



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115244069 A

(43) 申请公布日 2022. 10. 25

(21) 申请号 202080088984.7

(74) 专利代理机构 余姚德盛专利代理事务所

(22) 申请日 2020.12.18

(普通合伙) 33239

专利代理师 周积德

(30) 优先权数据

19217672.5 2019.12.18 EP

62/949,480 2019.12.18 US

(51) Int.Cl.

C07K 14/33 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/087338 2020.12.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/123391 EN 2021.06.24

(71) 申请人 埃克斯欧姆尼斯生物技术有限公司

地址 荷兰马斯特里赫特

(72) 发明人 A·M·库比亚克

权利要求书1页 说明书41页

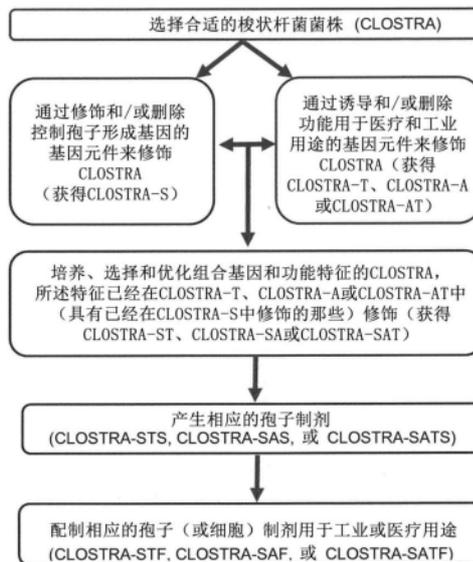
序列表19页 附图15页

(54) 发明名称

遗传修饰的梭状杆菌菌株及其用途

(57) 摘要

本发明涉及遗传修饰的梭状杆菌菌株,其提供对多种临床和工业应用有用的复制和生理特性的改进组合。具体而言,从本文所述梭状杆菌菌株产生的临床级孢子可有效地储存、配制,并有利地用于预防和/或治疗诸如癌症等医疗状况。



1. 一种遗传修饰的梭状杆菌菌株, 呈现可诱导或可抑制的孢子形成表型和一种或多种额外的基因组修饰, 用于表达异源序列和/或使第二梭状杆菌基因失活。

2. 根据权利要求1所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株, 其中所述可诱导或可抑制的孢子形成表型是由控制涉及梭状杆菌菌株孢子形成的一种或多种梭状杆菌基因表达的序列的缺失、替换或其他遗传修饰引起的。

3. 根据权利要求2所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株, 其中所述基因修饰是插入可诱导或可抑制的启动子。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株, 其中所述涉及梭状杆菌菌株孢子形成的梭状杆菌基因选自Spo0A、Spo11E、Spo11AA和Spo11AB。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株, 其中所述梭状杆菌菌株来源于包括丁酸梭状芽胞杆菌、产孢梭状芽胞杆菌和诺维梭状芽胞杆菌的梭状杆菌属。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株, 其中所述梭状杆菌菌株表达异源基因, 该异源基因编码选自酶、抗体、抗原、毒素和细胞因子的至少一种蛋白质。

7. 根据权利要求6所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株, 其中所述梭状杆菌菌株表达异源基因, 该异源基因编码前药转化酶、针对癌症抗原的抗体和/或细胞因子。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株, 其中所述梭状杆菌菌株经修饰以使溶血中的至少一种梭状杆菌基因失活或减弱。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株, 其中所述梭状杆菌菌株经修饰以使代谢中的至少一种梭状杆菌基因失活或减弱。

10. 根据权利要求9所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株, 其中所述梭状杆菌菌株是尿嘧啶营养缺陷型突变株。

11. 得自根据前述权利要求中任一项所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株的梭状杆菌孢子。

12. 根据权利要求11所述的梭状杆菌孢子, 其中所述孢子是在诱导或抑制基因修饰序列的化合物存在下产生的, 该序列控制涉及孢子形成的一种或多种梭状杆菌基因的表达。

13. 组合物, 包含来自根据权利要求1-10中任一权利要求所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株的细胞或来自根据权利要求11或12所述的遗传修饰的梭状杆菌菌株的孢子的细胞。

14. 根据权利要求13所述的组合物, 其中所述组合物用作药物, 并且任选地包含添加剂、载体、稀释剂、盐和/或赋形剂。

15. 根据权利要求13或14所述的组合物, 其中所述组合物为液体悬浮液或冻干制剂。

16. 根据权利要求13至15中任一权利要求所述的组合物, 其中所述组合物用于治疗癌症, 并且任选地包含具有药理学或药物类性质的额外化合物。

17. 根据权利要求13至16中任一权利要求所述的组合物, 其中所述组合物被配制用于全身、肿瘤内或口服给药。

18. 一种治疗癌症的方法, 包括向需要其的受试者施用根据权利要求13至17中任一权利要求所述的组合物。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述额外化合物与所述组合物单独、同时或顺序施用。

20. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述额外化合物是前药。

遗传修饰的梭状杆菌菌株及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及新型梭状杆菌菌株和孢子、它们的制备方法以及在各种工业和临床应用中的用途。

背景技术

[0002] 梭状杆菌是革兰氏阳性、厌氧、内孢子形成细菌,属于梭状杆菌属,包括约180种,已知通过降解糖、醇、氨基酸、嘌呤、嘧啶和聚合物(如淀粉和纤维素)来产生不同类型的酸和其他化合物。为了生存和繁殖,梭状杆菌的孢子形成过程通常是在暴露于当地环境的不利条件(如pH、加热、冷冻、辐射或氧气条件)之后进行的。这一过程由孢子形成特异性蛋白和其他以转录或翻译后水平作用的因子的复杂级联控制。例如,spo0A、spollAA、spollE、sight、sigF、sigE、sigG和sigK基因主要负责组织和调节孢子形态发生成分的表达,从而产生不同的复杂表型(Shen S et al.,2019;Al-Hinai M et al.,2015)。

[0003] 组成梭状杆菌属的物种的复制和其他生物学特性已针对不同的目标进行研究,可分为三个主要领域:致病性梭状杆菌感染的控制、作为工业用平台生物的开发(特别是用于生物转化和生产化学商品)、以及开发梭状杆菌属对不良细胞和细胞事件的细胞毒性特性(例如,抑制癌细胞生长和诱导对癌细胞的反应)。在这些方面,已经出现一些技术,或者已经从其他生物体中改造了一些技术,用于培养、管理、选择或使用梭状杆菌,特别是通过使用经过修饰、克隆、添加、破坏和/或置于特定系统下以控制基因表达的调控或编码序列来修饰梭状杆菌基因组。

[0004] 如最近所综述的(Joseph R et al.,2018;McAllister KN,and Sorg JA,2019;Kwon SW et al.,2020),在从梭状杆菌物种中构建和选择具有永久、高效和精确修饰基因组的菌株方面,已经出现一系列的改进,从而可以更好地了解梭状杆菌孢子形成和体外代谢过程,也可以改进其作为细胞或孢子的用途。利用梭状杆菌物种中存在的天然同源重组途径的机制已被应用,但成功率和效果参差不齐。在梭状杆菌中的等位基因交换系统、基于CRISPR的基因编辑和基因表达控制,使得可能修饰这种类型的基因组,然后选择最适合特定预期用途的克隆或变体。

[0005] 已经开发了几种方法,通过利用提供梭状杆菌菌株的结构,这些菌株具有针对生物或生理特征的单一功能、高度准确的基因组修饰(包括核苷酸替换、基因缺失和盒插入),如孢子形成、额外或增强的酶活性、密码子优化的表达,非梭状杆菌基因、在外部诱导剂控制下的梭状杆菌基因表达、对化合物或条件的耐药性、毒力控制或基本细胞标记(Atmadjaja A et al.2019;Banjeree A et al.,2014;Bruder M et al.,.2016;Ingle P et al.,2019;Canadas I et al.,2019;Dembek M et al.,2017Diallo M et al.,2019;Dong H et al.,2012;Ehsaan M et al,2016;Foulquier C et al.,2019;Huang H et al.,2016;Pyne M et al.,2016;Wang S et al.,2018;Wasels F et al.,2017;Wen Z et al.,2017;W02003/074681;W02017/064439;W02010/005722;W02015/075475;W02017/190257)。

[0006] 克隆序列和梭状杆菌特异性基因修饰的组合在实验室条件下大多成功地产生了单个、特异性缺陷或抑制的基因。梭状杆菌在工业和临床开发项目等要求更高的应用中的使用受到了更大的限制,因为功能特性的改善必须与严格的生物控制以及体内基因表达和复制的严格控制相关联。例如,由于已知梭状杆菌物种具有在缺氧或缺氧环境(如实体瘤中存在的环境)中在人体内特异性积聚的能力,因此提出了基于梭状杆菌的癌症治疗的临床应用,并在各种模型中进行了测试,以作为诱导特异性免疫反应、靶向癌细胞、释放细胞因子的手段,和/或激活梭状芽孢杆菌感染肿瘤中的前药(Ni G et al.,2019;Torres W et al.,2018;Heap J et al.,2014;Zhang YL et al.2014Mowday A et al.2016;Kubiak AM and Minton NP,2015;W02007/149433;W02016/095503;W02009/111177;W02003/045153;W02013/159155)。

[0007] 基于梭状杆菌的癌症治疗方法已经单独或与其他药物联合试验,包括针对肿瘤微环境和癌症特异性免疫反应的应用(Agrawal S and Kandimalla E,2019;Zhong S et al.,2019;Xin Y et al.,2019)。然而,这些方法尚未成功地转化为临床实践,至少因为基于梭状杆菌孢子的制剂的临床前和临床特征仍需要大幅改进,以充分利用和控制其活动,包括管理复制控制,尤其是作为孢子存在时,给药后的特定定位,以及与人体组织中存在的细胞的显著相互作用,从而可以开发并成功应用有益的治疗策略。

发明内容

[0008] 本发明涉及使用非梭状杆菌基因序列在梭状杆菌基因组中从靶向和修饰序列的组合方法产生的孢子形成梭状杆菌菌株。然后可以选择遗传修饰的梭状杆菌菌株并有利地用于制备细胞或孢子制剂,从而提供与体内和体外梭状杆菌基因复制控制相关的改进的工业和临床实用性,以及此类菌株的用途,例如合适的化合物和治疗。本文所公开的方法进一步允许建立梭状杆菌细胞和孢子作为药物的改进临床用途,包括作为癌症治疗剂,不仅是在单一治疗环境中,而且在使用常规治疗方案的优化组合治疗中(针对或不针对通常施用梭状杆菌细胞或孢子的相同肿瘤或其他组织和/或生物活性和复制),使用特定剂量方案和/或在将受益于涉及两种或更多治疗剂的组合治疗的患者亚群中。

[0009] 在一个实施方案中,新的梭状杆菌菌株同时呈现可诱导或可抑制的孢子形成表型,与异源基因的表达和/或至少额外的梭状杆菌基因的失活(或至少减弱)相结合,尤其是与梭状杆菌复制无关但其表达对梭状杆菌菌株用于工业或临床应用产生负面影响的基因,例如不期望的细胞毒性效应或特定营养素用于生长和复制的代谢用途。尤其是,可诱导或可抑制的孢子形成表型是由于控制参与孢子形成过程的一种或多种梭状杆菌基因表达的序列的缺失、替换或其他遗传修饰所致。根据文献,优选从处于该过程早期阶段的基因中选择要靶向的孢子形成基因,例如在孢子形成开始直到建立不对称隔(在某些情况下在建立前孔之前),但对正常菌株复制和代谢的影响有限(Shen S et al.,2019;Al-Hinai M et ai,2015)。

[0010] 优选地,这些新的梭状杆菌菌株同时呈现可诱导的孢子形成表型和至少一种额外梭状杆菌基因的失活(或至少减弱),由此在特定失活的梭状杆菌基因的位置或梭状杆菌基因组中的任何其他位置,可通过外源基因的引入和基本或可诱导表达来进一步修饰这些菌株。具体而言,异源基因可从哺乳动物(优选人、植物或非梭状杆菌细菌基因组)中分离,并

针对具有酶活性、抗原特性、抗原结合特性、激素特性或对一般人类细胞或生理功能(例如信号、复制)的其他可观察影响的蛋白质进行修饰或未修饰的编码,代谢、免疫反应、细胞毒性、坏死、凋亡或分化。

[0011] 本文公开的所得梭状杆菌菌株可用于生产纯化和/或浓缩的细胞制剂(或相应的孢子制剂),以储存或直接用于临床环境,例如,以有效治疗剂量应用于需要的患者。特别是,如果制剂的最终用途与附加要求有关,则可适当修饰该制剂以生产相应批次或即用制剂,并可进一步包括例如补充生物或化学成分,例如药物、添加剂、盐或赋形剂。

[0012] 图1显示用于产生当前所公开的转基因梭状杆菌菌株的策略的一般示意图,包括各种最终或中间梭状杆菌菌株的命名法,起源于商业或其他可用的梭状杆菌菌株(指示为CLOSTRA),在本发明的整个过程中使用。CLOSTRA优先是属于梭状杆菌属的任何梭状杆菌物种,其在生物体中表现出孢子形成和萌发控制,包括*C. (Clostridium) butyricum*、产孢梭状芽胞杆菌、诺维梭状芽胞杆菌、肉毒梭状芽胞杆菌、艰难梭状芽胞杆菌、以及其他具有临床或工业价值的已知物种。具体而言,本文将呈现可诱导或可抑制孢子形成表型的新型梭状杆菌菌株鉴定为CLOSTRA-S。控制参与孢子形成的一种或多种梭状杆菌基因表达的这种转基因序列可由营养梭状杆菌细胞暴露的化合物诱导或抑制,优选在细胞培养条件下。新的梭状杆菌菌株呈现灭活(或至少减弱)的梭状杆菌基因,被鉴定为CLOSTRA-A。新的梭状杆菌菌株表达具有生物功能的异源基因,在本文中鉴定为CLOSTRA-T。特定CLOSTRA-S、CLOSTRA-A、CLOSTRA-T菌株可以鉴定这样的菌株,其中梭状杆菌基因组中的两种或多种修饰可以组合以获得所需的特性,例如CLOSTRA-A菌株,其中两个独立的非产孢基因通过缺失梭状杆菌基因组序列而失活,或至少减弱,无论是否在该基因组位置整合外源标记或功能序列,都可以提供适合临床或工业应用的无毒性CLOSTRA衍生的菌株和CLOSTRA衍生的产物。

[0013] 含有上述一种或多种遗传修饰的每种梭状杆菌菌株可进一步修饰以包括额外修饰,从而建立呈现本文所述表型的任何优选组合的额外遗传修饰菌株。这些进一步的菌株通过上述命名法的组合进行鉴定,例如CLOSTRA-AT、CLOSTRA-SA、CLOSTRA-ST和CLOSTRA-SAT。具体而言,如实施例所述,CLOSTRA-SA或CLOSTRA-A2,其中至少两种内源性梭状杆菌基因被修饰,可以用作参考“平台”菌株,通过引入一种或多种异源基因可以进一步优化其用于给定的工业或临床用途,从而产生一系列具有特定特性和用途的可供选择的编号CLOSTRA-SAT菌株。CLOSTRA-AT、CLOSTRA-SA、CLOSTRA-ST和CLOSTRA-SAT菌株中的每一种都可以作为相应的孢子(通过名称CLOSTRA-ATS、CLOSTRA-SAS、CLOSTRA-STS和CLOSTRA-SATS鉴定)和细胞或孢子制剂(通过名称CLOSTRA-ATF、CLOSTRA-SAF、CLOSTRA-STF和CLOSTRA-SATF鉴定)储存和使用。

[0014] 图2、图12和图16提供用于制备本文公开的用于根据本发明的临床用途的新型梭状杆菌菌株的策略的示例性示意图,其中特定的CLOSTRA-S、CLOSTRA-SA、CLOSTRA-SAT、CLOSTRA-SATS和CLOSTRA-SATF菌株依次生成和表征,特别是关于仅在特定细胞培养条件下(例如通过使用化合物)激活产孢的瞬时新型梭状杆菌菌株,并且消除梭状杆菌菌株在体内引起的任何已知不良影响(例如,人类受试者的溶血、使用特定分子作为能量来源或生物构建块和/或在特定组织中的生长和复制),或至少大幅减少。此类CLOSTRA菌株可经修饰以表达治疗相关蛋白质(例如,细胞因子、抗体、抗原和/或前药转化酶),并可作为细胞(或孢子)

更有效和安全地施用,以用于细胞培养容器(用于生产代谢物或工业用途的蛋白质)或用于多种医疗用途的体内,例如口服,系统地(例如静脉注射),或在特定组织内注射(例如肿瘤内),并与可能被体内新的梭状杆菌菌株(或孢子)激活的药物调配或不调配。

[0015] 本文所述的新型梭状杆菌菌株可以使用允许以特定和受控方式修饰梭状杆菌基因组的常规技术生产,例如通过质粒和其他构建物,其中使用适用于梭状杆菌菌株的标准重组DNA技术,在基因组中适当克隆、修饰、定向和排序待整合到梭状杆菌基因组中的序列。产生的CLOSTRA-S、CLOSTRA-A和CLOSTRA-T菌株(或呈现上述组合的其他菌株)以稳定的方式具有所需的修饰和相关表型。具体而言,可以通过使用质粒来修饰此类梭状杆菌菌株,允许通过利用菌株自身的同源重组系统整合梭状杆菌基因组中的序列,例如,利用基于CRISPR/Cas9技术的方法。图3A-3B、图5A-5B、图12和图16A-16C概述质粒特征、质粒克隆策略以及与使用CRISPR/Cas9技术产生特定CLOSTRA-S、CLOSTRA-A、CLOSTRA-T菌株和本文公开的其他组合相关的基因组修饰。示例性CLOSTRA菌株呈现原始CLOSTRA基因组内所需特征的组合,例如标签序列、标记序列、可诱导基因表达调节序列和酶(靶向特定药物或碳源)、治疗性蛋白质(例如细胞因子)(例如IL-2、IL-10、IL-12、IL-15)的编码序列,在人类中引起免疫反应的抗原(例如针对特定病毒或细菌蛋白质,导致针对此类病毒或细菌的疫苗接种或免疫)、生长因子、毒素或抗体(例如抗CTLA4、抗PD L1或抗PD-1抗体)。

[0016] 其他产品和方法可与本文所公开的新型梭状杆菌菌株的生产和使用相关联,特别是当最终用途与治疗背景和/或与此类用途相关的给药模式(例如,作为注射制剂)相关时。还建立了新型梭状杆菌细胞培养基和条件,以提供一种或多种符合监管和实际要求的细胞和孢子,包括GMP(良好生产规范)、临床程序或通常适用于转基因生物的环境义务,当梭状杆菌细胞用于任何应用时,均能绝对控制孢子形成。以下详细描述和以下示例中还公开了根据本发明的与特定新产品、用途和方法有关的其他实施例。

附图说明

[0017] 图1:图示本文公开的新型遗传修饰的梭状杆菌菌株的制备和用途的示意图。从参考梭状杆菌菌株(CLOSTRA)开始,专门设计两种不同类型的遗传修饰,用于修饰菌株的孢子形成过程(获得鉴定为CLOSTRA-S参考菌株)或修饰与复制无关的生物功能,尤其是通过整合编码酶或其他有用蛋白质的异源基因(获得鉴定为CLOSTRA-T的参考菌株),或通过完全或部分删除一种或多种梭状杆菌基因(获得鉴定为CLOSTRA-A的参考菌株)。这些变化可以按顺序和/或平行进行,或以任何顺序单独进行,以便将基因组合以创建替代参考菌株(鉴定为CLOSTRA-AT、CLOSTRA-ST、CLOSTRA-SA和CLOSTRA-SAT)。如果需要一种以上的遗传修饰来产生给定类别的适当修饰的CLOSTRA衍生菌株,则可以单独引入和鉴定遗传修饰(例如,CLOSTRA-T01、CLOSTRA-T02等菌株),并且引入其他特征(如CLOSTRA-S或CLOSTRA-A中发现的特征)所需的基因修饰可以在产生CLOSTRA-A和CLOSTRA-T的那些之间进行。这些新颖遗传修饰的梭状杆菌菌株(CLOSTRA衍生菌株)可以作为细胞直接用于工业和医疗目的,或者,生成相应的孢子制剂后,孢子制剂可以液体悬浮液或冻干制剂的形式出现(鉴定为CLOSTRA-STS、CLOSTRA-SAS和CLOSTRA-SATS),然后可以根据预期的特定用途(鉴定为CLOSTRA-STF、CLOSTRA-SAF和CLOSTRA-SATF)进行适当配制。

[0018] 图2:图示新型遗传修饰的梭状杆菌(CLOSTRA)菌株的制备和用途,其中孢子形成

过程、溶血活性和一种或多种非梭状杆菌基因的表达同时被修饰。在一个可能的方案中指出将三种不同的修饰引入CLOSTRA基因组的过程,但优选引入CLOSTRA-SA,其中分别执行两种不同的基因修饰(一种用于插入标签序列,然后使呈现人类溶血活性的内源性梭状杆菌基因失活,和/或外部诱导控制孢子形成)首先产生,(如中间CLOSTRA-A1和CLOSTRA S1A1所示)。在下一阶段,插入一种或多种编码哺乳动物和/或细菌蛋白质的基因,这些蛋白质具有生物学、药理学、药物特性,或者在体内表达时具有药物转化特性,以生成相应的CLOSTRA-SAT菌株。然后可以选择和筛选产生的CLOSTRA-SAT菌株,以鉴别在外源、治疗基因的表达、孢子形成控制和/或GMP培养系统中的复制方面具有最合适遗传和功能特征的菌株,从而可以制造、配制和使用相应的CLOSTRA-SAT孢子、尤其是用于涉及体内梭状杆菌孢子给药并与之兼容的医疗用途(如CLOSTRA-S1A1T01S、CLOSTRA-S1A1T02S和CLOSTRA-S1A1T03S例举)。构建CLOSTRA-SAT然后生产相应CLOSTRA-SAT和CLOSTRA-SATF的过程可以通过灭活或删除两种或多种梭状杆菌基因(尤其是与化学或生物底物的降解或代谢有关的基因)来适应,以产生具有待在选择和/或以后使用期间利用的表型的CLOSTRA衍生菌株。一个实例涉及PyrE基因的缺失,从而产生CLOSTRA衍生菌株,其中尿嘧啶营养缺陷型突变体是相关表型(除了缺乏溶血活性之外)。此类替代示例性菌株CLOSTRA-A2可用于引入额外元件,包括上文所公开的元件,例如,用于对呈现生物、药理学或类药物性质的哺乳动物和/或细菌蛋白质的孢子形成和/或编码进行外部可诱导控制的序列,或者可选择地,药物转化特性(即产生相应的CLOSTRA-S1A2菌株和相关的CLOSTRA-SAT、CLOSTRA-SATS和CLOSTRA-SATF)。这些实施方案的附加细节和示例在本发明的实施例3-4和附图中提供。

[0019] 图3:图示分别生成CLOSTRA-A、CLOSTRA-S、CLOSTRA-T,或将其各自的特征组合成CLOSTRA-AT、CLOSTRA-SA、CLOSTRA-ST或CLOSTRA-SAT的示意图。图3A:pPM-1nn模板质粒的示例性结构,包括作为骨架的允许质粒复制及其在不同微生物中选择维持的遗传元件,尤其是革兰氏阴性和革兰氏阳性复制子(革兰氏-(-)Rep和革兰氏-(+)Rep(后者包括梭状杆菌物种中正确复制和接合所需的TraJ基因),以及克隆和选择阶段可需要的选择标记(M)。这种主干由Clostra盒完成,该盒包括三个一级元件(F1、F2和F3),用于使用CRISPR/Cas9方法在CLOSTRA基因组内进行同源重组。第一元件包括异源序列(HetSeq,指编码、调节或标签序列,以及不完整或完整的基因),该序列在用作左同源臂和右同源臂的序列之间克隆(分别称为LHA和RHA;F3)。第二元件包括sgRNA模块,专门设计用于将CRISPR/Cas9修饰导入CLOSTRA基因组(F2)。第三元件包括要表达达到CLOSTRA(F1)中的Cas9基因。所有这些元件都可以从商用质粒中获得,或者从基因组、转录或反转录核酸中扩增,然后按照所示顺序或足以提供克隆核酸的有效表达和/或整合的任何其他顺序在质粒主干或Clostra盒中克隆。所示遗传元件的大小和方向并不能代表来自pPM-1nn的所有质粒。图3B:使用HetSeqⁿ和pPM1-1nn质粒(表示为简单示意结构,即仅显示与修饰CLOSTRA基因组相关的Clostra盒)在给定位置(Locusn)修饰梭状杆菌基因组(称为CLOSTRA基因组)的一般方案。来自F3的HetSeqⁿ在pPM-1nn的Clostra盒的两侧,其序列与gRNA靶位点的基因组上游和下游(左侧和右侧同源臂,LHA和RHA)同源。Cas9导致CLOSTRA基因组双链断裂后(由于pPM-1nn中Clostra盒FI和F2中编码和调节序列的活性),使用pPM-1nn质粒作为修复模板,通过高保真度同源性定向修复途径修复断裂的细胞将移除gRNA靶点并引入HetSeqⁿ,从而重新建立CLOSTRA基因组的完整性,从而允许包含这种CLOSTRA衍生基因组的细胞存活。

[0020] 图4:图示可克隆到pPM-1nn的HetSeqⁿ和Locusⁿ的示例性类型和组合,Locusⁿ可在CLOSTRA基因组内靶向,并开发用于单独或顺序敲入或敲出CLOSTRA基因组中的完整基因、编码序列和/或调节序列。图4A:可以使用一种pPM-1nn (pPM-1nnS) 来修饰示例性CLOSTRA衍生基因组,其中Clostra盒的HetSeqⁿ是靶向到孢子形成基因的启动子为Locusⁿ的调控序列(如Spo0A和Spo11AA所列举)。在对孢子形成基因的调节进行修饰之后(或之前),可以使用一种pPM-1nn (pPM-1nnH) 来修饰这种CLOSTRA衍生基因组,其中Clostra盒的HetSeqⁿ是靶向不同Locusⁿ的标记、编码和/或调节序列,例如,代谢活性(Met)、毒性活性(Tox)、结构蛋白(Str)、或任何其他编码或非编码元件(Gen)的基因。图4B:四种示例性HetSeqⁿ序列,如标记序列(TagSeq)、编码CLOSTRA中活性酶的DNA(酶)、编码具有治疗活性的蛋白质的DNA(药物)或可在CLOSTRA中诱导的启动子(IndProm),与CLOSTRA基因组中的四个示例性Locusⁿ序列对齐,这些序列可通过在CLOSTRA中引入pPM-1nn质粒(pPM-1nnS或pPM-1nnH质粒)来进行靶向和修饰。连续使用一个、两个或三个此类不同pPM-1nn质粒产生的修饰的CLOSTRA基因组的示例通过引入的HetSeqⁿ的示例性定位、取向和大小显示,从而产生所需的CLOSTRA-A、CLOSTRA-S、CLOSTRA-T和上面列出的组合,尤其是在存在可诱导孢子形成特征的情况下。

[0021] 图5:基于产孢梭菌设计示例性CLOSTRA-A(选择作为代表性CLOSTRA),包括作为HetSeqⁿ的标记序列来代替控制溶血素表达的CLOSTRA基因序列。图5A:基因参考质粒pPME-100基于pPM-1nn结构,并且包括用于促进克隆过程的特定限制位点,如在AseI和NotI限制位点之间克隆的Clostra盒和形成Clostra盒的序列元件示例性示出,称为F3(包括HetSeqⁿ,在同源重组LHA和RFIA的序列之间克隆)。还显示在梭状杆菌菌株(FI和F2)中执行CRISPR-Cas9技术的两个要素、以及可用于克隆的进一步限制位点(AatII、SaiI和BsaI)。图5B:名为pPME-101的示例性pPM-1nnH质粒在Clostra盒(此处表示)内含有PM-CB标签序列(BM1),该盒插入链球菌溶血素S(“Sag”)操纵子(从sagA到sagJ),随后产生具有溶血素阴性表型的CLOSTRA-A1菌株。选择侧接PM-CB标签序列(BM1)的左右同源臂(LHAsag和RHAsag)并组装在Clostra盒的F3元件中,以便用于执行CRISPR-Cas9技术的FI和F2元件,也在Clostra盒中,可以触发围绕Sag操纵子CLOSTRA基因组和pPME-101质粒的序列之间的同源重组,从而建立CLOSTRA-A1基因组。

[0022] 图6:验证示例性基于CLOSTRA-A的产孢梭菌(选择作为代表性CLOSTRA),包括标记序列HetSeqⁿ代替导致溶血素表达和体内溶血活性的产孢梭状芽胞杆菌基因序列。图6A:24个CLOSTRA衍生菌落中链球菌溶血素S操纵子缺失(ASagA-SagJ)的PCR筛查,潜在地携带PM-CB标签序列并具有Sag操纵子缺失的特征。使用两对引物对从反式接合剂平板中选择的菌落进行PCR筛选(参见本文实施例1中所述的材料和方法)。24个菌落中的4个(克隆5、7、8和16)产生1.8kb的带,表征CLOSTRA-A1敲除基因型。图6B:16个CLOSTRA衍生菌落中链球菌溶血素S操纵子缺失(ASag)的PCR筛查,潜在地携带BM1标签序列并具有Sag操纵子缺失(CLOSTRA-A1)的特征。使用两对不同的引物对从反式接合剂平板(c1-c5)中选择的菌落进行PCR筛选。第一对用于PCR反应(PCR1),其中1375bp的片段仅在原始的未修饰CLOSTRA(WT)中扩增。第二对用于PCR反应(PCR2),其中1844bp的产物仅在正确修饰的CLOSTRA-A1中扩增(在WT中,PCR2扩增将导致超过10kb的片段,远远超过标准PCR反应)。DNA片段标记显示在两个面板中,因为PCR产物的M. Sanger测序证实sag操纵子的缺失和PM-CB标签序列的存在。

[0023] 图7:与对照CLOSTRA细胞相比,CLOSTRA-A1的体外分析。图7A:在初始菌落划线后

24和72小时,使用哥伦比亚血液琼脂平板(5%羊血,BD Biosciences)分析红细胞分解。在两个时间点测试四种细胞类型:产孢梭状芽胞杆菌sag敲除(CLOSTRA-A1;sag=链球菌溶血素S同源物;Q1),产孢梭状芽胞杆菌野生型(CLOSTRA;Q2),丁酸梭状芽胞杆菌(阴性对照;Q3),B型链球菌(阳性对照;Q4)。图7B:在液体血液分析中,通过产孢梭状芽胞杆菌的野生型和敲除菌株对人类红细胞分解的定量分析,其中在OD₅₄₀处测量CLOSTRA、CLOSTRA-A1、B组链球菌(GBS,阳性对照为已建立的β溶血物种)的血红蛋白释放。

[0024] 图8:以CLOSTRA-A1S孢子形式对CLOSTRA-A1进行的功能性体内分析。图8A:图示从CLOSTRA-A1S培养物开始制备CLOSTRA-A1S。(步骤1) CLOSTRA-A1菌株在无牛培养基(BFM)中培养,以充分形成孢子。将得到的CLOSTRA-A1S纯制剂(步骤2)配制成CLOSTRA-A1F(约10⁶个孢子在0.1ml盐溶液中),用于静脉注射到癌症小鼠模型中的8只荷瘤动物中(步骤3)。在第4天处死动物之前,每24小时对动物进行一次彻底的体格检查,并切除肿瘤进行定植研究(步骤4)。图8B:使用CLOSTRA-A1菌株的肿瘤定植研究。CLOSTRA-A1S(S)和营养CLOSTRA-A1(V)是从8只实验小鼠的肿瘤中回收的,这些小鼠的肿瘤以每毫升样本的集落形成单位表达。S+V:热处理前肿瘤样本中存在的孢子和营养细胞;S:热处理程序(80°C,20分钟)后,孢子仅存在于肿瘤样品中。样品用BFM培养基镀在预还原板上,并在厌氧条件下培养24小时。菌落计数的检测限为50CFU/ml。

[0025] 图9:设计并验证将前药转化酶表达为HetSeqⁿ代替特定CLOSTRA基因组序列的示例性CLOSTRA-T。图9A:质粒pPME-102(以简化格式表示,即仅显示与修饰CLOSTRA基因组相关的示例性Clostra盒),其中包含Pth114启动子(Pth114-yfk0)控制下的yfk0基因在Clostra盒的F3元件内插入海藻糖操纵子(从treB到treR),随后生成具有海藻糖阴性表型的CLOSTRA-T01。选择Pth114-yfk0序列侧接的左右同源臂(LHA_{tre}和RHA_{tre})以触发CLOSTRA基因组内海藻糖操纵子周围的序列与pPME-102质粒之间的同源重组。图9B:通过PCR测试并在1.0%琼脂糖凝胶(L=NEB 2-log DNA梯形图)上显示,与两种CLOSTRA野生型克隆(c1-c2)相比,确认四种CLOSTRA-T01克隆(c1-c4)中存在来自pPME-102质粒的Yfk0序列。图9C:培养7小时后,可溶性部分CLOSTRA-T01克隆和CLOSTRA克隆上的SDS-PAGE凝胶。蛋白质标记(L):精密全蓝蛋白质标准(Bio-Rad)。在CLOSTRA-T01和CLOSTRA(各两个克隆)的标准化裂解物上形成SDS-PAGE凝胶。Yfk0硝基还原酶蛋白带用白色框表示。每种NTR蛋白的预期大小的不同条带在SDS-PAGE凝胶上可见并突出显示。图9D:CLOSTRA-T01(由于Yfk0硝基还原酶)、CLOSTRA(作为阴性对照)或缓冲液的甲萘醌还原酶活性,在使用BugBuster试剂(Novagen Militorre,70584)按照制造商建议(Novagen,用户协议TB245 Rev.F 1108)制备的三份7小时裂解物中测量。酶活性通过在λ=550nm下60秒的吸光度变化来测量。误差条表示平均值的标准误差。甲萘醌还原被用作标准底物,以量化来自硝基还原酶家族的PCE的酶活性。

[0026] 图10:设计并验证表达细胞因子为HetSeqⁿ而非CLOSTRA基因组序列的示例性CLOSTRA-T。图10A:与图9A所示pPME-102的简化表示相比,质粒pPME-103中Clostra盒的FB包含小鼠白细胞介素2编码序列,该序列置于Clostra盒中Pfdx启动子和nprM3信号序列的控制下(Pfdx-nprM3-IL2,整个序列表示为m1L2;完整PfdxnprM3-m1L2-Flag,SEQ.ID NO:63),然后插入CLOSTRA基因组中的pyrE位点,随后生成具有pyrE阴性表型(尿嘧啶营养缺陷型)的CLOSTRA-T02。选择m1L2基因侧接的左右同源臂(LHA_{pyr}和RHA_{pyr})以触发CLOSTRA基

基因组中pyrE(乳清酸磷酸核糖转移酶)基因周围序列与pPME-103质粒之间的同源重组。图10B:通过PCR测试并在1.0%琼脂糖凝胶上显示,与未修饰的CLOSTRA克隆相比,确认三种CLOSTRA-T02克隆(c1-c3)中存在mIL2基因,带对应于原始CLOSTRA中未产生的预期片段(约950bp)。图10C:对对照CLOSTRA-A1(A1)和三种CLOSTRA-T02克隆(T02-1/-3)进行的Western免疫印迹(免疫印迹分析)可视化。通过SDS-PAGE分离细胞裂解物和上清液部分,转移到硝化纤维素膜上,并使用抗Flag标记抗体进行分析。“M”标识蛋白质标记(Precision Plus Protein™ All Blue, Bio Rad)。用TMB印迹一步法溶液(Thermo Scientific Pierce)在硝化纤维素膜上显示标签标记的小鼠IL-2蛋白,并且其大小对应于约为18.2kDa。图10D:用培养基(BFM)和CLOSTRA作为阴性对照,通过CTLL-2细胞系的细胞增殖测定所选CLOSTRA-T02克隆分泌的mIL2的生物活性。图10E:通过ELISA测量克隆CLOSTRA-T02克隆、未修饰CLOSTRA的分泌型小鼠IL2,并且缓冲液仅作为阴性对照(BDL:低于检测限)。

[0027] 图11:设计和验证基于CLOSTRA-A的示例性CLOSTRA-SA,已经包括标记序列HetSeqn,而不是控制溶血素表达的CLOSTRA基因组序列,并且随后进一步修饰以在体外和体内呈现条件性孢子形成特征。图11A:与图9A中pPME-102的简化表示相比,质粒pPME-104中Clostra盒的F3,异源序列包含bgaR转录调节器,该转录调节器置于含有两个乳糖操作子的发散启动子(PbgaR:PbgaL)的控制下,如文献中所述(Hartman AH et al., 2011)。选择spo0A启动子(Pspo0A)侧接的左侧和右侧同源臂(LHASOA和spo0A作为RHA)以触发CLOSTRA-A1基因组和pPME-104质粒之间的同源重组。在异源重组后,CLOSTRA-A1中的天然spo0A启动子被靶向,并被控制spo0A的乳糖诱导系统取代,随后生成具有溶血素阴性表型的CLOSTRA-S1A1。代替性CLOSTRA菌株(CLOSTRA-S2A1)可以类似地通过使用spo11AA启动子(Pspo0A)侧接的序列作为左侧和右侧同源臂(LHA和RHA)来生成。图11B:检测CLOSTRA-S1A1诱导的孢子形成。CLOSTRA-S1A1菌株在BMF培养基中培养,添加或不添加1mM IPTG溶液。接种后每隔24小时采集一次热处理样品,连续五天,在厌氧条件下,在预还原BFM琼脂平板上连续稀释。孵育24-48小时后,评估形成的菌落。条形图表示每毫升所列CLOSTRA培养物的CFU(菌落形成单位)数量。数据代表三个独立实验的平均值,并且误差条表示平均值的标准误差。菌落计数的检测限为50CFU/ml。

[0028] 图12:图示基于相同CLOSTRA-SA菌株生成示例性替代CLOSTRA-SAT菌株的两种方法,其基因组可以使用公开的pPME-102和pPME-103分别修饰CLOSTRA菌株为CLOSTRA-T01和CLOSTRA-T02菌株。产生的CLOSTRA-S1A1T01和CLOSTRA-S1A1T02菌株可用于生成CLOSTRA-S1A1T01S、CLOSTRA-S1A1T01F、CLOSTRA-S1A1T02S和CLOSTRA-S1A1T02F配制物(包含孢子或细胞),然后用适当的化合物诱导产孢,分离孢子,并将其配制以在体内施用,其中这些孢子产生的细胞将表达Yfk0硝基还原酶或小鼠白细胞介素2(在临床应用中,将用人类编码序列替代)。PM-CB标签序列(或BM1)取代所示CLOSTRA衍生菌株中的Sag操纵子。此外,可以进一步修饰CLOSTRA-S1A1T01以将感兴趣的治疗基因整合到pPME-103中,从而产生具有两个治疗基因组合的CLOSTRA-S1A1T03,例如,细胞因子和前药转化酶。可从用于产生根据本图12的相应孢子和制剂的替代CLOSTRA-S和CLOSTRA-A菌株(如图13-16所示)开始产生其他替代CLOSTRA-SAT菌株。

[0029] 图13:基于CLOSTRA-A1菌株设计和验证CLOSTRA-A2菌株,在CLOSTRA-A1中包含BM2标记序列HetSeqⁿ,而不是pyrE(乳清酸磷酸核糖转移酶基因)。图13A:与图9A中pPME-102的

简化表示相比, pPME-105质粒中CLOSTRA盒的F3包含BM2标记序列。选择BM2标记序列侧接的左和右同源臂(LHAp_{pyr}和RHAp_{pyr})以触发CLOSTRA-A1基因组中pyrE基因周围的序列与pPME-105质粒之间的同源重组。图13B:琼脂糖凝胶上PCR产物的可视化,确认从CLOSTRA-A1基因组(A1)中删除pyrE基因(609bp缺失),并选择包含BM2标签序列的CLOSTRA-A2菌株。(CLOSTRA-A2),使用水作为对照(WT)。M:1kb加DNA阶梯。图13C:根据文献,通过在规定的生长培养基上培养,验证CLOSTRA-A2克隆是否为尿嘧啶营养缺陷型突变体(Lovitt et al., 1987)。在厌氧条件下孵育48小时后,CLOSTRA-A2仅在添加尿嘧啶(20μg/ml)的规定培养基中生长,而在缺乏此类补充的培养基中不能生长。CLOSTRA-A1菌株已被用作对照,以证明pyrE基因的功能以及随后在无任何外部尿嘧啶来源的特定培养基中生长的能力。

[0030] 图14:基于CLOSTRA-A2菌株(溶血素和pyrE阴性)和两个标签序列(BM1和BM2),设计新的CLOSTRA衍生菌株,随后进行修饰以呈现孢子形成过程的体外控制。图14A:BgaR转录调节器的组织示意图,该转录调节器置于发散启动子(PbgaR:PbgaL)的控制下,其中PbgaL已被改变以包括核糖开关序列(Rb-E)在+1启动后开始。图14B:与图9A中pPME-102的简化表示相比,pPME-106质粒中Clostra盒的F3包含bgaR转录调节器,该转录调节器置于包含两个乳糖操作子的发散启动子(PbgaR:PbgaL)的控制下,如文献中所述(Hartman AH et al., 2011),并修饰为包含文献中所述的茶碱诱导核糖开关序列(Topp et al., 2010)。选择pPME-106质粒中spo0A启动子(P spo0A)侧接的左侧和右侧同源臂(LHAA和spo0A作为RHA)以触发CLOSTRA-A2基因组和pPME-106质粒之间的同源重组。在异源重组后,CLOSTRA-A2中的天然spo0A启动子被靶向,并被乳糖和茶碱诱导系统取代,该系统在spo0A水平控制孢子形成,随后生成具有溶血素和尿嘧啶阴性表型的CLOSTRA-S1A2。图14C:已使用pPME-107质粒生成相应的CLOSTRA-S2A2菌株,不同于pPME-106,其包括作为LHA和RHA序列的序列Lhasia和作为RHA的spol1AA),位于spol1AA启动子(P spol1AA)的两侧,以便在异源重组时,CLOSTRA-A2中的天然spol1AA启动子是靶向的,并被乳糖和茶碱诱导系统取代,该系统在spol1AA水平上控制孢子形成,但仍获得具有溶血素和pyrE阴性表型的CLOSTRA菌株。

[0031] 图15:验证基于CLOSTRA-A2菌株的新菌株(溶血素和pyrE阴性,带有两个标签序列(BM1和BM2)),它们使用两种不同的梭状杆菌产孢基因在体外控制孢子形成过程。图15A:使用基因特异性引物进行PCR扩增后,确认CLOSTRA-S3A2和CLOSTRA-S4A2菌株。CLOSTRA-S3A2菌株的特征是包含可诱导启动子的序列有422bp缺失和1344bp插入(S3A2,PCR片段为3070bp;CLOSTRA-A2,PCR片段为2151bp;WT:水对照)。CLOSTRA-S4A2菌株显示包含可诱导启动子的序列有145bp的缺失和1344bp的插入(A2,PCR片段为1800bp;S4A2,PCR片段为2999bp;WT:水对照)。M:1-kb标记阶梯)。图15B:在诱导产孢的背景下测试CLOSTRA-S3A2和CLOSTRA-S4A2菌株,以开发耐热菌株。CLOSTRA-S3A2和CLOSTRA-S4A2菌株在BMF培养基中培养,添加或不添加2mM乳糖和5mM茶碱溶液(培养基接种后4小时添加)。接种后每隔24小时采集一次热处理样品,连续五天,在厌氧条件下,在预还原BFM琼脂平板上连续稀释。孵育24-48小时后,评估形成的菌落。条形图表示每毫升所列CLOSTRA培养物的CFU(菌落形成单位)数量。数据代表三个独立实验的平均值,并且误差条表示平均值的标准误差(检测限:50CFU/ml)。

[0032] 图16:用于生成示例性、基于示范性治疗基因(IL2、白细胞介素21)整合的替代CLOSTRA-AT和CLOSTRA-SAT菌株,但是,可以在不同Locusⁿ(天然或已修饰)和不同CLOSTRA

衍生菌株中使用本文公开的任何治疗基因,包括生长因子、抗体、抗原或酶的基因(具有可诱导或正常的孢子形成过程)。图16A:pPME-108质粒,pPME-103衍生质粒,可包含IL2基因序列,具有LHA和RFIA序列,适合将该治疗基因整合到两种不同CLOSTRA菌株(CLOSTRA-A2和CLOSTRA S3A2)的相同基因组位置(例如海藻糖操纵子、LHA_{tre}和RHA_{tre})。可使用另外两种pPME-103衍生质粒(pPME-109和pPME-110)靶向先前修饰的Locusⁿ在具有可诱导产孢的CLOSTRA衍生菌株内(CLOSTRA S4A2,产生CLOSTRA-S4A2T02a和CLOSTRA-S4A2T02b;在图16B,F3中含有LHABMI和RHABMI)或具有正常孢子形成的CLOSTRA衍生菌株内(CLOSTRA A2,产生CLOSTRA-A2T02a和CLOSTRA-A2T02b;图16C,F3中含有LHABM2和RHABM2)。产生的CLOSTRA菌株可用于产生如上所述的细胞、孢子和相关组合物。

具体实施方式

[0033] (i) 通用定义

[0034] “CLOSTRA”是指被确定为属于梭状杆菌属的任何物种、菌株、分离物、变体和细胞,它们在生物体内具有产孢和发芽控制功能,例如,直接从生物体和生物样品中分离,或从公共来源获得,包括储存库和细胞库。此类特定梭状杆菌物种的非详尽列表包括丁酸梭状芽胞杆菌、产孢梭状芽胞杆菌、肉毒梭状芽胞杆菌、艰难梭状芽胞杆菌、丙酮丁醇梭菌、*C. autoethanogenum*、*C. beijerinckii*、*C. carboxidivorans*、*C. cellulolyticum*、*C. celerecrescens*、产纤维二糖梭菌、甲酸乙酸梭菌、*Clostridium josui*、克氏梭菌、诺维梭状芽胞杆菌、巴斯德梭菌、*C. papyrosolvans*、*C. perfringens*、*C. phytofermentans*、*C. polysaccharolyticum*、*C. propionicum*、*C. saccharoperbutylacetonicum*、*C. sticklandii*、破伤风梭菌、*C. thermocellum*、*C. thermobutyricum*、*C. thermoaceticum*、*C. populeti*、*Clostridium lentocellum*、*Clostridium chartatabidum*、阿氏梭状杆菌、*Clostridium herbivorans*、*C. madisonii*、双酶梭菌、肉毒梭状芽胞杆菌、*C. brevifaciens*、*C. chauvoei*、*C. dissolvans*、*C. fallax*、溶组织梭菌、*C. nigrificans*、*C. perfringens*、腐败梭菌、败毒梭素、*C. thermohydrolyticum*、*C. thermosaccharolyticum*、韦氏梭菌、*C. saccharolyticum*、*C. Ijungdahlii*,以及文献中描述的保存库和细胞库中发现的和/或工业或临床应用中常用的任何分离物或菌株。有关用作CLOSTRA的梭状杆菌物种的其他详细信息和分类,请参见文献(例如Cruz-Morales P et al., 2019)。

[0035] 合适的CLOSTRA菌株可从公共保藏中找到,如美国典型培养物保藏中心(ATCC)、国家工业、食品和海洋细菌保藏中心(NCIMB)或国家典型培养物保藏(NCTC)、或从布达佩斯条约下的国际保藏机构中找到。用作CLOSTRA的梭状杆菌种类的选择将取决于其生物学特性和随后使用的CLOSTRA衍生菌株。例如,已知定植于人体组织(如内脏或皮肤)的梭状杆菌物种将优先用于产生可直接用于医疗应用的梭状杆菌衍生菌株(例如丁酸梭状芽胞杆菌或产孢梭状芽胞杆菌),因为它们无毒,或者在选择了已经失去任何毒性特征的菌株后(如诺维梭状芽胞杆菌-NT和肉毒梭状芽胞杆菌、艰难梭状芽胞杆菌、*C. tetanii*或*C. perfringens*的其他无毒变体)。任何专门生长和代谢植物或其他有机物质的梭状芽胞杆菌物种(例如*C. thermocellum*、丙酮丁醇梭菌和*C. cellulolyticum*)都优先用于产生可用于工业应用的梭状杆菌衍生菌株。事实上,梭状杆菌基因组可能已经包括异源(非梭状杆菌)序列,或存在

来自给定梭状杆菌物种参考基因组序列的基因组缺失、重排、突变、复制或其他基因组修饰,与使用质粒或其他设计、生产的载体中的Clostra盒中存在的序列无关,并根据本发明使用。

[0036] “Locusⁿ”是指包含在CLOSTRA基因组中的任何DNA序列,其适于根据本发明的方法进行修饰。CLOSTRA基因组中的此类DNA序列可以是任何大小,例如一种或多种全操纵子、一种或多种全基因、复制位点或基因间非编码序列,以及此类序列中的特定元件,包括完整或部分编码序列、启动子或其他调节基因表达或任何长度和组成的复制的序列。

[0037] “HetSeqⁿ”是指未包含在CLOSTRA基因组中的任何DNA序列,其旨在根据本发明的方法非随机整合在CLOSTRA基因组中。该DNA序列可以是任何大小和来源(包括来自不同克隆、细菌、酵母、植物、哺乳动物、人类或任何人造变体和人工序列的基因组),并且可以包括作为一种或多种全操纵子、一种或多种全基因、复制位点或基因间非编码序列,以及其中的特定元件,例如完整或部分编码序列,标记序列,可在特定RNA物种、启动子、标记或其他调节基因表达或任何长度和组成的复制的序列中转录的DNA序列。

[0038] “Clostra盒”是指在质粒或其他载体中克隆的重组DNA序列,该重组DNA序列包含至少第一HetSeqⁿ要整合到CLOSTRA基因组的Locusⁿ的序列,以及优选地,至少第二种HetSeqⁿ序列,其允许第一HetSeqⁿ在CLOSTRA基因组的Locusⁿ中稳定整合。第一HetSeqⁿ序列可在5'和/或3'端包含与所需基因Locusⁿ内或周围的序列相同或至少高度同源的额外序列,从而通过同源重组(也被定义为F3)触发第一HetSeqⁿ序列到CLOSTRA基因组的精确整合。第二HetSeqⁿ序列可包括一种或多种编码蛋白质的基因,这些蛋白质有助于和/或指导DNA序列在CLOSTRA基因组中的精确整合(例如,如图3和图4所示,对于通用pPM-1nn、pPM-1nnH和pPM-1nnS质粒,以及如图5所示的pPME-100和pPME-100衍生质粒,其特征是适合在F1/F2元件中应用CRISPR/Cas9技术的元件。可以构建Clostra盒,并将其用于DIMA重组技术的任何兼容质粒或载体,但优选在可维持在革兰氏阳性和/或革兰氏阴性细菌中的载体中。

[0039] “CLOSTRA-S”是指CLOSTRA菌株或CLOSTRA细胞,尤其是通过可用于细胞培养条件的化合物或条件,呈现可诱导或可抑制的孢子形成表型。因此,存在于Clostra盒中用于产生Clostra-S的第一HetSeqⁿ优选包含非梭状杆菌调节DNA,该DNA适当定位在作为控制或直接参与孢子形成过程的CLOSTRA基因的Locusⁿ内,例如spo0A、spollAA、spollE、sigH、sigF、sigE、sigG和sigK。优选地,孢子形成基因是根据每种梭状杆菌物种或菌株,在文献中确定的与孢子形成早期阶段相关的基因(Shen S et al., 2019; Al-Hinai M et al., 2015)。如实施例所示,由于靶向、修饰的CLOSTRA基因仍然存在,根据所需用途、基因修饰技术和CLOSTRA盒中作为第一(或随后的)HetSeqⁿ包含的调控序列,在细胞培养、体内和/或其他条件下,条件产孢是可能的和可诱导的。

[0040] “CLOSTRA-A”是指CLOSTRA菌株或CLOSTRA细胞,其呈现灭活或至少减毒的基因,该基因通常为CLOSTRA提供不适合后续医疗或工业用途的生物活性,尤其是在使用原始CLOSTRA导致活性、复制减少的情况下,和/或在细胞培养条件下或在体内暴露于CLOSTRA的非CLOSTRA细胞的生存能力(或在特定条件下和/或在给定密度下培养时,甚至CLOSTRA自身的特性)。因此,Clostra盒中用于生成CLOSTRA-A的第一(或随后的)HetSeqⁿ优选地包含定位在Locusⁿ内的任何DNA,该HetSeqⁿ是控制或直接参与不希望的表型、破坏、突变、替换或以其他方式突变其调节和/或编码序列的CLOSTRA基因,但对CLOSTRA的生存能力和其他生物

活性没有影响或影响有限。例如,第一HetSeqⁿ可以是对表达或Locusⁿ进行负调控的序列,引入点突变、部分缺失、插入或完全缺失完整蛋白质的编码区,或纯粹中断和替换整个或一段Locusⁿ,而不提供任何其他活性。如实施例所示,将参与溶血性CLOSTRA活性的操纵子替换为无功能的参考标记,或标签序列大大降低CLOSTRA-A中的这种活性。CLOSTRA-A中功能失活或减弱的Locusⁿ和相关表型也可与抗原序列、酶以及通常的梭状杆菌代谢副产物有关,例如,其分泌和/或积累可不受欢迎,包括使用特定分子(作为能量来源或用于转录和/或复制功能)和/或产生酸、醇、毒素或其他代谢副产物。此外,CLOSTRA-A可结合两种或多种不同Locusⁿ的失活或缺失,在整合至少多种不同的HetSeqⁿ后,不相关或不影响孢子形成过程,如CLOSTRA-A2的示例所示。

[0041] “CLOSTRA-T”是指CLOSTRA菌株或CLOSTRA细胞,呈现CLOSTRA基因组中不存在的功能性异源基因,为CLOSTRA提供有利于在治疗或工业环境中使用的生物活性,特别是在使用原始CLOSTRA需要特定预期活动的情况下,例如,在细胞培养条件下或在体内暴露于CLOSTRA的非CLOSTRA细胞的生理特性、复制、活力和/或其他特性(或甚至CLOSTRA特性本身,当在特定条件和/或给定密度下培养时)。因此,Clostra盒中用于生成CLOSTRA-T的第一(或随后的)HetSeqⁿ优选地包含要定位在CLOSTRA基因组中的Locusⁿ内的任何基因(完整或完整编码序列),而不影响正常(或期望的)CLOSTRA表型、存活性和其他生物活性。例如,第一HetSeqⁿ可以是抗原序列的编码序列(例如用于疫苗接种应用)、酶的编码序列(针对特定药物或碳源)、治疗性蛋白质,例如细胞因子(例如IL-2、IL-10、IL-15)、引起人类免疫反应的抗原、生长因子、毒素或抗体(例如抗CTLA4、抗PD L1或抗PD1抗体)。本发明所设想的治疗方法和方案还可涉及施用基于CLOSTRA-T的CLOSTRA衍生产品,该产品优选为抗体(包括单克隆抗体)和其他常规抗体形式,或任何其他结合细胞表面蛋白以控制免疫反应的医药上可得的试剂,因此,作为检查点抑制剂(CPI),可阻断、减少和/或抑制PD-1和PD-L1或PD-L2和/或PD-1与PD-L1或PD-L2的结合。或者,抗体可以针对目前在临床环境中使用或开发的治疗性抗体的癌症抗原。此类抗原的示例为PDGFR α 、Her2、EGFR、VEGFR2、RANKL、CD38、EpCAM、VEGFA、CEA、CD40和CD25(Corraliza-Gorjon I et al., 2017)及其相应的蛋白质/DNA编码序列,可在数据库和/或文献中找到。

[0042] CLOSTRA-T基因组中引入的DNA序列可以与最初披露的DNA序列(或天然DNA序列)相同,但可以根据梭状杆菌生物学和/或CLOSTRA-T菌株的使用进行修饰和调整。例如,可优化克隆序列内的密码子使用,以改善梭状杆菌菌株中相应蛋白质的转录和翻译,如文献中所述,梭状杆菌菌株中表达为重组蛋白质的一系列人类或非梭状杆菌基因。实际上,可以在该范围内使用特定软件,如JCat或Ugene(Gao W et al., 2004; Grote A et al., 2005; Alexaki A., et al., 2019)。或者,当自然序列包含供真核细胞分泌的信号序列时,可以删除或以其他方式突变该信号序列,以允许相应蛋白质在梭状杆菌菌株中正确转录和翻译。作为另一种选择,对最初公开的或天然的DNA序列进行修饰,以在随后由CLOSTRA-T菌株表达的重组蛋白中包括标签序列或其他功能序列。

[0043] 如示例所示,CLOSTRA-T可包含一种以上的HetSeqⁿ,每个HetSeqⁿ具有不同的活性(例如,前药转化酶和细胞因子),每个HetSeqⁿ在CLOSTRA基因组修饰的连续步骤中与不同的质粒和Clostra盒整合。可在Clostra盒中克隆的编码序列用于生成通用pPM-1nn、pPM-1nnH和pPM-1nnS质粒(以及pPME-100衍生质粒)和修饰CLOSTRA的基因组,并且CLOSTRA衍生

菌株可表达具有治疗意义的细胞因子的人类序列(或相应的啮齿动物序列,当需要在啮齿动物模型中验证时),作为完整序列或仅成熟序列在5'端与编码起始氨基酸和/或其他连接序列的密码子融合。此类细胞因子序列的示例为白细胞介素2(IL-2;小鼠序列UniProt代码P04351;人类序列UniProt代码P60568)、白细胞介素10(IL-10;小鼠序列UniProt代码P18893;人类序列UniProt代码P22301)或白细胞介素15(IL-15;小鼠序列UniProt代码P48346;人类序列UniProt代码P40933)。或者,该序列可以是治疗性抗体(或其任何功能片段,例如单链抗体、Fab或纳米体)中的一种,其可以在CLOSTRA衍生菌株复制的相同位置表达并发挥其生物活性,如之前表达功能性抗体的溶瘤梭状杆菌菌株所示(Groot AJ et al., 2007)。示例性序列是编码抗PD-L1抗体(例如药物库代码DB11714、DB11495下的序列)或抗CTLA-4抗体Ipilimumab(KEGG药物代码D04603)的抗PD-1抗体Pembrolizumab(KEGG药物代码D10574和药物库代码DB09037、DB09035、DB11595下的其他抗体)的重链和轻链的序列。

[0044] “CLOSTRA-SA”是指结合CLOSTRA-S和CLOSTRA-A的功能特性和基因组修饰的CLOSTRA菌株或CLOSTRA细胞,其通过使用至少两个不同的Clostra盒修饰CLOSTRA产生,其中CLOSTRA-S或CLOSTRA-A首先生成,然后以任何顺序修饰。CLOSTRA-SA表型和基因组可以用作随后添加一种或多种Clostra盒以获得相应的CLOSTRA-SAT表达(非)梭状杆菌基因的平台。特别地,选择整合至少两个不同的HetSeqⁿ的Locusⁿ(如果CLOSTRA-A结合与孢子形成过程无关的两种不同梭状杆菌基因的失活或缺失,如CLOSTRA-A2中的两种不同梭状杆菌基因的失活或缺失,甚至三种),可以定义并提供专门改良的CLOSTRA-SA菌株,作为插入不同HetSeqⁿ的平台,根据CLOSTRA-SAT菌株的预期用途和特点,在选择和制造CLOSTRA衍生菌株和CLOSTRA衍生产品时分享相同的产孢和生物学特征。

[0045] “CLOSTRA-AT”是指CLOSTRA菌株或CLOSTRA细胞,结合CLOSTRA-T和CLOSTRA-A的功能特性和基因组修饰,通过用至少两种不同的Clostra盒修饰CLOSTRA产生,其中CLOSTRA-T或CLOSTRA-A首先生成,然后以任何顺序修饰。CLOSTRA-AT表型和基因组可以用作平台,然后添加一种或多种Clostra盒,以获得具有适当条件产孢特征和诱导系统的CLOSTRA-SAT。

[0046] “CLOSTRA-ST”是指结合CLOSTRA-T和CLOSTRA-S的功能特性和基因组修饰的CLOSTRA菌株或CLOSTRA细胞,其通过使用至少两种不同的Clostra盒修饰CLOSTRA产生,其中CLOSTRA-T或CLOSTRA-S首先生成,然后以任何顺序修饰。CLOSTRA-ST表型和基因组可以用作平台,然后添加一种或多种Clostra盒以获得CLOSTRA-SAT,并适当减弱或抑制CLOSTRA基因。

[0047] “CLOSTRA-SAT”是指CLOSTRA菌株或CLOSTRA细胞,呈现CLOSTRA-A、CLOSTRA-T和CLOSTRA-S的功能特性和基因组修饰,其通过以任何顺序从CLOSTRA-SA、CLOSTRA-AT和CLOSTRA-ST中的任何一种开始,用至少三种不同的Clostra盒修饰CLOSTRA产生。

[0048] “CLOSTRA衍生菌株”是指CLOSTRA菌株或CLOSTRA细胞,以任何顺序呈现CLOSTRA-A、CLOSTRA-T、CLOSTRA-S、CLOSTRA-SA、CLOSTRA-AT、CLOSTRA-ST和CLOSTRA-SAT中任何一种的功能特性和基因组修饰,与用于修饰CLOSTRA基因组的Clostra盒无关。

[0049] “CLOSTRA衍生孢子”是指从CLOSTRA衍生菌株获得的任何衍生孢子制剂,尤其是含有孢子的制剂,如CLOSTRA-SAS、CLOSTRA-STs、CLOSTRA-ATS和CLOSTRA-SATS。

[0050] “CLOSTRA衍生制剂”是指可用于工业和/或治疗用途的细胞或孢子配方,如从

CLOSTRA衍生菌株或CLOSTRA衍生孢子获得,尤其是含有孢子的制剂,如CLOSTRA-SAF、CLOSTRA-STF、CLOSTRA-ATF和CLOSTRA-SATF所示。

[0051] “CLOSTRA衍生产品”是指CLOSTRA衍生菌株、CLOSTRA衍生孢子、CLOSTRA衍生制剂以及提取物、馏分和从中分离出的遗传元件。CLOSTRA衍生产品可作为可直接储存或使用的纯化和/或浓缩制剂或配方提供。具体而言,由于与使用或储存相关的附加要求,此类制剂可进一步包括例如医药上可接受的生物或化学成分,例如药物、添加剂、盐或赋形剂。此外,根据所需的储存、使用或管理,CLOSTRA衍生产品可以以各种替代格式提供,例如液体、固体、冷冻、干燥和/或冻干格式。

[0052] (ii) 制备CLOSTRA衍生菌株的载体和技术

[0053] 如本文根据实施例所述,所公开的载体和代表性实施技术可适于将DNA整合到专性厌氧微生物的基因组内,例如通常的CLOSTRA(如文献中所述)和CLOSTRA衍生菌株。优选地,此类载体和方法通常选自CRISPR/Cas系统、Cre/Lox系统、TALEN系统和基于同源重组的机制。有关所公开序列、克隆技术和将此类载体组装为平台的其他详细信息,可在文献中找到(Nora L et al., 2019)。

[0054] 这些方法可选择性地包括使用外源性抗生素抗性基因或其他编码选择标记的核酸,以赋予CLOSTRA或CLOSTRA衍生菌株中的可选表型。修饰的选择标记基因可包括编码选择标记的区域和可操作地连接到所述区域的启动子,其中启动子导致由修饰的选择标记基因的单个拷贝编码的选择标记的表达量足以使选择标记改变CLOSTRA衍生菌株的表型,从而可以将其与缺乏修饰的选择(或反选择)标记基因(包括抗生素抗性基因)的CLOSTRA区分开来,编码利用特殊营养替代物的特定代谢酶的基因,编码催化化合物形成独特颜色的酶的基因,编码荧光蛋白的基因,以及编码对另一分子、异源毒素或反义RNA具有特异性亲和力的蛋白的基因。这些标记允许通过从大肠杆菌到CLOSTRA的共轭转移,在大肠杆菌克隆微生物和CLOSTRA或CLOSTRA衍生菌株之间追踪和穿梭质粒。

[0055] CLOSTRA的转化和遗传修饰可涉及通过CLOSTRA基因组中的同源重组替换目标DNA序列(例如Locusⁿ),并包括使用包含复制源的载体转化该菌株,该载体允许其在CLOSTRA中复制,并且优选在其他微生物(如大肠杆菌)中复制,以及包含与目标DNA序列周围所选区域同源的序列的Clostra盒。特别是CRISPR/Cas9技术和双交叉,同源重组介导的染色体整合允许HetSeqⁿ的重组在Clostra盒和CLOSTRA基因组内,独立于梭状杆菌物种中的任何自然同源重组系统。此方法可使用特定或任何顺序的适当质粒连续执行两次或多次,如使用示例性pPME-100衍生质粒的示例中所述。

[0056] 质粒中的启动子序列、编码序列和其他序列也可以针对特定CLOSTRA基因表达谱、代谢和生物学进行优化,例如,其中对多核苷酸的密码子使用进行了优化。此外,由于CLOSTRA同源重组中涉及的基因改变或缺失,CLOSTRA还可呈现特定特征,提高同源重组的频率和/或效率。通常,由于Clostra盒区域中存在的序列至少为70%,因此该过程是可能的;在CLOSTRA或CLOSTRA衍生菌株中,80%、90%、95%、99%或更多与Locusⁿ下游和上游区域相同,且此类同源序列至少约为100、250、500、750、1000、1500碱基或更多核苷酸。

[0057] CLOSTRA菌株中的位点特异性变化可涉及使用Cas9酶(例如,在化脓链球菌和其他微生物中鉴定和克隆的Cas9酶),该Cas9酶可以使用包含将引入CLOSTRA基因组中的序列的相同质粒(例如,在pPM-1nn质粒中,尤其是在示例所示的pPME-100衍生质粒中)引入细胞

中,或者通过使用两种不同的质粒。如本文所用,Cas9酶可利用一种或多种DNA序列,这些DNA序列是与内源性聚集的规则分布的短回文重复序列(CRISPR)相关的重复序列,或来自CLOSTRA基因组或CLOSTRA衍生菌株的一种或多种连续DNA序列。

[0058] 本发明载体可使用适用于梭状杆菌物种的DNA递送技术,尤其是从接合、DNA磷酸钙共沉淀、通用转导、脂质体融合和原生质体转化中选择的DNA递送技术,导入CLOSTRA和CLOSTRA衍生菌株。通过这种方式,Locusⁿ可以修饰,其中Locusⁿ可以是以下任何编码或非编码序列(或其中包含的特定片段):启动子、操纵子、编码孢子形成因子、代谢酶、转录调节蛋白、细胞生长因子、毒素、细胞应激反应蛋白或细胞复制因子的基因。

[0059] 尤其是,CLOSTRA-S衍生菌株或其他不进行自发自然产孢的CLOSTRA衍生菌株,是由改变至少一种产孢基因的结构、功能和/或基因表达控制的基因组修饰产生的,优选spo0A、spollE、spollAA、spollAB、spollR、spollGA或从Sigma F、Sigma E和Sigma G中选择的,更优选的是spo0A或spollAA。以下代码可用于识别梭状杆菌物种共有的产孢基因,以在CLOSTRA-S基因组中进行修饰和诱导:spollR(II期孢子形成蛋白R)、spollD(II期孢子形成蛋白D)、spollGA(II期孢子形成蛋白GA)、spollAB(II期孢子形成蛋白AB)、spollAA(II期孢子形成蛋白AA)、spollE(II期孢子形成蛋白E)、spo0A(0期孢子形成蛋白A)和任何相应的III期孢子形成蛋白。

[0060] 孢子形成基因表达的修饰优选地导致体内或体外的条件性孢子形成过程,该过程是由孢子形成基因的诱导或抑制引起的。这种控制可是由于直接或间接(通过改变导致孢子形成的信号级联中一种或多种特定基因的表达)控制该基因表达的序列的替换和/或破坏造成的。CLOSTRA-S衍生菌株中诱导的突变或其他基因组修饰可能是使用常规CRISPR/Cas9技术、同源重组或任何其他与梭状芽孢杆菌生物学和基因组兼容的技术破坏和/或替代梭状芽孢杆菌基因启动子,具有在CLOSTRA菌株中具有功能活性的(非)梭状杆菌序列(例如,通过敲入、敲除、替换、消除DNA序列),和/或具有或不具有修饰编码该孢子形成基因的序列。

[0061] 优选地,通过将CLOSTRA-S衍生菌株的细胞或孢子暴露于特定化合物(如糖、抗生素、气体或其他化学品)或条件(如温度或pH值),得到可诱导或可抑制的孢子形成表型。可根据生产要求或公认的细胞培养条件,以及更重要的是,在体内给药后,对孢子形成过程进行有意控制,以达到预期的最终用途。CLOSTRA-S衍生菌株优选在人体给药后不能产孢,或表现出有限的产孢活性,并且只能在细胞培养和制造CLOSTRA菌株时可重复的条件下产孢。在已知的诱导剂或抑制系统中,梭状杆菌菌株具有活性,可以对孢子形成基因进行适当的控制,从而在任何CLOSTRA-S衍生菌株中进行有条件的孢子形成,其中有两种主要机制可以利用。作为主要方法,调节序列可由可添加到细胞培养基中的金属、化学品或糖等化合物激活,如阿拉伯糖(Zhang J et al.,2015)、乳糖(Hartman AH et al.,2011)、木糖(Nariya H et al.,2011)或类似的非天然衍生物RNA聚合酶结合序列。针对基因转录、转录后控制或翻译后控制的其他更复杂的方法可能涉及沉默RNA、特定酶和/或合成核糖开关的克隆,这些核糖开关控制不同细菌物种(包括梭状杆菌物种)的基因表达,并且基于在细胞培养中使用茶碱和/或乳糖等化合物(Topp S et al.,2010;Cui W et al.,2016;Canadas I et al.,2019)。根据CLOSTRA基因组以及CLOSTRA衍生产品的后期制造和使用,可以组合一种或多种系统以达到所需的孢子形成控制水平,如CLOSTRA菌株鉴定为CLOSTRA-S3和CLOSTRA-S4的

示例所示。

[0062] pPM-1nn质粒、Clostra盒和CLOSTRA衍生产品(包括任何pPME-100衍生质粒)可根据适用于梭状杆菌物种的一般协议生产,但更具体地说,可根据在临床或工业环境中使用此类生物产品的严格要求生产,使用与生物控制、储存、运输、消除、实验操作以及转基因微生物使用相关的设备和协议。

[0063] (iii) 药物组合物、用途和方法

[0064] 包含根据本发明的CLOSTRA衍生产品的药物组合物(例如CLOSTRA-SAS、CLOSTRA-ATS、CLOSTRA-STs、CLOSTRA-SATS、CLOSTRA-SAF、CLOSTRA-ATF、CLOSTRA-CLOSTRA-STF和CLOSTRA-SATF)可优选用作药物,尤其是用于治疗包括癌症在内的适应症,更优选的是那些实体癌类型,其中体内施用的CLOSTRA衍生产品由于对肿瘤内存在的缺氧区域的倾向性而累积,这取决于肿瘤的大小、阶段、位置和/或起源。具体而言,呈现条件性孢子形成和/或替代性基因表达控制的CLOSTRA菌株还可以在可诱导或基础表达系统中表达或不表达也有助于总体治疗效果的另一种治疗剂(包括抗体、细胞因子、细胞生长因子或毒素),至少表达此类前药转化酶。

[0065] 本发明的药物组合物可含有CLOSTRA细胞或孢子,其量根据生物和/或治疗活性进行评估,并含有每给定单位的CLOSTRA细胞或孢子的计算浓度,例如在每剂量、每毫升或每毫克10到 10^{15} 个或更多CLOSTRA孢子或细胞之间(通常在 10^5 到 10^9 个孢子之间)。CLOSTRA细胞或孢子的浓度也可定义为与药物上可接受的载体、载体、稀释剂、添加剂、赋形剂、溶剂、佐剂或其他化合物和药物(也包括在配方中)的浓度的比率(例如,每毫克 10^5 - 10^8 个孢子的药物,如多西紫杉醇),或者以每剂量或每千克菌落形成单位(CFU)的形式。

[0066] 可使用多种生理学标准(如趋化因子、细胞因子、干扰素等的联合分泌变化,或特定细胞表面受体或转录因子的表达变化)检测和定义CLOSTRA衍生产品的治疗效果。当将这些发现与在平行或类似情况下使用另一种基于梭菌的治疗进行治疗(或潜在候选治疗)的癌症模型或患者的临床或治疗效果进行比较时,有利地允许识别新的临床用途、治疗方法,以及可能受益于使用CLOSTRA衍生产品单独或与其他药物组合(同时或单独,按任何顺序)治疗的药物方案,包括抗癌药物(如当前标准的护理剂、抗肿瘤抗原抗体或癌症免疫疗法)或抗原(人类或非人类的,如疫苗),在治疗过程中或使用CLOSTRA衍生产品治疗之前。

[0067] 在也表达前药转化酶(PCE)的CLOSTRA衍生产品中,使用此类CLOSTRA衍生产品可有益于一般的定向酶前药治疗(DEPT),尤其是梭菌定向酶前药治疗(CDEPT)。文献中描述用于治疗癌症的典型PCE、前药和基于PCE的策略(Rautio J et al., 2018; Hamada Y, 2017; Williams EM et al., 2015)。参考PCE可以是地衣芽孢杆菌的Yfk0硝基还原酶(Emptage CD et al., 2009)。治疗受试者实体瘤癌症的方法可包括向受试者施用表达具有硝基还原酶活性的多肽的CLOSTRA衍生产品和/或其孢子,其中CLOSTRA衍生产品定植于受试者的肿瘤,其中前药在肿瘤内施用和激活。在缺氧和/或坏死环境中增殖的CLOSTRA衍生产品可用于激活抗癌药物(例如化疗剂)或将其靶向于肿瘤携带个体中的肿瘤的方法,包括:(a)施用表达一种或多种有效修饰药物的酶的CLOSTRA衍生产品;和(b)系统地施用通过微生物产生的酶在肿瘤部位转化为该抗癌剂的前药。此类方法涉及施用包含CLOSTRA衍生产品的组合物,其中前药转化酶要么由CLOSTRA基因组自然表达,要么优选通过Clostra盒和重组载体引入,包括代表性实施例中所所述的载体。

[0068] 这些方法需要通过施用的CLOSTRA细胞或孢子在体内适当地结合待施用的前药和前药转化酶。前药可选自葡糖苷酸(例如表柔比星、阿霉素等药物的葡糖苷酸缀合物)和药物的化学衍生物的原始形式,例如磷酸足叶乙甙、磷酸阿霉素、磷酸丝裂霉素C、核苷酸衍生物(例如5-氟胞嘧啶或5-氟尿嘧啶)、羟基安乃近芥和其他基于芥子气的药物,和4-羟基环磷酰胺。相应的前药转化酶可以是胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶、羧肽酶、碱性磷酸酶或 β -内酰胺酶,尤其针对前药中的硝基官能团。

[0069] 本发明还允许定义治疗方法和药物方案,这些方法和药物方案可受益于服用CLOSTRA衍生产品,例如公开的CLOSTRA衍生孢子和含有它们的制剂,适用于给定的病理学(即根据其病理生理学、转移特性、位置、阶段等的特定类型的癌症,或特定的疫苗接种方法),候选患者群体(即根据先前的治疗、持续的护理标准或其他治疗模式、免疫状况、改变的拷贝数、感染类型、基因突变或相关基因的激活)和/或与特定佐剂(如鞭毛蛋白或其他具有类似功能特征的化学或生物化合物)和其他药物(如检查点抑制剂)的组合,TLR激动剂(例如TLR3激动剂、TLR8激动剂或TLR9激动剂)、针对癌症抗原的抗体、小肽抑制剂(例如针对特定蛋白酶)、小分子抑制激酶或信号蛋白、癌症疫苗、非人抗原或过继细胞疗法。本发明还允许定义治疗方法和药物方案,这些方法和药物方案可受益于服用CLOSTRA衍生产品,例如公开的CLOSTRA衍生孢子和含有它们的配方,适用于给定的病理学(即根据其病理生理学、转移特性、位置、阶段等的特定类型的癌症,或特定的疫苗接种方法),候选患者群体(即根据先前的治疗、持续的护理标准或其他治疗模式、免疫状况、改变的拷贝数、感染类型、基因突变或相关基因的激活)和/或与特定佐剂(如鞭毛蛋白或其他具有类似功能特征的化学或生物化合物)和其他药物(如检查点抑制剂)的组合,TLR激动剂(例如TLR3激动剂、TLR8激动剂或TLR9激动剂)、针对癌症抗原的抗体、小肽抑制剂(例如针对特定蛋白酶)、小分子抑制激酶或信号蛋白、癌症疫苗、非人抗原或过继细胞疗法。这些替代的、新颖的治疗方案可涉及通过注射到血流中(以便不同组织可暴露于该制剂)或在特定生理位置,例如直接在器官、皮肤和/或病理改变的组织(例如癌症病变)中,施用根据本发明的CLOSTRA衍生产品。在后一种情况下,如果原病变不再存在(通过全身免疫激活或其他机制),或根据其他临床参数(如通过生物标记物分析确定的适当临床反应),临床医生评估,可在同一病变(如果仍然存在)或另一病变中施用CLOSTRA衍生产品,基因表达特征、癌症抗原、免疫细胞或临床标准(如肿瘤负荷、分期、转移和/或复发)。根据各监管机构(如FDA、EMA、世界卫生组织和ICLIO)正式定义的标准对临床治疗进行评估和/或控制,提供了一系列标准,用于使用任何适当的技术(如PET和成像)评估癌症患者对药物治疗的反应(如肿瘤的稳定、消退或消除),一般或特定类型的癌症(如实体癌),如文献所述(Eleneen Y and Colen RR,2017;Subbiah V et al.,2017;Rossi S et al.,2017)。

[0070] 根据本发明的治疗性组合的代表性实例可涉及与细胞因子(例如IL-2、IL-10或IL-15)或抗体抗PD-1和抗PD-L1抗体(抗PD1/PD-L1)一起施用CLOSTRA衍生产品,其作为免疫抑制、促炎,或者可以通过修饰此类药物的现有方案(包括定期静脉注射抗体),通过包括施用速溶CLOSTRA衍生产品(优选一次或多次静脉或肿瘤内注射到一种或多种肿瘤病灶中)来改进癌症免疫治疗剂(或使之成为可能)。关于针对癌症抗原的抗体(例如CD20、CD25、CD38、CD40、HER2或EGFR),主要示例是由EMA(欧洲)或FDA(美国)等监管机构批准(或正在验证和审查)的抗体,以及针对细胞表面蛋白的抗体,尤其是用于治疗实体瘤,其治疗活性和/

或临床用途可通过与克罗斯特拉衍生产品的联合施用而得到改善。当要施用的额外药物是细胞因子、化疗剂和/或其他基于细胞的治疗(例如过继细胞转移或CAR-T)时,可以应用类似的方法。抗癌单克隆抗体可选择性地与放射性同位素或药物激活酶结合,其中放射性同位素为铯-188、铯-186、氟-18、钷90或碘-131。

[0071] 在施用本文所公开的组合物后观察到的治疗或预防效果是通过利用专性厌氧CLOSTRA细胞和孢子的细胞靶向性和基因表达活性产生的,这些孢子被定义为具有生物活性的CLOSTRA-ATS、CLOSTRA-STs、CLOSTRA-SATS、CLOSTRA-ATF、CLOSTRA-CLOSTRA-STF和CLOSTRA-SATF,并根据包含在序列水平上的基因组修饰在体内发芽,编码重组(非)梭菌基因和/或控制此类(非)梭菌基因表达水平的序列。通过暴露细胞制剂、组织、器官、动物、类器官、,人类或临床样本(例如活组织检查、血液或血浆制剂)或其他生物样本或提取物,这些样本或提取物指示了所公开的CLOSTRA衍生产品的病理学(例如癌症或病毒感染),有利地允许定义哪些不同的生物靶点和效应是直接导致的或与之相关,所公开的克罗斯特拉衍生产品对此类细胞施加的生理活性(如凋亡、自噬、激活、增殖或其他)或此类细胞随后在人体内施加的生理活性(在肿瘤内、淋巴结中、血液中等)。本发明实施例展示代表性CLOSTRA衍生产品如何在基于细胞的模型(使用细胞系、原代细胞制剂或类器官等共培养系统)、动物模型(例如研究癌症病理学和癌症治疗的相关)中有益地使用。

[0072] 可通过CLOSTRA衍生产品在这些模型中确定和/或评估的示例性生物学特征包括细胞毒性、坏死、分化、凋亡、自噬、激活(失活)、细胞在特定组织或器官内外的迁移、增殖、细胞外基质的完整性、增殖、活力、分化、,免疫反应(根据对特定传染源的暴露,或对该传染源的感染或免疫能力,和/或抗原特异性或非特异性免疫细胞(如B细胞、T细胞或NK细胞)数量或特征的变化来确定),对肿瘤微环境的影响,阻止生长、消退或破坏实体肿瘤,酶(如蛋白酶、脂肪酶和胶原酶)的表达、孢子定植时间、溶瘤、肿瘤体积、全身毒性、动物存活率、孢子数量或CLOSTRA衍生产品在肿瘤内、血液中或其他地方产生的其他可测量影响。

[0073] 本发明还提供可结合不同给药途径施用CLOSTRA衍生产品的医疗方法和用途,例如,一种或多种瘤内(或瘤周)注射,然后在一段时间内(例如一周或多周)进行一种或多种皮下、静脉内、足内或肌肉内注射。组合物剂量,尤其是关于CLOSTRA衍生孢子的含量,可适用于每种给药类型、方案(例如,最高用于瘤内或肝内注射,较低用于皮下或肌肉注射)、和/或与一种或多种额外药物的给药(例如,在联合治疗中)。

[0074] 本文还提供了制备包含CLOSTRA衍生产品的药物组合物的方法,包括混合CLOSTRA衍生产品和一种或多种医药上可接受的佐剂、稀释剂、载体或赋形剂。这些成分可以根据治疗的特定医疗适应症(例如实体癌或血液癌)和/或根据给药方式进行调整,例如通过注射(瘤周、瘤内、眼内、足内、肝内、椎管内、胰腺内、肌肉内或皮下注射)、吸入、局部或口服。在后一种情况下,口服制剂可用于治疗胃肠道疾病或取决于营养和/或肠道微生物群(例如肠易激综合征、感染、癌症、神经退行性疾病、糖尿病等)。

[0075] 与根据本发明可使用的氯斯特拉衍生产品的盐、药物组合物和剂量有关的其他实施例通常在参考文献中描述,例如在雷明顿的《药学》(Allen, Loyd V., Jr; 22nd edition, 2012)。CLOSTRA衍生产品可方便地以单位剂型呈现,由此可通过药理学和基于细胞的药物制剂领域中已知的任何方法制备此类剂型。可连续或根据最大耐受剂量内的一种或多种离散剂量施用CLOSTRA衍生产品作为药物制剂,根据需要调整任何其他药物或标准护理治疗,例

如放疗、化疗(例如丝裂霉素C、长春瑞滨或多西紫杉醇)、肿瘤热疗或紫杉醇等化学品,拓扑替康、DNA改变药物、卡铂、抗代谢药物、吉西他滨、防止细胞分裂的药物、长春新碱、抗血管生成或血管靶向药物(如多拉他汀)以及激酶或磷酸酶抑制剂(如帕佐帕尼、奥拉帕利)。

[0076] 本领域技术人员可以使用常规剂量给药协议来确定给定条件集的最佳给药速率。本文所述制剂和/或本发明药物组合物的个体剂量可以单位剂型投与,单位剂型包括预先填充的注射器或小瓶,其中包含预定浓度和治疗有用量的CLOSTRA衍生产品。例如,每个单位剂型可含有 10 至 10^{15} 个CLOSTRA细胞或孢子,或替代量,例如约 0.001mg 至约 1000mg CLOSTRA衍生产品,例如,优选约 0.1mg 至约 100mg ,包括其中的所有值和范围。在一些实施方案中,如文献所述,本文所述的药剂和/或药物组合物可每日施用一次以上、约每日施用一次、约隔日施用一次、约每三天施用一次、约每周施用一次、约每两周施用一次或约每三周施用一次,以重复施用两种或多种周期(Theys J et al., 2006)。每个周期包括两次或两次以上的给药和/或与其他常规、标准化或周期性治疗方案(例如放疗、化疗、免疫治疗或其他治疗,尤其是最先进的癌症治疗)相关。当通过静脉注射、肝内注射、皮内注射或肿瘤内注射施用CLOSTRA衍生产品时,因此可以调整组合物的总量。

[0077] 根据本发明的CLOSTRA衍生产品的治疗方法和用途涉及治疗或预防以人类或动物细胞、优选癌症和最优选实体癌或淋巴瘤的异常生长为特征的细胞生长障碍。在另一个优选实施方案中,CLOSTRA衍生产品的治疗方法和用途是作为药物组合物,其配制为可注射的水性组合物(任选包含医药上可接受的载体、赋形剂和/或佐剂),用于处于健康状态的器官或组织,呈现与外源性病原体(如细菌、病毒和一般感染)相关的疾病,或呈现由细胞生长障碍引起的改变,其特征是人类或动物细胞的异常生长,例如癌症(即涉及致瘤转化、转移、有毒化合物),或以雌性哺乳动物生殖器官细胞异常生长为特征的妇科疾病)。优选地,根据本发明的CLOSTRA衍生产品的治疗方法和用途旨在诱导(直接或间接)一种或多种肿瘤细胞的死亡,或抑制一种或多种肿瘤细胞的生长,并进一步包括治疗、减少、改善或预防癌细胞生长、存活、转移、上皮间充质转化,免疫逃逸或复发。在一些实施方案中,CLOSTRA衍生产品用于治疗不同阶段的癌症,如I期、II期、III期或IV期。通过非限制性示例,使用整体阶段分组,I期癌症局限于身体的一个部位;II期癌症和III期癌症都是局部晚期癌症。癌症是定为II期还是III期通常取决于癌症的具体类型。否则,可以根据适合靶向的组织 and 位置来定义癌症,并通过直接、瘤内或瘤周注射进行治疗。

[0078] 根据本发明,通过所公开的组合物、组合、方案和相关给药方法治疗的癌症是基底细胞癌、胆道癌中的一种或多种;膀胱癌;骨癌;脑和中枢神经系统癌;乳腺癌;腹膜癌;绒毛膜癌;结缔组织癌;消化系统癌症(包括食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌或其他胃肠道癌症);眼癌;头颈部癌症;胶质母细胞瘤;肝癌;肝癌;上皮内肿瘤;肾癌、肾上腺癌或肾癌;白血病;肝癌;肺癌(如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌);黑色素瘤;肾细胞癌;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(唇、喉、舌、口、咽);胰腺癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;呼吸系统癌症;涎腺癌;皮肤癌;鳞状细胞癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫、子宫内膜、宫颈、外阴、卵巢或其他妇科癌症;泌尿系统癌症;淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤(NHL;包括特殊类型,如低级别/滤泡性、小淋巴细胞性、中级/滤泡性、中级弥漫性、高级免疫母细胞性、高级淋巴母细胞性、高级小非分裂细胞性或块状疾病NHL)、套细胞和艾滋病相关淋巴瘤;慢性淋巴细胞白血病;急性淋巴细胞白血病;毛细胞白血病;慢性粒

细胞白血病;以及其他癌和肉瘤;移植后淋巴增生性疾病(PTLD),以及与白内障或水肿相关的异常血管增生(如与脑肿瘤相关的血管增生)。在一些实施方案中,这种癌症是胆道癌。在一些实施方案中,胆道癌是从胰腺癌、胆囊癌、胆管癌和壶腹癌中挑选出来的。在一些实施方案中,癌症是肝癌。在一些实施方案中,这种癌症是结肠癌。在一些实施方案中,胆管癌是胆管癌和/或腺癌。或者,该癌症可被列入罕见疾病列表,根据欧洲或美国定义的发病率和/或流行率标准进行定义,并在国际罕见癌症倡议等组织网站上提供的定期更新列表中指出(<http://www.irci.info>)或稀有癌症(<http://www.rarecare.eu>)中指出。

[0079] 更优选地,根据本发明的CLOSTRA衍生产品用于治疗实体瘤(例如癌、胶质瘤、黑色素瘤或肉瘤)的方法中。具体而言,CLOSTRA衍生产品可系统性投与,或直接投与肿瘤内或肿瘤附近或肿瘤处,例如肿瘤肿块边缘、周围上皮细胞、淋巴管或血管(例如通过瘤内或瘤周注射)或雌性哺乳动物生殖器官的异常生长细胞。这种癌症可能是一种休眠性肿瘤,可能是由癌症转移引起的。休眠肿瘤也可能是手术切除肿瘤后的残余肿瘤。例如,癌症复发可能是肿瘤再生、肺转移或肝转移,其中根据本发明的治疗方法和用途提供了减少或阻断被治疗癌症可导致的远处转移的方法。

[0080] 此外,对器官和皮肤的宏观检查以及对任何一种免疫缺陷的完全免疫活性动物模型的微观病理分析可进一步指示根据本发明的方法和用途的功效。通过使用适当的统计测试,可以很容易地在本文所述的不同实验组之间比较类似研究中产生的定量数据,无论是否校正多次测试,以评估在施用本文所述的CLOSTRA衍生产品后观察到的治疗(尤其是抗肿瘤)效果,单独使用或与其他药物联合使用。

[0081] 此外,所公开的组合物可用于支持疫苗(或自身作为疫苗产品)、细胞因子、抗原、抗体、化合物和其他具有免疫调节活性的化合物,用于治疗和/或预防癌症(固体或非固体)或感染,例如作为佐剂和/或用于拯救对药物反应不良或耐药的患者,包括用于癌症免疫治疗、改变细胞代谢和/或功能(最好是在免疫细胞和/或癌细胞中)、调节DNA表达、复制和/或修复(包括针对表观遗传机制的药物)或用于标准护理治疗(如化疗或放疗,或涉及癌症或病毒抗原的基于疫苗的治疗)的药物。与克洛斯特拉衍生产品共同施用(随后,以任何顺序)的此类额外药剂可改善治疗方法,其生物利用度、功效、药代动力学/药效学特征、稳定性、代谢或其他药物特性在单独施用每种药物感兴趣化合物治疗时未观察到。

[0082] 典型的癌症适应症,其中根据本发明的治疗方法和方案可以通过适当地结合施用抑制PD-1的药物(例如抗PD-1抗体)和CLOSTRA衍生产品来实现,包括但不限于黑色素瘤、三阴性乳腺癌、肉瘤、头颈癌、结直肠癌、膀胱癌、肾细胞癌、肝转移、胃癌、前列腺癌和肝细胞癌。此类适应症也可通过在适当的方案中给予CLOSTRA衍生产品与抗PD-L1、抗CTLA4或抗OX-40抗体(或放疗等标准护理)的组合来治疗。

[0083] 在一些实施方案中,CLOSTRA衍生产品可与针对PD-1、PD-L1和PD-L2中的一种或多种的免疫调节剂一起施用。优选地,免疫调节剂是PD-1抑制剂。在一些实施方案中,免疫调节剂是针对PD-1、PD-L1和PD-L2中的一种或多种的抗体。这种免疫调节剂是抗体,包括nivolumab(ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO)、pembrolizumab(KEYTRUDA)、pidilizumab(CT-011)、MK-3475、BMS-936559、MPDL3280A的非限制性示例。

[0084] CLOSTRA衍生产品可作为药物组合物包含在试剂盒中,该药物组合物可作为液体溶液或冻干粉针剂提供。特别是,当含有CLOSTRA衍生孢子时,试剂盒还可能含有使用前与

孢子混合的溶剂,其中所述溶剂选自林格溶液、磷酸盐缓冲盐或其他与人体注射相容的溶液,包括用于治疗癌症的溶液。试剂盒还可包含将共同施用或单独施用的另一种药物或前药。

[0085] (iv) 工业组合物、用途和方法

[0086] 除了本文所述的医药产品、用途和方法外,CLOSTRA衍生产品还可有利地应用于许多工业或商业环境,尤其是在需要高密度和/或与高效,严格控制细胞培养条件,以生产化合物、酸和其他原材料,提高纯度和/或产量。

[0087] CLOSTRA衍生菌株可进行基因改造,以表达一种或多种异源基因,以增强或抑制一种或多种内源酶的活性(或添加进一步的酶性质),从CLOSTRA已用于工业、非临床工艺开始,或使进一步的CLOSTRA适用于此类工业工艺。可修饰CLOSTRA衍生菌株,使其将条件性孢子形成与抑制或减弱内源性CLOSTRA基因的活性和/或表达相关联,同时添加或不添加一种或多种非梭状芽孢杆菌生物学或酶学特性。此类性质的示例包括特定糖、纤维素和/或木质纤维素材料的水解。这些材料和CLOSTRA衍生菌株可用于从用作主要碳源的各种原始有机物质生产散装化学制剂的方法和工艺。此类含碳物质来源可是(非)木本植物物质、纤维素材料、木质纤维素材料、半纤维素材料、碳水化合物、果胶、淀粉、菊糖、果聚糖、葡聚糖、玉米和玉米衍生产品、甘蔗、草、开关草、高粱、竹子、酒糟、酒糟干可溶性物质(DDS)、酒糟干可溶性物质(DDG)、浓缩酒糟可溶性物质(CDS),蒸馏器湿谷物(DWG)、蒸馏器干谷物(含可溶物)、果皮、柑橘皮、蔗渣、杨树或藻类。在接触CLOSTRA衍生菌株之前或之后,可通过酸、蒸汽爆炸、热水处理、碱、过氧化氢酶或解毒或螯合剂处理含碳物质,以促进和/或改进发酵过程或分离化学、最终产品,例如气体、生物燃料、醇、溶剂、营养元素或其他因素,以及与食品、塑料或其他行业相关的酸。因此,可在发酵容器中使用CLOSTRA衍生菌株,其中引入含碳物质,并在给定时间段后提取副产物,以消除无关或有毒化合物,并分离所需副产物,例如正丁醇、丙酮、异丙醇、乳酸或乙醇。

[0088] 实施例

[0089] 实施例1:制备Clostra盒和pPM-1nn质粒(作为pPME-100衍生质粒),用于产生和验证示范性非溶血性梭状杆菌菌株(CLOSTRA-A1)

[0090] 材料和方法

[0091] 菌株细胞培养条件

[0092] 表1

梭状杆菌物种	培养保藏号	生长要求	参考文献/目的
产孢梭状芽胞杆菌	NCIMB 10696	厌氧, 37°C	Kubiak AM <i>et al.</i> , 2015 Cooksley CM <i>et al.</i> , 2010
	野生型		
丁酸梭状芽胞杆菌	DSM 10702	需氧, 37°C	Tanner R <i>et al.</i> , 1981
	野生型		
大肠杆菌	TOP10	需氧, 37°C	Invitrogen™ (表达/质粒储存菌株)
	NEB® 稳定的竞争细胞		NEB Product: C3040 (表达/质粒储存菌株)
	S17-1™	需氧, 30°C	ATCC 47055 (结合供体菌株)

[0094] 大肠杆菌在LB培养基中培养,适当时添加氯霉素(25pg/ml),在37°C、200rpm下水平振荡。所有厌氧梭状杆菌菌株在37°C的厌氧条件下(80%N₂、10%CO₂、10%H₂)在MACS1000工作站(Don Whitely, Yorkshire, UK)的BFM培养基中培养, BFM培养基是固体或液体培养基,用于培养和获得梭状杆菌细胞和孢子,无需使用动物来源的材料。

[0095] 表2

主要成分	浓度范围
蛋白胨, 肽酶消化来自蔬菜源的微生物(例如大豆)	1-25 g/l
证明的无动物酵母提取物(例如酵母提取物, Novagen® Veggie™)	1-25 g/l
消耗氧并且允许像梭状杆菌生长专性厌氧物(例如巯基乙酸钠)	0.1-1.5 g/l
糖源(例如右旋糖)	0.01-0.5%
抗生素, 当需要时(例如甲砒霉素或D-环丝氨酸)	0 - 250 µg/ml

[0097] 向生长培养基中添加1-50mM异丙基-1-硫代-D-半乳糖基吡喃(IPTG)可诱导CLOSTRA-S1A1菌株的孢子形成。将所有菌株作为冷冻储备储存在含有10%甘油(过滤消毒)的培养基中,置于-80°C冷冻柜中。所有培养基、缓冲液和溶液均在蒸馏水中制备,并在121°C下高压灭菌15分钟或过滤消毒。除非另有规定,培养基成分、抗生素和其他化学品和生化药品由Oxoid、Sigma Aldrich或Fisher Scientific提供。通过添加1%(w/v)1号细菌琼脂(Oxoid)制备琼脂平板。

[0098] CLOSTRA菌株高滴度纯孢子库的制备。在80%N₂、10%CO₂、10%H₂、37°C的条件下,

在厌氧柜(型号MG1000 Mark II, Don Whitley Scientific Limited)中,从BMF琼脂平板上的冷冻孢子原液中划出CLOSTRA野生型菌株。24小时后,用重循环梭状杆菌细胞接种10ml厌氧还原BFM肉汤。孵育48小时后,将10ml培养物向下旋转(5000g,持续10分钟),重新悬浮在1ml PBS中,并进行热处理(80°C,持续20分钟)。在厌氧条件下,将1ml混合物接种到40ml新鲜和厌氧还原的BFM中,并静置48小时孵育。48小时后,将整个40ml培养物在5000g室温下旋转10分钟,重新悬浮在2ml PBS缓冲液中,在80°C下进行20分钟的热处理。将2ml热处理培养物接种到Schott Duran瓶中的1升预还原新鲜BMF培养基中。

[0099] 将CLOSTRA的1升培养物在37°C厌氧条件下放置72小时,然后在之前描述的厌氧条件下,在30°C次优温度下每日搅拌72小时。培养过程结束后,从厌氧培养箱中取出1升孢子培养物,并在室温下暴露于环境氧气中24小时。随后,对孢子/碎片混合物进行热处理(80°C,20分钟)并冷却至室温。将等分(300 μ l)的孢子样品镀在预还原BFM板上,以检查孢子形成滴度。将孢子混合物分配到250ml离心瓶中(NALGENE 3120-0250),填充至总容量的80%(即每个200ml)。然后将孢子混合物向下旋转(5000g,30分钟),并丢弃上清液。将每个瓶子中的小球重新悬浮在20ml PBS中,并汇集在一起。最终100ml孢子/碎片混合物在4°C下培养24小时,转速为100rpm。

[0100] 将含有孢子、死细胞和细胞碎片的高滴度孢子悬浮液在室温下以3000g离心30分钟制成颗粒,然后再悬浮在10ml 20%无菌Flistodenz溶液中。将每1ml的10ml孢子悬浮液小心地分层在falcon试管中30ml Histodenz梯度(50%)的顶部,注意不要将孢子与梯度培养基混合。梯度在4000g下离心20分钟。营养细胞和细胞碎片沉积在所用悬浮液和50%梯度培养基溶液之间的界面上,而孢子沿着梯度培养基向下移动,在试管底部形成颗粒。将界面处的细胞碎片与溶液的其余部分一起轻轻丢弃,使孢子颗粒保持原样。每个孔颗粒在10ml无菌水中清洗,最后在1ml PBS中造粒和再悬浮,并汇集在一起。使用亮相显微镜检查所得10ml孢子悬浮液,以确认其纯度。

[0101] 扩增和克隆典型Clostra盒和pPME-100质粒的DNA序列。表3列出了根据标准协议和示例中所述用于DNA片段PCR扩增、筛选和测序的主要引物序列。

[0102] 表3

[0103]

名称	序列	描述
Cas9-F (SEQ ID NO:1)	TATAGCGGCCGCTCAGTCACCTCCTAGCTG ACTC	扩增来自 <i>Streptococcus pyogenes</i> (Dep. No. DSM 20565)的Cas9基因; 在所有pPME-100衍生物质粒中
Cas9-R (SEQ ID NO:2)	CCGGTCTCACAAGATGGATAAGAAATACTC AATAGGCTTAGATATCGG	
Prom-F (SEQ ID NO:3)	CCGGTCTCATGGTCGTACACTCCCTTTTACT ATTTAATTATCTATG	扩增具有sgRNA的模块F2; 在所有pPME-100衍生物质粒中 (全F2序列, SEQ ID NO:61)
sgRNA-R (SEQ ID NO:4)	TATAGACGTCATAAAAATAAGAAGCCTGC AAATGCAGGCTTCTTATTTTTATAAAAAA GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG	
Sag-LHA-F (SEQ ID NO:5)	TATATAGGTCTCGGAAAATAAAGAAGGA CAAGTATTGCTAAATTCTTATGATGTAG	扩增LHA _{sag} 和RHA _{sag} 以在CLOSTRA内产生F3元件靶向Sag操纵子; 在pPME-101中
Sag-LHA-R (SEQ ID NO:6)	TATAGGTCTCGTCTCTGTTAACCTCAAATT TATTATACCTAATAATCCTTTTTAATTATTT CATGTACAC	
Sag-RHA-F (SEQ ID NO:7)	TATAGGTCTCGGAGATTTACACAGAGGCC TTAGTATAGTAATTTTATTTGCAGTAAGTTT CTTTATTATAGG	
Sag-RHA-R (SEQ ID NO:8)	TATATAGGTCTCGTGGCCCAAAGTTCAC ATTTAACTTTAACAAGAAACCTG	
Sag-SG-R (SEQ ID NO:9)	TATAGACGTCATAAAAATAAGAAGCCTGC AAATGCAGGCTTCTTATTTTTATAAAAAA GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG	通过SaiI, AatII限制位点将Sag靶向sgRNA插入pPME-101载体
Sag-SG-F (SEQ ID NO:10)	TATAGTCGACGAGTTAATCCATCTGCAGGA GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGT GGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTATAAAAA	

[0104]

上游-F (SEQ ID NO:11)	TAGCATCAGGAGGAACGAAGATAAAGGC	在产孢梭状芽胞杆菌中菌落PCR筛选用于sag操纵子敲除突变物(验证CLOSTRA-A1克隆)
结合-R (SEQ ID NO:12)	ACCGCCACCTACCTAACCTAACGC	
下游-R (SEQ ID NO:13)	CCATAAATCTCTCAATATGTCAAAGCCATC AAGTCC	
TreO-LHA-F (SEQ ID NO:14)	TATAGACGTCGATAAGTCCTATTATTATTA AAATTTCTATAAGAAAATATTAATG	扩增LHA _{tre} 和RHA _{tre} 以在CLOSTRA内产生F3元件靶向海藻糖操纵子; 在pPME-101中
TreO-LHA-R (SEQ ID NO:15)	CCGGTCTCGGCAGCATTTTCACTAATTTA ATATCTCCAATAATATTACGG	
TreO-RHA-F (SEQ ID NO:16)	CCGGTCTCAGATTTAAATTTGTAGAATTTG CACGAAGAAAATAATACTG	
TreO-RHA-R (SEQ ID NO:17)	TATAGGCGCGCCCAATAATTTACAAGGTAT TTAAGATAAG	
TreO-SG-R (SEQ ID NO:18)	TATAGACGTCATAAAAATAAGAAGCCTGC AAATGCAGGCTTCTATTTTTATAAAAAAA GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG	通过SaiI, AatII限制位点将海藻糖靶向sgRNA插入pPME-102载体
TreO-SG-F (SEQ ID NO:19)	CCGTCGACATACCTCCACAGAACATAAGGT TTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAGTGG CACCGAGTCGGTGCTTTTTTATAAAAATA	
Thl14YfkO-F (SEQ ID NO:20)	CCGGTCTCACTGCCAATAGATAAAATAAAG	扩增Pth14-yfk0序列; 在pPME-102中(全Thl14 yfk0序列, SEQ ID NO:62)
Thl14YfkO-R (SEQ ID NO:21)	CCGGTCTCAAATCATAAAAATAAGAAGCCT GCAAATGCAGGC	
CR2-TreO-F (SEQ ID NO:22)	GACTTATTTGGGTTTATTTAACTACCCCG	菌落PCR筛选用于验证CLOSTRA-T01克隆
CR2-TreO-R (SEQ ID NO:23)	TAGCATTGGACATTATTGTTAAGCATAAGAC	
pyrE-LHA-F (SEQ ID NO:24)	TATAGACGTCCCTAAAGAAGGAAATAATG GCATAAGAAT	扩增LHA _{pyr} 和RHA _{pyr} 以产生F3元件靶向CLOSTRA pyrE基因来插入mIL2; 对于pPME-103和pPME-105
pyrE-LHA-R (SEQ ID NO:25)	CCGGTCTCAATTATTAATAATTCCCCTTAT TTCTCTAAAGTTTGAATACC	
pyrE-RHA-F (SEQ ID NO:26)	CCGGTCTCAATTTAAAAATAAGGAGTGCT CAAATAGATTTAATTTTG	
pyrE-RHA-R (SEQ ID NO:27)	TATAGGCGCGCCAGTTGTTCCAGATGTTGA TGTAATCTGCTTATTTG	
mIL2-F (SEQ ID NO:28)	CCGGTCTCATAATTTATAAATAAAAATCAC CTTTTAGAGGTGG	扩增pfdx-nprM3-mIL2序列; 对于pPME-103
mIL2-R (SEQ ID NO:29)	CCGGTCTCAAATTTATTATTTATCATCATC ATCTTTATAATCTTGAGGACTTG	

[0105]

pyrE-SG-R (SEQ ID NO:30)	TATAGACGTCATAAAAATAAGAAGCCTGC AAATGCAGGCTTCTTATTTTTATAAAAAA GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG	通过 <i>Sai1</i> , <i>Aat11</i> 限制位点将pyrE靶向sgRNA插入pPME-103载体
pyrE-SG-F (SEQ ID NO:31)	TAGTCGACATAGTAGGACCAGCTATGGGG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATA AGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG GCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTATAAAAAT A	
pyrE-ChR-R (SEQ ID NO:32)	GGAGATATATAATGCTTCAAGTAAATTTAT GTGGTAAG	菌落PCR筛选用于验证CLOSTRA-T02克隆和CLOSTRA-A2克隆
pyrE-ChR-F (SEQ ID NO:33)	CTCCCATAAATAATCTTGTTTTGACGCTAA TATAGC	
Lspo-LHA-F (SEQ ID NO:34)	CCGACGTCGAAATTGTGAAGGAAAAGACT TAAAAATAGTGGCTTATAG	扩增LHA和RHA以产生F3元件靶向CLOSTRA-A1 Spo0A启动子, 从而插入可诱导性bgaR-bgaL模块; 对于pPME-104
Lspo-LHA-R (SEQ ID NO:35)	CCGGTCTCAGGTCTTAATTATTATCTAATAT TCCAGCATCCTTTAGCATC	
Lspo-RHA-F	CCGGTCTCAATGGAAGAAACAAAGATCAA	

(SEQ ID NO:36)	TGTTATCATTGC	
Lspo-RHA-R (SEQ ID NO:37)	TAGGCGCGCCCTTCCATTATTTATAGTATA CCCAAATATATTGTTTATAG	
bgaRL-F (SEQ ID NO:38)	CCGGTCTCACTGCCAATAGATAAAAATAAAG TCTGCC	扩增乳糖可诱导性bgaR -PbgaR-PbgaL.; 对于 pPME-104
bgaRL-R (SEQ ID NO:39)	CCGGTCTCACCATTTTACCCTCCCAATACAT TTAAAATAATTATGTATTATG	
LSpo0A-SG-R (SEQ ID NO:40)	TATAGACGTCATAAAAATAAGAAGCCTGC AAATGCAGGCTTCTTATTTTTATAAAAAA GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG	通过SaiI, AatII限制位 点将spo0A启动子靶向 sgRNA插入pPME-104 载体
LSpo0A-SG-F (SEQ ID NO:41)	TAGTCGACGTACAACCTCTTGTCACTGGT TTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAGTGG CACCGAGTCGGTGCTTTTTTATAAAAATA	
spo0A-Chr-R2 (SEQ ID NO:42)	CCTGCAGCTGTATCCGGTATACAAATAGGA GATAG	菌落PCR筛选用于验证 CLOSTRA-S1A1克隆
spo0A-Chr-F2 (SEQ ID NO:43)	GGTCATTTTTAGGTTTATTCCCGTAGACC	
pCB102-F (SEQ ID NO:44)	GCAAATACATTCGTTGATG	菌落PCR筛选用于验证 pPME-100衍生物质粒的 损失
pCB102-R (SEQ ID NO:45)	CTTTATTTATGATTCATACTTGAC	
pyrE-BM2-LHA (SEQ ID NO:48)	CCGGTCTCACTGCTTAAATAATCCCCTTAT TTCTCTAAAGTTTG	扩增LHA _{pyr} 和RHA _{pyr} 以 产生F3元件靶向 CLOSTRA-A1 pyrE基因 来插入Tag序列BM2用于 pPME-105质粒。扩增和 建立该F3元件的其他引 物是Sag-LHA-F和 Sag-LHA-R。
pyrE-BM2-RHA (SEQ ID NO:49)	CCGGTCTCAGCAGCCCTCCACTCCCATGGA GGATTTAAAATAAGGAGTGTCTCAAAT AGATT	
bgaL- RbEspo0A-R (SEQ ID NO:50)	CCGGTCTCACCATCTTGTTGTTACCTCCTTA GCAGGGTGCTGCCAAGGGCATC	用于Th114Yfk0-F的引物 扩增pPME-106的修饰的 bgaL-RbE序列
PSpolIAA-SG1-F (SEQ ID NO:51)	TAGTCGACGGATTTGGATGAGTAAAAGG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATA AGG	通过SaiI, AatII限制位 点将PspolIAA靶向sgRNA 插入pPME-107
sgRNA-Uni-R (SEQ ID NO:52)	TATAGACGTCATAAAAATAAGAAGCCTGC AAATGCAGGCTTCTTATTTTTATAAAAAA GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTG	
spolIAA-LHA-F	TATAGACGTCGAGTCTATAAATTTATGAAT	

[0106]

	(SEQ ID NO:53)	TTTAAAATATTTTTTAGGTAAG	扩增LHA和RHA以产生F3元件靶向CLOSTRA-S4A2 <i>spol1AA</i> 启动子, 从而插入可诱导性 <bgal-rbe< b="">模块; 对于pPME-107</bgal-rbe<>
	<i>spol1AA-LHA-R</i> (SEQ ID NO:54)	CCGGTCTCAGCAGGTA AAAATTTTTATAT TGATTATTCTAGAACAC	
	<i>spol1AA-RHA-F</i> (SEQ ID NO:55)	CCGGTCTCAATGTATTTAAAATTTGATAAA AAAGCAGACAAAC	
	<i>spol1AA-RHA-R</i> (SEQ ID NO:56)	GGCGCGCCTTTAGTTCCTTCCCCTTTTCTG	
[0107]	bgaL-RbE <i>spol1AA-R</i> (SEQ ID NO:57)	CCGGTCTCAACATCTTGTTGTACCTCCTTA GCAGGGTGCTGCCAAGGGCATC	用于Th114Yfk0-F的引物扩增pPME-107质粒的修饰的 bgaL-RbE 序列
	<i>Chr-spol1AA-F</i> (SEQ ID NO:58)	CCACTTGGGTATGTTGGAATAGCTGCC	菌落PCR筛选用于验证CLOSTRA-S4A2
	<i>Chr-spol1AA-R</i> (SEQ ID NO:59)	CCAGATCTTGCTCTCCATAAGTCC	

[0108] pPM-1nn载体的设计和组装如图3-5所示。使用Cas9-F和Cas9-R引物从化脓链球菌 DSM 20565中扩增Cas9基因, 所得PCR产物用Bsa1和Not1消化, 产生FI片段。合成包含启动子驱动Cas9、gRNA支架和20nt sgRNA靶向区的F2模块(Thermo Fisher Scientific), 通过PCR扩增(使用Prom-F和sgRNA-R引物), 并用Bsa1和Aat11限制性内切酶消化。左侧和右侧同源臂代表在pPME-100衍生质粒的F3元件中克隆并使用CLOSTRA野生型基因组DNA作为模板和表3所列PCR扩增的相关引物扩增的受CRISPR-Cas9突变的染色体位点两侧的序列。

[0109] Clostra盒和pPME-100衍生质粒中包含的其他序列靶向的Locusⁿ和HetSeqⁿ。表4显示用于构建示例中所述CLOSTRA衍生菌株的主要CLOSTRA序列。

[0110] 表4

Locus ⁿ 名称	产孢梭状芽胞杆菌NCIMB 10696 基因组中的位置 (CP009225.1)	实施例 no.
操纵子	AKC61242.1 至 AKC61250.1	Ex. 1 (CLOSTRA-A1)
海藻糖操纵子	AKC62714.1 至 AKC62716.1	Ex. 2 (CLOSTRA-T01)
<i>pyrE</i>	AKC64051.1	Ex. 2 (CLOSTRA-T02) Ex. 3 (CLOSTRA-A2)
<i>Pspo0A</i>	范围 : 2,072,794 to 2,073,215	Ex. 3 (CLOSTRA-S1A1) Ex. 4 (CLOSTRA-S3A2)
<i>Pspol1AA</i>	范围 : 3,473,550 to 3,473,694	Ex. 3 (CLOSTRA-S2A1) Ex. 4 (CLOSTRA-S4A2)

[0113] 设计HetSeqⁿ序列, 必要时优化密码子, 并用其特定启动子和/或信号序列合成(Thermo Fisher Scientific)。使用特定引物对HetSeqⁿ的DNA序列进行PCR(表3) 使用标准协议; 根据制造商的说明, 使用Golden Gate assembly cloning系统(ThermoFisher Scientific) 消化扩增产物并与适当的LHA和RHA片段线性连接。用特异性引物扩增产生的

DNA序列,并使用组成F3片段的AscI和AatII限制性内切酶进行消化。F1、F2和F3片段线性连接,通过PCR扩增,并用AscI和NotI限制性内切酶消化,然后克隆到pMTL82151主干中 (Heap J et al., 2009),在进一步克隆之前使用相同的酶线性化。F3是同源重组盒,旨在促进与Locusⁿ中的CLOSTRA基因组的重组,并包含与HetSeqⁿ靶位点的上游和下游CLOSTRA序列同源的序列。盒可包含也可不包含同源臂之间的货物,并且由两个臂组成。左侧同源臂(LHA):盒的最上游/5-引物部分(100bp和1000 bp之间,例如750bp或更多)定义DNA重组的5-引物位点。右同源臂(RHA):盒的最下游/3-引物部分(100bp到1000bp之间,例如750bp或更多)定义DNA重组的3-引物位点。

[0114] 表5总结pPME-100衍生质粒中存在的标准和可变遗传元件,并进一步包括Cas9和导向RNA支架以及转录为RNA(但未翻译)并被Cas9识别和结合的保守DNA序列(Jinek M et al., 2012)。pPME-100衍生质粒中的可变遗传元件是根据示例中描述的所需CLOSTRA衍生菌株设计和生成的。AatII和SaiI限制位点允许根据染色体靶向区(Locusⁿ)模块化交换20nt重定靶序列(sgRNA)。这些导向序列是根据Benchling(www.Benchling.com)使用CRISPR导向设计工具设计的。sgRNA的序列(单导向RNA),位于gRNA支架上游并与其共同转录的可变序列,决定了CLOSTRA Locusⁿ中Cas9切割的目标位点。

[0115] 表5

[0116]

主要活性	名称/符号	特定功能和主要参考文献
在微生物中复制/保持	pCB102	革兰氏阳性复制子, 衍生自丁酸梭状芽胞杆菌NCIMB 7423的本地pCR102质粒 (Minton N and Morris J 1981; Collins ME et al., 1985)
	pBP1	革兰氏阳性复制子, 衍生自 <i>C. botulinum</i> (Minton N et al., 2016)
	catP	抗生素选择标记。克隆自 <i>C. perfringens</i> 转座子元件 (Bannam TL et al., 1995); catP分别在大肠杆菌和甲磺霉素梭状杆菌菌株中提供氯霉素耐性, 用于选择携带质粒的细胞
	colE1	革兰氏阴性复制子, 用于在大肠杆菌克隆菌株中复制质粒并分泌到子细胞中
	traJ	转移基因, 用于在结合需要的大肠杆菌质粒宿主中表达基因
	p15a	来自pACYC184质粒的革兰氏阴性复制子, 得自 ATCC (Cat. No. 37033)
启动子	araE	CP002660.1 范围 : 1480078 至 1480346
	thl-s	CP002660.1 范围 : 3008857 至 3008980 和 3008769 至 3008788
	fdx	CP009225.1 范围 : 86395 至 86475
使用F3/HRC ⁺ 引入HetSeq ⁿ 的主要类型	Tag	允许验证CLOSTRA基因组的(非)编码序列, 其中Locus ⁿ 内源序列删除, 并且被标记或其他非生物功能序列代替(然后通过PCR、抗体或任何其他体外/体内测量法来鉴别)
	酶 (PCE)	前药转化元件由外源基因(具有其本身调控和编码序列)构成, 一旦插入CLOSTRA基因组和表达, 允许修饰化学或生物化合物

[0117]

		到药物中, 特别当在对象中复制的CLOSTRA菌株暴露于这种化合物, 并且化合物将用于身体位置(其中CLOSTRA菌株复制)中的对象时
	药物	药物编码元件由外源基因(具有其本身调控和编码序列)构成, 一旦插入CLOSTRA基因组和表达, 允许产生生物药物, 特别当药物用于有机体位置(其中CLOSTRA菌株复制)中的对象时

[0118] 表6总结可插入pPME-100衍生质粒 (SEQ ID NO:55) 并整合到克隆衍生菌株基因组中的代表性HetSeqⁿ异源编码序列。

[0119] 表6

HetSeq ⁿ 类型	基因 / 插入名称	参考文献, 实施例
gene	<i>bgaR</i>	CPE0770 UniProtKB - Q8XMB9_CLOPE (实施例 3: 产生 CLOSTRA-S1A1)
[0120] 酶	<i>yfkO</i>	GeneBank: TWK17509.1 (实施例 2: 产生 CLOSTRA-T01)
药物	mIL-2	免疫治疗, UniProtKB - P04351 (IL2_MOUSE) 位置 [21-169] (实施例 2: 产生 CLOSTRA-T02) 可代替的对应人序列 IL2 UniProtKB - P60568 (IL2_HUMAN) 位置 [21-153] (实施例 4: pPME-108)

[0121] 表7总结可插入pPM-1nn载体以控制HetSeqⁿ或Locusⁿ表达的代表性HetSeqⁿ异源、非编码和调控序列。

[0122] 表7

HetSeq ⁿ 类型	基因 / 插入名称	参考文献, 实施例
[0123] Tag (PM -CB)	BM1 (SEQ ID NO:46)	GTTAACAGAGATTTACACAGAGG (实施例 1: 产生 CLOSTRA-A1)

[0124]

	BM2 (SEQ ID NO:47)	GCAGCCCTCCACTCCCATGGAGG (实施例 4: 产生 CLOSTRA-A2
启动子	thl-s	CP002660.1 范围 : 3008857 至 3008980 和 3008769 至 3008788
	thl13	CP002660.1 范围 : 3008857 至 3008980. RBS 和间隔区域 (16 bp 来自ATG起始密码子) 试验选择
	thl14	CP002660.1 范围 : 3008857 至 3008980. RBS 和间隔区域 (16 bp 来自ATG起始密码子) 试验选择
	ptb	CP002660.1 范围 : 3228725 至 3228872
	ptb13	CP002660.1 范围 : 3228743 至 3228872, RBS 和间隔区域 (16 bp 来自ATG起始密码子) 试验选择
	ptb14	CP002660.1 范围 : 3228743 至 3228872 RBS 和间隔区域 (16 bp 来自ATG起始密码子) 试验选择
	fdx	CP009225.1 范围 : 86,395 至 86,475
	fdx-RsE (RbE)	CP009225.1 范围 : 86,395 至 86,458 和 riboswitch E GGTGATACCAGCATCGTCTTGATGCCCTTGGCAGCACCTGCT AAGGAGGCAACAA (Topp S et al., 2010; SEQ ID NO: 64)
	fdx13	CP009225.1 范围 : 86395 至 86458. RBS 和间隔区域 (16 bp 来自ATG起始密码子) 试验选择
	fdx14	CP009225.1 范围 : 86395 至 86458. RBS 和间隔区域 (16 bp 来自ATG起始密码子) 试验选择
		bgaR-bgaL
信号序列	nprM3	CP009225.1 范围 : 1,611,069 至 1,611,143
	nprM4	CP009225.1 范围 : 1,612,928 至 1,6113,002
	cstA1	CP009225.1 范围 : 647,832 至 647,900
	nprM2	CP009225.1 范围 : 1,614,791 至 1,614,865
	SH3	CP009225.1 范围 : 599,142 至 599,234
终止子	T1	CP035785.1 范围 : 1029153 至 1029229
	T2	AE015927.1 范围 : 1499755 至 1499840
	T3	CP042184.1 范围 : 3601746 至 3601788
	T4	M11214.1 范围 : 354 至 395

[0125] 表8所示为克隆pPM-1nn质粒和基因以产生不同的CLOSTRA基因型。

[0126] 表8

[0127]

质粒名称	HetSeq ⁿ	CLOSTRA 菌株 [基因型]	特征	实施例
pPME-101	PM-CB 序列 Tag (BM1)	CLOSTRA-A1 [<i>C.sporogenes</i> - Δ (<i>sagA-sagJ</i>)::PM-CB]	删除Sag操纵子 Δ (<i>sagA-sagJ</i>) 和在Sag 操纵子处插入PM-CB 序列标签 (BM1)	Ex. 1
pPME-102	<i>Pthl14- yfkO</i>	CLOSTRA-T01 [<i>C.sporogenes</i> - Δ (<i>treB-treR</i>)::(<i>Pthl14-yfkO</i>)]	删除海藻糖操纵子 Δ (<i>treB-treR</i>) 和插入由 <i>thl14</i> 启动子控制的 <i>yfkO</i> 基因	Ex. 2
pPME-103	<i>Pfdx- nprM3- mIL2</i>	CLOSTRA-T02 [<i>C.sporogenes</i> - Δ <i>pyrE</i> ::(<i>Pfdx-nprM3- mIL2</i>)]	删除 <i>pyrE</i> 基因 (Δ <i>pyrE</i>) 并插入由 <i>Pfdx-nprM3</i> (启动子-信号序列) 控制的 <i>mIL2</i> (白细胞介 素2)	Ex. 2
pPME-104	(<i>PbgaR- PbgaL</i>)- <i>bgaR</i>	CLOSTRA-S1A1 [<i>C.sporogenes</i> -- Δ (<i>sagA- sagJ</i>)::PM-CB- Δ <i>Pspo0A</i> :: (<i>PbgaR-PbgaL-BgaR</i>)]	删除Sag操纵子 Δ (<i>sagA-sagJ</i>) 并插入 PM-CB序列标签 (在Sag 操纵子处的BM1), 以及删除 <i>spo0A</i> 启动子 (Δ <i>Pspo0A</i>) 并在 <i>PbgaR-PbgaL</i> 发散启动子 控制下插入 <i>BgaR</i> 基因	Ex. 3
pPME-105	BM2 序列 tag	CLOSTRA-A2	删除 <i>pyrE</i> 基因 Δ <i>pyrE</i> 并在CLOSTRA-A1 中 <i>pyrE</i> 基因座处插入 BM2序列标签 (溶血 缺陷型菌株)	Ex. 4
pPME-106	(<i>PbgaR- PbgaL- RbE</i>)- <i>bgaR</i>	CLOSTRA-S2A2 [<i>C.sporogenes</i> -- Δ (<i>sagA- sagJ</i>)::PM-CB- Δ <i>Pspo0A</i> :: (<i>PbgaR-PbgaL-BgaR</i>)] (全 <i>BgaR-bglA-RbE</i> 序列 SEQ ID NO:60)	删除组成型 <i>Spo0A</i> 启动子 (Δ <i>Pspo0A</i>) 并在 <i>PbgaR-PbgaL-RbE</i> 启动子控制下插入 <i>BgaR</i> 基因, 其中茶碱诱导性 核糖开关在CLOSTRA-A2 菌株 (<i>pyrE</i> 和Sag-阴性)	Ex. 4

[0128] 将大肠杆菌宿主的pPME-100衍生质粒转化为CLOSTRA菌株。根据制造商的说明,质粒DNA被转化到商业上获得的(Invitrogen)和具有化学活性的一次性TOPIO大肠杆菌细胞以及结合供体大肠杆菌S17-1中。随后,使用对先前描述的方案的修饰将示例性pPM-1nn质粒(例如pPME-100衍生质粒,为pPM-LNH或pPM-1nn)引入CLOSTRA(Purdy et.al.,2002)。简而言之,从1ml过夜培养的大肠杆菌S17-1供体中收获的细胞在1ml PBS中洗涤,并以5000rpm离心1分钟。将颗粒小心地重新悬浮在200 μ l CLOSTRA菌株中(之前在厌氧培养箱中

过夜)。将供体和受体细胞的混合物点在普通BFM平板上,并在37°C的厌氧条件下培养6-7小时。最后,用无菌环收集接合细胞,并将其重新悬浮在0.5ml无菌厌氧PBS中,并以适当的稀释液接种在适当的选择性培养基上(含甲砒霉素)。通过添加D-环丝氨酸(250 μ l/ml)反选大肠杆菌供体。

[0129] CRISPR-Cas9突变-CLOSTRA衍生菌株的选择。利用pPM-1nn载体的CRISPR-Cas9突变通过所公开的图中示意性显示的机制发生。如上所述,通过与大肠杆菌S17-1供体接合,将pPM-1nn载体转移至CLOSTRA菌株。甲砒霉素耐药的跨结合菌落在24-48小时内出现,并收获到含有10%甘油的1ml BFM培养基中。将100 μ l收获的转结合文库接种到5ml新鲜BFM肉汤中,培养48小时以促进质粒的丢失。此外,48小时培养物在PBS中连续稀释,并在非选择性平板上接种,以获得单个菌落。培养24小时后,将得到的单个菌落用作菌落PCR筛选的模板。根据制造商的说明(Thermoscientific, K1081),使用2xDreamTaq Green PCR主混合物。通过对编辑模板序列两侧的染色体区域进行引物对退火,确认所需的突变(表3)。质粒特异性引物也用于确认突变菌株中pPME-100衍生质粒的丢失。琼脂糖凝胶电泳分离菌落PCR产物。

[0130] 红细胞分解的定量分析。对CLOSTRA-A1菌株进行公布的全血分析(Totten PA et al., 1995)。简言之,将200 μ l PBS洗涤培养物在含有20 μ l全血的96孔培养皿中培养1小时。然后离心平板(200x g, 10分钟),并将上清液转移到新的无菌96孔平板上。在OD₅₄₀处测量血红蛋白释放。产孢梭状芽胞杆菌NCIMB10696野生型(CLOSTRA)和B型链球菌菌株用作对照。

[0131] 活体动物定植研究。将小鼠结直肠CT26癌细胞皮下注射到成年免疫活性BALB/c小鼠体内。每周使用游标卡尺测量三次肿瘤体积。当肿瘤体积达到约300mm³时,给予100 μ l的1x10⁷纯孢子悬浮液或载体(PBS)。在随访期结束时,测定肿瘤、全血和正常组织(淋巴结和脾脏)中的定植水平。为了测定营养细胞(V)的水平,所有样品在厌氧室中连续在PBS中稀释,并在BFM琼脂平板上电镀,添加D-环丝氨酸。为了评估内孢子的水平,在稀释和电镀之前,将所有组织样品短暂旋转并进行热处理(80°C, 20分钟)。所有平板均培养24小时,然后进行菌落计数(CFU/ml值)。

[0132] 结果

[0133] 本文提出的一般策略,即通过构建、引入CLOSTRA并基于图3A所述模板载体pPM-1nn对一系列质粒进行生物学验证,来对示例性CLOSTRA菌株(如图2所总结)进行遗传修饰。该载体的特征在于本文所述的DNA盒为Clostra盒,由三种主要元件(F1、F2和F3)形成,其中,通过同源重组将DNA序列元件引入CLOSTRA基因组(即,用作标记或驱动进一步修饰的非编码序列,或编码酶、药物、标签序列或调控序列(如组成型或诱导型启动子)的序列)与编码调控和转录DNA的DNA一起克隆在特定CLOSTRA Locusⁿ进行CRISPR/Cas9基因组修饰所需的序列(图3B)。在Clostra盒中克隆的元件中,F3包含pPM-1nn质粒中最可变的序列,因为它是由整合在CLOSTRA基因组(HetSeqⁿ)中的异源序列形成的,CLOSTRA基因组(HetSeq)是在指导HetSeqⁿ在特定Locusⁿ(LHA和RHA)整合的序列之间克隆的。HetSeqⁿ的性质和用途可区分pPM-1nn质粒的两大类别(图4A):那些旨在修饰孢子形成基因的调节区,使其根据特定用途和要求(pPM-1nnS)以及旨在修饰、替代或删除任何其他类型的基因座的基因(或基因间序列),全部或部分位于编码区或非编码区(pPM-1nnH)水平。组合选择HetSeqⁿ、Locusⁿ和LHA/RHA序列、以及连续使用pPM-1nnH和pPM-1nnS质粒(其中组装Clostra盒)来修饰CLOSTRA基因组,定义CLOSTRA衍生菌株的相关表型和功能特征,以供将来选择、生产和使用

CLOSTRA衍生产品(图4B)。

[0134] 作为第一步,通过使用独特的限制性位点,以适当的顺序和方向顺序克隆Clostra盒元件,并适合生成所需的pPM-1nnS和pPM-1nnH质粒,设计并生成示例性pPME-100质粒模板(图5A)。为了生成示例性CLOSTRA-A1,将标签序列(通常称为PM-CB,以序列BM1为例,在其他质粒中,以BM2为例)克隆到pPME-101质粒(pPM-LNH质粒)中,该序列之间的序列允许其在Sag操纵子内使用CRISPR/Cas9方法通过同源重组整合,使操纵子在CLOSTRA-A1中失活(图5B)。当使用pPME-101质粒用于修饰产孢梭状芽胞杆菌时,菌株NCIMB 10696作为示例性CLOSTRA,可以使用不同的PCR扩增策略筛选所得克隆,以鉴别呈现所需DNA修饰的克隆,即sag操纵子的缺失以及由此导致的溶血活性的功能丧失(图6A和图6B)。随后,使用标准体外溶血试验对其中一个CLOSTRA-A1克隆进行验证,确认与阳性和阴性对照相比,CLOSTRA-A1不具有这种活性(图7A和图7B)。还对CLOSTRA-A1进行产孢和体内定位特性测试,确认从CLOSTRA-A1获得的孢子可以在呈现CLOSTRA-A1定植的实体瘤的动物模型中产生和静脉注射,其中发现CLOSTRA-A1为营养细胞或孢子(图8A和图8B)。

[0135] 因此,示例性CLOSTRA-A1的基因组可通过使用pPM-1nn基质粒进一步修饰,其中克隆另一个FletSeqⁿ序列,然后结合CLOSTRA-A1的非溶血表型转移为特异性功能和/或调节,特别是关于条件性孢子形成(使用pPM-1nnS质粒)和/或外源编码序列的表达(使用另外pPM-1nnH质粒)。而且,选择产孢梭状芽胞杆菌,菌株可有助于结合其他特征,例如基于释放的代谢物,如具有神经保护或免疫球蛋白A调节活性的代谢物。

[0136] 实施例2:用于产生表达外源酶(CLOSTRA-T01)或细胞因子(CLOSTRA-T02)的示范性梭状杆菌菌株的Clostra盒和pPME-100衍生质粒的制备以及CLOSTRA-T01和CLOSTRA-T02克隆的初步验证

[0137] 材料和方法

[0138] 质粒构建和验证。实施例1的材料和方法总结克隆策略、引物、pPME-102和pPME-103质粒中包含的序列、以及它们用于生成和确认CLOSTRA衍生菌株CLOSTRA-T01和CLOSTRA-T02中正确的序列整合。

[0139] 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。聚丙烯酰胺凝胶。使用Invitrogen NuPAGE[®]缓冲液和试剂进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白质样品(细胞裂解物)与4x浓缩的Invitrogen加载缓冲液(混合有400mM二硫苏糖醇(DTT))混合。样品在100℃的加热块中变性5分钟,然后与Precision Plus Protein Standard[™] All Blue(Bio-Rad)一起加载到Invitrogen 4-12%NuPage凝胶中。蛋白凝胶在150V下在1x MES Invitrogen缓冲液中电泳60分钟。凝胶用dH₂O彻底冲洗,并且考马斯蓝染色剂(50%甲醇,10%乙酸,0.05%亮蓝R-250)在室温下摇动托盘中染色1小时,并用去污溶液(50%甲醇,40%dH₂O,10%乙酸)清洗1-3小时。

[0140] 硝基还原酶活性的定量CLOSTRA和CLOSTRA-T01菌株的7小时细胞裂解物按照制造商的建议(Novagen,用户协议TB245 Rev.F 1108),使用BugBuster试剂(Novagen Milipore,70584)制备一式三份。甲萘醌还原酶活性的测定如上所述(Knox R et I., 1988)。已知属于硝基还原酶家族的酶具有甲萘醌还原酶活性。硝基还原酶催化NADPH将甲萘醌还原为甲萘醌,甲萘醌非酶促还原细胞色素C,从而形成 $\lambda=550\text{nm}$ 的“红-粉”色。在37℃的分光光度计上进行分析。在含有780 μl 预热分析缓冲液(10mM Tris-HCl,pH 7.5)的石英试管中,添加以下溶液:10 μl 的1mM甲萘醌在二甲基亚砜中,100 μl 的10mM NADH和100 μl 的

700 μ M牛细胞色素C。立即混合反应杯内容物,添加10 μ l的细胞裂解物并再次混合。通过在 $\lambda = 550\text{nm}$ 处测量吸光度增加30s来记录酶反应。使用以下方程式计算每毫升硝基还原酶活性的单位:

$$[0141] \quad U/ml = \frac{((\Delta A550/min))/ml}{14.79} \quad \text{其中 } (\Delta A550/min) \text{ 指示每分钟 } A_{550} \text{ 的增加量。}$$

[0142] 使用单向或双向RM ANOVA方差分析,在GraphPad Prism中对甲萘醌含量进行统计分析。

[0143] CTLL-2细胞增殖试验。CTLL-2指示细胞系(小鼠C57b1/6T细胞)从ECACC细胞培养物收集(目录号93042610)中获得。细胞在添加10%FBS(胎牛血清)和10%T-STIM(T细胞培养补充物)的RPMI培养基中培养。在10-14天不受干扰的生长后,维持细胞系并在5%CO₂、37 $^{\circ}$ C下培养。最后,用0.4%台盼蓝染色细胞样品以评估细胞活力。当获得令人满意的活性时,通过离心(200x g)获得细胞培养物,并在RPMI-1640中洗涤三次。再次使用0.4%台盼蓝染色评估细胞活性,并在显微镜下在血细胞计数室中计数细胞。最后,将细胞重新悬浮在密度为3x10⁵细胞/毫升的培养基中。

[0144] 将CLOSTRA-T02和CLOSTRA(产孢梭状芽胞杆菌对照菌株)划线并接种于10ml新鲜BFM培养基中,一式三份。在7小时的生长期后,从所有菌株中获得1ml样品。将样品向下旋转,并使用0.22 μ m过滤器和注射器过滤上清液。为了进行测定,向96孔板的每个孔中添加100 μ l培养基(RPMI-1640+10%FBS)。将样品和标准品添加到96孔板中,从第2行到第12行进行2倍的连续稀释,使第1行为空。以重组小鼠白细胞介素-2(#IL031 Sigma)为标准。制备IL-2标准品的工作浓度(40ng/ml),测定范围包括第2行10ng/ml至第12行0.0097ng/ml。向每个孔中添加100 μ l洗涤的CTLL-2细胞(3x10⁵细胞/ml)。平板在5%CO₂下培养48小时;37 $^{\circ}$ C,在加湿培养箱中。向每个孔中添加10 μ l的5mg/ml MTT溶液,并将平板再培养4小时。然后将50 μ l的溶解溶液(20%SDS和50%DMF)添加到平板中并培养过夜。第二天在570nm处对分析板进行分光光度测量。根据生成的小鼠IL2标准曲线计算分析的最终结果。

[0145] Western印迹:根据文献(Schwarz K et al.,2007)和制造商的说明,使用抗FLAG抗体在培养上清的DOC-TCA沉淀部分进行Western印迹,证实CLOSTRA-T02中分泌IL-2蛋白。根据制造商的说明,通过细胞因子特异性ELISA法(Invitrogen,目录号BMS601)测定CLOSTRA-T02在7小时培养上清中分泌的IL-2水平。结果记录在微孔板阅读器(BMG Labtech SPECTROstar Omega)中,并根据重组IL2标准进行计算。

[0146] 结果

[0147] pPME-100衍生质粒中Clostra盒的模块化结构允许产生替代pPM-1nn质粒(pPM-1nnH或pPM-1nnS质粒),该质粒可用于整合来自Clostra Locusⁿ内人类或其他基因组来源的HetSeqⁿ,这样,修饰后的克隆就可以作为筛选和选择可行CLOSTRA-T克隆(或进一步的衍生物,包括CLOSTRA-AT、CLOSTRA-ST或CLOSTRA-SAT)的标记,这些可以根据任何适用的用途或制造要求进行正确修饰。

[0148] 作为第一代表性CLOSTRA-T模型,硝基还原酶(可以将前体药物激活为抗癌药物的酶)的DNA编码被克隆到pPME-102质粒(即pPM-1nnH质粒)中,以及LHA和RHA序列之间的功能启动子,从而允许使用pPM-1nnH质粒将该序列模块整合到CLOSTRA海藻糖操纵子中(图9A)。

这种替代使产生的阳性克隆也具有海藻糖阴性,因此可以在引入非梭状杆菌酶序列和活性的同时,对其进行筛选和选择。除确认引入的硝基还原酶活性(图9D)外,还在DNA(图9B)和蛋白质(图9C)水平上获得和验证用于该CLOSTRA衍生菌株的CLOSTRA克隆的组,本文称为CLOSTRA-T01。

[0149] 作为第二代表性CLOSTRA-T模型,细胞因子(具有免疫调节和抗癌活性的蛋白质)的DNA编码被克隆到pPME-103质粒中,以及LHA和RHA序列之间的功能启动子,从而允许将该序列模块整合到CLOSTRA-0rotate磷酸核糖转移酶基因中(图10A)。这种替代使得产生的阳性克隆无法将核糖磷酸基团从5-磷酸核糖1-二磷酸转移到乳清酸,并产生乳清酸单磷酸(OMP),因此,它们可以与细胞因子序列和活性同时进行筛选和选择,成为尿嘧啶营养缺陷突变株。除了确认IL2特异性细胞因子活性(图10C)和分泌活性(图10D)外,还在DNA(图10B)和蛋白质(图10B)水平上获得和验证用于该CLOSTRA衍生菌株的克隆的组,本文称为CLOSTRA-T02。

[0150] 因此,可以通过使用基于pPM-1nn的质粒(例如,基于pPME-100质粒格式的pPM-LNH质粒)另外修饰这些示例性各自CLOSTRA-T菌株的基因组,例如通过使用pPME-101质粒克隆另外HetSeqⁿ序列,以便具有临床和/或工业用途的蛋白质可以有利地与CLOSTRA-A1的非溶血表型组合特异表达(产生CLOSTRA-A1T菌株)。或者,也可以通过使用基于pPME-102或pPME-103质粒设计的pPM-1nnH来生成这种CLOSTRA-A1T菌株,以实施例1中所述的方式修饰CLOSTRA-A菌株。

[0151] 实施例3:用于产生结合非溶血性和条件性产孢特性的示范性梭状杆菌菌株(CLOSTRA-S1A1)的Clostra盒的制备和CLOSTRA-S1A1克隆的初步验证

[0152] 材料和方法

[0153] CLOSTRA-S1A1菌株的产生。合成乳糖诱导启动子bgaR-bgaL(Thermo Fisher Scientific),使用指定的寡核苷酸扩增,并与HC(同源盒)连接以生成pPME-103质粒。CLOSTRA-A1菌株被用作携带pPME-103质粒的S17-1大肠杆菌菌株的受体,并引入控制spo0A基因的可诱导启动子。遵循CRISPR/Cas9和序列验证协议,如代表性实施例1所示的材料和方法所述。该方法不仅可用于产生CLOSTRA-S1菌株(从未修饰的CLOSTRA开始),还可用于产生相应的CLOSTRA-S2和CLOSTRA-S2A1,其中可诱导启动子利用克隆策略、引物、序列(也在实施例1的材料和方法中概述)控制spo11AA基因。

[0154] 耐热CFU的研制。如前面实施例所述,进行孢子形成试验,旨在评估耐热CFU在5天内的发育情况。简而言之,孢子形成培养物(CLOSTRA-S1A1)在BFM肉汤(添加和不添加1mM IPTG)中培养三次,共培养5天。CLOSTRA对照菌株在BFM肉汤中培养,不添加1mM IPTG。在试验过程中,在样品培养0、24、48、72、96和120小时后,对300 μ l样品进行试验。在每个时间点,将样品快速旋转并进行热处理(80 $^{\circ}$ C,20分钟)。孵育后,将各样品在PBS中从100连续稀释至10⁻⁷;在BFM琼脂平板上发现每个稀释液的三份20 μ l等份。24-48小时后,观察和计数菌落,并测定CFU/ml值。光学显微镜和文献也证实这些高滴度孢子制剂的纯度和质量(Yang WW et al.,2009)。

[0155] 结果

[0156] 通过引入将具有正常产孢活性的CLOSTRA-A1转化为具有条件性产孢活性的CLOSTRA菌株的序列,获得关于Clostra盒的模块化结构如何允许产生替代pPM-1nn(pPM-

lnnH和pPM-1nnS)质粒的额外证据,这些质粒可用于整合来源于Clostra Locusⁿ内的人类或其他基因组的HetSeqⁿ表型,可用于有利地调节和控制产生的CLOSTRA-S1A1细胞和CLOSTRA-S1A1S孢子的使用的特性。

[0157] 因此,在含有两种乳糖操作子的发散启动子(PbgaR:PbgaL)的控制下,将含有bgaR转录调节器的DNA序列克隆到LHA和RFIA序列之间的pPME-104质粒中,这允许用序列替代内源性spo0A启动子(Pspo0A),该序列使spo0A表达(从而形成孢子)可由乳糖等化合物诱导(图11A)。该系统有益于使产生的阳性克隆的复制更加可控,因为根据具体用途可能需要此功能。通过使用pPME-104对CLOSTRA-A1克隆进行修饰,获得了一组克隆,本文称为CLOSTRA-S1A1,并在DNA和功能水平上进行验证,尤其是通过使用IPTG作为CLOSTRA-S1A1中的孢子形成诱导剂,其显示出与原CLOSTRA相当的孢子形成特性(图11B)。这种方法可以使用替代克隆策略应用,其中CLOSTRA-SA菌株基因组中的其他CLOSTRA基因组合以协调一致的方式被灭活或删除,从而提高其安全性并提供易用性,同时保持制造、管理、或使用CLOSTRA衍生产品。

[0158] 本文所述的这一和先前的示例有效地展示了如何分别生产和使用当前公开的CLOSTRA和CLOSTRA衍生菌株以及Clostra盒,或者以专门适合的组合替代,以供工业和临床使用。例如,本文中的CLOSTRA-SA基因组可用作整合HetSeqⁿ的平台具有临床和/或工业用途的额外活性的蛋白质的序列编码,如上述公开的CLOSTRA-T菌株所表达的蛋白质。可以生成CLOSTRA-SA菌株的组,其中非溶血表型已经与条件性、可诱导的产孢特征相结合,并且相应的CLOSTRA-SATS孢子前分离和CLOSTRA-SATF制剂可以按照预期目标以高度受控的方式制造和使用,避免任何可归因于梭状杆菌菌株和各自孢子的不良生物特性,如文献中所述。

[0159] 如图12所示,可通过使用pPME-102或pPME-103质粒构建物来修饰瞬时CLOSTRA-S1A1菌株或以其他方式使其适应工业或临床目的,从而分别产生前药转化酶或细胞因子,结合相应细胞培养中的条件性孢子形成表型(为了制造或其他合适的目的而诱导或抑制孢子形成)、孢子制剂和孢子制剂。事实上,每当考虑对受试者(包括人类受试者)施用CLOSTRA-SATF制剂时,此类制剂缺乏溶血活性提供了评估替代给药途径、剂量和方案的可能性,尤其是当需要或首选静脉给药时,和/或其他药物组合物或药物治疗也被共同施用或以其他方式作为联合治疗方案的一部分。科学文献提供了有关方案的更多详细信息,这些方案有助于评估CLOSTRA-SATF和其他CLOSTRA衍生产物治疗癌症的安全性、耐受性和任何不良影响,例如通过测试临床前模型和调整涉及基因工程细菌的先前临床研究的设计,尤其是梭菌孢子在肿瘤治疗中的潜力(Torres W et al,2018;Kubiak AM and Minton NP,2015)。

[0160] 根据本发明公开的策略可有效地应用于产孢梭状芽胞杆菌和其他梭状芽胞杆菌物种,其中消除溶血活性是有益的。事实上,其他不具有这种活性的梭状芽胞杆菌物种(如丁酸梭状芽胞杆菌)可被开发为CLOSTRA,其基因组使用pPM-1nnS质粒进行修饰,以在核糖开关、RNA聚合酶诱导和/或糖诱导系统的控制下呈现条件性孢子形成。然后,可使用pPM-1nnH质粒将产生的CLOSTRA-S菌株直接修饰为CLOSTRA-ST菌株,以便在全身给药和肿瘤定植后,或在口服给药后,局部在胃肠道中,有利地输送治疗剂。施用CLOSTRA衍生产物,尤其是那些允许体内表达和服用酶、细胞因子和其他基于蛋白质的治疗产品(如图12所示的IL2和yfk0硝基还原酶),添加或不添加与营养缺陷型特征相关的其他特征,这些特征是由于使

用pPM-1nnH质粒构建克隆衍生菌株(删除或钝化代谢或酶活性,例如,PyrE或海藻糖操纵子)而产生的。

[0161] 实施例4:用于产生结合非溶血性、尿嘧啶营养不良性和条件性产孢特性的示范性梭状杆菌菌株(CLOSTRA-S3A2和CLOSTRA-S4A2)的Clostra盒的制备以及CLOSTRA-S2A2和CLOSTRA-S3A2克隆的初步验证

[0162] 材料和方法

[0163] CLOSTRA-A2、CLOSTRA-S3A2和CLOSTRA-S4A2菌株的产生和验证。遵循CRISPR/Cas9和序列验证协议,如代表性实施例1所示的材料和方法所述。CLOSTRA-A1已被pPME-105质粒修饰,以创建尿嘧啶营养缺陷型菌株。与乳清酸磷酸核糖转移酶PyrE基因相对应的576bp的上游区域的33bp已使用指定的寡核苷酸扩增,并与F3元件连接以生成pPME-105。CLOSTRA-A1菌株被用作携带pPME-105载体的S17-1菌株的受体,该菌株已被BM2序列替换以生成CLOSTRA-A2菌株,并可用于CLOSTRA-A2菌株和任何进一步衍生菌株的唯一识别和检测。CLOSTRA-S2A2和CLOSTRA-S3A2在添加或不添加2mM乳糖和5mM茶碱的情况下培养。CLOSTRA-A2仅在规定的培养基中添加20 μ l/ml的尿嘧啶溶液。如文献所述,已制备明确的梭状杆菌生长培养基(Lovitt RW et al.,1987)。在厌氧柜中预还原添加和不添加尿嘧啶(最终浓度为20 μ g/ml)的琼脂平板。菌株:对CLOSTRA-A1和CLOSTRA-A2进行划线,并在厌氧条件下培养48小时,以检测其生长情况。

[0164] 结果

[0165] pPME-100衍生质粒系列中Clostra盒的模块化结构可用于根据特定要求组合CLOSTRA衍生菌株Locusⁿ内序列的删除、替换和/或添加。例如,pPME-103质粒可以通过将用作HetSeqⁿ的m1L2序列替换为克隆于用于在CLOSTRA中靶向PyrE基因的LHA和RHA序列之间的标记序列(或可促进随后修饰的序列)来修饰。所得pPM-1nnH(pPME-105质粒)可以用于修饰CLOSTRA-A1,以及由此获得的CLOSTRA衍生菌株(CLOSTRA-A2)可以用作从其他pPM-1nnH和/或pPM-1nnS质粒引入任何其他HetSeqⁿ的平台(图13A)。该CLOSTRA-A2的构建已在DNA(图13B)和生物学、功能(图13C)水平上进行了探索和验证,证实CLOSTRA衍生菌株除了是非溶血性突变体外,也是尿嘧啶营养缺陷型突变体。

[0166] 在CLOSTRA衍生菌株中获得更严格的孢子形成调节的另一个示例方法是,将基于茶碱的核糖开关整合到先前描述的可诱导启动子系统中,并在pPME-104质粒中克隆为HetSeqⁿ(图14A)。该序列可用于生成pPME-104质粒的两种衍生物:pPME-106质粒触发整合改良的孢子形成调节序列以控制Spo0A表达,而pPME-107质粒触发这种整合以控制另外重要的孢子形成基因Spo11AA。当这两种质粒用于修饰CLOSTRA-A2时,产生的CLOSTRA-S3A2(图14B)和CLOSTRA-S4A2(图14C)在引入任何进一步的HetSeqⁿ之前,有利地结合选择和孢子形成控制特征,例如,编码抗体、抗原、细胞因子、酶或生长因子等异源蛋白质的蛋白质。在正确的DNA整合水平(图15A)和孢子形成控制水平上生成并验证示例性CLOSTRA-S3A2和CLOSTRA-S4A2,在没有乳糖和茶碱联合诱导的情况下,孢子形成受到了特别好的抑制(图15B)。事实上,当与进一步修饰的CLOSTRA-S3A2T和CLOSTRA-S4A2T菌株中的治疗性(例如抗癌)蛋白的表达相结合时,CLOSTRA-S3A2和CLOSTRA-S4A2中的营养缺陷型特征提供可在营养缺陷型特征有利于定位的组织中施用的CLOSTRA衍生菌株和CLOSTRA衍生产品,CLOSTRA衍生菌株的体内增殖,而不在其他组织中定植或分散孢子。在PyrE基因丢失或替换的情况

下,通过瘤内注射或其他适当注射从CLOSTRA-S3A2T和CLOSTRA-S4A2T获得的孢子,不仅可以在暴露于缺氧条件下(无进一步的孢子形成事件)后特异性驱动并增殖到肿瘤中,但与其他组织中的尿嘧啶浓度相比,这些部位的尿嘧啶浓度更高。

[0167] 利用CLOSTRA-A2的特征来产生表达一种或多种治疗性蛋白质的CLOSTRA衍生菌株(有或无孢子形成过程的控制)的示例性方法可以通过使用pPME-108质粒将IL2(白细胞介素2)基因整合到另外Locusⁿ如海藻糖操纵子来举例说明,pPME-108质粒是pPME-102的衍生物(图16A)。或者,可以通过使用pPME-109和pPME-110质粒在已经修饰的Locusⁿ内引入IL2来修饰CLOSTRA-A2,具有(图16B)或不具有(图16C)通过利用基因spo0A或spol1AA控制孢子形成过程。

[0168] 参考文献

[0169] Agrawal S and Kandimalla E,2019.Immuno-Oncol Tech.3:15-23.Al-Hinai M et al.,2015.Microbiol Mol Biol Rev.79:19-37.

[0170] Alexaki A.,et al.,2019.J Mol Biol,431:2434-2441

[0171] Atmadjaja A et al.2019.FEMS Microbiol Lett.366:fnz059.

[0172] Banjeree A et al.,2014.Appl Environ Microbiol.80:2410-2416.Bannam TL et al.,1995.Mol Microbiol.16:535-51.

[0173] Bruder M et al.,2016.Appl Environ Microbiol.82:6109-6119.Canadas I et al.,2019.ACS Synth Biol.8:1379-1390.

[0174] Collins ME et al.,1985.J Gen Microbiol.131:2097-105.

[0175] Cooksley CM et al.,2010.Appl Environ Microbiol.76:4448-60.Corralliza-Gorjon I et al.,2017.Front Immunol.8:1804.

[0176] Cruz-Morales P et al.,2019.Genome Biol.Evol.11(7):2035.

[0177] Cui W et al.,2016.Microb Cell Fact.15:199.

[0178] Dembek M et al.,2017.Front Microbiol.8:1793.

[0179] Diallo M et al.,2019.Methods.S1046-2023:30090-8.

[0180] Dong H et al.,2012.Metab Engin.14:59-67.

[0181] Ehsaan M et al.,2016.Biotechnol Biofuel.9:4.

[0182] Eleneen Y and Colen RR,2017.Adv Exp Med Biol.995:141-153.Emptage CD et al.2009.Biochem Pharmacol.77(1):21-9.

[0183] Foulquier C et al.,2019.Biotechnol Biofuel.12:31.

[0184] Gao W et al.,2004.Biotechnol Prog.20:443-8.

[0185] Groot AJ et al.,2007.Biochem Biophys Res Commun.364:985-9.Grote A et al.,2005.Nucleic Acids Res.33:W526-31.

[0186] Hamada Y,2017.Bioorg Med Chem Lett.27:1627-1632.

[0187] Hartman AH et al.,2011.Appl Environ Microbiol.77:471-8.

[0188] Heap J et al.,2009.J Microbiol Methods.78:79-85.

[0189] Heap J et al.,2014.Oncotarget.5:1761-9.

[0190] Huang H et al.,2016.ACS Synth.Biol.12:1355-1361

[0191] Ingle P et al.,2019.Sci Rep.9:8123.

- [0192] Jinek M et al.,2012.Science.2012337:816-21.
- [0193] Joseph R et al.,2018.Front.Microbiol.9:154.
- [0194] Knox R et I.,1988.Biochem Pharmacol.37:4671-7.
- [0195] Kubiak AM and Minton NP,2015.Res Microbiol.66:244-54.
- [0196] Kubiak AM et al.,2015.Genome Announc.3:e00942-15.
- [0197] Kwon SW et al.,2020.Front Bioeng Biotechnol.8:282.
- [0198] Lovitt RW et al.,1987.J Appl Bacteriol.62:81-92.
- [0199] McAllister KN,and Sorg JA,2019.J Bacteriol.201:e00219-19.
- [0200] Minton N and Morris J,1981.J Gen Microbiol.127:325-331.
- [0201] Minton N et al.,2016.Anaerobe 41:104-112.
- [0202] Mowday I et al.2016.Cancers.8:63.
- [0203] Nariya H et al.,2011.Appl Environ Microbiol.77:8439-41.
- [0204] Ni G et al.,2019.Biomed Res Int.2019:1395138.
- [0205] Nora L et al.,2019.Biotechnol Adv.3:107433.
- [0206] Purdy D et al.,2002.Mol Microbiol.46:439-52.
- [0207] Pyne M et al.,2016.Sci Rep.6:25666.
- [0208] Rautio J et al.,2018.Nat Rev Drug Discov.17:559-587.
- [0209] Rossi S et al.,2017.Eur J Nucl Med Mol Imaging.44:2310-2325.
- [0210] Schwarz K et al.,2007.J Microbiol Methods.68:396-402.
- [0211] Shen S et al.,2019 Microbiol Spectr.7:10.1128/microbiolspec.GPP3-0017-2018.Subbiah V et al.,2017.Diagnostics.7:E10.
- [0212] Tanner R et al.,1981.Current Microbiol.5:35-38.
- [0213] Theys J et al.,2006.British Journal of Cancer.95:1212-1219.
- [0214] Topp S et al.,2010.Appl Environ Microbiol.76:7881-4.
- [0215] Torres W et al.,2018.J Cancer Metastasis Treat.4:4.
- [0216] Totten PA et al.,1995.Infect Immun.63:4409-16.
- [0217] Wang S et al.,2018.Clin Microbiol Infec.24:1095-1099.
- [0218] Wasels F et al.,2017.J Microbiol Methods.140:5-11.
- [0219] Wen Z et al.,2017.Metab Eng.39:38-48.
- [0220] Williams EM et al.,2015.Biochem J.471:131-53.
- [0221] Xin Y et al.,2019.Nat Rev Drug Discov.18:899-90.
- [0222] Yang WW et al.,2009.J Appl Microbiol.106:27-33.
- [0223] Zhang J et al.,2015.Biotechnol Biofuels.8:36.
- [0224] Zhang YL et al.2014.Lett Appl Microbiol.59:580-6.
- [0225] Zhong S et al.,2019.Transl Oncol.13:57-69.

序列表

<110> 埃克斯欧姆尼斯生物技术有限公司

<120> 遗传修饰的梭状杆菌菌株及其用途

<130> 293-001P

<150> EP19 217 672.5

<151> 2019-12-18

<150> US62/949,480

<151> 2019-12-18

<160> 64

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> Cas9-F

<400> 1

tatagcggcc gctcagtcac ctccctagctg actc 34

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> Cas9-R

<400> 2

ccggtctcac aagatggata agaaatactc aataggctta gatatcgg 48

<210> 3

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> Prom-F

<400> 3
ccggtctcat ggtcgtacac tcccttttac tatttaatta tctatg 46

<210> 4
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> sgRNA-R

<400> 4
tatagacgtc ataaaaataa gaagcctgca aatgcaggct tcttattttt ataaaaaag 60
caccgactcg gtgccacttt ttcaagttg 89

<210> 5
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Sag-LHA-F

<400> 5
tatataggtc tcgggaaaat aaagaaggac aagtattgct aaattcttat gatgtag 57

<210> 6
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Sag-LHA-R

<400> 6
tataggtctc gtctctgta accetcaaat ttattatacc taataatcct ttttaattat 60
tttcatgtac ac 72

<210> 7
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<221>
<222>
<223> Sag-RHA-F
<400> 7
tataggtctc ggagatttac acagaggccc ttagtatagt aatattatatt gcagtaagtt 60
tctttattat agg 73
<210> 8
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Sag-RHA-R
<400> 8
tatataggtc tcgtggccca aagttcacta attttaactt taacaagaaa cctg 54
<210> 9
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Sag-SG-R
<400> 9
tatagacgtc ataaaaataa gaagcctgcaaatgcaggct tcttattttt ataaaaaaag 60
caccgactcg gtgccacttt ttcaagttg 89
<210> 10
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Sag-SG-F
<400> 10
tatagtcgac gagttaatcc atctgcagga gtttagagc tagaaatagc aagttaaaat 60
aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgctttt tttataaaaa 120
<210> 11

- <211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> 上游-F(Upstream-F)
<400> 11
tagcatcagg aggaacgaag ataaaggc 28
<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> 结合-R(Junction-R)
<400> 12
accgccacct acactaacac taacgc 26
<210> 13
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> 下游-R(Downstream-R)
<400> 13
ccataaatct ctcaatatgt caaagccatc aagtcc 36
<210> 14
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Tre0-LHA-F
<400> 14
tatagacgtc gataagtcct attattatta aaatttccta taagaaaata ttaatg 56

- <210> 15
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Tre0-LHA-R
<400> 15
ccggtctcgg cagcattttc aactaattta atatctcaa taatattacg g 51
- <210> 16
<211> 49
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Tre0-RHA-F
<400> 16
ccggtctcag atttaaattt gtagaatttg cacgaagaaa ataatactg 49
- <210> 17
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Tre0-RHA-R
<400> 17
tataggcgcg cccaataatt tacaaggtat ttaagataag 40
- <210> 18
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Tre0-SG-R
<400> 18

tatagacgtc ataaaaataa gaagcctgca aatgcaggct tcttattttt ataaaaaaag 60

caccgactcg gtgccacttt ttcaagttg 89

<210> 19

<211> 120

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> Tre0-SG-F

<400> 19

ccgtcgacat acctccacag aacataaggt tttagagcta gaaatagcaa gttaaaataa 60

ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt tataaaaata 120

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> Th114Yfk0-F

<400> 20

ccggtctcac tgccaataga taaaataaag 30

<210> 21

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> Th114Yfk0-R

<400> 21

ccggtctcaa atcataaaaa taagaagcct gcaaatgcag gc 42

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>
<223> CR2-Tre0-F
<400> 22
gacttatttg ggtttattta aactaccccg 30
<210> 23
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> CR2-Tre0-R
<400> 23
tagcattgga cattattggt aagcataaga c 31
<210> 24
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> pyrE-LHA-F
<400> 24
tatagacgtc cctaaagaag gaaataatgg cataagaat 39
<210> 25
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> pyrE-LHA-R
<400> 25
ccggtctcaa ttattaaata attcccetta tttcttctaa agtttgaata cc 52
<210> 26
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<221>
<222>
<223> pyrE-RHA-F
<400> 26
ccggtctcaa tttaaaaata aggagtgtct caaatagat ttaattttg 49
<210> 27
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> pyrE-RHA-R
<400> 27
tataggcgcg ccagttgttc cagatgttga tgtatactgc ttatttg 47
<210> 28
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> mIL2-F
<400> 28
ccggtctcat aatttataaa taaaatcac ctttagagg tgg 43
<210> 29
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> mIL2-R
<400> 29
ccggtctcaa aatttattat ttatcatcat catctttata atcttgagga cttg 54
<210> 30
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221>
<222>
<223> pyrE-SG-R
<400> 30
tatagacgtc ataaaaataa gaagcctgca aatgcaggct tcttattttt ataaaaaag 60
caccgactcg gtgccacttt ttcaagttg 89
<210> 31
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> pyrE-SG-F
<400> 31
tagtcgacat agtaggacca gctatgggggt ttagagcta gaaatagcaa gttaaaataa 60
ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt tataaaaata 120
<210> 32
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> pyrE-ChR-R
<400> 32
ggagatatat aatgcttcaa gtaaatttat gtggtaag 38
<210> 33
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> pyrE-ChR-F
<400> 33
ctccccataa ataatcttgt tttgacgcta atatagc 37
<210> 34

<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Lspo-LHA-F
<400> 34
ccgacgtcga aattgtgaag gaaaagactt aaaaatagtg gcttatag 48
<210> 35
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Lspo-LHA-R
<400> 35
ccggtctcag gtcttaatta ttatctaata ttccagcatc ctttagcatc 50
<210> 36
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Lspo-RHA-F
<400> 36
ccggtctcaa tggaagaaac aaagatcaat gttatcattg c 41
<210> 37
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Lspo-RHA-R
<400> 37
taggcgcgcc ctttccatta tttatagtat acccaaatat attgtttata g 51

<210> 38
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> bgaRL-F
<400> 38
ccggtctcac tgccaataga taaaataaag tctgcc 36
<210> 39
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> bgaRL-R
<400> 39
ccggtctcac cattttaccc tccaatata tttaaataa ttatgtattc atg 53
<210> 40
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> LSp0A-SG-R
<400> 40
tatagacgtc ataaaaataa gaagcctgca aatgcaggct tcttattttt ataaaaaag 60
caccgactcg gtgccacttt ttcaagttg 89
<210> 41
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> LSp0A-SG-F

<400> 41
tagtcgacgt acaactcctt tgcactggt ttagagcta gaaatagcaa gttaaataa 60
ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt tataaaaata 120

<210> 42
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> spo0A-Chr-R2

<400> 42
cctgcagctg tatccggtat acaaatagga gatag 35

<210> 43
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> spo0A-Chr-F2

<400> 43
ggtcattttt aggtttattc ccgtagacc 29

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> pCB102-F

<400> 44
gcaaaaataca ttcgttgatg 20

<210> 45
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>

<222>
<223> pCB102-R
<400> 45
ctttatttat gatttcatac ttgac 25
<210> 46
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> BM1
<400> 46
gttaacagag atttacacag agg 23
<210> 47
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> BM2
<400> 47
gcagccctcc actcccatgg agg 23
<210> 48
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> pyrE-BM2-LHA
<400> 48
ccggtctcac tgcttaaata attcccetta tttcttctaa agtttg 46
<210> 49
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<221>
<222>
<223> pyrE-BM2-RHA
<400> 49
ccggtctcag cagccctcca ctcccatgga ggatttaaaa ataaggagtg tctcaaaata 60
gatt 64
<210> 50
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> bgaL-RbEspo0A-R
<400> 50
ccggtctcac catctgttg ttacctcctt agcagggtgc tgccaagggc atc 53
<210> 51
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> PSpoIIAA-SG1-F
<400> 51
tagtgcacgg atttggatga gtaaaaaggt tttagagcta gaaatagcaa gttaaaataa 60
gg 62
<210> 52
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> sgRNA-Uni-R
<400> 52
tatagacgtc ataaaaataa gaagcctgca aatgcaggct tcttattttt ataaaaaag 60
caccgactcg gtgccacttt ttcaagttg 89
<210> 53

<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> spoIIAA-LHA-F
<400> 53
tatagacgtc gagtctataa atttatgaat tttaaataat ttttaggta ag 52
<210> 54
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> spoIIAA-LHA-R
<400> 54
ccggtctcag caggtaaaaa tttttatat tgattattct agaacac 47
<210> 55
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> spoIIAA-RHA-F
<400> 55
ccggtctcaa tgtatttaaa atttgataaa aaagcagaca aac 43
<210> 56
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> spoIIAA-RHA-R
<400> 56
ggcgcgcctt tagttccctt ccccttttct g 31

- <210> 57
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> bgaL-RbEspoIIAA-R
<400> 57
ccggtctcaa catcttgttg ttacctcett agcagggtgc tgccaagggc atc 53
- <210> 58
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Chr-spoIIAA-F
<400> 58
ccacttgggt atgttggat agctgcc 27
- <210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> Chr-spoIIAA-R
<400> 59
ccagatcttg cctcttccat aagttcc 27
- <210> 60
<211> 1349
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221>
<222>
<223> BgaR-bglA-RbE序列
<400> 60

ctgccaatag ataaaataaa gtctgccaca attgtggcag actttatfff atctattgat 60
 ttatttcatt ttttaattta tatacttggg ttatttactt gattatttct gtaatttagt 120
 ggagacattg aaaaatgttt tgaaaaagt tttgaaaata acagggagtc actataacct 180
 acactacttg cgacttctcc tataggaagt ttagtgcttt ttaataaaag ggtggctttg 240
 tacattctaa ggtttattaa atatctttga ggagaaattc caaggttfff tatgaacatt 300
 ttatataaat aacttctact taagttcaca taatcagcaa tttcttgaac agttatgcta 360
 tgcattgtaat tagaattaat gaaattaaga gcatctttaa tatatgtgtg taattcctta 420
 tctttgtatt caaaaggfff tggaattct tctataagt cgtaacataa tgagtaaagt 480
 tcttttagta atagtatgtc atcagatctt gaaggattat aagttfffga tatttcgcac 540
 atatttaata ttatctgtgg aattfffag tttcttcac aattagcaac acaggagtta 600
 gtaatagaag ttctatttaa atactcatta gcatttgaac cactaaatcc tatccagtag 660
 tattcccaag gatcatcaat agaagccaca tactcaactt gcatacttt tagtagtata 720
 aaaatatcac ctgttttaa gttatatacc ttaccattaa atttaaaagt tccatatccc 780
 ttagttacgt aatgaataac agcattfff aatacttcat agttatatcc taatcctggt 840
 ataccttgtt ctataccaca ttcatctaca ttcatfcaaa agttfffctt aacatacttt 900
 ttccacaata tttgcattc tacctcctaa cctataaaat tagccaattt tatagtagtc 960
 ttatattaaa catttacatg agagcttgc aaagcagfff atcaacataa aagctfffata 1020
 ttttaaaata aattcttcta aatataagaa tattttaaag aaatatctt atatattagt 1080
 tattaanaatt tataagatta taagaaacat tataacatat tttagaactt tttactatt 1140
 ctaaaagatt aatttacata ttaacattta attatgggta aaaactatf tgaanaatga 1200
 tttatatgga attatgttfc ttaaatatac aatcatgtt catgaataca taattatfff 1260
 aaatgtattg aatacgactc actataggtg ataccagcat cgtcttgatg cccttggcag 1320
 caccctgcta aggaggtaac aacaagatg 1349

<210> 61

<211> 580

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> pPME-100衍生物质粒的合成模块F2(Synthesized module F2 for pPME-100 derivative plasmids)

<400> 61

tggcgtaca ctccctfita ctatttaatt atctatgtta aatgattaac gtgctcattt 60
 atattfitaac aaactfita catgaagfita agtfiffitag aaaattatf atattfifata 120
 tfffctcatt atactfifctg ctgaactatc tagattfifata tftagfifcct fgcttfgcct 180
 acaagggatt fctatfifcct ftcattfifaca attcatacgt ataaaatcca aattfiffctt 240
 gacattfifata cacataaata ftatgattfa tataggtaat cgctfifcata aaatatatta 300
 cccttaggaa atcaaatgat tataagfifcat atatgaaaac gttatataata attgatatgt 360

ttacatttgt aacttagatt tctctttgat ttccacatat ataaatctta aggaggagtt 420
 ttcgctgaca tagtaggacc agctatgggg ttttagagct agaaatagca agttaaaata 480
 aggctagtcc gttatcaact tgaaaaagtg gcaccgagtc ggtgcttttt ttataaaaat 540
 aagaagcctg catttgcagg cttcttattt ttatgacgtc 580

<210> 62

<211> 828

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> Th114-Yfk0

<400> 62

ttagcatatg cataagtta atttttttgt taaaaatat taaactttgt gtttttttta 60
 acaaaatata ttgataaaaa taataatagt gggataat aagttgtag agaaaacgta 120
 ataaaataaa ggaggtttat atatatgaca gaacaaagca agaaacaaga aatactagat 180
 gcttttcagt ttagacatgc aacaaaagag tttgatccag ataggaaaat atcagatgaa 240
 gatttccaat tcatacttga agctggtaga ttatcacat cttctgtagg tttagaacct 300
 tggcaatttg tagttgtaca aaataaagaa ctaagagaaa agttaagaca agtttcttgg 360
 ggagctcaag gacaattacc aactgcatct cattttgtac ttttattagg tagaacagct 420
 aaagaaatga gaagagatag tggatatgta gctgatcaat tgaacatgt taagaaaatg 480
 cctgaagata taatagaaaa tatgctaaaa gaagatggag ttttagaaag ttttcaagat 540
 ggtgattttc acttgatga atcagataga gcaatgttg attgggtag taacaaact 600
 tacattgcat tagcaaatat gatgactgca gctgcttaa taggaattga ttcttgtcca 660
 attgaaggat ttaactatga caaagtacat gacatactg agaaagaagg tgtattagaa 720
 gatggaagat ttgacatc agtaatggca gcttttggat atagagtaaa agaacctaga 780
 cccaaaacta gaagagcttt agatcaaatt gtaaatggg ttgaataa 828

<210> 63

<211> 808

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> PfdxnprM3-mIL2-Flag

<400> 63

taatttataa ataaaaatca ctttttagag gtggtttttt tatttataaa ttagttagt 60
 agcctgtgaa ataagtaagg aaaaaaaga agtaagtgtt atatatgatg attattttgt 120
 agatgtagat aggataatag aatccataga aatataggt tatacagtta tataaaaatt 180

actttaaaaa ttaataaaaa catggtaaaa tataaatcgt ataaagttgt gtaattttta 240
aggaggtgtg ttacatatga aaagtaaaaa attattagct acagtgctaa gtgctgtaat 300
cactctttct actgtttctg cagtttatgc tgctccaact tctagttcaa cttcaagttc 360
tacagctgaa gcacaacaac agcaacaaca gcaacaaca cagcaacaac atcttgaaca 420
actattaatg gatctacaag aacttctatc tagaatggaa aattatagaa accttaaact 480
accaagaatg ctaacattta aattttattt accaaaaca gcaacagaat taaaagatct 540
tcagtgtctc gaagatgaac ttggctctc acgtcatggt ctagatttaa ctcaaagtaa 600
aagttttcaa ttggaagatg cagaaaattt tataagtaat attagagtaa ctgttgtaa 660
actaaaggga tctgataaca cttttgaatg tcaattcgat gatgaatcag ctactgttgt 720
agattttcta agaaggtgga tagcattctg tcaaagtatc atatctaca gtctcaaga 780
ttataaagat gatgatgata aataataa 808

<210> 64

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> fdx-RsE (RbE)

<400> 64

ggtgatacca gcatcgtctt gatgcccttg gcagcacct gctaaggagg caaca 56

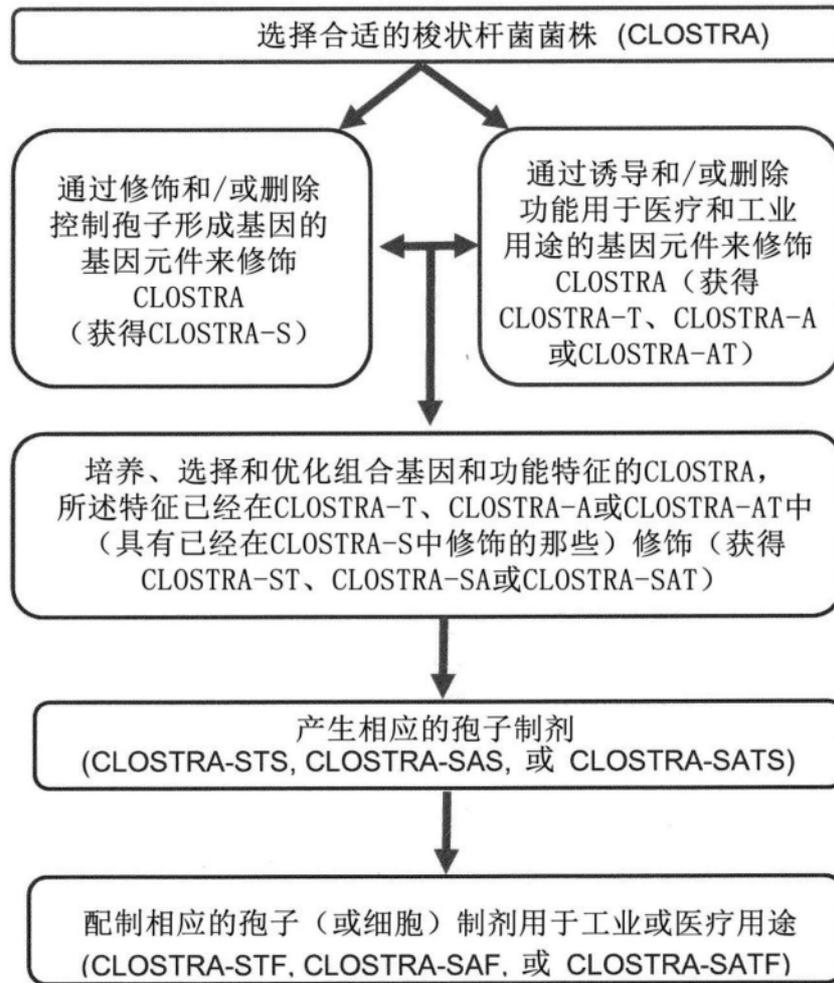


图1

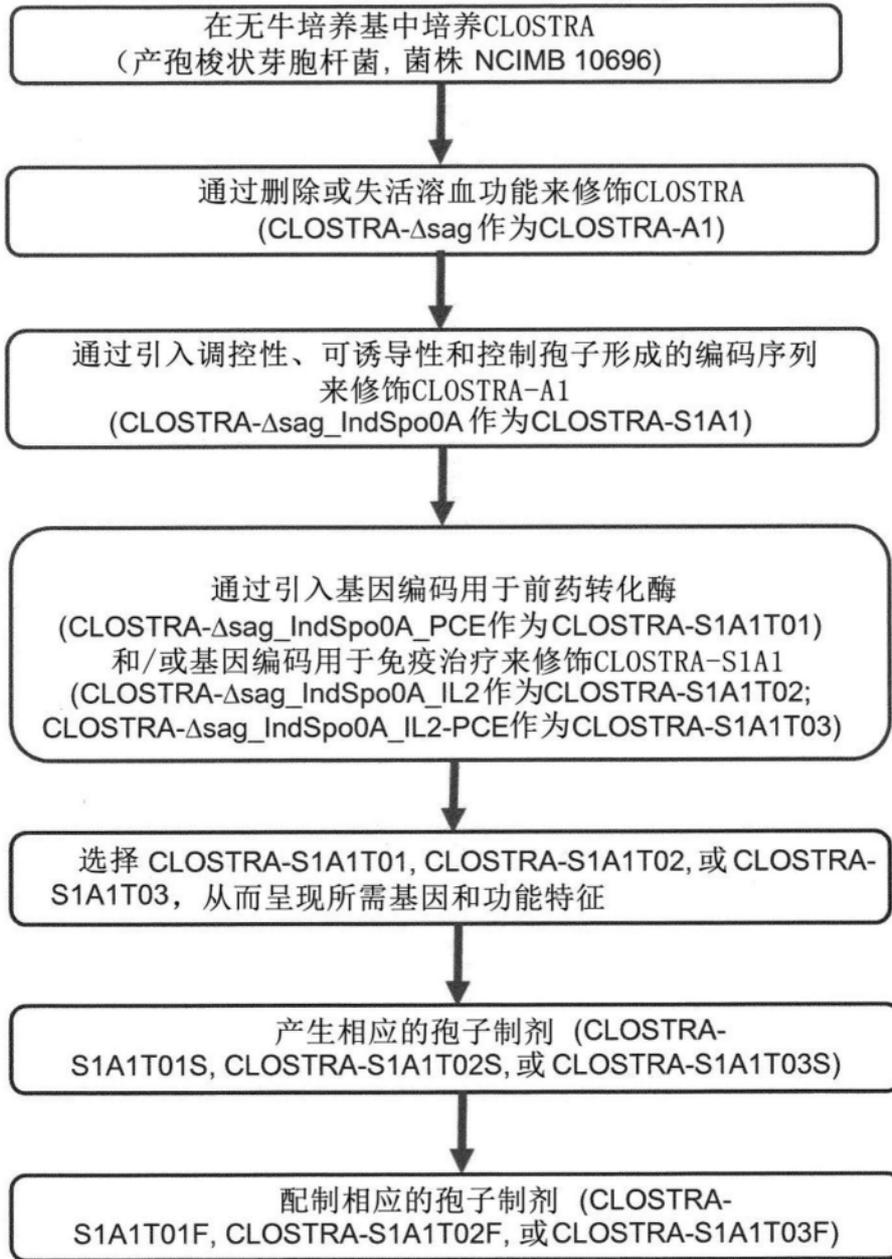


图2

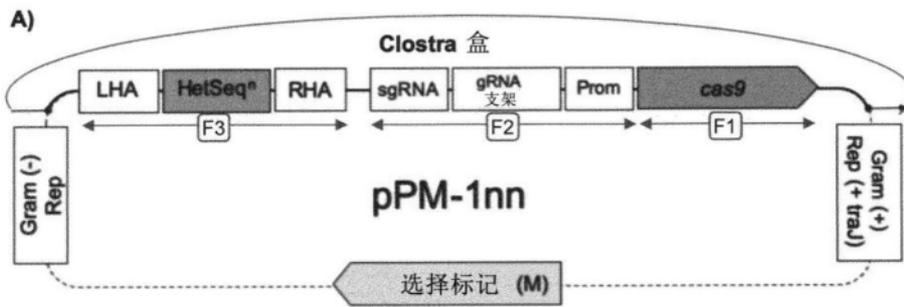


图3A

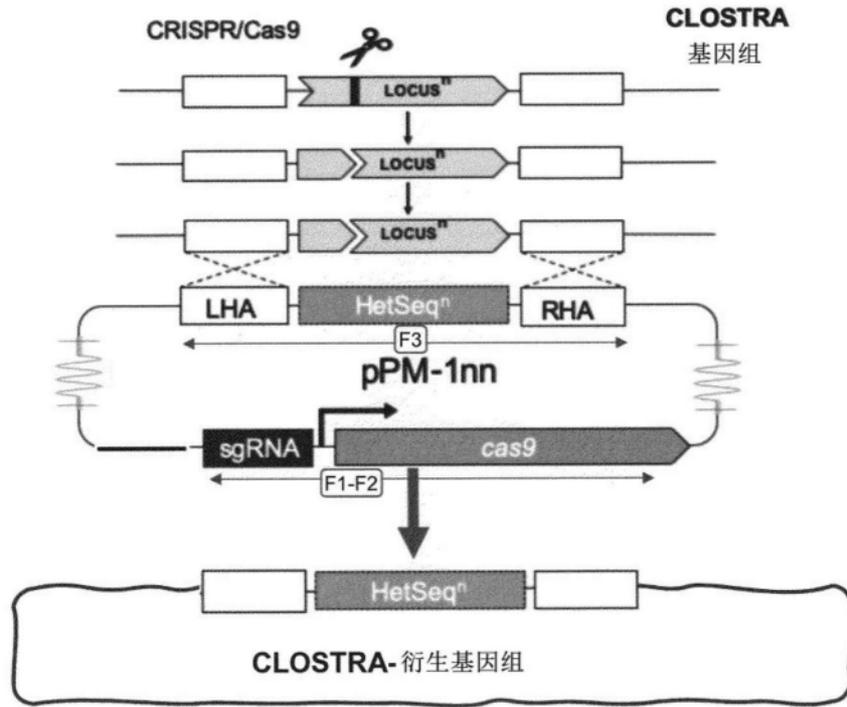


图3B

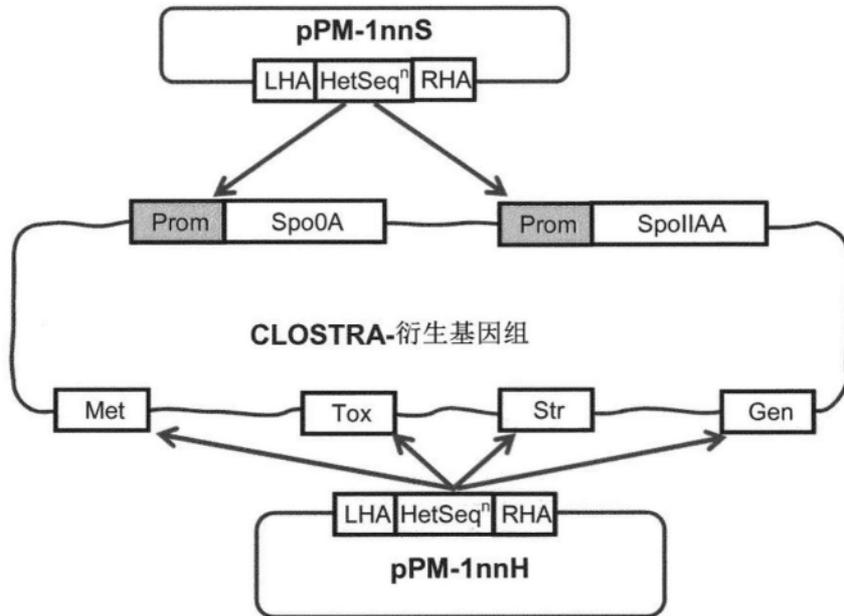


图4A

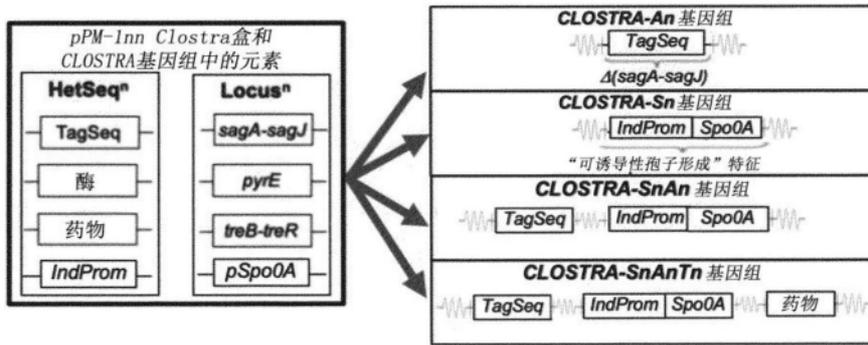


图4B

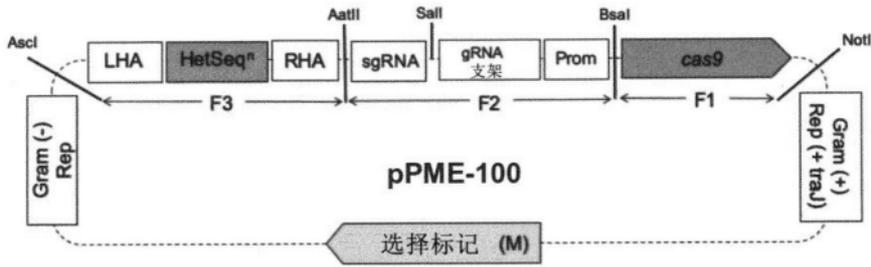


图5A

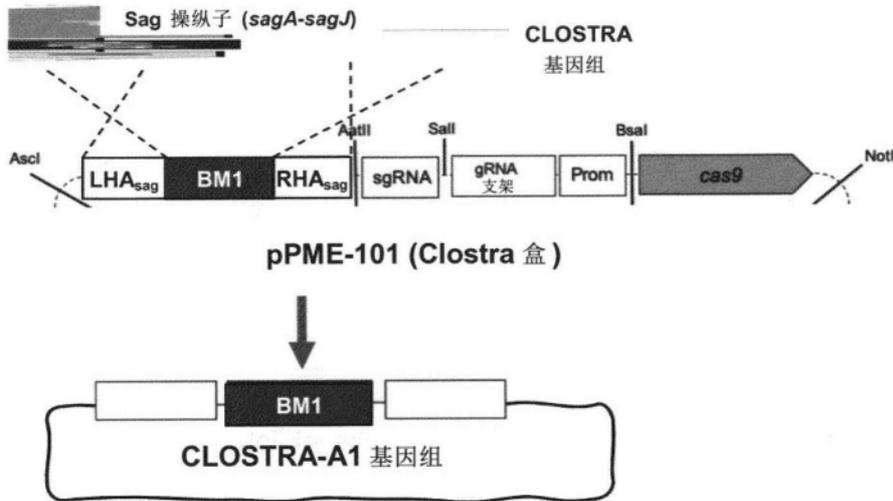


图5B

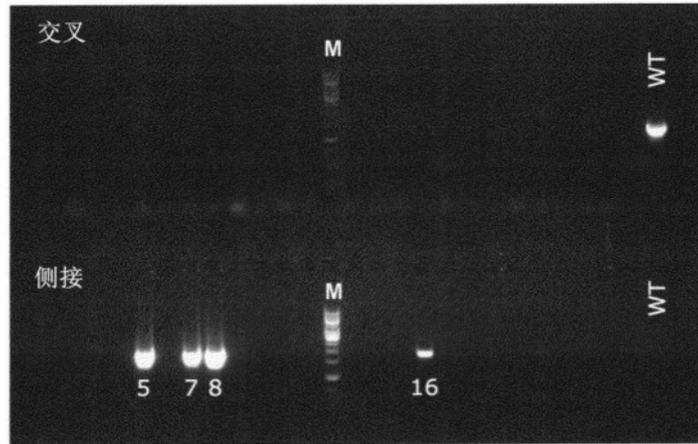


图6A



图6B

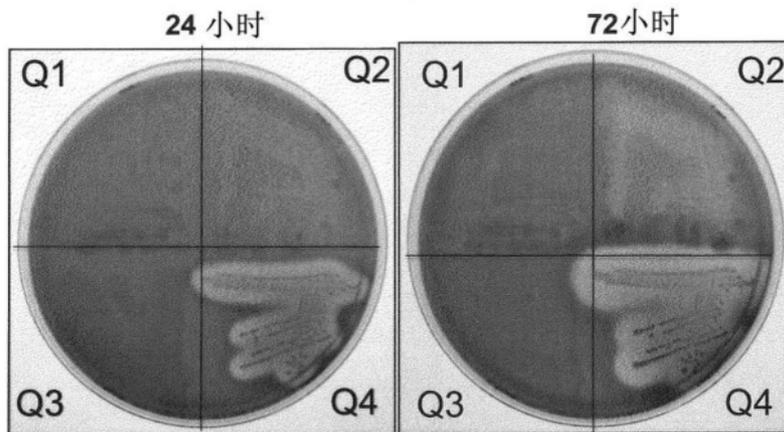


图7A

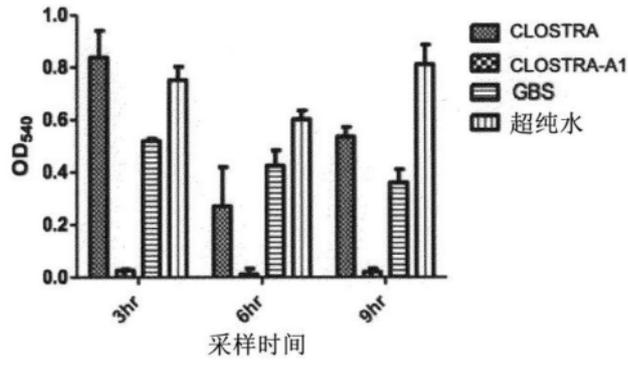


图7B

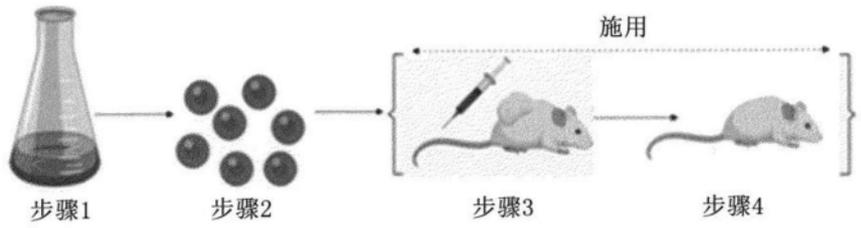


图8A

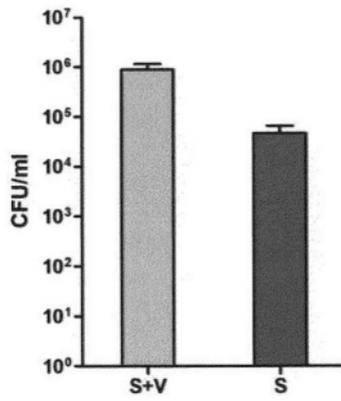


图8B

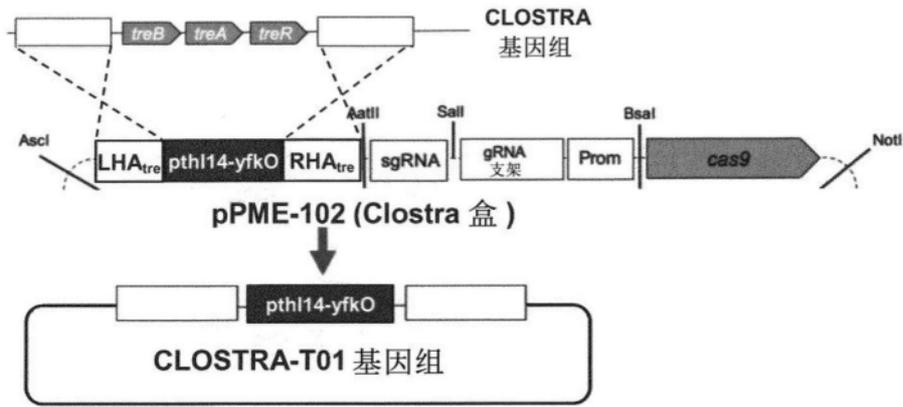


图9A



图9B

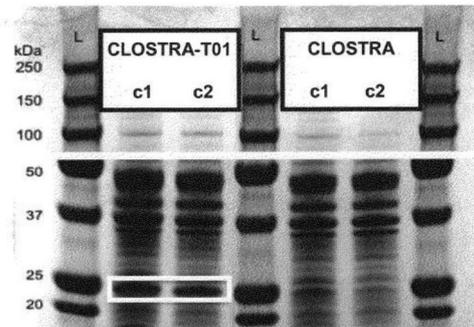


图9C

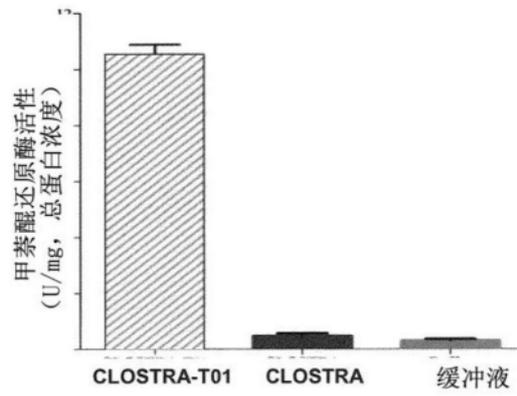


图9D

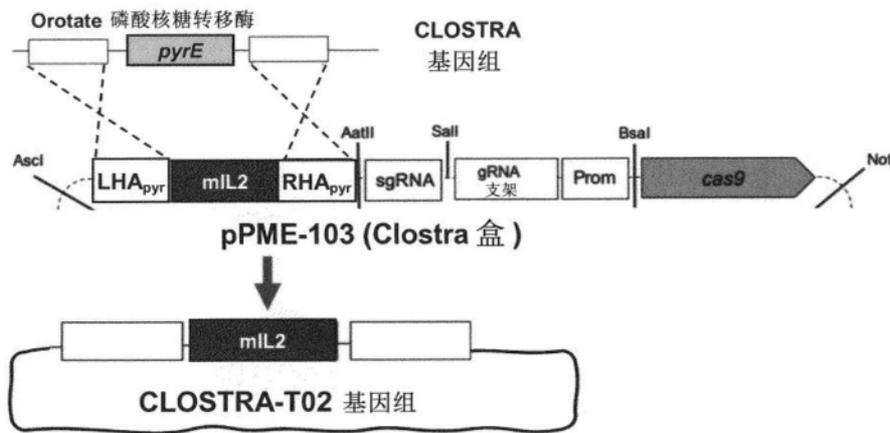


图10A



图10B

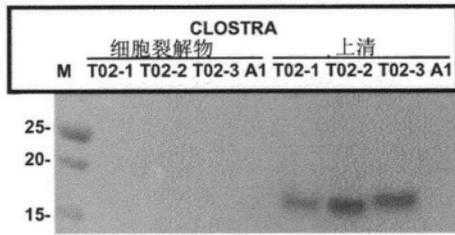


图10C

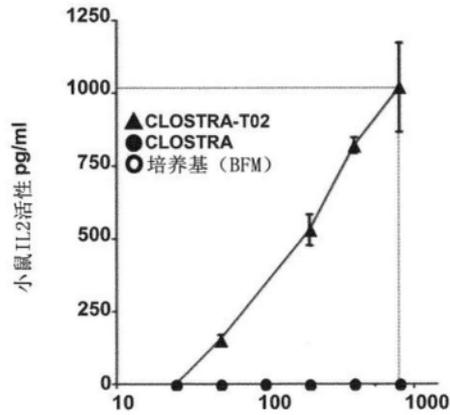


图10D

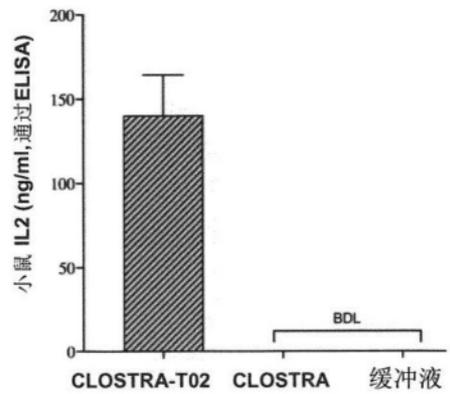


图10E

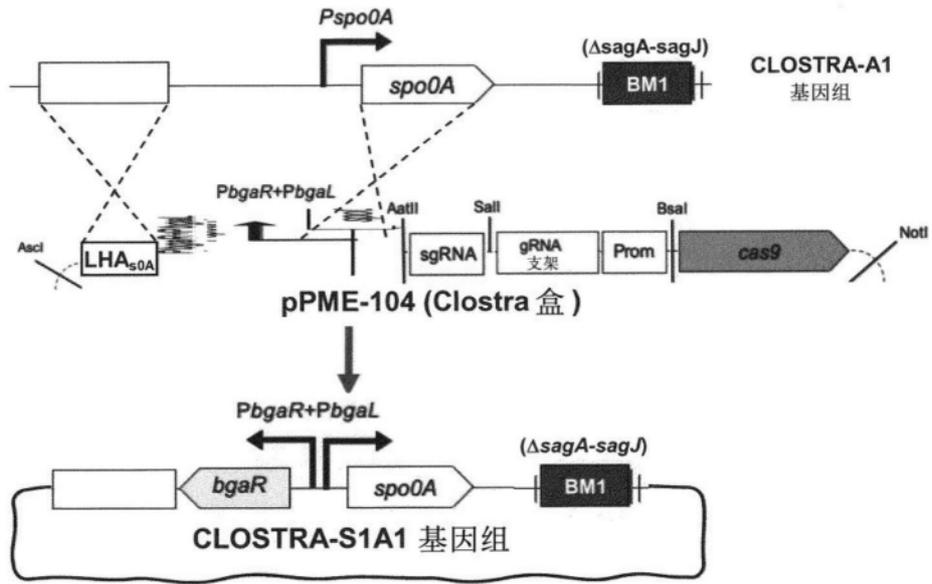


图11A

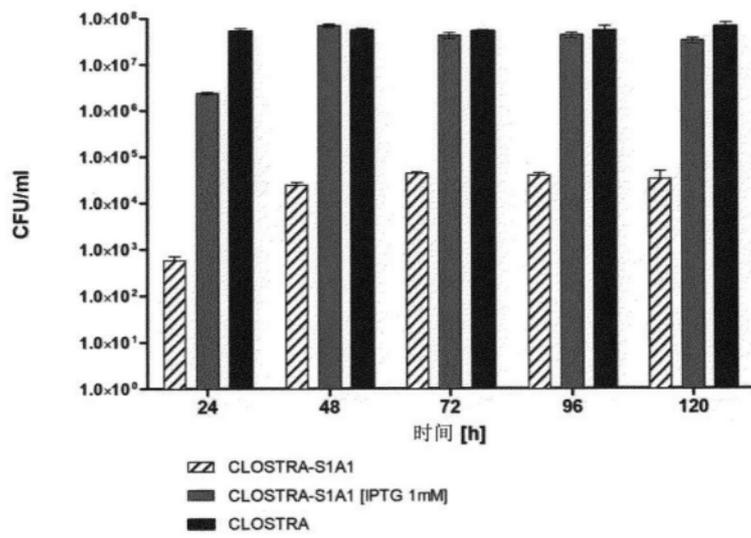


图11B

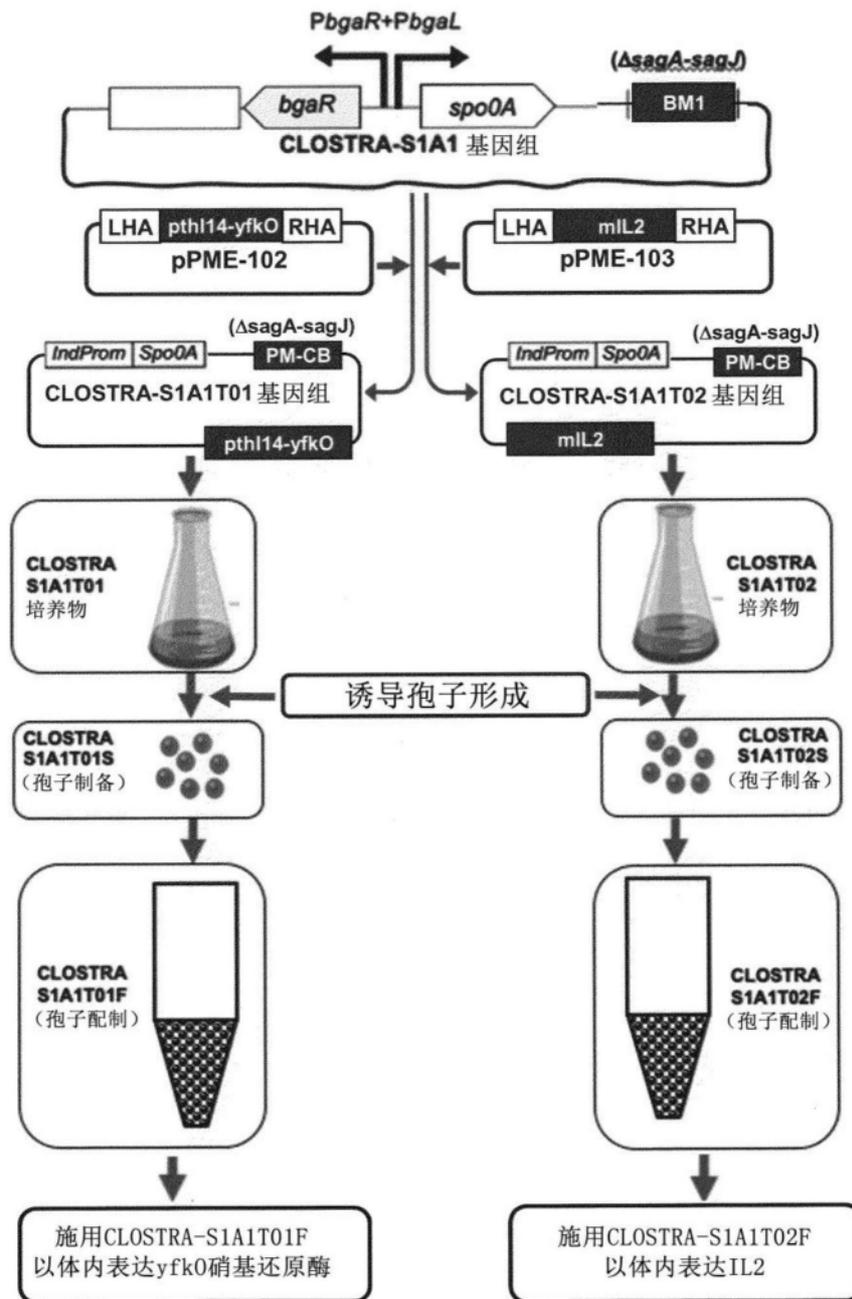


图12

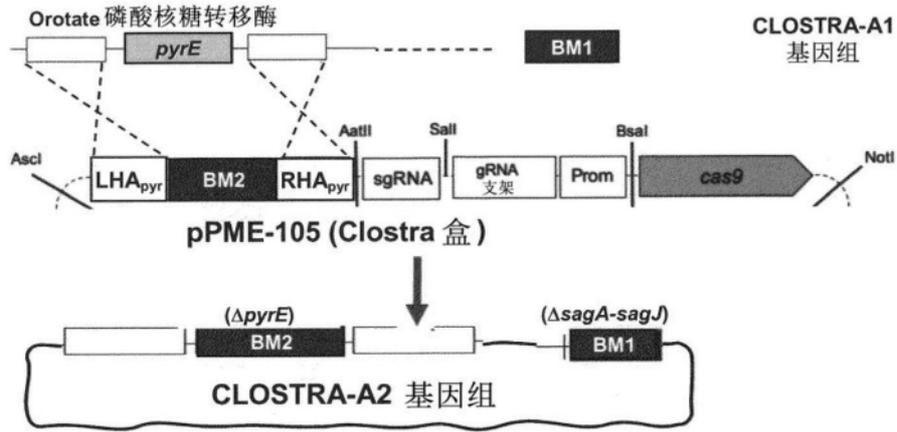


图13A

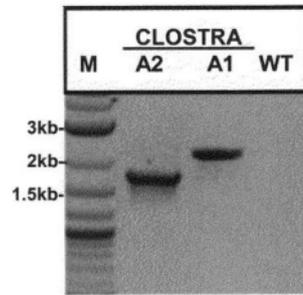


图13B



图13C

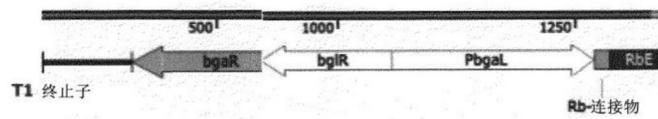


图14A

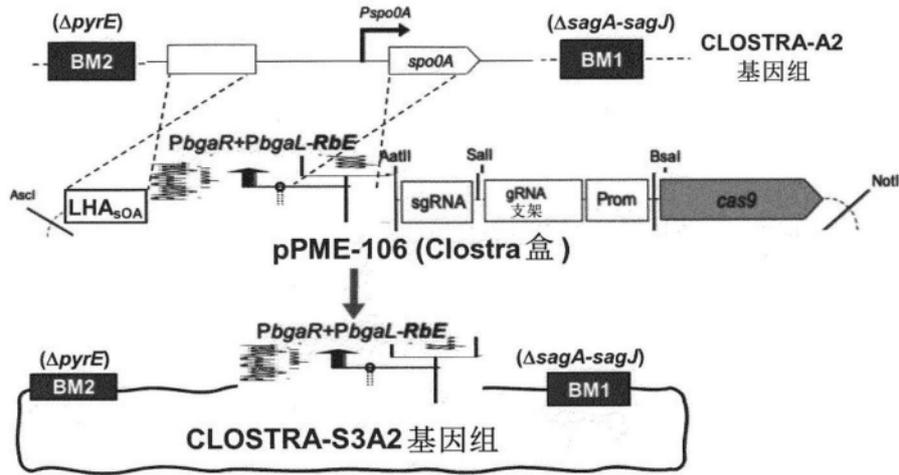


图14B

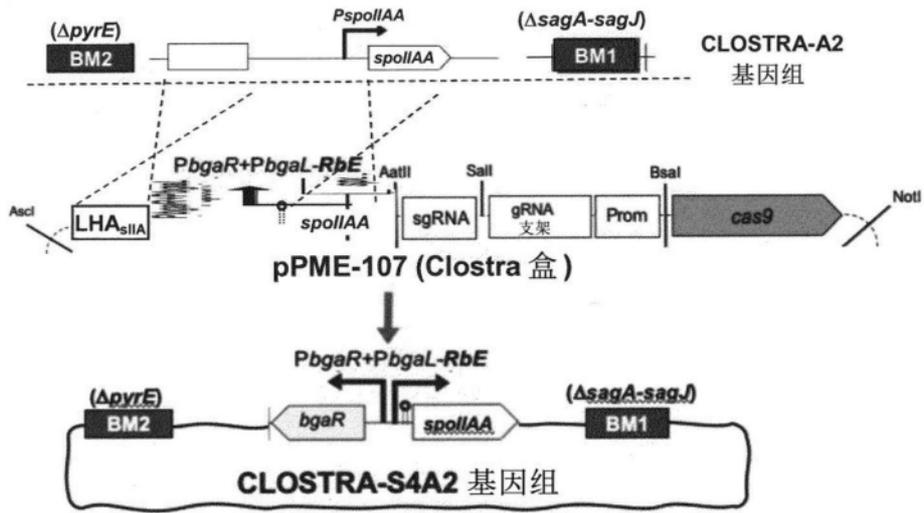


图14C

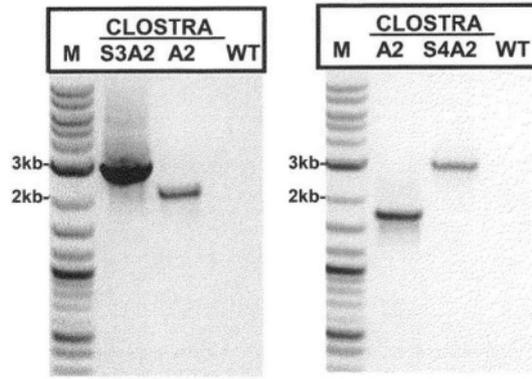


图15A

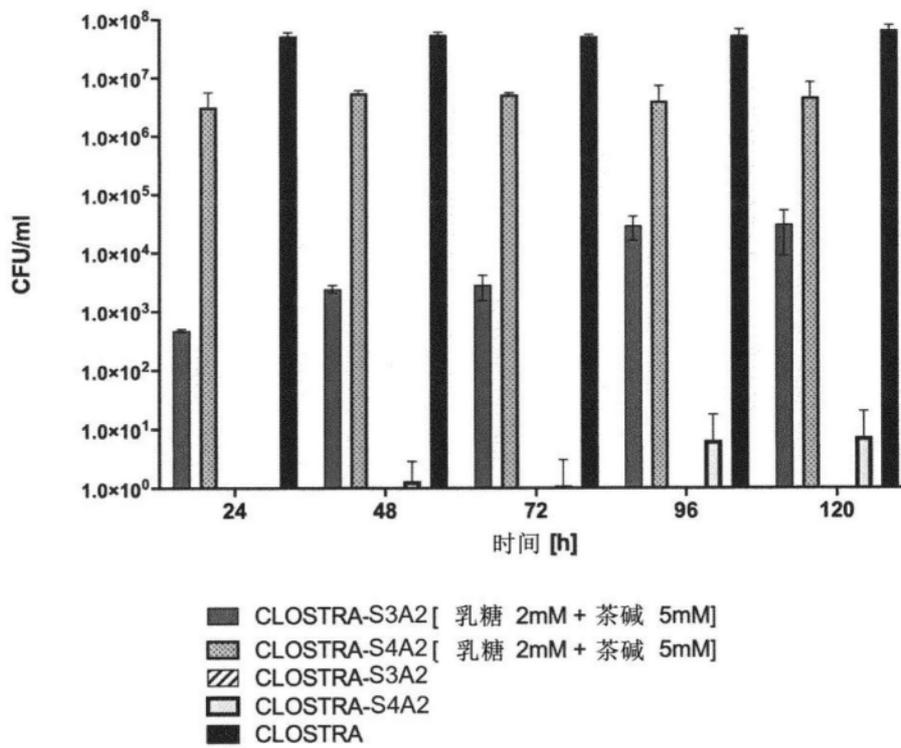


图15B

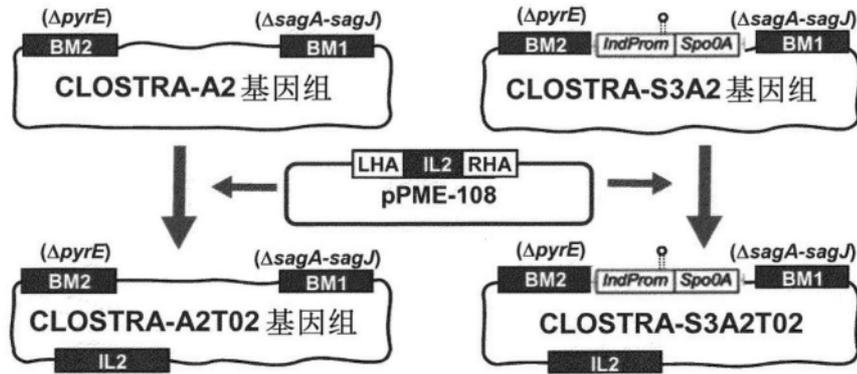


图16A

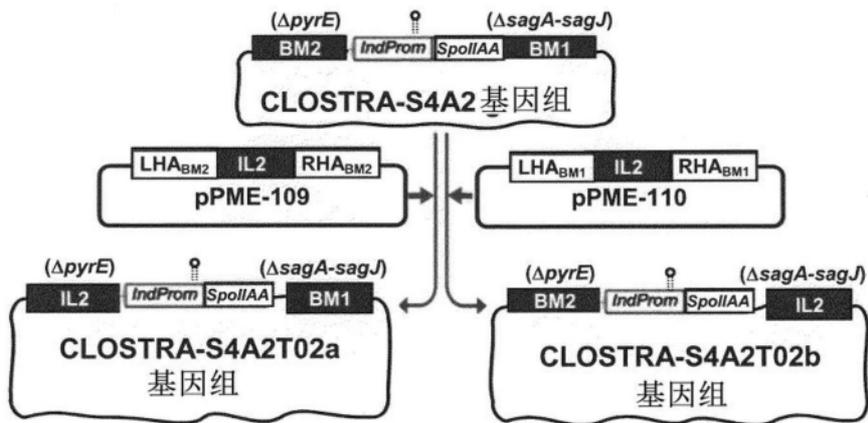


图16B

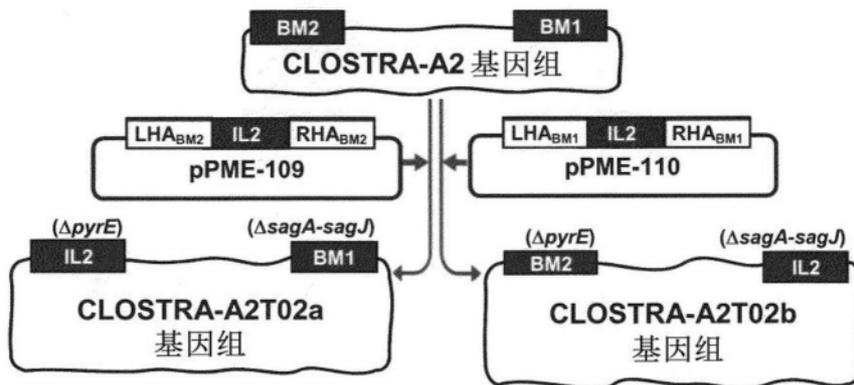


图16C