

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390884** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.25

(22) Дата подачи заявки
2021.10.26

(51) Int. Cl. *C07K 14/34* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

(54) ДОСТАВКА БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ

(31) **20204007.7**

(32) **2020.10.27**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/079654**

(87) **WO 2022/090211 2022.05.05**

(71) Заявитель:
ТЗ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ АГ (CH)

(72) Изобретатель:

**Амштуц Марлиз, Иттиг Симон,
Каспер Кристоф, Дик Матиас С.,
Заупе Фальк (CH)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантным штаммам грамотрицательных бактерий и их применению в способе лечения рака у субъекта.

A1

202390884

202390884

A1

ДОСТАВКА БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным штаммам
5 грамотрицательных бактерий и их применению в способе лечения рака у субъекта.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

У бактерий выработались различные механизмы для впрыскивания белков
10 напрямую в клетки-мишени¹. Система секреции III типа (type III secretion system, T3SS), используемая такими бактериями, как *Yersinia*, *Shigella* и *Salmonella*², функционирует подобно микроинъектору, который инъецирует так называемые бактериальные эффектор-белки в клетки-хозяина. T3SS использовалась для
15 доставки гибридных пептидов и белков в клетки-мишени. Гетерологичные бактериальные эффекторы T3SS доставлялись в случае, когда исследуемая бактерия являлась трудно поддающейся воздействию генетических средств (такая как *Chlamydia trachomatis*). Часто репортерные белки сливали с предполагаемыми сигналами секреции T3SS, чтобы изучить требования для
20 T3SS-зависимой доставки белков, таких как аденилатциклаза *Bordetella pertussis*, ДГФР (дигидрофолатредуктаза) мыши или поддающаяся фосфорилированию метка. Доставку пептидов, главным образом, проводили с целью вакцинации. Пептиды включали вирусные эпитопы, бактериальные эпитопы (листериолизин O), а также пептиды, представляющие эпитопы
25 раковых клеток человека. В нескольких случаях функциональные эукариотические белки доставляли для модулирования клетки-хозяина, которое осуществляли с помощью нанотел³, ядерных белков (рекомбиназы Cre, MyoD)^{4,5} или IL10 и IL1ra⁶. Ни одна из вышеупомянутых систем не позволяет осуществлять доставку единичных белков, поскольку в каждом случае при этом
30 кодируются один или множество эндогенных эффекторных белков. Более того, применяемые векторы были сконструированы способом, не позволяющим осуществлять простое клонирование других фрагментов ДНК, кодирующих

предпочтительные белки, что препятствует широкому применению системы.

Подходы, обеспечивающие адресную доставку лекарственных средств, представляют большой интерес. Например, применяют антитела, распознающие структуры поверхности опухолевых клеток и, в оптимальном случае, селективно связывающиеся с опухолевыми клетками. Для улучшения механизма действия таких антител их можно конъюгировать с терапевтическими средствами или с липидными везикулами, наполненными лекарственными средствами. Одной из проблем при применении таких везикул является надлежащее высвобождение активного компонента. Еще более сложной является доставка терапевтических белков или пептидов, в особенности, при нацеливании на внутриклеточные механизмы. Было испробовано множество альтернативных способов решения данной проблемы доставки терапевтических белков в эукариотические клетки, которые включают «проникающие в клетку пептиды» (cell penetrating peptides, CPP) или подобные технологии, а также различные способы на основе наночастиц. Все из данных технологий характеризуются недостатками – низкой эффективностью и тем, что «груз», поглощенный клеткой посредством эндоцитоза, вероятно, в итоге будет расщеплен в лизосомах. Более того, конфликт между необходимостью обеспечения стабильности комплекса груз-носитель в организме человека и необходимостью его дестабилизации и высвобождения груза в клетке-мишени представляет собой проблему, характерную для таких технологий. Было показано, что множество бактерий реплицируются в злокачественных солидных опухолях при введении в отдаленной области, включая *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Bifidobacteria*. На сегодняшний день в клинической практике применяют только бациллу Кальмета-Герена (БЦЖ, полученную из *Mycobacterium bovis*). БЦЖ вводят для лечения поверхностного рака мочевого пузыря, хотя лежащий в основе молекулярный механизм остается в значительной степени неизвестным. Разработка штаммов бактерий, способных, например, доставлять груз, образованный внутри бактерии, к области его действия внутри клеток, таких как клетки рака, т.е. за пределами бактерии, остается важной задачей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным штаммам грамотрицательных бактерий и их применению в способе лечения рака у субъекта. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения

5 предложены рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий и их применение для лечения рака у субъекта, причем указанные рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий позволяют транслокацию различных эффекторов III типа, а также эффекторов IV типа, вирусных белков и, что наиболее важно, функциональных эукариотических белков в клетки рака, 10 например, в клетки злокачественной солидной опухоли.

В соответствии с настоящим изобретением предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, способный экспрессировать и секретировать по меньшей мере два различных гетерологичных белка, каждый в высоких 15 пиковых количествах, причем неожиданно максимальная активность каждого из указанных гетерологичных белков сохраняется после доставки в эукариотические клетки, например, в клетки рака, при сохранении полной способности бактериального штамма колонизировать опухоль и оптимизированной генетической стабильности.

20

В первом аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, содержащий i) первую полинуклеотидную молекулу, которая содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом 25 последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

ii) вторую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность 30 нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная

- последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- iii) третью полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором; и
- iv) четвертую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором,
- причем указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы расположены на векторе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, а указанная третья и указанная четвертая полинуклеотидные молекулы расположены на хромосоме указанного штамма грамотрицательных бактерий или на внехромосомном генетическом элементе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, при условии, что указанный внехромосомный генетический элемент не является вектором, на котором расположены указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы.
- В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, содержащий
- i) первую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- ii) вторую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в

- рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- 5 iii) третью полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из
- 10 бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором; и iv) четвертую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная
- 15 последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, причем указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы расположены на векторе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, а указанная третья и указанная четвертая
- 20 полинуклеотидные молекулы расположены на хромосоме указанного штамма грамотрицательных бактерий или на внехромосомном генетическом элементе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, при условии, что указанный внехромосомный генетический элемент не является вектором, на котором расположены указанная первая и указанная вторая
- 25 полинуклеотидные молекулы, для применения в качестве лекарственного средства.

- В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, содержащий
- 30 i) первую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная

последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

ii) вторую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

iii) третью полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором; и

iv) четвертую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, причем указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы расположены на векторе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, а указанная третья и указанная четвертая полинуклеотидные молекулы расположены на хромосоме указанного штамма грамотрицательных бактерий или на внехромосомном генетическом элементе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, при условии, что указанный внехромосомный генетический элемент не является вектором, на котором расположены указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы, для применения в способе лечения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту указанного рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, причем рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

Аналогично, в соответствии с настоящим изобретением предложен способ

лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту описанного выше рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, причем рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

- 5 Аналогично, в соответствии с настоящим изобретением предложено применение описанного выше рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий для производства лекарственного средства для лечения рака у субъекта.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1: Плазмида вирулентности *Yersinia enterocolitica* W227 - pYV. Плазмида вирулентности *Yersinia* (pYV) штамма W227 размером 69673 п.о. представлена в масштабе. Отмечены эффекторные белки T3SS, точка начала репликации и устойчивость к мышьяку (кодируемая генами *arsC*, *B*, *R* и *H*): I: точка начала репликации, II: *yopO*, III: *yopP*, IV: *yopQ*, V: *yopT*, VI: *sycT*, VII: *yopM*, VIII: *yopD*, IX: *yopB*, X: *sycD*, XII: *yopH*, XIII: *sycH*, XIV: *sycE*, XV: *yopE*, XVI: *yadA*, XVII-XX: *arsC*, *B*, *R* и *H*.

20 **Фиг. 2: Модифицированная плазмида вирулентности *Yersinia enterocolitica* W227 - pYV-051, - кодирующая YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека, кодируемые эндогенной плазмидой pYV в эндогенных сайтах *yopH* и *yopE*, соответственно.** pYV-051 размером 73073 п.о., представлена в масштабе. I: точка начала репликации (53...203), II : YopO нарушен (7409...8116), III: YopP нарушен (8597...8949), IV: YopQ (10692...11240), V: YopT нарушен (11761...12301), VI: *sycT* (12301...12693), VII: YopM нарушен (16270...17375), VIII: YopD (18629...19549), IX: YopB (19568...20773), X: *sycD* (20751...21257), XI: YopE₁₋₁₃₈ (с измененными кодонами) (45228...45641), XII: сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (45654...46742), XIII: *sycH* (46970...47395), XIV: *sycE* (49006...49398), XV: YopE₁₋₁₃₈ (49591...50004), XVI: CARD₂ RIG-I человека (50017...50754), XVII: *yadA* (60173...61636), XVIII: *arsC* (65122...65547), XIX: *arsB* (65560...66849), XX: *arsR* (66861...67215), XXI: *arsH*

(67301...67999).

Фиг. 3: Описание вектора pBad_Si2. (А) Карта вектора плазмиды для клонирования pBad_Si2, которую применяли для получения слитых конструкций с YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и YopE₁₋₁₃₈-слитый белок находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*. (В) Сайт множественного клонирования (MCS) расположен непосредственно после фрагмента yopE₁₋₁₃₈ на плазмиде pBad_Si2.

10 **Фиг. 4: Описание вектора pTZP-715.** Карта вектора среднекопийной плазмиды для клонирования pTZP-715, которую применяли для получения слитых конструкций с YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и YopE₁₋₁₃₈-слитый белок находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*. I: промоторная область araBAD (4...279), II: промотор PBAD (250...277), III: MCS I (317...331), IV: SycE
15 (339...731), V: YopE₁₋₁₃₈ (924...1337), VI: MCS II (1338...1361), VII: метка с-Мус (1368...1397), VIII: метка bHis (1413...1430), IX: стоп-кодон (1431...1433), X: устойчивость к хлорамфениколу (2110...2766), XI: точка начала репликации pBR322 (2924...3552).

20 **Фиг. 5: Описание вектора pTZP-716.** Карта вектора высококопийной плазмиды для клонирования pTZP-716, которую применяли для получения слитых конструкций с YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и YopE₁₋₁₃₈-слитый белок находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*. I: промоторная област
25 araBAD (4...279), II: промотор PBAD (250...277), III: MCS I (317...331), IV: SycE (339...731), V: YopE₁₋₁₃₈ (924...1337), VI: MCS II (1338...1361), VII: метка с-Мус (1368...1397), VIII: метка bHis (1413...1430), IX: стоп-кодон (1431...1433), X: устойчивость к хлорамфениколу (2110...2766), XI: точка начала репликации ColE1 (2924...3552).

30 **Фиг. 6: Описание вектора pTZP-717.** Карта вектора низкокопийной плазмиды для клонирования pTZP-717, которую применяли для получения слитых конструкций с YopE₁₋₁₃₈. Шаперон SycE и YopE₁₋₁₃₈-слитый белок находятся под контролем нативного промотора *Y. enterocolitica*. I: промоторная област
araBAD (4...279), II: промотор PBAD (250...277), III: MCS I (317...331), IV: SycE

(339...731), V: YopE₁₋₁₃₈ (924...1337), VI: MCS II (1338...1361), VII: метка с-Мус (1368...1397), VIII: метка 6His (1413...1430), IX: стоп-кодон (1431...1433), X: устойчивость к хлорамфениколу (2110...2766), XI: точка начала репликации pBR322 (2924...3552), XII: Rop (4124...4348).

5

Фиг. 7: Описание вектора pTZP-751, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека. Карта вектора

среднекопийного вектора pTZP-751, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека в одном опероне под контролем промотора

10

yopE. I: промоторная область araBAD (4...279), II: промотор PBAD (250...277),

III: MCS I (317...331), IV: SycE (339...731), V: YopE₁₋₁₃₈ (924...1337), VI: CARD₂

RIG-I человека (1350...2087), VII: YopE₁₋₁₃₈ (с измененными кодонами)

(2101...2514), VIII: cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (2527...3614), IX: метка с-Мус

(3626...3655), X: метка 6His (3671...3688), XI: устойчивость к хлорамфениколу

15

(4368...5024), XII: точка начала репликации pBR322 (5182...5810).

Фиг. 8: Доставка белка, индуцирующего IFN I типа, кодируемого вектором или эндогенной плазмидой вирулентности. Чувствительные к IFN

репортерные клетки B16F1 инфицировали *Y. enterocolitica* ΔyopHOPEMT: либо

20

контрольным штаммом, не доставляющим груз (III), либо кодирующим на

эндогенной плазмиде pYV IV: YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅), V:

YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂, либо на

среднекопийном векторе VI: YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека. Титрование

бактерий, добавленных к клеткам, проводили для каждого штамма, обозначено I

25

в виде множественности заражения (MЗ). Индукцию IFN I типа измеряли по

оптической плотности на 650 нм (II).

Фиг. 9: Доставка белка, индуцирующего IFN I типа, кодируемого вектором или эндогенной плазмидой вирулентности. Чувствительные к IFN

репортерные клетки макрофагов RAW инфицировали *Y. enterocolitica*

30

ΔyopHOPEMT: либо контрольным штаммом, не доставляющим груз (III), либо

кодирующим на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (IV),

либо кодирующим на эндогенной плазмиде pYV YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂

(V). Титрование бактерий, добавленных к клеткам, проводили для каждого

штамма, обозначено **I** в виде множественности заражения (МЗ). Индукцию IFN I типа измеряли по оптической плотности на 650 нм (**II**).

Фиг. 10: Доставка белка, индуцирующего IFN I типа, кодируемого вектором или эндогенной плазмидой вирулентности. Чувствительные к IFN репортерные клетки меланоцитов B16F1 инфицировали *Y. enterocolitica* Δ*uorHOPEMT*: либо контрольным штаммом, не доставляющим груз (**III**), либо кодирующим на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆) (**IV**), либо кодирующим на эндогенной плазмиде pYV YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (**V**), либо кодирующим как на среднекопийном векторе, так и на эндогенной плазмиде YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (**VI**). Титрование бактерий, добавленных к клеткам, проводили для каждого штамма, обозначено **I** в виде множественности заражения (МЗ). Индукцию IFN I типа измеряли по оптической плотности на 650 нм (**II**).

15

Фиг. 11: Доставка белка, индуцирующего IFN I типа, кодируемого вектором или эндогенной плазмидой вирулентности. Чувствительные к IFN репортерные клетки меланоцитов B16F1 инфицировали *Y. enterocolitica* Δ*uorHOPEMT*: либо контрольным штаммом, не доставляющим груз (**III**), либо кодирующим на эндогенной плазмиде pYV YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅), и дополнительно на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (**IV**), либо кодирующим как на эндогенной плазмиде pYV, так и дополнительно на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека (**V**). Титрование бактерий, добавленных к клеткам, проводили для каждого штамма, обозначено **I** в виде множественности заражения (МЗ). Индукцию IFN I типа измеряли по оптической плотности на 650 нм (**II**).

30

Фиг. 12: Доставка белка, индуцирующего IFN I типа, кодируемого вектором или эндогенной плазмидой вирулентности. Чувствительные к IFN репортерные клетки меланоцитов B16F1 (**A**), макрофагов RAW (**B**) или макрофагов THP-1 (**C**) инфицировали *Y. enterocolitica* Δ*uorHOPEMT*: либо контрольным штаммом, не доставляющим груз (**III**), либо кодирующим на эндогенной плазмиде pYV YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I

человека (RIG-I₁₋₂₄₅) (IV), либо кодирующим на эндогенной плазмиде pYV YopE_{1-138-cGAS} человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека, и дополнительно на среднекопийном векторе YopE_{1-138-cGAS} человека₁₆₁₋₅₂₂ (V), либо кодирующим на эндогенной плазмиде pYV YopE_{1-138-cGAS} человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека и дополнительно на среднекопийном векторе YopE_{1-138-cGAS} человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека (VI), либо кодирующим как на эндогенной плазмиде pYV, так и дополнительно на векторе YopE_{1-138-cGAS} человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека (VII). Титрование бактерий, добавленных к клеткам, проводили для каждого штамма, обозначено I в виде множественности заражения (MЗ).
 10 Индукцию IFN I типа измеряли по оптической плотности на 650 нм (II).

Фиг. 13: Колонизация опухоли штаммами, кодирующими белок, индуцирующий IFN I типа, на векторе или на эндогенной плазмиде вирулентности. Доставка человеческих cGAS₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I (RIG-I₁₋₂₄₅) и
 15 копияность вектора не изменяют бактериальные нагрузки солидных опухолей в модели рака молочной железы 4T1. Мышам с подкожными опухолями молочной железы 4T1 вводили в/в 5×10^6 КОЕ *Y. enterocolitica* Δ*yopHOPEMT*: либо контрольный штамм, не доставляющий груз (II), либо кодирующий на эндогенной плазмиде pYV YopE_{1-138-cGAS} человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I
 20 человека (III), либо кодирующий как на эндогенной плазмиде pYV, так и на среднекопийном векторе YopE_{1-138-cGAS} человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека (IV), либо кодирующий как на эндогенной плазмиде pYV, так и на высококопийном векторе YopE_{1-138-cGAS} человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека (V), либо кодирующий как на эндогенной плазмиде pYV, так и на низкокопийном
 25 векторе YopE_{1-138-cGAS} человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека (VI). Бактериальную нагрузку определяли как колониеобразующие единицы (КОЕ) на грамм опухоли (КОЕ/г) (I).

Фиг. 14: Экспрессия и секреция белков, индуцирующих IFN I типа, кодируемых низко-, средне- или высококопийным вектором. Экспрессия и
 30 секреция CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅) в зависимости от копияности вектора. Экспрессию в бактериях (I) или секрецию в супернатант (II) оценивали для *Y. enterocolitica* Δ*yopHOPEMT*: либо контрольного штамма, не доставляющего груз (III), либо кодирующего на среднекопийном векторе YopE₁₋

$_{138}$ -CARD₂ RIG-I человека (IV), либо кодирующего на высококопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (V), либо кодирующего на низкокопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (VI).

5 **Фиг. 15: Доставка белка, индуцирующего IFN I типа, кодируемого эндогенной плазмидой вирулентности и низко-, средне- или высококопийным вектором.** Чувствительные к IFN репортерные клетки B16F1 инфицировали *Y. enterocolitica* ΔyopHOPEMT: либо контрольным штаммом, не доставляющим груз (III), либо кодирующим на эндогенной плазмиде pYV YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅) и дополнительно на средне- (IV), высоко- (V) или низкокопийном (VI) векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека. Титрование бактерий, добавленных к клеткам, проводили для каждого штамма, обозначено I в виде множественности заражения (M3). Индукцию IFN I типа измеряли по оптической плотности на 650 нм (II).

15

Фиг. 16: Доставка белка, индуцирующего IFN I типа, кодируемого эндогенной плазмидой вирулентности и низко-, средне- или высококопийным вектором. Чувствительные к IFN репортерные клетки меланоцитов B16F1 (A), макрофагов RAW (B) или макрофагов THP-1 (C) инфицировали *Y. enterocolitica* ΔyopHOPEMT: либо контрольным штаммом, не доставляющим груз (III), либо кодирующим на эндогенной плазмиде pYV YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅) (IV), либо кодирующим на эндогенной плазмиде pYV YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека и дополнительно на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I. Титрование бактерий, добавленных к клеткам, проводили для каждого штамма, обозначено I в виде множественности заражения (M3). Индукцию IFN I типа измеряли по оптической плотности на 650 нм (II).

30 **Фиг. 17: Штамм для оптимальной доставки белка, индуцирующего IFN I типа, кодируемого эндогенной плазмидой вирулентности и вектором.** Доставка YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I (RIG-I₁₋₂₄₅), кодируемых эндогенной плазмидой pYV в эндогенных сайтах yopH и yopE, соответственно, и дополнительно среднекопийным вектором, на котором YopE₁₋

¹³⁸ -cGAS человека¹⁶¹⁻⁵²² и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I кодируются в одном опероне под контролем промотора уорЕ.

Фиг. 18: Доставка белков cGAS и CARD₂ RIG-I, индуцирующих IFN I типа, и ее действие на различные типы клеток. Доставка человеческих cGAS₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I (RIG-I₁₋₂₄₅) приводит к дифференциальной индукции передачи сигналов IFN I типа в меланоцитах B16F1 (A), глиобластоме человека LN-229 (B), макрофагах RAW мыши (C) или макрофагах THP-1 человека (D). Чувствительные к IFN репортерные клетки B16F1, RAW или THP-1 и клетки глиобластомы человека LN-229 инфицировали *Y. enterocolitica* ΔуорНОРЕМТ: либо контрольным штаммом, не доставляющим груз (III), либо кодирующим на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (IV), либо кодирующим на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека¹⁶¹⁻⁵²² (V). Титрование бактерий, добавленных к клеткам, проводили для каждого штамма, обозначено I в виде множественности заражения (МЗ). Индукцию IFN I типа измеряли по оптической плотности на 650 нм (II) в A, C и D, и с помощью ELISA IFN β в B, указана в пг/мл.

Фиг. 19: Доставка индуцирующих IFN I типа белков, кодируемых эндогенной плазмидой вирулентности и среднекопийным вектором. Доставка человеческих cGAS₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I (RIG-I₁₋₂₄₅) приводит к дифференциальной индукции передачи сигналов IFN I типа в В-клеточной лимфоме A20 (A) или Т-лимфоцитарных клетках Jurkat (B). A) Клетки лимфомы A20 мыши инфицировали *Y. enterocolitica* ΔуорНОРЕМТ: либо контрольным штаммом, не доставляющим груз (III), либо кодирующим на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (IV), либо кодирующим на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека¹⁶¹⁻⁵²² (V), либо кодирующим на pYV и среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека¹⁶¹⁻⁵²² (VI). B) Т-клетки Jurkat человека инфицировали *Y. enterocolitica* ΔуорНОРЕМТ: либо контрольным штаммом, не доставляющим груз (III), либо кодирующим на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека¹⁶¹⁻⁵²² (IV), либо кодирующим на pYV и среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека¹⁶¹⁻⁵²² (V). Титрование бактерий,

добавленных к клеткам, проводили для каждого штамма, обозначено **I** в виде множественности заражения (МЗ). Индукцию IFN I типа измеряли с помощью ELISA IFNb, в В указана в пг/мл (**II**).

5 **Фиг. 20: Генетическая стабильность колонизирующих опухоль штаммов бактерий, кодирующих белок, индуцирующий IFN I типа, на эндогенной плазмиде вирулентности.** Кодирование человеческих cGAS₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I (RIG-I₁₋₂₄₅) генетически стабильно при кодировании на эндогенной плазмиде вирулентности pYV *in vivo* в модели меланомы B16F10. Мышам с подкожными
10 опухолями B16F10 вводили в/в 1×10^6 КОЕ *Y. enterocolitica* Δ*урНОРЕМТ*, кодирующий на эндогенной плазмиде pYV YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека. Бактерии выделяли на 2 день после введения (животные 1 и 2) или на 4 день после введения (животные 3 – 10) и снимали реплику на селективную среду для оценки присутствия плазмиды pYV в % (**I**) или отсутствия
15 плазмиды pYV (**II**).

Фиг. 21: Генетическая стабильность колонизирующих опухоль штаммов бактерий, кодирующих белок, индуцирующий IFN I типа, на векторе и на эндогенной плазмиде вирулентности. По-видимому, кодирование
20 человеческих cGAS₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I (RIG-I₁₋₂₄₅) на среднекопийном векторе и эндогенной плазмиде вирулентности генетически более стабильно, чем кодирование на эндогенной плазмиде вирулентности pYV или векторе отдельно, в модели рака молочной железы EMT-6 *in vivo*. Мышам, имеющим подкожные опухоли EMT-6, вводили внутрь опухоли $7,5 \times 10^7$ КОЕ *Y. enterocolitica*
25 Δ*урНОРЕМТ*, кодирующего как на эндогенной плазмиде pYV, так и на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека. Бактерии выделяли на 1-й день после введения (животные 1 и 2) или на 2-й день после введения (животные 4 - 6) и снимали реплику на селективную среду для оценки присутствия в % как плазмиды pYV, так и среднекопийного вектора (**VI**),
30 присутствия только плазмиды pYV (**V**), присутствия только среднекопийного вектора (**IV**) или отсутствия как плазмиды pYV, так и среднекопийного вектора (**III**).

Фиг. 22: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6 дикого типа с п/к

аллотрансплантатом клеток меланомы **V16F10**. Мышам C57BL/6 дикого типа с п/к аллотрансплантатом клеток меланомы **V16F10** вводили внутрь опухоли **III: ФБР**, или $7,5 \times 10^7$ КОЕ **IV: *Y. enterocolitica dHOPEMT***, или **V: *Y. enterocolitica dHOPEMT***, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅), при этом оба белка кодируются эндогенной плазмидой pYV (в эндогенных сайтах yopH и yopE, соответственно), и дополнительно на среднекопийном векторе (на котором YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I кодируются в одном опероне под контролем промотора yopE). Внутриопухолевые инъекции начинали, когда опухоль достигала размера $61 (+/-22)$ мм³. День первой внутриопухолевой инъекции бактерий обозначали как день 0, лечение проводили в д0, д1, д2, д3, д6 и д9. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (**II: дни**) с помощью штангенциркуля. Указан средний объем опухоли (**I**) в мм³.

Фиг. 23: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6 дикого типа с п/к аллотрансплантатом клеток меланомы V16F10. Мышам C57BL/6 дикого типа с п/к аллотрансплантатом клеток меланомы **V16F10** проводили внутриопухолевую инъекцию **ФБР**. Внутриопухолевые инъекции начинали, когда опухоль достигала размера $61 (+/-22)$ мм³. День первой внутриопухолевой инъекции обозначали как день 0, лечение проводили в д0, д1, д2, д3, д6 и д9. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (**II: дни**) с помощью штангенциркуля. Указан объем опухоли отдельных животных (n = 15) (**I**) в мм³.

Фиг. 24: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6 дикого типа с п/к аллотрансплантатом клеток меланомы V16F10. Мышам C57BL/6 дикого типа с п/к аллотрансплантатом клеток меланомы **V16F10** проводили внутриопухолевую инъекцию $7,5 \times 10^7$ КОЕ ***Y. enterocolitica dHOPEMT***. Внутриопухолевые инъекции начинали, когда опухоль достигала размера $61 (+/-22)$ мм³. День первой внутриопухолевой инъекции обозначали как день 0, лечение проводили в д0, д1, д2, д3, д6 и д9. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (**II: дни**) с помощью штангенциркуля. Указан объем опухоли отдельных животных (n = 15) (**I**) в мм³.

Фиг. 25: Прогрессирование опухоли у мышей C57BL/6 дикого типа с п/к

аллотрансплантатом клеток меланомы **B16F10**. Мышам C57BL/6 дикого типа с п/к аллотрансплантатом клеток меланомы B16F10 проводили внутриопухолевую инъекцию $7,5 \times 10^7$ КОЕ *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅), при этом оба белка кодировались на эндогенной плазмиде pYV (в эндогенных сайтах уорН и уорЕ, соответственно), и дополнительно на среднекопийном векторе (на котором YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека кодируются в одном опероне под контролем промотора уорЕ). Внутриопухолевые инъекции начинали, когда опухоль достигала размера 61 (+/-22) мм³. День первой внутриопухолевой инъекции обозначали как день 0, лечение проводили в д0, д1, д2, д3, дб и д9. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней (**II**: дни) с помощью штангенциркуля. Указан объем опухоли отдельных животных (n = 15) (**I**) в мм³.

Фиг. 26: Доставка белков, индуцирующих ответ интерферона I типа, с помощью бактериальной T3SS – RIG-I. Доставка вариантов домена CARD RIG-I человека и мыши приводит к индукции IFN I типа в чувствительной к IFN линии репортерных клеток RAW. Репортерные клетки RAW инфицировали **I**: *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT или *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT, кодирующим на полученной из pBad_Si2 плазмиде **II**: YopE₁₋₁₃₈-домены CARD RIG-I человека₁₋₂₄₅, **III**: YopE₁₋₁₃₈-домены CARD RIG-I мыши₁₋₂₄₆, **IV**: YopE₁₋₁₃₈-домены CARD RIG-I мыши₁₋₂₂₉, **V**: YopE₁₋₁₃₈-домены CARD RIG-I мыши₁₋₂₁₈. Титрование бактерий, добавленных к клеткам (**VI**: указано в виде MЗ), проводили для каждого штамма, и оценивали стимуляцию IFN на основании активности секретируемой формы щелочной фосфатазы (**VII**: ОП₆₅₀), которая находится под контролем промотора I-ISG54, состоящего из индуцируемого IFN промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE.

Фиг. 27 А-Е: перечень штаммов, используемых в данной заявке.

30

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным штаммам грамотрицательных бактерий и их применению в способе лечения рака,

например, злокачественной солидной опухоли, у субъекта.

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

- 10 Термин «штамм грамотрицательных бактерий» в настоящем документе включает следующие бактерии: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia*
- 15 *pseudomallei*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter rodentium*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Edwardsiella tarda*, *Endozoicomonas elysicola*, *Erwinia amylovora*, *Escherichia albertii*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Mesorhizobium loti*, *Myxococcus xanthus*, *Pantoea agglomerans*, *Photobacterium*
- 20 *damselae*, *Photorhabdus luminescens*, *Photorhabdus temperate*, *Pseudoalteromonas spongiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium sp*, *Salmonella enterica* и другие *Salmonella sp*, *Shigella flexneri* и другие *Shigella sp*, *Sodalis glossinidius*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *Vibrio campellii*, *Vibrio caribbenthicus*, *Vibrio harvey*,
- 25 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio tubiashii*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*. Предпочтительными штаммами грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением являются штаммы грамотрицательных бактерий, которые относятся к
- 30 семействам *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae*. Штамм грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением обычно используют для доставки гетерологичных белков с помощью бактериальной T3SS в эукариотические клетки *in vitro* и/или *in vivo*, предпочтительно, *in vivo*.

Термин «рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий» в настоящем документе обозначает рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, генетически трансформированный полинуклеотидной конструкцией, такой как вектор. Вирулентность такого рекомбинантного штамма грамотрицательных

5 бактерий обычно аттенуирована в результате делеции бактериальных эффекторных белков, обладающих вирулентной активностью, которые транспортируются одним или несколькими бактериальными белками, которые являются частью аппарата системы секреции. Такие эффекторные белки доставляются аппаратом системы секреции в клетки-хозяева, в которых они

10 проявляют свою вирулентную активность в отношении различных белков хозяина и аппаратов клетки. Известно множество различных эффекторных белков, которые транспортируются различными типами систем секреции и демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей, модулирующих функции регуляторных молекул хозяина. Вирулентность

15 рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий в настоящем документе может быть дополнительно аттенуирована вследствие отсутствия сидерофора, в норме или иногда продуцируемого штаммом грамотрицательных бактерий, в результате чего штамм не продуцирует сидерофор, например, является

20 дефицитным по продукции сидерофора. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации используется рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, в котором отсутствует сидерофор, обычно или иногда продуцируемый штаммом грамотрицательных бактерий, в результате чего штамм не продуцирует сидерофор, например, является дефицитным по

25 продукции сидерофора, более предпочтительно штамм йерсинии (*Yersinia*), в частности, *Y. enterocolitica* MRS40 Δ_{уорН, О, Р, Е, М, Т}, *Y. enterocolitica* MRS40 Δ_{уорН, О, Р, Е, М, Т ΔHairpinI-virF} или *Y. enterocolitica* MRS40 Δ_{уорН, О, Р, Е, М, Т Δasd pYV-asd}, в которых отсутствует сидерофор, обычно или иногда продуцируемый штаммом грамотрицательных бактерий, в результате чего штамм не продуцирует сидерофор, например, является дефицитным по

30 продукции сидерофора. Наиболее предпочтительно используют штамм *Yersinia*, в частности *Y. enterocolitica* MRS40 Δ_{уорН, О, Р, Е, М, Т}, в котором отсутствует сидерофор, обычно или иногда продуцируемый штаммом грамотрицательных бактерий, в результате чего штамм не продуцирует сидерофор, например, является дефицитным по продукции сидерофора, в частности, является

дефицитным по продукции йерсиниабактина. *Y. enterocolitica* MRS40 ДуорН, О, Р, Е, М, Т, который является дефицитным по продукции йерсиниабактина, был описан в публикации WO02077249 и был депонирован 24^{ого} сентября 2001 года согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в бельгийских
 5 Согласованных коллекциях микроорганизмов (ВССМ); данному штамму был присвоен учетный номер LMG P-21013. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий предпочтительно не продуцирует сидерофор, например, является дефицитным по продукции сидерофора.

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

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

25 Сидерофоры включают гидроксамат, катехолат и сидерофоры со смешанными лигандами. На сегодняшний день несколько сидерофоров были одобрены для применения у людей, а именно для лечения перенасыщения железом.

30 Предпочтительными сидерофорами являются дефероксамин (также известный как десферриоксамин В, десфероксамин В, DFO-В, DFOA, DFB или Десферал), десферриоксамин Е, деферазирокс (Эксиджад, Десирокс, Дефриджет, Десифер) и деферипрон (Феррипрокс).

Термин «эндогенный белок, необходимый для роста», в настоящем документе обозначает белки рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, без

которых штамм грамотрицательных бактерий не может расти. Эндогенные белки, необходимые для роста, представляют собой, например, фермент, необходимый для продукции аминокислоты, фермент, участвующий в биосинтезе пептидогликана, фермент, участвующий в биосинтезе ЛПС (липополисахарида), фермент, участвующий в синтезе нуклеотида, или фактор инициации трансляции.

Термин «фермент, необходимый для продукции аминокислоты», в настоящем документе обозначает ферменты, которые связаны с продукцией аминокислот рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий и без которых штамм грамотрицательных бактерий не может расти. Ферменты, необходимые для продукции аминокислот, представляют собой, например, аспартат-бета-полуальдегид-дегидрогеназу (*asd*), глутаминсинтетазу (*glnA*), триптофанил-тРНК-синтетазу (*trpS*) или серин-гидроксиметил-трансферазу (*glyA*), или транскетолазу 1 (*tktA*), транскетолазу 2 (*tktB*), рибулозофосфат 3-эпимеразу (*rpe*), рибозо-5-фосфат-изомеразу А (*rpiA*), трансальдолазу А (*talA*), трансальдолазу В (*talB*), фосфорибозилпирофосфатсинтазу (*prs*), АТФ-фосфорибозилтрансферазу (*hisG*), бифункциональный белок биосинтеза гистидина HisIE (*hisI*), 1-(5-фосфорибозил)-5-[(5-фосфорибозиламино)метиленамино] имидазол-4-карбоксамидизомеразу (*hisA*), субъединицу HisH имидазолглицеролфосфатсинтазы (*hisH*), субъединицу HisF имидазолглицеролфосфатсинтазы (*hisF*), бифункциональный белок биосинтеза гистидина HisB (*hisB*), гистидинолфосфат-аминотрансферазу (*hisC*), гистидинолдегидрогеназу (*hisD*), 3-дегидрохинатсинтазу (*aroB*), 3-дегидрохинатдегидратазу (*aroD*), шикиматдегидрогеназу (NADP(+)) (*aroE*), шикиматкиназу 2 (*aroL*), шикиматкиназу 1 (*aroK*), 3-фосфошикимат 1-карбоксивинилтрансферазу (*aroA*), хоризматсинтазу (*aroC*), Р-белок (*pheA*), Т-белок (*tyrA*), аминотрансферазу ароматических аминокислот (*tyrB*), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатаьдолазу (*aroG*), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатаьдолазу (*aroH*), фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатаьдолазу (*aroF*), хинат/шикимат-дегидрогеназу (*ydiB*), АТФ-зависимый изофермент 6-фосфофруктокиназы 1 (*pfkA*), АТФ-зависимый изофермент 6-фосфофруктокиназы 2 (*pfkB*), фруктозо-бисфосфатаьдолазу класса 2 (*fbaA*), фруктозо-бисфосфатаьдолазу класса 1 (*fbaB*), триозофосфат-изомеразу (*tpiA*),

пируваткиназу I (pykF), пируваткиназу II (pykA), глицеральдегид-3-
 фосфатдегидрогеназу A (gapA), фосфоглицераткиназу (pgk), 2,3-
 бисфосфоглицерат-зависимую фосфоглицератмутазу (gpmA), 2,3-
 бисфосфоглицерат-независимую фосфоглицератмутазу (gpmM/yibO),
 5 предполагаемую фосфоглицератмутазу (ytjC/gpmB), енолазу (eno), D-3-
 фосфоглицератдегидрогеназу (serA), фосфосеринаминотрансферазу (serC),
 фосфосеринфосфатазу (serB), L-сериндегидратазу 1 (sdaA), L-сериндегидратазу
 2 (sdaB), L-треониндегидратазу катаболическую (tdcB), L-треониндегидратазу
 биосинтетическую (ilvA), L-сериндегидратазу (tdcG), серинацетилтрансферазу
 10 (cysE), цистеинсинтазу A (cysK), цистеинсинтазу B (cysM), бета-цистатионазу
 (malY), цистатионин бета-лиазу (metC), 5-метилтетрагидроптероилтриглутамат-
 гомоцистеин-метилтрансферазу (metE), метионинсинтазу (metH), S-
 аденозилметионинсинтазу (metK), цистатионин гамма-синтазу (metB),
 гомосерин O-сукцинилтрансферазу (metA), 5'-метилтиоаденозин/S-
 15 аденозилгомоцистеин-нуклеозидазу (mtnN), S-рибозилгомоцистеинлиазу (luxS),
 цистатион бета-лиазу, цистатион гамма-лиазу, серин-
 гидроксиметилтрансферазу (glyA), глицин-гидроксиметилтрансферазу (itaE),
 малую субъединицу 3-изопропилмалатдегидратазы (leuD), большую
 субъединицу 3-изопропилмалатдегидратазы (leuC), 3-
 20 изопропилмалатдегидрогеназу (leuB), L-треониндегидратазу биосинтетическую
 (ilvA), большую субъединицу изофермента 3 ацетолактатсинтазы (ilvI), малую
 субъединицу изофермента 3 ацетолактатсинтазы (ilvH), малую субъединицу
 изофермента 1 ацетолактатсинтазы (ilvN), малую субъединицу изофермента 2
 ацетолактатсинтазы (ilvM), кетол-кислотную редуктоизомеразу (NADP(+))
 25 (ilvC), дегидратазу дигидроксикислоты (ilvD), аминотрансферазу аминокислот с
 разветвленной цепью (ilvE), бифункциональную дегидрогеназу
 аспартокиназы/гомосерина 1 (thrA), бифункциональную дегидрогеназу
 аспартокиназы/гомосерина 2 (metL), 2-изопропилмалатсинтазу (leuA), глутамат-
 пируват-аминотрансферазу (alaA), аспартат-аминотрансферазу (aspC),
 30 бифункциональную дегидрогеназу аспартокиназы/гомосерина 1 (thrA),
 бифункциональную дегидрогеназу аспартокиназы/гомосерина 2 (metL), лизин-
 чувствительную аспартокиназу 3 (lysC), аспартат-полуальдегид-дегидрогеназу
 (asd), 2-кето-3-дезоксигалактонат-альдолазу (yagE), 4-гидрокси-
 тетрагидродипиколинатсинтазу (dapA), 4-гидрокси-тетрагидродипиколинат-

редуктазу (*dapB*), 2,3,4,5-тетрагидропиридин-2,6-дикарбоксилат N-сукцинилтрансферазу (*dapD*), сукцинил-диаминопимелат-десукцинилазу (*dapE*), диаминопимелат-эпимеразу (*dapF*), предполагаемую лиазу (*yjhH*), ацетилорнитин/сукцинилдиаминопимелат-аминотрансферазу (*argD*),
 5 цитратсинтазу (*gltA*), аконитатгидратазу В (*acnB*), аконитатгидратазу А (*acnA*), неохарактеризованную предполагаемую аконитатгидратазу (*ybhJ*), изоцитратдегидрогеназу (*icd*), аспартат-аминотрансферазу (*aspC*), глутамат-пируват-аминотрансферазу (*alaA*), большую цепь глутаматсинтазы [NADPH] (*gltB*), малую цепь глутаматсинтазы [NADPH] (*gltD*), глутаминсинтетазу (*glnA*),
 10 ацетилтрансферазу аминокислот (*argA*), ацетилглутаматкиназу (*argB*), N-ацетил-гамма-глутамил-фосфат-редуктазу (*argC*), ацетилорнитин/сукцинилдиаминопимелат-аминотрансферазу (*argD*), ацетилорнитин-деацетилазу (*argE*), цепь F орнитинкарбамоилтрансферазы (*argF*), цепь I орнитинкарбамоилтрансферазы (*argI*), аргининосукцинатсинтазу
 15 (*argG*), аргининосукцинатлиазу (*argH*), глутамат 5-киназу (*proB*), гамма-глутамилфосфатредуктазу (*proA*), пирролин-5-карбоксилатредуктазу (*proC*), орнитинциклодеаминазу, лейцин-тРНК лигазу (*leuS*), глутамин-тРНК лигазу (*glnS*), серин-тРНК лигазу (*serS*), бета-субъединицу глицин-тРНК лигазы (*glyS*), альфа-субъединицу глицин-тРНК лигазы (*glyQ*), тирозин-тРНК лигазу (*tyrS*),
 20 треонин-тРНК лигазу (*thrS*), альфа-субъединицу фенилаланин-тРНК лигазы (*pheS*), бета-субъединицу фенилаланин-тРНК лигазы (*pheT*), аргинин-тРНК лигазу (*argS*), гистидин-тРНК лигазу (*hisS*), валин-тРНК лигазу (*valS*), аланин-тРНК лигазу (*alaS*), изолейцин-тРНК лигазу (*ileS*), пролин-тРНК лигазу (*proS*), цистеин-тРНК лигазу (*cysS*), аспарагин-тРНК лигазу (*asnS*), аспартат-тРНК
 25 лигазу (*aspS*), глутамат-тРНК лигазу (*gltX*), триптофан-тРНК лигазу (*trpS*), бета-субъединицу глицин-тРНК лигазы (*glyS*), метионин-тРНК лигазу (*metG*), лизин-тРНК лигазу (*lysS*). Предпочтительные ферменты, необходимые для продукции аминокислоты, представляют собой *tktA*, *rpe*, *prs*, *argK*, *tyrB*, *argH*, *fbaA*, *gapA*, *pgk*, *eno*, *tdcG*, *cysE*, *metK*, *glyA*, *asd*, *dapA/B/D/E/F*, *argC*, *proC*, *leuS*, *glnS*, *serS*,
 30 *glyS/Q*, *tyrS*, *thrS*, *pheS/T*, *argS*, *hisS*, *valS*, *alaS*, *ileS*, *proS*, *cysS*, *asnS*, *aspS*, *gltX*, *trpS*, *glyS*, *metG*, *lysS*, более предпочтительные ферменты представляют собой *asd*, *glyA*, *leuS*, *glnS*, *serS*, *glyS/Q*, *tyrS*, *thrS*, *pheS/T*, *argS*, *hisS*, *valS*, *alaS*, *ileS*, *proS*, *cysS*, *asnS*, *aspS*, *gltX*, *trpS*, *glyS*, *metG*, *lysS*, наиболее предпочтительный фермент представляет собой *asd*.

Термины «штамм грамотрицательных бактерий, дефицитный по продукции аминокислоты, необходимой для роста», и «ауксотрофный мутант» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают штаммы

5 грамотрицательных бактерий, которые не могут расти при отсутствии по меньшей мере одной обеспечиваемой экзогенно незаменимой аминокислоты или ее предшественника. Аминокислота, по продукции которой штамм является дефицитным, представляет собой, например, аспартат, *мезо-2,6-*

10 *диаминопимелиновую кислоту, ароматические аминокислоты или лейцин-аргинин. Такой штамм может быть получен, например, в результате делеции гена аспартат-бета-полуальдегид-дегидрогеназы (Δ asd). Такой ауксотрофный мутант не может расти при отсутствии экзогенной мезо-2,6-*

диаминопимелиновой кислоты. Мутация, например, делеция гена аспартат-бета-полуальдегид-дегидрогеназы, является в настоящем документе

15 *предпочтительной для штамма грамотрицательных бактерий, дефицитного по продукции аминокислоты, необходимой для роста, в соответствии с настоящим изобретением.*

Термин «штамм грамотрицательных бактерий, дефицитный по продукции

20 *белков адгезии, связывающихся с поверхностью эукариотической клетки или внеклеточным матриксом», обозначает мутантные штаммы грамотрицательных бактерий, которые не экспрессируют по меньшей мере один белок адгезии по сравнению с белками адгезии, экспрессируемыми соответствующим штаммом дикого типа. Белки адгезии могут включать, например, протяженные*

25 *полимерные молекулы адгезии, такие как пили/фимбрии, или нефимбриальные адгезины. Фимбриальные адгезины включают пили 1 типа (такие как Fim-пили *E. coli* с адгезином FimH), P-пили (такие как Pap-пили с адгезином PapG из *E. coli*), пили 4 типа (такие как белок пилин, например, из *P. aeruginosa*) или карлин (белки Csg с адгезином CsgA из *S. enterica*). Нефимбриальные адгезины*

30 *включают тримерные адгезины-аутоотпортеры, такие как YadA из *Y. enterocolitica*, BraA (*B. pseudomallei*), Hia (*H. influenzae*), BadA (*B. henselae*), NadA (*N. meningitidis*) или UspA1 (*M. catarrhalis*), а также другие адгезины-аутоотпортеры, такие как AIDA-1 (*E. coli*), а также другие адгезины/инвазины, такие как InvA из *Y. enterocolitica* или интимин (*E. coli*),*

либо члены семейства Dg или семейства Afa (*E. coli*). Термины YadA и InvA в настоящем документе обозначают белки из *Y. enterocolitica*. Аутотранспортёр YadA ⁷ связывается с различными формами коллагена, а также фибронектина, в то время как инвазин InvA ⁸ связывается с β -интегринами в мембране эукариотической клетки. Если штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Y. enterocolitica*, то указанный штамм, предпочтительно, является дефицитным по InvA и/или YadA.

В настоящем документе термин «семейство *Enterobacteriaceae*» включает семейство грамотрицательных палочкообразных факультативно анаэробных бактерий, обнаруживаемых в почве, воде, растениях и животных, которые часто присутствуют у позвоночных в качестве патогенов. Бактерии данного семейства характеризуются подобной физиологией и демонстрируют консервативность функциональных элементов и генов соответствующих геномов. Также, будучи оксидаза-отрицательными, все члены данного семейства сбрасывают глюкозу, и большинство из них являются нитратвосстанавливающими.

Бактерии *Enterobacteriaceae* в соответствии с настоящим изобретением могут представлять собой любую бактерию из данного семейства и конкретно включают, без ограничения, бактерии следующих родов: *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia*, *Morganella*, *Providencia* или *Yersinia*. В более конкретных вариантах реализации бактерия относится к виду *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Erwinia amylovora*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus hauseri*, *Providencia alcalifaciens* или *Morganella morganii*.

Предпочтительно, штамм грамотрицательных бактерий выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Vibrio*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*,

Chromobacterium, Sodalis, Citrobacter, Edwardsiella, Rhizobiae, Aeromonas, Photorhabdus, Bordetella и *Desulfovibrio*, более предпочтительно, из группы, состоящей из родов *Yersinia, Escherichia, Salmonella* и *Pseudomonas*, наиболее предпочтительно, из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*, в частности, *Yersinia*.

Термин «*Yersinia*» в настоящем документе включает все виды *Yersinia*, включая *Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*.

Предпочтительным является *Yersinia enterocolitica*.

10

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

15

«Промотор» в настоящем документе обозначает последовательность нуклеиновой кислоты, которая регулирует экспрессию единицы транскрипции. «Область промотора» представляет собой регуляторную область, способную связываться с РНК-полимеразой в клетке и инициировать транскрипцию кодирующей последовательности, расположенной по ходу транскрипции (в направлении 3'). В области промотора находится сайт инициации транскрипции (который обычно определяют посредством картирования с помощью нуклеазы S1), а также белок-связывающие домены (консенсусные последовательности), отвечающие за связывание РНК-полимеразы, такие как предполагаемая область -35 и бокс Прибнова. Термин «функционально связанный» при описании

20

25

взаимодействия между двумя нуклеотидами, например, участками ДНК, обозначает ничто иное как то, что данные участки функционально связаны друг с другом и расположены на одном и том же фрагменте нуклеиновой кислоты.

30

Промотор функционально связан со структурным геном, если он контролирует транскрипцию гена и расположен на том же фрагменте нуклеиновой кислоты, что и ген. Обычно промотор является функциональным в указанном штамме грамотрицательных бактерий, т.е. промотор способен экспрессировать слитый белок в соответствии с настоящим изобретением, т.е. промотор способен экспрессировать слитый белок в соответствии с настоящим изобретением без дополнительного применения генетической инженерии или экспрессии

дополнительных белков. Более того, функциональный промотор в природе не должен быть контррегулируемым применительно к бактериальной T3SS.

5 Термин «внехромосомный генетический элемент» в настоящем документе обозначает генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся
эндогенно в штамме грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением, такой как плаزمид вирулентности, или который представляет собой экзогенный генетический элемент, которым трансформирован штамм грамотрицательных бактерий и который временно или стабильно встроен в
10 хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся эндогенно, такой как эндогенная плазмид вирулентности. Эндогенная плазмид вирулентности является предпочтительным внехромосомным генетическим элементом в соответствии с настоящим изобретением. Такой внехромосомный генетический элемент может быть
15 получен путем встраивания вектора, такого как вектор экспрессии, вектор для гомологичной рекомбинации, или другого типа встраивания в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся эндогенно, такой как плазмид вирулентности, путем встраивания фрагментов ДНК для гомологичной рекомбинации или другого типа встраивания в хромосому или в
20 генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся эндогенно, такой как плазмид вирулентности, или посредством направляемой элементом РНК сайтспецифической вставки в хромосому или в генетический элемент, отличный от хромосомы, содержащийся эндогенно, такой как плазмид вирулентности, например, с помощью CRISPR/Cas9 и соответствующей
25 направляющей РНК.

Термины «молекула полинуклеиновой кислоты» и «молекула полинуклеотида» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и имеют одинаковое значение, и обозначают как молекулы ДНК, так и молекулы РНК, которые
30 могут быть либо одноцепочечными, либо двухцепочечными, и которые могут частично или полностью транскрибироваться и транслироваться (ДНК) или частично или полностью транслироваться (РНК) в продукт гена.

Термины «последовательность нуклеиновой кислоты», «последовательность

нуклеотидов» и «последовательность нуклеотидной кислоты» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и имеют одинаковое значение, и предпочтительно обозначают ДНК или РНК. Термины «последовательность нуклеиновой кислоты», «последовательность нуклеотидов» и

5 «последовательность нуклеотидной кислоты» предпочтительно используются как синонимы термина «полинуклеотидная последовательность».

Термин «оперон» в настоящем документе обозначает два или более генов, транскрибируемых под контролем одного промотора. Таким образом, эти гены, как правило, транскрибируются вместе и образуют одну матричную РНК, после

10 чего эта единая мРНК кодирует более чем один белок (полицистронная мРНК). В дополнение к промотору и двум или более генам также может присутствовать элемент оператора, который контролирует транскрипцию.

15 Термин «доставка» в настоящем документе обозначает транспортировку белка из рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий в эукариотическую клетку, включая этапы экспрессии гетерологичного белка в рекомбинантном штамме грамотрицательных бактерий, секрецию экспрессированного белка или белков из такого рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий и

20 транслокацию секретированного белка или белков таким рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий в цитозоль эукариотической клетки. Соответственно, термины «сигнал доставки» или «сигнал секреции», которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо, обозначают полипептидную последовательность, которая может распознаваться системой

25 секреции и транслокации штамма грамотрицательных бактерий и направляет доставку белка из штамма грамотрицательных бактерий в эукариотические клетки.

Термин «сигнал доставки из бактериального эффекторного белка» в настоящем

30 документе обозначает сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функциональный в рекомбинантном штамме грамотрицательных бактерий, т.е. который обеспечивает секрецию экспрессированного в рекомбинантном штамме грамотрицательных бактерий гетерологичного белка из такого рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий с помощью системы

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

В настоящем документе «секреция» белка обозначает транспортировку гетерологичного белка наружу через мембрану клетки рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий. «Транслокация» белка обозначает транспортировку гетерологичного белка из рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий через плазматическую мембрану эукариотической клетки в цитозоль такой эукариотической клетки.

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

Термин «бактериальный эффекторный белок» в настоящем документе обозначает бактериальные белки, транспортируемые системами секреции, например, бактериальными белками, которые являются частью аппарата

5 системы секреции, в клетки-хозяева. Такие эффекторные белки доставляются посредством системы секреции в клетку-хозяина, в которой они проявляют, например, вирулентную активность в отношении различных белков хозяина и аппаратов клетки. Известно множество различных эффекторных белков, которые транспортируются различными типами систем секреции и

10 демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей, модулирующих функции регуляторных молекул хозяина. Системы секреции включают систему секреции 3 типа (Т3SS), систему секреции 4 типа (Т4SS) и систему секреции 6 типа (Т6SS). Некоторые эффекторные белки (такие как IpaC *Shigella flexneri*) также относятся к классу бактериальных белков, которые

15 являются частью аппарата системы секреции и обеспечивают транслокацию белка. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий в настоящем документе обычно содержит бактериальные белки, представляющие собой необходимые компоненты бактериальной системы секреции 3 типа (Т3SS), системы секреции 4 типа (Т4SS) и/или системы секреции 6 типа (Т6SS),

20 предпочтительно, системы секреции 3 типа (Т3SS). Термин «бактериальные белки, представляющие собой необходимые компоненты бактериальной Т3SS», в настоящем документе обозначает белки, которые в природе образуют инъектисому, например, впрыскивающую иглу, или которые иным способом являются необходимыми для ее функционирования при транслокации белков в

25 эукариотические клетки. Белки, образующие инъектисому или иным способом являющиеся необходимыми для ее функционирования при транслокации белков в эукариотические клетки, включают, без ограничения:

SctC, YscC, MxiD, InvG, SsaC, EscC, HrcC, HrcC (секретин), SctD, YscD, MxiG, Prg, SsaD, EscD, HrpQ, HrpW, FliG (внешний белок MS-кольца), SctJ, YscJ, MxiJ,

30 PrgK, SsaJ, EscJ, HrcJ, HrcJ, FliF (внутренний белок MS-кольца), SctR, YscR, Spa24, SpaP, SpaP, SsaR, EscR, HrcR, HrcR, FliP (малый белок аппарата экспорта), SctS, YscS, Spa9 (SpaQ), SpaQ, SsaS, EscS, HrcS, HrcS, FliQ (малый белок аппарата экспорта), SctT, YscT, Spa29 (SpaR), SpaR, SsaT, EscT, HrcT, HrcT, FliR (малый белок аппарата экспорта), SctU, YscU, Spa40, SpaS, SpaS,

SsaU, EscU, HrcU, HrcU, FlhB (белок-переключатель аппарата экспорта), SctV, YscV, MxiA, InvA, SsaV, EscV, HrcV, HrcV, FlhA (большой белок аппарата экспорта), SctK, YscK, MxiK, OrgA, HrpD (вспомогательный цитозольный белок), SctQ, YscQ, Spa33, SpaO, SpaO, SsaQ, EscQ, HrcQA+B, HrcQ, FliM + FliN
 5 (белок С-кольца), SctL, YscL, MxiN, OrgB, SsaK, EscL, Orf5, HrpE, HrpF, FliH (статор), SctN, YscN, Spa47, SpaL, InvC, SsaN, EscN, HrcN, HrcN, FliI (АТФаза), SctO, YscO, Spa13, SpaM, InvI, SsaO, Orf15, HrpO, HrpD, FliJ (стебель), SctF, YscF, MxiH, PrgI, SsaG, EscF, HrpA, HrpY (белок филамента иглы), SctI, YscI, MxiI, PrgJ, SsaI, EscI, rOrf8, HrpB, HrpJ, (внутренний белок палочки), SctP, YscP,
 10 Spa32, SpaN, InvJ, SsaP, EscP, Orf16, HrpP, HraP, FliK (регулятор длины иглы), LcrV, IpaD, SipD (гидрофильный транслокатор, белок конца иглы), YopB, IpaB, SipB, SseC, EspD, HrpK, PopF1, PopF2 (гидрофобный транслокатор, поровый белок), YopD, IpaC, SipC, SseD, EspB (гидрофобный транслокатор, поровый белок), YscW, MxiM, InvH (пилотин), SctW, YopN, MxiC, InvE, SsaL, SepL,
 15 HrpJ, HraA (привратник).

Термин «эффекторный белок Т6SS» или «бактериальный эффекторный белок Т6SS» в настоящем документе обозначает белки, которые в природе
 20 впрыскиваются системами Т6S в цитозоль эукариотических клеток или бактерий, и белки, которые в природе секретируются системами Т6S, которые могут, например, образовывать транслокационные поры в эукариотической мембране. Термин «эффекторный белок Т4SS» или «бактериальный эффекторный белок Т4SS» в настоящем документе обозначает белки, которые в природе
 25 впрыскиваются системами Т4S в цитозоль эукариотических клеток, и белки, которые в природе секретируются системами Т4S, которые могут, например, образовывать транслокационную пору в эукариотической мембране. Термин «эффекторный белок Т3SS» или «бактериальный эффекторный белок Т3SS» в настоящем документе обозначает белки, которые в природе
 30 впрыскиваются системами Т3S в цитозоль эукариотических клеток, и белки, которые в природе секретируются системами Т3S, которые могут, например, образовывать транслокационную пору в эукариотической мембране (включая порообразующие транслокаторы (такие как YopB и YopD *Yersinia*) и белки конца иглы, такие как LcrV *Yersinia*). Предпочтительно, применяют белки, которые в природе впрыскиваются системами Т3S в цитозоль эукариотических

клеток. Данные факторы вирулентности парализуют или перепрограммируют эукариотическую клетку с пользой для патогена. Эффекторы T3S демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей и модулируют функцию критических регуляторных молекул хозяина, и включают, но не ограничены перечисленными эффекторами: AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEpto, AvrPpiBpto, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE, белки семейства GALA, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaB, IpaC, IpaH, IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB, PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopB, YopD YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA.

Формулировка «рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, накапливающийся в злокачественной солидной опухоли», или «рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий накапливается в злокачественной солидной опухоли» в настоящем документе обозначает рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, который реплицируется в злокачественной солидной опухоли, тем самым увеличивая число бактерий данного рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий внутри злокачественной солидной опухоли. Неожиданно было обнаружено, что рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий после введения субъекту накапливается специфично в злокачественной солидной опухоли, т.е. накапливается специфично в органе, в котором присутствует злокачественная опухоль, причем число бактерий рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий в органах, в которых не присутствует злокачественная солидная опухоль, является низким или не детектируемым.

В случае локализующихся вне клетки бактерий, таких как *Yersinia*, бактерии преимущественно накапливаются в межклеточном пространстве, образованном между опухолевыми клетками или клетками микроокружения опухоли.

Растущие внутри клетки бактерии, такие как *Salmonella*, будут внедряться в основном в опухолевые клетки или клетки микроокружения опухоли и обитать внутри таких клеток, хотя также могут наблюдаться внеклеточные скопления бактерий. Число бактерий рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, скопившихся внутри злокачественной солидной опухоли, может находиться, например, в диапазоне от 10^4 до 10^9 бактерий на грамм опухолевой ткани.

Термин «рак» в настоящем документе обозначает заболевание, при котором аномальные клетки делятся без контроля и могут прорасти в близлежащие ткани. Клетки рака могут также распространяться в другие части тела через кровеносную и лимфатическую системы. Существует несколько основных типов рака. Карцинома представляет собой рак, который возникает в коже или тканях, выстилающих или покрывающих внутренние органы. Саркома представляет собой рак, который возникает в кости, хряще, жире, мышцах, кровеносных сосудах или другой соединительной или поддерживающей ткани. Лейкоз представляет собой рак, который возникает в кроветворяющей ткани, такой как костный мозг, и вызывает образование и поступление в кровь большого количества аномальных кровяных клеток. Лимфома и множественная миелома представляют собой типы рака, которые возникают в клетках иммунной системы. Типы рака центральной нервной системы представляют собой типы рака, которые возникают в тканях головного мозга и спинного мозга. Термин «рак» в настоящем документе включает солидные опухоли, т.е. злокачественные солидные опухоли, такие как, например, саркомы, карциномы и лимфомы, и несолидные опухоли, такие как, например, лейкозы (типы рака крови). Злокачественные солидные опухоли являются предпочтительными.

Термин «солидная опухоль», «показание солидной опухоли», «злокачественная солидная опухоль» или «показание злокачественной солидной опухоли» в настоящем документе обозначает аномальную массу ткани, которая обычно не содержит кисты или области с жидкостью. Солидные опухоли могут являться доброкачественными (нераковыми) или злокачественными (раковыми). Злокачественные солидные опухоли лечат способами в соответствии с настоящим изобретением. Различные типы злокачественных солидных

опухолей называют по типу клеток, которые их образуют. Примерами злокачественных солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы (типы рака крови) обычно не образуют злокачественные солидные опухоли (определение согласно Национальному институту рака Национального центра здоровья США). Злокачественные солидные опухоли включают, без ограничения, аномальную массу клеток, которые могут происходить из различных типов тканей, таких как печень, толстая кишка, ободочная и прямая кишка, кожа, молочная железа, поджелудочная железа, шейка матки, тело матки, мочевого пузыря, желчный пузырь, почка, гортань, губа, полость рта, пищевод, яичник, предстательная железа, желудок, яички, щитовидная железа или легкое и, таким образом, включают злокачественные солидные опухоли печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишок, кожи, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почки, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной железы, желудка, яичек, щитовидной железы или легкого. Предпочтительными злокачественными солидными опухолями, которые можно лечить способами в соответствии с настоящим изобретением, являются злокачественные солидные опухоли, которые происходят из кожи, молочной железы, печени, поджелудочной железы, мочевого пузыря, предстательной железы и толстой кишки и, таким образом, включают злокачественные солидные опухоли кожи, молочной железы, печени, поджелудочной железы, мочевого пузыря, предстательной железы и толстой кишки. В равной степени предпочтительными злокачественными солидными опухолями, которые можно лечить способами в соответствии с настоящим изобретением, являются злокачественные солидные опухоли, связанные с раком печени, такие как гепатоклеточная карцинома.

Термин «частота объективного ответа» (ЧОО) в настоящей заявке обозначает долю пациентов с уменьшением размера опухоли на заранее установленную величину и за минимальный период времени. Длительность ответа обычно измеряют с момента первоначального ответа до задокументированного прогрессирования опухоли. В общем, FDA определяет ЧОО как сумму частичных ответов плюс полные ответы. При таком определении, ЧОО является прямой мерой противоопухолевой активности лекарственного средства,

которую можно оценить в несравнительном исследовании. ЧОО представляет собой сумму полного ответа (ПО) и частичного ответа (ЧО). Определение ЧОО, ПО и ЧО для человека представлено в руководствах RECIST (RECIST 1.1 ⁶⁹) и переработанных руководствах по оценке иммунотерапевтического соединения (iRECIST ⁷⁰).

В доклинических исследованиях на имеющих опухоль мышах определение ответа опухоли переработано относительно определения в RECIST для людей: отсутствие регрессии опухоли определяют как увеличение объема опухоли более чем на 35% по сравнению с их соответствующим объемом в день 0; стабильное заболевание определяют как изменение объема опухоли от уменьшения на 50% до увеличения на 35% объема опухоли по сравнению с днем 0; частичную регрессию определяют как уменьшение объема опухоли от 50% до 95% по сравнению с днем 0; и полную регрессию или полный ответ определяют как уменьшение объема опухоли на >95% по сравнению с днем 0.

Термины «полный ответ», «полная регрессия опухоли» и «полная регрессия» используются в настоящем документе взаимозаменяемо, и они имеют одинаковое значение. Термин «полный ответ» (ПО) в отношении целевых очагов обозначает исчезновение всех целевых очагов. Любые патологические лимфатические узлы (целевые или нецелевые) должны уменьшиться по короткой оси до <10 мм. Термин «полный ответ» (ПО), используемый в данном документе в отношении нецелевых очагов, обозначает исчезновение всех нецелевых очагов и нормализацию уровня опухолевых маркеров. Все лимфатические узлы должны быть непатологическими по размеру (короткая ось <10 мм).

Термин «частичный ответ» (ЧО), используемый в настоящем документе в отношении целевых очагов, обозначает уменьшение суммы диаметров целевых очагов по меньшей мере на 30%, при сравнении с исходной суммой диаметров.

Термин «прогрессирующее заболевание» (ПЗ), используемый в настоящем документе в отношении целевых очагов, обозначает увеличение суммы диаметров целевых очагов по меньшей мере на 20%, при сравнении с наименьшей суммой за время исследования (включая исходную сумму, если она

является наименьшей за время исследования). В дополнение к относительному увеличению на 20% сумма также должна демонстрировать абсолютное увеличение не менее чем на 5 мм. Появление одного или нескольких новых очагов также считается прогрессирующим. Термин «прогрессирующее заболевание» (ПЗ), используемый в настоящем документе в отношении нецелевых очагов, обозначает появление одного или нескольких новых очагов и/или явное прогрессирующее существование существующих нецелевых очагов. Явное прогрессирующее обычно не должно превалировать над статусом целевого очага. Оно должно отражать общее изменение статуса заболевания, а не увеличение одного очага.

Термин «стабильное заболевание» (СЗ), используемый в настоящем документе в отношении целевых очагов, обозначает как отсутствие достаточного уменьшения для соответствия критериям ЧО, так и отсутствие достаточного увеличения для соответствия критериям ПЗ, при сравнении с наименьшей суммой диаметров за время исследования.

В настоящей заявке термин «выживаемость без прогрессирующего» (ВБП) относится к продолжительности времени от начала лечения до момента прогрессирующего или смерти, в зависимости от того, что наступит раньше.

Термин «бактериальный эффекторный белок, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток», в настоящем документе обозначает бактериальные эффекторные белки, которые транспортируются системами секреции в клетки-хозяева, в которых они проявляют свою вирулентную активность в отношении различных белков и клеточных аппаратов хозяина. Известно множество различных эффекторных белков, которые транспортируются различными типами систем секреции и демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей, модулирующих функции регуляторных молекул хозяина. Системы секреции включают систему секреции 3 типа (Т3SS), систему секреции 4 типа (Т4SS) и систему секреции 6 типа (Т6SS). Важно отметить, что некоторые эффекторные белки, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток (такие как IpaC *Shigella flexneri*), также относятся к классу бактериальных белков, которые являются

частью аппарата системы секреции. В случае если бактериальный эффекторный белок, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток, также является необходимым для функционирования аппарата секреции, такой белок исключают из данного определения. Эффекторные белки T3SS, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток, обозначают белки, такие как YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT *Y. enterocolitica*, или OspF, IpgD, IpgB1 *Shigella flexneri*, или SopE, SopB, SptP *Salmonella enterica*, или ExoS, ExoT, ExoU, ExoY *P. aeruginosa*, или Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ *E. coli*. Эффекторные белки T4SS, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток, обозначают белки, такие как LidA, SidC, SidG, SidH, SdhA, SidJ, SdjA, SdeA, SdeA, SdeC, LepA, LepB, WipA, WipB, YlfA, YlfB, VipA, VipF, VipD, VpdA, VpdB, DrrA, LegL3, LegL5, LegL7, LegLC4, LegLC8, LegC5, LegG2, Ceg10, Ceg23, Ceg29 *Legionella pneumophila*, или VerA, VerB, VerC, VerD, VerE, VerF VerG *Bartonella henselae*, или VirD2, VirE2, VirE3, VirF *Agrobacterium tumefaciens*, или CagA *H. Pylori*, или коклюшный токсин *Bordetella pertussis*. Эффекторные белки T6SS, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток, обозначают белки, такие как белки VgrG *Vibrio cholerae* (такие как VgrG1).

20 Термин «эффекторный белок T3SS, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток», или «бактериальный эффекторный белок T3SS, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток», в настоящем документе обозначает белки, которые в природе впрыскиваются системами T3S в цитозоль эукариотических клеток, и белки, которые в природе секретируются системами T3S, которые могут, например, образовывать транслокационную пору в эукариотической мембране, которые представляют собой факторы вирулентности в отношении эукариотических клеток, т.е. белки, которые парализуют или перепрограммируют эукариотическую клетку с пользой для патогена. Эффекторы демонстрируют широкий репертуар биохимических активностей и модулируют функцию критических регуляторных механизмов хозяина, таких как, например, фагоцитоз и актиновый цитоскелет, передача воспалительных сигналов, апоптоз, эндоцитоз или секреторные пути^{2,9}, и включают, но не ограничены перечисленными эффекторами: AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB,

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

Эффекторные гены T3SS *Yersinia*, которые являются вирулентными в эукариотической клетке и могут быть делетированы/мутированы, например, в *Y. enterocolitica*, представляют собой YopE, YopH, YopM, YopO, YopP (также называемый YopJ) и YopT¹⁰. Соответствующие эффекторные гены, которые являются вирулентными в эукариотической клетке, могут быть делетированы/мутированы в *Shigella flexneri* (например, OspF, IpgD, IpgB1), *Salmonella enterica* (например, SopE, SopB, SptP), *P. aeruginosa* (например, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) или *E. coli* (например, Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ).
 15 Последовательности нуклеиновой кислоты данных генов доступны специалистам в данной области техники, например, в базе данных Genebank (yopH, yopO, yopE, yopP, yopM, yopT из NC_002120 GI:10955536; эффекторные белки *S. flexneri* из AF386526.1 GI:18462515; эффекторы *S. enterica* из NC_016810.1 GI:378697983 или FQ312003.1 GI:301156631; эффекторы *P. aeruginosa* из AE004091.2 GI:110227054 или CP000438.1 GI:115583796 и
 25 эффекторные белки *E. coli* из NC_011601.1 GI:215485161).

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

В настоящем документе термины «полипептид», «пептид», «белок», «полипептидный» и «пептидный» используются взаимозаменяемо и обозначают серию остатков аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями между альфа-амино- и карбоксильными группами соседних остатков.

Предпочтительными являются белки, которые содержат аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 10 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот.

- 10 В соответствии с настоящим изобретением «гетерологичный белок или его фрагмент» включает встречающиеся в природе белки или их фрагменты, а также включает искусственно сконструированные белки или их фрагменты. В настоящем документе термин «гетерологичный белок или его фрагмент» обозначает белок или его фрагмент, отличные от эффекторного белка T3SS или его N-концевого фрагмента, с которыми они могут быть слиты. В частности, гетерологичный белок или его фрагмент в настоящем документе обозначают белок или его фрагмент, которые не принадлежат к протеому, т.е. всем природным белкам, составляющим конкретный рекомбинантный штамм граммотрицательных бактерий, предложенный и применяемый в соответствии с
- 15 настоящим изобретением, например, который не принадлежит к протеому, т.е. всем природным белкам, составляющим конкретный штамм бактерий рода *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*. Обычно гетерологичный белок или его фрагмент происходят из животного, включая человека.
- 20 Предпочтительно, гетерологичный белок или его фрагмент представляют собой белок человека или его фрагмент. Более предпочтительно, гетерологичный белок или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков передачи сигналов клетки, репортерных
- 25 белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, родственных GPCR белков, слитых конструкций нанотел и нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков, или их фрагментов. Особенно предпочтительно, гетерологичный белок или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции
- 30

ответа интерферона (IFN), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, репортерных белков, малых ГТФаз, родственных GPCR белков, слитых конструкций нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков, или их фрагментов. Дополнительный особенно предпочтительный гетерологичный белок или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков передачи сигналов клетки, слитых конструкций нанотел и нанотел. Еще более предпочтительными являются гетерологичные белки или их фрагменты, выбранные из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла и белков с анкириновыми повторами, или их фрагментов. Дополнительные еще более предпочтительные гетерологичные белки или их фрагменты выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков с анкириновыми повторами, белков передачи сигналов клетки, слитых конструкций нанотел и нанотел. Дополнительные еще более предпочтительные гетерологичные белки или их фрагменты выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков с анкириновыми повторами, слитых конструкций нанотел и нанотел. Дополнительные еще более предпочтительные гетерологичные белки или их фрагменты выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), белков, участвующих в регуляции апоптоза или апоптоза, и белков передачи сигналов клетки. Дополнительные еще более предпочтительные гетерологичные белки или их фрагменты выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, слитых конструкций нанотел и нанотел. Дополнительные еще более предпочтительные гетерологичные белки или их фрагменты выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа

интерферона (IFN), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, и слитых конструкций нанотел. Наиболее предпочтительными являются белки или их фрагменты, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, или белки или их фрагменты, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), в частности, белки или их фрагменты, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), такие как гетерологичные белки или их фрагменты из животного, предпочтительно из человека, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, или белки человека или их фрагменты, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN). Белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), или их фрагменты, предпочтительно представляют собой белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN) I типа, или их фрагменты, более предпочтительно белки человека или их фрагменты, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN) I типа.

15 В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением содержит две последовательности нуклеотидов, кодирующие идентичные или два различных гетерологичных белка, или их фрагмента, слитые независимо друг от друга в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из

20 бактериального эффекторного белка.

В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением содержит три последовательности нуклеотидов, кодирующие идентичные или три различных гетерологичных белка, или их фрагмента, слитые независимо друг от друга в рамке с 3'-концом

25 последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка. В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением содержит четыре последовательности нуклеотидов, кодирующие идентичные или четыре различных гетерологичных белка, или их фрагмента, слитые

30 независимо друг от друга в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка.

Гетерологичный белок, экспрессируемый рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий, обычно имеет молекулярную массу от 1 до 150 кДа, предпочтительно от 1 до 120 кДа, более предпочтительно от 1 до 100 кДа,

наиболее предпочтительно от 10 до 80 кДа. Фрагмент гетерологичного белка обычно содержит от 10 до 1500 аминокислот, предпочтительно от 10 до 800 аминокислот, более предпочтительно от 100 до 800 аминокислот, в частности, от 100 до 500 аминокислот. Фрагмент гетерологичного белка, в соответствии с

5 определением в настоящем документе, обычно обладает теми же функциональными свойствами, что и гетерологичный белок, из которого он получен. Термин «гетерологичный белок, из которого он получен», по отношению к фрагменту относится к полноразмерному гетерологичному белку, из которого получен фрагмент. Термин «те же функциональные свойства, что и

10 у гетерологичного белка, из которого он получен», относится к молекулярной функции (или одной из молекулярных функций) полноразмерного белка, из которого получен указанный фрагмент, которая, например, может представлять собой ферментативную активность, функцию в белок-белковом взаимодействии и/или действие в качестве каркасного белка. В отношении фрагмента белков,

15 участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), cGAS человека и RIG-I человека могут служить в качестве примера. Полноразмерный cGAS человека представляет собой нуклеотидилтрансферазу, которая катализирует образование циклического ГМФ-АМФ (цГМФ) из АТФ и гуанозинтрифосфата (ГТФ). Фрагмент cGAS человека, обладающий «теми же

20 функциональными свойствами», должен быть способен выполнять такую же ферментативную активность (синтез цГМФ из ГТФ и АТФ в случае cGAS). Аналогично для RIG-I человека - цитоплазматического сенсора короткой двухцепочечной РНК, который состоит из РНК-геликазного домена, С-концевого домена и N-концевого домена (Brisse & Ly, 2019). Геликазный домен

25 отвечает за распознавание двухцепочечной РНК; С-концевой домен содержит репрессорный домен; и N-концевой домен содержит два домена привлечения каспаз (CARD), которые активируют нисходящие сигнальные пути. Таким образом, фрагмент RIG-I человека, обладающий «теми же функциональными свойствами», должен быть способен выполнять такую же активность, что и одна

30 из молекулярных функций полноразмерного RIG-I, в случае N-концевого домена CARD - активировать соответствующие нисходящие сигнальные пути.

В некоторых вариантах реализации фрагмент гетерологичного белка содержит домен гетерологичного белка. Таким образом, в некоторых вариантах

реализации штамм грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую домен гетерологичного белка. Предпочтительно, штамм грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность

5 нуклеотидов, кодирующую один или два домена гетерологичного белка, более предпочтительно, два домена гетерологичного белка.

В некоторых вариантах реализации штамм грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность

10 нуклеотидов, кодирующую повторяющиеся домены гетерологичного белка или два или более доменов различных гетерологичных белков, слитых в одной рамке считывания с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка.

15 Термин «гетерологичные белки, которые относятся к одному и тому же функциональному классу белков», в настоящем документе обозначает гетерологичные белки, которые выполняют одну и ту же функцию, например, гетерологичные белки, обладающие специфичной ферментативной активностью, гетерологичные белки, которые действуют в одном и том же пути

20 передачи сигналов, таком как, например, регуляция клеточного цикла, или характеризуются общим специфичным свойством, такие как, например, относящиеся к одному и тому же классу бактериальных эффекторных белков. Функциональные классы белков представляют собой, например, белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, белки, которые действуют в

25 качестве регуляторов клеточного цикла, белки с анкириновыми повторами, белки передачи клеточных сигналов, белки, участвующие в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), репортерные белки, факторы транскрипции, протеазы, малые ГТФазы, родственные GPCR белки, слитые конструкции нанотел и нанотела, бактериальные эффекторы T3SS,

30 бактериальные эффекторы T4SS или вирусные белки, которые действуют совместно в биологическом процессе установления вирулентности в отношении эукариотических клеток.

В соответствии с настоящим изобретением «домен гетерологичного белка» включает домены встречающихся в природе белков, а также включает домены искусственно сконструированных белков. В настоящем документе термин «домен гетерологичного белка» обозначает домен гетерологичного белка, 5 отличный от домена эффекторного белка T3SS, или домен, отличный от домена, содержащего его N-концевой фрагмент, с которым он может быть слит для получения слитого белка. В частности, домен гетерологичного белка в настоящем документе обозначает домен гетерологичного белка, который не принадлежит к протеому, т.е. всем природным белкам, составляющим 10 конкретный рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, предложенный и применяемый в настоящем изобретении, например, который не принадлежит к протеому, т.е. всем природным белкам, составляющим конкретный штамм бактерий рода *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*. Обычно домен гетерологичного белка получен из животного, 15 включая человека. Предпочтительно, домен гетерологичного белка представляет собой домен белка человека. Более предпочтительно, домен гетерологичного белка представляет собой домен белка, выбранного из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), регуляторов 20 клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков передачи сигналов клетки, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, родственных GPCR белков, слитых конструкций нанотел и нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. Особенно предпочтительно, домен гетерологичного белка представляет 25 собой домен белка, выбранного из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, репортерных белков, малых ГТФаз, родственных GPCR белков, слитых конструкций нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, 30 бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков. В особенности еще более предпочтительными являются домены гетерологичных белков, выбранных из группы, состоящей из белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), регуляторов клеточного цикла и белков с анкириновыми повторами. Наиболее

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

5 ответа интерферона (IFN), в частности, домены гетерологичных белков человека, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона I типа (IFN).

Домен гетерологичного белка, экспрессируемый рекомбинантным штаммом

10 грамотрицательных бактерий, обычно имеет молекулярную массу от 1 до 50 кДа, предпочтительно от 1 до 30 кДа, более предпочтительно от 1 до 20 кДа, наиболее предпочтительно от 1 до 15 кДа.

В соответствии с настоящим изобретением «белки, участвующие в индукции

15 или регуляции ответа IFN», включают, без ограничения: cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKK-эпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG-I (DDX58), MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11,

20 DDX41, LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, IFNAR1, IFNAR2, TYK2, JAK1, ISGF3, IL10R2, IFNLR1, IFNGR1, IFNGR2, JAK2, STAT4, ферменты, генерирующие циклические динуклеотиды (циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ), такие как WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS, или

25 их фрагмент. Предпочтительные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN, выбраны из группы, состоящей из перечисленных белков: cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKK-эпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG-I (DDX58), MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3,

30 TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41, LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, IFNAR1, IFNAR2, TYK2, JAK1, ISGF3, IL10R2, IFNLR1, IFNGR1, IFNGR2, JAK2, STAT4, ферменты, генерирующие циклические динуклеотиды (циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и

циклического ди-ГАМФ), такие как WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS, или их фрагмент.

В соответствии с настоящим изобретением «белки участвующие в индукции
 5 или регуляции ответа IFN I типа», включают, без ограничения: cGAS, STING, TRIF, TBK1, ИКК-эпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-ПК, RIG-I, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41,
 10 LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, ферменты, образующие циклические динуклеотиды (циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ), такие как WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS, или их фрагменты.

Предпочтительные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I
 15 типа, выбраны из группы, состоящей из перечисленных белков: cGAS, STING, TRIF, TBK1, ИКК-эпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-ПК, RIG-I, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, LSm14A, LRRFIP1, DHX29, DHX15, или их фрагментов, и
 20 ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, или их фрагментов.

Более предпочтительные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа
 25 IFN I типа, выбраны из группы, состоящей из: cGAS (такого как Q8N884 в Uniprot для белка человека), RIG-I (такого как O95786 в Uniprot для белка человека), MDA5 (такого как Q9BYX4 в Uniprot для белка человека), IPS-1/MAVS (такого как Q7Z434 в Uniprot для белка человека), IRF3 (такого как Q14653 в Uniprot для белка человека), IRF7 (такого как Q92985 в Uniprot для
 30 белка человека), IRF9 (такого как Q00978 в Uniprot для белка человека) и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR (такого как Q9HXT9 в Uniprot для белка *P. aeruginosa*), DncV (такого как Q9KVG7 в Uniprot для белка *V. cholerae*),

DisA и DisA-подобного белка (такого как Q812L9 в Uniprot для белка *B. cereus*), CdaA (такого как Q8Y5E4 в Uniprot для белка *L. monocytogenes*), CdaS (такого как O31854 в Uniprot или его конститутивно активный мутант L44F для белка *B. subtilis*) и cGAS (такого как Q8N884 в Uniprot для белка человека), или
 5 фрагментов данных белков.

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

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбраны из группы, состоящей из белков, содержащих домен CARD, или их фрагментов, и ферментов,
 20 образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, или их фрагментов. Гетерологичные белки, содержащие домен CARD, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, представляет собой, например, RIG-I, который обычно содержит два домена CARD, MDA5, который обычно содержит два
 25 домена CARD, и MAVS, который обычно содержит один домен CARD.

Фрагмент гетерологичных белков, участвующих в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I типа, обычно содержит от 25 до 1000 аминокислот, предпочтительно, от 50 до 600 аминокислот, более предпочтительно, от 100 до
 30 500 аминокислот, еще более предпочтительно, от 100 до 362 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент гетерологичных белков, участвующих в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I типа, содержит фрагмент гетерологичных белков, участвующих в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I типа, который обычно содержит от 25 до

- 1000 аминокислот, предпочтительно от 50 до 600 аминокислот, более предпочтительно от 100 до 500 аминокислот, еще более предпочтительно от 100 до 362 аминокислот, в частности, от 100 и 246 аминокислот, или содержит фрагмент гетерологичного белка, участвующего в индукции или регуляции
- 5 ответа IFN или ответа IFN I типа, который имеет делецию аминокислотной последовательности, содержащую от аминокислоты 1 до аминокислоты 160 N-концевых аминокислот, предпочтительно делецию аминокислотной последовательности, содержащую N-концевые аминокислоты 1 - 59 или N-концевые аминокислоты 1 - 160, и где фрагмент гетерологичного белка,
- 10 участвующего в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I типа, обычно содержит от 25 до 1000 аминокислот, предпочтительно от 50 до 600 аминокислот, более предпочтительно от 100 до 500 аминокислот, еще более предпочтительно от 100 до 362 аминокислот.
- 15 Фрагмент гетерологичных белков, содержащих домен CARD, участвующих в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I типа, обычно содержит аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из аминокислот 100 - 500, предпочтительно аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из аминокислот
- 20 100 - 400, более предпочтительно аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из аминокислот 100 - 300, более предпочтительно аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из аминокислот 100 - 294, более предпочтительно аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой
- 25 из аминокислот 100 - 246.

В некоторых вариантах реализации фрагмент гетерологичных белков, содержащих домен CARD, участвующих в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I типа, содержит аминокислотную последовательность,

30 выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 294, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 246, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-

концевую аминокислоту кислоту 1 и не более чем аминокислоту 245,
 аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере N-
 концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 231, аминокислотную
 последовательность, содержащую по меньшей мере N-концевую аминокислоту
 5 1 и не более чем аминокислоту 229, аминокислотную последовательность,
 содержащую по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем
 аминокислоту 228, аминокислотную последовательность, содержащую по
 меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 218,
 аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере N-
 10 концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 217, аминокислотную
 последовательность, содержащую по меньшей мере N-концевую аминокислоту
 1 и не более чем аминокислоту 100, и аминокислотную последовательность,
 содержащую по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем
 аминокислоту 101, более конкретно, аминокислотную последовательность,
 15 выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности,
 содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем
 аминокислоту 245, аминокислотную последовательность, содержащую по
 меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 228,
 аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере N-
 20 концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 217, и аминокислотную
 последовательность, содержащую по меньшей мере N-концевую аминокислоту
 1 и не более чем аминокислоту 100, наиболее конкретно, аминокислотную
 последовательность, содержащую по меньшей мере N-концевую аминокислоту
 1 и не более чем аминокислоту 245 гетерологичного белка, предпочтительно
 25 гетерологичного белка, содержащего домен CARD человека.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичный белок
 представляет собой фрагмент гетерологичного белка, содержащего домен
 CARD, участвующего в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I
 30 типа, или содержит фрагмент гетерологичного белка, содержащего домен
 CARD, участвующего в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I
 типа. Обычно фрагмент гетерологичного белка, содержащего домен CARD,
 участвующего в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I типа,
 содержит по меньшей мере один домен CARD. В этих вариантах реализации

гетерологичный белок, в частности, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 294, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 246, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 245, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 231, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 229, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 228, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 218, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 217, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 100, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 101, более конкретно, аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 245, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 228, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 217 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 100 гетерологичного белка, участвующего в индукции или регуляции ответа IFN или ответа IFN I типа, содержащего домен CARD.

В этих вариантах реализации гетерологичный белок более конкретно содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 246, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 245, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 229, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 228, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 218 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 217, в частности, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до

аминокислоты 245, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 228, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 217, наиболее конкретно, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до

5 аминокислоты 245 RIG-I, или

аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 100, и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 101 MAVS, или аминокислотной

10 последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 294 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 231 MDA5, еще более конкретно, аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной

15 последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 245, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 228 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 217 RIG-I, или

аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до

20 аминокислоты 100 MAVS, или аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 294 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 231 MDA5.

25

Наиболее предпочтительными являются аминокислотная последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 245 RIG-I человека и аминокислотная последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 246 RIG-I мыши. Фрагмент 1-245 RIG-I человека и фрагмент 1-

30 246 RIG-I мыши соответствуют друг другу с идентичностью последовательностей на 73% (и сходством последовательностей на 85%) и являются функционально эквивалентными, т.е. оба фрагмента демонстрируют эквивалентную активность в клетках мыши и клетках человека.

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

В более предпочтительном варианте реализации гетерологичный белок, участвующий в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбран из группы,

состоящей из содержащих домен CARD RIG-I, MDA5 и MAVS, или их фрагмента, причем указанный фрагмент содержит по меньшей мере один домен CARD, и cGAS и его фрагмента, в частности, выбран из группы, состоящей из содержащего домен CARD RIG-I, и его фрагмента, причем указанный фрагмент

5 содержит по меньшей мере один домен CARD, содержащего домен CARD MAVS, и его фрагмента, причем указанный фрагмент содержит по меньшей мере один домен CARD, и cGAS и его фрагмента. Фрагменты этих белков, описанные выше, являются особенно предпочтительными. В этом более предпочтительном варианте реализации содержащие домен CARD RIG-I,

10 MDA5, MAVS содержат встречающийся(-еся) в природе домен(ы) CARD и необязательно дополнительно С-концевые аминокислоты после встречающегося(-ихся) в природе домена(ов) CARD, например, содержат встречающийся в природе геликазный домен в случае RIG-I или его фрагмент, предпочтительно фрагмент, содержащий 1 - 500, более предпочтительно 1 - 250,

15 еще более предпочтительно 1 - 150 аминокислот, причем встречающийся в природе геликазный домен или его фрагмент не является функциональным, т.е. не связывается с доменом CARD, или необязательно содержат расположенную по ходу транскрипции С-концевую последовательность в случае MAVS или его фрагмента, предпочтительно фрагмент, содержащий 1 - 500, более

20 предпочтительно 1 - 250, еще более предпочтительно 1 - 150 аминокислот. В этих вариантах реализации cGAS и его фрагмент обычно содержат встречающийся в природе синтазный домен (кор и С-концевой домен НТазы; аминокислоты 160 – 522 cGAS человека, как описано в публикации ⁶⁵, и такой как Q8N884 в Uniprot для белка человека), предпочтительно, cGAS и его

25 фрагмент содержат встречающийся в природе синтазный домен, но имеют делецию части или всего N-концевого домена, предпочтительно, делецию всего N-концевого спирального удлинения (N-концевое спиральное удлинение; аминокислоты 1 – 160 cGAS человека, как описано в публикации ⁶⁵, и такое как Q8N884 в Uniprot для белка человека). Делеция части или всего N-концевого

30 домена, предпочтительно, представляет собой делецию аминокислот 1 – 59.

В предпочтительном варианте реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбраны из группы, состоящей из семейства RIG-I-подобных рецепторов (RLR) (таких как RIG-I и MDA5) и/или

их фрагментов, других белков, содержащих домен CARD, участвующих в противовирусной передаче сигналов и индукции IFN I типа (таких как MAVS), и/или их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и

5 циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS и/или их фрагментов, приводящие к стимуляции STING. Термин «другие содержащие домен CARD белки, участвующие в противовирусной передаче сигналов и индукции IFN I типа, и их фрагменты» включают MAVS, CRADD/RAIDD, RIPK2/RIP2, CARD6,

10 NOD1 и NOD2 или их фрагменты. Таким образом, в еще одном предпочтительном варианте реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбраны из группы, состоящей из семейства RIG-I-подобных рецепторов (RLR) (таких как RIG-I и MDA5) или их фрагментов, других белков, содержащих домен CARD, участвующих в

15 противовирусной передаче сигналов и индукции IFN I типа, выбранных из группы, состоящей из MAVS, CRADD/RAIDD, RIPK2/RIP2, CARD6, NOD1 и NOD2, или их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR,

20 DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагментов, приводящие к стимуляции STING.

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбраны из группы, состоящей из

25 RIG-I, MDA5, LGP2, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS или их фрагментов, более предпочтительно, выбраны из группы, состоящей из RIG-I, MAVS, MDA5, WspR, DncV, DisA-подобного белка и cGAS или их фрагментов, наиболее предпочтительно, выбраны из группы, состоящей из RIG-I или его фрагмента и cGAS или его фрагмента.

30

В более предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбран из группы, состоящей из RIG-I, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагмента, еще более предпочтительно, выбран из группы, состоящей из

RIG-I, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагмента, в частности, выбран из группы, состоящей из RIG-I, MDA5, MAVS и cGAS или их фрагмента. Фрагменты этих белков, описанные выше, являются особенно предпочтительными.

- 5 В этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент RIG-I, MDA5, MAVS обычно содержит аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из аминокислот 100 - 500, предпочтительно аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из аминокислот 100 - 400, более предпочтительно аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из аминокислот 100 - 300.

- В этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент RIG-I содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 246, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 245, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 229, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 228, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 218, и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 217, в частности, аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 245; фрагмент MDA5 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 294, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 231, и фрагмент MAVS содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 100, и аминокислотной последовательности,

содержащей по меньшей мере N-концевую аминокислоту 1 и не более чем аминокислоту 101.

В этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент RIG-I содержит, более конкретно, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 246, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 245, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 229, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 228, аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 218 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 217, еще более конкретно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 245, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 228, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 217, наиболее конкретно, аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 245; фрагмент MDA5 содержит, более конкретно, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 294 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 231; и фрагмент MAVS содержит, более конкретно, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 100 и аминокислотной последовательности от N-концевой аминокислоты 1 до аминокислоты 101.

В этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент cGAS обычно содержит аминокислотную последовательность от N-концевой аминокислоты 1 до любой из аминокислот 100 - 600, предпочтительно аминокислотную последовательность от аминокислоты 50 до любой из аминокислот 100 - 550, более предпочтительно аминокислотную последовательность от аминокислоты 60 до любой из аминокислот 100 - 530, в частности, аминокислотную последовательность от аминокислоты 60 до аминокислоты 530, аминокислотную последовательность от аминокислоты 146 до аминокислоты

507 или аминокислотную последовательность от аминокислоты 161 до аминокислоты 530, более конкретно, аминокислотную последовательность от аминокислоты 60 до аминокислоты 530 или аминокислотную последовательность от аминокислоты 161 до аминокислоты 530 cGAS человека.

5 В этом более предпочтительном варианте реализации фрагмент cGAS содержит, в частности, аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере аминокислоту 60 и не более чем аминокислоту 422, аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере аминокислоту 146 и не
10 более чем аминокислоту 507, и аминокислотной последовательности, содержащей по меньшей мере аминокислоту 161 и не более чем аминокислоту 522.

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

20

В еще более предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбран из группы, состоящей из доменов CARD RIG-I человека₁₋₂₄₅ (SEQ ID NO: 1), доменов CARD RIG-I человека₁₋₂₂₈ (SEQ ID NO: 2), доменов CARD RIG-I человека₁₋₂₁₇ (SEQ ID NO: 3),
25 доменов CARD RIG-I мыши₁₋₂₄₆ (SEQ ID NO: 4), доменов CARD RIG-I мыши₁₋₂₂₉ (SEQ ID NO: 5), доменов CARD RIG-I мыши₁₋₂₁₈ (SEQ ID NO: 6), доменов CARD MAVS человека₁₋₁₀₀ (SEQ ID NO: 7), домена CARD MAVS мыши₁₋₁₀₁ (SEQ ID NO: 8), cGAS *N. vectensis* (SEQ ID NO: 9), cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (SEQ ID NO: 10), cGAS мыши₁₄₆₋₅₀₇ (SEQ ID NO: 11), cGAS *N. vectensis*₆₀₋₄₂₂ (SEQ ID NO:
30 12), MDA5 мыши₁₋₂₉₄ (SEQ ID NO: 13), MDA5 мыши₁₋₂₃₁ (SEQ ID NO: 14), MDA5 человека₁₋₂₉₄ (SEQ ID NO: 15) и MDA5 человека₁₋₂₃₁ (SEQ ID NO: 16).

В особенно предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбран из группы, состоящей из

доменов CARD RIG-I человека₁₋₂₄₅, (SEQ ID NO: 1), доменов CARD RIG-I человека₁₋₂₂₈ (SEQ ID NO: 2), доменов CARD RIG-I человека₁₋₂₁₇ (SEQ ID NO: 3), домена CARD MAVS человека₁₋₁₀₀ (SEQ ID NO: 7) и cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (SEQ ID NO: 10).

5

RIG1B более конкретном предпочтительном варианте реализации белок, участвующий в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбран из группы, состоящей из доменов CARD RIG-I человека₁₋₂₄₅ (SEQ ID NO: 1), доменов CARD RIG-I мыши₁₋₂₄₆ (SEQ ID NO: 4), доменов CARD RIG-I мыши₁₋₂₂₉ (SEQ ID NO: 5), доменов CARD RIG-I мыши₁₋₂₁₈ (SEQ ID NO: 6) и cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (SEQ ID NO: 10), наиболее конкретно выбран из группы, состоящей из доменов CARD RIG-I человека₁₋₂₄₅ (SEQ ID NO: 1) и cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (SEQ ID NO: 10).

10

15 Семейство RIG-I-подобных рецепторов (RLR) содержит белки, выбранные из группы, состоящей из RIG-I, MDA5 и LGP2. Предпочтительные гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, представляют собой белки RIG-I и MDA5, содержащие домен CARD, в частности, белок RIG-I, содержащий домен CARD. Другие предпочтительные белки, содержащие домен CARD, участвующие в индукции IFN I типа, включают белки, выбранные из группы, состоящей из MAVS.

20

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбраны из группы белков, включающих домен CARD RIG-I, домен CARD MDA5 и/или домен CARD MAVS, и WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS, и их фрагментов, предпочтительно, выбраны из группы белков, включающих домен CARD RIG-I, домен CARD MDA5 и/или домен CARD MAVS, и WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA и cGAS, или их фрагментов.

30

В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбраны из группы, состоящей из домена CARD RIG-I, домена CARD MDA5, домена CARD MAVS,

WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, более предпочтительно, выбраны из группы, состоящей из домена CARD RIG-I, WspR, DncV, DisA-подобного белка и cGAS.

- 5 В некоторых предпочтительных вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, содержат один или несколько (например, два, три или четыре) доменов CARD, предпочтительно, содержат один или несколько (например, два, три или четыре) доменов CARD RIG-I, MDA5 и/или MAVS, предпочтительно, RIG-I и/или MAVS. В более
- 10 предпочтительном варианте реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, содержат оба домена CARD RIG-I, оба домена CARD MDA5 и/или домен CARD MAVS и cGAS, или их фрагмент, в частности, оба домена CARD RIG-I и cGAS, или их фрагмент, более конкретно, оба домена CARD RIG-I.

15

- В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбраны из группы, состоящей из белка, индуцирующего ответ IFN I типа, без ферментативной функции и белка, индуцирующего ответ IFN I типа, с ферментативной функцией. Белок,
- 20 индуцирующий ответ IFN I типа, без ферментативной функции, входящий в объем настоящего изобретения, обычно содержит по меньшей мере один домен CARD, предпочтительно два домена CARD. Домен CARD обычно состоит из пучка от шести до семи альфа-спиралей, предпочтительно, конфигурации из шести - семи антипараллельных альфа-спиралей с гидрофобным кором и
- 25 внешней поверхностью, состоящей из заряженных остатков. Белок, индуцирующий ответ IFN I типа, с ферментативной функцией, входящий в объем настоящего изобретения, обычно включает фермент, образующий циклический динуклеотид (циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ), или его домен, приводящие к стимуляции
- 30 STING, предпочтительно, диаденилатциклазу (DAC), дигуанилатциклазу (DGC) или ГМФ-АМФ-циклазу (GAC) или их домен.

В соответствии с настоящим изобретением «белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза», включают, без ограничения, Bad, Bcl2, Bak, Bmt, Bax,

Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, Araf1, каспазу 9, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 10, DFFA, DFFB, ROCK1, APP, CAD, ICAD, CAD, EndoG, AIF, HtrA2, Smac/Diablo, Arts, ATM, ATR, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), семейство IAP, LC8, PP2B, белки 14-3-3, PKA, PKC, PI3K, Erk1/2, p90RSK, TRAF2, TRADD, FADD, Дахх, каспазу 8, каспазу 2, RIP, RAIDD, MKK7, JNK, FLIP, белки FKHR, GSK3, белки CDK и их ингибиторы, такие как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) и семейство Cip1/Waf1/Kip1-2 (p21(Cip1/Waf1), p27(Kip1), p57(Kip2)). Предпочтительно применяют Bad, Bmt, Bcl2, Bak, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, каспазу 9, каспазу 3, каспазу 6, каспазу 7, Smac/Diablo, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), LC8, PP2B, TRADD, Дахх, каспазу 8, каспазу 2, RIP, RAIDD, FKHR, белки CDK и их ингибиторы, такие как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), наиболее предпочтительно, BIM, Bid, укороченный Bid, FADD, каспазу 3 (и ее субъединицы), Bax, Bad, Akt, белки CDK и их ингибиторы, такие как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d))¹¹⁻¹³. Дополнительно белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, включают DIVA, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bid и tBid, Egl-1, Bcl-Gs, цитохром С, беклин, CED-13, BNIP1, BNIP3, Bcl-B, Bcl-W, Ced-9, A1, NR13, Bfl-1, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 8.

Белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из проапоптотических белков, антиапоптотических белков, ингибиторов путей, предотвращающих апоптоз, и ингибиторов путей передачи сигналов или путей, способствующих выживанию. Проапоптотические белки включают белки, выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Araf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома С, FADD, семейства каспаз и белков CDK и их ингибиторов, таких как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), или выбранные из группы, состоящей из Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Araf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклина 1, Egl-1 и CED-13, цитохрома С, FADD и семейства каспаз. Предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Egl-1, Araf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейства каспаз, белки CDK и их ингибиторы, такие как семейство INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)). В равной

степени предпочтительными являются Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid и tBid, Bok, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, беклин 1, Egl-1 и CED-13, Smac/Diablo, FADD, семейство каспаз.

5 Антиапоптотические белки включают белки, выбранные из группы, состоящей из

Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13, семейства IAP и Bfl-1.

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

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

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

15

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из белков только-ВНЗ, каспаз и белков внутриклеточной передачи сигналов контроля апоптоза рецепторами смерти, или их фрагментов. Предпочтительными

20 являются белки только-ВНЗ или их фрагменты.

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

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

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

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

Проапоптотические белки, входящие в объем настоящего изобретения, обычно
10 содержат альфа-спиральную структуру, предпочтительно, гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и обычно содержат по меньшей мере один из доменов ВН1, ВН2, ВН3 или ВН4, предпочтительно, содержат по меньшей мере один домен ВН3. Обычно проапоптотические белки, входящие в объем настоящего изобретения, не обладают ферментативной
15 активностью.

Антиапоптотические белки, входящие в объем настоящего изобретения, обычно содержат альфа-спиральную структуру, предпочтительно, гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и содержат комбинацию различных доменов ВН1, ВН2, ВН3 и ВН4, предпочтительно, комбинацию
20 различных доменов ВН1, ВН2, ВН3 и ВН4, в которой присутствует домен ВН1 и ВН2, более предпочтительно, ВН4-ВН3-ВН1-ВН2, ВН1-ВН2, ВН4-ВН1-ВН2 или ВН3-ВН1-ВН2 (от N- к C-концу). Дополнительно в объем настоящего изобретения также входят белки, содержащие по меньшей мере один домен VIR.

25 Ингибиторы путей, предотвращающих апоптоз, входящие в объем настоящего изобретения, обычно содержат альфа-спиральную структуру, предпочтительно, гидрофобную спираль, окруженную амфипатическими спиралями, и обычно содержат один домен ВН3.

Длина каждого из доменов ВН1, ВН2, ВН3 или ВН4 обычно составляет от
30 приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот. Таким образом, в некоторых вариантах реализации гетерологичные белки, участвующие в апоптозе или регуляции апоптоза, выбраны из группы, состоящей из гетерологичных белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, длина которых составляет от приблизительно 5 до приблизительно 200,

предпочтительно, от приблизительно 5 до приблизительно 150, более предпочтительно, от приблизительно 5 до приблизительно 100, наиболее предпочтительно, от приблизительно 5 до приблизительно 50, в частности, от приблизительно 5 до приблизительно 25 аминокислот.

5

Особенно предпочтительный гетерологичный белок представляет собой домен ВНЗ индуктора апоптоза tBID, более конкретно, домен ВНЗ, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17 - 20, предпочтительно, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18.

10

В равной степени предпочтительным является домен ВНЗ регулятора апоптоза BAX, более конкретно, домен BAX, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21 - 24, предпочтительно, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22. В SEQ ID NO приведены последовательности человека и мыши, однако в равной степени включены домены ВНЗ tBID и BAX

15

всех других видов.

В соответствии с настоящим изобретением «регуляторы клеточного цикла» включают, но не ограничены перечисленными: циклины (такие как циклин А, циклин В, циклин D1, циклин D2, циклин D3, циклин Е, циклин Н), циклин-зависимые киназы (CDK, такие как CDK1, CDK2, CDK4, CDK6) и активизирующие CDK киназы (такие как CDK7), ингибиторы Cdk (такие как семейство INK4, включая INK4A, INK4B, INK4C, INK4D, и семейство Cip/Kip, которое включает p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2)), субстраты CDK (такие как продукт гена-супрессора опухоли ретинобластомы, NPAT, гистон H1, p107, p130) и белки стимулирующего анафазу комплекса/циклосомы и контрольных точек клеточного цикла (такие как Mad1, Mad2, BubR1, BUB1, p53, Mdm2, Cdc25, белки 14-3-3, Cdc20). Предпочтительные регуляторы клеточного цикла выбирают из группы, состоящей из циклинов, циклин-зависимых киназ (CDK), активизирующих CDK киназ, ингибиторов Cdk, субстратов CDK, белков стимулирующего анафазу комплекса/циклосомы и контрольных точек клеточного цикла. Более предпочтительные регуляторы клеточного цикла выбирают из группы, состоящей из циклина А, циклина В, циклина D1, циклина D2, циклина D3, циклина Е, циклина Н, CDK1, CDK2, CDK4, CDK7, INK4A, INK4B, INK4C, INK4D, Waf1 (Cip1/p21), p27 (Cip2), p57

(Kip2), NPAT, гистона H1, p107, p130, Mad1, Mad2, BubR1, BUB1, p53, Mdm2, Cdc25, белков 14-3-3 и Cdc20.

В соответствии с настоящим изобретением «белки передачи сигналов клетки»

5 включают, но не ограничены перечисленными белками:

- I. передачи сигналов цитокинов (такими как рецепторы цитокинов и интерлейкинов, такие как рецептор IL-2; адаптерные белки и киназы, такие как семейство JAK; регуляторные факторы, такие как SOCS; факторы транскрипции, такие как IRF3, или IRF9, или семейство STAT;

10 и мишени киназ/мишени из нисходящих сигнальных путей, такие как АКТ, GRB2),
- II. передачи сигналов фактора выживаемости/передачи сигналов смерти/передачи сигналов факторов роста или гормонов (такими как киназы, такие как MAPK-киназы, такие как MEK, ERK, другие киназы,

15 такие как АКТ, или PI3K, или SRC, или ATM, и комплексы киназ, такие как комплекс 1 mTOR (mTORC1); факторы транскрипции, такие как Elk1 или c-Myc; ГТФазы, такие как Ras; рецепторы факторов роста, которые обычно являются рецепторными тирозинкиназами, такими как EGFR; рецепторы гормонов, такие как рецепторы эстрогена),
- 20 III. передачи сигналов хемокинов (такими как рецепторы хемокинов, которые обычно представляют собой 7 раз пронизывающие мембрану белки/рецепторы, сопряженные с G-белком, такие как CXCR2; комплексы G-белков, такие как комплекс Gi, состоящий из субъединиц G-альфаi, G-бета и G-гамма, киназы; адаптерные белки и белки передачи

25 сигналов/регуляторы передачи сигналов, такие как фосфолипаза C, протеинкиназа C, семейство JAK, PI3K, Rho ГТФазы, такие как CDC42 или RhoA, MAPK, такие как JNK, комплекс 1 mTOR; факторы транскрипции, такие как семейство STAT или NFkB; факторы инициации трансляции, такие как eIF4E) и
- 30 IV. передачи сигналов внеклеточного матрикса/Wnt/Hedgehog (такими как лиганды WNT, такие как Wnt1 или Wnt3a; рецепторы лигандов WNT, такие как Frizzled; корецепторы LRP, такие как LRP6; бета-катенин, LGR5, аксин, APC, киназы, такие как GSK3-бета, CK1-альфа, FAK и казеин; кадгерин; убиквитин-лигазы, такие как бета-TrCP, ядерный

репрессорный комплекс, состоящий из TLE, гистондеацетилаз HDAC; Dvl, энхансеры, такие как TCF и LEF; коактиваторы, такие как p300; Rho ГТФазы, такие как Rac1; интегрины).

- Предпочтительные белки передачи сигналов клетки выбраны из группы,
- 5 состоящей из белков передачи сигналов цитокинов, белков передачи сигналов факторов выживаемости, белков передачи сигналов смерти, белков передачи сигналов факторов роста, белков передачи сигналов гормонов, белков передачи сигналов хемокинов и белков передачи сигналов внеклеточного матрикса/Wnt/Hedgehog. Более предпочтительные белки передачи сигналов
- 10 клетки выбраны из группы, состоящей из рецепторов цитокинов, таких как рецептор GM-CSF, рецептор интерферона альфа/бета, рецептор интерферона гамма, CD40 или CD120, или их адаптерных белков; рецепторов интерлейкинов, таких как рецептор IL-2, рецептор IL-7, рецептор IL-12, рецептор IL-21 или рецептор IL-18, или их адаптерных белков; киназ, таких как семейство JAK,
- 15 MAP-киназы, PI3K, Akt и комплексы киназ, такие как комплекс mTOR; факторов транскрипции, таких как IRF3 или IRF9, семейство STAT или NFkB; Rho ГТФаз, таких как CDC42, RhoA или Rac1. Еще более предпочтительные белки передачи сигналов клетки выбраны из группы, состоящей из рецептора GM-CSF, рецептора интерферона альфа/бета, рецептора интерферона гамма,
- 20 CD40, CD120 или их адаптерных белков; рецептора IL-2, рецептора IL-7, рецептора IL-12, рецептора IL-21, рецептора IL-18 или их адаптерных белков; семейства JAK, MAP-киназ, PI3K, AKT, комплекса mTOR, IRF3, IRF9, семейства STAT, NFkB, CDC42, RhoA и Rac1.
- 25 В соответствии с настоящим изобретением «репортерные белки» включают, но не ограничены перечисленными: флуоресцентные белки (такие как GFP), люциферазы или репортерные белки-ферменты (такие как щелочная фосфатаза). Предпочтительные репортерные белки представляют собой репортерные белки-ферменты.
- 30 В соответствии с настоящим изобретением «родственные GPCR белки» включают, но не ограничены перечисленными: рецепторы, сопряженные с G-белком (такие как CXCR2), комплексы G-белков (состоящие из G-альфа, G-бета и G-гамма), киназы (такие как PKA), адаптерные белки и белки передачи сигналов/регуляторы передачи сигналов (такие как фосфолипазы,

аденилатциклазы, фосфодиэстеразы), киназы (такие как протеинкиназа С (PKC) или PKA), факторы транскрипции (такие как CREB). Предпочтительные родственные GPCR белки выбраны из группы, состоящей из рецепторов, сопряженных с G-белком, комплексов G-белков, киназ, адаптерных белков, белков передачи сигналов/регуляторов передачи сигналов и факторов транскрипции. Более предпочтительные родственные GPCR белки выбраны из группы, состоящей из CXCR2, комплексов G-белков, состоящих из G-альфа, G-бета и G-гамма, PKA, фосфолипаз, аденилатциклаз, фосфодиэстераз, протеинкиназы С (PKC) и CREB.

- 5 В соответствии с настоящим изобретением «белки, слитые с нанотелами», включают, но не ограничены перечисленными: нанотела, слитые с доменами, разрушающими белки (такими как N-концевой домен F-бокс белка Slmb дрозофилы или убиквитин-лигазы; и следовательно, нанотела, слитые с белками передачи сигналов клетки или их частями), нанотела, слитые с идентичными или другими нанотелами (би- или мультиспецифические нанотела), нанотела, слитые с репортерными белками, нанотела, слитые с сигналами субклеточной локализации (такими как сигнал ядерной локализации (NLS)).
- 10 Предпочтительные белки, слитые с нанотелами, выбраны из группы, состоящей из нанотел, слитых с доменами, разрушающими белки, нанотел, слитых с белками передачи сигналов клетки или их частями, нанотел, слитых с идентичными или другими нанотелами, нанотел, слитых с репортерными белками, и нанотел, слитых с сигналами субклеточной локализации. Более предпочтительные белки, слитые с нанотелами, выбраны из группы, состоящей из нанотел, слитых с N-концевым доменом F-бокс белка Slmb дрозофилы,
- 20 нанотел, слитых с убиквитин-лигазами, нанотел, слитых с идентичными или другими нанотелами, являющихся би- или мультиспецифическими, нанотел, слитых с NLS. В соответствии с настоящим изобретением «нанотела» включают, но не ограничены перечисленными: единичные антитела, состоящие из мономерного одноцепочечного варибельного домена антитела. Фрагменты VHH верблюдовых являются примером нанотел. Предпочтительные нанотела представляют собой единичные антитела, состоящие из мономерного одноцепочечного варибельного домена антитела.
- 30

Другой особенно предпочтительный гетерологичный белок представляет собой

гетерологичный белок, содержащий домен белка, участвующего в индукции или регуляции ответа IFN I типа, более конкретно, гетерологичный белок, содержащий домен белка, участвующего в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбранного из группы, состоящей из i) домена CARD RIG-I, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - 6, ii) домена CARD MDA5, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13 - 16, предпочтительно SEQ ID NO: 15 или 16, и iii) домена CARD MAVS, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 или 8, предпочтительно SEQ ID NO: 7. Другой конкретный предпочтительный гетерологичный белок представляет собой полноразмерный cGAS, такой как cGAS *N. vectensis* (SEQ ID NO: 9), cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (SEQ ID NO: 10), cGAS₆₀₋₄₂₂ *N. vectensis* (SEQ ID NO: 12) или cGAS₁₄₆₋₅₀₇ мыши (SEQ ID NO: 11). Наиболее предпочтительными гетерологичными белками являются гетерологичные белки, содержащие домен CARD RIG-I человека (SEQ ID NO: 1 - 3), в частности, домен CARD RIG-I человека (SEQ ID NO: 1) и cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах реализации гетерологичные белки представляют собой фермент, превращающий пролекарство. В этих вариантах реализации рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий экспрессирует, предпочтительно экспрессирует и секретирует фермент, превращающий пролекарство. Фермент, превращающий пролекарство, как указано в настоящем документе, включает ферменты, превращающие нетоксичные пролекарства в токсичное лекарство, предпочтительно, ферменты, выбранные из группы, состоящей из цитозиндезаминазы, пурин-нуклеозидфосфорилазы, тимидинкиназы, бета-галактозидазы, карбоксилэстераз, нитроредуктаз, карбоксипептидаз и бета-глюкуронидаз, более предпочтительно ферменты, выбранные из группы, состоящей из цитозиндезаминазы, пурин-нуклеозидфосфорилазы, тимидинкиназы и бета-галактозидазы.

Термин «сайт расщепления протеазой» в настоящем документе обозначает специфичный аминокислотный мотив в аминокислотной последовательности, например, в аминокислотной последовательности белка или слитого белка, который расщепляется специфичной протеазой, распознающей указанный

аминокислотный мотив. Обзор см. в публикации ¹⁴. Примеры сайтов расщепления протеазой представляют собой аминокислотные мотивы, которые расщепляются протеазой, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы риновируса человека (HRV 3C), протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактор Ха и тромбина.

Следующие аминокислотные мотивы распознаются соответствующими протеазами:

10 - Asp-Asp-Asp-Asp-Lys: энтерокиназа (легкая цепь)/энтеропептидаза (SEQ ID NO: 45)

- Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro: протеаза PreScission/протеаза риновируса человека (HRV 3C) (SEQ ID NO: 46)

15 - Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser (SEQ ID NO: 47) и модифицированные мотивы на основе Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly/Ser (где X представляет собой любую аминокислоту) распознаются протеазой TEV (tobacco etch virus, вируса гравировки табака) (SEQ ID NO: 48)

-Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln-Ser: протеаза TVMV (SEQ ID NO: 49)

- Ile-(Glu или Asp)-Gly-Arg: протеаза фактор Ха (SEQ ID NO: 50)

- Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser: тромбин. (SEQ ID NO: 51).

20 Сайты рестрикции протеазой в настоящем документе включают убиквитин.

Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах реализации убиквитин используют в качестве сайта расщепления протеазой, т.е.

последовательность нуклеотидов кодирует убиквитин в качестве сайта

расщепления протеазой, который может быть расщеплен специфичными

25 убиквитин-процессирующими протеазами в N-концевом сайте, например,

который может быть расщеплен специфичными убиквитин-процессирующими

протеазами, называемыми деубиквитинизирующими ферментами, в N-концевом

сайте эндогенно в клетке, в которую был доставлен слитый белок. Убиквитин

процессируется на C-конце группой эндогенных убиквитин-специфичных C-

30 концевых протеаз (деубиквитинизирующих ферментов, DUB). Расщепление

убиквитина под действием DUB, как полагают, происходит на самом C-конце

убиквитина (после G76).

«Индивидуум», «субъект» или «пациент» представляет собой позвоночное. В некоторых вариантах реализации позвоночное представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают, без ограничения, приматов (включая человека и нечеловекообразных приматов) и грызунов (например, мышей и крыс). В предпочтительных вариантах реализации субъект представляет собой человека.

Термин «мутация» в настоящем документе используется в качестве общего термина и включает изменения как одной пары оснований, так и множества пар оснований. Такие мутации могут включать замены, мутации со сдвигом рамки считывания, делеции, вставки и укорочения.

Термин «сигнал ядерной локализации» в настоящем документе обозначает аминокислотную последовательность, которая помечает белок для импорта в ядро эукариотической клетки, и предпочтительно включает вирусный сигнал ядерной локализации, такой как NLS, полученный из большого Т-антигена SV40 (PPKKKRKV). (SEQ ID NO: 52).

Термин «сайт множественного клонирования» в настоящем документе обозначает короткую последовательность ДНК, содержащую несколько сайтов рестрикции для расщепления рестрикционными эндонуклеазами, такими как AclI, HindIII, SspI, MluCI, Tsp509I, PciI, AgeI, BspMI, BfuAI, SexAI, MluI, BceAI, HpyCH4IV, HpyCH4III, BaeI, BsaXI, AflIII, SpeI, BsrI, BmrI, BglII, AfeI, AluI, StuI, ScaI, ClaI, BspDI, PI-SceI, NsiI, AseI, SwaI, CspCI, MfeI, BssSI, BmgBI, PmlI, DraIII, AleI, EcoP15I, PvuII, AlwNI, BtsIMutI, TspRI, NdeI, NlaIII, CviAII, FatI, MslI, FspEI, XcmI, BstXI, PflMI, BccI, NcoI, BseYI, FauI, SmaI, XmaI, TspMI, Nt.CviPII, LpnPI, AciI, SacII, BsrBI, MspI, HpaII, ScrFI, BssKI, StyD4I, BsaJI, BslI, BtgI, NciI, AvrII, MnlI, BbvCI, Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, SbfI, Bpu10I, Bsu36I, EcoNI, HpyAV, BstNI, PspGI, StyI, BcgI, PvuI, BstUI, EagI, RsrII, BsiEI, BsiWI, BsmBI, Hpy99I, MspA1I, MspJI, SgrAI, BfaI, BspCNI, XhoI, EarI, AcuI, PstI, BpmI, DdeI, SfcI, AflIII, BpuEI, SmlI, AvaI, BsoBI, MboII, BbsI, XmnI, BsmI, Nb.BsmI, EcoRI, HgaI, AatII, ZraI, Tth111I PflFI, PshAI, AhdI, DrdI, Eco53kI, SacI, BseRI, PleI, Nt.BstNBI, MlyI, HinfI, EcoRV, MboI, Sau3AI, DpnII BfuCI, DpnI, BsaBI, TfiI, BsrDI, Nb.BsrDI, BbvI, BtsI, Nb.BtsI, BstAPI, SfaNI, SphI, NmeAIII, NaeI,

NgoMIV, BglI, AsiSI, BtgZI, HinP1I, HhaI, BssHII, NotI, Fnu4HI, Cac8I, MwoI, NheI, BmtI, SapI, BspQI, Nt.BspQI, BlpI, TseI, ApeKI, Bsp1286I, AlwI, Nt.AlwI, BamHI, FokI, BtsCI, HaeIII, PhoI, FseI, SfiI, NarI, KasI, SfoI, PluTI, AscI, EciI, BsmFI, ApaI, PspOMI, Sau96I, NlaIV, KpnI, Acc65I, BsaI, HphI, BstEII, AvaII,
 5 BanI, BaeGI, BsaHI, BanII, RsaI, CviQI, BstZ17I, BciVI, SalI, Nt.BsmAI, BsmAI, BcoDI, ApaLI, BsgI, AccI, Hpy166II, Tsp45I, HpaI, PmeI, HincII, BsiHKAII, ApoI, NspI, BsrFI, BstYI, HaeII, CviKI-1, EcoO109I, PpuMI, I-CeuI, SnaBI, I-SceI, BspHI, BspEI, MmeI, TaqαI, NruI, Hpy188I, Hpy188III, XbaI, BclI, HpyCH4V, FspI, PI-PspI, MscI, BsrGI, MseI, PacI, PsiI, BstBI, DraI, PspXI, BsaWI, BsaAI, EaeI,
 10 предпочтительно, XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI. Термин «сайт множественного клонирования» в настоящем документе также обозначает короткую последовательность ДНК, используемую для событий рекомбинации, как, например, в стратегии клонирования Gateway, или для способов, таких как сборка Гиббсона или клонирование в ТОРО-
 15 системе.

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

25 Термин «штамм *Yersinia* дикого типа» в настоящем документе обозначает встречающийся в природе вариант (такой как E40 *Y. enterocolitica*) или встречающийся в природе вариант, содержащий генетические модификации, позволяющие применять векторы, такие как делеционные мутации в генах
 30 рестрикционных эндонуклеаз или генах устойчивости к антибиотикам (такой как MRS40 *Y. enterocolitica* - чувствительное к ампициллину производное E40 *Y. enterocolitica*) Эти штаммы содержат хромосомную ДНК, а также немодифицированную плазмиду вирулентности (называемую pYV).

Подвид *paleartctica* *Y. enterocolitica* обозначает низкопатогенные штаммы *Y. enterocolitica*, которые отличаются от более вирулентных штаммов подвида *enterocolitica*^{15,16}. В *Y. enterocolitica* подвида *paleartctica* отсутствует, по сравнению с *Y. enterocolitica* подвида *enterocolitica*, остров высокой патогенности (high-pathogenicity island, HPI). Этот HPI кодирует сидерофор железа, называемый йерсиниабактином¹⁷. Отсутствие йерсиниабактина в *Y. enterocolitica* подвида *paleartctica* делает данный подвид менее патогенным и зависимым от индуцируемого системно доступного железа для персистентной инфекции, например, в печени или селезенке¹⁷. Железо может стать доступным для бактерии в индивидууме, например, в результате предварительного введения дефероксамина - хелатора железа, который применяют для лечения перенасыщения железом у пациентов¹⁸.

Термин «содержать» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий», обычно используют в значении «включать», то есть «включая, но не ограничиваясь», иначе говоря, допуская присутствие одного или нескольких свойств или компонентов.

Формы единственного числа включают множественное число, если в содержании явно не указано иное.

Термин «приблизительно» обозначает диапазон значений $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, формулировка «приблизительно 200» включает $\pm 10\%$ от 200 или от 180 до 220.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, который содержит

i) первую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

- ii) вторую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная
- 5 последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;
- iii) третью полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал
- 10 доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором; и
- iv) четвертую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в
- 15 рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, причем указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы
- 20 расположены на векторе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, а указанная третья и указанная четвертая полинуклеотидные молекулы расположены на хромосоме указанного штамма грамотрицательных бактерий или на внехромосомном генетическом элементе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, при
- 25 условии, что указанный внехромосомный генетический элемент не является вектором, на котором расположены указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы.

В некоторых вариантах реализации рекомбинантный штамм

30 грамотрицательных бактерий представляет собой рекомбинантный аттенуированный по вирулентности штамм грамотрицательных бактерий.

Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением можно получить путем

- 1) трансформирования штамма грамотрицательных бактерий полинуклеотидной молекулой, предпочтительно полинуклеотидной молекулой ДНК, содержащей последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок, и последовательность нуклеотидов, которая гомологична или идентична последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или которая гомологична или идентична последовательности нуклеотидов, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, причем сигнал доставки из бактериального эффекторного белка или его фрагмент кодируется на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности указанного штамма грамотрицательных бактерий. Предпочтительно, последовательность нуклеотидов, которая гомологична или идентична последовательности нуклеотидов сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту, расположена на 5'-конце последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок. Последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок, может быть фланкирована на 3'-конце последовательностью нуклеотидов, гомологичной последовательности нуклеотидов хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Эта последовательность нуклеотидов, фланкирующая гомологичный белок на его 3'-конце, может быть гомологичной последовательности нуклеотидов, лежащей в пределах 10 т.п.о. на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Эта последовательность нуклеотидов, фланкирующая гомологичный белок на его 3'-конце, может быть гомологичной последовательности нуклеотидов и может находиться в пределах того же оперона на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Трансформацию обычно проводят так, чтобы последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок, была вставлена в эндогенную плазмиду вирулентности или хромосому рекомбинантного

аттенуированного по вирулентности штамма грамотрицательных бактерий, предпочтительно, на эндогенной плазмиде вирулентности, с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, кодируемого хромосомой или эндогенной плазмидой вирулентности, 5 причём гетерологичный белок, слитый с сигналом доставки, экспрессируется и секретируется.

- 2) После этапа (или параллельно этапу) 1) рекомбинантный штамм бактерий, полученный на этапе 1), может быть трансформирован дополнительной полинуклеотидной молекулой, предпочтительно 10 полинуклеотидной молекулой ДНК, содержащей последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок, и последовательность нуклеотидов, которая гомологична или идентична последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или которая гомологична или идентична 15 последовательности нуклеотидов, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, причём сигнал доставки из бактериального эффекторного белка или его фрагмент кодируется на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности штамма грамотрицательных бактерий. Последовательность нуклеотидов 20 может быть гомологична или идентична последовательности нуклеотидов сигнала доставки из бактериального эффекторного белка или ее фрагменту, и может быть расположена на 5'-конце последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок. Последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок, 25 может быть фланкирована на 3'-конце последовательностью нуклеотидов, гомологичной последовательности нуклеотидов хромосомы или эндогенной плазмиды вирулентности с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Эта последовательность нуклеотидов, фланкирующая 30 гомологичный белок на его 3'-конце, может быть гомологичной последовательности нуклеотидов, лежащей в пределах 10 т.п.о. на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Эта последовательность нуклеотидов, фланкирующая

гомологичный белок на его 3'-конце, может быть гомологичной последовательности нуклеотидов и может находиться в пределах того же оперона на хромосоме или на эндогенной плазмиде вирулентности, что и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или ее фрагменту. Трансформацию обычно проводят так, чтобы последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок, была вставлена в эндогенную плазмиду вирулентности или хромосому рекомбинантного аттенуированного по вирулентности штамма грамотрицательных бактерий, предпочтительно, на эндогенной плазмиде вирулентности, с 3'-конца от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, кодируемого хромосомой или эндогенной плазмидой вирулентности, причем гетерологичный белок, слитый с сигналом доставки, экспрессируется и секретируется.

3) Рекомбинантный штамм бактерий, полученный в соответствии с этапами 1) и 2), может быть дополнительно генетически трансформирован одной или двумя полинуклеотидными конструкциями, такими как вектор экспрессии, содержащими одну (в случае двух векторов) или две (в случае одного вектора) последовательности нуклеотидов, кодирующие гетерологичный белок, и последовательность нуклеотидов, которая гомологична или идентична последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или которая гомологична или идентична последовательности нуклеотидов, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка. В случае, если рекомбинантный штамм бактерий, полученный в соответствии с этапами 1) и 2), трансформирован одним вектором, содержащим две последовательности нуклеотидов, кодирующие каждый из гетерологичного белка и последовательности нуклеотидов, которая гомологична или идентична последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, или которая гомологична или идентична последовательности нуклеотидов, кодирующей фрагмент сигнала доставки из бактериального эффекторного белка, в одном варианте реализации эти две последовательности могут быть слиты с образованием оперона.

Порядок этапов 1 - 3) может быть изменен, или можно объединить этапы без изменения конечного полученного рекомбинантного бактериального штамма.

- 5 В случае если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia*, эндогенная плаزمида вирулентности представляет собой pYV (plasmid of *Yersinia* Virulence, плазмида вирулентности *Yersinia*). В случае если рекомбинантный аттенуированный по вирулентности штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Salmonella*, эндогенное месторасположение для вставки представляет собой один из кластеров генов, называемых SpiI или SpiII (для острова патогенности *Salmonella*), положение, в котором эффекторный белок кодируется в другом месте или, в качестве альтернативы, одну из плазмид вирулентности *Salmonella* (SVP).
- 10
- 15 В одном варианте реализации третья и четвертая полинуклеотидные молекулы вставлены и/или расположены на эндогенной плазмиде вирулентности, предпочтительно вставлены и/или расположены на эндогенной плазмиде вирулентности в нативном сайте бактериального эффекторного белка, например, в нативном сайте фактора вирулентности, предпочтительно в случае, если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia*, в нативном сайте YopE и/или YopN или в нативном сайте другого Yop (YopO, YopP, YopM, YopT), предпочтительно в нативном сайте YopE и YopN, соответственно, или в случае, если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Salmonella*, в нативном сайте эффекторного белка, кодируемого в SpiI, SpiII или кодируемого в другом месте, предпочтительно в нативном сайте эффекторного белка, кодируемого в SpiI или SpiII, более предпочтительно в нативном сайте SopE или SteA.
- 20
- 25

- 30 В предпочтительном варианте реализации гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемые последовательностью нуклеотидов первой, второй, третьей и четвертой полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, выбраны из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа IFN I типа, выбранных из группы, состоящей из: cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKK-эпсилон, IRF3,

TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG-I, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41, LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, 5 DHX29, DHX15, Ku70, ферментов, образующих циклические динуклеотиды (циклаз циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ), таких как WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS, или их фрагментов; белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, выбранных из группы, состоящей из проапоптотических белков, 10 антиапоптотических белков, ингибиторов путей, предотвращающих апоптоз, и ингибиторов путей передачи сигналов или путей, способствующих выживанию; регуляторов клеточного цикла, выбранных из группы, состоящей из циклинов, циклин-зависимых киназ (CDK), активирующих CDK киназ, ингибиторов Cdk, субстратов CDK, белков стимулирующего анафазу комплекса/циклосомы и 15 контрольных точек клеточного цикла; белков с анкириновыми повторами; белков передачи сигналов клетки, выбранных из группы, состоящей из белков передачи сигналов цитокинов, белков передачи сигналов факторов выживаемости, белков передачи сигналов смерти, белков передачи сигналов факторов роста, белков передачи сигналов гормонов, белков передачи сигналов хемокинов и белков передачи сигналов внеклеточного матрикса/Wnt/Hedgehog; 20 репортерных белков, выбранных из группы, состоящей из флуоресцентных белков, люцифераз и ферментных репортерных белков; факторов транскрипции; протеаз; малых ГТФаз; родственных GPCR белков, выбранных из группы, состоящей из рецепторов, сопряженных с G-белком, комплексов G-белков, 25 киназ, адаптерных белков, белков передачи сигналов/регуляторов передачи сигналов и факторов транскрипции; слитых конструкций нанотел, выбранных из группы, состоящей из нанотел, слитых с доменами, разрушающими белки, нанотел, слитых с белками передачи сигналов клетки или их частями, нанотел, слитых с идентичными или другими нанотелами, нанотел, слитых с 30 репортерными белками, и нанотел, слитых с сигналами субклеточной локализации; нанотел, бактериальных эффекторов T3SS; бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков; или их фрагментов.

В одном варианте реализации последовательность нуклеотидов, кодирующая

гетерологичный белок или его фрагмент, первой полинуклеотидной молекулы и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, третьей полинуклеотидной молекулы кодируют один и тот же гетерологичный белок или его фрагмент.

- 5 В дополнительном варианте реализации последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, второй полинуклеотидной молекулы и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, четвертой полинуклеотидной молекулы, кодируют один и тот же гетерологичный белок или его фрагмент.
- 10 В предпочтительном варианте реализации последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, первой полинуклеотидной молекулы, и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, третьей полинуклеотидной молекулы, кодируют один и тот же гетерологичный белок или его фрагмент, и
- 15 последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, второй полинуклеотидной молекулы, и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, четвертой полинуклеотидной молекулы, кодируют один и тот же гетерологичный белок или его фрагмент, причем гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый
- 20 первой и третьей полинуклеотидной молекулой, отличается от гетерологичного белка или его фрагмента, кодируемого второй и четвертой полинуклеотидными молекулами.

- В более предпочтительном варианте реализации гетерологичный белок,
- 25 кодируемый последовательностью нуклеотидов первой и третьей полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из семейства RIG-I-подобных рецепторов (RLR), других белков, содержащих домен CARD, участвующих в противовирусной передаче сигналов и индукции IFN I типа, или их фрагментов, и ферментов, образующих
- 30 циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, приводящие к стимуляции STING, или их фрагментов, как описано выше. Еще более предпочтительно, гетерологичный белок, кодируемый

- последовательностью нуклеотидов первой и третьей полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из RIG-I, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагментов, как описано выше. В частности, гетерологичный белок,
- 5 кодируемый последовательностью нуклеотидов первой и третьей полинуклеотидных молекул, представляет собой cGAS или его фрагмент, например, его фрагменты, описанные выше, более конкретно, cGAS человека, представленный в SEQ ID NO: 10, или его фрагмент.
- 10 В более предпочтительном варианте реализации гетерологичный белок, кодируемый последовательностью нуклеотидов второй и четвертой полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из семейства RIG-I-подобных рецепторов (RLR), других белков, содержащих домен CARD, участвующих в противовирусной передаче сигналов
- 15 и индукции IFN I типа, или их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, приводящие к стимуляции STING, или их фрагментов, описанных выше. Еще
- 20 более предпочтительно гетерологичный белок, кодируемый последовательностью нуклеотидов второй и четвертой полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из RIG-I, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA и cGAS или их фрагментов. В частности, гетерологичный белок, кодируемый
- 25 последовательностью нуклеотидов второй и четвертой полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из RIG-I, MDA5, MAVS, WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка и CdaA, или их фрагмента. Более конкретно, гетерологичный белок, кодируемый последовательностью нуклеотидов второй и четвертой полинуклеотидных
- 30 молекул, представляет собой RIG-I или его фрагмент, как описано выше, более конкретно, фрагмент RIG-I, содержащий домен CARD, еще более конкретно, фрагмент RIG-I, предпочтительно RIG-I человека, содержащий два домена CARD, наиболее конкретно, фрагмент RIG-I человека, содержащий два домена CARD, как показано в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3,

предпочтительно, как показано в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте реализации каждая из последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок или его фрагмент, слитой в рамке с 3'-
5 концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, первой полинуклеотидной молекулы и последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок или его фрагмент, слитой в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, второй
10 полинуклеотидной молекулы функционально связаны с одним и тем же промотором. Термин «каждая функционально связана с одним и тем же промотором» означает в таком контексте, что один промотор (один и тот же промотор) запускает экспрессию гетерологичных белков с первой и второй полинуклеотидных молекул. В предпочтительном варианте реализации каждая
15 из последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок или его фрагмент, слитой в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, первой полинуклеотидной молекулы и последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок или его фрагмент, слитой в рамке с 3'-концом
20 последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, второй полинуклеотидной молекулы функционально связаны с одним и тем же промотором YopE.

В дополнительном варианте реализации последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-
25 концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, третьей полинуклеотидной молекулы и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, четвертой
30 полинуклеотидной молекулы функционально связаны с двумя различными промоторами. В предпочтительном варианте реализации последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал

доставки из бактериального эффекторного белка, третьей полинуклеотидной молекулы функционально связана с промотором Υ_{opE} , а последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал

5 доставки из бактериального эффекторного белка, четвертой полинуклеотидной молекулы функционально связана с промотором Υ_{opH} .

В следующем предпочтительном варианте реализации последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в

10 рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, первой полинуклеотидной молекулы и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом последовательности

15 нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, второй полинуклеотидной молекулы функционально связаны с одним и тем же промотором, и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом

20 последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, третьей полинуклеотидной молекулы и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, четвертой полинуклеотидной молекулы функционально связаны с двумя различными промоторами.

25

Вектор, содержащий указанные первую и вторую полинуклеотидные молекулы, может представлять собой низко-, средне- или высококопийную плазмиду. Низкокопийные плазмиды обычно присутствуют в количестве 1 - 15

копий/бактериальную клетку, предпочтительно 1 - 10 копий/бактериальную

30 клетку. Среднекопийные плазмиды обычно присутствуют в количестве 5 - 200 копий/бактериальную клетку, предпочтительно 10 - 150 копий/бактериальную клетку. Высококопийные плазмиды обычно присутствуют в количестве 100 - 1000 копий/бактериальную клетку, предпочтительно 150 - 700

копий/бактериальную клетку.

В предпочтительном варианте реализации вектор, содержащий указанные первую и вторую полинуклеотидные молекулы, представляет собой среднекопийную плазмиду. В предпочтительном варианте реализации вектор представляет собой среднекопийную плазмиду с 5 - 200

5 копиями/бактериальную клетку, т.е. 5 - 200 копий плазмиды присутствует в одной бактериальной клетке, предпочтительно 10 - 150 копий/бактериальную клетку, т.е. 10 - 150 копий плазмиды присутствует в одной бактериальной клетке.

10 В одном варианте реализации вектор, содержащий указанные первую и вторую полинуклеотидные молекулы, представляет собой плазмиду, которая имеет размер без вставки от 1 до 15 кДа, предпочтительно от 2 до 10 кДа, более предпочтительно от 3 до 7 кДа.

15 В одном варианте реализации внехромосомный генетический элемент представляет собой эндогенную плазмиду вирулентности, предпочтительно эндогенную плазмиду вирулентности, которая естественным образом (в природе) кодирует белки системы секреции III типа. В предпочтительном варианте реализации указанный внехромосомный генетический элемент
20 представляет собой эндогенную плазмиду вирулентности pYV.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Pseudomonas*. В одном варианте реализации
25 рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий выбран из группы, состоящей из родов *Yersinia* и *Salmonella*. Предпочтительно рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia*, более предпочтительно штамм *Yersinia enterocolitica*. Наиболее предпочтительным является *Yersinia enterocolitica* E40 (O:9, биотип 2)¹⁹ или его чувствительные к
30 ампициллину производные, такие как *Y. enterocolitica* MRS40 (также называемый *Y. enterocolitica* подвида *paleoartica* MRS40), описанные в публикации²⁰. *Y. enterocolitica* E40 и его производное *Y. enterocolitica* MRS40, описанные в публикации²⁰, идентичны *Y. enterocolitica* подвида *paleoartica* E40 и его производному *Y. enterocolitica* подвида *paleoartica* MRS40, описанным в

публикациях^{15,17,21}. Также предпочтительно рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Salmonella*, более предпочтительно штамм *Salmonella enterica*. Наиболее предпочтительным является *Salmonella enterica*, серовар Тифимуриум SL1344, описанный в коллекции культур Управления здравоохранения Англии (NCTC 13347).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм, который не продуцирует сидерофор, например, является дефицитным по продукции сидерофора, предпочтительно не продуцирует сидерофоры, например, является дефицитным по продукции любого сидерофора. Такой штамм представляет собой, например, *Y. enterocolitica* подвида *paleoartica* MRS40, описанный в публикациях^{15,17,20,21}, который не продуцирует йерсиниабактин и который является предпочтительным.

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

В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнал доставки из бактериального эффекторного белка представляет собой сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, выбранного из группы, состоящей из бактериального эффекторного белка T3SS или его N-концевого фрагмента, бактериального эффекторного белка T4SS или его N-концевого фрагмента и бактериального эффекторного белка T6SS или его N-концевого фрагмента. В одном варианте реализации настоящего изобретения сигнал доставки из бактериального эффекторного белка представляет собой бактериальный эффекторный белок T3SS, включающий бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, причем эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент могут содержать сайт связывания шаперонов. Эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент, который содержит сайт связывания шаперонов, является в особенности пригодным в качестве сигнала доставки в настоящем изобретении. Предпочтительные эффекторные

белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из SopE, SopE2, SptP, YopE, ExoS, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SseJ, Sse, SrfH, YopJ, AvrA, AvrBsT, YopT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG, OspI, IpaH, SspH1, VopF, ExoS, ExoT,

5 HopAB2, XopD, AvrRpt2, HopAO1, HopPtoD2, HopU1, белков семейства GALA, AvrBs2, AvrD1, AvrBS3, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEpto, AvrPpiBpto, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD и AvrXv3.

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

В равной степени предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из SopE, SopE2, SptP, SteA, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SifB, SseJ, Sse, SrfH, YopJ, AvrA, AvrBsT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG, OspI, IpaH, VopF, ExoS, ExoT, HopAB2, AvrRpt2, HopAO1, HopU1, белков семейства GALA, AvrBs2, AvrD1, YopO, YopP, YopE, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEpto, AvrPpiBpto, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD и AvrXv3. В равной степени более предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из SopE, SptP, SteA, SifB, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopT, среди которых в равной степени наиболее предпочтительные эффекторные белки T3SS или их N-концевые фрагменты выбраны из группы, состоящей из IpgB1, SopE, SopB, SptP, SteA, SifB, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE и YopT, в частности, SopE, SteA или YopE или их N-концевых фрагментов, более конкретно, SteA или YopE или их N-концевых фрагментов, наиболее конкретно, YopE или его N-концевого фрагмента.

30

В некоторых вариантах реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка первой, второй, третьей и четвертой полинуклеотидных молекул представляет собой один и тот же сигнал доставки. В

предпочтительном варианте реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка первой, второй, третьей и четвертой полинуклеотидных молекул представляет собой сигнал доставки из бактериального эффекторного белка T3SS, предпочтительно, один и тот же сигнал доставки из бактериального эффекторного белка T3SS. В более предпочтительном варианте реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка первой, второй, третьей и четвертой полинуклеотидных молекул содержит эффекторный белок YopE или его N-концевой фрагмент.

В некоторых вариантах реализации сигнал доставки из бактериального эффекторного белка кодируется последовательностью нуклеотидов, содержащей бактериальный эффекторный белок или его N-концевой фрагмент, причем его N-концевой фрагмент содержит по меньшей мере первые 10, предпочтительно по меньшей мере первые 20, более предпочтительно по меньшей мере первые 100 аминокислот бактериального эффекторного белка T3SS. Термин «по меньшей мере первые 10 аминокислот бактериального эффекторного белка T3SS» обозначает первые 10 NH₂-концевых (также называемых N-концевыми) аминокислот бактериального эффекторного белка T3SS.

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

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

- сайт связывания шаперона SycE, такой как N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE, обозначенный в настоящем документе как YopE₁₋₁₃₈ и представленный в SEQ ID NO: 25, или эффекторный белок SopE или его N-концевой фрагмент,
- 5 содержащий сайт связывания шаперона InvB, такой как N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий 81 или 105 N-концевых аминокислот эффекторного белка SopE, обозначенный в настоящем документе как SopE₁₋₈₁ или SopE₁₋₁₀₅, соответственно, и представленный в SEQ ID NO: 26 и 27.
- 10 В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia*, и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка содержит эффекторный белок YopE или его N-концевую часть, предпочтительно эффекторный белок YopE *Y. enterocolitica* или его N-концевую часть. Предпочтительно, сайт связывания
- 15 SycE содержится в N-концевой части эффекторного белка YopE. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE может содержать 12, 16, 18, 52, 53, 80 или 138 N-концевых аминокислот^{22-24, 68}. Наиболее предпочтительным является N-концевой фрагмент эффекторного белка YopE, содержащий 138 N-концевых аминокислот эффекторного белка YopE, например, описанный в
- 20 публикации Forsberg и Wolf-Watz²⁵, обозначенный в настоящем документе как YopE₁₋₁₃₈ и представленный в SEQ ID NO: 25.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Salmonella*, и сигнал

25 доставки из бактериального эффекторного белка, кодируемый последовательностью нуклеотидов, содержит эффекторный белок SopE или SteA или его N-концевую часть, предпочтительно эффекторный белок SopE или SteA *Salmonella enterica* или его N-концевую часть. Предпочтительно сайт связывания шаперонов содержится в N-концевой части эффекторного белка

30 SopE. В связи с этим N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE может содержать 81 или 105 N-концевых аминокислот. Наиболее предпочтительным является полноразмерный SteA (SEQ ID NO: 28) и N-концевой фрагмент эффекторного белка SopE, содержащий 105 N-концевых аминокислот эффекторного белка, например, описанный в SEQ ID NO: 27.

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

20 В одном варианте реализации рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий является дефицитным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, более предпочтительно является дефицитным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, который является вирулентным в отношении
25 эукариотических клеток, еще более предпочтительно является дефицитным по продукции по меньшей мере одного эффекторного белка T3SS, наиболее предпочтительно является дефицитным по продукции по меньшей мере одного эффекторного белка T3SS, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные
30 штаммы грамотрицательных бактерий являются дефицитными по продукции по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух, более предпочтительно по меньшей мере трех, еще более предпочтительно по меньшей мере четырех, в частности, по меньшей мере пяти, более конкретно, по меньшей мере шести, наиболее конкретно, всех бактериальных эффекторных

белков, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий являются дефицитными по продукции по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере двух, более

5 предпочтительно по меньшей мере трех, еще более предпочтительно по меньшей мере четырех, в частности, по меньшей мере пяти, более конкретно, по меньшей мере шести, наиболее конкретно, всех функциональных бактериальных эффекторных белков, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток, так что полученный рекомбинантный

10 штамм грамотрицательных бактерий продуцирует меньше бактериальных эффекторных белков или продуцирует бактериальные эффекторные белки в меньшей степени по сравнению с не аттенуированным по вирулентности штаммом грамотрицательных бактерий дикого типа, т.е. по сравнению со штаммом грамотрицательных бактерий дикого типа, который обычно

15 продуцирует бактериальные эффекторные белки, или так что полученный рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий больше не продуцирует какие-либо функциональные бактериальные эффекторные белки, которые являются вирулентными в отношении эукариотических клеток.

20 В соответствии с настоящим изобретением такой мутантный штамм грамотрицательных бактерий, т.е. такой рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, который является дефицитным по продукции по меньшей мере одного бактериального эффекторного белка, например, который является дефицитным по продукции по меньшей мере одного бактериального

25 эффекторного белка, который является вирулентным в отношении эукариотических клеток, например, такой мутантный штамм *Yersinia* может быть получен посредством введения по меньшей мере одной мутации в по меньшей мере один ген, кодирующий эффектор. Предпочтительно такие гены, кодирующие эффектор, включают YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopP/YopJ

30 и YopT, если речь идет о штамме *Yersinia*. Предпочтительно, такие гены, кодирующие эффектор, включают AvrA, CigR, GogB, GtgA, GtgE, PipB, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopB/SigD, SopA, SpiC/SsaB, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SopD, SopE, SopE2, SspH1, SspH2, PipB2, SifA, SopD2, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SteC, SteA, SteB, SteD, SteE, SpvB,

SpvC, SpvD, SrfJ, SptP, если речь идет о штамме *Salmonella*. Наиболее предпочтительно все гены, кодирующие эффектор, делетированы. Специалист в данной области техники может применять любое количество стандартных методик для получения мутаций в данных эффекторных генах T3SS. В руководстве Sambrook et al. в общем виде описаны данные методики. См. Sambrook et al. ²⁶.

В соответствии с настоящим изобретением мутацию можно ввести в область промотора гена, кодирующего эффектор, так чтобы экспрессия такого эффекторного гена была устранена.

- 10 Мутацию также можно ввести в кодирующую область гена, кодирующего эффектор, так чтобы каталитическая активность кодируемого эффекторного белка была устранена. «Каталитическая активность» эффекторного белка обычно обозначает функцию эффекторного белка, направленную против клетки-мишени, т.е. токсичность. Такая активность регулируется
- 15 каталитическими мотивами в каталитическом домене эффекторного белка. Подходы для идентификации каталитического домена и/или каталитических мотивов эффекторного белка хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, публикации ^{27,28}.
- Соответственно, одна предпочтительная мутация в соответствии с настоящим изобретением представляет собой делецию всего каталитического домена.
- 20 Другая предпочтительная мутация представляет собой мутацию со сдвигом рамки считывания в гене, кодирующем эффектор, так что каталитический домен не присутствует в белковом продукте, экспрессированном с такого гена «со сдвигом рамки считывания». Наиболее предпочтительная мутация представляет
- 25 собой мутацию с делецией всей кодирующей области эффекторного белка. Настоящим изобретением также предусмотрены другие мутации, такие как небольшие делеции или замены пар оснований, которые вводят в каталитические мотивы эффекторного белка и которые приводят к нарушению каталитической активности данного эффекторного белка.
- 30 Мутации, которые вводят в гены функциональных бактериальных эффекторных белков, можно ввести в конкретный штамм с помощью множества способов. Один из таких способов включает клонирование мутированного гена в вектор-«самоубийцу», который способен вводить мутированную последовательность в штамм в результате аллельного обмена. Пример такого вектора-«самоубийцы»

описан в публикации ²⁹.

Таким образом, мутации, полученные во множестве генов, можно последовательно ввести в штамм грамотрицательных бактерий, получая полимутантный, например, шестикратно мутантный рекомбинантный штамм.

5 Порядок, в котором вводят данные мутантные последовательности, неважен. При определенных условиях может потребоваться ввести мутации только в некоторые, но не во все эффекторные гены. Соответственно, в настоящем изобретении также предусмотрен полимутантный *Yersinia*, отличный от шестикратно мутантного *Yersinia*, например, двукратно мутантный, трехкратно
10 мутантный, четырехкратно мутантный и пятикратно мутантный штаммы. Для цели доставки белков система секреции и транслокации настоящего мутантного штамма должна быть интактной.

Предпочтительный рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением представляет собой шестикратно

15 мутантный штамм *Yersinia*, в котором все гены, кодирующие эффектор (которые представляют собой *yopH*, *yopO*, *yopP*, *yopE*, *yopM*, *yopT*), мутированы, так что полученный в результате *Yersinia* больше не продуцирует каких-либо функциональных эффекторных белков. Такой шестикратно мутантный штамм *Yersinia* обозначают как ДуорН, О, Р, Е, М, Т для *Y.*

20 *enterocolitica*. В качестве примера, такой шестикратно мутант может быть получен из штамма *Y. enterocolitica* MRS40 с получением *Y. enterocolitica* MRS40 ДуорН, О, Р, Е, М, Т (также называемого в настоящем документе *Y. enterocolitica* подвида *palearctica* MRS40 ДуорН, О, Р, Е, М, Т или *Y. enterocolitica* ДуорН, О, Р, Е, М, Т), который является предпочтительным. *Y.*

25 *enterocolitica* MRS40 ДуорН, О, Р, Е, М, Т, который является дефицитным по продукции йерсиниабактина, был описан в публикации WO02077249 и был депонирован 24^{ого} сентября 2001 года согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в бельгийских Согласованных коллекциях

30 микроорганизмов (ВССМ); данному штамму был присвоен учетный номер LMG P-21013.

В равной степени предпочтительным является *Y. enterocolitica* MRS40 ДуорН,О, Р, Е, М, Т, который содержит делецию на эндогенной плазмиде вирулентности *pYV*, устраняющую шпилечную структуру РНК или ее части, такую как

делеция шпильки I, расположенной против хода транскрипции от гена, кодирующего эндогенный ДНК-связывающий белок типа AraC (Δ HairpinI-virF), такой как *Y. enterocolitica* MRS40 Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ HairpinI-virF (также называемый *Y. enterocolitica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ HairpinI-virF). В равной

5 степени предпочтительным является *Y. enterocolitica* MRS40 Δ уорН, О, Р, Е, М, Т, который содержит делецию хромосомного гена, кодирующего *asd*, и эндогенную плазмиду вирулентности pYV, содержащую последовательность нуклеотидов, которая содержит ген, кодирующий *asd*, функционально связанный с промотором (pYV-*asd*), такой как *Y. enterocolitica* MRS40 Δ уорН, О,

10 Р, Е, М, Т Δ asd pYV-*asd* (также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd pYV-*asd*). В особенности предпочтительным является *Y. enterocolitica* MRS40 Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd Δ HairpinI-virF pYV-*asd*, который содержит обе модификации, описанные выше (также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т

15 Δ asd Δ HairpinI-virF pYV-*asd*). В особенности предпочтительными штаммами являются *Y. enterocolitica* MRS40 Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ HairpinI-virF (также называемый *Y. enterocolitica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ HairpinI-virF), *Y. enterocolitica* MRS40 Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd pYV-*asd* (также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd pYV-*asd*) или *Y.*

20 *enterocolitica* MRS40 Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd Δ HairpinI-virF pYV-*asd* (также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd Δ HairpinI-virF pYV-*asd*), которые являются дефицитными по продукции сидерофора, предпочтительно не продуцируют сидерофоры, например, являются дефицитными по продукции любого сидерофора, как в случае всех

25 штаммов *Y. enterocolitica* подвида *palearctica*. Таким образом, в равной степени особенно предпочтительными штаммами являются *Y. enterocolitica* подвида *palearctica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ HairpinI-virF (также называемый *Y. enterocolitica* подвида *palearctica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ HairpinI-virF), *Y. enterocolitica* подвида *palearctica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd pYV-*asd*, также

30 называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd pYV-*asd*) или *Y. enterocolitica* подвида *palearctica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd Δ HairpinI-virF pYV-*asd* (также называемый в настоящем документе *Y. enterocolitica* Δ уорН, О, Р, Е, М, Т Δ asd Δ HairpinI-virF pYV-*asd*).

Наиболее предпочтительным является шестикратно мутантный штамм *Yersinia enterocolitica*, который обозначают как ΔyopH, O, P, E, M, T.

5 Конструкции полинуклеиновой кислоты, такие как векторы, которые можно
применять в соответствии с настоящим изобретением для трансформации
штамма грамотрицательных бактерий, могут зависеть от используемых
штаммов грамотрицательных бактерий, как известно специалисту в данной
области техники. Конструкции полинуклеиновых кислот, которые можно
10 применять в соответствии с настоящим изобретением, включают векторы
экспрессии (включая синтетические или полученные иным способом
модифицированные версии эндогенных плазмид вирулентности), векторы для
вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности и последовательности
нуклеотидов, такие как, например, фрагменты ДНК для вставки в хромосому
или в плазмиду вирулентности. Векторы экспрессии, которые пригодны,
15 например, для штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*,
представляют собой, например, плазмиды pUC, pBad, pACYC, pUCP20 и pET.
Векторы для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности, которые
пригодны, например, для штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или
Pseudomonas, представляют собой, например, pKNG101. Вставка в хромосому
20 или в плазмиду вирулентности фрагментов ДНК обозначает способы,
применяемые, например, в штамме *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или
Pseudomonas, такие как, например, генетическая инженерия лямбда-red.
Векторы для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности или
фрагменты ДНК для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности могут
25 вставлять последовательности нуклеотидов в соответствии с настоящим
изобретением, так что, например, последовательность нуклеотидов,
кодирующая гетерологичный белок, слитая в рамке с 3'-концом
последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из
бактериального эффекторного белка, функционально связана с эндогенным
30 промотором рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий. Таким
образом, если применяют вектор для вставки в хромосому или в плазмиду
вирулентности или фрагмент ДНК для вставки в хромосому или в плазмиду
вирулентности, то эндогенный промотор может кодироваться эндогенной
бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной ДНК), и только

соответствующая последовательность нуклеотидов будет предоставлена сконструированным вектором для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности, либо фрагментом ДНК для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности. В качестве альтернативы, если применяют вектор для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности или конструкцию полинуклеиновой кислоты, такую как, например, последовательность нуклеотидов для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности, то эндогенный промотор и сигнал доставки из бактериального эффекторного белка могут кодироваться эндогенной бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной ДНК), и только конструкция полинуклеиновой кислоты, такая как, например, последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок, будет предоставлена вектором для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности, либо конструкцией полинуклеиновой кислоты, такой как, например, последовательность нуклеотидов для вставки в хромосому или в плазмиду вирулентности. Таким образом, не требуется, чтобы промотор обязательно содержался в векторе, применяемом для трансформации рекомбинантных штаммов грамотрицательных бактерий, т.е. рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением могут быть трансформированы вектором, который не содержит промотор.

Предпочтительный вектор, например, предпочтительный вектор экспрессии для *Yersinia*, выбран из группы, состоящей из pBad_Si_1, pBad_Si_2 и pT3P-715, pT3P-716 и pT3P-717. pBad_Si2 был сконструирован путем клонирования фрагмента SycE-YopE₁₋₁₃₈, содержащего эндогенные промоторы для YopE и SycE, из очищенного pYV40 в сайт KpnI/HindIII pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BglII pBad-MycHisA путем расщепления, обработку фрагментом Кленова и повторное лигирование. Дополнительно на 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ были добавлены следующие сайты рестрикции: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII). pBad_Si1 аналогичен pBad_Si2, но кодирует EGFP, амплифицированный из pEGFP-C1 (Clontech), в сайте NcoI/BglII под контролем индуцируемого арабинозой промотора. В равной степени предпочтительным является применение модифицированных версий эндогенной плазмиды вирулентности pYV *Yersinia*, кодирующих

гетерологичные белки в виде слитых с сигнальной последовательностью T3SS белков.

Предпочтительный вектор, например, предпочтительный вектор экспрессии для *Salmonella*, выбран из группы, состоящей из pT3P_267, pT3P_268 и pT3P_269.

5 Плазмиды pT3P_267, pT3P_268 и pT3P_269, содержащие соответствующий эндогенный промотор и полноразмерную последовательность SteA (pT3P_267), фрагмент SopE₁₋₈₁ (pT3P_268) или фрагмент SopE₁₋₁₀₅ (pT3P_269), амплифицировали из геномной ДНК SL1344 *S. enterica* и клонировали в сайт NcoI/KpnI pBad-MycHisA (Invitrogen).

10 pT3P-715 представляет собой полностью синтетическую плазмиду (первично синтезированный вектор) со свойствами, аналогичными pSi_2, при этом соответствующая кодирующая область AraC была удалена, а ген устойчивости к ампициллину (плюс 70 п.о. против хода транскрипции от него) заменен геном устойчивости к хлорамфениколу с областью 200 п.о. против хода транскрипции от нее. Для ясности, pT3P-715 содержит фрагмент SysE-YopE₁₋₁₃₈, содержащий эндогенные промоторы для YopE и SysE из pYV40, где на 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ были добавлены следующие сайты рестрикции: XbaI-XhoI-BstBI-HindIII. Он содержит точку начала репликации pBR322 и хлорамфениколацетилтрансферазу (cat) из мобильного генетического элемента Tn9⁶⁷.

pBad_Si2 и pT3P-715 представляют собой среднекопийные плазмиды с точкой начала репликации pBR322 (pMB1) (SEQ ID NO: 29).

Производное pT3P-716 представляет собой высококопийную плазмиду, полученную в результате точечной мутации в точке начала репликации pBR322 (SEQ ID NO: 29), в результате которой затем получают точку начала репликации ColE1 (SEQ ID NO: 30). Высококопийные плазмиды для экспрессии и доставки гетерологичных белков-грузов получены на основе pT3P-716.

Производное pT3P-717 представляет собой низкокопийную плазмиду, полученную на основе точки начала репликации pBR322, как в pT3P-715, но дополнительно содержащую ген gor («repressor of primer», репрессор праймера) (SEQ ID NO: 31). Низкокопийные плазмиды для экспрессии и доставки грузов-гетерологичных белков получены на основе pT3P-717.

Полинуклеотидные молекулы в соответствии с настоящим изобретением могут содержать другие элементы последовательности, такие как 3'-последовательность терминации (включая стоп-кодон и поли(А)-последовательность) или ген, придающий лекарственную устойчивость, который позволяет проводить селекцию трансформантов, получивших полинуклеотидные молекулы, или другой элемент, позволяющий проводить селекцию трансформантов.

Рекомбинантные штаммы грамотрицательных бактерий можно трансформировать полинуклеотидными молекулами в соответствии с настоящим изобретением множеством известных способов. Для целей настоящего изобретения способы трансформации с целью введения полинуклеотидных молекул включают, без ограничения, электропорацию, трансформацию, опосредованную фосфатом кальция, конъюгацию или их комбинации. Например, полинуклеотидными молекулами, например, расположенными на векторе, можно трансформировать первый штамм бактерий с помощью стандартной процедуры электропорации. Затем такая полинуклеотидная молекула, например, расположенная на векторе, может быть перенесена из первого штамма бактерий в требуемый штамм путем конъюгации - процесса, также называемого «мобилизацией». Можно осуществить селекцию трансформанта (т.е. штаммов грамотрицательных бактерий, поглотивших вектор), например, с помощью антибиотиков. Данные методики хорошо известны в данной области техники. См., например, публикацию ¹⁹.

В соответствии с настоящим изобретением промотор, функционально связанный с бактериальным эффекторным белком рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой нативный промотор эффекторного белка T3SS соответствующего штамма или совместимого штамма бактерий, или другой нативный промотор соответствующего или совместимого штамма бактерий, или промотор, применяемый в векторах экспрессии, которые пригодны, например, для штамма *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* или *Pseudomonas*, например, pUC и pBad. Такие промоторы представляют собой промотор T7, промотор Plac или индуцируемый арабинозой промотор Ara-bad.

Если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой

штамм *Yersinia*, промотор может быть получен из гена вирулона *Yersinia*. «Ген вирулона *Yersinia*» обозначает гены на плазмиде pYV *Yersinia*, экспрессия которых контролируется как температурой, так и осуществлением контакта с клеткой-мишенью. Такие гены включают гены, кодирующие элементы аппарата секретиции (гены Ysc), гены, кодирующие транслокаторы (YopB, YopD и LcrV), гены, кодирующие контрольные элементы (YopN, TyeA и LcrG), гены, кодирующие шапероны эффекторных T3SS (SycD, SycE, SycH, SycN, SycO и SycT), и гены, кодирующие эффекторы (YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopT и YopP/YopJ), а также другие белки, кодируемые pYV, такие как VirF и YadA.

5

10 В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор T3SS. Если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia*, то промотор выбирают из промоторов любого одного из YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM и YopP/YopJ. Более

15 предпочтительно промотор получен из YopE и/или YopH. Наиболее предпочтительными являются промотор YopE и промотор YopH, соответственно.

Если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Salmonella*, то промотор может быть получен из острова патогенности

20 SpiI или SpiII или из эффекторного белка, кодируемого в другом месте. Такие гены включают гены, кодирующие элементы аппарата секретиции, гены, кодирующие транслокаторы, гены, кодирующие контрольные элементы, гены, кодирующие шапероны эффекторных T3SS, и гены, кодирующие эффекторы, а также другие белки, кодируемые SPI-1 или SPI-2. В предпочтительном варианте

25 реализации настоящего изобретения промотор представляет собой нативный промотор гена, кодирующего функциональный эффектор T3SS. Если рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Salmonella*, то промотор выбирают из промоторов любого одного из эффекторных белков. Более предпочтительно промотор получен из SopE, InvB

30 или SteA.

В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой искусственно индуцируемый промотор, такой как, например, индуцируемый IPTG промотор, индуцируемый светом промотор и индуцируемый арабинозой промотор.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую сайт расщепления протеазой. Сайт расщепления протеазой обычно расположен на полинуклеотидной молекуле, которая содержит

5 последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, между последовательностью нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок, и последовательностью нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки. Получение функционального и в

10 общем виде применимого сайта расщепления позволяет отщеплять сигнал доставки после транслокации. Поскольку сигнал доставки может препятствовать правильной локализации и/или функционированию транслоцированного белка в клетках-мишенях, введение сайта расщепления протеазой между сигналом доставки и белком, представляющим интерес,

15 позволяет доставку в эукариотические клетки практически нативных белков. Предпочтительно сайт расщепления протеазой представляет собой аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой или ее каталитическими доменами, выбранной из группы, состоящей из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы 3С риновируса

20 человека, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактор Ха и тромбина, более предпочтительно аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой TEV. В равной степени предпочтительный сайт расщепления протеазой представляет собой аминокислотный мотив, который расщепляется протеазой или ее каталитическими доменами, выбранной из группы, состоящей

25 из энтерокиназы (легкой цепи), энтеропептидазы, протеазы PreScission, протеазы 3С риновируса человека, протеазы TEV, протеазы TVMV, протеазы фактор Ха, процессирующей убиквитин протеазы, называемой деубиквитинизирующими ферментами, и тромбина. Наиболее предпочтительным является аминокислотный мотив, который расщепляется

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

а) протеаза транслоцируется в эукариотическую клетку рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий, как описано в настоящем документе, который экспрессирует слитый белок, содержащий сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, и протеазу в качестве гетерологичного

5 белка; или

б) протеаза экспрессируется конститутивно или временно в эукариотической клетке.

Обычно рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, применяемый для доставки необходимого белка в эукариотическую клетку, и

10 рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, транслоцирующий протеазу в эукариотическую клетку, различны.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий содержит дополнительную последовательность

15 нуклеотидов, кодирующую молекулу для мечения или акцепторный сайт для молекулы для мечения. Дополнительная последовательность нуклеотидов, кодирующая молекулу для мечения или акцепторный сайт для молекулы для мечения, обычно слита с 5'-концом или с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок. Предпочтительная молекула

20 для мечения или акцепторный сайт для молекулы для мечения выбраны из группы, состоящей из усиленного зеленого флуоресцентного белка (enhanced green fluorescent protein, EGFP), кумарина, акцепторного сайта кумаринлигазы, резорурфина, акцепторного сайта резорурфинлигазы, тетрацистеинового мотива, применяемого с красителем FlAsH/ReAsH (Life Technologies). Наиболее

25 предпочтительным является резорурфин и акцепторный сайт резорурфинлигазы или EGFP. Применение молекулы для мечения или акцепторного сайта для молекулы для мечения приведет к присоединению молекулы для мечения к гетерологичному белку, представляющему интерес, который затем будет доставлен в таком виде в эукариотическую клетку и сделает возможным

30 отслеживание белка, например, с помощью микроскопии живых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий содержит дополнительную последовательность нуклеотидов, кодирующую пептидную метку. Дополнительная

последовательность нуклеотидов, кодирующая пептидную метку, обычно слита с 5'-концом или с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок. Предпочтительная пептидная метка выбрана из группы, состоящей из метки Muc, метки His, метки Flag, метки HA, метки Strep или метки V5 или комбинации двух или более меток из данной группы. Наиболее предпочтительными являются метка Muc, метка Flag, метка His и комбинация меток Muc и His. Применение пептидной метки обеспечит возможность отслеживать меченный белок, например, с помощью иммунофлуоресценции или вестернблоттинга с применением антител против метки. Дополнительно применение пептидной метки позволяет проводить аффинную очистку необходимого белка после секреции в супернатант культуры или после транслокации в эукариотические клетки, в обоих случаях с применением способа очистки, подходящего для соответствующей метки (например, металл-хелатной аффинной очистки при применении с меткой His или очистки на основе антитела против Flag при применении с меткой Flag).

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий содержит дополнительную последовательность нуклеотидов, кодирующую сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS). Дополнительная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал ядерной локализации (NLS), обычно слита с 5'-концом или с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок, причем указанная дополнительная последовательность нуклеотидов кодирует сигнал ядерной локализации (NLS). Предпочтительный NLS выбран из группы, состоящей из NLS большого Т-антигена SV40 и его производных³⁰, а также других вирусных NLS. Наиболее предпочтительным является NLS большого Т-антигена SV40 и его производные.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий содержит сайт множественного клонирования. Сайт множественного клонирования обычно расположен на 3'-конце последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, и/или на 5'-конце или 3'-конце последовательности нуклеотидов, кодирующей гетерологичный белок. В

векторе может содержаться один или более одного сайта множественного клонирования. Предпочтительный сайт множественного клонирования выбран из группы сайтов рестрикционных ферментов, состоящей из сайтов XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI. Наиболее предпочтительными являются сайты XbaI, XhoI, BstBI и HindIII.

Слитый белок, экспрессируемый рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий в соответствии с настоящим изобретением, также называют «слияние белков» или «гибридный белок», т.е. слитый белок или гибриды сигнала доставки и гетерологичного белка. Слитый белок может также содержать, например, сигнал доставки и два или более различных гетерологичных белков.

В соответствии с настоящим изобретением предложен штамм грамотрицательных бактерий, описанный в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, содержащий

20 i) первую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из

25 бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

ii) вторую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная

30 последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

iii) третью полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал

доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором; и iv) четвертую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, причем указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы расположены на векторе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, а указанная третья и указанная четвертая полинуклеотидные молекулы расположены на хромосоме указанного штамма грамотрицательных бактерий или на внехромосомном генетическом элементе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, при условии, что указанный внехромосомный генетический элемент не является вектором, на котором расположены указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы, для применения в качестве лекарственного средства.

20

В соответствии с настоящим изобретением также предложены способы лечения рака у субъекта, например, лечения злокачественных солидных опухолей, включающие доставку гетерологичных белков, как описано выше в настоящем документе, в клетки рака, например, в клетки злокачественной солидной опухоли или в клетки микроокружения опухоли.

25

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, содержащий i) первую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

30

ii) вторую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная

5 последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором;

iii) третью полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал

10 доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором; и

iv) четвертую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в

15 рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором, причем указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы

20 расположены на векторе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, а указанная третья и указанная четвертая полинуклеотидные молекулы расположены на хромосоме указанного штамма грамотрицательных бактерий или на внехромосомном генетическом элементе, который содержится в указанном штамме грамотрицательных бактерий, при

25 условии, что указанный внехромосомный генетический элемент не является вектором, на котором расположены указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы, для применения в способе лечения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту указанного рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, причем

30 рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

Аналогично, в соответствии с настоящим изобретением предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту описанного выше рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий,

причем рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

Аналогично, в соответствии с настоящим изобретением предложено применение описанного выше рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий для производства лекарственного средства для лечения рака у субъекта.

Аналогично, в соответствии с настоящим изобретением предложено применение описанного выше рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий для лечения рака у субъекта.

10

Белки можно доставить, т.е. транслоцировать в клетку рака, например, в клетки злокачественной солидной опухоли, во время введения рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий субъекту, или их можно доставить, т.е. транслоцировать в клетку рака, например, в клетки злокачественной солидной

15

опухоли, или в клетки микроокружения опухоли, в более позднее время, например, после того, как рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий достигнет клетки рака, например, очага злокачественной солидной опухоли, и/или достигнет клетки рака, например, очага злокачественной солидной опухоли, и реплицируется, как описано выше. Время доставки можно

20

регулировать, например, с помощью промотора, который применяют для экспрессии гетерологичных белков в рекомбинантном штамме грамотрицательных бактерий. В первом случае экспрессию гетерологичного белка может запускать конститутивный промотор или, более предпочтительно, эндогенный промотор бактериального эффекторного белка. В случае

25

отсроченной доставки белков экспрессию гетерологичного белка может запускать искусственно индуцируемый промотор, такой как индуцируемый арабинозой промотор. В данном случае, после того, как бактерии достигли желаемого очага и накопились в нем, субъекту будут вводить арабинозу (или индуктор соответствующего индуцируемого промотора). Затем арабиноза

30

индуцирует бактериальную экспрессию белка, подлежащего доставке.

Таким образом, в одном варианте реализации способ лечения рака включает

i) культивирование рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, как описано в настоящем документе;

- ii) введение субъекту указанного рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, указанного в i), причем слитый белок, который содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, экспрессируется рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий и
- 5 транслоцируется в клетку рака или клетку микроокружения опухоли; и необязательно
- iii) расщепление слитого белка, так что гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка внутри клетки рака, причем рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий вводят в
- 10 количестве, которого достаточно для лечения субъекта.

Клетки рака для доставки гетерологичных белков обычно представляют собой клетки рака из типов рака, выбранных из группы, состоящей из саркомы, лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, типов рака центральной нервной

15 системы и злокачественных солидных опухолей, которые включают, без ограничения, аномальную массу клеток, которые могут происходить из различных типов тканей, таких как печень, толстая кишка, ободочная и прямая кишка, кожа, молочная железа, поджелудочная железа, шейка матки, тело матки, мочевого пузыря, желчный пузырь, почка, гортань, губа, полость рта,

20 пищевод, яичник, предстательная железа, желудок, яичко, щитовидная железа или легкое, и, таким образом, включают злокачественные солидные опухоли печени, толстой кишки, ободочной и прямой кишок, кожи, молочной железы, поджелудочной железы, шейки матки, тела матки, мочевого пузыря, желчного пузыря, почки, гортани, губы, полости рта, пищевода, яичника, предстательной

25 железы, желудка, яичка, щитовидной железы или легкого. Предпочтительно, клетки рака для доставки гетерологичных белков представляют собой клетки рака злокачественных солидных опухолей.

Таким образом, в одном предпочтительном варианте реализации рак

30 представляет собой злокачественную солидную опухоль, и способ включает

i) культивирование рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, как описано в настоящем документе;

ii) введение субъекту указанного рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, указанного в i), причем слитый белок, который содержит сигнал

доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, экспрессируется рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий и транслоцируется в клетку злокачественной солидной опухоли или клетку в микроокружении опухоли; и необязательно

- 5 iii) расщепление слитого белка, так что гетерологичный белок отщепляется от сигнала доставки из бактериального эффекторного белка внутри клетки злокачественной солидной опухоли, причем рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий вводят в количестве, которого достаточно для лечения субъекта.

10

В некоторых вариантах реализации по меньшей мере два слитых белка, каждый из которых содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, экспрессируются рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий и транслоцируются в эукариотическую клетку, например, клетку рака, способами в соответствии с настоящим изобретением.

15

Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий можно культивировать так, чтобы экспрессировался слитый белок, который содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и гетерологичный белок, в соответствии со способами, известными в данной области техники (например, см. публикацию FDA, *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, chapter 8: *Yersinia enterocolitica*). Предпочтительно, рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий можно культивировать в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, например, при температуре 28°C. Для индукции экспрессии T3SS и, например, генов, зависящих от промотора YopE/SycE, бактерии можно выращивать при температуре 37°C.

20

25

В одном варианте реализации клетки рака, например, клетки злокачественной солидной опухоли, приводят в контакт с двумя рекомбинантными штаммами грамотрицательных бактерий, указанными в i), причем первый рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий экспрессирует первый слитый белок, который содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и первый гетерологичный белок, а второй рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий экспрессирует второй слитый белок, который

30

содержит сигнал доставки из бактериального эффекторного белка и второй гетерологичный белок, так что первый и второй слитый белок транслоцируются в клетку злокачественной солидной опухоли или клетку микроокружения опухоли. В этом варианте реализации предложен способ коинфекции клетки
5 рака, например, клетки злокачественной солидной опухоли, двумя штаммами бактерий в качестве пригодного способа доставки, например, двух различных гибридных белков в одну клетку.

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

В соответствии с настоящим изобретением также предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный штамм
грамотрицательных бактерий, описанный в настоящем документе,
20 необязательно содержащая подходящий фармацевтически приемлемый носитель. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением также предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, описанный в настоящем документе, для применения в способе лечения рака, например, злокачественной солидной
25 опухоли у субъекта.

Рекомбинантные грамотрицательные бактерии могут входить в состав для удобного и эффективного введения в количестве, которого достаточно для
лечения субъекта, в виде фармацевтической композиции с подходящим
30 фармацевтически приемлемым носителем. Единичная лекарственная форма рекомбинантных грамотрицательных бактерий или фармацевтической композиции, подлежащей введению, может, например, содержать рекомбинантные грамотрицательные бактерии в количестве от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} бактерий на мл, предпочтительно от

приблизительно 10^6 до приблизительно 10^9 бактерий на мл, более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^9 бактерий на мл, наиболее предпочтительно приблизительно 10^8 бактерий на мл.

- 5 Под «количеством, достаточным для лечения субъекта», или «эффективным количеством», которые используются в настоящем документе взаимозаменяемо, подразумевают количество бактерии или бактерий, достаточно высокое, чтобы в значительной степени положительно изменить состояние, лечение которого
- 10 проводят, но достаточно низкое, чтобы избежать серьезных побочных эффектов (при обоснованном соотношении польза/риск), в рамках здравого медицинского суждения. Эффективное количество бактерии будет варьировать в зависимости от конкретной поставленной цели, возраста и физического состояния субъекта, лечение которого проводят, длительности лечения, природы сопутствующей
- 15 терапии и конкретной применяемой бактерии. Эффективное количество бактерии будет, таким образом, представлять собой минимальное количество, которое обеспечит необходимый эффект. Обычно субъекту вводят количество от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} бактерий, например, от
- 20 приблизительно 10^5 до приблизительно 10^{10} бактерий/ m^2 поверхности тела, предпочтительно от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^9 бактерий, например, от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^9 бактерий/ m^2
- 25 поверхности тела, более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий, например, от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий/ m^2 поверхности тела, наиболее предпочтительно 10^8 бактерий, например, 10^8 бактерий/ m^2 поверхности тела.
- 30 Однократная доза рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий для введения субъекту, например, человеку, для лечения рака, например, злокачественной солидной опухоли, составляет обычно от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{10} бактерий, например, от приблизительно 10^4 бактерий/ m^2
- поверхности тела до приблизительно 10^{10} бактерий/ m^2 поверхности тела, предпочтительно от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий, например, от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 бактерий/ m^2
- поверхности тела, более предпочтительно от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 бактерий, например, от приблизительно 10^6 до

приблизительно 10^8 бактерий/ m^2 поверхности тела, еще более предпочтительно от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий, например, от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^8 бактерий/ m^2 поверхности тела, наиболее предпочтительно 10^8 бактерий, например, 10^8 бактерий/ m^2

5 поверхности тела всех рекомбинантных грамотрицательных бактерий.

Примеры веществ, которые могут выступать в качестве фармацевтических носителей, представляют собой сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы и их производные, такие как кукурузный крахмал и картофельный

10 крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетаты целлюлозы; порошковый трагакант; солод; желатин; тальк; стеариновые кислоты; стеарат магния; сульфат кальция; карбонат кальция; растительные масла, такие как арахисовое масло, хлопковое

15 масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао-бобов; многоатомные спирты, такие как пропиленгликоль, глицерин, сорбитол, маннитол и полиэтиленгликоль; агар; альгиновые кислоты; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; экстракты клюквы и фосфатный буферный

20 раствор; обезжиренное сухое молоко; а также другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах, такие как, например, витамин С, эстроген и эхинацея. Также могут присутствовать смазывающие средства и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия, а также красящие средства, ароматизирующие вещества, смазывающие вещества, вспомогательные вещества, вещества, способствующие таблетированию, стабилизаторы, антиоксиданты и консерванты.

25

Способы введения рекомбинантных грамотрицательных бактерий субъекту можно выбрать из группы, состоящей из внутривенного, внутриопухолевого, интраперитонеального и перорального введения. Несмотря на то, что не подразумевается ограничение настоящего изобретения каким-либо конкретным

30 способом применения, внутривенное или внутриопухолевоe введение бактерий или фармацевтических композиций является предпочтительным.

В зависимости от пути введения может требоваться, чтобы активные компоненты, которые содержат бактерии, были покрыты материалом для защиты указанных организмов от действия ферментов, кислот и других

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

Одну бактерию можно ввести саму по себе или в комбинации со второй, отличной бактерией. Любое число различных бактерий можно применять в сочетании. Под «в комбинации с» подразумевают «вместе», по существу одновременно или последовательно. Композиции можно также вводить в форме
15 таблетки, пиллюли или капсулы, например, такой как высушенная сублимацией капсула, содержащая бактерии или фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением, либо в виде замороженного раствора бактерий или фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением, содержащего DMSO или глицерол. Другая предпочтительная
20 форма применения включает приготовление лиофилизированной капсулы бактерий или фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Еще одна предпочтительная форма применения включает приготовление высушенной теплом капсулы бактерий или фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением.

25 Рекомбинантные грамотрицательные бактерии или фармацевтическую композицию, подлежащие введению, можно ввести путем инъекции. Формы, подходящие для применения путем инъекции, включают моносеptические суспензии и моносеptические порошки для немедленного получения
30 моносеptической суспензии для инъекций. Во всех случаях форма должна быть моносеptической и должна быть жидкой в той степени, чтобы ее можно было с легкостью ввести через шприц. Форма должна быть стабильной в условиях производства и хранения. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, сахара, многоатомный

спирт (например, глицерол, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), подходящие смеси таких компонентов и растительные масла.

Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством

использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания

5 требуемого размера частиц в случае дисперсии. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические вещества, например, сахара или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить посредством применения в композициях веществ, которые отсрочивают всасывание, например, моностеарата алюминия
10 и желатина.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий вводят субъекту совместно с сидерофором.

Данные варианты реализации являются предпочтительными. Сидерофоры,

15 которые можно вводить совместно, представляют собой сидерофоры, включая гидроксамат, катехолат и сидерофоры со смешанными лигандами.

Предпочтительные сидерофоры представляют собой дефероксамин (также известный как десферриоксамин В, десфероксамин В, DFO-B, DFOA, DFB или Десферал), десферриоксамин Е, деферазирокс (Эксиджад, Десирокс,

20 Дефриджет, Десифер) и деферипрон (Феррипрокс), более предпочтительным является дефероксамин. Дефероксамин представляет собой бактериальный сидерофор, продуцируемый актинобактерией *Streptomyces pilosus*, который доступен для приобретения, например, у компании Novartis Pharma Schweiz AG (Швейцария).

25 Совместное введение с сидерофором можно проводить до, одновременно или после введения рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий.

Предпочтительно сидерофор вводят до введения рекомбинантного штамма

грамотрицательных бактерий, более предпочтительно вводят примерно за 24 часа до, предпочтительно примерно за 6 часов до, более предпочтительно за 3

30 часа до, в частности, за 1 час до введения субъекту рекомбинантного штамма

грамотрицательных бактерий. В конкретном варианте реализации субъект

получает предварительное лечение десфероксамином за 1 час до

инфицирования рекомбинантным штаммом грамотрицательных бактерий,

чтобы позволить рост бактерий. Обычно сидерофор вводят совместно в разовой

дозе от приблизительно $0,5 \times 10^{-5}$ моль до приблизительно 1×10^{-3} моль, более предпочтительно от приблизительно 1×10^{-5} моль до приблизительно 5×10^{-4} моль, предпочтительно от приблизительно 1×10^{-4} моль до приблизительно 4×10^{-4} моль. Обычно десфероксамин вводят совместно в разовой дозе от
5 приблизительно 20 мг до приблизительно 500 мг, предпочтительно от приблизительно 50 мг до приблизительно 200 мг на субъекта, более предпочтительно совместно вводят разовую дозу 100 мг десфероксиамина.

Режимы введения доз для введения рекомбинантного штамма

10 грамотрицательных бактерий или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе, будут варьировать в зависимости от конкретной поставленной цели, возраста и физического состояния субъекта, лечение которого проводят, длительности лечения, природы сопутствующей терапии и конкретной применяемой бактерии, как известно специалисту. Рекомбинантный
15 штамм грамотрицательных бактерий обычно вводят субъекту в соответствии с режимом введения доз, состоящим из разовой дозы каждые 1 - 20 дней, предпочтительно каждые 1 - 10 дней, более предпочтительно каждые 1 - 7 дней. Период введения обычно составляет от приблизительно 20 до приблизительно 60 дней, предпочтительно приблизительно 30 – 40 дней. В качестве
20 альтернативы, период введения обычно составляет от приблизительно 8 до приблизительно 32 недель, предпочтительно от приблизительно 8 до приблизительно 24 недель, более предпочтительно от приблизительно 12 до приблизительно 16 недель.

25 В соответствии с настоящим изобретением также предложен набор для лечения рака, например, такого как злокачественные солидные опухоли, предпочтительно, у человека. Такие наборы, как правило, будут содержать рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и инструкции по применению
30 набора. В некоторых вариантах реализации наборы содержат носитель, упаковку или контейнер, который разделен на отсеки для размещения одного или нескольких контейнеров, таких как флаконы, пробирки и т.п., причем каждый из контейнера или контейнеров содержит один из отдельных элементов для применения в способе, описанном в настоящем документе. Подходящие

контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и лабораторные пробирки. В других вариантах реализации контейнеры изготовлены из множества материалов, таких как стекло или пластик.

Примеры

Пример 1:

А) Материалы и методы

- 5 Штаммы бактерий и условия роста. Штаммы, применявшиеся в данном исследовании, перечислены на фиг. 27А - *E. coli* Top10, который применяли для очистки и клонирования плазмиды, и *E. coli* Sm10 λ pir, который применяли для конъюгации, а также *E. coli* BW19610³¹, который применяли для
- 10 размножения рKNG101, выращивали общепринятым способом на чашках с агаром LB и в бульоне LB при температуре 37°C. Ампициллин использовали в концентрации 200 мкг/мл (*Yersinia*) или 100 мкг/мл (*E. coli*), а хлорамфеникол использовали в концентрации 10 мкг/мл для селекции векторов экспрессии. Стрептомицин использовали в концентрации 100 мкг/мл для селекции векторов-
- 15 «самоубийц». *Y. enterocolitica* MRS40 (O:9, биотип 2)²⁰, не устойчивое к ампициллину производное E40¹⁹, и полученные из него штаммы выращивали общепринятым способом на сердечно-мозговом экстракте (Brain Heart Infusion (BHI); Difco) при к.т. (комнатной температуре). Ко всем штаммам *Y. enterocolitica* добавляли налидиксовую кислоту (35 мкг/мл), а ко всем штаммам *Y. enterocolitica asd* дополнительно добавляли 100 мкг/мл мезо-2,6-
- 20 диаминопимелиновой кислоты (*mDAP*, Sigma Aldrich).

- Генетические манипуляции с *Y. enterocolitica*.** Генетические манипуляции с *Y. enterocolitica* были описаны в публикации^{32,33}. Вкратце, мутаторы для модификации или делеции генов в плаزمиде рYV или на хромосоме
- 25 конструировали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами из 2-х фрагментов с применением в качестве матрицы очищенной плазмиды рYV40 или геномной ДНК, что приводило к получению фланкирующих последовательностей размером 200 – 250 п.о. на обеих сторонах
- 30 делетированной или модифицированной части соответствующего гена. В качестве альтернативы использовали полностью синтетические фрагменты ДНК (первично синтезированные) с фланкирующими последовательностями размером 200 - 250 п.о. на обеих сторонах делетированной или модифицированной части соответствующего гена. Полученные в результате

фрагменты клонировали в pKNG101²⁹ в BW19610 *E. coli*³¹. Плазмидами с подтвержденной последовательностью трансформировали *E. coli* Sm10 λ pir, из которого осуществляли перенос (мобилизацию) плазмид в соответствующий штамм *Y. enterocolitica*. Мутанты, несущие встроенный вектор, размножали для

5 получения нескольких поколений без селекционного давления. Затем для селекции клонов, которые утратили вектор, использовали сахарозу. Наконец, мутанты идентифицировали с помощью ПЦР для отбора колоний. Конкретные мутаторы (pT3P-456, pT3P-457, pT3P-697 и pT3P-714) перечислены в таблице III.

10

Конструирование плазмид. Плазмиду pBad_Si2, pBad_Si1 или pT3P-715 (или производные pT3P-716 и pT3P-717) применяли для клонирования слитых белков с N-концевыми 138 аминокислотами YopE (SEQ ID NO: 25). pBad_Si2 (фиг. 3) была сконструирована путем клонирования фрагмента SycE-YopE₁₋₁₃₈,

15

содержащего эндогенные промоторы для YopE и SycE, из очищенной pYV40 в сайт KpnI/HindIII pBad-MycHisA (Invitrogen). Дополнительные модификации включают удаление фрагмента NcoI/BglII pBad-MycHisA путем расщепления, обработку фрагментом Кленова и повторное лигирование. Двухнаправленный терминатор транскрипции (BBa_B1006; iGEM foundation) клонировали в сайт

20 расщепления KpnI и обрабатывали фрагментом Кленова (pBad_Si2) или сайт расщепления BglII (pBad_Si1). Затем на 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ были добавлены следующие сайты рестрикции: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII) (фиг. 3B). pBad_Si1 аналогична pBad_Si2, но кодирует EGFP, амплифицированный из pEGFP-C1 (Clontech) в сайте NcoI/BglII, под контролем индуцируемого арабинозой

25

промотора. pT3P-715 (Фигура 4) представляет собой полностью синтетическую плазмиду (первично синтезированный вектор) с характеристиками, сходными с pSi_2, при этом соответствующая кодирующая область AgaC была удалена, а ген устойчивости к ампициллину (плюс 70 п.о. против хода транскрипции)

30

заменен геном устойчивости к хлорамфениколу с областью 200 п.о. против хода транскрипции. Для ясности, pT3P-715 содержит фрагмент SycE-YopE₁₋₁₃₈, содержащий эндогенные промоторы для YopE и SycE из pYV40, где на 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ были добавлены следующие сайты рестрикции: XbaI-XhoI-BstBI-HindIII. Он содержит точку начала репликации pBR322 и хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT) из мобильного генетического

элемента Tn9 (Alton NK, Varnek D (1979) Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. Nature 282:864–869).

Производное рТЗР-716 (Фигура 5) представляет собой высококопийную плазмиду на основе точечной мутации в точке начала репликации рBR322 (SEQ ID NO: 29), в результате которой затем получают точку начала репликации ColE1 (SEQ ID NO: 30). Высококопийные плазмиды для экспрессии и доставки гетерологичных белков-грузов получены на основе рТЗР-716. Производное рТЗР-717 (Фигура 6) представляет собой низкокопийную плазмиду, полученную на основе точки начала репликации рBR322, как в рТЗР-715, но дополнительно содержащую ген *gor* («repressor of primer», репрессор праймера) (SEQ ID NO: 31). Низкокопийные плазмиды для экспрессии и доставки грузов-гетерологичных белков получены на основе рТЗР-717. Полностью синтетические плазмиды рТЗР-716 и рТЗР-717 (первично синтезированные векторы).

15

Гетерологичные белки для доставки – RIG-I. RIG-I (также называемый DDX58; Uniprot O95786 для белка человека) представляет собой

цитоплазматический сенсор короткой двухцепочечной РНК и основной паттерн-распознающий рецептор врожденной иммунной системы. RIG-I состоит из домена РНК-геликазы, С-концевого домена и N-концевого домена (Brisse & Ly, 2019). Геликазный домен отвечает за распознавание двухцепочечной РНК; С-концевой домен содержит репрессорный домен, и N-концевой домен содержит два домена привлечения каспаз (CARD), которые активируют нисходящие сигнальные пути. В состоянии покоя RIG-I находится в состоянии, в котором С-концевой репрессорный домен покрывает РНК-связывающий и геликазный домены. После связывания агонистической вирусной РНК с геликазным доменом, белок разворачивается, и N-концевые домены CARD становятся доступными для взаимодействия с партнерами из нисходящих сигнальных путей, такими как митохондриальный

30 противовирусный сигнальный белок (MAVS) и TANK-связывающая киназа 1 (TBK1). Затем следует транслокация в ядро активированного регуляторного фактора IFN 3 (IRF3) и IRF7, что приводит к транскрипции регулируемых стимулируемым интерфероном чувствительным элементом (ISRE) кодирующих последовательностей, таких как IFN- α и - β . Выбранный гетерологичный белок

для доставки состоит только из N-концевых доменов CARD RIG-I (без
 остальной части белка; например, человеческий RIG-I₁₋₂₄₅, или RIG-I₁₋₂₂₉, или
 RIG-I₁₋₂₁₈, все из которых содержат оба N-концевых домена CARD RIG-I и,
 следовательно, упоминаются как фрагменты CARD₂ RIG-I, CARD₂ RIG-I или
 5 домены CARD RIG-I, указанные термины используются взаимозаменяемо в
 настоящем документе), что приводит к РНК-независимой конститутивной
 активации пути RIG-I. Доставленные в бактерии домены CARD RIG-I доступны
 и приводят к активации MAVS и TBK1. Затем следует транслокация в ядро
 активированных IRF3 и IRF7, что приводит к транскрипции регулируемых ISRE
 10 кодирующих последовательностей, таких как IFN-а и -b.

Аналогичным образом, домен CARD или домены CARD из MAVS или MDA5
 были выбраны для функционирования независимо от агониста при доставке
 бактериями.

15 **Гетерологичные белки для доставки – cGAS.** Синтаза циклического ГМФ-
 АМФ (cGAS; Uniprot Q8N884 для белка человека) представляет собой
 цитоплазматический сенсор ДНК. cGAS представляет собой
 нуклеотидилтрансферазу, которая катализирует образование циклического
 ГМФ-АМФ (цГАМФ) из АТФ и гуанозинтрифосфата (ГТФ) и является частью
 20 сигнального пути обнаружения ДНК cGAS-STING. Она содержит два основных
 сайта связывания дцДНК на противоположных сторонах каталитического
 кармана и активируется при связывании с цитозольной ДНК. После связывания
 с ДНК cGAS катализирует синтез цГАМФ, который затем функционирует как
 вторичный мессенджер, который связывает и активирует трансмембранный
 25 белок 173 (TMEM173)/STING, расположенный в эндоплазматическом
 ретикулуме. Затем STING активирует протеинкиназы киназу IκB (IKK) и TBK1,
 которые, в свою очередь, активируют факторы транскрипции NF-κB и IRF3 для
 индукции интерферонов и других цитокинов. Вторичный мессенджер цГАМФ
 может также переходить в другие клетки несколькими способами и,
 30 посредством этого, передавать сигнал опасности цитозольной ДНК
 окружающим клеткам. У укороченного с N-конца cGAS (такого как cGAS
 человека₁₆₁₋₅₂₂) нет N-концевого ДНК-связывающего домена, но сохраняется
 ферментативная активность. Доставка этого укороченного cGAS в
 эукариотические клетки приводит к внутриклеточной продукции цГАМФ

вследствие ферментативной активности cGAS, которая приводит к активации пути STING. Как видно для пути RIG-I, активация пути STING в конечном итоге приводит к продукции IFN I типа.

- 5 Человеческие (и другие эукариотические) гены были первично синтезированными, что позволяло использовать кодоны, предпочитаемые *Y. enterocolitica* (фиг. 27A - E), и клонировать их в виде слитых с YopE₁₋₁₃₈ белков в плазмиду pBad_Si2 или pT3P-715 (для среднего числа копий), pT3P-716 (для высокого числа копий) или pT3P-717 (для низкого числа копий) (см. таблицу II
- 10 ниже). Лигированные плазмиды клонировали в *E. coli* Top10. Секвенированные плазмиды переносили посредством электропорации в желательный штамм *Y. enterocolitica* с использованием таких настроек, как для стандартной электропорации *E. coli*.

15

Таблица I (праймер № T3P_: Последовательность)

SEQ ID NO: 32: Праймер №: T3T_887
cacatgtggtcgacGAATAGACAGCGAAAGTTGTTGAAATAATTG

20

SEQ ID NO: 33: Праймер №: T3T_955
sactaccctgtttttatccataTТААТТGCGCGGTTTAAACGGG

25

SEQ ID NO: 34: Праймер №: T3T_956
TATGGATAAAAACAAGGGGGTAGTG

SEQ ID NO: 35: Праймер №: T3T_888
catgcaatgggcccGTTTTCAGTATAAAAAGCACGGTATATAC

30

SEQ ID NO: 36: Праймер №: T3T_957
sactaccctgtttttatccataTТААТТGCGCGGTTTCAGCG

SEQ ID NO: 37: Праймер №: T3T_995
catggtcgacGTTTTCAGTATAAAAAGCACGGTATATAC

35

SEQ ID NO: 38: Праймер №: T3T_822
catggtcgacCTCAGGGTTCCAGCTTAGC

40

SEQ ID NO: 39: Праймер №: T3T_1021
catggtcgacCTCAGGGTTCCAGCTTAGC

SEQ ID NO: 40: Праймер №: T3T_1022
catggtcgacCTCAGGGTTCCAGCTTAGC

SEQ ID NO: 41: Праймер №: T3T_1023

catggctgacCTCAGGGTTCCAGCTTAGC

SEQ ID NO: 42: Праймер №: ТЗТ_287

CGGGGTACCTCAACTAAATGACCGTGGTG

SEQ ID NO: 43: Праймер №: ТЗТ_288

5 GTTAAAGCTTtctgaatctagactcgagCGTGGCGAACTGGTC

Таблица II. Клонированные слитые белки

Белок, который будет доставлен с помощью ТЗSS	SEQ ID NO белка	Плазмидный остов	Название полученной в результате плазмиды	Праймеры. ТЗТ_№:	SEQ ID NO праймера
YorE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I человека (AK 1 - 245)	1	pBad_Si_2	pТЗР_453	синтетическая конструкция	/
YorE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I человека (AK 1 - 245)	1	pТЗР-715	pТЗР-718	синтетическая конструкция	/
YorE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I человека (AK 1 - 245)	1	pТЗР-716	pТЗР-719	синтетическая конструкция	/
YorE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I человека (AK 1 - 245)	1	pТЗР-717	pТЗР-720	синтетическая конструкция	/
YorE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I мыши (AK 1 - 246)	4	pBad_Si_2	pТЗР-454	синтетическая конструкция	/
YorE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i>	4	pТЗР-715	pТЗР-721	синтетическая	/

CARD ₂ RIG-I мыши (AK 1 - 246)				конструкция	
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I мыши (AK 1 - 246)	4	pT3P-716	pT3P-722	синтетическая конструкция	/
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I мыши (AK 1 - 246)	4	pT3P-717	pT3P-723	синтетическая конструкция	/
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I мыши (AK 1 - 229)	5	pBad_Si_2	pT3P_521	1021/1022	39/40
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I мыши (AK 1 - 218)	6	pBad_Si_2	pT3P_522	1021/1023	39/41
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)	10	pBad_Si_2	pT3P_515	синтетическая конструкция	/
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)	10	pT3P-715	pT3P-745	синтетическая конструкция	/
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I человека (AK 1 - 245) И YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)	1 и 10	pT3P-715	pT3P-751	синтетическая конструкция	/
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I человека (AK 1 - 245) И YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-	1 и 10	pT3P-716	pT3P-731	синтетическая конструкция	/

оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)					
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I человека (AK 1 - 245) И YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)	1 и 10	pT3P-717	pT3P-732	синтетическая конструкция	/

Таблица III. Мутаторы для генетической модификации и полученные в результате плазмиды pYV

Мутатор/конструкция	Подлежит вставке в:	Плазмидный остов	Название полученного мутатора	Название полученной pYV	Праймеры ТЗТ_№	SEQ ID NO праймеров	Матрица	Применялись исходным штаммом
YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> CARD ₂ RIG-I мыши (AK 1 - 246)	pYV (yopE ::)	pKNG101	pT3P_457	pYV-022	ПЦР1: 887/957 ПЦР2: 956/888 ПЦР с перекрывающимся праймерами 887/888	32/36, 34/35, 32/35	ПЦР1 :ppT3P-454 ПЦР2 : <i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. enterocolitica</i> <i>ΔyopNOP</i> <i>EMT</i>

YopE ₁₋₁₃₈ - кодон- оптимиз ированн ый для Y. <i>enterocol itica</i> CARD ₂ RIG-I человека (AK 1 - 245)	pYV (yopE ::)	pKNG1 01	pT3P_4 56	pYV- 021	ПЦР1: 887/955 ПЦР2: 956/888 ПЦР с перекры вающим ися праймер ами 887/888	32/33, 34/35, 32/35	ПЦР1 :ppT3 P-453 ПЦР2 : Y. <i>entero colitic a</i>	Y. <i>entero colitic a</i> <i>Δyop HOP EMT</i>
YopE ₁₋₁₃₈ - кодон- оптимиз ированн ый для Y. <i>enterocol itica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)	pYV (yopE ::)	pKNG1 01	pT3P_6 97	pYV- 048	995/822	37/38	pT3P- 515	Y. <i>entero colitic a</i> <i>Δyop HOP EMT</i>
YopE ₁₋₁₃₈ - кодон- оптимиз ированн ый для Y. <i>enterocol itica</i> cGAS	pYV (yopH ::)	pKNG1 01	pT3P_7 14	pYV- 050	/ (Синтет ический ген)	/	/	Y. <i>entero colitic a</i> <i>Δyop HOP EMT</i>

человека (АК 161 - 522)								
YopE1- 138- кодон- оптимиз ированн ый для Y. <i>enterocol itica</i> CARD ₂ RIG-I человека (АК 1 - 245) И YopE1- 138- кодон- оптимиз ированн ый для Y. <i>enterocol itica</i> сGAS человека (АК 161 - 522)	pYV (yopE :: и yopH: :)	pKNG1 01	pT3P_7 14	pYV- 051	/ (Синтет ический ген)	/	/	Y. <i>entero colitic a</i> <i>Δyop HOP EMT</i> pYV- 021

Секреция Yop. Индукцию регулона *yop* проводили посредством переноса культуры в температуру 37°C в ВНИ-Ох (условия, позволяющие секрецию) ³⁴. В

5 качестве источника углерода добавляли глюкозу (4 мг/мл).

Фракцию всех клеток и фракцию супернатанта разделяли путем центрифугирования при 20800 g в течение 10 мин. при температуре 4°C. Осадок клеток отбирали в качестве фракции всех клеток. Белки в супернатанте преципитировали трихлоруксусной кислотой в конечной концентрации 10% (масса/объем) в течение 1 ч при температуре 4°C. После центрифугирования (20800 g в течение 15 мин.) и удаления супернатанта полученный в результате осадок промывали в ледяном ацетоне в течение ночи. Образцы снова центрифугировали, супернатант отбрасывали, осадок высушивали на воздухе и ресуспендировали в 1x ДСН (додецилсульфате натрия) с красителем для нанесения на гель.

Секретированные белки анализировали методом ПААГ-ДСН (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия); в каждом случае на каждую дорожку наносили белки, секретированные 3×10^8 бактерий.

Обнаружение конкретных секретированных белков методом иммуноблоттинга проводили с применением 12,5% гелей ПААГ-ДСН. Для обнаружения белков во фракции всех клеток, на каждую дорожку наносили 2×10^8 бактерий, если не указано обратное, и белки разделяли на 12,5% гелях ПААГ-ДСН перед обнаружением методом иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг проводили с применением моноклональных антител крысы против YopE (MPA193 – 13A9; 1:1000, ³⁵). Антисыворотку предварительно абсорбировали дважды в течение ночи против *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ *asd* для снижения фонового окрашивания. Обнаружение проводили с помощью вторичных антител, направленных против антител крысы и конъюгированных с пероксидазой хрена (1:5000; Southern biotech), с последующим проявлением с помощью хемилюминесцентного субстрата ECL (LumiGlo, KPM).

Культура клеток и инфекции. Клетки B16F1, LN-229 и RAW культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (Dulbecco's modified Eagle' s medium, DMEM), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и 2 mM L-глутамином (сDMEM). Клетки THP-1, A20, Jurkat и 4T1 культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% ЭТС и 2 mM L-глутамином, для клеток A20 дополнительно добавляли 1 mM пируват натрия, 2,5 г/л D-глюкозы, 10 mM HEPES и 0,05 mM меркаптоэтанол. *Y. enterocolitica*

- выращивали на ВНИ с добавками в течение ночи при к.т., разводили в свежем ВНИ до ОП₆₀₀, равной 0,2, и выращивали в течение 2 ч при к.т., а затем температуру повышали до 37°C на шейкере с водяной баней в течение дополнительных 30 мин. - 1 ч. Наконец, бактерии собирали путем
- 5 центрифугирования (при относительном центробежном ускорении 6000 gcf в течение 30 сек) и промывали один раз DMEM, дополненной 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамином. Клетки, которые высевали в 96-луночные или 6-луночные планшеты, инфицировали при указанных МЗ в DMEM/RPMI, дополненной 10 mM HEPES и 2 mM L-глутамином. Клетки THP-1 дифференцировали путем
- 10 добавления форболмиристатацетата (ФМА) в конечной концентрации 20 - 50 нг/мл в течение 3 - 48 часов до заражения бактериями. После добавления бактерий планшеты центрифугировали в течение 1 мин. при 500 g и помещали в температуру 37°C на указанные периоды времени.
- 15 **Прямой анализ активации интерферона I типа.** Клетки меланомы мыши B16F1, макрофаги дикого типа мыши RAW264.7 или моноциты/макрофаги человека THP-1, все из которых стабильно экспрессировали секретируемую форму эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под контролем промотора I-ISG54, который состоит из индуцируемого IFN промотора ISG54, усиленного
- 20 мультимерным ISRE, были приобретены у InvivoGen (B16-Blue ISG, RAW-Blue ISG, THP1-Blue ISG). Условия роста и анализ IFN I типа адаптировали на основании протоколов, предоставленных InvivoGen. Вкратце, 12500 клеток B16-Blue ISG, 30000 клеток RAW-Blue или 100000 клеток THP-1 в 150 мкл среды для анализа (RPMI + 2 mM L-глутамин + 10% ЭТС для клеток B16-Blue ISG и
- 25 дифференцированных добавлением ФМА клеток THP1-Blue ISG; DMEM + 2 mM L-глутамин + 10% ЭТС для RAW-Blue) на лунку высевали в 96-луночный планшет с плоским дном лунок (NUNC или Corning). В тот же или на следующий день клетки инфицировали штаммами бактерий, подлежащими анализу, путем добавления 15 мкл на лунку желаемой множественности
- 30 заражения (МЗ, разводили в среде для анализа) с последующим кратковременным центрифугированием (500 g, 60 сек, к.т.) Через 2 часа инкубации (37°C и 5% CO₂) бактерии убивали добавлением среды для анализа, содержащей пенициллин (100 Ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Инкубацию

- продолжали в течение 20 – 24 ч. Обнаружение SEAP и люциферазы проводили, следуя протоколам QUANTI-Blue™ и QUANTI-Luc™ (InvivoGen), соответственно. Для обнаружения SEAP: 20 мкл супернатанта клеток инкубировали с 180 мкл реактива для обнаружения (QUANTI-Blue™, InvivoGen). Планшет инкубировали при температуре 37°C, и активность SEAP измеряли путем считывания ОП на 650 нм с применением считывающего устройства для микропланшетов (Molecular Devices). В качестве положительного контроля использовали IFN γ мыши (базовый раствор: 1000000 Ед./мл), разведенный до соответствующих концентраций в среде для анализа.
- 10 Для обнаружения люциферазы: к 20 мкл супернатанта клеток добавляли 50 мкл реактива для обнаружения (QUANTI-Luc™, InvivoGen) в непрозрачных планшетах (ThermoScientific). Незамедлительно измеряли люминесценцию с применением считывающего устройства для планшетов (BioTek). Для активации клеток LN-229, Jurkat или A20, 20000 - 30000 клеток в 100 мкл среды для анализа (DMEM + 2 mM L-глутамин + 10% ЭТС для LNN-29, или RPMI + 2 mM L-глутамин + 10% ЭТС + 1 mM пируват натрия + 2,5 г/л D-глюкозы + 10 mM HEPES, и для клеток A20 дополнительно добавляли 0,05 mM меркаптоэтанол) на лунку высевали в 96-луночный планшет с плоским дном лунок (NUNC или Corning). В тот же или на следующий день клетки инфицировали штаммами
- 20 бактерий, подлежащими анализу, путем добавления 15 мкл на лунку желаемой множественности заражения (МЗ, разводили в среде для анализа). После 4 часов инкубации (37°C и 5% CO $_2$) супернатанты собирали и анализировали присутствие в них IFN β с помощью набора для анализа ELISA IFN- β человека LumiKine™ Xpress human IFN- β или набора для анализа ELISA IFN- β мыши
- 25 LumiKine™ Xpress murine IFN- β (Invivogen), следуя инструкциям производителя

Биораспределение или эффективность на моделях аллотрансплантата опухолей 4Т1, ЕМТ-6 и В16F10 мышам.

- 30 Все эксперименты на животных были одобрены (лицензия 1908; Kantonales Veterinäramt Basel-Stadt) и проводились в соответствии с местными руководствами (Tierschutz-Verordnung, Basel-Stadt) и законом Швейцарии о защите животных (Tierschutz-Gesetz). Мышей BALB/c (модель 4Т1 или ЕМТ-6) или С57BL/6 (модель В16F10) в возрасте 6 недель заказывали в компании

Janvier Labs. После по меньшей мере одной недели адаптации мышам проводили анестезию изофлураном, и в бок мышей вводили путем подкожной инъекции 100 мкл клеток 4Т1, ЕМТ-6 или В16F10 (1×10^5 - 1×10^6 клеток). В течение всего эксперимента проводили оценку поведения и внешнего вида мышей и измеряли поверхностную температуру, а также массу тела.

После развития опухолей мышам вводили раствор Десферала в концентрации 8 мг/мл (10 мл/кг) путем и/п инъекции. В тот же или на следующий день мышей инфицировали соответствующим штаммом *Y. enterocolitica* (1×10^7 бактерий для эксперимента 4Т1; 1×10^6 бактерий для эксперимента В16F10) путем инъекции в хвостовую вену или, для внутриопухолевого (в/о) введения, путем инъекции напрямую в опухоль в указанные дни ($7,5 \times 10^7$ бактерий для эксперимента ЕМТ-6 и В16F10). Инокулят, который вводили мышам, подтверждали с помощью посева методом разведения. В качестве контроля мышам инъецировали только не содержащий эндотоксины ФБР. Для экспериментов с многократным введением за 24 часа до последнего введения бактерий мышам раствор Десферала 8 мг/мл (10 мл/кг) вводили путем и.п. инъекции.

Прогрессирование опухоли отслеживали путем измерения длины и ширины опухоли с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли определяли как $0,5 \times \text{длина} \times \text{ширину}^2$. Объем опухоли, превышающий 1500 мм^3 , определяли как гуманную конечную точку. В соответствующие дни после инфекции мышей умерщвляли путем ингаляции CO_2 . Отделяли опухоль и определяли ее массу. Опухоль гомогенизировали. Общие КОЕ в каждом образце определяли путем точечного нанесения серийных разведений на чашки с агаром LB, содержащим налидиксовую кислоту (35 мкг/мл). Для оценки присутствия плазмиды pYV снимали реплику колоний на чашки с агаром LB, содержащим налидиксовую кислоту (35 мкг/мл) и арсенит (400 мкМ), и рассчитывали процент. Для оценки присутствия (среднекопийного) вектора, снимали реплику колоний на чашки с агаром LB, содержащим налидиксовую кислоту (35 мкг/мл) и хлорамфеникол (10 мкг/мл), и рассчитывали процент. Для оценки присутствия как плазмиды pYV, так и (среднекопийного) вектора, снимали реплику колоний на чашки с агаром LB, содержащим налидиксовую

кислоту (35 мкг/мл), арсенит (400 мкМ) и хлорамфеникол (10 мкг/мл), и рассчитывали процент.

5 В) РЕЗУЛЬТАТЫ

Основанная на системе секреции 3 типа система доставки слитых белков YopE.

Авторы настоящего изобретения выбрали N-концевые 138 аминокислот YopE (SEQ ID NO: 25) для слияния с белками, подлежащими доставке, поскольку
 10 данный подход, как было показано, демонстрировал наилучшие результаты при транслокации других гетерологичных субстратов T3S⁶⁸. Поскольку эти N-концевые 138 аминокислот YopE содержат CBS, авторы настоящего изобретения затем решили коэкспрессировать SycE. Фрагмент SycE-YopE₁₋₁₃₈, клонированный из очищенной плазмиды вирулентности pYV40 *Y. enterocolitica*,
 15 содержит эндогенные промоторы YopE и его шаперона SycE. Вследствие этого SycE и любой слитый белок YopE₁₋₁₃₈ индуцируются быстрым изменением температуры от выращивания при к.т. до 37°C. Время культивирования при температуре 37°C будет влиять на количество слитого белка, присутствующее в бактериях. На 3'-конце YopE₁₋₁₃₈ добавляли сайт множественного клонирования
 20 (multiple cloning site, MCS), за которым необязательно следовали метка Muc и 6x His, а также стоп-кодон (SEQ ID NO: 44).

Фоновый штамм тщательно выбирали. Во-первых, для ограничения транслокации эндогенных эффекторов авторы настоящего изобретения использовали штамм *Y. enterocolitica*, в котором были делетированы все
 25 известные эффекторы: Yop H, O, P, E, M и T (названный ΔНОРЕМТ)³⁷.

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

30 В случае *Y. enterocolitica* вирулентность снижали путем делеции шести эндогенных эффекторных белков, называемых «внешние белки Yersinia» (Yersinia outer proteins, Yop), более конкретно, YopH, O, P, E, M, T (MRS40 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135])³⁷.

Эти Yop кодируются на «плазмиде вирулентности *Yersinia*» (pYV) - плазмиде размером приблизительно 70 т.п.о., на которой кодируется полная система секреции 3 типа (Т3SS), а также другие белки, обуславливающие вирулентность (фиг.1). YopH, O, P, E, M и T представляют собой шесть эффекторных белков, которые доставляются в клетки-хозяева бактериальной системой секреции третьего типа для модулирования и ослабления иммунной системы. Каждый Yop обладает специфической биохимической активностью в клетке-хозяине. YopT отщепляет С-концевой цистеин Rho-ГТФаз и, таким образом, удаляет изопренильную группу, которая заякоривает ГТФазы в мембрану. Такая инактивация Rho в связи с неправильной локализацией позволяет избежать фагоцитоза иммунными клетками, такими как макрофаги и нейтрофилы ⁴⁹. В том же пути YopE выступает в качестве белка, активирующего ГТФазу (GTPase activating protein, GAP), для Rho-ГТФаз, деактивируя их. Это приводит к снижению уровня фагоцитоза и ингибированию высвобождения иммунными клетками IL-1 бета ⁴⁹. Более того, YopO выступает в качестве ингибитора диссоциации гуаниновых нуклеотидов (GDI), деактивируя Rho-ГТФазы. YopO дополнительно содержит серин/треонин-киназный домен, оказывающий действие на актиновый цитоскелет способом, который до конца не понятен ⁴⁹. YopH представляет собой тирозинфосфатазу, воздействующую на белки фокальной адгезии, такие как киназа фокальной адгезии (Focal adhesion kinase, Fak), паксиллин и другие белки, таким образом, в высокой степени предотвращая фагоцитоз макрофагами и нейтрофилами ⁴⁹. Было обнаружено, что YopP, который называют YopJ у *Y. pseudotuberculosis* или *Y. pestis*, инактивирует в иммунных клетках путь передачи сигналов MAPK/NFkB, предотвращая высвобождение TNFα и IL-8 из иммунных клеток, стимулированных присутствием бактерий. Более того, было обнаружено, что YopP индуцирует в иммунных клетках апоптоз, что может быть связано с эффектом, нарушающим путь MAPK, который в своем активированном состоянии защищает клетки от апоптоза ⁴⁹. Роль YopM пока что полностью не ясна, но он был обнаружен связанным с рибосомальной S6 киназой 1 (ribosomal S6 kinase 1, RSK1) и С-подобной протеинкиназой 2 (protein kinase C-like 2, PRK2). Представляется, что YopM может стимулировать фосфорилирование RSK1 и, таким образом, воздействовать на мишени из нисходящих сигнальных путей, такие как, например, продвижение по клеточному циклу ⁴⁹. В результате

делеции одного или нескольких из данных *Yop* защитный механизм бактерий от иммунной системы кардинально нарушается⁵⁰. Мутацию соответствующих *yop* подтверждали методом ПЦР в соответствующей области и с помощью анализа секреции *in vitro*. Анализ секреции *in vitro* методом ПААГ-ДСН и окрашивания

5 Кумасси голубым подтвердили отсутствие полноразмерных *YopH*, *O*, *M* и *YopE*.

Более того, необязательно был сконструирован штамм *Y. enterocolitica* с делециями в *asd* (гене аспарат-полуальдегид-дегидрогеназы). Мутация в *asd* приводит к полной утрате способности к росту без добавления мезо-

10 диаминопимелиновой кислоты. Данный подход позволяет получить не содержащие антибиотики системы, поддерживающие плазмиду, на основании присутствия *asd* на соответствующей плазмиде. Аналогично, можно использовать другие ауксотрофные мутанты.

15 Слияние с N-концевым сигналом секреции бактерий привело к успешной доставке экспрессированного в бактериях белка *YopE*₁₋₁₃₈ - лейциновая застеежка GCN4 (дрожжи) - GGDEF WspR (*P. aeruginosa*) и не предотвратило фолдинг и функцию данного состоящего из трех частей белка в эукариотической клетке. Это означает, что слитые с *YopE* лейциновая застеежка GCN4 - GGDEF WspR

20 все еще способны димеризоваться и, таким образом, приводить к получению активных доменов GGDEF, что является неожиданным.

Доставка триггерных белков путей cGAS/STING и RIG-I-подобного рецептора с помощью бактериальной T3SS для индукции ответа IFN I типа и оптимизированного генетического кодирования.

25

В следующем разделе использовались отличные репортерные линии клеток для IFN I типа (а также нативные нерепортерные линии клеток):

- Меланома мыши B16F1: В линии репортерных клеток B16F1 доставка cGAS лишь минимально способствует индукции IFN по сравнению с передачей сигналов RIG-I (фиг. 18). Таким образом, линия репортерных
- 30 клеток B16F1 может быть использована для оценки, главным образом, RIG-I-зависимой передачи сигналов и ее нарушения путем

дополнительного кодирования cGAS или других активирующих STING белков.

- 5
 - Макрофаги мыши RAW 264.7: В линии репортерных клеток RAW доставка cGAS и активация передачи сигналов RIG сопоставимо способствуют общей активации (**фиг. 18**). Таким образом, линия репортерных клеток RAW может быть использована для оценки комбинации RIG-I- и cGAS-зависимой передачи сигналов и ее нарушения или усиления посредством кодирования множества белков.
- 10
 - Моноциты/макрофаги THP-1 человека: В линии репортерных клеток THP-1 доставка cGAS, главным образом, способствует индукции IFN на клетках THP-1 по сравнению с передачей сигналов RIG-I (**фиг. 18**). Таким образом, линия репортерных клеток THP-1 может быть использована для оценки, главным образом, cGAS-зависимой передачи сигналов и ее нарушения путем дополнительного кодирования RIG-I или
- 15
 - других активирующих RLR белков.

Оценивали индукцию IFN I типа в линии репортерных клеток меланомы при доставке слитого белка YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅).

Позволяющие оценить стимуляцию IFN I типа репортерные клетки

- 20 меланоцитов мыши B16F1 основаны на активности секретируемой формы щелочной фосфатазы, находящейся под контролем промотора I-ISG54, который состоит из индуцируемого IFN промотора ISG54, усиленного мультимерным ISRE. В этой линии клеток доставка cGAS лишь минимально способствует индукции IFN на клетках B16F1 по сравнению с передачей сигналов RIG. Таким
- 25 образом, эта линия репортерных клеток может быть использована для оценки, главным образом, RIG-зависимой передачи сигналов и ее нарушения путем дополнительного кодирования cGAS или других белков, активирующих STING. Репортерные клетки инфицировали различными количествами (M3) штаммов бактерий, экспрессирующих и транслоцирующих YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I
- 30 человека (RIG-I₁₋₂₄₅) и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂. Продемонстрировали, что YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека дозозависимо индуцирует ответ IFN I типа в этой линии репортерных клеток меланомы (**фиг. 8**), в то время как фоновый штамм бактерий (*Y. enterocolitica* ΔHOPEMT) не был способен индуцировать

такой ответ (**фиг. 8**). Было обнаружено, что активность YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека немного выше, когда он кодируется на среднекопийном векторе (таком как pBad_Si2 или pTZP-715), по сравнению с кодированием на pYV (**фиг.**

8). Было обнаружено, что дополнительное кодирование YopE₁₋₁₃₈-cGAS

5 человека₁₆₁₋₅₂₂ на pYV (где доставка cGAS₁₆₁₋₅₂₂ лишь минимально способствует индукции IFN на клетках B16F1) не нарушает активность кодируемого pYV YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека.

Таким образом, была обнаружена неожиданно высокая активность YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека при кодировании на pYV по сравнению с кодированием

10 на векторе, поскольку следовало предполагать сильно сниженную активность вследствие очень низкого (единичного) числа копий по сравнению с вектором (среднекопийным). Кроме того, было обнаружено, что дополнительное

кодирование YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ на pYV не нарушает активность кодируемого pYV YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека, что также неожиданно,

15 поскольку следовало ожидать, что присутствие второго белка-груза приведет к снижению количества доставленного первого белка-груза.

Оценивали индукцию IFN I типа в линии репортерных макрофагов RAW при доставке слитого белка YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂. Репортерные клетки

20 инфицировали различными количествами (МЗ) штаммов бактерий,

экспрессирующих и транслоцирующих YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂.

Продемонстрировали, что YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ дозозависимо

индуцирует ответ IFN I типа в этой линии репортерных клеток меланомы (**фиг.**

9), в то время как фоновый штамм бактерий (*Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ) не был

25 способен индуцировать такой ответ (**фиг. 9**). Обнаружили, что активность

YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ сильно повышена при кодировании на

среднекопийном векторе (таком как pBad_Si2 или pTZP-715) по сравнению с кодированием на pYV (**фиг. 9**).

Оценивали индукцию IFN I типа в линии репортерных клеток меланомы при

30 доставке слитого белка YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши (RIG-I₁₋₂₄₆). Репортерные

клетки меланоцитов мыши B16F1 инфицировали различными количествами

(МЗ) штаммов бактерий, экспрессирующих и транслоцирующих YopE₁₋₁₃₈-

CARD₂ RIG-I мыши. Продемонстрировали, что YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши

дозозависимо индуцирует ответ IFN I типа в этой линии репортерных клеток

меланомы (**фиг. 10**), в то время как фоновый штамм бактерий (*Y. enterocolitica* Δ HOPEMT) не был способен индуцировать такой ответ (**фиг. 10**). Обнаружили, что активность YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши была немного выше при кодировании на среднекопийном векторе (таком как pBad_Si2 или pT3P-715) по сравнению с кодированием на pYV (**фиг. 10**). Было обнаружено, что двойное кодирование YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши на pYV и среднекопийном векторе было сопоставимо с кодированием YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I мыши только на среднекопийном векторе, при этом неожиданно демонстрируя более высокий сигнал уже при более низких МЗ (**фиг. 10**).

10

Оценивали индукцию IFN I типа в линии репортерных клеток меланомы при доставке слитого белка YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅) в комбинации с YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂. В линии репортерных меланоцитов мыши B16F1 доставка cGAS₁₆₁₋₅₂₂ вносит лишь минимальный вклад в индукцию IFN на клетках B16F1 по сравнению с передачей сигналов RIG. Таким образом, эта линия репортерных клеток может быть использована для оценки, главным образом, RIG-зависимой передачи сигналов и ее нарушения путем дополнительного кодирования cGAS₁₆₁₋₅₂₂ или других белков, активирующих STING. Репортерные клетки инфицировали различными количествами (МЗ) штаммов бактерий, экспрессирующих и транслоцирующих YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂.

15

Продемонстрировали, что YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека в комбинации с YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ дозозависимо индуцирует ответ IFN I типа в этой линии репортерных клеток меланомы (**фиг. 11**), в то время как фоновый штамм бактерий (*Y. enterocolitica* Δ HOPEMT) не был способен индуцировать такой ответ (**фиг. 11**). Обнаружили идентичную активность, когда YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ кодировались как на среднекопийном векторе (таком как pBad_Si2 или pT3P-715), так и pYV, по сравнению с кодированием YopE₁₋₁₃₈-RIG-I человека на среднекопийном векторе (таком как pBad_Si2 или pT3P-715) и на pYV и дополнительным кодированием YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ только на pYV (**фиг. 11**). Таким образом, было обнаружено, что дополнительное кодирование YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (где доставка cGAS₁₆₁₋₅₂₂ лишь минимально способствует

20

25

30

индукции IFN на клетках B16F1) на векторе не нарушает активность рYV и кодируемого вектором YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (**фиг. 11**).

Оценивали индукцию IFN I типа в линии репортерных клеток меланомы B16F1, макрофагов RAW и THP-1 человека при доставке слитого белка YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅) в комбинации с YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂. Линию репортерных клеток B16F1 можно использовать для оценки, главным образом, RIG-I-зависимой передачи сигналов, линию клеток THP-1 - для оценки, главным образом, сGAS-зависимой передачи сигналов, а линию клеток RAW - для оценки потенциала совместной активации сGAS и RIG-I. Репортерные клетки инфицировали различными количествами (МЗ) штаммов бактерий, экспрессирующих и транслоцирующих YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂. Продемонстрировали, что YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека в комбинации с YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ дозозависимо индуцировал ответ IFN I типа во всех линиях репортерных клеток (**фиг. 12**), в то время как фоновый штамм бактерий (*Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ) не был способен индуцировать такой ответ (**фиг. 12**).

В клетках B16F1, отражающих зависимость от RIG-I передачу сигналов, самый сильный сигнал наблюдался, когда YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека кодировался на среднекопийном векторе, хотя разница с кодируемым рYV YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека невелика. Дополнительное кодирование сGAS₁₆₁₋₅₂₂ на векторе, по-видимому, не препятствует доставке и активности CARD₂ RIG-I (**фиг. 12**).

В клетках THP-1, отражающих зависимость от сGAS передачу сигналов, самый сильный сигнал наблюдался, когда YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ кодировался на среднекопийном векторе, с заметным отличием от кодируемого на рYV YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂. Дополнительное кодирование CARD₂ RIG-I на векторе, по-видимому, не препятствует доставке и активности сGAS₁₆₁₋₅₂₂ (**фиг. 12**).

В клетках RAW, отражающих зависимость от сGAS и RIG-I передачу сигналов, обнаружили равные сигналы, независимо от того, кодировались ли сGAS₁₆₁₋₅₂₂ или CARD₂ RIG-I только на рYV или дополнительно на векторе (среднекопийном) (**фиг. 12**). В этой линии клеток пиковый уровень активации

был достигнут при очень низких МЗ, что может объяснить равные сигналы всех тестируемых конструкций.

Таким образом, доставка сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека, кодируемых на эндогенной плазмиде рYV и дополнительно на

5 среднеекопийном векторе, приводила к наилучшим результатам при рассмотрении результатов всех тестируемых линий клеток и, следовательно, по-видимому, демонстрировала независимый от типа клеток высокий уровень доставки и активности.

10 Исследования биораспределения в модели рака молочной железы у мышей.

Мышей, несущих сингенные подкожные опухоли молочной железы 4T1, колонизировали различными бактериальными штаммами путем внутривенного введения и оценивали колонизацию. Для валидации *Y. enterocolitica* подвида

15 гетерологичные белки, индуцирующие IFN I типа (либо на рYV, либо на векторе, либо как на рYV, так и на векторе), проводили исследования аллотрансплантата опухоли мышам с использованием общепринятой модели рака молочной железы 4T1 (ATCC № CRL-2539). Когда s.c. опухоли достигали

20 инфицировали 1×10^7 кое *Y. enterocolitica* подвида *palearctica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T, либо контрольным штаммом, не доставляющим груз, либо кодированием на эндогенной плазмиде рYV YopE₁₋₁₃₈ -человеческом сGAS 161-522 и YopE₁₋₁₃₈ -человеческом RIG-I-карте 2 (RIG-I₁₋₂₄₅), либо кодированием как

25 на эндогенной плазмиде рYV, так и на векторе номера копии среды YopE₁₋₁₃₈ -человеческом сGAS 161-522 и YopE₁₋₁₃₈ -человеческом RIG-I-карте 2, или кодирование как на эндогенной плазмиде рYV, так и на векторе с высоким

30 числом копий YopE₁₋₁₃₈-человеческий сGAS 161-522 и человеческий YopE₁₋₁₃₈-человеческий RIG-I CARD₂, или кодирование как на эндогенной плазмиде рYV, так и на векторе с низким числом копий YopE₁₋₁₃₈-человеческий сGAS₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-человеческий RIG-I CARD₂. Для того чтобы позволить рост бактерий мышам предварительно вводили десфероксамин за 24 ч до инфицирования. У

мышей, инфицированных аттенуированным по вирулентности штаммом *Y. enterocolitica* подвида *palearctica* MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T, не наблюдалось

значительной потери массы тела, и они все еще получали нормальный балл при оценке по внешнему виду и поведению на 6 день после инфекции.

Бактериальную нагрузку определяли в виде колониобразующих единиц КОЕ на грамм опухоли (КОЕ/г) (**фиг. 13**) на 6 день после инфицирования. У этих мышей, инфицированных *Y. enterocolitica* подвида *palearctica* MRS40 Δ*uorH*, O, P, E, M, T, в злокачественной солидной опухоли на 6 день после инфекции были обнаружены живые бактерии (**фиг. 13**). Аналогичным образом, для всех производных штаммов от *Y. enterocolitica* Δ*uorH*, O, P, E, M, T, независимо от того, кодируют ли они гетерологичный белок, индуцирующий IFN I типа, на рYV, на векторе или как на рYV, так и на векторе, живые бактерии были обнаружены в злокачественной солидной опухоли на 6 день после инфекции на уровнях, аналогичных таковым для *Y. enterocolitica* Δ*uorH*, O, P, E, M, T. Таким образом, было обнаружено, что доставка *YorE*₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и *YorE*₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I и копияность вектора не изменяют бактериальные нагрузки солидных опухолей в модели рака молочной железы 4T1 (**фиг. 13**).

Экспрессию и секрецию *YorE*₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅) оценивали в зависимости от копияности вектора, кодирующего *YorE*₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека. С этой целью проводили эксперименты по секреции *in vitro*.

Экспрессию в бактериях или секрецию в супернатант оценивали для *Y. enterocolitica* Δ*uorH* OPEMT: либо контрольного штамма, не доставляющего груз, либо кодирующего *YorE*₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека на низко-, средне- или высококопийном векторе. Наиболее высокую экспрессию обнаружили для высококопийной плазмиды (**фиг. 14I**), что соответствовало ожиданиям, основанным на увеличении числа копий вектора, кодирующего *YorE*₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека. Удивительно, но в анализе секреции была обнаружена самая высокая секреция для плазмиды со средним и низким количеством копий, в то время как кодирование на основе плазмиды с высоким количеством копий давало явно меньшую секрецию КАРТЫ₂ *YorE*₁₋₁₃₈-человека RIG-I. (**фигура 14 II**). Следовательно, высококопийная плазида, по-видимому, приводит к повышенной экспрессии, но сниженной способности к секреции *YorE*₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (**фигура 14**).

Кроме того, в клеточных анализах с использованием линии репортерных клеток

В16F1 оценивали потенциал активации в зависимости от копияности вектора, кодирующего только $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека (RIG-I₁₋₂₄₅), дополнительно к кодируемым $pYV \Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂ (фиг. 15). Неожиданно, для $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека, кодируемого на векторе, дополнительно к кодируемым $pYV \Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂, индукция IFN I типа была наиболее слабой при кодировании $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека на низкокопийном векторе (фиг. 15). Этот результат отличается от результата анализа секреции (фиг. 14), но может быть объяснен взаимодействием кодирования на векторе и на pYV (как на фиг. 10) и кодированием только на основе вектора (как на фиг. 8). Наиболее высокая индукция IFN I типа наблюдалась, когда $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека кодировался среднекопийной плазмидой (фиг. 15).

Оценивали индукцию IFN I типа в линии репортерных клеток меланомы В16F1, макрофагов RAW и THP-1 человека при доставке слитого белка $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека (RIG-I₁₋₂₄₅) в комбинации с $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂ в зависимости от копияности вектора, кодирующего как $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека, так и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂ (фиг. 16). Линию репортерных клеток В16F1 можно использовать для оценки, главным образом, RIG-I-зависимой передачи сигналов, линию клеток THP-1 - для оценки, главным образом, cGAS-зависимой передачи сигналов, а линию клеток RAW - для оценки потенциала совместной активации cGAS и RIG-I (фиг. 18). Репортерные клетки инфицировали различными количествами (МЗ) штаммов бактерий, экспрессирующих и транслоцирующих $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂. Продемонстрировали, что $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека в комбинации с $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂ дозозависимо индуцирует ответ IFN I типа во всех линиях репортерных клеток (фиг. 16), в то время как фоновый штамм бактерий (*Y. enterocolitica* $\Delta HOPEMT$) не был способен индуцировать такой ответ (фиг. 16).

Во всех тестируемых линиях клеток комбинация кодирования на $pYV \Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂ с кодированием на векторе $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂ индуцировала наиболее высокую активацию IFN I типа, когда вектор

представлял собой среднекопийный вектор (**фиг. 16**), затем следовала низкокопийная плаزمиды, а самую слабую активацию вызывала высококопийная плазмиды (**фиг. 16**). Хотя результаты показали, что двойное кодирование на рYV и векторе является предпочтительным для повышенной активации IFN I типа (см. **фиг. 10 и 19**), а также генетической стабильности (см. **фиг. 20 и 21**), эти данные позволяют предположить, что среднекопийный вектор является оптимальным.

Резюмируя результаты по влиянию копияности вектора, кодирующего YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅), YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ или YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (**фиг. 14-16**), среднекопийный вектор является наиболее предпочтительным.

Оптимальная комбинация для доставки двух белков, кодируемых эндогенной плазмидой вирулентности и среднекопийным вектором, здесь показана для YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅) и YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и представлена на **фиг. 17**. Оптимизированной доставки и генетической стабильности cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и CARD₂ RIG-I человека достигают путем кодирования на эндогенной плазмиде рYV и дополнительно на среднекопийном векторе.

Путем исследования доставки индуцирующих IFN I типа белков YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и ее влияния на различные типы клеток, оценивали различия в способности этих двух белков к индуцированию. Оптимизированная комбинация слитых белков должна затем позволить активировать разнообразный набор типов клеток. Доставка YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I приводит к дифференциальной индукции передачи сигналов IFN I типа в меланоцитах B16F1 (**фиг. 18 A**), глиобластоме LN-229 человека (**фиг. 18 B**), макрофагах RAW мыши (**фиг. 18 C**) или макрофагах THP-1 человека (**фиг. 18 D**). YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I приводит к более сильной индукции IFN I типа, чем YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ на клетках B16F1 мыши и клетках глиобластомы LN-229 человека. На макрофагах RAW мыши потенциал индукции IFN I типа у YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека сопоставим, в то время как YopE₁₋₁₃₈-cGAS

человека₁₆₁₋₅₂₂ превосходит по эффективности $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ на макрофагах ТНР-1 человека.

В качестве примера, линию клеток В-клеточной лимфомы мыши А20
 5 инфицировали *Y. enterocolitica* $\Delta HOPEMT$, кодирующим на среднекопийной плазмиде $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека, кодирующим на среднекопийной плазмиде $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂, или кодирующим на среднекопийной плазмиде и на рYV $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂. Штамм, кодирующий на
 10 среднекопийной плазмиде $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека, индуцирует меньший ответ IFN I типа в клетках А20, чем штамм, кодирующий на среднекопийной плазмиде $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂, который снова превзойден по эффективности штаммом, кодирующим на среднекопийной плазмиде и на рYV $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$
 15 человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂ (фиг. 19 А).

В другом примере линию Т-клеток человека Jurkat инфицировали *Y. enterocolitica* $\Delta HOPEMT$, кодирующим на среднекопийной плазмиде $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂, или кодирующим на среднекопийной плазмиде и на рYV $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂. Штамм, кодирующий на среднекопийной плазмиде
 20 $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂, превосходит по эффективности штамм, кодирующий на среднекопийной плазмиде и на рYV $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$ человека и $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂ (фиг. 19 В).

25 Для оценки генетической стабильности, когда бактериальные штаммы растут *in vivo* (растут в опухолях), мышей, несущих сингенные подкожные опухоли меланомы В16F10, колонизировали бактериальным штаммом *Y. enterocolitica* подвида *palearctica* MRS40 ДуорН, О, Р, Е, М, Т, кодирующим на эндогенной плазмиде рYV оба $\Upsilon_{opE_{1-138}-cGAS}$ человека₁₆₁₋₅₂₂ и $\Upsilon_{opE_{1-138}-CARD_2 RIG-I}$
 30 человека (RIG-I₁₋₂₄₅), путем внутривенного введения, и оценивали бактерии, выделенные из опухоли, на присутствие соответствующего селективного маркера. Когда подкожные опухоли достигали определенного размера (около 100 - 200 мм³), мышей внутривенно инфицировали 1 x 10⁶ КОЕ *Y. enterocolitica* подвида MRS40 ДуорН, О, Р, Е, М, Т, кодирующим на эндогенной плазмиде

рYV оба YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека. Для того чтобы позволить рост бактерий мышам предварительно вводили десфреоксамин за 24 ч до инфицирования. У мышей, инфицированных аттенуированным по вирулентности штаммом *Y. enterocolitica* подвида

5 paelearctica MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T, не наблюдалось значительной потери массы тела, и они получали нормальный балл при оценке по внешнему виду и поведению. Бактерии выделяли на 2 и 4 день после инфицирования и снимали реплику колоний на чашки с селективным агаром для оценки присутствия

10 эндогенной плазмиды рYV (**фиг. 20**). Почти у всех прошедших анализ животных плазида рYV оказалась очень стабильной и присутствовала на 2 день и на 4 день после введения (**фиг. 20**).

Аналогично, мышей, несущих сингенные подкожные опухоли молочной железы ЕМТ-6, колонизировали бактериальным штаммом *Y. enterocolitica* подвида

15 paelearctica MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T, кодирующим на эндогенной плазмиде рYV оба YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅), путем введения внутрь опухоли, и оценивали бактерии, выделенные из опухоли, на наличие соответствующего селективного маркера. Когда

20 подкожные опухоли достигали определенного размера (около 100 - 200 мм³), мышей в/в инфицировали 7,5 x 10⁷ КОЕ *Y. enterocolitica* подвида paelearctica MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T, кодирующим на эндогенной плазмиде рYV оба

YopE₁₋₁₃₈-cGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека. Для того чтобы позволить рост бактерий мышам предварительно вводили десфреоксамин до инфицирования. У мышей, инфицированных аттенуированным по

25 вирулентности штаммом *Y. enterocolitica* подвида paelearctica MRS40 ΔyopH, O, P, E, M, T, не наблюдалось значительной потери массы тела, и они получали нормальный балл при оценке по внешнему виду и поведению. Бактерии

выделяли на 1 и 2 день после инфицирования и снимали реплику колоний на чашки с селективным агаром для оценки присутствия эндогенной плазмиды

30 рYV и среднекопийного вектора (**фиг. 21**). Почти у всех прошедших анализ животных плазида рYV и вектор оказались очень стабильными и присутствовали на 1 и 2 день после введения (**фиг. 21**). Было также обнаружено, что некоторые выделенные колонии бактерий содержали только плазмиду рYV, но не среднекопийный вектор, и наоборот. В целом, плазида рYV оказалась

немного более стабильной, чем среднекопийный вектор, вплоть до 2 дня после введения.

Для оценки влияния $YopE_{1-138}$ -CARD₂ RIG-I человека (RIG-I₁₋₂₄₅) и $YopE_{1-138}$ -сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂, доставленных в опухолевые клетки *in vivo*, авторы настоящего изобретения провели исследования на мышах C57BL/6 дикого типа с п/к аллотрансплантатом клеток меланомы B16F10. Мышам интратуморально (интратуморально) инъекцировали ФБР (фиг. 23) или $7,5 \cdot 10^7$ *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ(фиг. 24), *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ + $YopE_{1-138}$ КАРТА₂ RIG1 ЧЕЛОВЕКА и $YopE_{1-138}$ сGAS 161-522 человека, кодируемого эндогенной плазмидой pYV (на эндогенных сайтах уорН и уорЕ, соответственно) (фиг. 25), и дополнительно на векторе среднего числа копий (на котором $YopE_{1-138}$ -сGAS 161-522 человека и КАРТА₂ $YopE_{1-138}$ -RIG-I кодируются в одном опероне под контролем промотора уорЕ), когда опухоль достигает размера около 60-130 мм

3. День первой в/о инъекции бактерий обозначали как день 0. Мышам вводили в/о инъекции в Д0, Д1, Д5, Д6, Д10 и Д11. Объем опухоли измеряли в течение следующих дней с помощью штангенциркуля. Лечение *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ отдельно продемонстрировало влияние на прогрессирование объема опухоли: у 2/15 мышей наблюдалась полная регрессия опухоли (фиг. 24). Было обнаружено, что *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ, который доставлял $YopE_{1-138}$ -сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и $YopE_{1-138}$ -CARD₂ RIG-I, приводил к более выраженному влиянию на прогрессирование опухоли: у 8/15 мышей наблюдалась полная и длительная регрессия опухоли (фиг. 25). Также можно увидеть влияние *Y. enterocolitica* ΔНОРЕМТ отдельно и дополнительно при доставке $YopE_{1-138}$ -сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и $YopE_{1-138}$ -CARD₂ RIG-I на средние объемы опухоли (фиг. 22). Эти результаты подчеркивают, что такие бактерии и их ТЗСС можно применять, чтобы весьма значительно препятствовать прогрессированию опухоли, и что доставка белков, индуцирующих IFN I типа, хорошо подходит для индукции регрессии первичной опухоли.

30

Таким образом, кодируемый вектором $YopE_{1-138}$ -сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и в меньшей степени также кодируемый вектором $YopE_{1-138}$ -CARD₂ RIG-I человека приводят к более высокой активации ответа IFN I типа, чем их кодирование плазмидой pYV (фиг. 8 и 9). Двойное кодирование $YopE_{1-138}$ -CARD₂ RIG-I

человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ на векторе не ухудшает активность каждого отдельного груза (**рис. 11 и 12**). Кодирование двух различных гетерологичных грузов имеет преимущество более широкого потенциала активации на различных типах клеток (**фиг. 18 и 19**). Таким образом, кодирование на основе вектора, по-видимому, необходимо для высокого потенциала активации, тогда как было обнаружено, что двойное кодирование двух гетерологичных грузов повышает общую активность, то есть комбинация CARD₂ RIG-I с сGAS₁₆₁₋₅₂₂ приводила к передаче сигналов интерферона в более разнообразных типах клеток по сравнению с доставкой только сGAS₁₆₁₋₅₂₂ или CARD₂ RIG-I.

Кодирование на pYV гетерологичных белков обладает преимуществом повышенной генетической стабильности *in vivo* над кодированием на основе вектора (**фиг. 20 и 21**). Было обнаружено, что кодирование YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ на pYV и на основе вектора превосходит или сопоставимо по эффективности с кодированием только на основе вектора с точки зрения потенциала активации IFN (**фиг. 10 и 19**). В целом, эти результаты показывают, что комбинированная доставка сGAS человека и CARD RIG-I человека увеличивает диапазон типов клеток, в которых может быть достигнута индукция IFN I типа (по сравнению с доставкой только сGAS или только CARD RIG-I), и увеличивает эффективность индукции интерферона в некоторых типах клеток.

Таким образом, двойное кодирование на pYV и на векторе YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ может считаться оптимальным для максимальной активности YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I человека и YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ (см. **фиг. 19** в качестве примера) и лучшей генетической стабильности (см. **фиг. 20 и 21**). Кроме того, было обнаружено, что среднекопийный вектор превосходит по эффективности низко- или высококопийные векторы (**фиг. 13 - 16**).

Таким образом, штамм с комбинированным кодированием YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I на pYV и на среднекопийном векторе (например, как показано на **фиг. 17**), где на среднекопийном векторе YopE₁₋₁₃₈-сGAS человека₁₆₁₋₅₂₂ и YopE₁₋₁₃₈-CARD₂ RIG-I кодируются одним опероном, объединяет все предпочтительные признаки (потенциала активации широкого диапазона типа клеток, повышенную эффективность, генетическую

стабильность). Такой штамм (показанный на **фиг. 17**) также был, в конечном счете, проверен на его влияние на прогрессирование опухоли в модели солидной опухоли у животных (**фиг. 22 - 25**), где было обнаружено, что он вызывает длительную и полную регрессию опухоли у более чем 50% животных, получивших лечение.

Перечень литературных источников

- 1 Hayes, C. S., Aoki, S. K. & Low, D. A. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet* **44**, 71-90,
5 doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091449 (2010).
- 2 Cornelis, G. R. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811-825, doi:nrmicro1526 [pii]10.1038/nrmicro1526 (2006).
- 3 Blanco-Toribio, A., Muyldermans, S., Frankel, G. & Fernandez, L. A. Direct injection of functional single-domain antibodies from *E. coli* into human cells. *3PLoS One* **5**, e15227, doi:10.1371/journal.pone.0015227 (2010).
- 10 4 Bichsel, C. *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. *Cell Reprogram* **15**, 117-125, doi:10.1089/cell.2012.0058 (2013).
- 5 Bichsel, C. *et al.* Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and
15 differentiated cells. *PLoS One* **6**, e16465, doi:10.1371/journal.pone.0016465 (2011).
- 6 Chamekh, M. *et al.* Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the *Shigella* type III secretion apparatus. *J Immunol* **180**, 4292-4298 (2008).
- 20 7 Skurnik, M. & Wolf-Watz, H. Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**, 517-529 (1989).
- 8 Isberg, R. R., Voorhis, D. L. & Falkow, S. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**, 769-778 (1987).
- 25 9 Mota, L. J. & Cornelis, G. R. The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* **37**, 234-249, doi:R673752030212825 [pii]10.1080/07853890510037329 (2005).
- 10 Trosky, J. E., Liverman, A. D. & Orth, K. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* **10**, 557-565, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x (2008).
- 30 11 Brenner, D. & Mak, T. W. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 871-877, doi:S0955-0674(09)00160-4 [pii]10.1016/j.ceb.2009.09.004 (2009).
- 12 Chalah, A. & Khosravi-Far, R. The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol* **615**, 25-45, doi:10.1007/978-1-4020-6554-5_3 (2008).
- 35 13 Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742-758, doi:S0092-8674(11)01283-9 [pii]10.1016/j.cell.2011.10.033 (2011).
- 14 Waugh, D. S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* **80**, 283-293, doi:S1046-5928(11)00203-8 [pii]10.1016/j.pep.2011.08.005 (2011).
- 40 15 Howard, S. L. *et al.* Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J Bacteriol* **188**, 3645-3653, doi:10.1128/JB.188.10.3645-3653.2006 (2006).
- 45 16 Thomson, N. R. *et al.* The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet* **2**, e206, doi:10.1371/journal.pgen.0020206 (2006).
- 17 Pelludat, C., Hogardt, M. & Heesemann, J. Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to

- Y. enterocolitica MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun* **70**, 1832-1841 (2002).
- 18 Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P. & Cornelis, G.
5 Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of
Yersinia enterocolitica W227. *Infect Immun* **57**, 2534-2541 (1989).
- 19 Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate
cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells. *Mol Microbiol* **14**, 583-
594 (1994).
- 10 20 Sarker, M. R., Neyt, C., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The Yersinia Yop
virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J
Bacteriol* **180**, 1207-1214 (1998).
- 21 Neubauer, H., Aleksic, S., Hensel, A., Finke, E. J. & Meyer, H. Yersinia
enterocolitica 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form
15 three homology groups. *Int J Med Microbiol* **290**, 61-64, doi:10.1016/S1438-
4221(00)80107-1 (2000).
- 22 Feldman, M. F., Muller, S., Wuest, E. & Cornelis, G. R. SycE allows secretion
of YopE-DHFR hybrids by the Yersinia enterocolitica type III Ysc system.
Mol Microbiol **46**, 1183-1197, doi:3241 [pii] (2002).
- 20 23 Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. A synonymous mutation in Yersinia
enterocolitica yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *J
Bacteriol* **187**, 707-715, doi:10.1128/JB.187.2.707-715.2005 (2005).
- 24 Wolke, S., Ackermann, N. & Heesemann, J. The Yersinia enterocolitica type 3
secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of
25 bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins. *Cell Microbiol* **13**,
1339-1357, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01623.x (2011).
- 25 Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Genetic analysis of the yopE region of Yersinia
spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE
expression. *J Bacteriol* **172**, 1547-1555 (1990).
- 30 26 Sambrook, J. (ed David W. Russell) (Cold Spring Harbor Laboratory Press,
Cold Spring Harbor, N.Y. , 2001).
- 27 Alto, N. M. & Dixon, J. E. Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of
bacterial type III effector proteins. *Methods Enzymol* **439**, 131-143,
doi:S0076-6879(07)00410-7 [pii]10.1016/S0076-6879(07)00410-7 (2008).
- 35 28 Alto, N. M. *et al.* Identification of a bacterial type III effector family with G
protein mimicry functions. *Cell* **124**, 133-145, doi:S0092-8674(05)01229-8
[pii]10.1016/j.cell.2005.10.031 (2006).
- 29 Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G. R. A wide-host-range suicide vector for
improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA
40 gene of Yersinia enterocolitica. *Gene* **109**, 137-141, doi:0378-1119(91)90599-
7 [pii] (1991).
- 30 Yoneda, Y. *et al.* A long synthetic peptide containing a nuclear localization
signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of
IgM into the nucleus efficiently. *Exp Cell Res* **201**, 313-320 (1992).
- 45 31 Metcalf, W. W., Jiang, W. & Wanner, B. L. Use of the rep technique for allele
replacement to construct new Escherichia coli hosts for maintenance of R6K
gamma origin plasmids at different copy numbers. *Gene* **138**, 1-7 (1994).
- 32 Diepold, A. *et al.* Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion
injectisome. *Embo J* **29**, 1928-1940, doi:emboj201084
50 [pii]10.1038/emboj.2010.84 (2010).

- 33 Iriarte, M., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The rpoS gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect Immun* **63**, 1840-1847 (1995).
- 34 Cornelis, G., Vanootegem, J. C. & Sluiter, C. Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* **2**, 367-379, doi:0882-4010(87)90078-7 [pii] (1987).
- 5 35 Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* **70**, 4165-4176 (2002).
- 10 36 Boyd, A. P., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* **182**, 4811-4821 (2000).
- 37 Iriarte, M. & Cornelis, G. R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**, 915-929 (1998).
- 15 38 Kudryashev, M. *et al.* In situ structural analysis of the *Yersinia enterocolitica* injectisome. *Elife* **2**, e00792, doi:10.7554/eLife.0079200792 [pii] (2013).
- 39 39 Schulte, R. *et al.* *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* **14**, 1471-1484 (2000).
- 20 40 Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C. & Cornelis, G. R. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**, 1278, doi:307/5713/1278 [pii]10.1126/science.1107679 (2005).
- 41 Carrington, J. C. & Dougherty, W. G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3391-3395 (1988).
- 25 42 Kapust, R. B., Tozser, J., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 949-955, doi:10.1016/S0006-291X(02)00574-0S0006-291X(02)00574-0 [pii] (2002).
- 43 Liang, H., Gao, H., Maynard, C. A. & Powell, W. A. Expression of a self-processing, pathogen resistance-enhancing gene construct in *Arabidopsis*. *Biotechnol Lett* **27**, 435-442, doi:10.1007/s10529-005-1884-9 (2005).
- 30 44 Weber, W. *et al.* Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol* **20**, 901-907, doi:10.1038/nbt731nbt731 [pii] (2002).
- 45 Kapust, R. B. *et al.* Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng* **14**, 993-1000 (2001).
- 35 46 Lee, V. T., Anderson, D. M. & Schneewind, O. Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol* **28**, 593-601 (1998).
- 40 47 Gray, D. C., Mahrus, S. & Wells, J. A. Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease. *Cell* **142**, 637-646, doi:S0092-8674(10)00783-X [pii]10.1016/j.cell.2010.07.014 (2010).
- 48 48 Henrichs, T. *et al.* Target-directed proteolysis at the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4246-4251, doi:102/12/4246 [pii]10.1073/pnas.0408520102 (2005).
- 45 49 Aepfelbacher, M., Trasak, C. & Ruckdeschel, K. Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb Haemost* **98**, 521-529 (2007).
- 50 50 Trulzsch, K., Sporleder, T., Igwe, E. I., Russmann, H. & Heesemann, J. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to

- pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* **72**, 5227-5234, doi:10.1128/IAI.72.9.5227-5234.2004 (2004).
- 51 Bohme, K. *et al.* Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique
intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog* **8**,
5 e1002518, doi:10.1371/journal.ppat.1002518 (2012).
- 52 Rohde, J. R., Luan, X. S., Rohde, H., Fox, J. M. & Minnich, S. A. The
Yersinia enterocolitica pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic
DNA bends which melt at 37 degrees C. *J Bacteriol* **181**, 4198-4204 (1999).
- 53 Curtiss, R., 3rd, Galan, J. E., Nakayama, K. & Kelly, S. M. Stabilization of
10 recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Res Microbiol* **141**, 797-805
(1990).
- 54 Spreng, S. & Viret, J. F. Plasmid maintenance systems suitable for GMO-
based bacterial vaccines. *Vaccine* **23**, 2060-2065,
doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.009 (2005).
- 15 55 Neyt, C., Iriarte, M., Thi, V. H. & Cornelis, G. R. Virulence and arsenic
resistance in *Yersinia*. *J Bacteriol* **179**, 612-619 (1997).
- 56 Wu, J. & Chen, Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic
acids. *Annu Rev Immunol* **32**, 461-488, doi:10.1146/annurev-immunol-
032713-120156 (2014).
- 20 57 Kranzusch, P. J. *et al.* Ancient Origin of cGAS-STING Reveals Mechanism of
Universal 2',3' cGAMP Signaling. *Mol Cell* **59**, 891-903,
doi:10.1016/j.molcel.2015.07.022 (2015).
- 58 Commichau, F. M., Dickmanns, A., Gundlach, J., Ficner, R. & Stulke, J. A
jack of all trades: the multiple roles of the unique essential second messenger
25 cyclic di-AMP. *Mol Microbiol* **97**, 189-204, doi:10.1111/mmi.13026 (2015).
- 59 Corrales, L. *et al.* Direct Activation of STING in the Tumor
Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and
Immunity. *Cell Rep* **11**, 1018-1030, doi:10.1016/j.celrep.2015.04.031 (2015).
- 60 De, N., Navarro, M. V., Raghavan, R. V. & Sondermann, H. Determinants for
30 the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator
WspR. *J Mol Biol* **393**, 619-633, doi:10.1016/j.jmb.2009.08.030 (2009).
- 61 Witte, G., Hartung, S., Buttner, K. & Hopfner, K. P. Structural biochemistry
of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated
by DNA recombination intermediates. *Mol Cell* **30**, 167-178,
35 doi:10.1016/j.molcel.2008.02.020 (2008).
- 62 Panne, D., McWhirter, S. M., Maniatis, T. & Harrison, S. C. Interferon
regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *J
Biol Chem* **282**, 22816-22822, doi:10.1074/jbc.M703019200 (2007).
- 63 Engel, C., G. Brugmann, S. Lambing, L.H. Muhlenbeck, S. Marx, C. Hagen,
40 D. Horvath, M. Goldeck, J. Ludwig, A.M. Herzner, J.W. Drijfhout, D.
Wenzel, C. Coch, T. Tuting, M. Schlee, V. Hornung, G. Hartmann, and J.G.
Van den Boorn. 2017. RIG-I Resists Hypoxia-Induced Immunosuppression
and Dedifferentiation. *Cancer Immunol Res.* 5:455-467.
- 64 Hou, F., L. Sun, H. Zheng, B. Skaug, Q.X. Jiang, and Z.J. Chen. 2011. MAVS
45 forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral
innate immune response. *Cell.* 146:448-461.
- 65 Kranzusch, P.J., A.S. Lee, J.M. Berger, and J.A. Doudna. 2013. Structure of
human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in
innate immunity. *Cell Rep.* 3:1362-1368.

- 66 Seth, R.B., L. Sun, C.K. Ea, and Z.J. Chen. 2005. Identification and
characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that
activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 122:669-682.
- 67 Alton, N., Vapnek, D. 1979. Nucleotide sequence analysis of the
5 chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature* 282, 864–869.
<https://doi.org/10.1038/282864a0>.
- 68 Ittig, S.J., 2015. A bacterial type III secretion-based protein delivery tool for
broad applications in cell biology. *J Cell Biol* 23 November 2015; 211 (4):
913–931. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201502074>.
- 10 69 Eisenhauer, E.A., P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R.
Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L.
Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, and J. Verweij. 2009. New
response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline
(version 1.1). *Eur J Cancer*. 45:228-247.
- 15 70 Seymour, L., J. Bogaerts, A. Perrone, R. Ford, L.H. Schwartz, S. Mandrekar,
N.U. Lin, S. Litiere, J. Dancey, A. Chen, F.S. Hodi, P. Therasse, O.S.
Hoekstra, L.K. Shankar, J.D. Wolchok, M. Ballinger, C. Caramella, E.G.E. de
Vries, and R.w. group. 2017. iRECIST: guidelines for response criteria for use
in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol*. 18:e143-e152.
- 20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий, который содержит
- 5 i) первую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с
- 10 промотором;
- ii) вторую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с
- 15 промотором;
- iii) третью полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с
- 20 промотором; и
- 25 iv) четвертую полинуклеотидную молекулу, содержащую последовательность нуклеотидов, кодирующую гетерологичный белок или его фрагмент, слитую в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, причем указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, функционально связана с промотором,
- 30 причем указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы расположены на векторе, который содержится в указанном штамме

- грамотрицательных бактерий, а указанная третья и указанная четвертая полинуклеотидные молекулы расположены на хромосоме указанного штамма грамотрицательных бактерий или на внехромосомном генетическом элементе, который содержится в указанном штамме
- 5 грамотрицательных бактерий, при условии, что указанный внехромосомный генетический элемент не является вектором, на котором расположены указанная первая и указанная вторая полинуклеотидные молекулы.
- 10 2. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по п. 1, характеризующийся тем, что последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, первой полинуклеотидной молекулы, и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, третьей
- 15 полинуклеотидной молекулы кодируют один и тот же гетерологичный белок или его фрагмент.
3. Рекомбинантный аттенуированный по вирулентности штамм грамотрицательных бактерий по п. 1 или п. 2, характеризующийся тем, что
- 20 последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, второй полинуклеотидной молекулы, и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, четвертой полинуклеотидной молекулы, кодируют один и тот же гетерологичный белок или его фрагмент.
- 25 4. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 3, характеризующийся тем, что указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал
- 30 доставки из бактериального эффекторного белка первой полинуклеотидной молекулы, и указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка второй

полинуклеотидной молекулы, функционально связаны с одним и тем же промотором.

5. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 4, характеризующийся тем, что последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, третьей полинуклеотидной молекулы и последовательность нуклеотидов, кодирующая гетерологичный белок или его фрагмент, слитая в рамке с 3'-концом последовательности нуклеотидов, кодирующей сигнал доставки из бактериального эффекторного белка, четвертой полинуклеотидной молекулы функционально связаны с двумя различными промоторами.
6. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 5, характеризующийся тем, что фрагмент гетерологичного белка содержит от 100 до 800 аминокислот и обладает теми же функциональными свойствами, что и гетерологичный белок, из которого он получен.
7. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 6, характеризующийся тем, что сигнал доставки из бактериального эффекторного белка представляет собой полипептидную последовательность, которая может распознаваться системой секреции и транслокации рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий и направляет доставку белка из рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий в эукариотические клетки.
8. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 7, характеризующийся тем, что сигнал доставки из бактериального эффекторного белка выбран из группы, состоящей из бактериального эффекторного белка T3SS или его N-концевого фрагмента, бактериального эффекторного белка T4SS или его N-концевого фрагмента и бактериального эффекторного белка T6SS или его N-концевого фрагмента.

9. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 7, характеризующийся тем, что сигнал доставки из бактериального эффекторного белка представляет собой бактериальный эффекторный белок T3SS, включающий бактериальный эффекторный белок T3SS или его N-концевой фрагмент.
5
10. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по п. 9, характеризующийся тем, что N-концевой фрагмент бактериального эффекторного белка T3SS содержит по меньшей мере первые 10 аминокислот бактериального эффекторного белка T3SS.
10
11. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 10, характеризующийся тем, что указанный вектор представляет собой среднекопийную плазмиду.
15
12. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 11, характеризующийся тем, что указанный внехромосомный генетический элемент представляет собой эндогенную плазмиду вирулентности.
20
13. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 12, характеризующийся тем, что указанный гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый последовательностью нуклеотидов первой, второй, третьей и четвертой полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из белков, участвующих в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, регуляторов клеточного цикла, белков с анкириновыми повторами, белков передачи сигналов клетки, репортерных белков, факторов транскрипции, протеаз, малых ГТФаз, родственных GPCR белков, слитых конструкций нанотел и нанотел, бактериальных эффекторов T3SS, бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков, или их фрагментов.
25
30
14. Рекомбинантный грамотрицательный штамм бактерий по любому из пп. 1- 12, характеризующийся тем, что указанный гетерологичный белок или его
35

фрагмент, кодируемый нуклеотидной последовательностью первой, второй, третьей и четвертой полинуклеотидной молекулы, независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из

белков, участвующих в индукции или регуляции ответа ИФН I типа,

5 выбранных из группы, состоящей из cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKK-эпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG-I, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41,

10 LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, ферментов, образующих циклические динуклеотиды (циклаз циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ), таких как WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS, или их фрагментов;

белков, участвующих в апоптозе или регуляции апоптоза, выбранных из

15 группы, состоящей из проапоптотических белков, антиапоптотических белков, ингибиторов путей, предотвращающих апоптоз, и ингибиторов путей передачи сигналов или путей, способствующих выживанию;

регуляторов клеточного цикла, выбранных из группы, состоящей из циклинов, циклин-зависимых киназ (CDK), активирующих CDK киназ,

20 ингибиторов Cdk, субстратов CDK, белков стимулирующего анафазу комплекса/циклосомы и белков контрольных точек клеточного цикла;

белков с анкириновыми повторами; белков передачи сигналов клетки, выбранных из группы, состоящей из белков передачи сигналов цитокинов,

белков передачи сигналов факторов выживаемости, белков передачи

25 сигналов смерти, белков передачи сигналов факторов роста, белков передачи сигналов гормонов, белков передачи сигналов хемокинов и белков передачи сигналов внеклеточного матрикса/Wnt/Hedgehog;

репортерных белков, выбранных из группы, состоящей из флуоресцентных белков, люцифераз и ферментных репортерных белков; факторов

30 транскрипции; протеаз; малых ГТФаз; родственных GPCR белков, выбранных из группы, состоящей из рецепторов, сопряженных с G-белком, комплексов G-белков, киназ, адаптерных белков, белков передачи сигналов/регуляторов передачи сигналов и факторов транскрипции;

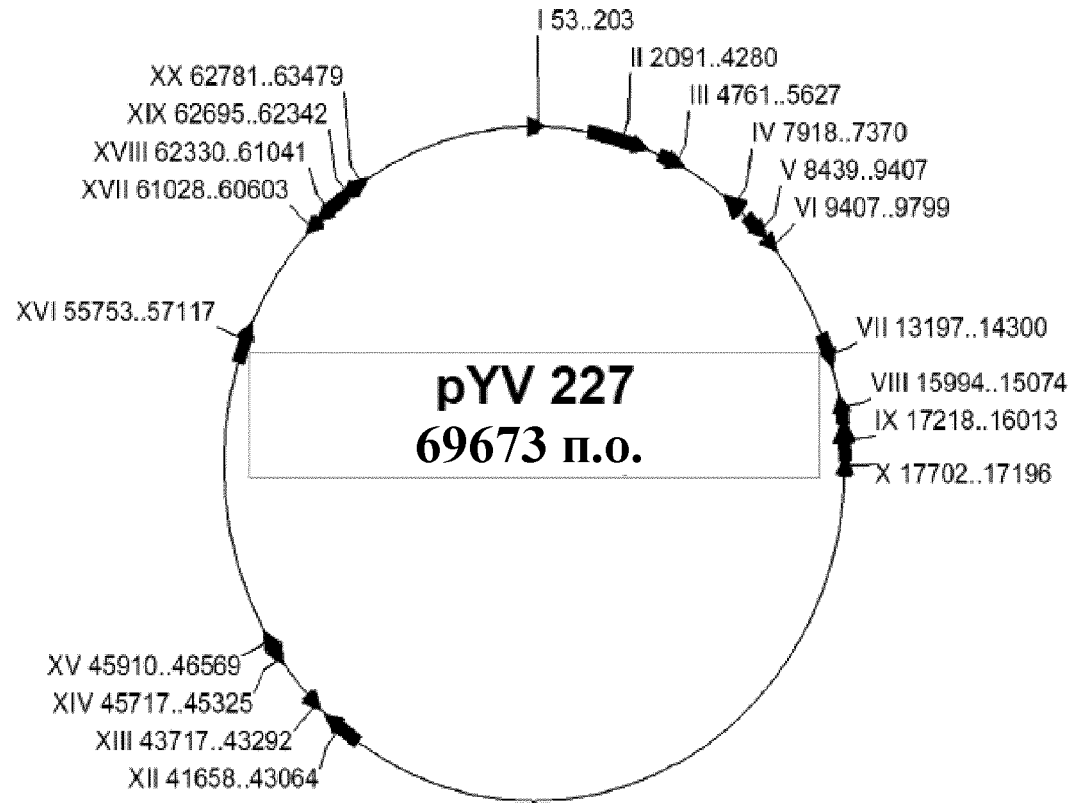
слитых конструкций нанотел, выбранных из группы, состоящей из

- нанотел, слитых с доменами, разрушающими белки, нанотел, слитых с белками передачи сигналов клетки или их частями, нанотел, слитых с идентичными или другими нанотелами, нанотел, слитых с репортерными белками, и нанотел, слитых с сигналами субклеточной локализации;
- 5 нанотел; бактериальных эффекторов T3SS; бактериальных эффекторов T4SS и вирусных белков; или их фрагментов.
15. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 12, характеризующийся тем, что гетерологичный белок или его фрагмент,
- 10 кодируемый последовательностью нуклеотидов первой, второй, третьей и четвертой полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), или его фрагмент.
- 15 16. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 12 и 15, характеризующийся тем, что белок, участвующий в индукции или регуляции ответа интерферона (IFN), или его фрагмент, представляет собой белок, участвующий в индукции или регуляции ответа IFN I типа,
- 20 выбранный из группы, состоящей из cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKK-эпсилон, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG-I, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41,
- 25 LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, или их фрагментов, ферментов, образующих циклические динуклеотиды (циклаз циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ), таких как WspR, DncV, DisA и DisA-подобный белок, CdaA, CdaS и cGAS, или их фрагментов.
- 30 17. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 12, характеризующийся тем, что указанный гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый последовательностью нуклеотидов первой, второй, третьей и четвертой полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из семейства RIG-I-подобных

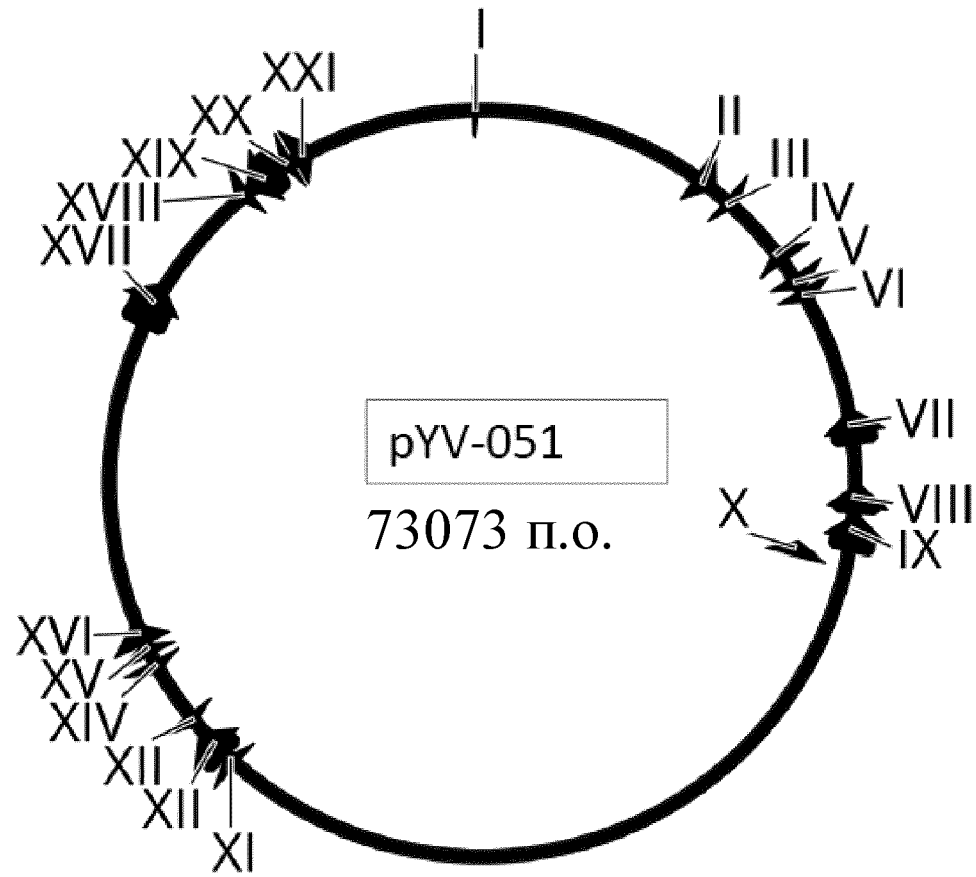
- рецепторов (RLR), других белков, содержащих домен CARD, участвующих в противовирусной передаче сигналов и индукции IFN I типа, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DncV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CdaS и cGAS, приводящие к стимуляции STING, или их фрагментов.
- 5
18. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 12, характеризующийся тем, что указанный гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый последовательностью нуклеотидов первой, второй, третьей и четвертой полинуклеотидных молекул, независимо друг от друга, выбран из группы, состоящей из семейства RIG-I-подобных рецепторов (RLR), других белков, содержащих домен CARD, выбранных из группы, состоящей из MAVS, CRADD/RAIDD, RIPK2/RIP2, CARD6, NOD1 и NOD2, или их фрагментов, и ферментов, образующих циклические динуклеотиды, таких как циклазы циклического ди-АМФ, циклического ди-ГМФ и циклического ди-ГАМФ, выбранные из группы, состоящей из WspR, DnV, DisA и DisA-подобного белка, CdaA, CDA и cGAS, приводящие к стимуляции STING, или их фрагментов.
- 10
- 15
- 20
19. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 12, характеризующийся тем, что указанный гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый последовательностью нуклеотидов первой и третьей полинуклеотидной молекулы, представляет собой cGAS или его фрагмент, предпочтительно фрагмент cGAS.
- 25
20. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 12, характеризующийся тем, что указанный гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый последовательностью нуклеотидов первой и третьей полинуклеотидных молекул, представляет собой фрагмент cGAS, как показано в SEQ ID NO: 10.
- 30

21. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 12 или 18, характеризующийся тем, что указанный гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый последовательностью нуклеотидов второй и четвертой полинуклеотидных молекул, представляет собой RIG-I или его фрагмент, предпочтительно фрагмент RIG-I, содержащий домен CARD.
22. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 12 или 19 - 20, характеризующийся тем, что гетерологичный белок или его фрагмент, кодируемый последовательностью нуклеотидов второй и четвертой полинуклеотидных молекул, представляет собой фрагмент RIG-I, содержащий домен CARD, как показано в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.
23. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 22, характеризующийся тем, что указанный рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий представляет собой штамм *Yersinia*.
24. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 23 для применения в качестве лекарственного средства.
25. Рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий по любому из пп. 1 - 23 для применения в способе лечения рака у субъекта, причем указанный способ включает введение указанному субъекту рекомбинантного штамма грамотрицательных бактерий, причем указанный рекомбинантный штамм грамотрицательных бактерий вводят в количестве, которое является достаточным для лечения субъекта.

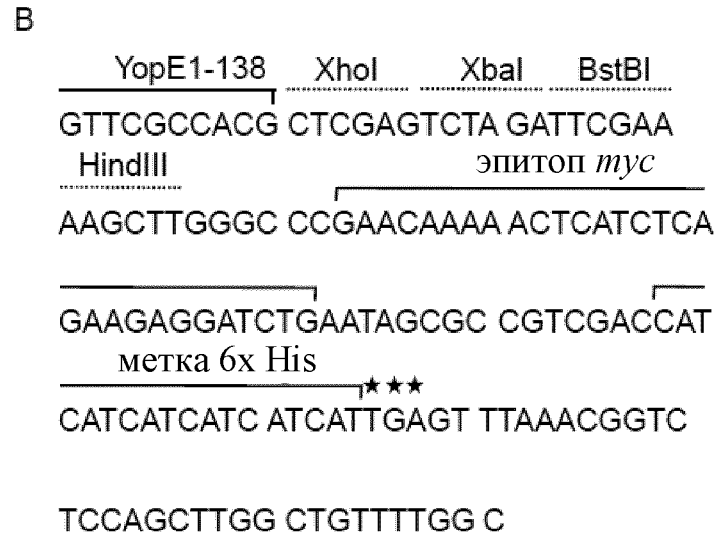
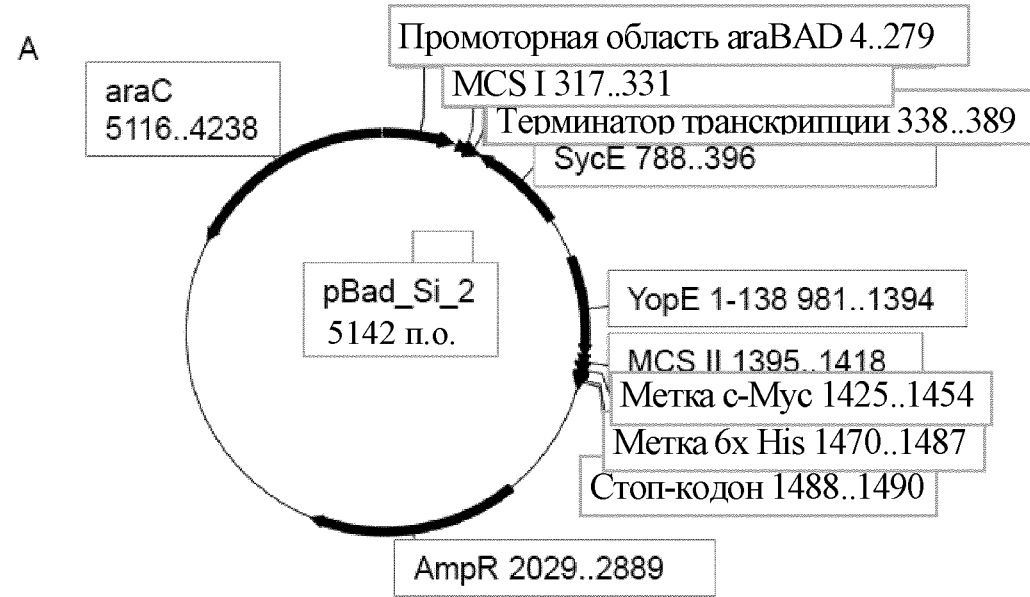
Фигура 1



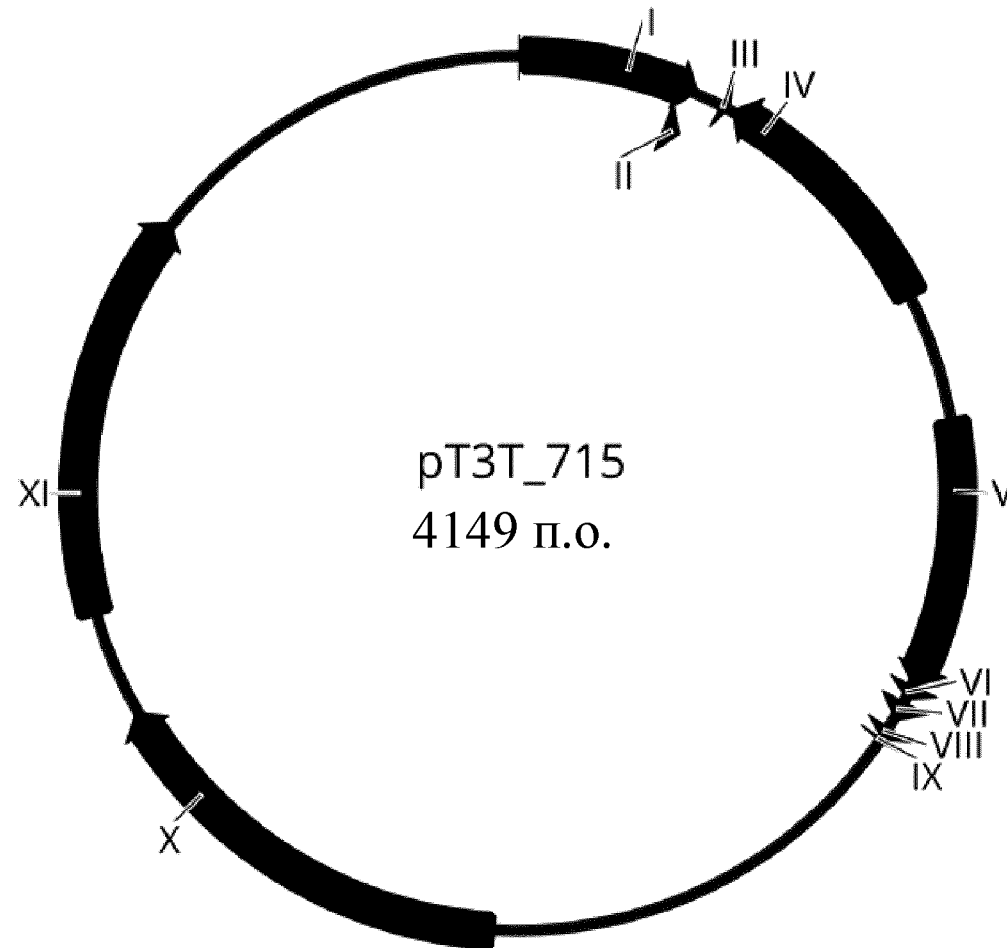
Фигура 2



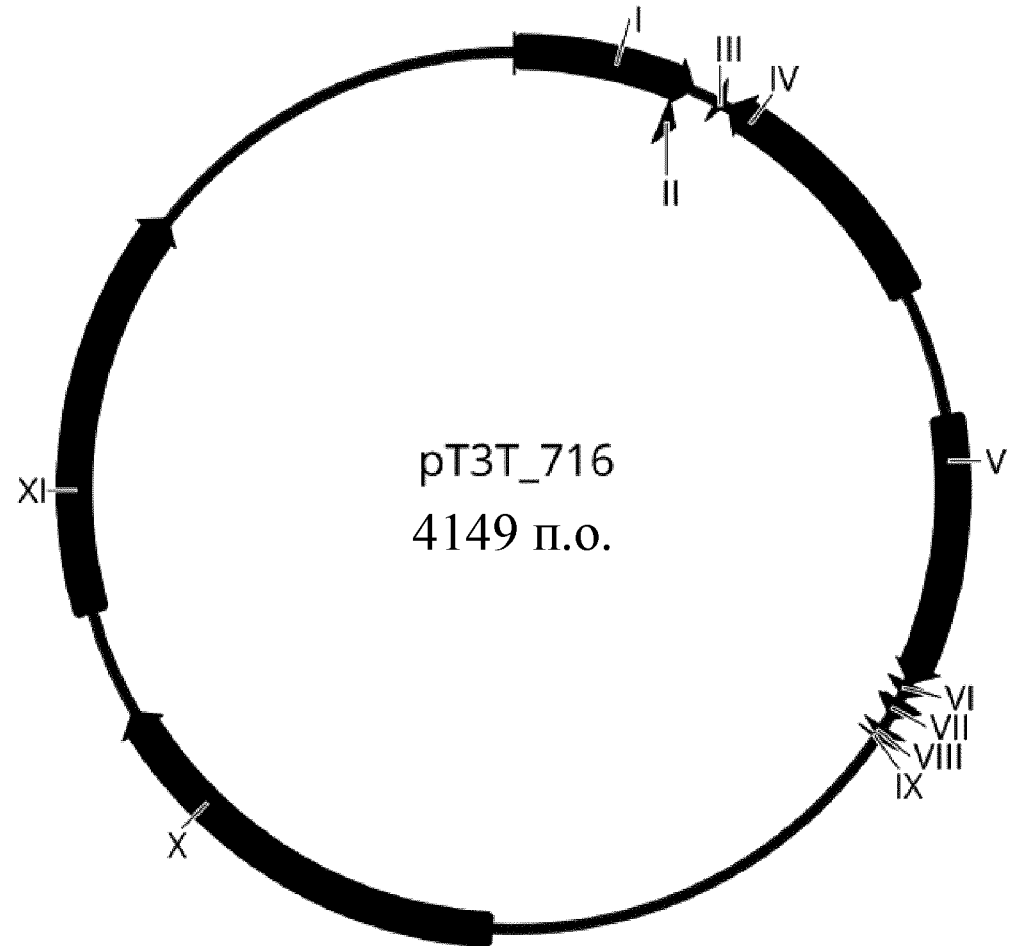
Фигура 3



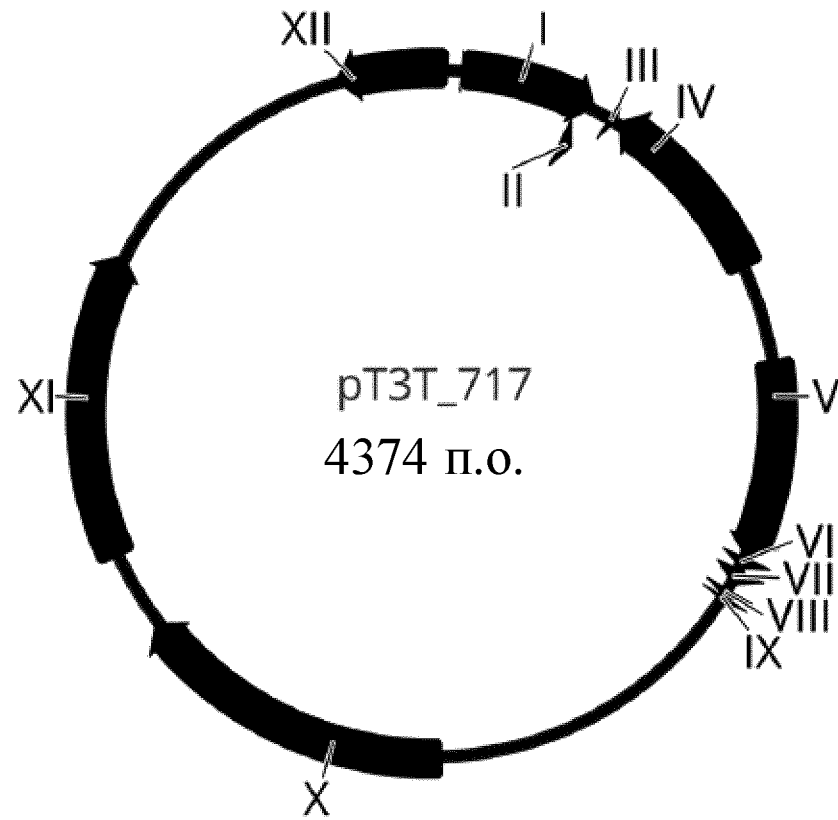
Фигура 4



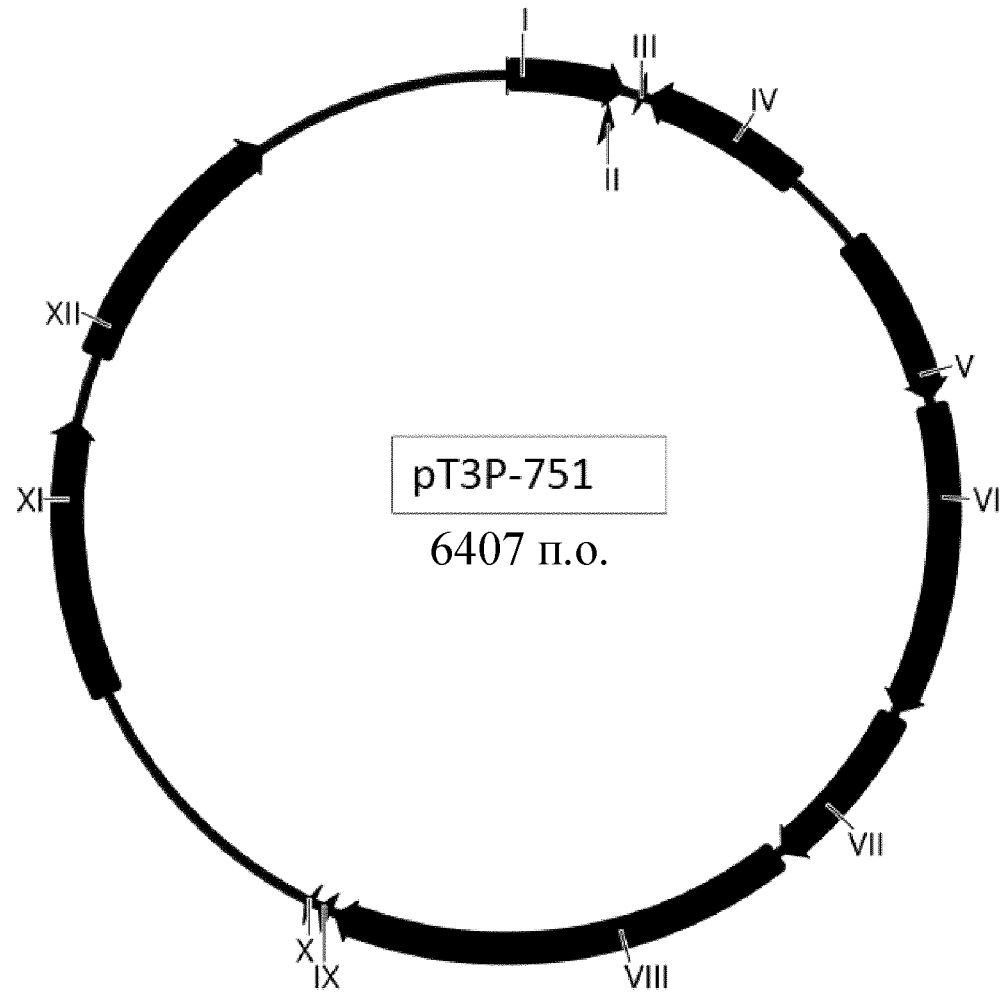
Фигура 5



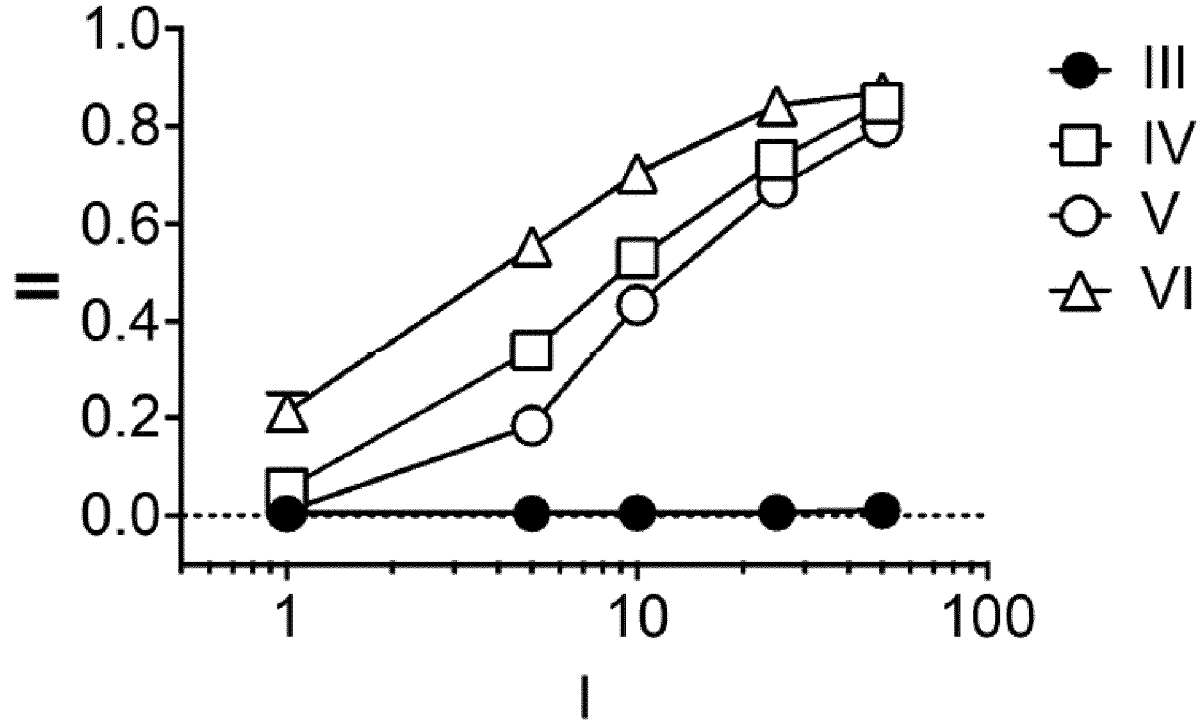
Фигура 6



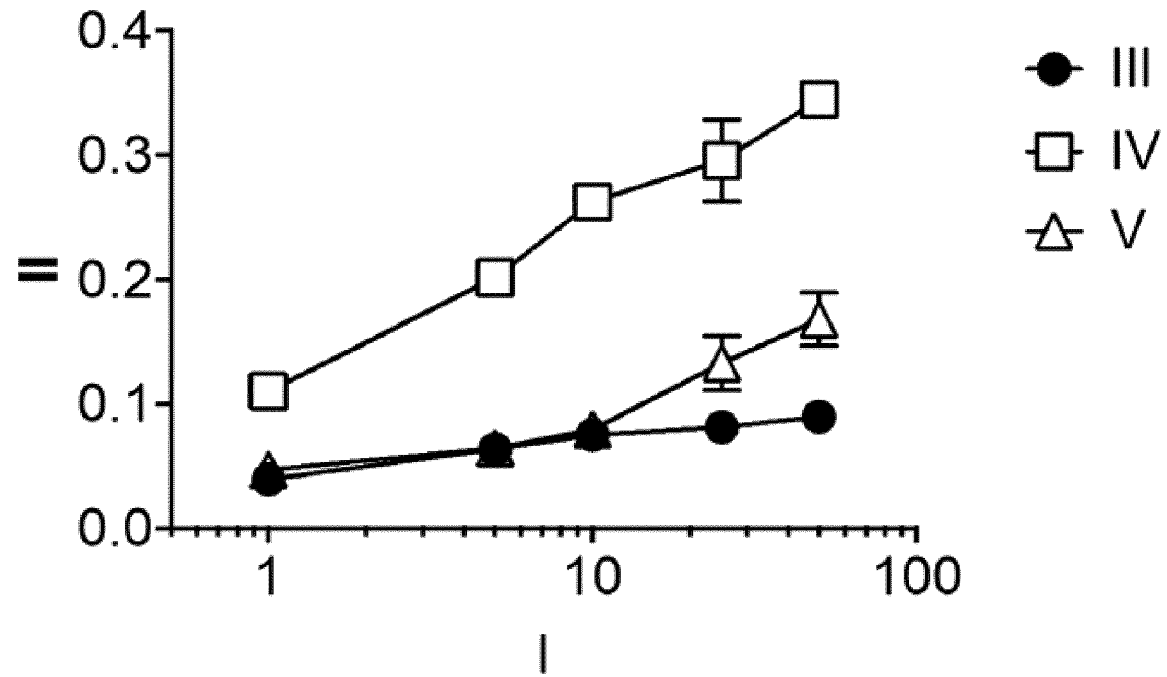
Фигура 7



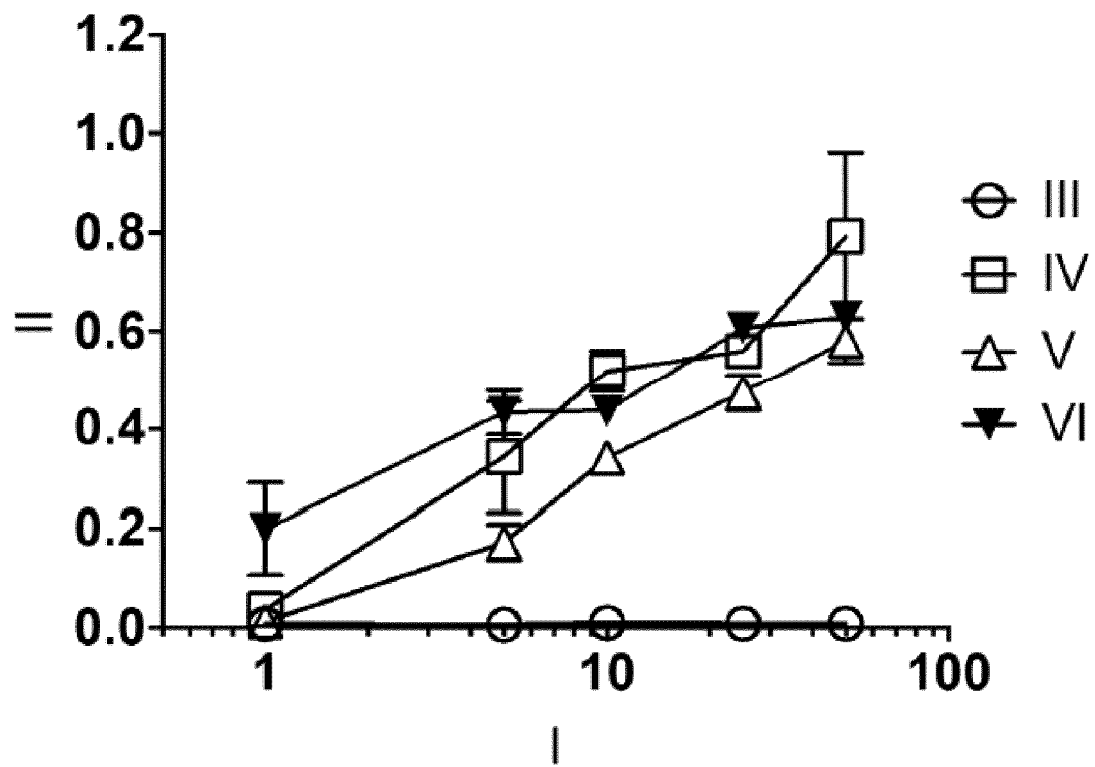
Фигура 8



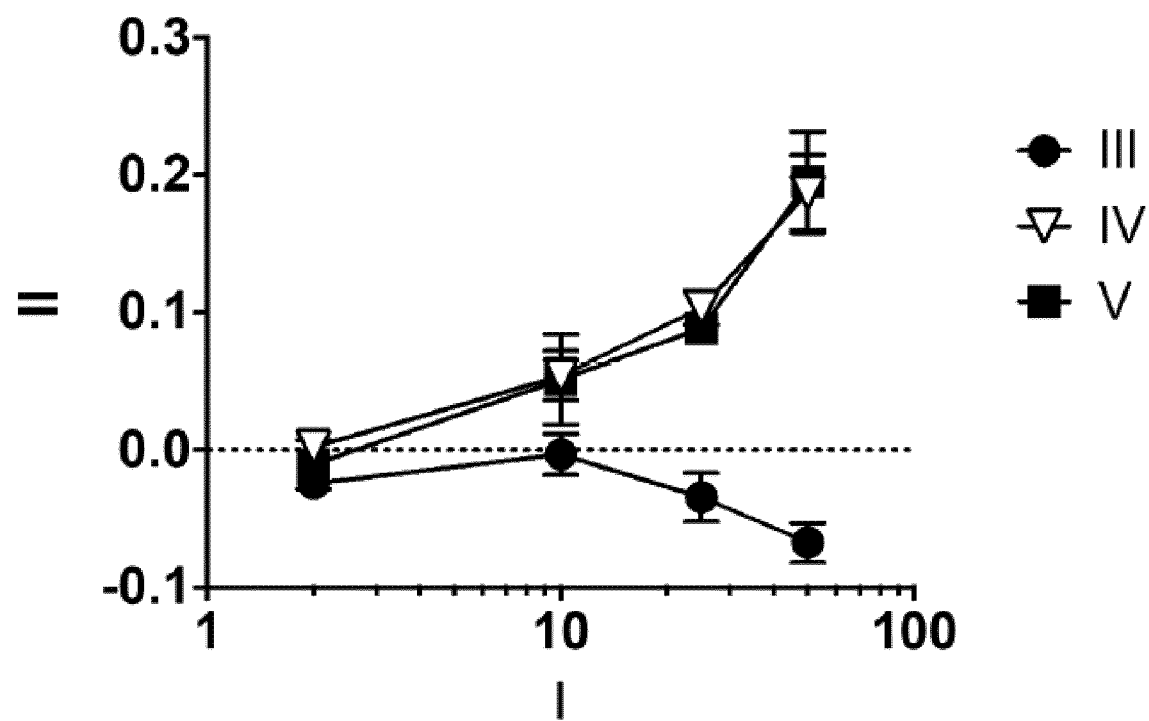
Фигура 9



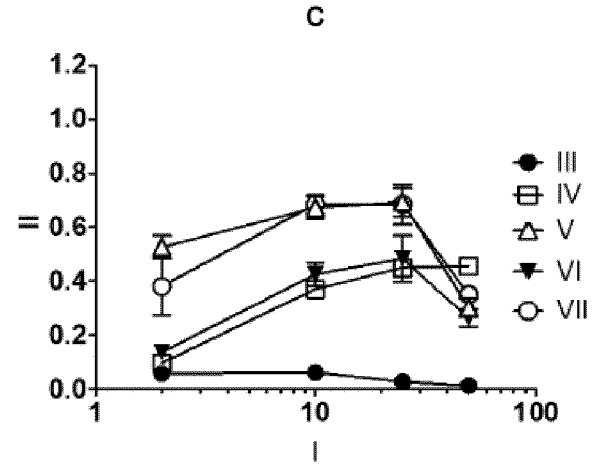
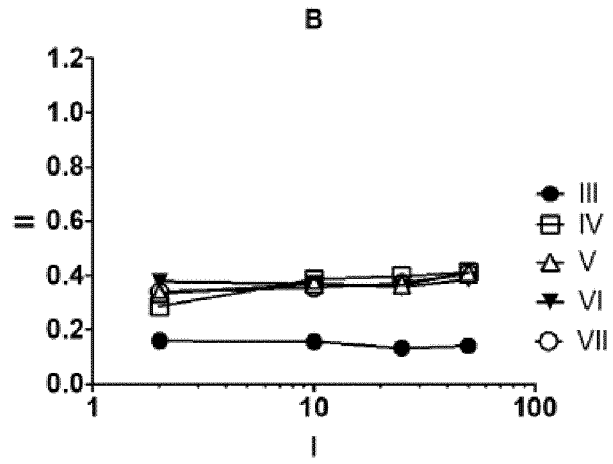
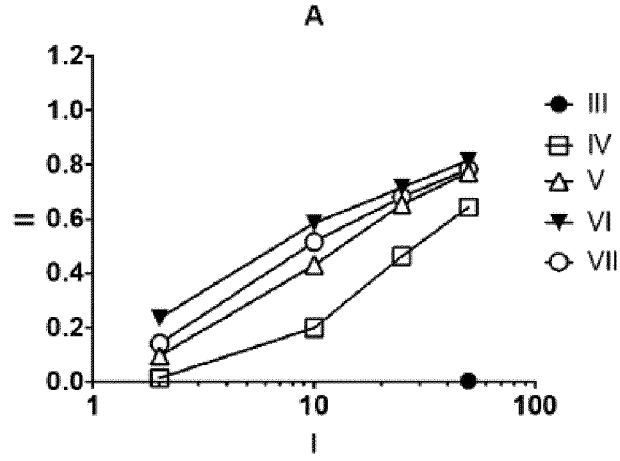
Фигура 10



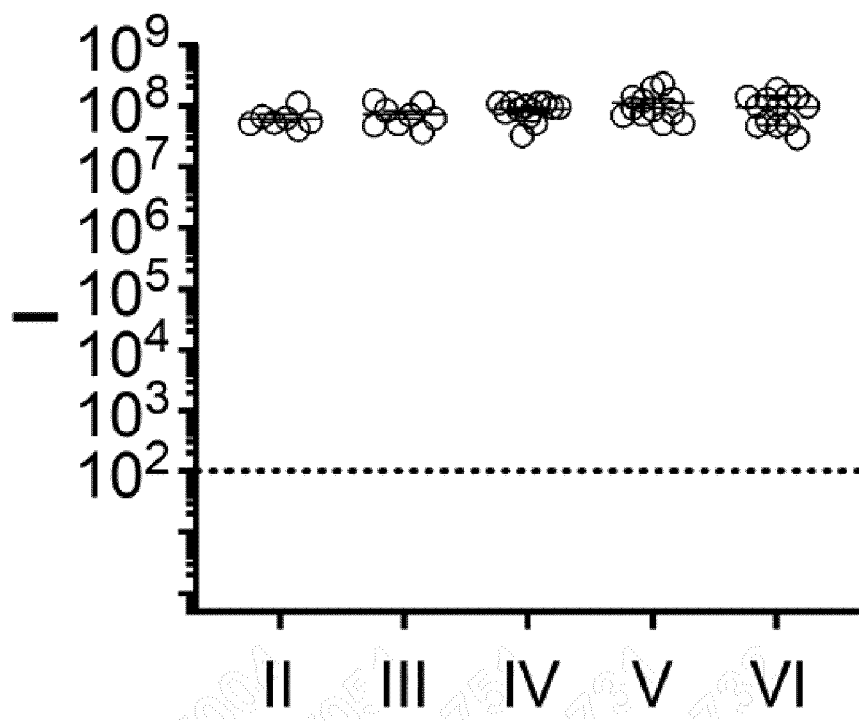
Фигура 11



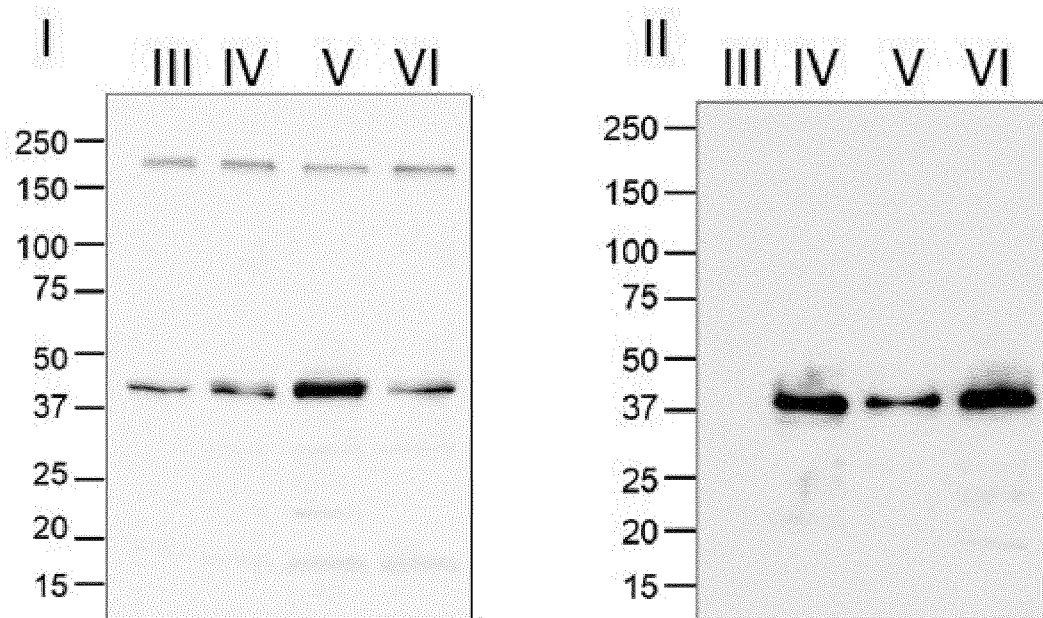
Фигура 12



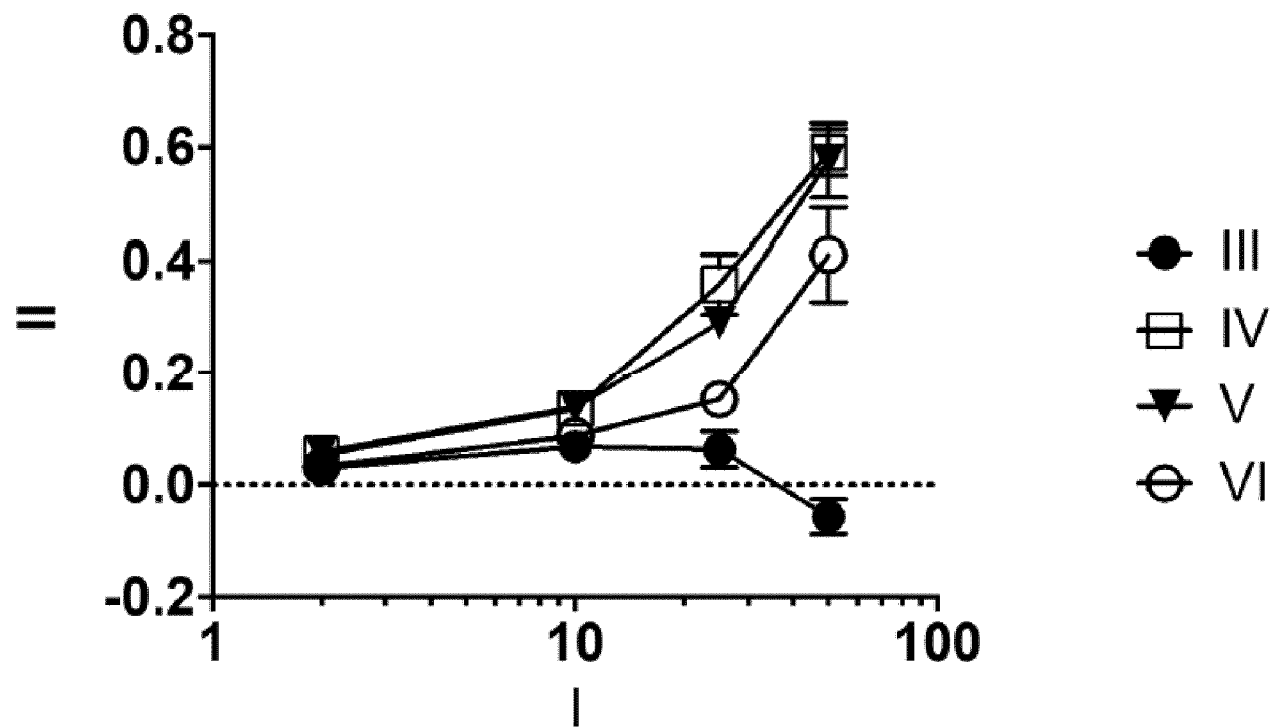
Фигура 13



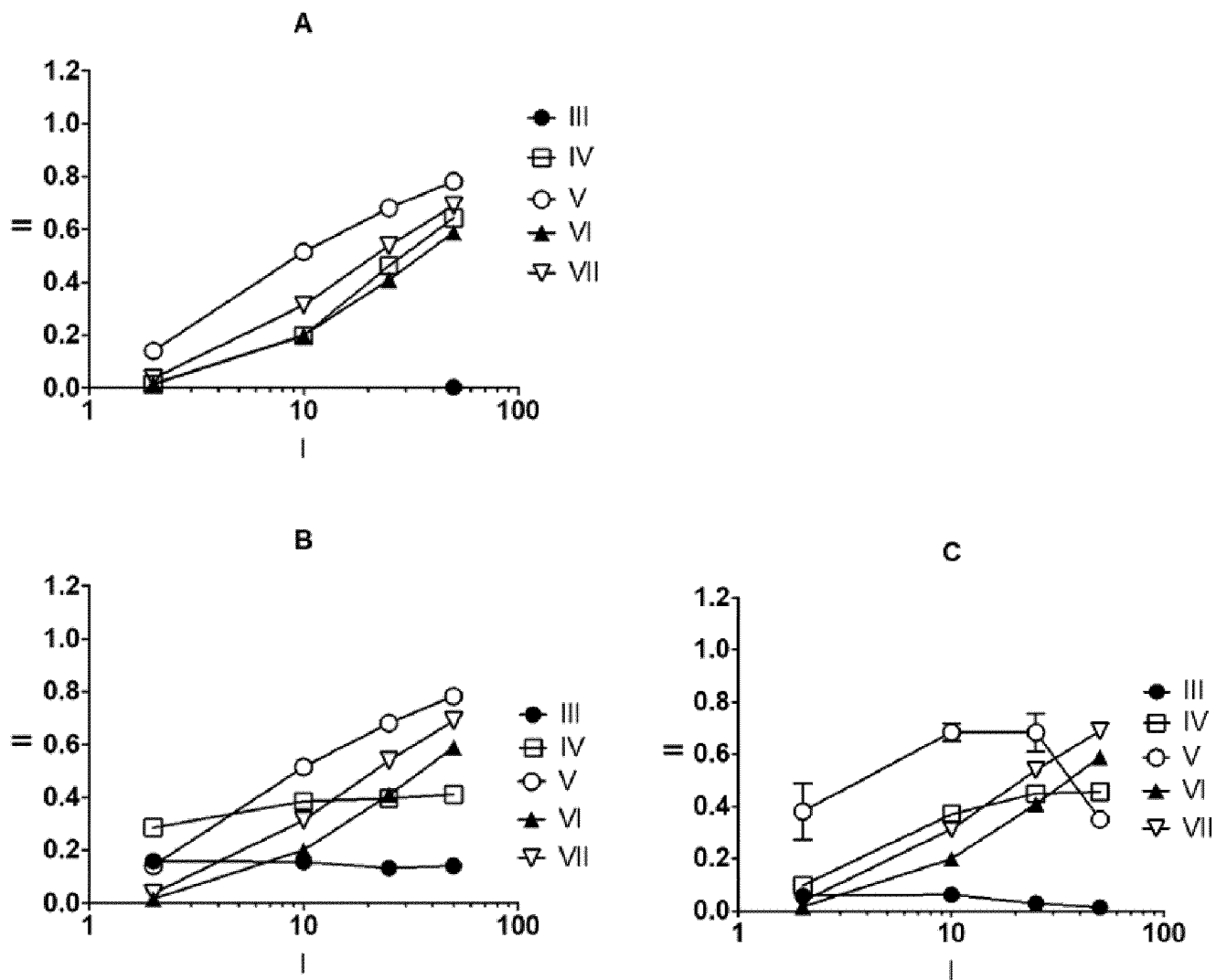
Фигура 14



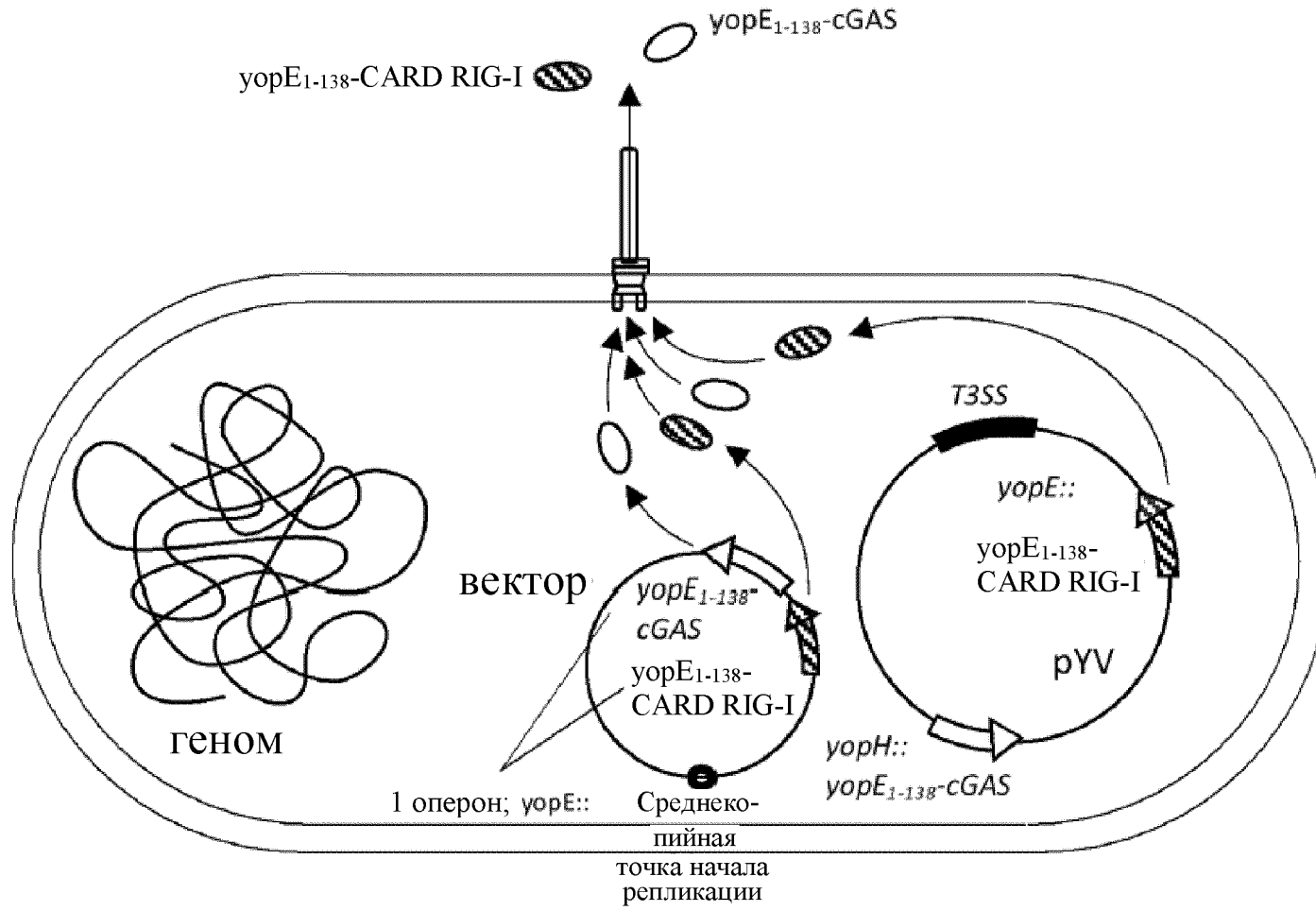
Фигура 15



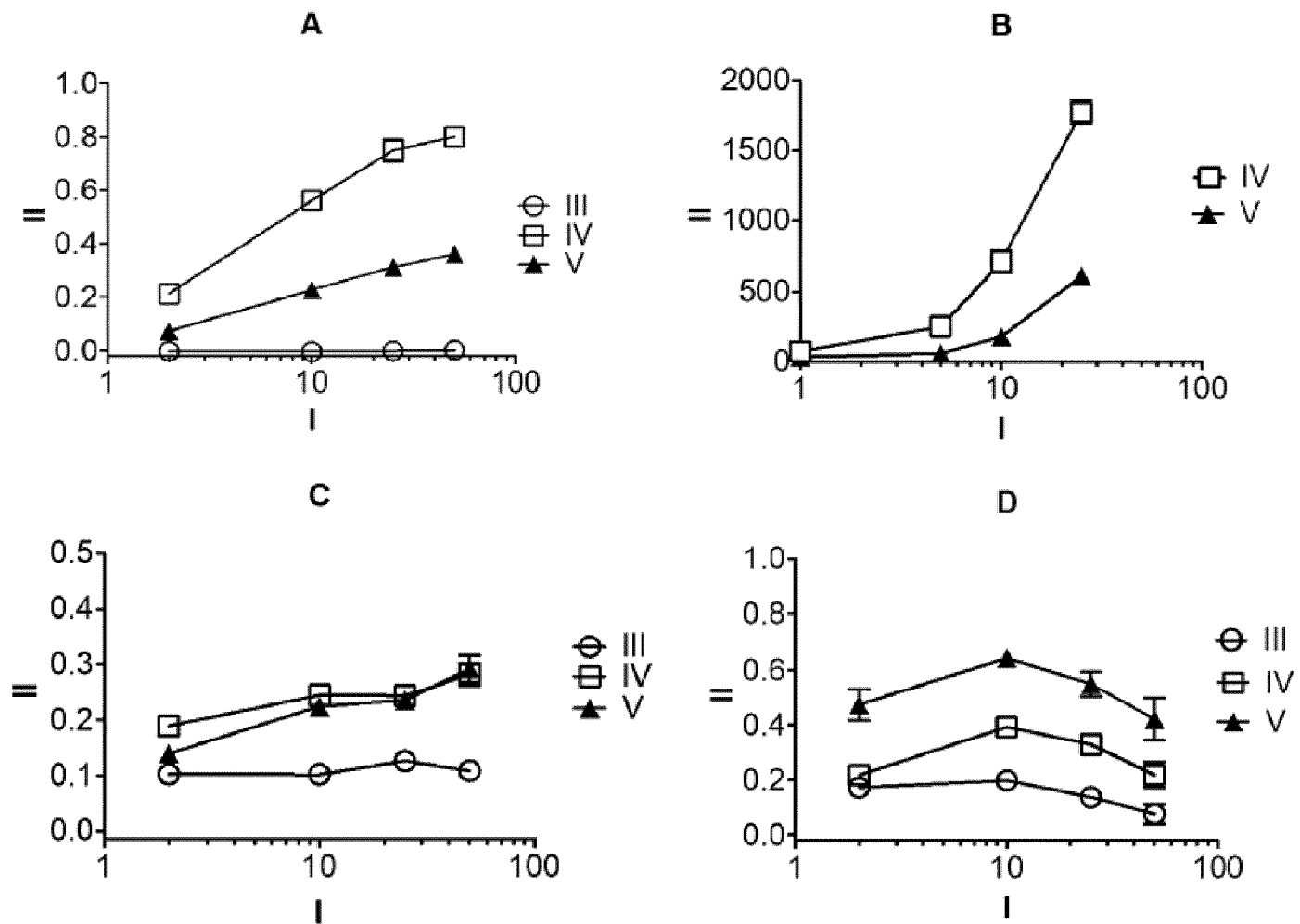
Фигура 16



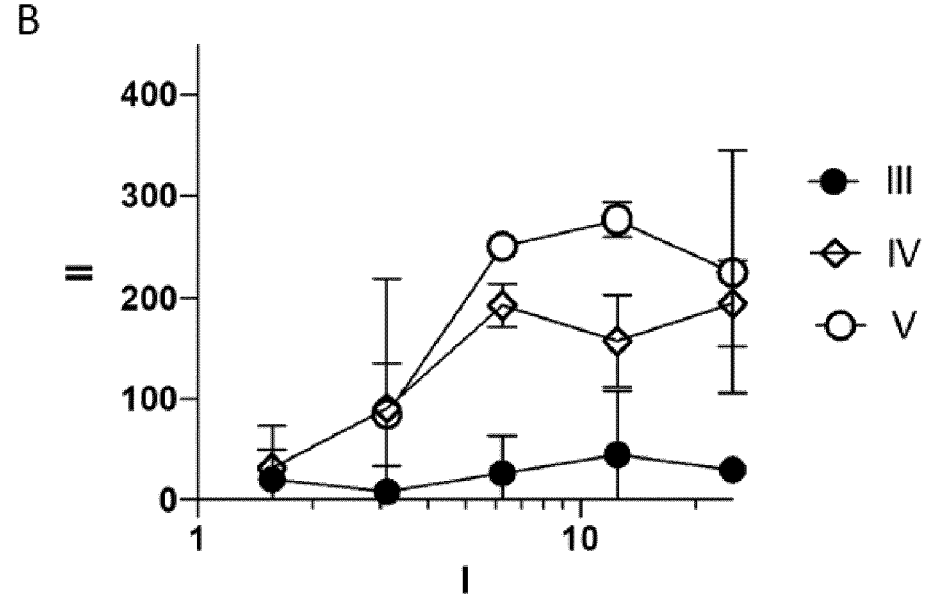
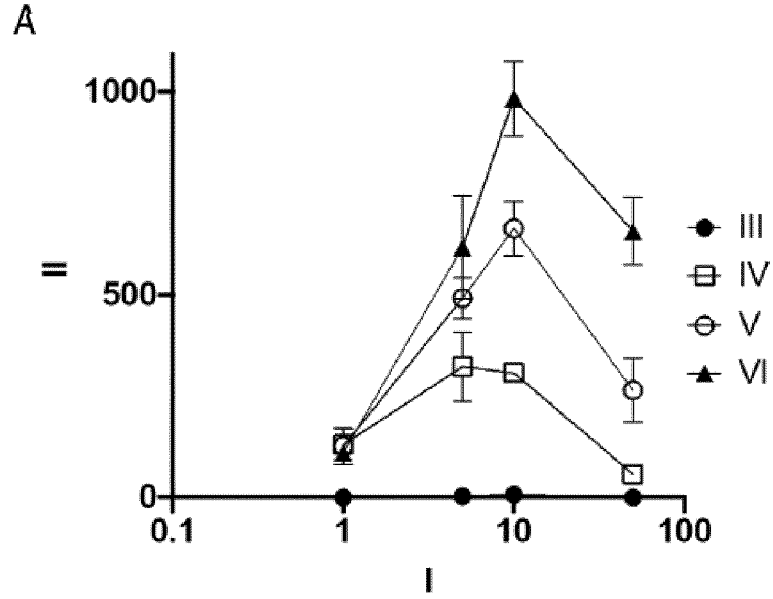
Фигура 17



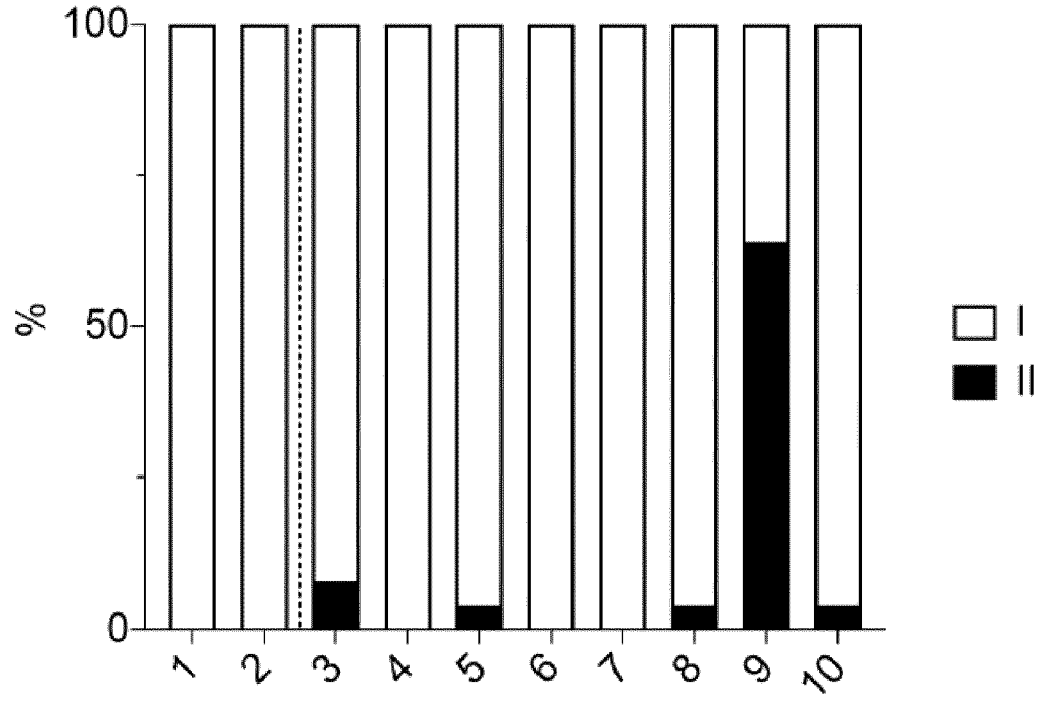
Фигура 18



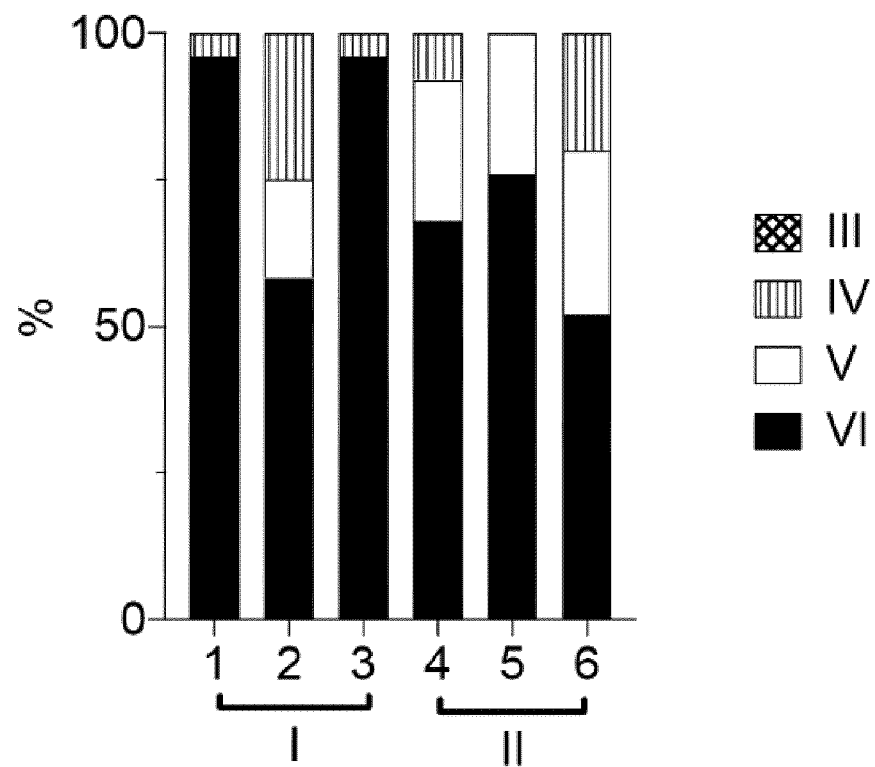
Фигура 19



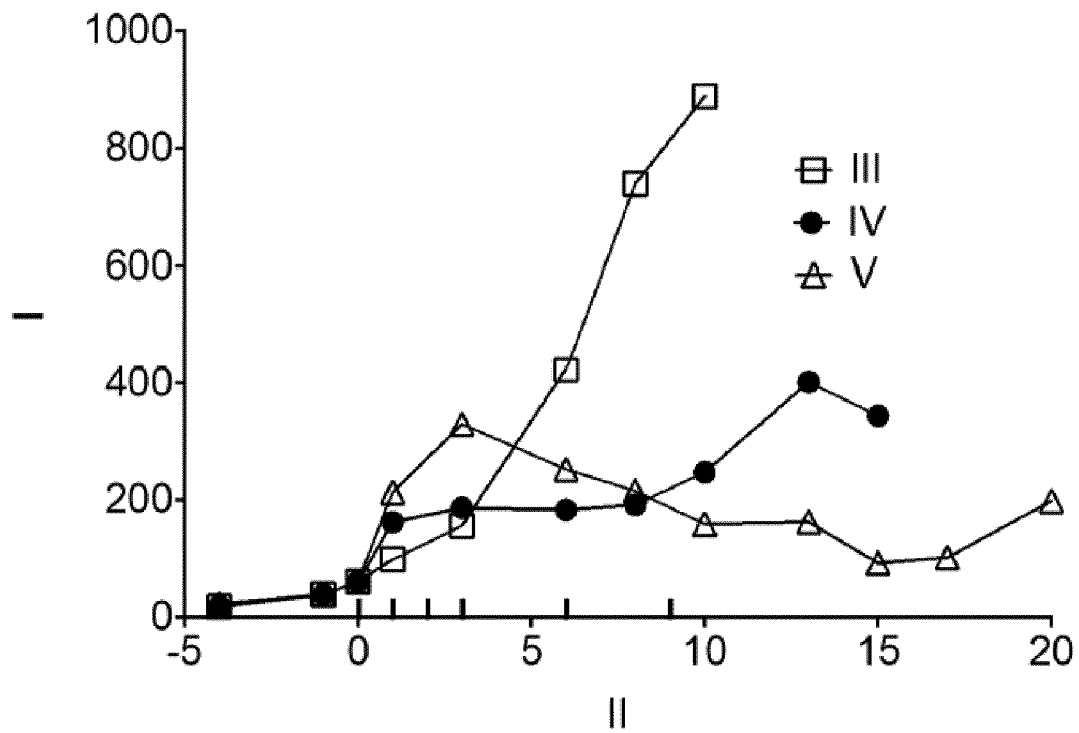
Фигура 20



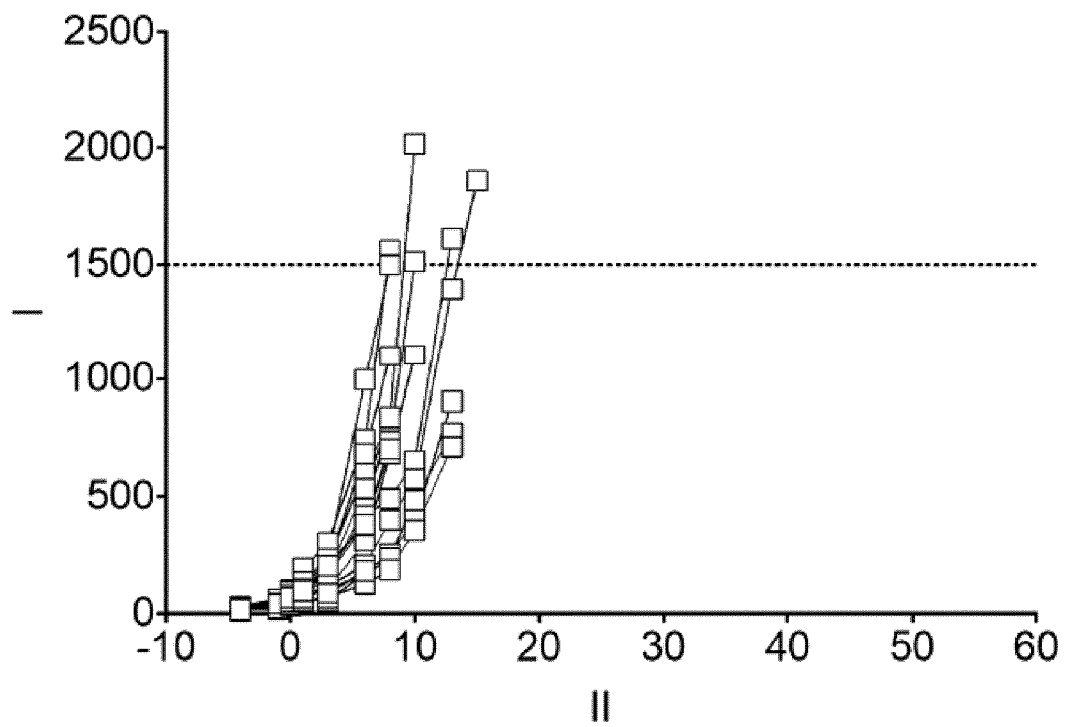
Фигура 21



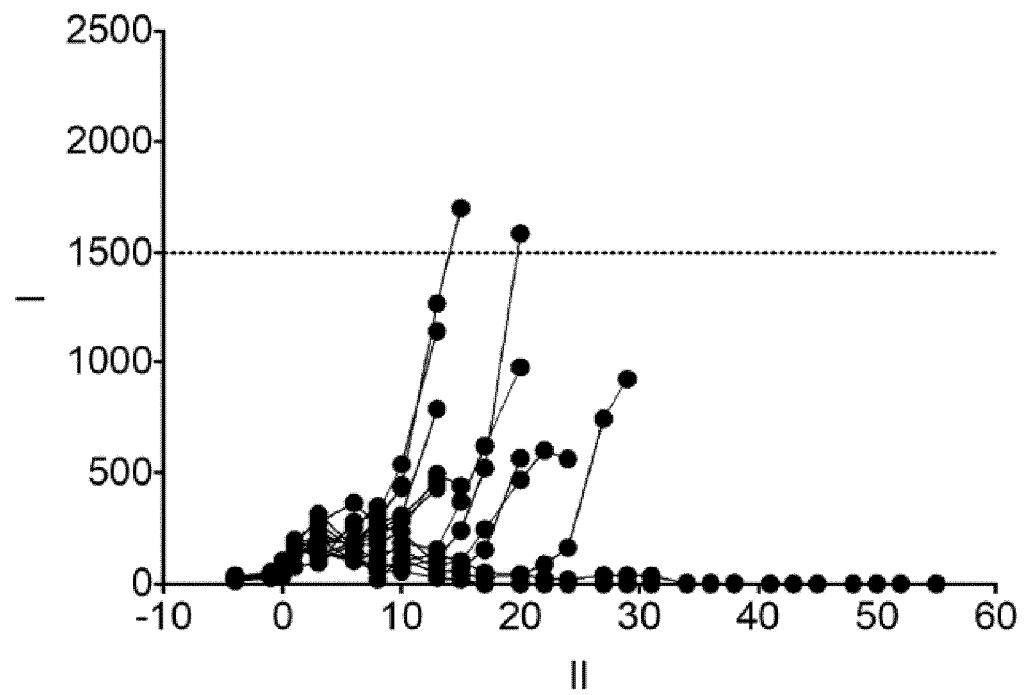
Фигура 22



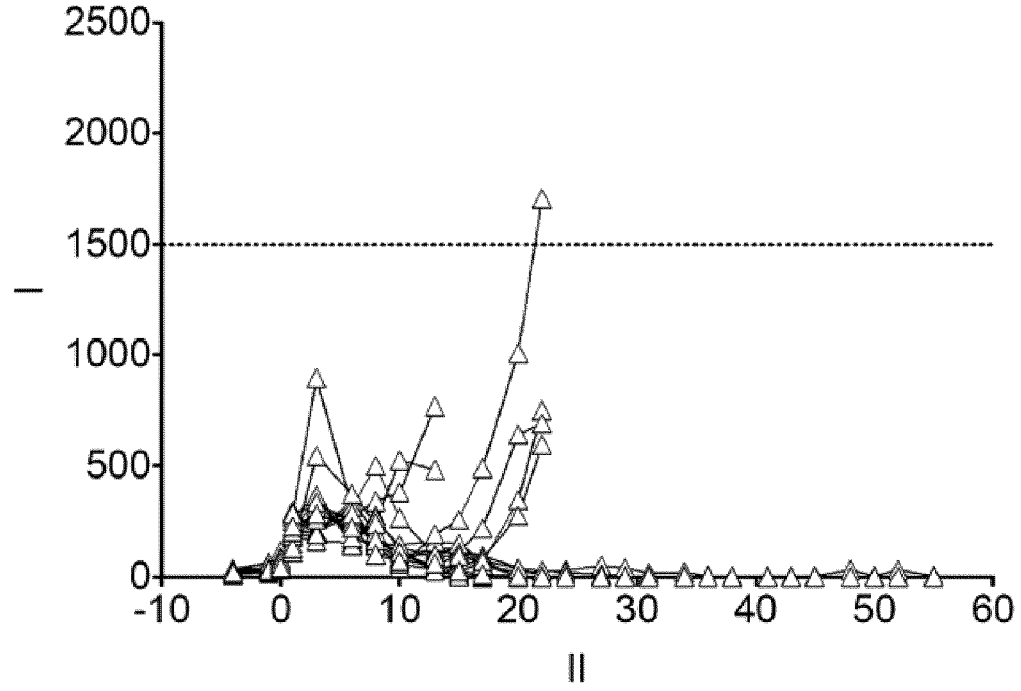
Фигура 23



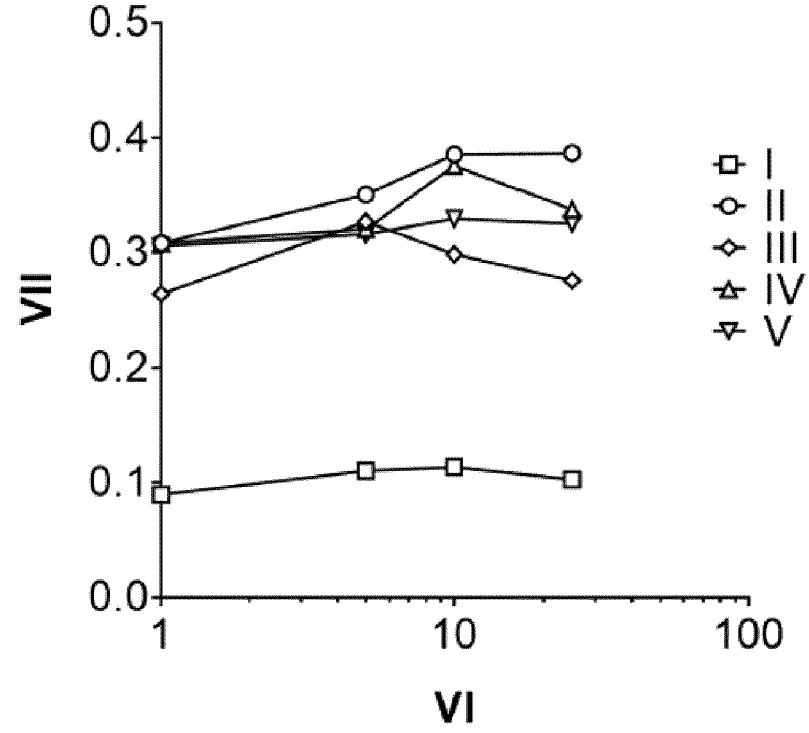
Фигура 24



Фигура 25



Фигура 26



Фигура 27А

Название штамма	Фоновый штамм	Вставка/соответствующие характеристики	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Плазмидный остов	Название полученной в результате плазмиды	Праймер ТЗТ_№:	Устойчивости	Ссылка
ДНОРЕМТ	Y. enterocolitica	MRS40 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					НДК	Iriarte and Cornelis, 1998
ДНОРЕМТ + pBad_Si2	Y. enterocolitica ΔyopH, O, P, E, M, T	Фрагмент SycE-YopE ₁₋₁₃₈ -MycHis	YopE ₁₋₁₃₈ -MycHis	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-YopE ₁₋₁₃₈)	НДК, АМП	
ДНОРЕМТ + pТЗР_453, или pТЗР-718, или pТЗР-719, или pТЗР-720	Y. enterocolitica ΔyopH, O, P, E, M, T		YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245)	pBad_Si_2, или pТЗР-715, или pТЗР-716, или pТЗР-717	pТЗР_453, или pТЗР-718, или pТЗР-719, или pТЗР-720	синтетическая конструкция	НДК, АМП или Cm	
ДНОРЕМТ + pТЗР_454, или pТЗР-721, или pТЗР-722, или pТЗР-723	Y. enterocolitica ΔyopH, O, P, E, M, T		YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для Y. enterocolitica два домена CARD RIG-I мыши (AK 1 - 246)	pBad_Si_2, или pТЗР-715, или pТЗР-716, или pТЗР-717	pТЗР_454, или pТЗР-721, или pТЗР-722, или pТЗР-723	синтетическая конструкция	НДК, АМП или Cm	

Фигура 27В

Название штамма	Фоновый штамм	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Плазмидный остов	Название полученной в результате плазмиды	Праймер T3T_№:	Устойчивости
ΔНОРЕМТ + рТ3Р-515, или рТ3Р-751, или рТ3Р-731, или рТ3Р-732	<i>Y. enterocolitica</i> ΔуорН, О, Р, Е, М, Т	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> сGAS человека (AK 161 - 522)	pBad_Si_2, или рТ3Р-715, или рТ3Р-716, или рТ3Р-717	рТ3Р-515, или рТ3Р-751, или рТ3Р-731, или рТ3Р-732	синтетическая конструкция	НДК, АМП или Cm
ΔНОРЕМТ + рТ3Р_522	<i>Y. enterocolitica</i> ΔуорН, О, Р, Е, М, Т	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I мыши (AK 1 - 218)	pBad_Si_2	рТ3Р_522	1021/1023	НДК, АМП
ΔНОРЕМТ + рТ3Р_521	<i>Y. enterocolitica</i> ΔуорН, О, Р, Е, М, Т	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I мыши (AK 1 - 229)	pBad_Si_2	рТ3Р_521	1021/1022	НДК, АМП

Фигура 27С

Название штамма	Фоновый штамм	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Плазмидный остов	Название полученной в результате плазмиды pYV	Мутатор	Устойчивости
ΔНОРЕМТ Y048	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)	pYV	pYV048	pT3P-697	НДК
ΔНОРЕМТ Y022	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I мыши (AK 1 - 246)	pYV	pYV022	pT3P-457	НДК
ΔНОРЕМТ Y022 + pT3P-454 или pT3P-721	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I мыши (AK 1 - 246)				НДК, АМП или Cm
ΔНОРЕМТ Y021	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245)	pYV	pYV021	pT3P-456	НДК
ΔНОРЕМТ Y051	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245) и YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)	pYV021	pYV051	pT3P-714	НДК

Фигура 27D

Название штамма	Фоновый штамм	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Плазмидный остов	Название полученной в результате плазмиды pYV	Мутатор	Устойчивости
ΔНОРЕМТ Y051 + pT3P-453 или pT3P-718	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245) и YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)				НДК, АМП или Cm
ΔНОРЕМТ Y051 + pT3P-751	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245) и YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)				НДК, Cm
ΔНОРЕМТ Y051 + pT3P-515 или pT3P-745	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245) и YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)				НДК, АМП или Cm
ΔНОРЕМТ Y051 + pT3P-731	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245) и YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)				НДК, Cm

Фигура 27Е

Название штамма	Фоновый штамм	Белок, который будет доставлен с помощью T3SS	Плазмидный остов	Название полученной в результате плазмиды pYV	Мутатор	Устойчивости
ΔНОРЕМ Т Y051 + pT3P-732	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245) и YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)				НДК, Cm
ΔНОРЕМ Т Y051 + pT3P-719	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245) и YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)				НДК, Cm
ΔНОРЕМ Т Y051 + pT3P-720	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH, O, P, E, M, T	YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированные для <i>Y. enterocolitica</i> два домена CARD RIG-I человека (AK 1 - 245) и YopE ₁₋₁₃₈ -кодон-оптимизированный для <i>Y. enterocolitica</i> cGAS человека (AK 161 - 522)				НДК, Cm