериальный промотор контролирует экспрессию гена asd.

147. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-146, отличающаяся тем, что конструкция на плазмиде, кодирующая терапевтический продукт или гетерологичный белок, содержит посттранскрипционный регуляторный элемент (WPRE) вируса гепатита сурка (WHP) или посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита B (HPRE).).

148. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-147, отличающаяся тем, что плазмида содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтический продукт, который является частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, приводя к экспрессии интерферона типа I (IFN), или представляет собой вариант этого.

149. Иммуностимулирующая бактерия по п.148, отличающаяся тем, что терапевтический продукт в немодифицированной форме воспринимает или взаимодействует прямо или косвенно с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами или циклическими динуклеотидами, индуцируя экспрессию IFN типа I, а вариант белка индуцирует экспрессию

IFNтипа I в отсутствие восприятия или взаимодействия с цитозольными нуклеиновыми кислотами, нуклеотидами, динуклеотидами или циклическими динуклеотидами.

150. Иммуностимулирующая бактерия по п.148, где терапевтический продукт представляет собой вариант, который при экспрессии у субъекта приводит к конститутивной экспрессии IFNI типа.

151. Иммуностимулирующая бактерия по п.148, где терапевтический продукт представляет собой вариант с приобретением функции (GOF), который не требует наличия цитозольных нуклеиновых кислот, нуклеотидов, динуклеотидов или циклических динуклеотидов для экспрессии IFNI типа.

152. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-151, отличающаяся тем, что терапевтический продукт выбран из STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6. , STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 и SNRNP200, а также их вариантов, которые повышают активность или повышают активность, так что активность интерферона I типа повышается или становится конститутивной.

153. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-152, отличающаяся тем, что терапевтический продукт выбран из TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33. , DHX36, DDX60 и SNRNP200 и их вариантов, которые повышают активность или повышают активность, так что активность интерферона типа I повышается или является конститутивной.

154. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-153, где терапевтический продукт представляет собой вариант белка, обладающий повышенной активностью, что приводит к повышенной экспрессии интерферона I типа (IFN) или приводит к конститутивной экспрессии IFNI типа.

155. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-154, отличающаяся тем, что плазмида кодирует конститутивно активный вариант белка с

приобретением функции, который у людей способствует интерферонопатии или вызывает ее.

156. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 62-80 и 148-155, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой вариант, содержащий мутацию, которая устраняет сайт фосфорилирования в белке STING, тем самым снижая уровень ядерного фактора каппа-легкой цепи-энхансера передачи сигналов активированных В-клеток (NF-κB).

157. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.148-156, где терапевтический продукт, индуцирующий IFN типа I, представляет собой STING, RIG-I, IRF-3 или MDA5 или их вариант.

158. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.148-157, где: терапевтический продукт, индуцирующий экспрессию IFN типа I, представляет собой его вариант, обладающий повышенной активностью или конститутивной активностью; и

терапевтический продукт представляет собой STING, RIG-I, IRF-3 или MDA5 или их вариант.

159. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 148-158, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой вариант STING, RIG-I, IRF-3 или MDA5, который содержит мутацию с приобретением функции, приводящую к повышенной экспрессии IFNI типа.

160. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 148-159, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой вариант STING, RIG-I, IRF-3 или MDA5, в котором один или несколько остатков серина (S) или треонина (T), которые фосфорилируются в результате вирусной инфекции, замещены аспарагиновой кислотой (D), в результате чего полученный вариант представляет собой фосфомиметик, который конститутивно индуцирует IFN типа I.

161. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 148-160, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой IRF-3, который имеет одну или несколько замен в остатках в положениях 396, 398, 402, 404 и 405, со ссылкой, для сравнения на SEQIDNO:312; и

остатки заменены остатками аспарагиновой кислоты.

162. Иммуностимулирующая бактерия по п.161, отличающаяся тем, что IRF-3 содержит замену S396D со ссылкой для сравнения на SEQIDNO:312.

163. Иммуностимулирующая бактерия по п.161, где IRF-3 содержит замены S396D/S398D/S402D/T404D/S405D со ссылкой для сравнения на SEQIDNO:312.

164. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 148-163, отличающаяся тем, что терапевтический продукт выбран из STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6. , STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21, DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 и SNRNP200, а также их вариантов, которые повышают активность или повышают активность так, что активность интерферона I типа повышается или становится конститутивной.

165. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.148-164, где: терапевтический продукт, который воспринимает цитозольную ДНК/РНК, представляет собой вариант STING, MDA5, RIG-I или IRF-3; и

немодифицированныйSTING имеет последовательность, указанную в любой из SEQIDNO: 305-309, немодифицированныйMDA5 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO: 310, немодифицированныйRIG-I имеет последовательность, указанную в SEQIDNO: 311, и немодифицированныйIRF -3 имеет последовательность, указанную в SEQIDNO:312.

166. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 148-165, отличающаяся тем, что терапевтический продукт выбран из STING, MDA5, IRF-3 и RIG-I и содержит мутацию(и) с приобретением функции, которая придает STING , MDA5, IRF-3 или RIG-I конститутивную активность, при этом экспрессия IFNI типа становится конститутивной.

167. Иммуностимулирующая бактерия по п. 165 или 166, отличающаяся тем, что мутации выбраны следующим образом:

a) в STING соссылкойдлясравненияна SEQ ID NO: 305-309, одинилинесколькovыбраныизчисла: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q , R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A , R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, N154S/R284G и S324A/S326A;

b) в MDA5, со ссылкой для сравнения на SEQIDNO:310, один или несколько из: T331I, T331R, A489T, R822Q, G821S, A946T, R337G, D393V, G495R, R720Q, R779H, R779C, L372F и A452T;

c) в RIG-I со ссылкой для сравнения на SEQIDNO:311 один или оба E373A и C268F; и

d) в IRF-3 со ссылкой для сравнения на SEQIDNO:312, S396D.

168. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 148-167, отличающаяся тем, что терапевтический продукт представляет собой вариант STING, который содержит одну или несколько аминозамен, выбранных для сравнения с любой из SEQIDNO: 305-309, из числа: S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R196A, R294A, T2 R293A /D205A, S272A/Q273A, R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A , S366A, R238A, R375A, S324A/S326A и N154S/R284G и их консервативных замен.

169. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-168, где: терапевтический белок увеличивает или индуцирует экспрессию IFNI типа; и

IFN типа I представляет собой интерферон-α или интерферон-β.

170. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-169, отличающаяся тем, что один или несколько генов или оперонов, вовлеченных в инвазию SPI-1 или независимую инвазию SPI-1, делетированы, разрушены или инактивированы, в результате чего иммуностимулирующая бактерия не проникает в эпителиальные клетки и не инфицирует их или имеет сниженную способность проникать в эпителиальные клетки или инфицировать их.

171. Иммуностимулирующая бактерия по п.170, отличающаяся тем, что один или более из avrA, hilA, hilD, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invI, invJ, iacP, iagB, spaO, spaP, spaQ, spaR, spaS, orgA, orgB, orgC, prgH, prgI, prgJ, prgK, sicA, sicP, sipA, sipB, sipC, sipD, sirC, sopB, sopD, sopE, sopE2, sprB и sptP удалены, разрушены или инактивированы.

172. Иммуностимулирующая бактерия по п.171, где один или несколько генов выбраны из числа pagN, hlyE, pefI, srgD, srgA, srgB и srgC.

173. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-172, имеющая делецию или нарушение гена, кодирующего белок в комплексе SPI-2.

174. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-173, отличающаяся тем, что плазмида кодирует иммуностимулирующий белок, который обеспечивает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли.

175. Иммуностимулирующая бактерия по п.174, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок, который придает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли выбран из одного или нескольких из: IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra , комплексом альфа-цепи IL-15/IL-15R, IL-18, IL-21, IL-23, IL-36γ, IL-2, модифицирован таким образом, что он не связывается со следующими: IL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон -α, интерферон-β, интерферон-γ, CCL3, CCL4, CCL5, белки, которые участвуют

или влияют или усиливают рекрутирование и/или персистенцию Т-клеток, CD40, лигандCD40 (CD40L), CD28, OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), 4-1BBl с делетированным, укороченным или иным образом модифицированным цитоплазматическим доменом для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов, члены семейства B7-CD28, CD47 антагонисты, антитело против IL6 или рецептор-ловушка, связывающий IL-6, антагонисты полипептида TGF-бета,и члены надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR).

176. Иммуностимулирующая бактерия по п.174 или 175, отличающаяся тем, что плазмида кодирует модифицированный 4-1BBL, последовательность которого представлена в SEQIDNO:390, SEQIDNO:391 или SEQIDNO:392.

177. Иммуностимулирующая бактерия по п.175 или 176, дополнительно содержащая метку, связанную с костимулирующим белком для облегчения его очистки или экспрессии.

178. Иммуностимулирующая бактерия по п.177, где метка представляет собой метку c-myc, содержащую последовательность MEQKLISEEDL, представленную в виде остатков 1-11 SEQIDNO:392.

179. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.174-178, где плазмида кодирует полипептид 4-1BBL и по меньшей мере один дополнительный терапевтический белок.

180. Иммуностимулирующая бактерия по п.179, отличающаяся тем, что дополнительный терапевтический белок(и) представляет собой IL-15Rα-IL-15sc, или IL-12, или IL-15Rα-IL-15sc и IL-12.

181. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 174-180, содержащая полипептид 1-4BBL и один или несколько дополнительных терапевтических полипептидов, закодированных в полицистронной нуклеиновой кислоте под контролем одного промотора, где полипептид 1-4BBL представляет собой первый полипептид в полицистроне.

182. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 174-181, отличающаяся тем, что:

иммуностимулирующий белок представляет собой костимулирующую молекулу, выбранную из CD40, лигандаCD40 (CD40L), CD28, OX40, лигандаOX40 (OX40L), 4-1BB и лиганда 4-1BB (4-1BBL), которые могут быть укорочены в цитоплазматическом домене или домене без цитоплазмы для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC) для устранения иммуносупрессивной обратной передачи сигналов; и

продукт укороченного гена способен осуществлять конститутивную иммуностимулирующую передачу сигнала Т-клетке за счет участия костимулирующего рецептора и неспособен передавать контррегуляторный сигнал антигенпрезентирующей клетке (APC) из-за укороченного или делетированного цитоплазматического домена.

183. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-182, отличающаяся тем, что кодируемый продукт содержит один или несколько белков STING, модифицированный белок STING, химерный белок STING, антитело против CTLA-4, IL-15, 4- 1BBL и его модифицированные или укороченные формы, антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептидный антагонист, IL-12 и IL-21 и/или любое из следующего:

один или более из IL-12, или IL-15, или IL12p70, или комплекса IL-15/IL-15R с альфа-цепью;

цитокин и агонист пути STING;

цитокин, агонист пути STING и либо костимулирующая молекула, либо ингибитор контрольной точки иммунного ответа;

цитокин, агонист пути STING и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида; и/или

цитокин, агонист пути STING, антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида, а также костимулирующая молекула или ингибитор контрольной точки иммунного ответа.

184. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-183, где плазмида включает нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт, индуцирующий апоптоз опухолевых клеток или являющийся цитотоксичным для опухолевых клеток.

185. Иммуностимулирующая бактерия по п. 184, отличающаяся тем, что:

продукт представляет собой нуклеиновую кислоту; и

нуклеиновая кислота, кодирующая продукт, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнал секреции, посредством которого секретируется продукт.

186. Иммуностимулирующая бактерия по п.183 или 184, где продукт индуцирует апоптоз.

187. Иммуностимулирующая бактерия по п.186, где продукт, индуцирующий апоптоз, представляет собой азурин.

188. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.174-187, отличающаяся тем, что плазмида кодирует иммуностимулирующий белок, который обеспечивает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, и иммуностимулирующий белок представляет собой цитокин или хемокин.

189. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 174-188, отличающаяся тем, что плазмида кодирует иммуностимулирующий белок, который придает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, который представляет собой костимулирующую молекулу или цитоплазматический домен с делецией или укорочением, или иным образом модифицированной формой.

190. Иммуностимулирующая бактерия по п.189, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок, который обеспечивает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли, выбран из 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 и OX40L, и цитоплазматического домена его делетированных или укороченных или укороченных и модифицированных форм, где модификации способствуют правильной ориентации, когда белок экспрессируется в клетке, а цитоплазматические делеции, укорочения и/или модификации устраняют или уменьшают иммуносупрессивную обратную передачу сигналов.

191. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-190, где плазмида кодирует терапевтический продукт, который представляет собой антагонист полипептида TGF-бета.

192. Иммуностимулирующая бактерия по п.191, отличающаяся тем, что антагонист полипептида TGF-бета выбран из антитела к TGF-бета или его фрагмента, антитела к рецептору TGF-бета или его фрагмента, растворимого антагониста полипептида TGF-бета и рецептора- ловушки, связывающего TGF-бета.

193. Иммуностимулирующая бактерия по п.191 или 192, где нуклеиновая кислота, кодирующая антагонист полипептида TGF-бета, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую сигнальную последовательность для секреции кодируемого полипептида.

194. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-193, где терапевтический продукт представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

195. Иммуностимулирующая бактерия по п.194, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из Fab, Fab', $F(ab')_2$, одноцепочечного Fv (scFv), Fv, dsFv,

нанотело, фрагмент диатела, одноцепочечное антитело и двухцепочечное антитело scFv-Fc.

196. Иммуностимулирующая бактерия по п.195, где антитело представляет собой scFV.

197. Иммуностимулирующая бактерия по п.195 или 196, отличающаяся тем, что антитело содержит Fc, при этом полученное антитело содержит две цепи.

198. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 195-197, отличающаяся тем, что антитело кодируется нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область легкой цепи, линкер, вариабельную область тяжелой цепи и lgGFc, при этом кодируемое антитело представляет собой scFv -Fc.

199. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.195-198, где антитело представляет собой антитело против CTLA-4.

200. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.194-199, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются гуманизированными или человеческими.

201. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.194-200, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антагонист PD-1, PD-L1, CTLA-4, VEGF, VEGFR2 или IL-6.

202. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-201, где плазмида кодирует два или более терапевтических продукта, выбранных из числа:

a) иммуностимулирующий белок, который вызывает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли;

b) один или несколько белков, являющихся частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, который приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN), или его варианта, обладающего повышенной активностью по увеличению

экспрессии IFN типа I, или варианта из них, что приводит к конститутивной экспрессии IFN типа I; и

c) противораковое антитело или его антигенсвязывающая часть.

203. Иммуностимулирующая бактерия по п.202, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой костимулирующую молекулу, в которой отсутствует цитоплазматический домен или его достаточная часть для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC), при этом укороченная костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу способную к конститутивному иммуностимулирующему сигналу к Т-клетке через участие костимулирующего рецептора и неспособеную к контррегуляторному сигналу к антигенпрезентирующей клетке (APC).

204. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую два или более терапевтических продукта под контролем одного промотора, при этом:

терапевтический продукт выбран из следующих:

a) иммуностимулирующий белок, который вызывает или способствует противоопухолевому иммунному ответу в микроокружении опухоли;

b) один или несколько белков, являющихся частью сенсорного пути цитозольной ДНК/РНК, который приводит к экспрессии интерферона типа I(IFN), или его варианта, обладающего повышенной активностью по увеличению экспрессии IFN типа I, или вариант из них, что приводит к конститутивной экспрессии IFN типа I; и

c) противораковое антитело или его антигенсвязывающая часть; и кодирующие нуклеиновые кислоты разделены последовательностью IRES или пептидами 2A, и каждая нуклеиновая кислота, кодирующая каждый продукт, может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей сигнальную последовательность, посредством чего при трансляции кодируемой мРНК

каждый продукт экспрессируется и секретируется отдельно из клетки, содержащей бактерию и/или плазмиду.

205. Иммуностимулирующая бактерия по п.204, отличающаяся тем, что иммуностимулирующий белок представляет собой костимулирующую молекулу, в которой отсутствует цитоплазматический домен или его достаточная часть для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC), при этом укороченная костимулирующая молекула представляет собой костимулирующую молекулу, способную подавать конститутивный иммуностимулирующий сигнал Т-клетке посредством вовлечения костимулирующего рецептора и не способную подавать контррегуляторный сигнал антигенпрезентирующей клетке (APC).

206. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-205, отличающаяся тем, что плазмида кодирует по меньшей мере два терапевтических продукта, выбранных из числа цитокина, белка, который конститутивно индуцирует IFNI типа, костимулирующей молекулы и противоракового антитела или его антигенсвязывающей части.

207. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-206, где: плазмида кодирует два или более терапевтических продукта под контролем одного промотора; и

экспрессия нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере два или все продукты, находится под контролем одного промотора, и нуклеиновая кислота, кодирующая каждый продукт, разделена нуклеиновой кислотой, кодирующей пептиды 2A, посредством чего при трансляции каждый продукт экспрессируется отдельно.

208. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.202-207, где нуклеиновая кислота, кодирующая один или несколько терапевтических продуктов, функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей последовательность, которая направляет секрецию экспрессируемого(ых) продукта(ов).

209. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-208, где:

терапевтический продукт представляет собой костимулирующую молекулу с делецией или укорочением цитоплазматического домена или другой модификацией для экспрессии на антигенпрезентирующей клетке (APC); и

продукт укороченного гена способен осуществлять конститутивную иммуностимулирующую передачу сигнала Т-клетке посредством взаимодействия с костимулирующим рецептором и неспособен передавать контррегуляторный сигнал APC из-за делеции, укорочения или другой модификации цитоплазматического домена.

210. Иммуностимулирующая бактерия по п. 209, отличающаяся тем, что костимулирующая молекула с делетированным, укороченным или иным образом модифицированным цитоплазматическим доменом представляет собой 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 или OX40L, и варианты, которые повышают правильную ориентацию белка при экспрессии в клетках.

211. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-210, которая кодирует два или более терапевтических продукта, где по меньшей мере один продукт выбран из a) и по меньшей мере один выбран из b), где:

a) представляет собой IL-2, IL-7, IL-12p70 (IL-12p40 + IL-12p35), IL-15, IL-23, IL-36 гамма, IL-2 с ослабленным связыванием с IL-2Ra, комплекс альфа-цепи IL-15/IL-15R, IL-18, IL-2, модифицированный таким образом, что он не связывается с IL-2Ra, CXCL9, CXCL10, CXCL11, интерферон-α, интерферон-β, CCL3, CCL4, CCL5 , белки, которые участвуют или которые влияют или усиливают рекрутирование/персистенцию Т-клеток, CD40, лигандCD40 (CD40L), OX40, лигандOX40 (OX40L), 4-1BB, лиганд 4-1BB (4-1BBL), члены семейства B7-CD28, антагонисты полипептида TGF-бета или члены надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR); и

b) STING, RIG-I, MDA-5, IRF-3, IRF-5, IRF-7, TRIM56, RIP1, Sec5, TRAF3, TRAF2, TRAF6, STAT1, LGP2, DDX3, DHX9, DDX1, DDX9, DDX21 , DHX15, DHX33, DHX36, DDX60 или SNRNP200.

212. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-211, которая кодирует или дополнительно кодирует одно или несколько антител, ингибирующих TGF-бета, или его антигенсвязывающий фрагмент, рецептор-ловушку, связывающий TGF-бета, антитело против IL6 или его антигенсвязывающий фрагмент и рецептор-ловушку, связывающий IL-6.

213. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-212, которая кодирует одну или несколько из следующих комбинаций терапевтических продуктов:

IL-2 и IL-12p70;

IL-2 и IL-21;

IL-2, IL-12p70 и вариант STING с приобретением функции (GOF);

IL-2, Ил-21 и вариант STINGGOF;

IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt), где Δcyt представляет собой делетированный цитоплазматический домен;

IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

IL-15/IL-15Rα и IL-21;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STING GOF;

IL-15/Ил-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и IL-21;

IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, вариант STINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); IL-12p70 и IL-18;

IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или антагонист полипептида, IL-2 и IL-12p70;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или антагонист полипептида, IL-2 и IL-21;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или антагонист полипептида, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или антагонист полипептида, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или полипептида антагонист, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или полипептида антагонист, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист рецептора-ловушкиTGF-β или антагонист полипептида, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

антагонист рецептора-ловушкиTGF-β или полипептида антагонист, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист рецептора-ловушкиTGF-β или полипептида антагонист, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

антагонист рецептора-ловушкиTGF-β или полипептида антагонист, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

антагонист рецептора-ловушкиTGF-β или полипептида антагонист, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антагонист рецептора-ловушкиTGF-β или полипептида антагонист, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или полипептида антагонист, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или полипептида антагонист, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или полипептида антагонист, IL-12p70 и IL-21;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или антагонист полипептида, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или полипептида антагонист, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или антагонист полипептида и IL-12p70;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или антагонист полипептида, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или полипептида антагонист, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или антагонист полипептида, IL-12p70 и IL-18;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или антагонист полипептида, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или полипептида антагонист, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антагонист рецептора-ловушки TGF-β или полипептида антагонист и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4 и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-18;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2 и IL-12p70;

агонист CD40, IL-2 и IL-21;

агонист CD40, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-12p70 и IL-21;

агонист CD40, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40 и IL-12p70;

агонист CD40, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-12p70 и IL-18;

агонист CD40, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и

агонист CD40 и вариант STINGGOF, где:

4-1BBL представляет собой 4-1BBL с удаленным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с модифицированным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом или 4-1BBL с укороченным и модифицированным цитоплазматическим доменом; и

антитело против CTLA-4 представляет собой scFv или scFv-Fc;

214. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-213, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую комбинацию терапевтических продуктов, выбранных из следующих комбинаций:

антитело против CTLA-4 и STING,

IL-15 и STING,

4-1BBL и STING,

антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида и STING,

IL-12 и STING,

антитело против CTLA-4, IL-15 и STING,

4-1BBL, IL-15 и STING,

антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида, и IL-15, и STING,

антитело против CTLA-4, и IL-12, и STING,

4-1BBL, IL-12 и STING,

антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида антагонист, IL-12 и STING,

антитело против CTLA-4, IL-15, антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида антагонист и STING,

4-1BBL и IL-15, антагонист рецептора-ловушкиTGF-бета или антагонист полипептида, и STING,

антитело против CTLA-4, и IL-12, и антагонист рецептора-ловушкиTGF-бета или полипептида антагонист, и STING,

4-1BBL и IL-12, антагонист рецептора-ловушкиTGF-бета или антагонист полипептида, и STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-15 и STING,

4-1BBL, IL-12, IL-15 иSTING,

антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или антагонист полипептида, IL-12, IL-15 и STING,

антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или антагонист полипептида, IL-12, IL-15 и STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-15, антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида антагонист и STING,

4-1BBL, IL-12, IL-21, антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или антагонист полипептида и STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-15 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида антагонист,

4-1BBL, IL-12, IL-21 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида,

IL-12, IL-15 и STING,

IL-15, IL-21 и STING,

IL-12, IL-21 и STING,

антитело против CTLA-4, IL-15, IL-21 и STING,

антитело против CTLA-4, IL-12, IL-21 и STING,

4-1BBL, IL-15, IL-21 иSTING,

4-1BBL, IL-12, IL-21 иSTING,

антитело против CTLA-4 и IL-15,

антитело против CTLA-4, IL-15 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида,

4-1BBL и IL-15,

4-1BBL, IL-15 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида, антитело против CTLA-4 и IL-12,

антитело против CTLA-4 и IL-12, а также антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида антагонист,

4-1BBL и IL-12,

4-1BBL, IL-12 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида,

антитело против CTLA-4 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или полипептида,

4-1BBL и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или антагонист полипептида,

IL-15 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или антагонист полипептида,

IL-12 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или антагонист полипептида,

IL-12, IL-15 и антагонист рецептора-ловушки TGF-бета или антагонист полипептида,

и IL-15, и IL-21 и антагонист рецептора-ловушкиTGF-бета или антагонист полипептида, где:

IL-15 представляет собой комплекс IL-15 или IL-15/IL-15R с альфа-цепью;

STING представляет собой полипептид STING, или вариант полипептида STING, или химерный полипептид STING, или химерный STING с заменами аминокислот;

TGF-бета представляет собой растворимую ловушку TGF-бета или антагонист TGF-бета;

4-1BBL представляет собой 4-1BBL с удаленным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с модифицированным цитоплазматическим доменом, 4-1BBL с укороченным цитоплазматическим доменом или 4-1BBL с укороченным и модифицированным цитоплазматическим доменом; и

антитело против CTLA-4 представляет собой scFv или scFv-Fc.

215. Иммуностимулирующая бактерия по п.214, где ловушка TGF-бета содержит слитый Fc или представляет собой антитело против TGF или его антигенсвязывающий фрагмент.

216. Иммуностимулирующая бактерия по п. 214 или 215, отличающаяся тем, что 4-1BBL является полноразмерным или является полноразмерным с заменами аминокислот в Ser5 и/или Ser8, посредством чего иммуносупрессивная обратная передача сигналов снижена или устранена, или 1-4BBL с удаленным цитоплазматическим доменом или укороченным цитоплазматическим доменом, который устраняет или уменьшает иммуносупрессивную обратную передачу сигналов, или представляет собой 4-1BBL с заменами аминокислот в усеченном цитоплазматическом домене, при этом 4-1BBL имеет правильную ориентацию при экспрессии в клетке.

217. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 214-215, отличающаяся тем, что полипептид STING содержит замену R284G или содержит замены N154S/R284, или представляет собой химерный полипептид STING, который представляет собой химерный полипептид STING человека с CTT тасманского дьявола, или представляет собой химерный полипептид STING человека с CTT TasmanianDevil и заменой, соответствующей R284G, или заменами, соответствующими N154S/R284G, все со ссылкой для сравнения на SEQIDNO:305-309.

218. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 213-215, отличающаяся тем, что вариант STING с приобретением функции (GOF) выбран(ы) из числа любых, указанных в п. 167 или п. 168.

219. Иммуностимулирующая бактерия или клетка, кодирующая одну или несколько из следующих комбинаций терапевтических продуктов:

IL-2 и IL-12p70;

IL-2 и IL-21;

IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt), где Δcyt представляет собой делетированный цитоплазматический домен;

IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/Ил-15Rα и вариант STINGGOF;

IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); ИЛ-15/ИЛ-15Rα и ИЛ-12p70;

IL-15/IL-15Rα и IL-21;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 ивариант STING GOF;

IL-15/IL-15Rα, Ил-21 и вариант STINGGOF;

IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и IL-21;

IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-12p70 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, вариант STINGGOF, и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

IL-1p70 и IL-18;

IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушка TGF-β, IL-2 и IL-12p70;

рецептор-ловушкаaTGF-β, IL-2 и IL-21;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушка TGF-β, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

рецептор-ловушкаTGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

рецептор-ловушкаTGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушкаTGF-β, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушкаTGF-β, IL-12p70 и IL-21;

рецептор-ловушкаTGF-β, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушка TGF-β и IL-12p70;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70 и IL-18;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

рецептор-ловушка TGF-β, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

рецептор-ловушка TGF-β и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-2 и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-21;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4 и IL-12p70;

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4, IL-12p70 и IL-18;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

антитело против CTLA-4, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

антитело против CTLA-4 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2 и IL-12p70;

агонист CD40, IL-2 и IL-21;

агонист CD40, IL-2, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-2, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-2, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-12p70;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα и IL-21;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-15/IL-15Rα, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-12p70 и IL-21;

агонист CD40, IL-12p70, IL-21 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, IL-21, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40 и IL-12p70;

агонист CD40, IL-12p70 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt);

агонист CD40, IL-12p70 и IL-18;

агонист CD40, IL-12p70, IL-18 и вариант STINGGOF;

агонист CD40, IL-12p70, IL-18, вариант STINGGOF и 4-1BBL (включая 4-1BBLΔcyt); и

агонист CD40 и вариант STINGGOF.

220. Иммуностимулирующая бактерия или клетка по п. 219, отличающаяся тем, что вариант STINGGOF выбран из любого из перечисленных в п. 167 или п. 168.

221. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-220, где кодируемый терапевтический продукт содержит домен Fc.

222. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-221, где кодируемый терапевтический продукт содержит трансмембранный домен белка B7.

223. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-222, отличающаяся тем, что кодируемый терапевтический продукт заякорен GPI.

224. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-223, отличающаяся тем, что кодируемый терапевтический продукт содержит человеческий сывороточный альбумин или его производные, которые увеличивают время полужизни кодируемого продукта в сыворотке.

225. Иммуностимулирующая бактерия любого из пп. 26-224, где кодируемый терапевтический продукт представляет собой слияние с коллагеном.

226. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-225, где бактерия является грамотрицательной бактерией.

227. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-226,

где бактерия представляет собой штамм Salmonella, Shigella, E. coli, Bifidobacteriae, Rickettsia, Vibrio, Listeria, Klebsiella, Bordetella, Neisseria, Aeromonas, Francisella, Cholera, Corynebacterium, Citrobacter, Chlamydia, Haemophilus, Brucella, Mycobacterium, Mycoplasma, Legionella. , Rhodococcus, Pseudomonas, Helicobacter, Bacillus или Erysipelothrix, или их

аттенуированныештаммы, или их модифицированные штаммы из любого из предыдущего списка бактериальных штаммов.

228. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-226, отличающаяся тем, что бактерия представляет собой*Rickettsiarickettsiae,Rickettsiaprowazekii,Rickettsiatsutsugamuchi,Rickettsiamooseri,Rickettsiasibirica,Bordetellabronchiseptica,Neisseriameningitidis,Neisseriagonorrhoeae,Aeromonaseucrenophila,Aeromonassalmonicida,Francisellatularensis,Corynebacteriumpseudotuberculosis,Citrobacterfreundii,Chlamydiapneumoniae,Haemophilussomnus,Brucellaabortus,Mycobacteriumintracellulare,Legionellapneumophila,Rhodococcusequi,Pseudomonasaeruginosa,Helicobactermustelae,Vibriocholerae,Bacillussubtilis,Erysipelothrixrhusiopathiae,Yersiniaenterocolitica,Rochalimaeaquintana, или Agrobacteriumtumerfacium.*

229. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-228, которая представляет собой аттенуированную бактерию или грамотрицательную бактерию.

230. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-229, которая представляет собой штамм Salmonella.

231. Иммуностимулирующая бактерия по п.230, которая представляет собой штамм Salmonellatyphimurium.

232. Иммуностимулирующая бактерия по п.230 или 231, где немодифицированная сальмонелла представляет собой штамм дикого типа.

233. Иммуностимулирующая бактерия по п.230 или 231, отличающаяся тем, что немодифицированный штамм Salmonella является аттенуированным.

234. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-233, отличающаяся тем, что иммуностимулирующая бактерия получена из штамма AST-100 (VNP20009 или YS1646), или штамма ATCC 14028, или штамма, обладающего всеми идентифицирующими характеристиками штамма ATCC 14028.

235. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 227-233, представляющая собой ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-) и pagP-.

236. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-235, где бактерия кодирует и экспрессирует ген устойчивости к уничтожению комплемента (rck).

237. Иммуностимулирующая бактерия по п.236, где ген rck представляет собой ген rckSalmonella.

238. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-237, которая при внутривенном введении в терапевтической дозе индуцирует менее 150 пг/мл каждого из сывороточного IL-6, сывороточного TNF-альфа и сывороточного IL-10 при измерениях. через 7 дней после лечения.

239. Иммуностимулирующая бактерия, которая при внутривенном введении в терапевтической дозе индуцирует менее 150 пг/мл каждого из сывороточного IL-6, сывороточного TNF-альфа и сывороточного IL-10 при измерении через 7 дней после лечения.

240. Иммуностимулирующая бактерия по п.238 или 239, где доза составляет 1×10^{8} КОЕ (колониеобразующие единицы).

241. Иммуностимулирующая бактерия по п.238 или 239, отличающаяся тем, что доза составляет $1x10^{8} - 1x10^{9}$ КОЕ.

242. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, которая кодирует терапевтический продукт и которая модифицирована для кодирования и экспрессии гена устойчивости к уничтожению комплемента (rck), при этом бактерия дикого типа не кодирует rck.

243. Иммуностимулирующая бактерия по п.242, которая представляет собой штамм E.coli.

244. Средство доставки, кодирующее укороченную костимулирующую молекулу с полной или частичной делецией цитоплазматического домена, для

экспрессии на антиген-презентирующей клетке (APC), где продукт укороченного гена способен к конститутивной иммуностимулирующей передаче сигнала Т-клетке через участие костимулирующего рецептора и неспособен подавать контррегуляторный сигнал на APC из-за удаленного цитоплазматического домена.

245. Средство доставки по п.244, отличающееся тем, что костимулирующая молекула представляет собой 4-1BBL, CD80, CD86, CD27L, B7RP1 или OX40L или их вариант с делетированным или укороченным цитоплазматическим доменом и/или мутациями, придающими правильную ориентацию белка при экспрессии в клетке.

246. Средство доставки по п.244 или п.245, которое представляет собой иммуностимулирующую бактерию, экзосому, наночастицу, онколитический вирус или клетку.

247. Средство доставки по любому из пп.244-246, которое представляет собой клетку.

248. Средство доставки по п.247, где клетка представляет собой стволовую клетку.

249. Средство доставки по п.248, где стволовая клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC).

250. Средство доставки по п.249, где MSC генетически модифицированы для экспрессии комбинации иммуномодулирующих цитокинов.

251. Средство доставки по п.250, отличающееся тем, что цитокины представляют собой интерлейкин 12 (IL-12) и интерлейкин 21 (IL-21).

252. Выделенная клетка, содержащая средство доставки по любому из пп.244-251.

253. Выделенная клетка, содержащая иммуностимулирующую бактерию по любому из пп.26-243.

254. Клетка по п.252 или 253, которая представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, опухолевую клетку или первичную клеточную линию.

255. Клетка по п.254, которая представляет собой гемопоэтическую клетку.

256. Клетка по п.255, которая представляет собой Т-клетку.

257. Клетка по любому из пп. 252-256, полученная exvivo путем инфицирования клетки средством доставки или иммуностимулирующей бактерией.

258. Клетка по любому из пп. 252-254, представляющая собой стволовую клетку неэмбрионального происхождения.

259. Клетка по любому из пп. 252-254, где клетка представляет собой стволовую клетку.

260. Клетка по п.259, где стволовая клетка представляет собой мезенхимальную стволовую клетку (MSC).

261. Клетка по п.260, где MSC генетически модифицированы для экспрессии комбинации иммуномодулирующих цитокинов.

262. Клетка по п.261, где цитокины представляют собой интерлейкин 12 (IL-12) и интерлейкин 21 (IL-21).

263. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 25-243, или средство доставки по любому из пп. 244-251, или клетку по любому из пп. 252-262 в фармацевтически приемлемом носителе.

264. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуностимулирующую бактерию по п.84 в фармацевтически приемлемом носителе.

265. Фармацевтическая композиция по п.263 или 264, приготовленная для введения без разбавления.

266. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 263-265, составленная для системного введения.

267. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 263-266, приготовленная для парентерального введения.

268. Фармацевтическая композиция по п.267, приготовленная для внутривенного введения.

269. Фармацевтическая композиция по п.267, приготовленная для внутриопухолевого введения.

270. Фармацевтическая композиция по п.267, приготовленная для внутрибрюшинного введения.

271. Фармацевтическая композиция по п.266, приготовленная для перорального введения.

272. Способ лечения рака, который включает солидную опухоль или гемобластоз у субъекта, включающий введение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 26-243, или средства доставки по любому из пп. 244-251, или клетки по любому из пп. по любому из пп. 252-262 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 263-271.

273. Применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 26-244, или средства доставки по любому из пп. 244-251, или клетки по любому из пп. 252-262, или фармацевтической композиции по любому из пп. 263-271, для лечения рака, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у субъекта.

274. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 26-244, или средство доставки по любому из пп. 244-251, или клетка по любому из пп. 252-262, или фармацевтическая композиция по любому из пп. 263-271 для применения для лечения рака, который включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование у субъекта.

275. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, средство доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-274, где субъектом является человек.

276. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, средство доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-275, где рак включает солидную опухоль.

277. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, средство доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-275, где рак включает гематологическое злокачественное новообразование.

278. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, средство доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-277, где лечение включает комбинированную терапию, при которой вводят второй противораковый агент или лечение.

279. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, средство доставки, клетка или фармацевтическая композиция по п. 278, где второе противораковое средство или лечение вводят до, одновременно, после или периодически с иммуностимулирующей бактерией, средством доставки, клеткой или фармацевтической композицией.

280. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, средство доставки, клетка или фармацевтическая композиция по п.278 или 279, где второе противораковое средство или лечение представляет собой иммунотерапию.

281. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, средство доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-280, где введение иммуностимулирующей бактерии, носителя для доставки, клетки или фармацевтической композиции осуществляется парентерально.

282. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, средство доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-280, где введение иммуностимулирующей бактерии, носителя для доставки, клетки или фармацевтической композиции осуществляется перорально, ректально или аэрозолем в легкое или внутри опухоли.

283. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, средство доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-280, где введение иммуностимулирующей бактерии, носителя для доставки, клетки или фармацевтической композиции осуществляется внутривенно, внутримышечно или подкожно.

284. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-283, где рак выбран из: лейкемии, лимфома; рак желудка; и рак молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичников, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, костей, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейка матки и печень.

285. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по п. 280, где иммунотерапия включает введение антитела к PD-1, или к PD-L1, или к CTLA-4, или их антигенсвязывающие части или формы.

286. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-285, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой виды Salmonella, Shigella, Listeria или E. coli.

287. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-286, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой вид Salmonella.

288. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-287, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой штамм Salmonellatyphimurium.

289. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-288, где введение иммуностимулирующей бактерии осуществляется внутрибрюшинным или внутриопухолевым введением.

290. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-289, где у субъекта имеется метастатический рак.

291. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-290, включающий введение второго противоракового лечения, где второе лечение выбрано из анти-PD-1, анти- -CTLA-4, анти-PD-L1, анти-IL-6, анти-Siglec-15, анти-VEGF, анти-CD73 и анти-CD38 антитела или их антигенсвязывающие части или формы.

292. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-291, включающий введение второго или дополнительного противоракового лечения, где второе или дополнительное лечение выбраны из поли(ингибитор АДФ-рибозы) полимеразы (PARP), ингибитор гистондеацетилазы (HDAC), химиотерапевтическое средство, антитело к EGFR, CAR-T-клетка, антитело к Her2, антитело к мезотелину и антитело к антигену созревания B-клеток (BCMA).

293. Способ, применение, иммуностимулирующая бактерия, носитель для доставки, клетка или фармацевтическая композиция по любому из пп. 272-292, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин-(fliC -/fljB-) и pagP-.

294. Способ выбора субъекта для лечения иммуностимулирующей бактерией по любому из пп. 26-244, или средства доставки по любому из пп. 244-251, или клетки по любому из пп. 252-262, или фармацевтической композиции по любому из пп. по любому из пп. 263-271, включающий:

получение биологического образца от субъекта; и

обнаружение одного или нескольких биомаркеров, указывающих на фенотип опухоли с иммунным исключением или иммунодефицитом.

295. Способ по п. 294, отличающийся тем, что биомаркер выбран из:

тест, указывающий на инфильтрацию Т-клеток или инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в микроокружении опухоли;

биомаркер, который измеряет ограничение Т-клеток или TIL инвазивным краем опухоли и ядром опухоли;

уровень TIL;

аденозиновая сигнатура (Nanostring), указывающая на CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8, THBS1, IL-6, CSF-3, IL-1beta, CCL2, CCL3 или CCL7;

миелоидная сигнатура (Nanostring), указывающая на CXXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, IL-6 или PTGS2; и

уровни одного или нескольких из CD3, CD8, CD73, CD39, TNAP (тканеспецифическая щелочная фосфатаза), CD38, CD45, CD68, PD-L1 и FoxP3.

296. Способ мониторинга терапии иммуностимулирующей бактерией по любому из пп. 26-244, или средством доставки по любому из пп. 244-251, или

клеткой по любому из пп. 252-262, или фармацевтической композицией по любому из пп. 263-271, в том числе:

получение биологического образца от субъекта и обнаружение изменения уровня биомаркера, при этом:

увеличение биомаркерауказывающет на противораковый фенотип, указывает на эффективность лечения; и

биомаркеры представляют собой любые, которые указывают на цитокиновый ответ, активацию интерферона типа I или активацию интерферона типа II.

297. Способ по п. 296, отличающийся тем, что:

биомаркер выбран из уровня одного или нескольких CXCL10/IP-10, CXCL9, интерферона-альфа, интерферона-бета, провоспалительных сывороточных цитокинов IL-6, TNF-α, MCP-1 или CCL2, и белок, связывающий IL-18; и

повышение уровня одного или нескольких биомаркеров свидетельствует об эффективности лечения.

298. Способ по любому из пп.294-297, где биологический образец представляет собой биоптат опухоли или образец жидкости организма.

299. Способ по любому из пп. 294-298, дополнительно включающий введение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 26-244, или средства доставки по любому из пп. 244-251, или клетки по любому из пп. 252-262, или фармацевтической композиции по любому из пп. 263-271.

300. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING) из нечеловеческого вида, где нечеловеческий STING представляет собой белок с более низкой сигнальной активностью NF-kB по сравнению с человеческим STING и, возможно, более высокой активностью сигнального пути интерферона I типа (IFN) по сравнению с STING человека, где:

нечеловеческий белок STING модифицирован для включения мутации или мутаций таким образом, чтобы он обладал повышенной активностью или действовал конститутивно в отсутствие цитозольных нуклеиновых кислот;

мутации представляют собой вставки, делеции и/или замены аминокислот; и

белок STING может иметь делецию или нарушение сайта связывания TRAF6.

301. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING) вида, отличного от человека, или химерный белок STING человека и его модификации, содержащие одну или несколько мутаций, связанных с приобретением функции (GOF), которые приводят к конститутивной активации кодируемого белка STING и/или повышенной чувствительности, или повышенной аффинности, или связывания с эндогенными лигандами, при этом белок STING модифицирован посредством одной или нескольких вставок, делеций и замен аминокислоты или аминокислот;

белок STING обладает сигнальной активностью IFN-бета и ослабленной сигнальной активностью ядерного фактора каппа-легкой цепи-энхансера активированных В-клеток (NF-kB) по сравнению с STING человека; и

мутация или мутации приводят к повышенной активности STING или конститутивной активности в индукции продукции IFN-бета.

302. Модифицированный белок STING по п. 300 или п. 301, отличающийся тем, что белок STING человека содержит последовательность, указанную в любой из SEQIDNO: 305-309, или представляет собой его человеческий аллельный вариант с по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с последовательностью аминокислот, указанных в любой из SEQIDNO:305-309.

303. Модифицированный белок STING по любому из пп. 300-302, отличающийся тем, что белок STING представляет собой химеру, содержащую замену области С-концевого хвоста (CTT) в белке STING первого вида на CTT белка STING от второго вида;

белок STING второго вида имеет более низкую сигнальную активность NF-kB, чем сигнальная активность NF-kB человеческого STING; и

сайт связывания TRAF6 в CTT может быть удален.

304. Модифицированный белок STING по любому из пп.300-303, отличающийся тем, что мутация или мутации являются любыми, которые соответствуют мутациям, связанным с аутовоспалительным заболеванием STING-ассоциированной васкулопатией (SAVI).

305. Модифицированный белок-стимулятор генов интерферона (STING), который представляет собой химеру, включающую замену области CTT (C-концевой хвост) в белке STING первого вида на CTT белка STING второго вида, в которой:

белок STING второго вида имеет более низкую сигнальную активность NF-kB, чем сигнальная активность NF-kB человеческого STING; и

сайт связывания TRAF6 в CTT может быть удален.

306. Модифицированный белок STING по любому из пп. 303-305, отличающийся тем, что белок STING человека содержит последовательность, указанную в любой из SEQIDNO: 305-309, или представляет собой его человеческий аллельный вариант с по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с последовательность аминокислот, указанная в любой из SEQIDNO:305-309.

307. Модифицированный белок STING по любому из пп. 303-306, отличающийся тем, что первый вид представляет собой человека, а второй вид выбран из тасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, кабана, летучей мыши, ламантина, хохлатого ибиса, латимерии, мыши и акулы-призрака.

308. Модифицированный белок STING по любому из пп.300-307, отличающийся тем, что сигнальная активность IFNI типа составляет по

меньшей мере или по меньшей мере примерно 30% от активности человеческого белка STING дикого типа.

309. Модифицированный белок STING по любому из пп. 300-308, отличающийся тем, что сигнальная активность NF-κB составляет менее 30%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5% активности дикого типа человеческой сигнальной активности STINGNF-κB.

310. Модифицированный белок STING по любому из пп. 300-309, отличающийся тем, что вид, отличный от человека, или второй вид выбран из тасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, кабана, летучей мыши, ламантина, хохлатого ибиса, латимерии, мыши, и акулы-призрака.

311. Модифицированный белок STING по любому из пп. 300-310, отличающийся тем, что модификация STING представляет собой мутацию или мутации, которые соответствуют, по ссылке и сопоставлению с STING человека, мутации, которая возникает при интерферонопатии, где последовательность человеческого STING, с которой осуществляется сравнение, указана в любой из SEQIDNO: 305-309.

312. Модифицированный белок STING по любому из пп. 300-311, который включает замену С-концевого хвоста (CTT) на CTT из белка STING, который имеет пониженную сигнальную активность NF-κB по сравнению с сигнальной активностью NF-κB человеческого STING.

313. Модифицированный белок STING по п.312, отличающийся тем, что замещающий CTT получен из белка STING тасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, кабана, летучей мыши, ламантина, хохлатого ибиса, латимерии, мыши или акулы-призрака.

314. Модифицированный белок STING по п.312, отличающийся тем, что замещающий CTT происходит от белка STING тасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, кабана, летучей мыши, ламантина,

хохлатого ибиса, латимерии, мыши или акулы-призрака, и он заменяет человеческий STINGCTT.

315. Модифицированный белок STING по п.313 или п.314, отличающийся тем, что замещающий CTT выбран из числа следующих видов и имеет последовательность: тасманский дьявол RQEEFAIGPKRAMTVTTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSLRTDGFSEQIDNO:371,

мартышка EEEEVTVGSLKTSEVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRSDLFSEQIDNO: 372,

Крупный рогатый скот EREVTMGSTETSVMPGSSVLSQEPELLISGLEKPLPLRSDVFSEQIDNO:373,

Кошка EREVTVGSVGTSMVRNPSVLSQEPNLLISGMEQPLPLRTDVFSEQIDNO:374,

Страус RQEEYTVCDGTLCSTDLSLQISESDLPQPLRSDCLSEQIDNO:375, кабан EREVTMGSAETSVVPTSSTLSQEPELLISGMEQPLPLRSDIFSEQIDNO:376,

Летучая мышь EKEEVTVGTVGTYEAPGSSTLHQEPELLISGMDQPLPLRTDIFSEQIDNO:377,

Ламантин EREEVTVGSVGTSVVPSPSSPSTSSLSQEPKLLISGMEQPLPLRTDVFSEQIDNO: 378,

Хохлатый ибис CHEEYTVYEGNQPHNPSTTLHSTELNLQISESDLPQPLRSDCFSEQIDNO:379,

Целакант

(вариант 1) QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKRQVCSEQIDNO:380,

Целакант

(вариант 2)

QKEEYFMSEQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKSGFSEQIDNO:381,

Акула-призрак

LTEYPVAEPSNANETDCMSEPHLMISDDPKPLRSYCPSEQIDNO: 383 и

Мышь

EKEEVTMNAPMTSVPPPSVLSQEPRLLISGMDQPLPLRTDLISEQIDNO:384,

или аллельные варианты каждой из этих последовательностей, имеющие по меньшей мере 98% идентичности последовательности.

316. Модифицированный белок STING по п.314 или 315, отличающийся тем, что CTT человека содержит последовательность EKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS (SEQIDNO:370) или представляет собой аллельный вариант, последовательность которого идентична по меньшей мере на 98%.

317. Модифицированный белок STING по любому из пп.305-316, отличающийся тем, что модифицированный белок STING представляет собой химеру, в которой CTT STING человека заменен на CTT STING тасманского дьявола.

318. Модифицированный белок STING по п. 317, отличающийся тем, что С-концевой хвост (CTT) STING тасманского дьявола содержит последовательность:

RQEEFAIGPKRAMTVTTSSTLSQEPQLLISGMEQPLSRTDGF (SEQIDNO:371) или представляет собой аллельный вариант, имеющий по меньшей мере 98% идентичности последовательности.

319. Модифицированный белок STING по любому из пп.300-318, включающий делецию или нарушение сайта связывания TRAF6.

320. Модифицированный белок STING по п.319, где белок STING представляет собой белок STING человека, а сайт связывания TRAF6 содержит аминокислотные остатки DFS на С-конце.

321. Модифицированный белок STING по любому из пп.300-320, содержащий модификацию, которая повышает сигнальную активность интерферона типа I или делает активность конститутивной в отсутствие цитозольных нуклеиновых кислот.

322. Модифицированный белок STING по п.321, отличающийся тем, что указанная модификация соответствует, на основании ссылки и сопоставления с STING человека, мутации, которая возникает при интерферонопатии, при этом белок STING человека имеет последовательность, указанную в любой из SEQIDNO: 305-309.

323. Модифицированный белок STING по любому из пп.300-322, отличающийся тем, что модификация представляет собой одну или несколько замен аминокислот, которые соответствуют одному или нескольким из S102P, V147L, V147M, N154S, V155M, G166E, C206Y, G207E, S102P/F279L, F279L, R281Q, R284G, R284S, R284M, R284K, R284T, R197A, D205A, R310A, R293A, T294A, E296A, R197A/D205A, S272A/Q273A,

R310A/E316A, E316A, E316N, E316Q, S272A, R293A/T294A/E296A, D231A, R232A, K236A, Q273A, S358A/E360A/S366A, D231A/R232A/K236A/R238A, S358A, E360A, S366A, R238A, R375A, и S324A/S326A соссылкойдлясравнениянапоследовательность STING человека, какуказано в любойиз SEQ ID NO:305-309.

324. Модифицированный белок STING по п.323, содержащий замену, соответствующую C206Y или R284G, со ссылкой для сравнения на последовательность человеческого STING, как указано в любой из SEQIDNO:305-309.

325. Модифицированный белок STING по п.324, содержащий замены, соответствующие N154S/R284G.

326. Модифицированный белок STING по п.300, который представляет собой белок STING тасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, кабана, летучей мыши, ламантина, хохлатого ибиса, латимерии, мыши или акулы-призрака.

327. Средство доставки, содержащее нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированный белок STING по любому из пп.300-326.

328. Средство доставки, содержащее нуклеиновые кислоты, кодирующие белок STING не относящегося к человеческому виду, при этом белок STING обладает сигнальной активностью IFN типа I и ослабленной сигнальной активностью NF-κB по сравнению с сигнальной активностью NF-κB человеческого STING.

329. Средство доставки по п.328, отличающееся тем, что белок STING человека содержит последовательность, указанную в любой из SEQIDNO: 305-309, или представляет собой его человеческий аллельный вариант с по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с последовательностью аминокислот. представленной в любой из SEQIDNO:305-309.

330. Средство доставки по п.328 или 329, отличающееся тем, что сигнальная активность IFNI типа составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно 30% сигнальной активности IFNI типа STING человека дикого типа.

331. Средство доставки по любому из пп. 327-330, отличающееся тем, что сигнальная активность белка STING нечеловеческого белка NF-κB составляет менее 30%, менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее. чем 5% сигнальной активности NF-κB человеческого STING.

332. Средство доставки по любому из пп.327-331, в котором нечеловеческий вид представляет собой тасманский дьявол, мартышку, крупный рогатый скот, кошку, страуса, кабана, летучую мышь, ламантина, хохлатого ибиса, целаканта, мышь или акулу-призрак.

333. Средство доставки по любому из пп.327-332, которое представляет собой клетку, экзосому, онколитический вирус или вирусный вектор, липосому или другой носитель на основе липидов или иммуностимулирующую бактерию.

334. Средство доставки по п.333, отличающееся тем, что средством доставки является клетка, которая представляет собой стволовую клетку или иммунную клетку.

335. Средство доставки по п.333, отличающееся тем, что средством доставки является иммуностимулирующая бактерия по любому из пп.26-243.

336. Средство доставки по п.335, отличающееся тем, что иммуностимулирующая бактерия представляет собой ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-) и pagP-.

337. Средство доставки по п.335, отличающееся тем, что иммуностимулирующая бактерия представляет собой ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-), pagP-, lppA- и lppB-.

338. Иммуностимулирующая бактерия, содержащая плазмиду, кодирующую модифицированный белок STING по любому из пп. 300-326, или кодирующую белок STING не относящегося к человеку вида, где кодируемый белок STING обладает сигнальной активностью IFNI типа и аттенуированнойNF-κB сигнальной активностью по сравнению с сигнальной активностью NF-κBSTING человека.

339. Иммуностимулирующая бактерия по п.338, представляющая собой ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин-, где бактерия дикого типа имеет флагеллы, и pagP-.

340. Иммуностимулирующая бактерия по п.338, представляющая собой ansB-, asd-, csgD-, purI-, msbB-, флагеллин- (fliC-/fljB-), где бактерия дикого типа имеет флагеллы, pagP-, lppA- , и lppB-.

341. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 338-340, отличающаяся тем, что вид, отличный от человека, выбран из тасманского дьявола, мартышки, крупного рогатого скота, кошки, страуса, кабана, летучей мыши, ламантина, хохлатого ибиса, латимерии, мыши и акулы-призрака.

342. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 338-341 или средство доставки по любому из пп. 295-297, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой грамотрицательную бактерию.

343. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 338-342 или средство доставки по любому из пп. 295-297, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой штамм Salmonella, Shigella, E. coli, Bifidobacteriae, Rickettsia, Vibrio, Listeria, Klebsiella. , Bordetella, Neisseria, Aeromonas, Francisella, Cholera, Corynebacterium, Citrobacter, Chlamydia, Haemophilus, Brucella, Mycobacterium, Mycoplasma, Legionella, Rhodococcus, Pseudomonas, Helicobacter, Bacillus или Erysipelothrix, или их аттенуированный штамм, или его модифицированный штамм любой из предыдущего списка бактериальных штаммов.

344. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 338-342 или средство доставки по любому из пп. 327-337, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой Rickettsiarickettsiae, Rickettsiaprowazekii, Rickettsiatsutsugamuchi, Rickettsiamooseri, Rickettsiasibirica, Bordetellabronchiseptica, Neisseriameningitidis. , Neisseriagonorrhoeae, Aeromonaseucrenophila, Aeromonassalmonicida, Francisellatularensis, Corynebacteriumpseudotuberculosis, Citrobacterfreundii, Chlamydiapneumoniae, Haemophilussomnus, Brucellaabortus, Mycobacteriumintracellulare, Legionellapneumophila, Rhodococcusequi, Pseudomonasaeruginosa, Helicobactersubtilerismustelae, Vibriochotilaerhusiopathiae, Yersiniaenterocolitica, Rochalimaeaquintana или Agrobacteriumtumerfacium или их аттенуированныйштамм,или его модифицированный штамм любого из предшествующего списка бактериальных штаммов.

345. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 338-342 или средство доставки по любому из пп. 327-337, где иммуностимулирующая бактерия представляет собой аттенуированную бактерию.

346. Иммуностимулирующая бактерия по любому из пп. 338-342 или средство доставки по любому из пп. 327-337, где бактерия представляет собой штамм Salmonella.

347. Иммуностимулирующая бактерия или средство доставки по п.346, где бактерия представляет собой штамм Salmonellatyphimurium.

348. Иммуностимулирующая бактерия или средство доставки по п.346 или п.347, где немодифицированная сальмонелла представляет собой штамм дикого типа.

349. Иммуностимулирующая бактерия или средство доставки по п.346 или п.347, где немодифицированный штамм Salmonella является аттенуированным.

350. Иммуностимулирующая бактерия или средство доставки по любому из пп. 327-349, где иммуностимулирующая бактерия получена из штамма AST-100 (VNP20009 или YS1646), или штамма ATCC 14028, или штамма, обладающего всеми идентифицирующими характеристиками штамма ATCC. 14028.

351. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный белок STING по любому из пп. 300-326, или средство доставки по любому из пп. 327-337, или иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 338-350 в фармацевтически приемлемом носителе.

352. Выделенная клетка, содержащая модифицированный белок STING по любому из пп. 300-326, или средство доставки по любому из пп. 327-337, или иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 338-350, где клетка не является зиготой оплодотворенной яйцеклетки человека.

353. Клетка по п.352, которая представляет собой иммунную клетку, стволовую клетку, опухолевую клетку или первичную клеточную линию.

354. Выделенная клетка или культивируемые клетки, содержащие иммуностимулирующую бактерию по любому из пп.338-350.

355. Клетка по п.353 или п.354, которая представляет собой гемопоэтическую клетку.

356. Клетка по п.355, которая представляет собой Т-клетку.

357. Клетка по любому из пп.352-356, полученная exvivo путем инфицирования клетки иммуностимулирующей бактерией или средством доставки.

358. Клетка по п.357, которая представляет собой Т-клетку или гемопоэтическую клетку.

359. Способ лечения рака, включающий введение модифицированного белка STING по любому из пп. 300-326, или средства доставки по любому из пп. 327-337, или иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 348-350, или фармацевтической композиции по п. 351 или клетки по любому из пп. 352-358 субъекту с раком, который включает солидную опухоль или представляет собой гематологическое злокачественное новообразование.

360. Способ по п.359, где рак представляет собой солидную опухоль.

361. Способ по п.359 или 360, отличающийся тем, что рак является метастатическим.

362. Способ по любому из пп.359-361, где рак выбран из следующих: лимфома; лейкемия; рак желудка; и рак молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичников, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, костей, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.

363. Применение модифицированного белка STING по любому из пп. 300-326, или средства доставки по любому из пп. 327-337, или иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 338-350, или фармацевтической композиции по п. 351, или клетки по любому из пп. 352-358 для лечения рака.

364. Применение по п.363, где рак включает солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

365. Применение по п.363 или 364, где рак является метастатическим.

366. Применение по любому из пп.363-365, где рак выбран из следующих: лимфома; лейкемия; рак желудка; и рак молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы и шеи, толстой кишки, яичников, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, костей, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичек, шейки матки и печени.

367. Модифицированный белок STING, средство доставки, иммуностимулирующая бактерия, фармацевтическая композиция, клетка, способ или применение по любому из пп. 300-366, где нечеловеческий белок STING имеет последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQIDNOs: 349, 356 или 359-369, или представляет собой аллельный вариант белка STING каждого вида, имеющий не менее 98% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот, представленной в любой из SEQIDNO: 349, 356, или 359-369.

368. Модифицированный белок STING, средство доставки, иммуностимулирующая бактерия, фармацевтическая композиция, клетка, способ или применение по любому из пп. 300-366, где нечеловеческий белок STING или химера имеет последовательность аминокислот, указанную в любом из SEQIDNO: 350-355, 357 или 358.

369. Способ превращения макрофага M2 в M1 или M1-подобный фенотип, включающий введение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 26-

343 and 338-350 субъекту с состоянием, болезнью или нарушением обработанным повышением противоопухолевого иммунного ответа.

370. Применение иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 25-343 и 338-350 или иммуностимулирующей бактерии по любому из пп. 25-343 и 338-350 для применения для превращения макрофага M2 в макрофаг M1 или M1-подобноый фенотип у субъекта с раком, посредством чего индуцируется или усиливается противоопухолевый иммунный ответ.

371. Способ по п.369 или применение или бактерия по п.370, где заболевание, расстройство или состояние представляет собой рак, включающий солидную опухоль.

372. Выделенная клетка, содержащая иммуностимулирующую бактерию по любому из пп. 26-243 и 338-350.

373. Клетка по п.372, которая представляет собой иммунную клетку или стволовую клетку.

374. Клетка по п.373, где клетка представляет собой стволовую клетку, но не эмбриональную стволовую клетку.

375. Клетка по п.373, которая представляет собой Т-клетку.

376. Клетка по п.375, которая представляет собой CAR-T-клетку.

377. Способ лечения рака, включающий введение клетки по любому из пп.372-376.

378. Клетка по любому из пп.372-376 для применения для лечения рака.

379. Применение клетки по любому из пп.372-376 для лечения рака.

STING человека и Тасманского дьявола

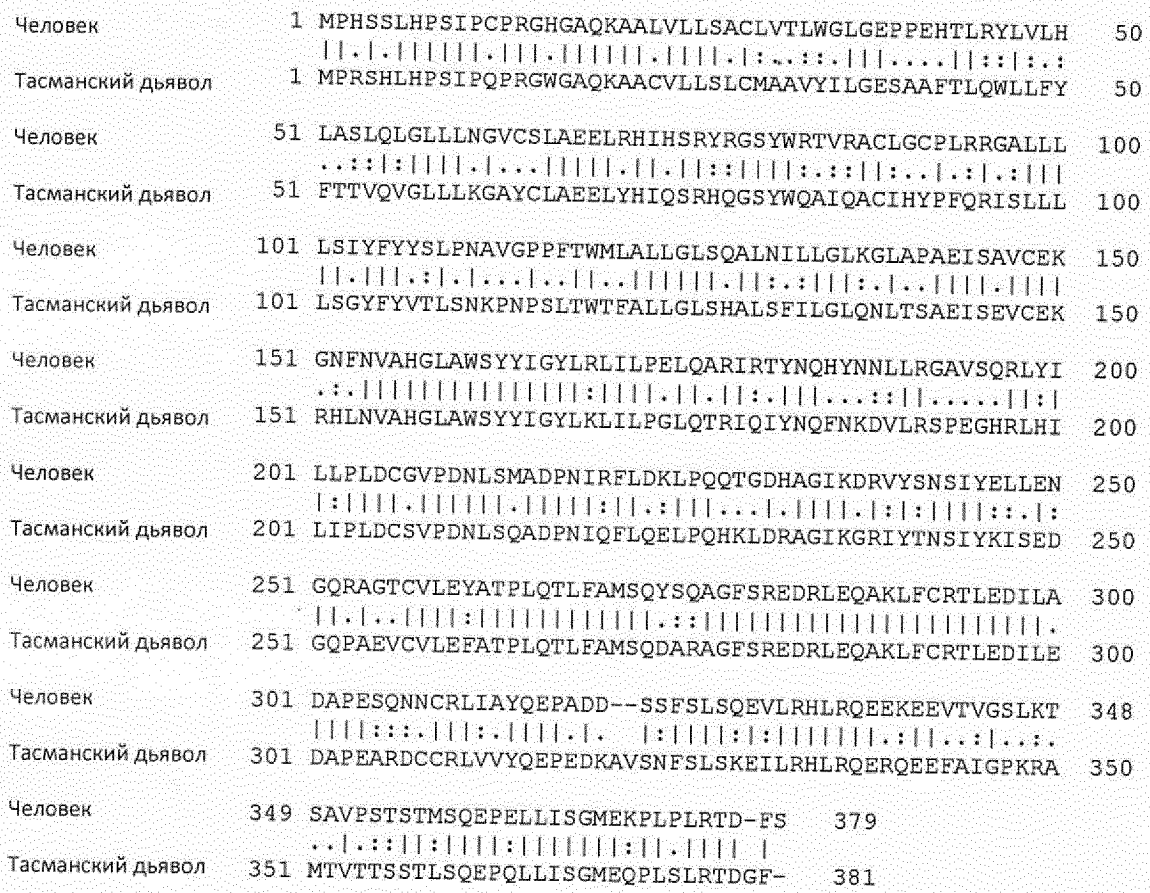


FIGURE 1

STING человека и мартышки

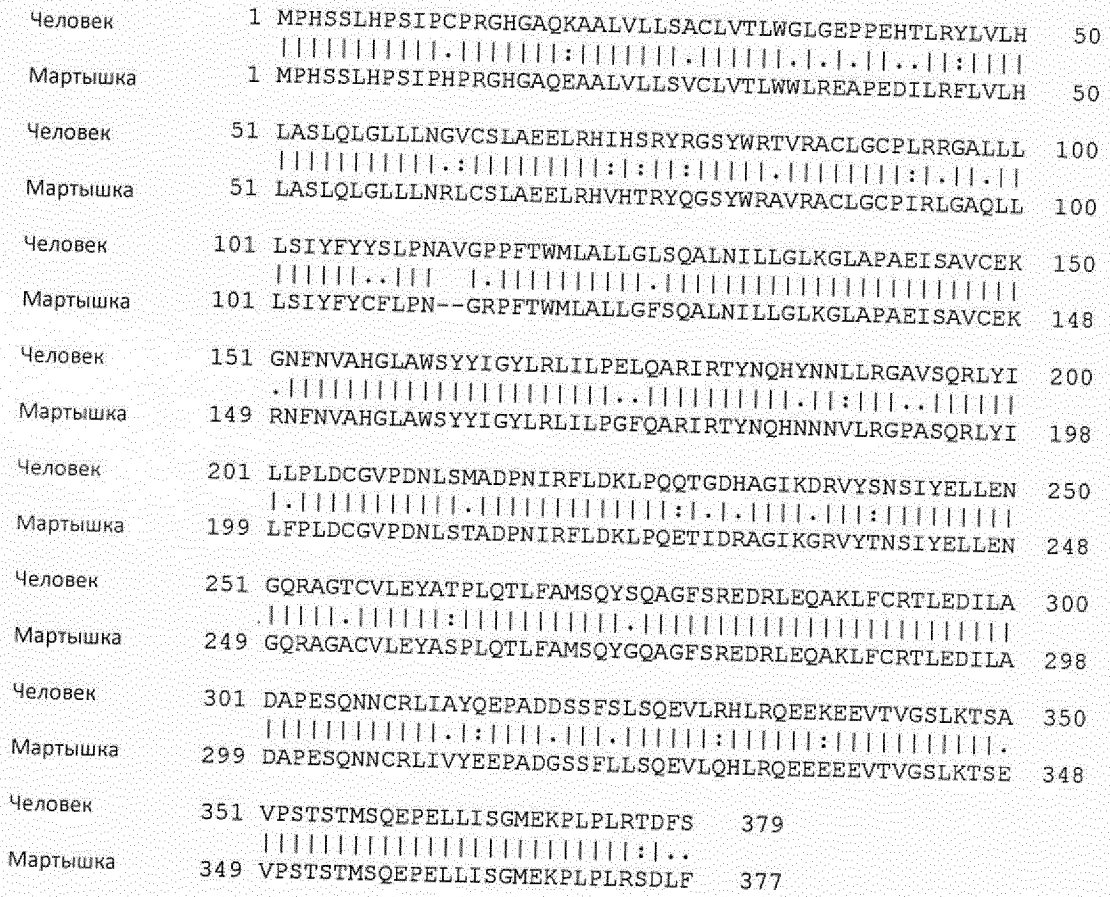


FIGURE 2

STING человека и крупного рогатого скота

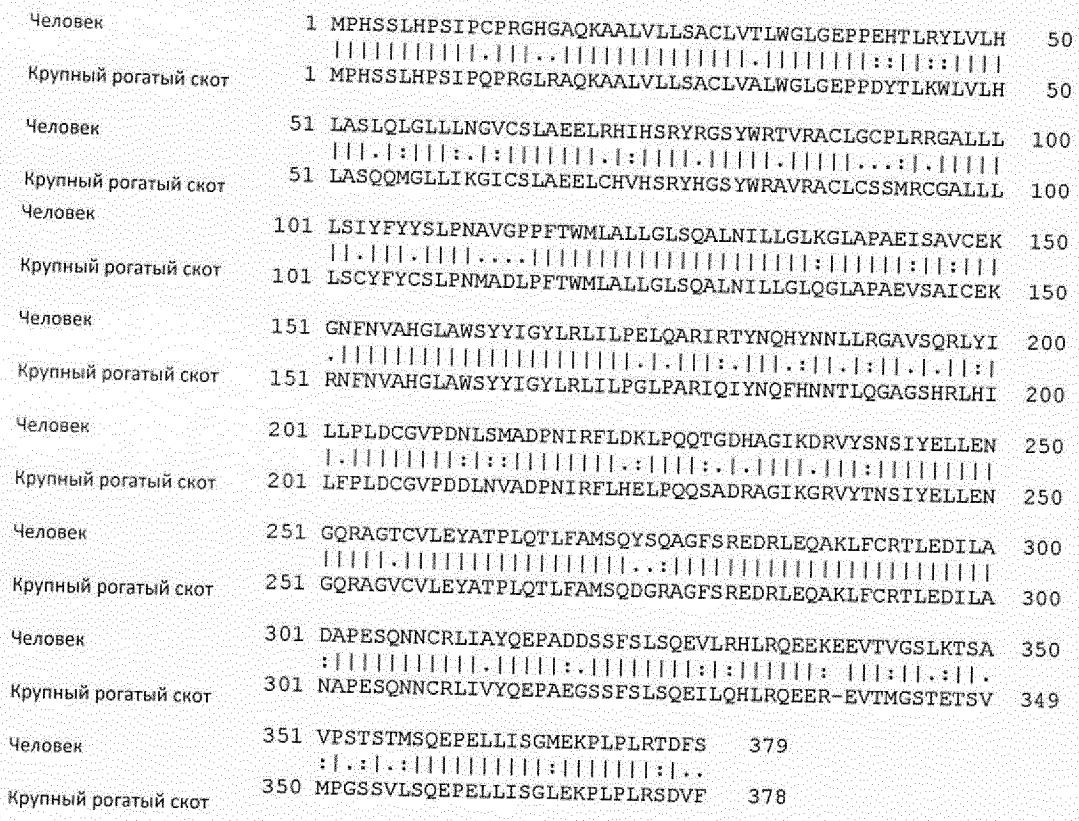


FIGURE 3

STING человека и кота

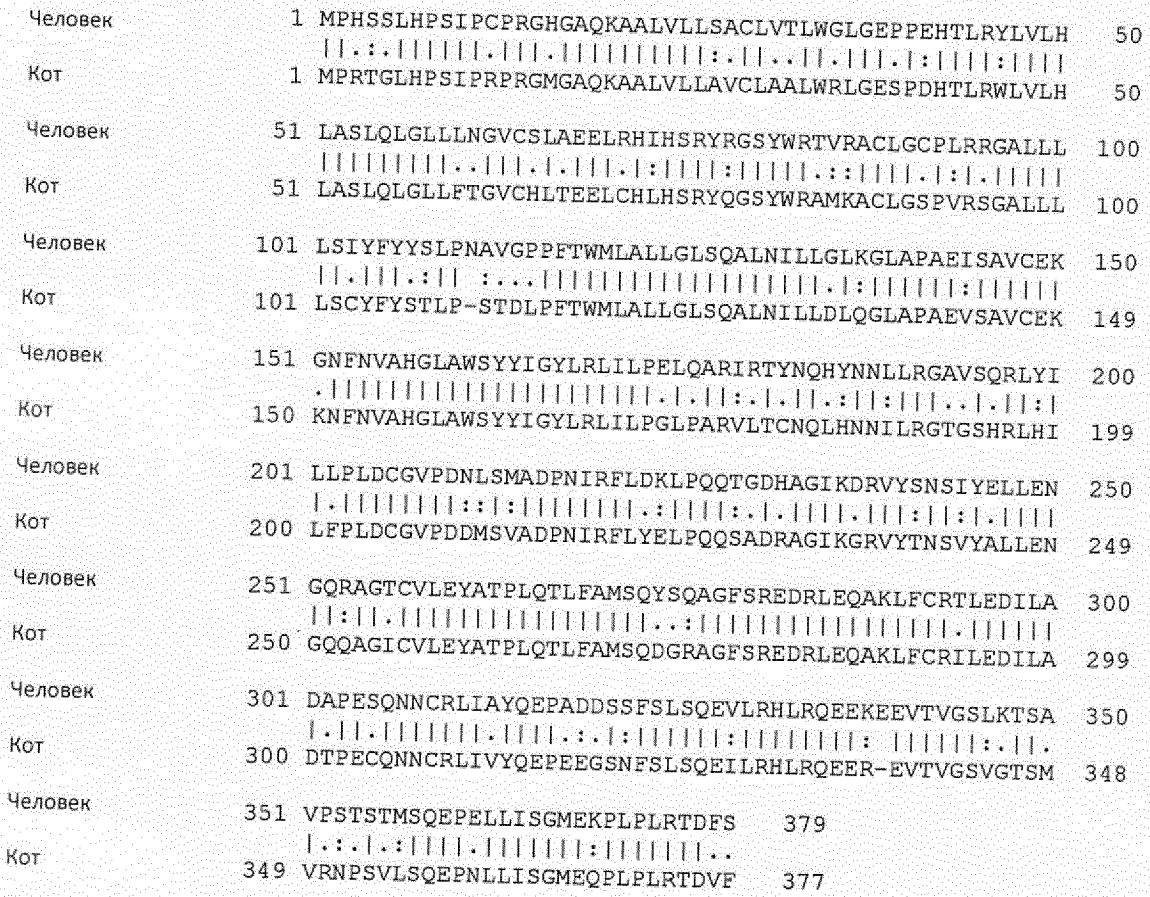


FIGURE 4

STING человека и страуса

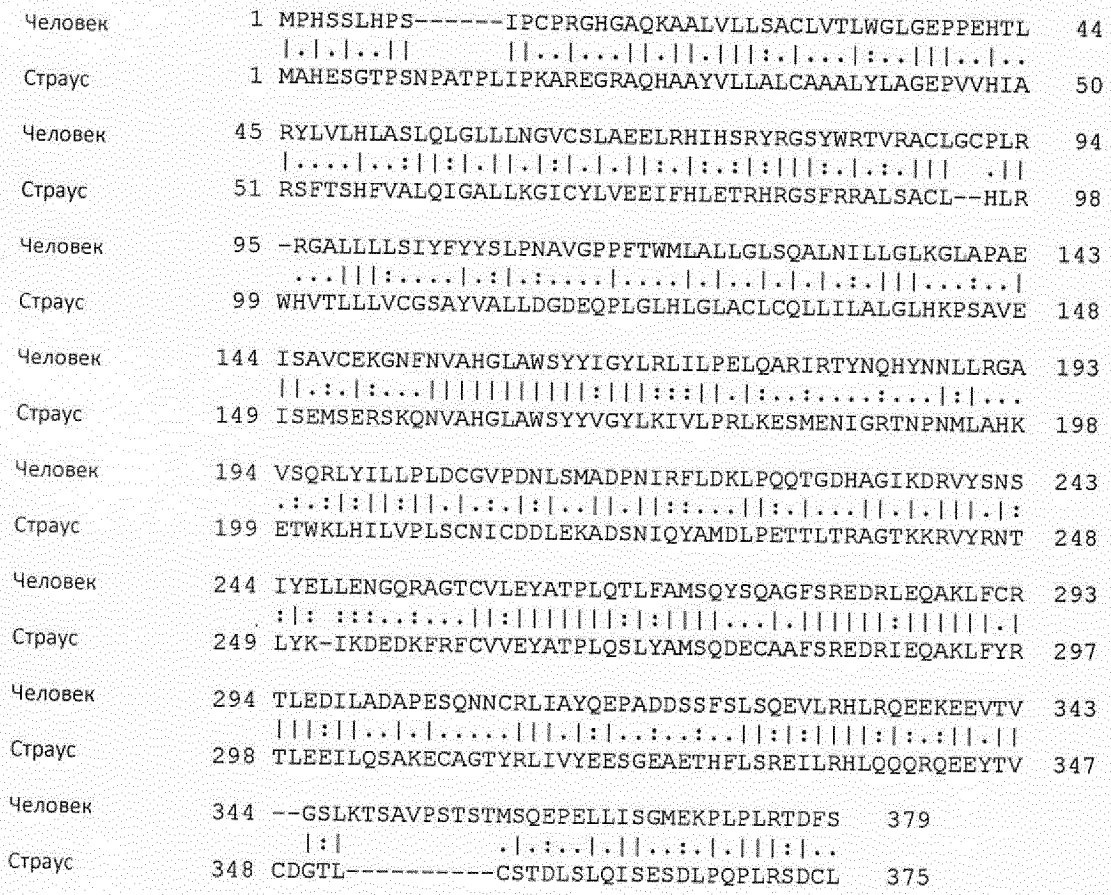


FIGURE 5

STING человека и хохлатого ибиса



FIGURE 6

STING человека и целаканта (вариант с SEQ ID NO:345): IG:

```
Человек       1 MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLH   50
                ....:...||.|||:.|.:.|..::::..|:.||.....::.|..:.||
Целакант      1 FGLQNMSAIIPQPRGNRANQMAYFIITVILMLLWIFRNIMDNVLEVIALH   50

Человек      51 LASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLL  100
                :..||...::.|:|:.|||:.|:..||.||||:.:.|||.........::
Целакант     51 ILLLQGAAIMKGICNFAEEVNHVQPRYGGSYWKALEACLNLSKYDVMKIV  100

Человек     101 LS--IYFYYSLPNAVGPPFTWMLALL--GLSQALNILLGLKGLAPAEISA  146
                .:  :::::|....|    .|.|.||  .|...||.:||:...:|.|:|.
Целакант    101 FAGVLWWHFSSSLFV----VWFLHLLVSCLCHLLNNVLGVLKPSPVEVSE  146

Человек     147 VCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQ  196
                :.|:....||||||||||:|||:|||||:.||::||..:.|||:...:.
Целакант    147 IYERNRIGVAHGLAWSYYLGYLKLVLPELEDRIKSYNVSHGNLLKHKETW  196

Человек     197 RLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYE  246
                ||:||||||.|.:.|||:..|.||.|||.|.:...:.||||.|.|.:|:|:
Целакант    197 RLHILLPLSCSIFDNLADVDSNIEFLDNLSELQINRAGIKGRSYKHSLYQ  246

Человек     247 LLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLE  296
                :|:..:|...|:|||||||::|..||:.:.|.|::|||||.|||.|||:
Целакант    247 VLDEDKRPHYCILEYATPLKSLLEMSKEASAEFTKEDRLEQTKLFYRTLK  296

Человек     297 DILADAPESQNNCRLIAY--QEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVG  344
                |||.::.|.:...||:.|  :|.:..|.| ||:|:||||.|::|||..:.
Целакант    297 DILDNSQECRGRFRLVIYDGREDSGKSHF-LSKELLRHLNQQQKEEYFMS  345

Человек     345 SLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS   379
                ........|||.:|.||:|:||..:.|..|:....
Целакант    346 EQTQPNSSSTSCLSTEPQLMISDTDAPHTLKRQVC   380
```

FIGURE 7

STING человека и данио

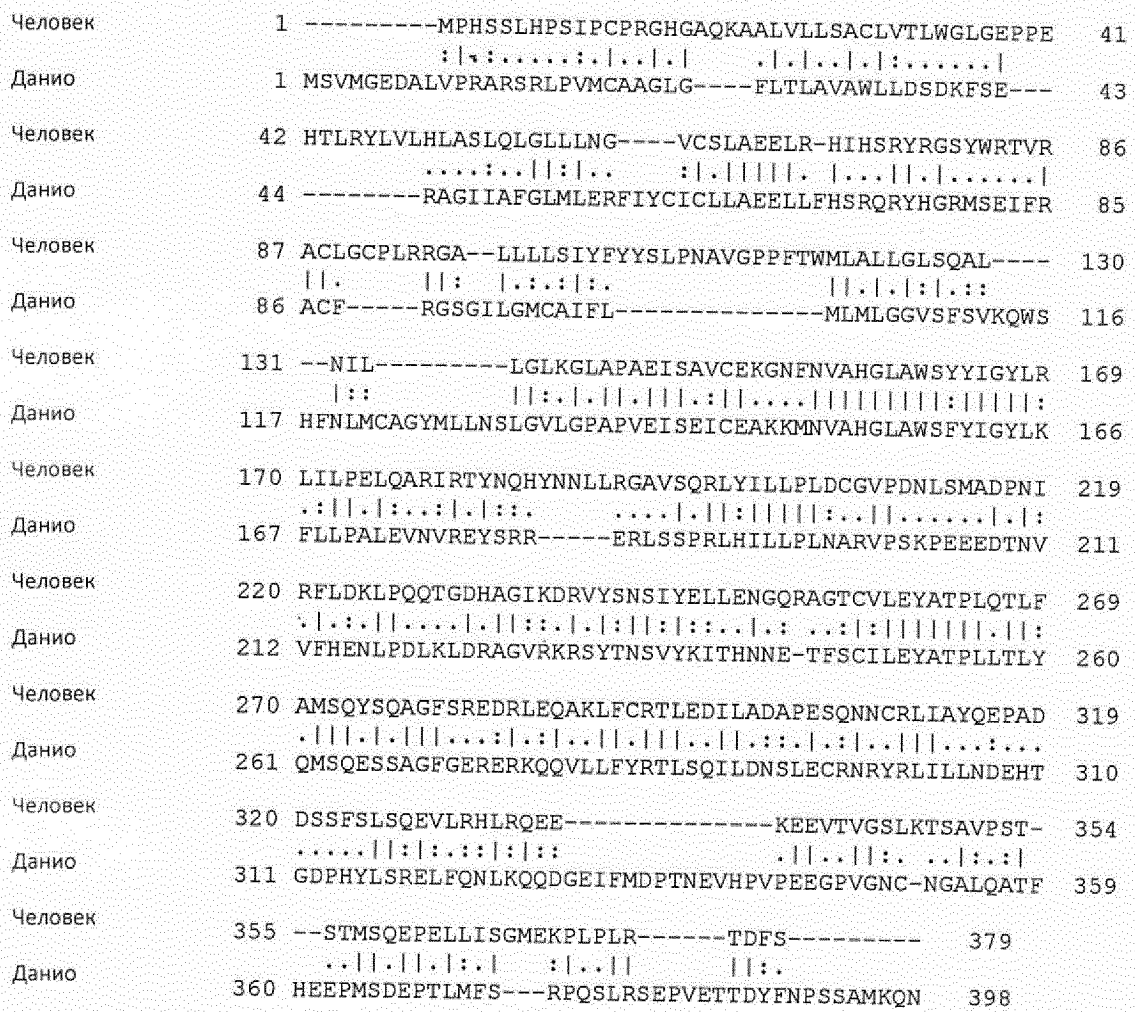


FIGURE 8

STING человека и кабана

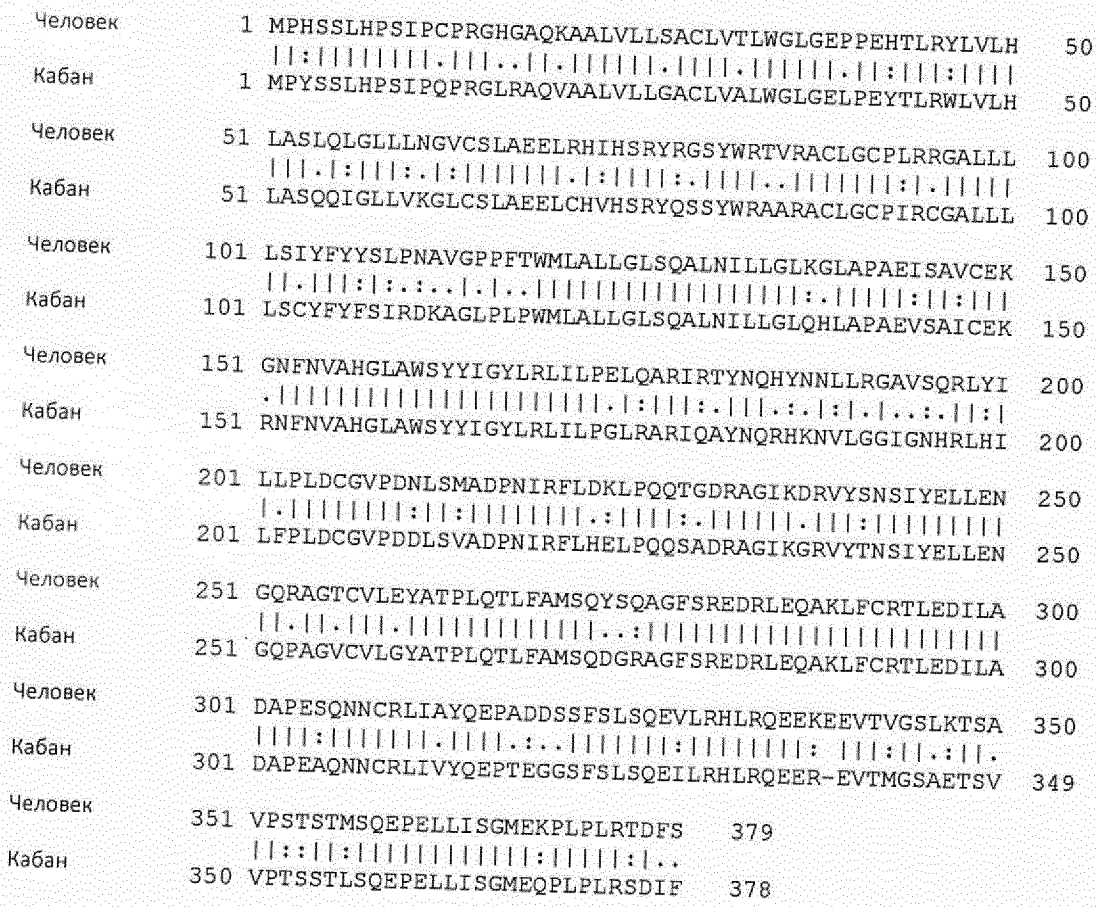


FIGURE 9

STING человека и летучей мыши

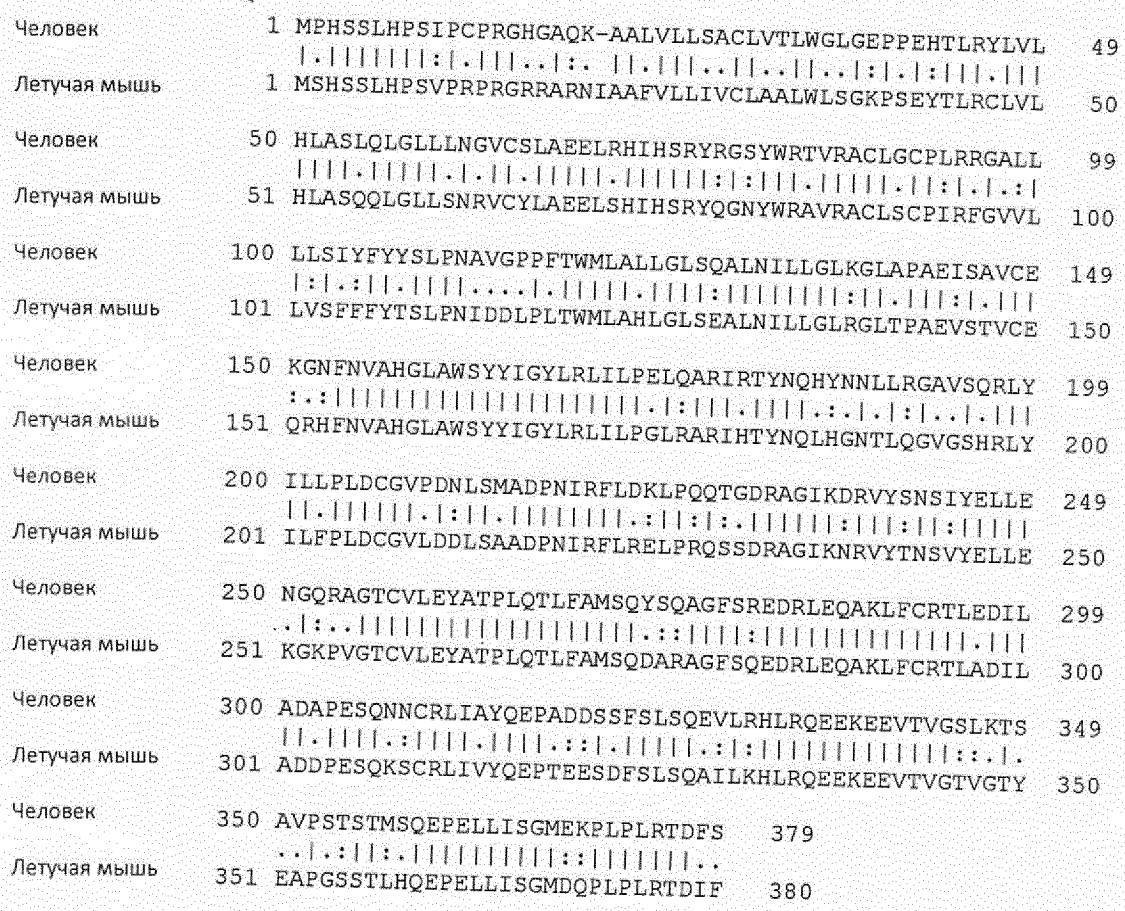


FIGURE 10

STING человека и ламантина



FIGURE 11

STING человека и акулы-призрака



FIGURE 12

STING человека и мыши

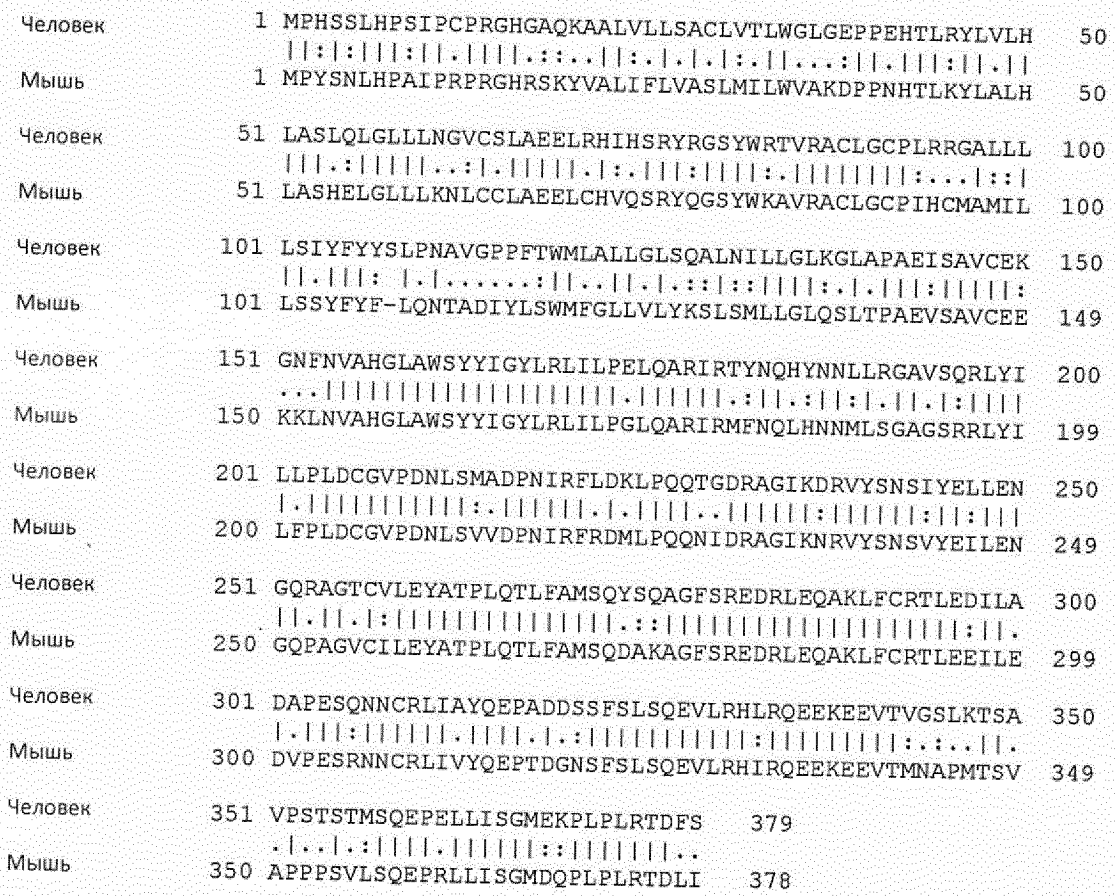
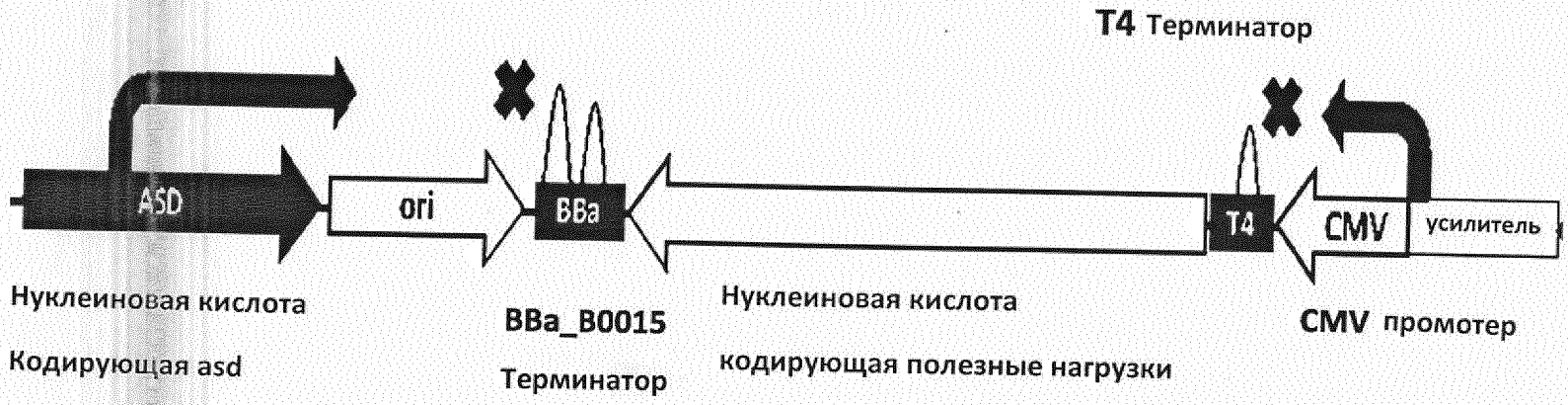


FIGURE 13



Плазмидная конструкция, в которой кассета экспрессии реверсируется на плазмиде и за ней следует BBa_B0015 терминатор и T4 терминатор внедряется за CMV промотером

FIGURE 14