

具有抗肿瘤活性的经修饰的细菌

技术领域

本发明涉及具有抗肿瘤活性的经修饰的细菌，包含所述经修饰的细菌的药物组合物及其抗肿瘤用途。

发明背景

癌症已成为威胁人类生命健康最主要的疾病之一，但现有的治疗方法(放疗、化疗、手术和靶向药物)均有不足之处，迫切需要研发新的治疗方法。以 Coley 毒素为代表的传统肿瘤细菌疗法已有 150 年历史，但效果稳定性差，且存在安全性问题。基因工程技术的发展使得降低菌林毒性取得了长足进展，一系列临床试验证实减毒工程细菌用于人体肿瘤治疗的安全性，但疗效欠佳，难以兼备安全性与治疗效力，无法满足临床肿瘤治疗需求。对肿瘤细菌疗法的进一步深度优化势在必行。

发明内容

本发明通过合成生物学基因线路构建严格厌氧细菌，在施用于动物体或人体后，该细菌显示出对肿瘤的治疗效果，并能够在短时间内被正常组织器官清除，由此降低因细菌在体内长期存留而对动物体或人体产生的毒副作用，具有更加可靠的抗肿瘤功效和安全性。

在一种实施方式中，本发明提供经修饰的细菌，其中与未修饰的起始菌株相比，所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒，所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因，且所述细菌缺失至少一种在巨噬细胞中存活所需的基因或其功能性表达产物。

在一种实施方式中，本发明提供经修饰的细菌，其中与未修饰的起始菌株相比，所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒，所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因，且所述细菌缺失至少一种参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因或其功能性表达产物。

在一种实施方式中，本发明提供经修饰的细菌，其中与未修饰的起始菌株相比，所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒和 pH 调节性表达盒，所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因，所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因，且所述细菌缺失至少一种参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因或其功能性表达产物。

在一种实施方式中，本发明提供经修饰的细菌，其中与未修饰的起始菌株相比，所

述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒和 pH 调节性表达盒, 所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因, 所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因, 其中所述细菌表达野生型脂多糖(LPS), 且所述细菌缺失至少一种在巨噬细胞中存活所需的基因或其功能性表达产物。

在一种实施方式中, 本发明提供一种经修饰的鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*) 细菌, 其中与未修饰的起始菌株相比, 所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒和 pH 调节性表达盒, 所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因, 所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因, 且所述细菌缺失至少一种参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因或其功能性表达产物。

在一种实施方式中, 本发明提供一种经修饰的鼠伤寒沙门菌细菌, 其中与未修饰的起始菌株相比, 所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒和 pH 调节性表达盒, 所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因, 所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因, 其中所述细菌表达野生型脂多糖(LPS), 且所述细菌缺失至少一种在巨噬细胞中存活所需的基因或其功能性表达产物。

在一种实施方式中, 本发明提供药物组合物, 其包含前述实施方式中任一项的细菌。在一种实施方式中, 所述药物组合物用于治疗恶性肿瘤。

在一种实施方式中, 本发明提供治疗恶性肿瘤的方法, 其包括给患有恶性肿瘤的对象施用前述实施方式中任一项的药物组合物。

在一种实施方式中, 本发明提供前述实施方式中任一项的细菌在制备用于治疗恶性肿瘤的药物中的用途。

附图说明

图 1: DB-ZW1 菌株构建方案的示意图。

图 2: DB-ZW1 和 DB-ZW2 菌株在不同细胞内的生长特性。其中, 图 2A 为 DB-ZW1 和 DB-ZW2 菌株在厌氧条件和有氧条件下的 *dapE* 基因转录水平; 图 2B 为 DB-ZW1 和 DB-ZW2 菌株在有氧条件下的生长情况; 图 2C 为在有氧环境添加 DAP 以及在厌氧环境的条件下 DB-ZW1 菌株的倍增时间。

图 3: DB-ZW1 和 DB-ZW3 菌株在 Raw264.7 小鼠巨噬细胞或 MB49 小鼠膀胱癌细胞中的生长状况。

图 4: DB-ZW1、2、3、4、5 和野生型 SL7207 菌株在正常组织和肿瘤内的分布, 其中图 4A 为菌株 DB-ZW1、2、3、4、5 和野生型 SL7207 菌株在正常组织中的含量; 图 4B 为菌株 DB-ZW1、2、3、4、5 和野生型 SL7207 菌株在肿瘤内的含量。

图 5: DB-ZW1、DB-ZW1 ($\Delta msbB$)、DB-ZW1 (Δlpp)和 DB-ZW1 ($\Delta fliC$) 菌株在正常组织和肿瘤内的分布。

图 6: DB-ZW1、DB-ZW1 ($\Delta msbB$)、DB-ZW1 (Δlpp)和 DB-ZW1 ($\Delta fliC$) 菌株在小鼠中的抑癌效果。其中, 图 6A 为 DB-ZW1、DB-ZW1 ($\Delta msbB$)、DB-ZW1 (Δlpp)、DB-ZW1 ($\Delta fliC$)和野生型 SL7207 菌株对 MB49 小鼠膀胱癌荷瘤小鼠肿瘤体积的影响; 图 6B 为 DB-ZW1、DB-ZW1 ($\Delta msbB$)、DB-ZW1 (Δlpp)、DB-ZW1 ($\Delta fliC$)和野生型 SL7207 菌株对 MB49 小鼠膀胱癌荷瘤小鼠体重的影响; 图 6C 为 DB-ZW1、DB-ZW1 ($\Delta msbB$)、DB-ZW1 (Δlpp)和 DB-ZW1 ($\Delta fliC$)和野生型 SL7207 菌株对 MB49 小鼠膀胱癌荷瘤小鼠生存率的影响; 图 6D 为 DB-ZW1 对小鼠 MB49 膀胱癌的治疗的各响应率类型。

图 7: DB-ZW1 在肿瘤和不同器官内随时间的分布变化。其中, 图 7A 为 DB-ZW1 在肿瘤和不同器官内的密度随时间的变化; 图 7B 为 DB-ZW1 在不同正常器官内的密度随时间的变化。

图8: DB-ZW1对膀胱癌、黑色素瘤和原位结肠癌的抑癌效果。其中, 图8A-C分别为DB-ZW1对皮下膀胱癌、原位黑色素瘤和皮下原位结肠癌肿瘤体积的影响; 图8D为DB-ZW1对原位结肠癌肿瘤数量的影响。

图9: DB-ZW1变体DB-ZW1- $\Delta fliC$ 在肿瘤和正常器官内的含量。

图 10: DB-ZW1 对记忆性 CD8⁺T 细胞的激活。其中, 图 10A 为 DB-ZW1 对小鼠引流淋巴结中记忆性 CD8⁺T 细胞的含量的影响; 图 10B 为用 B16-OVA 黑色素瘤细胞接种小鼠, DB-ZW1 对小鼠引流淋巴结中记忆性 CD8⁺T 细胞的含量的影响。

图 11: DB-ZW1 的抗肿瘤效果具有肿瘤记忆性。其中, 图 11A 显示黑色素瘤小鼠再次皮下接种 1×10^6 个 B16 黑色素瘤细胞后, 经 DB-ZW1 治愈的黑色素瘤小鼠无肿瘤生成; 图 11B 显示与首次诱导黑色素瘤的小鼠相比, 经 DB-ZW1 治愈的黑色素瘤小鼠肺重量较小; 图 11C 显示黑色素瘤小鼠再次皮下接种 1×10^6 个 MB49 膀胱癌细胞后, 经 DB-ZW1 治愈的黑色素瘤小鼠与首次皮下注射 MB49 膀胱癌细胞的小鼠一样有肿瘤生成。

图 12: DB-ZW1 对 IFN γ ⁺CD8⁺T 细胞的激活作用。其中, 图 12A 显示用 DB-ZW1 和变体 DB-ZW1- $\Delta msbB$ 、DB-ZW1- Δlpp 治疗皮下接种 MB49 膀胱癌细胞的小鼠对肿瘤微环境中 IFN γ ⁺CD8⁺T 细胞含量的影响; 图 12B 显示从 DB-ZW1 治疗后的荷瘤小鼠的肿瘤中分离的 CD8⁺T 细胞对 MB49 细胞和 B16 细胞的杀伤作用。

图 13: DB-ZW1 治疗对膀胱癌小鼠肿瘤引流淋巴结和肿瘤中 CD8⁺T 细胞中 TRM 细胞的比例以及 TRM 中 IFN γ ⁺的细胞比例的影响。

图 14: anti-CD3 抗体、DB-ZW1、DB-ZW1- $\Delta msbB$ 、DB-ZW1- Δlpp 在体外对 CD8⁺T 细胞的激活。

图 15: DB-ZW1、DB-ZW1- $\Delta msbB$ 、DB-ZW1- Δlpp 对膀胱癌皮下瘤荷瘤小鼠血清中 IL-10 含量的影响。

图 16: 细胞因子 IL-10 在 DB-ZW1 治疗肿瘤过程中的作用。其中, 图 16A 为 anti-IL-10 抗体对 DB-ZW1 诱导的肿瘤部位 IFN γ ⁺CD8⁺T 细胞的抑制作用; 图 16A 为 anti-IL-10 抗体对 DB-ZW1 诱导的肿瘤体积减小的抑制作用。

图 17: DB-ZW1 诱导原代巨噬细胞产生 IL-10。

图 18: DB-ZW1 对肿瘤中中性粒细胞、T 细胞和巨噬细胞分布的影响。

图 19: 图 19A、B 分别为抗 IL-10 抗体和抗 CSF1R 抗体对 DB-ZW1 治疗的肿瘤中性粒细胞环状结构的影响。

图 20: DB-ZW1 不同给药方式对抗瘤效果的影响。其中, 图 20A 为 DB-ZW1 瘤内注射或静脉注射对肿瘤在肿瘤和正常组织中的分布的影响; 图 20B 为 DB-ZW1 瘤内注射或静脉注射对肿瘤体积的影响。

图 21: DB-ZW1 灭活对抗瘤效果的影响。

图 22: DB-ZW1 的不同给药剂量对皮下 MB49 膀胱癌荷瘤小鼠肿瘤体积的影响。

图 23: 实施例中使用目的片段 PsseA-hlyA-loxp-KnaR-loxp (SEQ ID NO:1) (A)、Pssbp1-dapE-Cm (SEQ ID NO:2) (B)、PdapE-dapE-loxp-KnaR-loxp (SEQ ID NO:4) (C) 和 PhtrA-htrA-loxp-aadA-loxp (SEQ ID NO:5) (D) 的示意图, “数字 a……数字 b” 代表片段中的主要元件在该序列中的起始和终止核苷酸(nt)编号。

发明详述

定义

在本发明中, 除非另有说明, 否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且, 本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时, 为了更好地理解本发明, 下面提供相关术语的定义和解释。

在本文中, “低氧调节性必需基因表达盒(hypoxia regulated essential gene expression cassette)” 是指在低氧条件下能够启动必需基因表达的一段 DNA, 其含有受控于低氧诱导型启动子的必需基因, 且必要时可进一步含有该必需基因表达所需的其他调控元件。

在本文中, “必需基因” 是指对细菌的生长和/或存活起决定性作用的基因, 一旦细菌缺失此基因或其功能性表达产物则无法正常存活、分裂和/或生长。缺失必需基因或其功能性表达产物的典型示例是营养缺陷型菌株, 其在无特定外源性补充物存在时, 在体外培养条件下或体内环境中无法正常存活、分裂和/或生长。必需基因在细菌染色体上通常以单拷贝存在。

在本文中, “严格低氧诱导型启动子(strictly hypoxia inducible promoter)” 是指在无氧条件下能够启动特定基因转录, 而在有氧条件下几乎无法被激活并产生转录本的启动子。

可通过以下实验鉴定到可用于本发明的“严格低氧诱导型启动子”:

构建含有受控于待测定启动子的必需基因(例如 *dapA/dapE*)的表达菌株,在厌氧培养箱中进行 Luria-Bertani (简称 LB)平板划线,37 °C厌氧培养 24 h。在厌氧条件下,挑取单克隆,单克隆重悬到 20 μ l LB 液体培养基中。将 20 μ l 单克隆重悬液平均加到以下 ABCD 四管液体中,每一管加入 5 μ l:

- A. 2ml LB 液体培养基,
- B. 2ml LB 液体培养基,
- C. 2ml LB 液体培养基+DAP,
- D. 2ml LB 液体培养基+DAP。

将 AC 管在厌氧箱种 37 °C静置培养 24 h,BD 在有氧摇床中 37 °C培养 24 h。若 ACD 管中细菌能够生长,B 管中细菌无法生长(检测 OD600 值小于 0.05)则认为该启动子为严格低氧诱导型启动子。

表 1 给出了经以上实验鉴定到的可用于本发明的示例性严格低氧诱导型启动子。

表 1

启动子名称	序列	SEQ ID NO:
pepTp	GCAGGGGTAAAAGTGACCTGACGCAATATTTGTCT TTTCTTGCTTCTTAATAATGTTGTCACAAAAGTG AGGGTGACTACATGG	30
fnrSp	CGCCGCAAAGTTTGAGCGAAGTCAATAAACTCTCT ACCCATTCAGGGCAATATCTCTCTTGCAGGTGAAT GCAACGTCAAGCGAT	31
ysgAp	TCAGAAGAAGCAAAAAGACACTTTACCGAAGGGTT TAACATTTTTTTCGTGATACTCATCACCATGACGCA AATGCGTTGCATAAA	32
ssbp1	AACCGAGGTCACAACATAGTAAAAGCGCTATTGGT AATGGTACAATCGCGCGTTTACACTTATTCAGAAC GATTTTTTTCAGGAG	33
Hip1	GGATAAAAGTGACCTGACGCAATATTTGTCTTTTC TTGCTTAATAATGTTGTCA	34
BBa_I14018	TGTAAGTTTATACATAGGCGAGTACTCTGTTATGG	35
BBa_R1074	TTAAATTTCTCTCGTCAGGCCGGAATAACTCCCT ATAATGCGCCACCACACTGATAGTGCTAGTGTAGA TCAC	36
Ptet-Fnr	AAAATTGATCTGAATCAATATTTTGACAAAATTG ATCTGAATCAATATTTACTGAGC	37

Ptet-arcA	GTTAATAAAATGTTATTGACAGTTAATAAAATGTT ATACTGAGC	38
sseA	TTAGCACGTTAATTATCTATCGTGTATATG	39

在本文中，“参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因(gene involved in or regulating the endogenous anti-oxidative stress response pathway)”是指参与细菌(例如胞内菌，例如沙门菌)抵抗体内或体外环境中的活性氧分子(ROS)杀伤作用的基因。

在本文中，“在巨噬细胞中存活所需的基因”是指维持或提升胞内菌在巨噬细胞内存活能力的相关基因。这些基因的产物的功能与抵抗巨噬细胞对微生物的杀伤作用有关，因此这些基因或其功能性表达产物的缺失能够降低细菌(例如胞内菌，例如沙门菌)在巨噬细胞内存活能力。

在本文中，“功能性表达产物”包括 RNA 和蛋白质等。

在本文中，“兼性厌氧细菌”是指在有氧和无氧条件下均能存活的细菌。

在本文中，“pH 调节性表达盒(pH regulated expression cassette)”是指相关基因的表达受到环境 pH 调控的一组基因表达元件。

在本文中，“在酸性 pH 条件下具有活性的启动子(a promoter that is active under acid pH condition)”是指在酸性 pH 条件下可以被激活并且调节相关基因表达的启动子。在一些实施方式中，本发明的在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在 pH 值低于 7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6 或 5.5 时可被激活或仍具有启动子活性。在一些实施方式中，上述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在中性 pH 值时(例如 pH 7.0~7.4)也具有启动子活性。

“多肽”、“肽”、和“蛋白质”在本发明中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物，以及适用于天然氨基酸的聚合物。术语“多肽”、“肽”、“氨基酸序列”和“蛋白质”还可包括修饰形式，包括但不限于糖基化、脂质连接、硫酸盐化、谷氨酸残基的 γ 羧化、羟化和 ADP-核糖基化。

如本文所用，“多核苷酸”是指多个核苷酸通过磷酸二酯键连接而成的大分子，其中所述核苷酸包括核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸。本发明的多核苷酸的序列可以针对不同的宿主细胞(如大肠杆菌)进行密码子优化，从而改善多肽的表达。进行密码子优化的方法是本领域已知的。

两个多肽序列或两个多核苷酸序列之间的“序列相同性”指的是所述序列之间的相同的氨基酸或核苷酸的百分比。评估多肽或多核苷酸序列之间的序列相同性水平的方法是本领域已知的。序列相同性可以使用已知的各种序列分析软件评估。例如，序列相同性可以通过 EMBL-EBI 的在线比对工具来评估(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>)。两个序列之间的序列相同性可以使用 Needleman-Wunsch 算法，使用默认参数来评估。

在本文中，术语“活菌”是指一种有生命力、活动性营养代谢特征且能够行使自身生物功能的菌株。活菌可以包括菌株代谢过程中产生的细菌类生物量。

在本文中，术语“革兰氏阴性细菌”是指进行革兰氏染色已知的部分程序后，未保留作为的最初碱性染料染色剂(如，结晶紫)的细菌。在示例性革兰氏染色中，首先通过加热将细胞固定在载玻片上并用碱性染料(如，结晶紫)染色，所述碱性染料被革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌两者吸收。然后，将载玻片用媒染剂(如，革兰氏碘液)处理，所述媒染剂结合于碱性染料(如，结晶紫)并将其截留在细胞中。然后，将细胞用丙酮或乙醇洗涤，然后用不同颜色的第二染料复染色(如，番红)。革兰氏阳性生物体保留最初的紫色染色，而革兰氏阴性生物体通过有机洗涤溶剂脱色，因此显示复染色。示例性革兰氏阴性细菌包括但不限于埃希氏菌属种、志贺氏属种、沙门氏菌属种、弯曲菌属种、奈瑟氏菌属种、嗜血杆菌属种、气单胞菌属种、弗朗西斯氏菌属种、耶尔森菌属某种、克雷伯菌属某种、博德特氏菌属某种、军团菌属种、棒状杆菌属种、柠檬酸杆菌属种、衣原体属种、布鲁氏菌属种、假单胞菌属种、螺杆菌属种和弧菌属种的细菌。

本文所用的术语“恶性实体肿瘤”是指组织的异常肿块，通常不包含囊肿或液体区域。实体肿瘤可能是良性的(非癌症)，或恶性的(癌症)。不同类型的恶性实体肿瘤以形成它们的细胞类型命名。恶性实体肿瘤的实例是肉瘤、癌和淋巴瘤。白血病(血癌)通常不形成恶性实体肿瘤(根据 NIH 国家癌症研究所的定义)。恶性实体肿瘤包括但不限于可能源自不同组织类型的异常细胞团，所述不同组织类型例如肝、结肠、结直肠、皮肤、乳腺、胰腺、子宫颈、子宫体、膀胱、胆囊、肾、喉、唇、口腔、食道、卵巢、前列腺、胃、睾丸、甲状腺或肺等，因此恶性实体肿瘤包括恶性实体肝肿瘤、结肠肿瘤、结直肠肿瘤、皮肤肿瘤、乳腺肿瘤、胰腺肿瘤、子宫颈肿瘤、子宫体肿瘤、膀胱肿瘤、胆囊肿瘤、肾肿瘤、喉肿瘤、唇肿瘤、口腔肿瘤、食道肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤、胃肿瘤、睾丸肿瘤、甲状腺肿瘤或肺肿瘤等。

在本文中，为了治疗的目的，术语“对象”优选是需要治疗目标病理病况例如肿瘤的对象。为了预防的目的，所述对象优选是处于发展目标病理病况的风险中或倾向于发展目标病理病况的对象。术语“对象”包括活生物体，例如原核生物和真核生物。对象的实例包括哺乳动物，例如人、狗、牛、马、猪、绵羊、山羊、猫、小鼠、兔、大鼠和转基因非人动物。在本发明的特定实施方案中，所述对象是人。

如本文所用，“治疗”是用于获得有益或期望的临床结果的过程。为了本发明的目的，有益或期望的临床结果包括但不限于以下一项或多项：减少赘生性或癌性细胞的增殖(或破坏赘生性或癌性细胞)、抑制赘生性细胞的转移、缩小或减小肿瘤的大小、缓解恶性肿瘤、减轻恶性肿瘤引起的症状、提高患有恶性肿瘤的对象的生活质量、减少治疗恶性肿瘤所需的其他药物剂量、延缓恶性肿瘤进展、治愈恶性肿瘤和/或延长患有恶性肿瘤的患者的存活。

如本文所用，细菌、药物或药物组合物的“有效量”或“有效剂量”是足以实现任

何一种或多种有益或期望的结果的量。对于预防性用途，有益或期望的结果包括消除或降低疾病的风险，减少疾病严重性或延迟疾病的发作，包括疾病的生化、组织学和/或行为症状、其并发症以及在疾病发展期间呈现的中间病理表型。对于治疗性用途，有益或期望的结果包括诸如减轻疾病(诸如肿瘤)的一种或多种症状，减少治疗疾病所需的其他药物剂量，增强另一种药物的效果，延长所治疗的对象的存活，和/或延迟患者中癌症的进展。例如，相对于未接受治疗的对象，“有效量”优选地将细胞生长或肿瘤生长抑制至少约 10%，优选至少约 20%，更优选至少约 30%，更优选至少约 40%，更优选至少约 50%，更优选至少约 60%，更优选至少约 70%，更优选至少约 80%。抑制肿瘤生长的能力可以在预测对人类肿瘤的疗效的动物模型系统中评价。或者，也可以通过检查抑制细胞生长的能力来评价，这种抑制可以通过本领域技术人员公知的试验在体外测定。治疗有效量的治疗性化合物能够减小肿瘤大小，或者以其他方式缓解对象的症状。本领域技术人员可以根据如下因素确定这种量，如对象的大小、对象症状的严重性和选择的特定组合物或给药途径。

如本文所用，“药学上可接受的载体”包括当与活性成分组合时允许成分保留生物活性并且与对象的免疫系统不反应的任何材料，包括但不限于崩解剂、粘合剂、填充剂、缓冲剂、张力剂、稳定剂、抗氧化剂、表面活性剂或润滑剂。优选地，该载体适合于静脉内、肌肉、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。例如，根据施用途，可将本发明的细菌包裹于一种材料中，以保护该细菌免受可使该细菌失活的酸和其他天然条件的作用。药学上可接受的载体包括生理盐水、PBS 缓冲液、无菌水溶液或分散液和用于临时制备注射液或分散液的粉末剂。这些用于药学活性物质的介质和试剂的使用是本领域公知的。常规介质或试剂，除了任何与活性化合物不相容的范围外，都可能在本发明的药物组合物中。

经修饰的细菌

本发明提供一种经修饰的细菌，其中与未修饰的起始菌株相比，所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒。在一个实施方案中，所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因。在一个实施方案中，所述细菌缺失至少一种参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因或其功能性表达产物。在一个实施方案中，所述细菌缺失至少一种在巨噬细胞中存活所需的基因或其功能性表达产物。在一个实施方案中，所述细菌表达野生型脂多糖(LPS)。

在一个实施方式中，所述严格低氧诱导型启动子选自 *pepTp*、*fnrSp*、*ysgAp*、*ssbp1*、*Hip1*、*BBa_I14018*、*BBa_R1074*、*Ptet-arcA* 和 *Ptet-Fnr*。优选地，所述严格低氧诱导型启动子是 *ssbp1* 启动子。

在一个实施方式中，所述必需基因的表达产物在所述细菌内负责 2,6-二氨基庚二酸(DAP)的合成。在一个实施方式中，当在有氧条件下培养时，所述细菌的生长依赖于培

培养基中额外添加的 DAP 或其类似物。在一个实施方式中,所述必需基因选自 *dapA*、*dapB*、*dapD*、*dapE*、*argD*、*dapF* 及其任意组合。优选地,所述必需基因选自 *dapA* 和 *dapE*。优选地,所述 *dapE* 包含与 SEQ ID NO: 27 具有 $\geq 81\%$, 优选地 $\geq 82\%$, 更优选地 $\geq 83\%$ 、 $\geq 84\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 86\%$ 、 $\geq 87\%$ 、 $\geq 88\%$ 、 $\geq 89\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 91\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 或最优选地 $\geq 99\%$ 序列相同性的核苷酸序列。优选地,所述 *dapE* 的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 27。优选地,所述 *dapE* 的核苷酸序列由 SEQ ID NO: 27 组成。

在一个实施方式中,所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族基因。在一个实施方式中,所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因的功能性表达产物是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族相关蛋白。在一个实施方式中,所述细菌缺失 HtrA 丝氨酸蛋白酶活性。在一个实施方式中,所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 *htrA*。在一个实施方式中,所述细菌缺失 *htrA*。优选地,所述 *htrA* 包含与 SEQ ID NO: 28 具有 $\geq 81\%$, 优选地 $\geq 82\%$, 更优选地 $\geq 83\%$ 、 $\geq 84\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 86\%$ 、 $\geq 87\%$ 、 $\geq 88\%$ 、 $\geq 89\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 91\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 或最优选地 $\geq 99\%$ 序列相同性的核苷酸序列。优选地,所述 *htrA* 的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 28。优选地,所述 *htrA* 的核苷酸序列由 SEQ ID NO: 28 组成。

在一个实施方式中,所述必需基因是所述细菌染色体中天然存在的基因。在一个实施方式中,所述必需基因的天然启动子被所述严格低氧诱导型启动子功能性置换。由此,所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

在一个实施方式中,所述必需基因表达盒是外源性的。在一个实施方式中,所述细菌染色体中天然存在的该必需基因被缺失或功能性失活。由此,所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。在一个实施方式中,所述外源性必需基因表达盒整合于所述细菌的染色体。在一个实施方式中,所述外源性必需基因表达盒位于所述细菌的染色体之外。在一个实施方式中,所述外源性必需基因表达盒存在于所述细菌携带的质粒中。

在一个实施方式中,经修饰的细菌进一步包含 pH 调节性表达盒。在一个实施方式中,经修饰的细菌与未修饰的起始菌株相比,所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒和 pH 调节性表达盒。在一个实施方式中,所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因。根据本发明的一些实施方案,所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在 pH 值在约 pH4.0 至 7.0 的范围内有活性。在一些实施方案中,所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在 pH 为 pH6.0 $\pm$ 1 时有活性。在一个实施方式中,所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在 pH 值低于 7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6 或 5.5, 或其中任何两个 pH 值范围之间时有活性。在一个实施方式中,所述在酸性 pH 条件下具有活性

的启动子选自 sseA、ssrA、ssaB、ssaG、ssaM 和 ssaR。在一个实施方式中, 所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子是 sseA。在一个实施方式中, 所述细菌来源的溶血素蛋白是革兰氏阴性细菌溶血素蛋白。在一个实施方式中, 所述编码革兰氏阴性细菌溶血素蛋白的基因是 hlyA 或 hlyE。在一个实施方式中, 所述 hlyA 或 hlyE 来自单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)。优选地, 所述 hlyA 包含与 SEQ ID NO: 29 具有 $\geq 81\%$, 优选地 $\geq 82\%$, 更优选地 $\geq 83\%$ 、 $\geq 84\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 86\%$ 、 $\geq 87\%$ 、 $\geq 88\%$ 、 $\geq 89\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 91\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 或最优选地 $\geq 99\%$ 序列相同性的核苷酸序列。优选地, 所述 hlyA 的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 29。优选地, 所述 hlyA 的核苷酸序列由 SEQ ID NO: 29 组成。

在一个实施方式中, 所述未修饰的起始菌株是兼性厌氧细菌。在一个实施方式中, 所述细菌是肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌。优选地, 所述细菌是埃希菌属(*Escherichia*)、沙门菌属(*Salmonella*)、志贺菌属(*Shigella*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、耶尔森菌属(*Yersinia*)、枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷菌属(*Serratia*)、变形杆菌属(*Proteus*)、摩根菌属(*Morganella*)、普罗威登菌属(*Providencia*)、哈夫尼菌属(*Hafnia*)、泛菌属(*Pantoea*)细菌。优选地, 所述细菌选自大肠杆菌、蟑螂埃希菌(*E. blattae*)、弗格森埃希菌(*E. fergusonii*)、赫尔曼埃希菌(*E. hermannii*)、伤口埃希菌(*E. vulneris*)、肠沙门菌(*S. enterica*)、邦戈沙门菌(*S. bongori*)、伤寒杆菌(*S. typhi*)、猪霍乱沙门菌(*S. choleraesuis*)、鼠伤寒沙门菌(*S. typhimurium*)、痢疾志贺菌(*S. dysenteriae*)、福氏志贺菌(*S. flexneri*)、鲍特志贺菌(*S. boydii*)、宋内志贺菌(*S. sonnei*)、肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)、产酸克雷伯菌(*K. oxytoca*)、鼠疫耶尔森菌(*Y. pestis*)、小肠结肠炎耶尔森菌(*Y. enterocolitica*)、假结核耶尔森菌(*Y. pseudotuberculosis*)、奥氏耶尔森菌(*Y. aldouae*)、伯氏耶尔森菌(*Y. bercov-ieri*)、弗氏耶尔森菌(*Y. frederiksenii*)、中间耶尔森菌(*Y. intermedia*)、克氏耶尔森菌(*Y. kristensenii*)、莫氏耶尔森菌(*Y. mollahetti*)、罗氏耶尔森菌(*Y. rohdei*)、鲁氏耶尔森菌(*Y. ruckeri*)、弗劳地枸橼酸杆菌(*C. freundii*)、科泽枸橼酸杆菌(*C. kaseri*)、布拉克枸橼酸杆菌(*C. braakii*)、产气肠杆菌(*E. aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)、日勾维肠杆菌(*E. gergoviac*)、坂崎肠杆菌(*E. sakazakii*)、泰洛肠杆菌(*E. taylorac*)、河生肠杆菌(*E. aminigenus*)、中间肠杆菌(*E. intermedius*)、阿氏肠杆菌(*E. asburia*)、生癌肠杆菌(*E. cancerogenus*)、溶解肠杆菌(*E. dissolvens*)、超压肠杆菌(*E. nimipressualis*)、黏质沙雷菌(*S. marcescens*)、嗜虫沙雷菌(*S. entomophila*)、无花果沙雷菌(*S. ficaria*)、泉居沙雷菌(*S. fonticola*)、格氏沙雷菌(*S. grimesii*)、液化沙雷菌(*S. liquefaciens*)、芳香沙雷菌(*S. odorifera*)、普城沙雷菌(*S. plymuthica*)、龙眼斑沙雷菌(*S. proteamaculans*)、深红沙雷菌(*S. rubidaea*)、解脲沙雷菌(*S. ureilytica*)、奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)、普通变形杆菌(*P. vulgaris*)、产黏变形杆菌(*P. myxofaciens*)、潘氏变形杆菌(*P. penneri*)、豪氏变形杆菌(*P. hauseri*)、摩根摩根菌(*M. morganii*)、产碱普罗威登菌(*P. alcalifaciens*)、鲁氏普罗威登菌

(*Prustigianii*)、斯氏普罗威登菌(*P.stuartii*)、雷氏普罗威登菌(*P.rettgeri*)、亨氏普罗威登菌(*P.heimbochae*)、蜂房哈夫尼菌(*H.alvei*)和成团泛菌(*P.agglomerans*)。优选地，所述细菌是鼠伤寒沙门菌。优选地，所述起始菌株是鼠伤寒沙门菌 SL7207。

在一个实施方案中，当施用于患有肿瘤的对象后，所述细菌能够在肿瘤组织中存活并增殖但在正常组织中被快速清除。在一个实施方案中，当施用于患有恶性肿瘤的对象后，所述细菌能够诱导抗肿瘤特异性免疫应答。在一个实施方案中，当施用于患有恶性肿瘤的对象后，所述细菌能够诱导抗肿瘤免疫记忆。

在一个实施方案中，所述细菌不表达野生型鞭毛蛋白。在一个实施方案中，所述经修饰的细菌缺失 *fliC* 基因。

在一个实施方案中，所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 50% 至约 30%。在一个实施方案中，所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 30% 至约 10%。优选地，所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 10% 至约 1%。

药物组合物

本发明提供了一种药物组合物，其包含有效量的本发明的经修饰的细菌。在一个实施方案中，所述经修饰的细菌是活菌。

在一个实施方式中，所述药物组合物用于治疗恶性肿瘤。在一个实施方式中，所述药物组合物用于在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤特异性免疫应答。在一个实施方式中，所述药物组合物用于在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤免疫记忆。在一个实施方式中，所述药物组合物用于预防或治疗恶性肿瘤的转移或复发。在一个实施方式中，所述药物组合物用于治疗对既往的抗肿瘤治疗产生抗性 or 治疗失败的恶性肿瘤。

在一个实施方案中，所述恶性肿瘤是神经系统、呼吸系统、消化系统、泌尿系统、生殖系统、造血系统、淋巴系统、内分泌系统或皮肤黏膜的恶性肿瘤。在一个实施方案中，所述恶性肿瘤是肉瘤或癌。在一个实施方案中，所述恶性肿瘤是实体瘤。在一个实施方案中，所述恶性肿瘤选自神经胶质瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、鼻咽癌、口腔癌、舌癌、喉癌、头颈癌、黑色素瘤、支气管癌、肺癌、胸膜癌、食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、膀胱癌、前列腺癌、肾上腺瘤、甲状腺癌、甲状旁腺瘤、垂体瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、骨癌和骨肉瘤。

在一个实施方案中，所述药物组合物进一步包括药学上可接受的载体。

治疗方法及用途

本发明提供了一种治疗恶性肿瘤的方法，其包括给患有恶性肿瘤的对象施用有效量

的本发明的经修饰的细菌或本发明的药物组合物。

本发明提供了一种在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤特异性免疫应答的方法，其包括给患有恶性肿瘤的对象施用有效量的本发明的经修饰的细菌或本发明的药物组合物。

本发明提供了一种在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤免疫记忆的方法，其包括给患有恶性肿瘤的对象施用有效量的本发明的经修饰的细菌或本发明的药物组合物。

本发明提供了一种预防或治疗恶性肿瘤的转移或复发的方法，其包括给患有恶性肿瘤的对象施用有效量的本发明的经修饰的细菌或本发明的药物组合物。

本发明提供了一种预防或治疗恶性肿瘤的转移或复发的方法，其包括给患有恶性肿瘤转移或复发的对象或者具有恶性肿瘤转移或复发的高风险的对象施用有效量的本发明的经修饰的细菌或本发明的药物组合物。

本发明提供了一种治疗对既往的抗肿瘤治疗产生抗性或治疗失败的恶性肿瘤的方法，其包括给患有对既往的抗肿瘤治疗产生抗性或治疗失败的恶性肿瘤的对象施用有效量的本发明的经修饰的细菌或本发明的药物组合物。

本发明提供了本发明的经修饰的细菌在制备用于治疗恶性肿瘤的药物中的用途。

本发明提供了本发明的经修饰的细菌在制备用于在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤特异性免疫应答的药物中的用途。

本发明提供了本发明的经修饰的细菌在制备用于在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤免疫记忆的药物中的用途。

本发明提供了本发明的经修饰的细菌在制备用于预防或治疗恶性肿瘤的转移或复发的药物中的用途。

本发明提供了本发明的经修饰的细菌在制备用于治疗对既往的抗肿瘤治疗产生抗性或治疗失败的恶性肿瘤的药物中的用途。

在一个实施方案中，所述经修饰的细菌是活菌。

在一个实施方案中，所述恶性肿瘤是神经系统、呼吸系统、消化系统、泌尿系统、生殖系统、造血系统、淋巴系统、内分泌系统或皮肤黏膜的恶性肿瘤。在一个实施方案中，所述恶性肿瘤是肉瘤或癌。在一个实施方案中，所述恶性肿瘤是实体瘤。在一个实施方案中，所述恶性肿瘤选自神经胶质瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、鼻咽癌、口腔癌、舌癌、喉癌、头颈癌、黑色素瘤、支气管癌、肺癌、胸膜癌、食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、膀胱癌、前列腺癌、肾上腺瘤、甲状腺癌、甲状旁腺癌、垂体瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、骨癌和骨肉瘤。

在一个实施方案中，本发明的细菌、药物或药物组合物通过如下途径施用：静脉注射、瘤内注射、肌肉注射、皮下注射、腹腔注射、经脑内施用、胃肠道施用、体表施用、口腔黏膜施用、经鼻施用、经直肠施用、或经阴道施用。在一个实施方案中，本发明的

细菌、药物或药物组合物可以被配制为通过如下途径施用的形式：静脉注射、瘤内注射、肌肉注射、皮下注射、腹腔注射、经脑内施用、胃肠道施用、体表施用、口腔黏膜施用、经鼻施用、经直肠施用、或经阴道施用。

在一个实施方案中，本发明的药物或药物组合物的剂型例如可以是溶液、乳液、冷冻干燥制剂或悬浮液形式；对于经口施用，剂型可以是片剂或胶囊形式；对于鼻内剂型，剂型可以是粉剂、滴鼻剂或气溶胶形式；对于体表施用，剂型可以是水溶液、悬浮液、软膏、乳膏或凝胶；对于直肠或阴道施用，剂型可以是栓剂、灌肠剂或作为内窥镜或结肠镜检查程序的一部分递送。在一个实施方案中，所述药物或药物组合物被配制为溶液、乳液、冷冻干燥制剂或悬浮液形式；对于经口施用，可以被配制为片剂或胶囊形式；对于鼻内剂型，可以被配制为粉剂、滴鼻剂或气溶胶形式；对于体表施用，可以被配制为水溶液、悬浮液、软膏、乳膏或凝胶；对于直肠或阴道施用，可以配制成栓剂、灌肠剂或作为内窥镜或结肠镜检查程序的一部分递送。用于制备剂型的本领域公知的方法例如参见，“Remington's Pharmaceutical Sciences”（第 20 版），编者 A. Gennaro, 2000, Mack Publishing Company, Easton, PA。

在一些实施方案中，本发明的细菌、药物或药物组合物例如，可以以约 1 分钟、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 分钟、1 小时、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 小时、1 天、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 天的间隔施用，其中包括列出值的任意两个之间的范围，例如 1 分钟-10 分钟、1 分钟-30 分钟、1 分钟-1 小时、1 分钟-2 小时、1 分钟-4 小时、1 分钟-12 小时、1 分钟-18 小时、1 分钟-1 天、10 分钟-30 分钟、10 分钟-1 小时、10 分钟-2 小时、10 分钟-4 小时、10 分钟-12 小时、10 分钟-18 小时、10 分钟-1 天、30 分钟-1 小时、30 分钟-2 小时、30 分钟-4 小时、30 分钟-12 小时、30 分钟-18 小时、30 分钟-1 天、30 分钟-2 天、1 小时-2 小时、1 小时-4 小时、1 小时-12 小时、1 小时-18 小时、1 小时-1 天、4 小时-12 小时、4 小时-18 小时、4 小时-1 天、1 天-2 天、1 天-3 天、1 天-4 天、1 天-5 天、1 天-7 天、1 天-10 天、2 天-3 天、2 天-4 天、2 天-5 天、2 天-7 天、2 天-10 天或 5 天-10 天。在一些实施方案中，所述细菌、药物或药物组合物以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每八周一次、每九周一次、每十周一次、每十五周一次、每二十周一次、每二十五周一次或每二十六周一次施用。在一些实施方案中，所述细菌、药物或药物组合物被配制为例如，可以以约 1 分钟、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 分钟、1 小时、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 小时、1 天、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 天的间隔施用的形式，其中包括列出值的任意两个之间的范围，例如 1 分钟-10 分钟、1 分钟-30 分钟、1 分钟-1 小时、1 分钟-2 小时、1 分钟-4 小时、1 分钟-12 小时、1 分钟-18 小时、1 分钟-1 天、10 分钟-30 分钟、10 分钟-1 小时、10 分钟-2 小时、10 分钟-4 小时、10 分钟-

钟-12 小时、10 分钟-18 小时、10 分钟-1 天、30 分钟-1 小时、30 分钟-2 小时、30 分钟-4 小时、30 分钟-12 小时、30 分钟-18 小时、30 分钟-1 天、30 分钟-2 天、1 小时-2 小时、1 小时-4 小时、1 小时-12 小时、1 小时-18 小时、1 小时-1 天、4 小时-12 小时、4 小时-18 小时、4 小时-1 天、1 天-2 天、1 天-3 天、1 天-4 天、1 天-5 天、1 天-7 天、1 天-10 天、2 天-3 天、2 天-4 天、2 天-5 天、2 天-7 天、2 天-10 天或 5 天-10 天。在一些实施方案中,所述细菌、药物或药物组合物被配制为每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每八周一次、每九周一次、每十周一次、每十五周一次、每二十周一次、每二十五周一次或每二十六周一次施用的形式。剂量方案可能取决于执业医师预期达到的药代动力学衰减的模式。疗法的进展可以通过常规技术和测定监测。给药方案可以随时间变化。

在一些实施方式中,所述药物或药物组合物中的有效量的细菌包括至少约 10^4 个菌落形成单位(cfu),例如至少约 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 或 10^{13} cfu,其中包括任意的列出值之间的范围,例如 10^4 - 10^8 cfu、 10^4 - 10^9 cfu、 10^4 - 10^{10} cfu、 10^4 - 10^{11} cfu、 10^4 - 10^{12} cfu、 10^4 - 10^{13} cfu、 10^5 - 10^8 cfu、 10^5 - 10^9 cfu、 10^5 - 10^{10} cfu、 10^5 - 10^{11} cfu、 10^5 - 10^{12} cfu、 10^5 - 10^{13} cfu、 10^6 - 10^8 cfu、 10^6 - 10^9 cfu、 10^6 - 10^{10} cfu、 10^6 - 10^{11} cfu、 10^6 - 10^{12} cfu、 10^6 - 10^{13} cfu、 10^7 - 10^8 cfu、 10^7 - 10^9 cfu、 10^7 - 10^{10} cfu、 10^7 - 10^{11} cfu、 10^7 - 10^{12} cfu、 10^7 - 10^{13} cfu、 10^8 - 10^9 cfu、 10^8 - 10^{10} cfu、 10^8 - 10^{11} cfu、 10^8 - 10^{12} cfu 或 10^8 - 10^{13} cfu。

在一些实施方案中,本发明的细菌、药物或药物组合物的有效剂量的体积小于或等于约 3ml、约 2.5ml、约 2ml、约 1.5ml、约 1ml、约 0.75ml、约 0.5ml、约 0.25ml 或约 0.1ml。在一些实施方案中,所述细菌、药物或药物组合物的有效剂量的体积为约 20ml、约 19ml、约 18ml、约 17ml、约 16ml、约 15ml、约 14ml、约 13ml、约 12ml、约 11ml、约 10ml、约 9ml、约 8ml、约 7ml、约 6ml、约 5ml、约 4ml、约 3ml、约 2ml 或约 1ml。可选地,所述细菌、药物或药物组合物的有效剂量的体积为约 20.5ml、约 19.5ml、约 18.5ml、约 17.5ml、约 16.5ml、约 15.5ml、约 14.5ml、约 13.5ml、约 12.5ml、约 11.5ml、约 10.5ml、约 9.5ml、约 8.5ml、约 7.5ml、约 6.5ml、约 5.5ml、约 4.5ml、约 3.5ml、约 2.5ml、约 1.5ml、或约 0.5ml。在一些实施方案中,所述细菌、药物或药物组合物的有效剂量的体积为约 200ml、约 190ml、约 180ml、约 170ml、约 160ml、约 150ml、约 140ml、约 130ml、约 120ml、约 110ml、约 100ml、约 90ml、约 80ml、约 70ml、约 60ml、约 50ml、约 40ml 或约 30ml,以及任意的列出值之间的范围,例如 100ml-110ml、100ml-120ml、90ml-120ml、90ml-130ml 等。可选地,所述细菌、药物或药物组合物的有效剂量的体积为约 205ml、约 195ml、约 185ml、约 175ml、约 165ml、约 155ml、约 145ml、约 135ml、约 125ml、约 115ml、约 105ml、约 95ml、约 85ml、约 75ml、约 65ml、约 55ml、约 45ml、约 35ml 或约 25ml,以及任意的列出值之间的范围,例如 105ml-115ml、105ml-125ml、95ml-125ml、95ml-135ml 等。可选地,所述细菌、药物或药物组合物的有效剂量的体积为约 900 微升、约 800 微升、约 700 微升、约 600 微升、约 500 微升、

约 400 微升、约 300 微升、约 200 微升、或约 100 微升，可选地约 950 微升、约 850 微升、约 750 微升、约 650 微升、约 550 微升、约 450 微升、约 350 微升、约 250 微升、约 150 微升、或约 50 微升。在一些实施方案中，所述细菌、药物或药物组合物的有效剂量的体积小于或等于约 2.0ml。

在例如药物或药物组合物中，本发明的细菌的浓度可以为至少约 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 或 10^{13} cfu/ml，其中包括任意的列出值之间的范围，例如 10^3 - 10^8 cfu/ml、 10^3 - 10^9 cfu/ml、 10^3 - 10^{10} cfu/ml、 10^3 - 10^{11} cfu/ml、 10^3 - 10^{12} cfu/ml、 10^3 - 10^{13} cfu/ml、 10^4 - 10^8 cfu/ml、 10^4 - 10^9 cfu/ml、 10^4 - 10^{10} cfu/ml、 10^4 - 10^{11} cfu/ml、 10^4 - 10^{12} cfu/ml、 10^4 - 10^{13} cfu/ml、 10^5 - 10^8 cfu/ml、 10^5 - 10^9 cfu/ml、 10^5 - 10^{10} cfu/ml、 10^5 - 10^{11} cfu/ml、 10^5 - 10^{12} cfu/ml、 10^5 - 10^{13} cfu/ml、 10^6 - 10^8 cfu/ml、 10^6 - 10^9 cfu/ml、 10^6 - 10^{10} cfu/ml、 10^6 - 10^{11} cfu/ml、 10^6 - 10^{12} cfu/ml、 10^6 - 10^{13} cfu/ml、 10^7 - 10^8 cfu/ml、 10^7 - 10^9 cfu/ml、 10^7 - 10^{10} cfu/ml、 10^7 - 10^{11} cfu/ml、 10^7 - 10^{12} cfu/ml、 10^7 - 10^{13} cfu/ml、 10^8 - 10^9 cfu/ml、 10^8 - 10^{10} cfu/ml、 10^8 - 10^{11} cfu/ml、 10^8 - 10^{12} cfu/ml 或 10^8 - 10^{13} cfu/ml。在例如药物或药物组合物中，本发明的细菌的浓度可以为至少约 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 或 10^{13} cfu/g，其中包括任意的列出值之间的范围，例如 10^3 - 10^8 cfu/g、 10^3 - 10^9 cfu/g、 10^3 - 10^{10} cfu/g、 10^3 - 10^{11} cfu/g、 10^3 - 10^{12} cfu/g、 10^3 - 10^{13} cfu/g、 10^4 - 10^8 cfu/g、 10^4 - 10^9 cfu/g、 10^4 - 10^{10} cfu/g、 10^4 - 10^{11} cfu/g、 10^4 - 10^{12} cfu/g、 10^4 - 10^{13} cfu/g、 10^5 - 10^8 cfu/g、 10^5 - 10^9 cfu/g、 10^5 - 10^{10} cfu/g、 10^5 - 10^{11} cfu/g、 10^5 - 10^{12} cfu/g、 10^5 - 10^{13} cfu/g、 10^6 - 10^8 cfu/g、 10^6 - 10^9 cfu/g、 10^6 - 10^{10} cfu/g、 10^6 - 10^{11} cfu/g、 10^6 - 10^{12} cfu/g、 10^6 - 10^{13} cfu/g、 10^7 - 10^8 cfu/g、 10^7 - 10^9 cfu/g、 10^7 - 10^{10} cfu/g、 10^7 - 10^{11} cfu/g、 10^7 - 10^{12} cfu/g、 10^7 - 10^{13} cfu/g、 10^8 - 10^9 cfu/g、 10^8 - 10^{10} cfu/g、 10^8 - 10^{11} cfu/g、 10^8 - 10^{12} cfu/g 或 10^8 - 10^{13} cfu/g。

本文中谈及的剂量范围仅仅为示例性的并不限制可以由医生选择的剂量范围。本发明的药物组合物中的活性成分(例如，本发明的细菌)的量可根据如个体的疾病状况、年龄、性别和重量的因素而变化，包括恶性肿瘤存在与否，所治疗的恶性肿瘤的类型，恶性肿瘤的严重性，细菌、药物或药物组合物的活性或活力，施用途径，治疗的持续时间，与细菌、药物或药物组合物组合使用的药物(若有)，对象的饮食和一般健康状况，以及本领域中众所周知的类似因素。可以调节剂量方案以提供最佳的治疗反应。例如，可以单剂量施用，可随时间施用几个分份剂量或可将剂量随治疗情况的紧迫性按比例降低或增加。

本发明的细菌、药物或药物组合物可以通过本领域熟知的方法制造，诸如发酵罐中进行微生物生长，随后进行离心浓缩并洗涤、过滤或透析、常规造粒、混合、溶解、包封、冻干或乳化过程及其它方法。可以以各种形式产生本发明的细菌、药物或药物组合物，包括颗粒、沉淀或微粒、粉末，包括冷冻干燥、旋转干燥或喷雾干燥的粉末、无定形粉末、注射剂、乳液、酏剂、混悬剂或溶液。制剂可以任选地含有稳定剂、pH 调节剂、表面活性剂、生物利用率调节剂以及这些的组合。

在一个实施方案中，本发明的细菌、药物或药物组合物可以单独施用，或在载体的存在下与其他化合物或组合物组合施用。在一个实施方案中，所述细菌、药物或药物组合物可以与其它恶性肿瘤疗法（包括但不限于，放射疗法、化学疗法和外科手术）组合施用。所述细菌、药物或药物组合物在这样的情况下可以用作疗法中的佐剂。因此，所述实施方案的另一个方面涉及一种细菌、药物或药物组合物，其用于在选自放射疗法和化学疗法的恶性肿瘤疗法中用作佐剂。

示例实施方式

实施方式 A

实施方式 A1：一种经修饰的细菌，其中与未修饰的起始菌株相比，所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒，所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因，且所述细菌缺失至少一种参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因或其功能性表达产物。

实施方式 A2：实施方式 A1 的经修饰的细菌，其中所述严格低氧诱导型启动子选自 *pepTp*、*fnrSp*、*ysgAp*、*ssbp1*、*Hip1*、*BBa_I14018*、*BBa_R1074*、*Ptet-arcA* 和 *Ptet-Fnr*。

实施方式 A3：实施方式 A1 的经修饰的细菌，其中所述严格低氧诱导型启动子是 *ssbp1* 启动子。

实施方式 A4：前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌，其中所述必需基因的表达产物在所述细菌内负责 2,6-二氨基庚二酸(DAP)的合成，且当在有氧条件下培养时，所述细菌的生长依赖于培养基中额外添加的 DAP 或其类似物。

实施方式 A5：实施方式 A4 的经修饰的细菌，其中所述必需基因选自 *dapA*、*dapB*、*dapD*、*dapE*、*argD*、*dapF* 及其任意组合。

实施方式 A6：实施方式 A4 的经修饰的细菌，其中所述必需基因选自 *dapA* 和 *dapE*。

实施方式 A7：前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌，其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 *HtrA* 丝氨酸蛋白酶家族基因。

实施方式 A8：前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌，其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因的功能性表达产物是 *HtrA* 丝氨酸蛋白酶家族相关蛋白。

实施方式 A9：前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌缺失 *HtrA* 丝氨酸蛋白酶活性。

实施方式 A10：前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌，其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 *htrA*。

实施方式 A11：前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌缺失 *htrA*。

实施方式 A12：实施方式 A1-A11 任一项的经修饰的细菌，其中所述必需基因是所述细菌染色体中天然存在的基因，其中所述必需基因的天然启动子被所述严格低氧诱导

型启动子功能性置换,由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 A13: 实施方式 A1-A11 任一项的经修饰的细菌,其中所述必需基因表达盒是外源性的,且所述细菌染色体中天然存在的该必需基因被缺失或功能性失活,由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 A14: 实施方式 A13 的经修饰的细菌,其中所述外源性必需基因表达盒整合于所述细菌的染色体。

实施方式 A15: 实施方式 A13 的经修饰的细菌,其中所述外源性必需基因表达盒位于所述细菌的染色体之外。

实施方式 A16: 实施方式 A15 的经修饰的细菌,其中所述外源性必需基因表达盒存在于所述细菌携带的质粒中。

实施方式 A17: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌,其进一步包含 pH 调节性表达盒,所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因。

实施方式 A18: 实施方式 A17 的经修饰的细菌,其中所述细菌来源的溶血素蛋白是革兰氏阴性细菌溶血素蛋白。

实施方式 A19: 实施方式 A18 的经修饰的细菌,其中所述编码革兰氏阴性细菌溶血素蛋白的基因是 *hlyA* 或 *hlyE*。

实施方式 A20: 实施方式 A19 的经修饰的细菌,其中所述 *hlyA* 或 *hlyE* 来自单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

实施方式 A21: 实施方式 A17-A20 任一项的经修饰的细菌,其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在 pH 值低于 7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6 或 5.5 时有活性。

实施方式 A22: 实施方式 A17-A21 任一项的经修饰的细菌,其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子选自 *sseA*、*ssrA*、*ssaB*、*ssaG*、*ssaM* 和 *ssaR*。

实施方式 A23: 实施方式 A17-A21 任一项的经修饰的细菌,其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子是 *sseA*。

实施方式 A24: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌,其中所述未修饰的起始菌株是兼性厌氧细菌。

实施方式 A25: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌,其中所述细菌是肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌。

实施方式 A26: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌,其中所述细菌是埃希菌属(*Escherichia*)、沙门菌属(*Salmonella*)、志贺菌属(*Shigella*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、耶尔森菌属(*Yersinia*)、枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷菌属

(*Serratia*)、变形杆菌属(*Proteus*)、摩根菌属(*Morganella*)、普罗威登菌属(*Providencia*)、哈夫尼菌属(*Hafnia*)、泛菌属(*Pantoea*)细菌。

实施方式 A27: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌选自大肠杆菌、蟑螂埃希菌(*E. blattae*)、弗格森埃希菌(*E. fergusonii*)、赫尔曼埃希菌(*E. hermannii*)、伤口埃希菌(*E. vulneris*)、肠沙门菌(*S. enterica*)、邦戈沙门菌(*S. bongori*)、伤寒杆菌(*S. typhi*)、猪霍乱沙门菌(*S. choleraesuis*)、鼠伤寒沙门菌(*S. typhimurium*)、痢疾志贺菌(*S. dysenteriae*)、福氏志贺菌(*S. flexneri*)、鲍特志贺菌(*S. boydii*)、宋内志贺菌(*S. sonnei*)、肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)、产酸克雷伯菌(*K. oxytoca*)、鼠疫耶尔森菌(*Y. pestis*)、小肠结肠炎耶尔森菌(*Y. enterocolitica*)、假结核耶尔森菌(*Y. pseudotuberculosis*)、奥氏耶尔森菌(*Y. aldouae*)、伯氏耶尔森菌(*Y. bercov-ieri*)、弗氏耶尔森菌(*Y. frederiksenii*)、中间耶尔森菌(*Y. intermedia*)、克氏耶尔森菌(*Y. kristensenii*)、莫氏耶尔森菌(*Y. mollahetti*)、罗氏耶尔森菌(*Y. rohdei*)、鲁氏耶尔森菌(*Y. ruckeri*)、弗劳地枸橼酸杆菌(*C. freundii*)、科泽枸橼酸杆菌(*C. kaseri*)、布拉克枸橼酸杆菌(*C. braakii*)、产气肠杆菌(*E. aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)、日勾维肠杆菌(*E. gergoviac*)、坂崎肠杆菌(*E. sakazakii*)、泰洛肠杆菌(*E. taylorac*)、河生肠杆菌(*E. aminigenus*)、中间肠杆菌(*E. intermedius*)、阿氏肠杆菌(*E. asburia*)、生癌肠杆菌(*E. cancerogenus*)、溶解肠杆菌(*E. dissolvens*)、超压肠杆菌(*E. nimipressualis*)、黏质沙雷菌(*S. marcescens*)、嗜虫沙雷菌(*S. entomophila*)、无花果沙雷菌(*S. ficaria*)、泉居沙雷菌(*S. fonticola*)、格氏沙雷菌(*S. grimesii*)、液化沙雷菌(*S. liquefaciens*)、芳香沙雷菌(*S. odorifera*)、普城沙雷菌(*S. plymuthica*)、龙眼斑沙雷菌(*S. proteamaculans*)、深红沙雷菌(*S. rubidaea*)、解脲沙雷菌(*S. ureilytica*)、奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)、普通变形杆菌(*P. vulgaris*)、产黏变形杆菌(*P. myxofaciens*)、潘氏变形杆菌(*P. penneri*)、豪氏变形杆菌(*P. hauseri*)、摩根摩根菌(*M. morganii*)、产碱普罗威登菌(*P. alcalifaciens*)、鲁氏普罗威登菌(*P. rustigianii*)、斯氏普罗威登菌(*P. stuartii*)、雷氏普罗威登菌(*P. rettgeri*)、亨氏普罗威登菌(*P. heimboschae*)、蜂房哈夫尼菌(*H. alvei*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)。

实施方式 A28: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌是鼠伤寒沙门菌。

实施方式 A29: 实施方式 A28 的经修饰的细菌, 其中所述起始菌株是鼠伤寒沙门菌 SL7207。

实施方式 A30: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌表达野生型脂多糖(LPS)。

实施方式 A31: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有肿瘤的对象后, 所述细菌能够在肿瘤组织中存活并增殖但在正常组织中被快速清除。

实施方式 A32: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够抑制恶性肿瘤的生长。

实施方式 A33: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性

肿瘤的对象后,所述细菌能够诱导抗肿瘤特异性免疫应答。

实施方式 A34: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌,其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后,所述细菌能够诱导抗肿瘤免疫记忆。

实施方式 A35: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌,其不表达野生型鞭毛蛋白。

实施方式 A36: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌,其缺失 *fliC* 基因。

实施方式 A37: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌,其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 50% 至约 30%。

实施方式 A38: 实施方式 A1-A36 任一项的经修饰的细菌,其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 30% 至约 10%。

实施方式 A39: 实施方式 A1-A36 任一项的经修饰的细菌,其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 10% 至约 1%。

实施方式 B

实施方式 B1: 一种经修饰的细菌,其中与未修饰的起始菌株相比,所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒和 pH 调节性表达盒,所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因,所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因,且所述细菌缺失至少一种参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因或其功能性表达产物。

实施方式 B2: 实施方式 B1 的经修饰的细菌,其中所述严格低氧诱导型启动子选自 *pepTp*、*fmrSp*、*ysgAp*、*ssbp1*、*Hip1*、*BBa_I14018*、*BBa_R1074*、*Ptet-arcA* 和 *Ptet-Fnr*。

实施方式 B3: 实施方式 B1 的经修饰的细菌,其中所述严格低氧诱导型启动子是 *ssbp1* 启动子。

实施方式 B4: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌,其中所述必需基因的表达产物在所述细菌内负责 2,6-二氨基庚二酸(DAP)的合成,且当在有氧条件下培养时,所述细菌的生长依赖于培养基中额外添加的 DAP 或其类似物。

实施方式 B5: 实施方式 B4 的经修饰的细菌,其中所述必需基因选自 *dapA*、*dapB*、*dapD*、*dapE*、*argD*、*dapF* 及其任意组合。

实施方式 B6: 实施方式 B4 的经修饰的细菌,其中所述必需基因选自 *dapA* 和 *dapE*。

实施方式 B7: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌,其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族基因。

实施方式 B8: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌,其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因的功能性表达产物是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族相关蛋白。

实施方式 B9: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌,其中所述细菌缺失 HtrA

丝氨酸蛋白酶活性。

实施方式 B10: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 *htrA*。

实施方式 B11: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌缺失 *htrA*。

实施方式 B12: 实施方式 B1-B11 任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因是所述细菌染色体中天然存在的基因, 其中所述必需基因的天然启动子被所述严格低氧诱导型启动子功能性置换, 由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 B13: 实施方式 B1-B11 任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因表达盒是外源性的, 且所述细菌染色体中天然存在的该必需基因被缺失或功能性失活, 由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 B14: 实施方式 B13 的经修饰的细菌, 其中所述外源性必需基因表达盒整合于所述细菌的染色体。

实施方式 B15: 实施方式 B13 的经修饰的细菌, 其中所述外源性必需基因表达盒位于所述细菌的染色体之外。

实施方式 B16: 实施方式 B15 的经修饰的细菌, 其中所述外源性必需基因表达盒存在于所述细菌携带的质粒中。

实施方式 B17: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌来源的溶血素蛋白是革兰氏阴性细菌溶血素蛋白。

实施方式 B18: 实施方式 B17 的经修饰的细菌, 其中所述编码革兰氏阴性细菌溶血素蛋白的基因是 *hlyA* 或 *hlyE*。

实施方式 B19: 实施方式 B18 的经修饰的细菌, 其中所述 *hlyA* 或 *hlyE* 来自单核细胞增生李斯特菌、霍乱弧菌或大肠杆菌。

实施方式 B20: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在 pH 值低于 7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6 或 5.5 时有活性。

实施方式 B21: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子选自 *sseA*、*ssrA*、*ssaB*、*ssaG*、*ssaM* 和 *ssaR*。

实施方式 B22: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子是 *sseA*。

实施方式 B23: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述未修饰的起始菌株是兼性厌氧细菌。

实施方式 B24: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌是肠杆菌科细菌。

实施方式 B25: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌是埃希菌

属、沙门菌属、志贺菌属、克雷伯菌属、耶尔森菌属、枸橼酸杆菌属、肠杆菌属、沙雷菌属、变形杆菌属、摩根菌属、普罗威登菌属、哈夫尼菌属或泛菌属细菌。

实施方式 B26: 前述实施方式 A 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌选自大肠杆菌、蟑螂埃希菌、弗格森埃希菌、赫尔曼埃希菌、伤口埃希菌、肠沙门菌、邦戈沙门菌、伤寒杆菌、猪霍乱沙门菌、鼠伤寒沙门菌、痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍特志贺菌、宋内志贺菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、奥氏耶尔森菌、伯氏耶尔森菌、弗氏耶尔森菌、中间耶尔森菌、克氏耶尔森菌、莫氏耶尔森菌、罗氏耶尔森菌、鲁氏耶尔森菌、弗劳地枸橼酸杆菌、科泽枸橼酸杆菌、布拉克枸橼酸杆菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、日勾维肠杆菌、坂崎肠杆菌、泰洛肠杆菌、河生肠杆菌、中间肠杆菌、阿氏肠杆菌、生癌肠杆菌、溶解肠杆菌、超压肠杆菌、黏质沙雷菌、嗜虫沙雷菌、无花果沙雷菌、泉居沙雷菌、格氏沙雷菌、液化沙雷菌、芳香沙雷菌、普城沙雷菌、龙眼斑沙雷菌、深红沙雷菌、解脲沙雷菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、产黏变形杆菌、潘氏变形杆菌、豪氏变形杆菌、摩根摩根菌、产碱普罗威登菌、鲁氏普罗威登菌、斯氏普罗威登菌、雷氏普罗威登菌、亨氏普罗威登菌、蜂房哈夫尼菌和成团泛菌。

实施方式 B27: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌是鼠伤寒沙门菌。

实施方式 B28: 实施方式 B27 的经修饰的细菌, 其中所述起始菌株是鼠伤寒沙门菌 SL7207。

实施方式 B29: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌表达野生型脂多糖(LPS)。

实施方式 B30: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有肿瘤的对象后, 所述细菌能够在肿瘤组织中存活并增殖但在正常组织中被快速清除。

实施方式 B31: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够抑制恶性肿瘤的生长。

实施方式 B32: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够诱导抗肿瘤特异性免疫应答。

实施方式 B33: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够诱导抗肿瘤免疫记忆。

实施方式 B34: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其不表达野生型鞭毛蛋白。

实施方式 B35: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其缺失 *fliC* 基因。

实施方式 B36: 前述实施方式 B 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 50% 至约 30%。

实施方式 B37: 实施方式 B1-B35 任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细

胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 30%至约 10%。

实施方式 B38: 实施方式 B1-B35 任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 10%至约 1%。

实施方式 C

实施方式 C1: 一种经修饰的鼠伤寒沙门菌细菌, 其中与未修饰的起始菌株相比, 所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒和 pH 调节性表达盒, 所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因, 所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因, 且所述细菌缺失至少一种参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因或其功能性表达产物。

实施方式 C2: 实施方式 C1 的经修饰的细菌, 其中所述严格低氧诱导型启动子选自 *pepTp*、*fnrSp*、*ysgAp*、*ssbp1*、*Hip1*、*BBa_I14018*、*BBa_R1074*、*Ptet-arcA* 和 *Ptet-Fnr*。

实施方式 C3: 实施方式 C1 的经修饰的细菌, 其中所述严格低氧诱导型启动子是 *ssbp1* 启动子。

实施方式 C4: 前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因的表达产物在所述细菌内负责 2,6-二氨基庚二酸(DAP)的合成, 且当在有氧条件下培养时, 所述细菌的生长依赖于培养基中额外添加的 DAP 或其类似物。

实施方式 C5: 实施方式 C4 的经修饰的细菌, 其中所述必需基因选自 *dapA*、*dapB*、*dapD*、*dapE*、*argD*、*dapF* 及其任意组合。

实施方式 C6: 实施方式 C4 的经修饰的细菌, 其中所述必需基因选自 *dapA* 和 *dapE*。

实施方式 C7: 前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 *HtrA* 丝氨酸蛋白酶家族基因。

实施方式 C8: 前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因的功能性表达产物是 *HtrA* 丝氨酸蛋白酶家族相关蛋白。

实施方式 C9: 前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌缺失 *HtrA* 丝氨酸蛋白酶活性。

实施方式 C10: 前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 *htrA*。

实施方式 C11: 前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌缺失 *htrA*。

实施方式 C12: 实施方式 C1-C11 任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因是所述细菌染色体中天然存在的基因, 其中所述必需基因的天然启动子被所述严格低氧诱导型启动子功能性置换, 由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 C13: 实施方式 C1-C11 任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因表达

盒是外源性的，且所述细菌染色体中天然存在的该必需基因被缺失或功能性失活，由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 C14：实施方式 C13 的经修饰的细菌，其中所述外源性必需基因表达盒整合于所述细菌的染色体。

实施方式 C15：实施方式 C13 的经修饰的细菌，其中所述外源性必需基因表达盒位于所述细菌的染色体之外。

实施方式 C16：实施方式 C15 的经修饰的细菌，其中所述外源性必需基因表达盒存在于所述细菌携带的质粒中。

实施方式 C17：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌来源的溶血素蛋白是革兰氏阴性细菌溶血素蛋白。

实施方式 C18：实施方式 C17 的经修饰的细菌，其中所述编码革兰氏阴性细菌溶血素蛋白的基因是 *hlyA* 或 *hlyE*。

实施方式 C19：实施方式 C18 的经修饰的细菌，其中所述 *hlyA* 或 *hlyE* 来自单核细胞增生李斯特菌、霍乱弧菌或大肠杆菌。

实施方式 C20：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在 pH 值低于 7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6 或 5.5 时有活性。

实施方式 C21：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子选自 *sseA*、*ssrA*、*ssaB*、*ssaG*、*ssaM* 和 *ssaR*。

实施方式 C22：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子是 *sseA*。

实施方式 C23：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中所述未修饰的起始菌株是兼性厌氧鼠伤寒沙门菌。

实施方式 C24：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中所述起始菌株是鼠伤寒沙门菌 SL7207。

实施方式 C25：实施方式 C1-C24 任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌表达野生型脂多糖(LPS)。

实施方式 C26：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中当施用于患有肿瘤的对象后，所述细菌能够在肿瘤组织中存活并增殖但在正常组织中被快速清除。

实施方式 C27：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后，所述细菌能够抑制恶性肿瘤的生长。

实施方式 C28：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后，所述细菌能够诱导抗肿瘤特异性免疫应答。

实施方式 C29：前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌，其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后，所述细菌能够诱导抗肿瘤免疫记忆。

实施方式 C30: 前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌, 其不表达野生型鞭毛蛋白。

实施方式 C31: 前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌, 其缺失 *fliC* 基因。

实施方式 C32: 前述实施方式 C 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 50% 至约 30%。

实施方式 C33: 实施方式 C1-C31 任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 30% 至约 10%。

实施方式 C34: 实施方式 C1-C31 任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 10% 至约 1%。

实施方式 D

实施方式 D1: 一种经修饰的细菌, 其中与未修饰的起始菌株相比, 所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒, 所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因, 且所述细菌缺失至少一种在巨噬细胞中存活所需的基因或其功能性表达产物。

实施方式 D2: 实施方式 D1 的经修饰的细菌, 其中所述严格低氧诱导型启动子选自 *pepTp*、*fmrSp*、*ysgAp*、*ssbp1*、*Hip1*、*BBa_I14018*、*BBa_R1074*、*Ptet-arcA* 和 *Ptet-Fnr*。

实施方式 D3: 实施方式 D1 的经修饰的细菌, 其中所述严格低氧诱导型启动子是 *ssbp1* 启动子。

实施方式 D4: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因的表达产物在所述细菌内负责 2,6-二氨基庚二酸(DAP)的合成, 且当在有氧条件下培养时, 所述细菌的生长依赖于培养基中额外添加的 DAP 或其类似物。

实施方式 D5: 实施方式 D4 的经修饰的细菌, 其中所述必需基因选自 *dapA*、*dapB*、*dapD*、*dapE*、*argD*、*dapF* 及其任意组合。

实施方式 D6: 实施方式 D4 的经修饰的细菌, 其中所述必需基因选自 *dapA* 和 *dapE*。

实施方式 D7: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在巨噬细胞中存活所需的基因是 *STM3120*、*STM3119*、*slyA*、*sifA*、*SPI-2*、*phoP* 或 *htrA* 基因。

实施方式 D8: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在巨噬细胞中存活所需的基因的功能性表达产物是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族相关蛋白。

实施方式 D9: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌缺失 HtrA 丝氨酸蛋白酶活性。

实施方式 D10: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在巨噬细胞中存活所需的基因是 *htrA*。

实施方式 D11: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌缺失 *htrA*。

实施方式 D12: 实施方式 D1-D11 任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因是所

述细菌染色体中天然存在的基因，其中所述必需基因的天然启动子被所述严格低氧诱导型启动子功能性置换，由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 D13：实施方式 D1-D11 任一项的经修饰的细菌，其中所述必需基因表达盒是外源性的，且所述细菌染色体中天然存在的该必需基因被缺失或功能性失活，由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 D14：实施方式 D13 的经修饰的细菌，其中所述外源性必需基因表达盒整合于所述细菌的染色体。

实施方式 D15：实施方式 D13 的经修饰的细菌，其中所述外源性必需基因表达盒位于所述细菌的染色体之外。

实施方式 D16：实施方式 D15 的经修饰的细菌，其中所述外源性必需基因表达盒存在于所述细菌携带的质粒中。

实施方式 D17：前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌，其进一步包含 pH 调节性表达盒，所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因。

实施方式 D18：实施方式 D17 的经修饰的细菌，其中所述细菌来源的溶血素蛋白是革兰氏阴性细菌溶血素蛋白。

实施方式 D19：实施方式 D18 的经修饰的细菌，其中所述编码革兰氏阴性细菌溶血素蛋白的基因是 *hlyA* 或 *hlyE*。

实施方式 D20：实施方式 D19 的经修饰的细菌，其中所述 *hlyA* 或 *hlyE* 来自单核细胞增生李斯特菌、霍乱弧菌或大肠杆菌。

实施方式 D21：实施方式 D17-D20 任一项的经修饰的细菌，其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在 pH 值低于 7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6 或 5.5 时有活性。

实施方式 D22：实施方式 D17-D21 任一项的经修饰的细菌，其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子选自 *sseA*、*ssrA*、*ssaB*、*ssaG*、*ssaM* 和 *ssaR*。

实施方式 D23：实施方式 D17-D21 任一项的经修饰的细菌，其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子是 *sseA*。

实施方式 D24：前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌，其中所述未修饰的起始菌株是兼性厌氧细菌。

实施方式 D25：前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌是肠杆菌科细菌。

实施方式 D26：前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌是埃希菌属、沙门菌属、志贺菌属、克雷伯菌属、耶尔森菌属、枸橼酸杆菌属、肠杆菌属、沙雷菌属、变形杆菌属、摩根菌属、普罗威登菌属、哈夫尼菌属或泛菌属细菌。

实施方式 D27: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌选自大肠杆菌、蟑螂埃希菌、弗格森埃希菌、赫尔曼埃希菌、伤口埃希菌、肠沙门菌、邦戈沙门菌、伤寒杆菌、猪霍乱沙门菌、鼠伤寒沙门菌、痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍特志贺菌、宋内志贺菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、奥氏耶尔森菌、伯氏耶尔森菌、弗氏耶尔森菌、中间耶尔森菌、克氏耶尔森菌、莫氏耶尔森菌、罗氏耶尔森菌、鲁氏耶尔森菌、弗劳地枸橼酸杆菌、科泽枸橼酸杆菌、布拉克枸橼酸杆菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、日勾维肠杆菌、坂崎肠杆菌、泰洛肠杆菌、河生肠杆菌、中间肠杆菌、阿氏肠杆菌、生癌肠杆菌、溶解肠杆菌、超压肠杆菌、黏质沙雷菌、嗜虫沙雷菌、无花果沙雷菌、泉居沙雷菌、格氏沙雷菌、液化沙雷菌、芳香沙雷菌、普城沙雷菌、龙眼斑沙雷菌、深红沙雷菌、解脲沙雷菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、产黏变形杆菌、潘氏变形杆菌、豪氏变形杆菌、摩根摩根菌、产碱普罗威登菌、鲁氏普罗威登菌、斯氏普罗威登菌、雷氏普罗威登菌、亨氏普罗威登菌、蜂房哈夫尼菌和成团泛菌。

实施方式 D28: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌是鼠伤寒沙门菌。

实施方式 D29: 实施方式 D28 的经修饰的细菌, 其中所述起始菌株是鼠伤寒沙门菌 SL7207。

实施方式 D30: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌表达野生型脂多糖(LPS)。

实施方式 D31: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有肿瘤的对象后, 所述细菌能够在肿瘤组织中存活并增殖但在正常组织中被快速清除。

实施方式 D32: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够抑制恶性肿瘤的生长。

实施方式 D33: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够诱导抗肿瘤特异性免疫应答。

实施方式 D34: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够诱导抗肿瘤免疫记忆。

实施方式 D35: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其不表达野生型鞭毛蛋白。

实施方式 D36: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其缺失 *fliC* 基因。

实施方式 D37: 前述实施方式 D 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 50% 至约 30%。

实施方式 D38: 实施方式 D1-D36 任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 30% 至约 10%。

实施方式 D39: 实施方式 D1-D36 任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞

胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 10%至约 1%。

实施方式 E

实施方式 E1: 一种经修饰的细菌, 其中与未修饰的起始菌株相比, 所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒和 pH 调节性表达盒, 所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因, 所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因, 其中所述细菌表达野生型脂多糖(LPS), 且所述细菌缺失至少一种在巨噬细胞中存活所需的基因或其功能性表达产物。

实施方式 E2: 实施方式 E1 的经修饰的细菌, 其中所述严格低氧诱导型启动子选自 *pepTp*、*fmrSp*、*ysgAp*、*ssbp1*、*Hip1*、*BBa_I14018*、*BBa_R1074*、*Ptet-arcA* 和 *Ptet-Fnr*。

实施方式 E3: 实施方式 E1 的经修饰的细菌, 其中所述严格低氧诱导型启动子是 *ssbp1* 启动子。

实施方式 E4: 前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因的表达产物在所述细菌内负责 2,6-二氨基庚二酸(DAP)的合成, 且当在有氧条件下培养时, 所述细菌的生长依赖于培养基中额外添加的 DAP 或其类似物。

实施方式 E5: 实施方式 E4 的经修饰的细菌, 其中所述必需基因选自 *dapA*、*dapB*、*dapD*、*dapE*、*argD*、*dapF* 及其任意组合。

实施方式 E6: 实施方式 E4 的经修饰的细菌, 其中所述必需基因选自 *dapA* 和 *dapE*。

实施方式 E7: 前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在巨噬细胞中存活所需的基因是 *STM3120*、*STM3119*、*slyA*、*sifA*、*SPI-2*、*phoP* 或 *htrA* 基因。

实施方式 E8: 前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在巨噬细胞中存活所需的基因的功能性表达产物是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族相关蛋白。

实施方式 E9: 前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌缺失 HtrA 丝氨酸蛋白酶活性。

实施方式 E10: 前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在巨噬细胞中存活所需的基因是 *htrA*。

实施方式 E11: 前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌缺失 *htrA*。

实施方式 E12: 实施方式 E1-E11 任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因是所述细菌染色体中天然存在的基因, 其中所述必需基因的天然启动子被所述严格低氧诱导型启动子功能性置换, 由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 E13: 实施方式 E1-E11 任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因表达盒是外源性的, 且所述细菌染色体中天然存在的该必需基因被缺失或功能性失活, 由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式E14: 实施方式E13的经修饰的细菌, 其中所述外源性必需基因表达盒整合于所述细菌的染色体。

实施方式E15: 实施方式E13的经修饰的细菌, 其中所述外源性必需基因表达盒位于所述细菌的染色体之外。

实施方式E16: 实施方式E15的经修饰的细菌, 其中所述外源性必需基因表达盒存在于所述细菌携带的质粒中。

实施方式E17: 前述实施方式E中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌来源的溶血素蛋白是革兰氏阴性细菌溶血素蛋白。

实施方式E18: 实施方式E17的经修饰的细菌, 其中所述编码革兰氏阴性细菌溶血素蛋白的基因是 *hlyA* 或 *hlyE*。

实施方式E19: 实施方式E18的经修饰的细菌, 其中所述 *hlyA* 或 *hlyE* 来自单核细胞增生李斯特菌、霍乱弧菌或大肠杆菌。

实施方式E20: 前述实施方式E中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在酸性pH条件下具有活性的启动子在pH值低于7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6或5.5时有活性。

实施方式E21: 前述实施方式E中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在酸性pH条件下具有活性的启动子选自 *sseA*、*ssrA*、*ssaB*、*ssaG*、*ssaM* 和 *ssaR*。

实施方式E22: 前述实施方式E中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在酸性pH条件下具有活性的启动子是 *sseA*。

实施方式E23: 前述实施方式E中任一项的经修饰的细菌, 其中所述未修饰的起始菌株是兼性厌氧细菌。

实施方式E24: 前述实施方式E中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌是肠杆菌科细菌。

实施方式E25: 前述实施方式E中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌是埃希菌属、沙门菌属、志贺菌属、克雷伯菌属、耶尔森菌属、枸橼酸杆菌属、肠杆菌属、沙雷菌属、变形杆菌属、摩根菌属、普罗威登菌属、哈夫尼菌属或泛菌属细菌。

实施方式E26: 前述实施方式E中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌选自大肠杆菌、蟑螂埃希菌、弗格森埃希菌、赫尔曼埃希菌、伤口埃希菌、肠沙门菌、邦戈沙门菌、伤寒杆菌、猪霍乱沙门菌、鼠伤寒沙门菌、痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍特志贺菌、宋内志贺菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、奥氏耶尔森菌、伯氏耶尔森菌、弗氏耶尔森菌、中间耶尔森菌、克氏耶尔森菌、莫氏耶尔森菌、罗氏耶尔森菌、鲁氏耶尔森菌、弗劳地枸橼酸杆菌、科泽枸橼酸杆菌、布拉克枸橼酸杆菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、日勾维肠杆菌、坂崎肠杆菌、泰洛肠杆菌、河生肠杆菌、中间肠杆菌、阿氏肠杆菌、生癌肠杆菌、溶解肠杆菌、超压肠杆菌、黏质沙雷菌、嗜虫沙雷菌、无花果沙雷菌、泉居沙雷菌、格氏沙雷菌、液化沙

雷菌、芳香沙雷菌、普城沙雷菌、龙眼斑沙雷菌、深红沙雷菌、解脲沙雷菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、产黏变形杆菌、潘氏变形杆菌、豪氏变形杆菌、摩根摩根菌、产碱普罗威登菌、鲁氏普罗威登菌、斯氏普罗威登菌、雷氏普罗威登菌、亨氏普罗威登菌、蜂房哈夫尼菌和成团泛菌。

实施方式 E27：前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌是鼠伤寒沙门菌。

实施方式 E28：实施方式 E27 的经修饰的细菌，其中所述起始菌株是鼠伤寒沙门菌 SL7207。

实施方式 E29：前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌，其中当施用于患有肿瘤的对象后，所述细菌能够在肿瘤组织中存活并增殖但在正常组织中被快速清除。

实施方式 E30：前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌，其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后，所述细菌能够抑制恶性肿瘤的生长。

实施方式 E31：前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌，其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后，所述细菌能够诱导抗肿瘤特异性免疫应答。

实施方式 E32：前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌，其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后，所述细菌能够诱导抗肿瘤免疫记忆。

实施方式 E33：前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌，其不表达野生型鞭毛蛋白。

实施方式 E34：前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌，其缺失 *fliC* 基因。

实施方式 E35：前述实施方式 E 中任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 50% 至约 30%。

实施方式 E36：实施方式 E1-E34 任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 30% 至约 10%。

实施方式 E37：实施方式 E1-E34 任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 10% 至约 1%。

实施方式 F

实施方式 F1：一种经修饰的鼠伤寒沙门菌细菌，其中与未修饰的起始菌株相比，所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒和 pH 调节性表达盒，所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因，所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因，其中所述细菌表达野生型脂多糖(LPS)，且所述细菌缺失至少一种在巨噬细胞中存活所需的基因或其功能性表达产物。

实施方式 F2：实施方式 F1 的经修饰的细菌，其中所述严格低氧诱导型启动子选自 *pepTp*、*fnrSp*、*ysgAp*、*ssbp1*、*Hip1*、*BBa_I14018*、*BBa_R1074*、*Ptet-arcA* 和 *Ptet-Fnr*。

实施方式 F3: 实施方式 F1 的经修饰的细菌, 其中所述严格低氧诱导型启动子是 *ssbp1* 启动子。

实施方式 F4: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因的表达产物在所述细菌内负责 2,6-二氨基庚二酸(DAP)的合成, 且当在有氧条件下培养时, 所述细菌的生长依赖于培养基中额外添加的 DAP 或其类似物。

实施方式 F5: 实施方式 F4 的经修饰的细菌, 其中所述必需基因选自 *dapA*、*dapB*、*dapD*、*dapE*、*argD*、*dapF* 及其任意组合。

实施方式 F6: 实施方式 F4 的经修饰的细菌, 其中所述必需基因选自 *dapA* 和 *dapE*。

实施方式 F7: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在巨噬细胞中存活所需的基因是 *STM3120*、*STM3119*、*slyA*、*sifA*、*SPI-2*、*phoP* 或 *htrA* 基因。

实施方式 F8: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在巨噬细胞中存活所需的基因是参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因。

实施方式 F9: 实施方式 F8 的经修饰的细菌, 其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族基因。

实施方式 F10: 实施方式 F9 的经修饰的细菌, 其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因的功能性表达产物是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族相关蛋白。

实施方式 F11: 实施方式 F9 的经修饰的细菌, 其中所述细菌缺失 HtrA 丝氨酸蛋白酶活性。

实施方式 F12: 实施方式 F9 的经修饰的细菌, 其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 *htrA*。

实施方式 F13: 实施方式 F9 的经修饰的细菌, 其中所述细菌缺失 *htrA*。

实施方式 F14: 实施方式 F1-F13 任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因是所述细菌染色体中天然存在的基因, 其中所述必需基因的天然启动子被所述严格低氧诱导型启动子功能性置换, 由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 F15: 实施方式 F1-F13 任一项的经修饰的细菌, 其中所述必需基因表达盒是外源性的, 且所述细菌染色体中天然存在的该必需基因被缺失或功能性失活, 由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

实施方式 F16: 实施方式 F15 的经修饰的细菌, 其中所述外源性必需基因表达盒整合于所述细菌的染色体。

实施方式 F17: 实施方式 F15 的经修饰的细菌, 其中所述外源性必需基因表达盒位于所述细菌的染色体之外。

实施方式 F18: 实施方式 F17 的经修饰的细菌, 其中所述外源性必需基因表达盒存在于所述细菌携带的质粒中。

实施方式 F19: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌来源的溶

血素蛋白是革兰氏阴性细菌溶血素蛋白。

实施方式 F20: 实施方式 F19 的经修饰的细菌, 其中所述编码革兰氏阴性细菌溶血素蛋白的基因是 *hlyA* 或 *hlyE*。

实施方式 F21: 实施方式 F20 的经修饰的细菌, 其中所述 *hlyA* 或 *hlyE* 来自单核细胞增生李斯特菌、霍乱弧菌或大肠杆菌。

实施方式 F22: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子在 pH 值低于 7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6 或 5.5 时有活性。

实施方式 F23: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子选自 *sseA*、*ssrA*、*ssaB*、*ssaG*、*ssaM* 和 *ssaR*。

实施方式 F24: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子是 *sseA*。

实施方式 F25: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述起始菌株是鼠伤寒沙门菌 SL7207。

实施方式 F26: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有肿瘤的对象后, 所述细菌能够在肿瘤组织中存活并增殖但在正常组织中被快速清除。

实施方式 F27: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够抑制恶性肿瘤的生长。

实施方式 F28: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够诱导抗肿瘤特异性免疫应答。

实施方式 F29: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中当施用于患有恶性肿瘤的对象后, 所述细菌能够诱导抗肿瘤免疫记忆。

实施方式 F30: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其不表达野生型鞭毛蛋白。

实施方式 F31: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其缺失 *fliC* 基因。

实施方式 F32: 前述实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 50% 至约 30%。

实施方式 F33: 实施方式 F1-F31 任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 30% 至约 10%。

实施方式 F34: 实施方式 F1-F31 任一项的经修饰的细菌, 其中所述细菌在巨噬细胞中的存活水平为所述未修饰的起始菌株存活水平的约 10% 至约 1%。

实施方式 K

实施方式 K1: 药物组合物, 其包含有效量的前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌。

实施方式 K2: 实施方式 K1 的药物组合物, 其用于治疗恶性肿瘤。

实施方式 K3: 实施方式 K1 的药物组合物, 其用于在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤特异性免疫应答。

实施方式 K4: 实施方式 K1 的药物组合物, 其用于在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤免疫记忆。

实施方式 K5: 实施方式 K1 的药物组合物, 其用于预防或治疗恶性肿瘤的转移或复发。

实施方式 K6: 实施方式 K1 的药物组合物, 其用于治疗对既往的抗肿瘤治疗产生抗性或治疗失败的恶性肿瘤。

实施方式 K7: 实施方式 K1-K6 的药物组合物, 其中所述经修饰的细菌是活菌。

实施方式 L

实施方式 L1: 治疗恶性肿瘤的方法, 其包括给患有恶性肿瘤的对象施用有效量的前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌或实施方式 G 中任一项的药物组合物。

实施方式 L2: 在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤特异性免疫应答的方法, 其包括给所述对象施用有效量的前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌或实施方式 G 中任一项的药物组合物。

实施方式 L3: 在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤免疫记忆的方法, 其包括给所述对象施用有效量的前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌或实施方式 G 中任一项的药物组合物。

实施方式 L4: 预防或治疗恶性肿瘤的转移或复发的方法, 其包括给患有恶性肿瘤的对象施用有效量的前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌或实施方式 G 中任一项的药物组合物。

实施方式 L5: 预防或治疗恶性肿瘤转移或复发的方法, 其包括给患有恶性肿瘤转移或复发的对象或者具有恶性肿瘤转移或复发的高风险的对象施用有效量的前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌或实施方式 G 中任一项的药物组合物。

实施方式 L6: 治疗对既往的抗肿瘤治疗产生抗性或治疗失败的恶性肿瘤的方法, 其包括给患有对既往的抗肿瘤治疗产生抗性或治疗失败的恶性肿瘤的对象施用有效量的前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌或实施方式 G 中任一项的药物组合物。

实施方式 L7: 实施方式 L1-L6 的方法, 其中所述经修饰的细菌是活菌。

实施方式 M

实施方式 M1：前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌在制备用于治疗恶性肿瘤的药物中的用途。

实施方式 M2：前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌在制备用于在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤特异性免疫应答的药物中的用途。

实施方式 M3：前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌在制备用于在患有恶性肿瘤的对象中诱导抗肿瘤免疫记忆的药物中的用途。

实施方式 M4：前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌在制备用于预防或治疗恶性肿瘤的转移或复发的药物中的用途。

实施方式 M5：前述实施方式 A、实施方式 B、实施方式 C、实施方式 D、实施方式 E、或实施方式 F 中任一项的经修饰的细菌在制备用于治疗对既往的抗肿瘤治疗产生抗性 or 治疗失败的恶性肿瘤的药物中的用途。

实施方式 M7：实施方式 M1-M5 的用途，其中所述经修饰的细菌是活菌。

实施方式 N

实施方式 N1：实施方式 K 中任一项的药物组合物、实施方式 L 中任一项的方法、或实施方式 M 中任一项的用途，其中所述恶性肿瘤是神经系统、呼吸系统、消化系统、泌尿系统、生殖系统、造血系统、淋巴系统、内分泌系统或皮肤黏膜的恶性肿瘤。

实施方式 N2：实施方式 K 中任一项的药物组合物、实施方式 L 中任一项的方法、或实施方式 M 中任一项的用途，其中所述恶性肿瘤是肉瘤或癌。

实施方式 N3：实施方式 K 中任一项的药物组合物、实施方式 L 中任一项的方法、或实施方式 M 中任一项的用途，其中所述恶性肿瘤是实体瘤。

实施方式 N4：实施方式 K 中任一项的药物组合物、实施方式 L 中任一项的方法、或实施方式 M 中任一项的用途，其中所述恶性肿瘤选自神经胶质瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、鼻咽癌、口腔癌、舌癌、喉癌、头颈癌、黑色素瘤、支气管癌、肺癌、胸膜癌、食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、膀胱癌、前列腺癌、肾上腺瘤、甲状腺癌、甲状旁腺癌、垂体瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、骨癌和骨肉瘤。

实施方式 N5：实施方式 K 中任一项的药物组合物、实施方式 L 中任一项的方法、或实施方式 M 中任一项的用途，其中所述细菌、药物或药物组合物通过如下途径施用：静脉注射、瘤内注射、肌肉注射、皮下注射、腹腔注射、经脑内施用、胃肠道施用、体表施用、口腔黏膜施用、经鼻施用、经直肠施用、或经阴道施用。

实施例

以下实施例用于举例说明本发明的某些具体特征和/或实施方式。这些 实施例不应被解释为将本发明限制于所描述的具体特征或实施方式中。

实施例 1: 鼠伤寒沙门菌 SL7207 菌株的不同变体菌株的构建

1.1 以 *PsseA-hlyA-loxp-KnaR-loxp* 质粒(SEQ ID NO:9)和 *Pssbp1-dapE-Cm* 质粒(SEQ ID NO:10)作为模板, 通过 PCR 扩增获得目的片段。对于 *PsseA-hlyA-loxp-KnaR-loxp* 使用如下引物序列: 正向引物 TTCACAGAAAAGTGTGCCCCCTTCCATGGCGGAAGGGGACAAAGGTGAATTTGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCA (SEQ ID NO:11) 和反向引物 TCTGACGTACACAGCAATTTTGCCTTACCTGTTAATCGAGATTGAAACACCGAAGA AAGGCCACCCG (SEQ ID NO:12); 对于 *Pssbp1-dapE-Cm* 使用如下引物序列: 正向引物 TTGGTTTTCAGTGAATCCCGTTATCAGCAGTTTTTTTGATGAGGTGTAGTCTATTTGTCCTACTCAGGAGAGCG (SEQ ID NO:13) 和反向引物 CAATATTTTGCCAGCCAGTCCATGCTTATTTCTTACCGGAACGCTCACGAAGAAAGGCCACCCG (SEQ ID NO:14), 退火温度 55°C。目的片段 1 为 *PsseA-hlyA-loxp-KnaR-loxp* (SEQ ID NO:1), 目的片段 2 为 *Pssbp1-dapE-Cm* (SEQ ID NO:2)。

1.2 将含有 λ 噬菌体 Red 重组酶的 pSim6 质粒(BioVector NTCC Inc.:3574840)导入兼性厌氧沙门菌 SL7207 菌株(NCBI:ASM1320710v1), 制备含有 pSim6 质粒的 SL7207 菌株电转化感受态细胞 SL7207 (pSim6)。

1.3 将目的片段 1 通过电转化方法(E=18KV/cm)导入 SL7207 (pSim6)感受态细胞。利用 λ -red 同源重组技术将 SL7207 基因组中的 *dapE* 基因(调控细胞壁合成所必需的二氨基庚二酸的合成)替换为目的片段 1。具体为将含有 pSim6 质粒的靶菌株在 30°C 培养, 重组酶表达条件: 42°C, 15min; 在 PCR 引物上加入含有与靶基因位点上下游各 50bp 的同源臂, 在同源重组酶作用下, 完成同源重组过程, 获得 SL7207 ($\Delta dapE::PsseA-hlyA-KnaR$)菌株。

1.4 将含有 P1 噬菌体 Cre 重组酶的 Cre 质粒(Gene Bridges:A112)导入 SL7207 ($\Delta dapE::PsseA-hlyA-KnaR$)菌株, 重组去掉卡那霉素抗性, 得到 SL7207 ($\Delta dapE::PsseA-hlyA$)菌株。

1.5 将 pSim6 质粒导入 SL7207 ($\Delta dapE::PsseA-hlyA$)菌株; 制备 SL7207 ($\Delta dapE::PsseA-hlyA$) (pSim6)电转化感受态细胞。

1.6 将目的片段 2 通过电转化方法(E=18KV/cm)导入 SL7207 ($\Delta dapE::PsseA-hlyA$)

(pSim6)感受态细胞。利用 λ -red同源重组技术将SL7207 ($\Delta dapE::PsseA-hlyA$)基因组中的*htrA*基因(编码丝氨酸蛋白酶)替换为目的片段2, 获得DB-ZW1菌株, 其为*htrA*基因缺失, 具有*PsseA*控制的*hlyA*基因且*dapE*基因由严格低氧诱导型启动子*Pssbp1*控制的SL7207菌株 ($\Delta dapE::PsseA-hlyA$; $\Delta htrA::Pssbp1-dapE$ -Cm)。

1.7 制备 *PdapE-dapE-loxp-KnaR-loxp* PCR 产物, 其中使用正向引物 CAATATTTTGCCAGCCAGTCCATGCTTATTTCTCTTACCGGAACGCTCAATTTGTCCTACTCAG (SEQ ID NO:15) 和反向引物 TTGGTTTCAGTGAATCCCGTTATCAGCAGTTTTTTGATGAGGTGTAGTCTCGAAGA AAGGCCACCCG (SEQ ID NO:16), 退火温度为 60°C。利用 λ -red同源重组技术将 *PdapE-dapE-loxp-KnaR-loxp* PCR 产物(SEQ ID NO:4)通过电转化的方法(E=18KV/cm)转入DB-ZW1 (pSim6)感受态细胞, 以替换*Pssbp1-dapE*片段, 获得DB-ZW2菌株。其为*htrA*基因缺失, 具有启动子*PsseA*控制的*hlyA*基因且*dapE*基因由其天然启动子*PdapE*控制的SL7207菌株。

1.8 制备 *loxp-KnaR-loxp* PCR 产物, 其中使用正向引物 ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCGCCGATCATATTCAATAACCC (SEQ ID NO:17) 和反向引物 TTATTCGATTGGATTATCTACTTTTATTACTATATTTTCGGATAAAGCGTGGCTAGTGAA CCTCTTCGAGGG (SEQ ID NO:18), 退火温度为 55°C。利用 λ -red同源重组技术将 *loxp-KnaR-loxp* PCR 产物(SEQ ID NO:3)通过电转化的方法 (E=18KV/cm)转入DB-ZW1 (pSim6)感受态细胞, 以替换*hlyA*基因, 获得DB-ZW3菌株, 其为*htrA*基因缺失, *dapE*基因由严格低氧诱导型启动子*Pssbp1*控制且无*hlyA*基因的SL7207菌株。

1.9 制备 *PhtrA-htrA-loxp-aadA-loxp* 质粒 PCR 产物, 其中使用正向引物 GATAATGTATTACAGGTTGCTCCGGGCTTGAAAAAGTTAAATGACATCCATTTGTCCTACTCAGGAGAGC (SEQ ID NO:19) 和反向引物 AAAAGGAACCTTTTACCTTTTCGCCTTCCCGTTTCGTTCAACTTAGTATACGAAGAA AGGCCACCC (SEQ ID NO:20), 退火温度为 55°C。利用 λ -red同源重组技术将 *PhtrA-htrA-loxp-aadA-loxp* PCR 产物(SEQ ID NO:5)通过电转化的方法(E=18KV/cm)转入DB-ZW1 (pSim6)和DB-ZW3 (pSim6)感受态细胞, 插入至*attB*位点, 分别构建DB-ZW4和DB-ZW5菌株。其中DB-ZW4为具有由天然启动子控制的*htrA*基因, 由启动子*PsseA*控制的*hlyA*基因且*dapE*基因由启动子*Pssbp1*控制的SL7207菌株, DB-ZW5为具有由天然启动子控制的*htrA*基因, 无*hlyA*基因且*dapE*基因由启动子*Pssbp1*控制的SL7207菌株。

菌株构建方案如图1所示。通过PCR电泳证实了DB-ZW2、DB-ZW3、DB-ZW4和DB-ZW5菌株的成功构建。

实施例2: DB-ZW1 和 DB-ZW2 菌株在不同细胞内的生长特性

将 DB-ZW1 和 DB-ZW2 分别在 37°C 厌氧和有氧条件下利用 LB 肉汤进行培养,待生长至 OD₆₀₀ 为 0.2 时,5000rpm 离心收集细菌,PBS 洗涤后利用 Qiagen RNA 提取试剂盒(74106)提取 RNA,反转录后,利用 RT-qPCR 测量两个菌株中 *dapE* 的表达量。与带有天然启动子的菌株 DB-ZW2 相比,DB-ZW1 菌株可以在厌氧条件下更多地转录和表达 *dapE* 基因,而有氧条件下 DB-ZW1 菌株的 *dapE* 基因转录和表达显著减少(图 2A)。同时,在有氧条件下观察搭载厌氧基因线路的 DB-ZW1 菌株和无厌氧基因线路的 DB-ZW2 菌株的生长情况。将 DB-ZW1 和 DB-ZW2 分别在 37°C 有氧条件下利用 LB 肉汤进行培养,其中 DB-ZW1 培养基中加入 50μg/ml 的 DAP。当培养至 OD₆₀₀ 为 0.2 时,将两种细菌以 5000 rpm 离心收集,用 PBS 洗涤后取适量菌液加入到 2 cm 的玻璃底培养皿中,用琼脂糖胶垫压住菌液,于显微镜下观察。结果发现在培养大约 6 小时后,DB-ZW1 菌株所有细菌细胞发生裂解,细菌死亡,而未搭载厌氧基因线路的 DB-ZW2 菌株可以在有氧条件下存活并生长(图 2B)。此外,进一步测得在有氧环境添加 DAP 以及在厌氧环境的条件下 DB-ZW1 菌株的倍增时间约为 38 分钟(图 2C)。上述结果说明厌氧基因线路可以在不同的含氧条件下控制菌株的生长。

此外,在用于细胞培养的 6 孔板中每孔加入 2.5×10^6 个 Raw264.7 小鼠巨噬细胞(ATCC Number: TIB-71)或 MB49 小鼠膀胱癌细胞(Merck SCC148),在完全培养基(DMEM 基础培养基+10%胎牛血清+双抗)中置于 37°C 的 5% CO₂ 二氧化碳培养箱中过夜培养使细胞贴壁。取 2 个孔的细胞计数后,根据细胞数量分别加入 DB-ZW1 和 DB-ZW3 菌株(细菌计数后重悬在含有 50 μg/mL DAP 的 DMEM 基础培养基中),侵染比例为 50:1,共培养 15 分钟或 1 小时使细菌进入细胞。之后用 PBS 清洗细胞,加入含有 100 μg/mL 庆大霉素以及 50 μg/mL DAP 的 DMEM 基础培养基培养 1 小时后吸去上清,用 PBS 清洗细胞,收取细胞后破膜,通过涂板确定胞内存活的细菌数量。结果发现利用巨噬细胞和肿瘤细胞验证了搭载 pH 调节基因线路 *PsseA-hlyA* 的 DB-ZW1 菌株可以更快地被小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 清除,而在小鼠膀胱癌细胞系 MB49 中则呈现出良好的生长状态(图 3)。

实施例3: 不同变体菌株的体内分布

3.1 C57BL/6小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司,体重18g左右,饲养于无特定病原体(Specified Pathogen Free, SPF)环境中)皮下接种 1×10^6 个MB49小鼠膀胱癌细胞,建立小鼠膀胱癌皮下瘤模型。接种14-18天后,肿瘤体积为100 mm³左右时,开展实验。

3.2 将荷瘤小鼠分为PBS组、DB-ZW1组、DB-ZW2组、DB-ZW3组、DB-ZW4组、DB-ZW5组和SL7207组,共7组,每组3只小鼠。后6组荷瘤小鼠经小鼠尾静脉注射体积为125 μL的 1×10^7 CFU细菌。分别检测上述菌株在荷瘤小鼠正常组织器官中与肿瘤内的

数量分布。结果发现,注射后14天,与其他组菌株相比,只有DB-ZW1菌株可以在正常组织中被快速清除(图4A),同时能够在肿瘤内快速聚集(图4B)。失去厌氧调节基因线路 *Pssbp1-dapE* 或 pH 调节基因线路 *PsseA-hlyA* 或具有 *htrA* 基因会使 DB-ZW1 菌株在正常组织的清除速度变慢。

实施例 4: DB-ZW1 的变体菌株的构建

4.1 以 pBSK 质粒(Addgene: #67504)作为模板,通过 PCR 扩增获得目的片段 3、4 和 5, 分别为 *msbB*-HR-loxp-KnaR-loxp (SEQ ID NO:6, 正向引物: AGGTAGTACAGGGTTTGTCTCAGCATAAAGCCTCTCTTACGAGAGGCTTTATGCCGATCATATTCAATAACCC (SEQ ID NO:21); 反向引物: TCGCTACACTATTACAAATTCCTTTTCGCGTCAGCAGACCCTGGAAAAGCCTAGTGAACCTCTTCGAGGG (SEQ ID NO:22), 退火温度为 55°C); *lpp*-HR-loxp-KnaR-loxp (SEQ ID NO:7, 正向引物: CGGACAAAAAATGGCGCACGATGTGCGCCATTTTATATTGTGCGTCAAAGCCGATCATATTCAATAACCC (SEQ ID NO:23); 反向引物: AATACTTGTAACGCTACATGGAGATTAATCAATCTAGAGGGTATTAATACTAGTGAACCTCTTCGAGGG (SEQ ID NO:24), 退火温度为 55°C); 和 *fliC*-HR-loxp-KnaR-loxp (SEQ ID NO:8, 正向引物: GCTTTTCGCTGCCTTGATTGTGTACCACGTGTCGGTGAATCAATCGCCGGAGCCGATCATATTCAATAACCC (SEQ ID NO:25); 反向引物: ACGGTGAGAAACCGTGGGCAACAGCCCAATAACATCAAGTTGTAATTGATCTAGTGAACCTCTTCGAGGG (SEQ ID NO:26), 退火温度为 55°C)。

4.2 制备 DB-ZW1 菌株电转化感受态细胞,将 pSim6 质粒通过电转化方式转入 DB-ZW1 菌株。

4.3 制备 DB-ZW1 (pSim6)电转化感受态细胞,将培养至对数期的 DB-ZW1 (pSim6)菌液用预冷后的去离子水洗涤 2 次,再用等体积的 10%甘油洗涤一次,最后用 10%甘油重悬,每 5 毫升对数期菌液可制备成 100 微升电转感受态细胞。

4.4 将目的片段 3、4 和 5 分别导入 DB-ZW1 (pSim6)电转化感受态细胞。利用 λ -red 同源重组技术将 DB-ZW1 基因组中的 *msbB* 基因(编码脂质酰基转移酶, Gene ID:1253410)、*lpp* 基因(编码脂蛋白, Gene ID:1252895)和 *fliC* 基因(编码鞭毛蛋白, Gene ID:1253480)分别替换为目的片段 3、4 和 5, 获得 DB-ZW1 ($\Delta msbB$)菌株、DB-ZW1 (Δlpp)菌株和 DB-ZW1 ($\Delta fliC$)菌株。

通过 PCR 电泳证实了 DB-ZW1 ($\Delta msbB$)、DB-ZW1 (Δlpp)、DB-ZW1 ($\Delta fliC$)菌株的菌株的成功构建。

实施例5: DB-ZW1变体菌株的抑癌效果

C57BL/6小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 体重18g左右, 饲养于SPF环境中)皮下接种 1×10^6 个MB49小鼠膀胱癌细胞, 建立小鼠膀胱癌皮下瘤模型。接种14-18天后, 肿瘤体积为 100 mm^3 左右时, 开展实验。

小鼠分为PBS组、DB-ZW1组、DB-ZW1 ($\Delta msbB$)组、DB-ZW1 (Δlpp)组、DB-ZW1 ($\Delta fliC$)组和SL7207组, 共6组, 每组5只小鼠, 后5组荷瘤小鼠尾静脉接种体积为 $125 \mu\text{L}$ 的 1×10^7 CFU细菌。检测上述菌株在荷瘤小鼠正常组织器官与肿瘤内的分布、肿瘤体积变化、小鼠体重变化以及生存率。

5.1 细菌在荷瘤小鼠体内分布: DB-ZW1菌株、DB-ZW1 ($\Delta msbB$)、DB-ZW1 (Δlpp)、DB-ZW1 ($\Delta fliC$)注射14天后在正常组织中所有的细菌基本被完全清除, 而肿瘤内细菌数量达到 1×10^8 CFU/g (图5)。

5.2 肿瘤体积变化: 与注射PBS治疗的对照组相比, DB-ZW1菌株明显减小了肿瘤的体积, 并显著增加了小鼠的生存率, 但DB-ZW1- $\Delta msbB$ 、DB-ZW1- Δlpp 治疗效果明显弱于DB-ZW1, 而鞭毛蛋白缺失的DB-ZW1- $\Delta fliC$ 与DB-ZW1的治疗效果相当(图6A), SL7207组在死亡前肿瘤体积显著减小。

5.3 小鼠体重变化: DB-ZW1组和DB-ZW1- $\Delta fliC$ 组小鼠体重下降趋势相当, 表现出一过性下降, 随后稳定并回升。DB-ZW1- $\Delta msbB$ 组和DB-ZW1- Δlpp 组体重下降程度低于DB-ZW1组和DB-ZW1- $\Delta fliC$ 组(图6B), SL7207组体重显著且持续下降。

5.4 小鼠生存率: SL7207组在注射后7天内陆续死亡。PBS组、DB-ZW1- $\Delta msbB$ 组和DB-ZW1- Δlpp 组小鼠在注射12天后陆续死亡(注: 此三组动物因肿瘤体积过大, 因伦理学原因被处死)。实验周期内DB-ZW1组和DB-ZW1- $\Delta fliC$ 组无小鼠死亡(图6C)。

5.5 通过统计, DB-ZW1对小鼠MB49膀胱癌的治疗部分响应率达到了60% ($n=42$), 完全响应率达到36%, 这表明DB-ZW1对MB49具有很好的治疗效果(图6D)。

以上结果显示DB-ZW1和DB-ZW1- $\Delta fliC$ 具有治疗小鼠膀胱癌并提高其生存率的功效, 说明DB-ZW1内的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)在其治疗肿瘤的过程中发挥重要作用。在整个观察周期(35天)中, 仅DB-ZW1组和DB-ZW1- $\Delta fliC$ 组治疗后小鼠存活率为100%, 这表明DB-ZW1和DB-ZW1- $\Delta fliC$ 菌株具有很好的安全性。

实施例6: DB-ZW1对多种肿瘤模型具有抑癌效果

6.1 肿瘤模型的建立

C57BL/6小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 体重18g左右, 饲养于SPF环境中)皮下接种 1×10^6 个MB49小鼠膀胱癌细胞/B16黑色素瘤细胞(ATCC: CRL-6475), 建立小鼠膀胱癌/黑色素瘤皮下瘤模型。接种14-18天后, 肿瘤体积为 100 mm^3 左右时, 开展实验。利用DSS/AOM诱导原位形成结肠癌模型: 单次腹腔注射剂量 10 mg/kg 的AOM

后, 1周后饲喂含2.5%DSS饮水7天, 之后改为正常饮水14天, 此为DSS处理1个循环。DSS处理再进行3次循环, 以获得有结直肠癌的小鼠模型。

6.2 DB-ZW1在肿瘤和不同器官内的分布变化

将 1×10^7 CFU, 体积为125 μ L的DB-ZW1通过尾静脉注射到MB49膀胱癌荷瘤小鼠体内, 每组3只小鼠。观察到小鼠中大约90%的DB-ZW1在注射后1天(1 dpi)驻留在肿瘤中。在随后的2天内, 肿瘤中DB-ZW1的密度进一步升高100倍(达到 10^8 CFU/g), 并在随后的两周内维持在高水平。相比之下, 正常器官中的DB-ZW1密度在两周内稳步下降至 $<10^2$ CFU/g (图7A)。

为了进一步确定DB-ZW1是否优先在肿瘤中增殖, 向MB49膀胱癌荷瘤小鼠尾静脉注射 1×10^7 CFU, 体积为125 μ L的DB-ZW1细菌后的24小时内, 对细菌在不同器官中分布的数量进行了测定, 每组3只小鼠(图7B)。结果显示, DB-ZW1注射后在30分钟内迅速在小鼠体内扩散, 绝大部分DB-ZW1细胞(约99.9%)分布在肝脏、脾脏和血液中。而在注射后4 h内其数量显著减少, DB-ZW1总细胞数量减少约90%。随后, 肿瘤内DB-ZW1以 ~ 0.7 h⁻¹的生长速度呈指数级增殖, 在3天内达到饱和。而在正常器官中, DB-ZW1细胞的数量均稳步减少。DB-ZW1的这种特殊的肿瘤生长特征是确保以下研究结果有效性的关键。

6.3 DB-ZW1对膀胱癌、黑色素瘤和结肠癌的抑瘤效果

使用DB-ZW1对皮下膀胱癌、原位黑色素瘤和皮下及原位结肠癌小鼠进行治疗, 将 1×10^7 CFU, 体积为125 μ L的DB-ZW1通过尾静脉注射到荷瘤小鼠体内, 每组5只。如图8A-C所示, DB-ZW1明显减小了肿瘤的体积。此外, 利用DB-ZW1对原位结肠癌小鼠进行治疗还可明显减少小鼠结肠部位的肿瘤数量(图8D)。

实施例7: DB-ZW1在肿瘤快速增殖与其厌氧回路相关

以DB-ZW1为对照, 使用实施例2构建的无鞭毛的DB-ZW1- Δ *fliC*变体来验证细菌的肿瘤靶向定植是否与其运动能力有关。

7.1 肿瘤模型的建立

C57BL/6小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 体重18g左右, 饲养于SPF环境中)皮下接种 1×10^6 个MB49小鼠膀胱癌细胞, 建立小鼠膀胱癌皮下瘤模型。接种14-18天后, 肿瘤体积为100 mm³左右时, 开展实验。

7.2 DB-ZW1和变体DB-ZW1- Δ *fliC*的肿瘤靶向定植

将 10^7 CFU的DB-ZW1和变体DB-ZW1- Δ *fliC*通过尾静脉注射分别到MB49荷瘤小鼠体内, 每组3只小鼠。在注射后14天, 取出各个组织器官(心、肝脏、脾脏、肾、血、肿瘤)。称重、研磨后, 用PBS稀释, 并涂在LB平板上。放入37°C培养箱培养16-18小时后, 计数每个平板上的克隆数。结果发现, 运动能力很弱的DB-ZW1- Δ *fliC*也能在肿瘤内定植(图9)。此结果表明, DB-ZW1的肿瘤靶向效应不是由于细菌的运动性造成的, 而是与细菌在瘤内的定植以及快速增殖密切相关。

实施例8: DB-ZW1具有特异性激活记忆CD8⁺T细胞的作用

8.1 肿瘤模型的建立

C57BL/6小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 体重18g左右, 饲养于SPF环境中)皮下接种 1×10^6 个MB49小鼠膀胱癌细胞, 建立小鼠膀胱癌皮下瘤模型。接种14-18天后, 肿瘤体积为 100 mm^3 左右时, 开展实验。

8.2 DB-ZW1对记忆性CD8⁺T细胞的激活

解剖小鼠, 取出肿瘤引流淋巴结。研磨后, 通过40微米的滤网过滤制备成单细胞悬液。再经过抗体染色和流式分析检测肿瘤引流淋巴结中记忆性CD8⁺T细胞的含量。结果发现与PBS对照组的小鼠相比, DB-ZW1治疗小鼠的引流淋巴结中记忆性CD8⁺T细胞的含量显著增加(图10A)。利用 1×10^6 个B16-OVA黑色素瘤细胞接种小鼠, 发现小鼠引流淋巴结中增加的记忆性CD8⁺T细胞具有肿瘤抗原特异性(图10B)。再次皮下接种 1×10^6 个B16黑色素瘤细胞后, 经DB-ZW1治愈的黑色素瘤小鼠无肿瘤复发(图11A)。而再次皮下接种 1×10^6 个MB49膀胱癌细胞后, 经DB-ZW1治愈的黑色素瘤小鼠与首次皮下注射肿瘤细胞的小鼠一样有肿瘤生成(图11C)。上述结果说明DB-ZW1的抗肿瘤效果具有肿瘤记忆性。

8.3 DB-ZW1抑制转移瘤的作用

用含有 1×10^6 个B16细胞, 体积为 $125 \mu\text{L}$ 的细胞悬液以尾静脉注射的方式接种经DB-ZW1治愈的黑色素瘤小鼠, 18天后检测小鼠肺部肿瘤转移灶的形成情况。发现与首次诱导黑色素瘤的小鼠相比, 经DB-ZW1治愈的小鼠肺部重量明显较小(图11B)。

实施例9: DB-ZW1激活CD8⁺T细胞的抗肿瘤作用

9.1 肿瘤模型的建立

C57BL/6小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 体重18g左右, 饲养于SPF环境中)皮下接种 1×10^6 个MB49小鼠膀胱癌细胞, 建立小鼠膀胱癌皮下瘤模型。接种14-18天后, 肿瘤体积为 100 mm^3 左右时, 开展实验。

9.2 DB-ZW1对IFN γ ⁺CD8⁺T细胞的激活作用

用DB-ZW1和变体DB-ZW1- ΔmsbB 、DB-ZW1- Δlpp 分别治疗皮下接种MB49膀胱癌细胞的小鼠, 每组3只小鼠。检测了各组肿瘤微环境中IFN γ ⁺CD8⁺T细胞的含量, DB-ZW1治疗组小鼠肿瘤微环境中浸润的IFN γ ⁺CD8⁺T细胞数量明显高于PBS对照组和变体DB-ZW1- ΔmsbB 、DB-ZW1- Δlpp 治疗组(图12A)。

进行了CD8⁺T细胞与膀胱癌细胞系MB49, 黑色素瘤细胞系B16的体外共培养实验。从DB-ZW1治疗后的荷瘤小鼠的肿瘤中分离CD8⁺T细胞, 然后以5:1的比例与MB49或B16肿瘤细胞在37°C二氧化碳培养箱共同孵育5小时。通过测量从每个共培养孔收集的上清液中的乳酸脱氢酶释放(LDH)来测定对靶细胞杀伤效果。结果显示分离的CD8⁺T细胞对MB49细胞的杀伤作用显著高于对B16细胞的杀伤作用(图12B)。由此可见, DB-ZW1注

射后的瘤内CD8⁺T细胞对特定治疗的肿瘤细胞具有更强的杀伤作用。此结果表明, DB-ZW1通过特异性激活瘤内IFN γ ⁺CD8⁺T细胞发挥抗肿瘤效果。

实施例10: DB-ZW1激活肿瘤内的组织驻留型记忆性T细胞(TRM细胞)

10.1 肿瘤模型的建立

C57BL/6小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 体重18g左右, 饲养于SPF环境中)皮下接种 1×10^6 个MB49小鼠膀胱癌细胞, 建立小鼠膀胱癌皮下瘤模型。接种14-18天后, 肿瘤体积为100 mm³左右时, 开展实验。

10.2 DB-ZW1对TRM细胞的激活

检测了DB-ZW1治疗前后肿瘤微环境中CD62L-CD69⁺、CD62L-CD69⁺CD103⁺或CD62L-CD69⁺CD103⁻的CD8⁺T细胞的含量, 其中CD62L-CD69⁺CD8⁺T细胞为TRM细胞。结果发现, DB-ZW1治疗后的小鼠肿瘤引流淋巴结和肿瘤中CD8⁺T细胞中TRM细胞的比例以及TRM中IFN γ ⁺的细胞比例明显高于PBS对照组小鼠(图13)。

结果表明, DB-ZW1可通过特异性激活肿瘤内TRM细胞发挥抗肿瘤效果。

实施例11: DB-ZW1通过刺激巨噬细胞产生IL-10来激活CD8⁺T细胞

11.1 肿瘤模型的建立

C57BL/6小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 体重18g左右, 饲养于SPF环境中)皮下接种 1×10^6 个MB49小鼠膀胱癌细胞, 建立小鼠膀胱癌皮下瘤模型。接种14-18天后, 肿瘤体积为100 mm³左右时, 开展实验。

11.2 IL-10激活CD8⁺T细胞发挥抗肿瘤效应

利用anti-CD3抗体和DB-ZW1、DB-ZW1- Δ msbB、DB-ZW1- Δ lpp分别体外刺激瘤内分离的CD8⁺T细胞, 结果发现DB-ZW1、DB-ZW1- Δ msbB、DB-ZW1- Δ lpp都不能有效刺激CD8⁺T细胞的激活(图14)。进一步分别用DB-ZW1、DB-ZW1- Δ msbB、DB-ZW1- Δ lpp治疗小鼠膀胱癌皮下瘤, 并检测血清中各种炎症因子的含量。结果发现, DB-ZW1治疗组中IL-10的含量显著高于其它组(图15), 说明IL-10可能在DB-ZW1治疗肿瘤的过程中发挥重要作用。

为了证明细胞因子IL-10在DB-ZW1治疗肿瘤过程中的作用, 使用IL-10的中和抗体anti-IL-10 (BioXCell: #BE0049)和DB-ZW1治疗MB49诱发的膀胱癌小鼠。治疗7天后发现与PBS对照组相比, anti-IL-10抗体显著抑制DB-ZW1诱导的肿瘤部位IFN γ ⁺CD8⁺T细胞百分比的增加(图16A); 同时, 测量肿瘤体积发现与PBS对照组相比, DB-ZW1明显减小了肿瘤体积, 而anti-IL-10抗体显著抑制DB-ZW1诱导的肿瘤体积减小(图16B)。

11.3 DB-ZW1诱导原代巨噬细胞产生IL-10

流式分选小鼠骨髓细胞获得原代巨噬细胞, 使用DB-ZW1刺激体外培养的原代巨噬细胞。刺激结束后, 通过TRIzol试剂提取总RNA。逆转录获得cDNA后, 用qPCR检测IL-10

的转录本水平，采用标准曲线法计算基因的相对表达量，并归一化为Actb的表达水平。结果发现，DB-ZW1显著诱导原代巨噬细胞IL-10的表达(图17)。

以上结果表明，DB-ZW1通过刺激巨噬细胞产生IL-10，进而激活CD8⁺T细胞发挥抗肿瘤效应。

实施例12：DB-ZW1重塑瘤内免疫环境

将注射DB-ZW1治疗后的MB49膀胱癌小鼠肿瘤进行取样，并进行冰冻切片和免疫荧光染色。取出肿瘤后，浸泡在4%多聚甲醛组织固定液中固定5小时，再转移到30%蔗糖脱水12小时。包埋在OCT包埋剂里并放到-20℃冰箱冷冻。冰冻好的样品用冰冻切片机连续切出10 mm厚度的切片，放入-80℃保存。切片经丙酮固定10分钟后，晾干并恢复常温后再用对应的抗体进行染色，最后滴上含DAPI的抗荧光淬灭封片剂后盖上盖玻片，用指甲油封片。在荧光显微镜下观察切片并拍摄。结果发现大多数DB-ZW1定位于肿瘤切片的中心，且中性粒细胞聚集并围绕DB-ZW1形成环状结构(图18)。同时也发现，肿瘤内的T细胞和巨噬细胞在经过DB-ZW1治疗后也由瘤内的无序分布转变为有序的由外向内规则排序(图18)。进一步发现，中性粒细胞环状结构的形成与TME中IL-10的水平密切相关，使用相应的抗IL-10抗体，中性粒细胞明显的环状结构完全消失(图19A、B)，中性粒细胞和残留的DB-ZW1细胞在整个肿瘤切片的空间分布均匀且重叠，DB-ZW1密度显著下降。

在细菌治疗前3天开始通过尾静脉注射抗CSF1R抗体(50 mg/kg, BioXCell, BE0213)，每2至3天注射一次，直到实验终点，以耗尽肿瘤浸润的巨噬细胞，结果发现，中性粒细胞的环状结构消失(图19C)，肿瘤中的DB-ZW1密度也降低。这表明巨噬细胞能够保护细菌免受中性粒细胞吞噬。这些结果表明，DB-ZW1能够重塑瘤内免疫环境，存在于肿瘤中心的细菌吸引中性粒细胞，同时细菌通过刺激巨噬细胞产生IL-10来防御中性粒细胞。一旦IL-10被清除，中性粒细胞就会侵入肿瘤中心来消灭细菌。

实施例13：DB-ZW1在不同给药方式和给药剂量下的抗瘤效果

目前临床上常见的给药途径有皮下注射、静脉注射、口服、涂抹等，药物的给药途径同临床各类病症的治疗效果有着极为紧密的联系，若给药途径不同，同一种药物的药效有时差别极为巨大。鉴于DB-ZW1具有靶向肿瘤的特殊性，探索了瘤内注射和静脉注射两种方式对治疗效果的影响。首先，对DB-ZW1的给药途径和剂量进行了优化。如图20A所示，在使用 1×10^7 CFU DB-ZW1进行瘤内注射(i.t.)或静脉注射(i.v.)给药后的第14天，肿瘤内DB-ZW1的分布皆明显高于其他正常组织。静脉注射给药组的肿瘤抑制效果优于瘤内注射给药组(图20B)。

同时，也尝试使用灭活DB-ZW1进行肿瘤治疗(图21)，注射后第14天的肿瘤体积结果显示，灭活DB-ZW1具有一定的抑瘤效果，且随着注射剂量提高，抑瘤效果变得更好。

接下来,进一步探索了DB-ZW1的不同给药剂量对皮下荷MB49膀胱癌肿瘤小鼠治疗效果的影响(图22)。静脉注射DB-ZW1后第14天结果显示,当DB-ZW1数量低于 1×10^4 CFU时并没有治疗效果,而当DB-ZW1数量大于等于 1×10^5 CFU时开始产生效果, 1×10^6 CFU的DB-ZW1静脉注射效果较明显。

上述结果表明,DB-ZW1的给药途径和剂量与治疗效果之间有很密切的关系。此结果为未来DB-ZW1作为药物的实际应用提供了技术指导。

序列列表

SEQ ID NO:1: PsseA-hlyA-loxp-KnaR-loxp
TTCACAGAAAAGTGTGCCCCCTTCCATGGCGGAAGGGGACAAAGGTGAATTTGTCCTACTCAGGAGAGC
GTTCCACCGACAAACACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTTCGTTTATTTGATGCA
CTAGTGCCGATCATATTCAATAACCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTC
TGAAGAGGAGTTTACGTCCCATATGGAGTCCCGCTCAGAAGAAGTTCGTCAGAAGGCGATAGAAGGCGATG
CGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTC
AGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGA
ATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCC
TCGCCGTCGGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGCCGGCGCGAGCCCCCTGATGCTCTTCGTC
CAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGT
GGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTC
TCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCAGTTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCC
CGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTG
CCTCGTCTCTGAGTTTATTCAGGGCACCGGACAGGTTCGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCCCTGCGCT
GACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTC
CACCAAGCGGGCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCTGTCT
CTTGATCAGATCCTGATCCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGCGGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAG
GGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCCGACGTCATTGCGTTGCTAGCCCAAGCTTAG
GATCCGGAACCTTAAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGAAGAGGTTTC
ACTAGCTATCTAGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTT
CAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCCCGGGAACGGGATCCTGATCT
TGATCAGGCTGTGGGTGAGGCCACTCTTGGCATCGACACCAATGTGGGCCTTCATGCCAAGTGCCACTGA
TTGCCTTTCTTGGTCTGATGCATCTCCGGATCGCGTTGCTGCTCTTTGTTCTTGGTCGAGCTGGGTGCCTC
AATGATGGTGGCATCGACCAAGGTGCCTTGAGTCATCATGACGCCTGCTTCGGCCAGCCAGCGATTGATGG
TCTTGAACAATTGGCGGGCCAGTTGATGCTGCTCCAGAGGTGGCGGAAATTCATGATGGTGGTGCGGTCC
GGCAAGGCGCTATCCAGGGATAACCGGGCAACAGACGCATGGAGGCGATTTTCGTACAGAGCATCTTCCAT
CGCGCCATCGCTCAGGTTGTACCAATGCTGCATGCAGTGAATGCGTAGCATGGTTTCCAGCGGATAAGGTC
GCCGGCCATTACCAGCCTTGGGGTAAAACGGCTCGATGACTTCCACCATGTTTTGCCATGGCAGAATCTGC
TCCATGCGGGACAAGAAAATCTCTTTTCTGGTCTGACGGCGCTTACTGCTGAATTCAGTGTGCGCGAAGGT
AAGTTGATGACTCATGATGAACCCTGTTCTATGGCTCCAGATGACAAACATGATCTCATATCAGGGACTTG
TTCGCACCTTCCTTAGCACGTTAATTATCTATCGTGTATATGGAGGGGATCTAGAATGAAAAAATAATGC
TAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGCGCAACAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCA
TTCAATAAAGAAAATTCAATTTTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCGCCTGCAAGTCCCTAAGACGCCAAT
CGAAAAGAAACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGACTACAATAAAACAAATGTATTAG
TATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAATGAATATATTGTT
GTGGAGAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAATAATGCAGACATTCAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCT
AACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCAGATGTTCTCCCTGTAA
AACGTGATTCATTAACACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGACAATAAAATCGTTGTAAAA
AATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAATACATTAGTGAAAAGATGGAATGAAAAATATGCTCA
AGCTTATCCAAATGTAAGTGCAAAAATTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTG
CGAAATTTGGTACAGCATTTAAAGCTGTAATAATAGCTTGAATGTAACCTTCGGCGCAATCAGTGAAGGG
AAAAATGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAACGTGAATGTTAATGAACCTACAAGACC
TTCCAGATTTTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAATGCAGAAAATCCTC
CTGCATATATCTCAAGTGTGGCGTATGGCCGTCAAGTTTATTTGAAATTATCAACTAATTCCTATAGTACT
AAAGTAAAAGCTGCTTTTGATGCTGCCGTAAGCGGAAAATCTGTCTCAGGTGATGTAGAACTAACAAATAT

CATCAAAAATTCTTCTTCAAAGCCGTAATTTACGGAGGTTCCGCAAAAGATGAAGTTCAAATCATCGACG
GCAACCTCGGAGACTTACGAGATATTTTGAAGGCGCTACTTTAATCGAGAAACACCAGGAGTTCCC
ATTGCTTATACAACAACTTCTTAAAGACAATGAATTAGCTGTTATTAACAACTCAGAATATATTGA
AACAACTTCAAAGCTTATACAGATGGAAAAATTAACATCGATCACTCTGGAGGATACGTTGCTCAATTCA
ACATTTCTTGGGATGAAGTAAATTATGATCCTGAAGGTAACGAAATTGTTCAACATAAAAACTGGAGCGAA
AACATAAAAGTAAGCTAGCTCATTTACATCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCGAGAAATATTAATGT
TTACGCTAAAGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGAGAACGGTAATTGATGACCGGAACCTTACCAC
TTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGCGACCACGCTTTATCCGAAATATAGTAATAAGTAGATAAT
CCAATCGAATAAGTCGACCTCGAGGACTAGTGAACCTCTTCGAGGGACCTAATAACTTCGTATAGCATAACA
TTATACGAAGTTATATTAAGGGTTATTGAATATGATCGGCTCGAGATTACTTCGCATTGCAATCAGCTACG
GACTCAAGCTTACGTCAGGTCATACGATGAAGGCGATAAGTCGCGTAAGTTGCTAGCCACGCGGCTCACC
TTCACGGGTGGGCTTTCTTCGGTGTTTCAATCTCGATTAACAGGTAACGCAAAATTGCTGTGTACGTCAG
A

SEQ ID NO:2: Pssbp1-dapE-Cm

TTGGTTTCAGTGAATCCC GTTATCAGCAGTTTTTT GATGAGGTGTAGTCTATTTGTCCTACTCAGGAGAGC
GTTACCCGACAAACACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTTCGTTTATTTGATGCA
CTAGTGCCGATCATATTCAATAACCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTC
TGAAGAGGAGTTTACGTCCCATATGGAGTCCCGCTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGT
AATTCATTAAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCAT
CAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAGCGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGG
CCACGTTTAAATCAAACCTGGTGAACCTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAAC
CCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTTACCCTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCG
GAAATCGTCGTGGTATTCACCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAG
GGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGAAATTCCGGATGAGCATTTCATC
AGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGC
CGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTTCTT
TACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCATGCGAAACGATCCTCAT
CCTGTCTCTTGATCAGATCCTGATCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGCGCGCAAGAAAGCCATCCAGTTTAC
TTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCGACGTCATTGCGTTGCTAGCCA
AGCTTAGGATCCGGAACCCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGTCCCTCGAA
GAGTTTCACTAGCTATCTAGAGCTTGAGCTTGGACTCTGTGATAGATCCAGTAATGACCTCGGAACCTCCATCGG
ATTTGTTTCAAGCGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCCCGGGAACGGGATC
CTGATCTTGATCAACCGAGGTCACAACATAGTAAAAGCGCTATTGGTAATGGTACAATCGCGCGTTTACAC
TTATTCAAGACGATTTTTTTTTCAGGAGGGCCTACTTGTACACAGGACGGTAATGTCTGCGCCGGTTATTGA
GCTGACACAGCAACTTATTCGTGCCCCCTCCTGAGTCCGGATGACGCAGGCTGTCAGGCATTAATGATTG
AACGCTGCGTAAATCGGTTTTTACCATTGAGCATATGGATTTTGGCGACACGCAAAATTTTTGGGCATGG
CGTGGGCGTGGCGAAACGCTGGCGTTGCCGGGCATCTGACGTCGTACCGGCTGGCGATGTCGATCGCTG
GATCAATCCCGCTTTGAGCCTACGATTGCGGACGGAATGTTGTTGCGTGCAGCGCGGATATGAAAG
GTTCACTGGCGGCCATGGTGGTGGCTGCTGAACGTTTTTGTGCGCAGCATCCTCATCACCGGGGCCGCTC
GCATTTTTGATTACCTCTGATGAGGAAGCCAGCGCAAAAAATGGCACCGTAAAGGTGGTTGAAGCGCTGAT
GGCCCGTAACGAGCGGCTGGATTACTGTCTGGTGGCGAACCTTCCAGTACTGAAATTGTGGCGATGTCG
TCAAAAACGGGCGTTCGCGTTCTCTCACCTGTAACCTCACTATCCATGGCGTTTCAGGGGCAGCTCGCCTAT
CCGCATCTGGCGGATAACCCTGTTTCATCGCGCCGCGCCTTTTCTTAATGAAGTGGTTCGTATCGAGTGGGA
TCGGGGCAATGACTTTTTTCCCGGCCACCAGTATGCAGGTAGCCAATATCCAGGCAGGCACCGGCAGCAATA
ATGTCATTCCCGGCGAACTGTTCTGTGCAGTTTAACTTCCGTTTCAGCACGGAAGTACCGATGAGATGATC
AAAGAGCGGGTACATGCGCTGCTTGAAAAGCATCAGCTACGCTATACCGTAGACTGGTGGCTTTCCGGGCA
GCCGTTCTGACCGCACGCGGCAAGCTGGTGGACGCGGTGGTAAACGCCATTGAGCACTATAATGAAATTA
AACCGCAATTACTGACGACGGGCGGTACGTCCGACGACGTTTTTATCGCCGATGGGAGCGCAGGTGGTA
GAACTGGGGCCGGTGAACGCCACCATTCATAAAATTAATGAATGTGTGAATGCCGCGGATCTCCAGCTACT
GGCCCGTATGTATCAACGCATTATGGAACAGCTCGTCGCCCATCACCATCACCATCACTAAGATTACTTCG
CATTGCAATCAGCTACGGAAGCTTACGTCAGGTCATACGATGAAGGCGATAAGTCGCGTAAGTTGCT
AGCCACGCGGCTCACCTTCACGGGTGGGCTTTCTTCGTGAGCGTTCGGTAAGAGGAAATAAGCATGGA
CTGGCTGGCAAAATATTG

SEQ ID NO:3: loxp-knar-loxp

TTATTGATTGGATTATCTACTTTATTACTATATTTTCGGATAAAGCGTGGCTAGTGAACCTCTTCGAGGGA
CCTAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCCGGATCCTAAGCTTGGCTAGCA
ACGCAATGACGTCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGG

ATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATC
GTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCT
ATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCCG
GTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGCAGCGCGCTATCGTG
GCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGC
TATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCTGTCTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATG
GCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCG
CATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAGAGCATCAGG
GGCTCGCGCCGGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACC
CATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCG
GCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCG
AATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGC
CTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCCATATGGGACGTAAACTCCTCTTCAGACCTAATAACTTCGT
ATAGCATACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTATTGAATATGATCGGCGGTAGACTAACTAATATAAGT
GTAATAAAAACTAGCATTATTTTTTTTCAT

SEQ ID NO:4: PdapE-dapE-loxp-KnaR-loxp

CAATATTTTGCCAGCCAGTCCATGCTTATTTCTCTTACCAGGACGCTCAATTTGTCCTACTCAGGAGAGC
GTTACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCTGTTTATTTGATGCA
CTAGTGCCGATCATATCAATAACCCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTC
TGAAGAGGAGTTTACGTCCCATATGGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATG
CGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTC
AGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGA
ATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCC
TCGCCGTGCGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCCGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTCGTC
CAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGT
GGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGACGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTC
TCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGCGACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCC
CGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCCTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTG
CCTCGTCTGCAGTTCATTTCAGGGCACCGGACAGGTGCGTCTTGACAAAAAGAACCAGGCGCCCTGCGCT
GACAGCCGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTC
CACCCAAGCGGCCGGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCCTCGTCTCT
CTTGATCAGATCCTGATCCCTGCGCCATCAGATCCTTGCGCGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAG
GGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCCGACGTCATTGCGTTGCTAGCCAAGCTTAG
GATCCGGAACCTTAAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGAAGAGGTTTC
ACTAGCTATCTAGAGCTTGAGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAATCCATCTGGATTTGTT
CAGAACGCTCGGTTGCCCGCGGGCTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCCCGGGAAACGGGATCCTGATCT
TGATCAGGAACATGGCATTGATTATCGTTTTACGATTACCGTGTGGATGGCATAGACCTCCCTCTTCTTA
ATACCTTTTATTCGGAACCTCGGCTGGCAGCCTTTACTGAAATACGCGCGGCACAACATGGCCAAACTGGAT
GAAGGCCACCGCAGCGGGATTACCGATGCCGACTCCGCCGCTGCTCTCATGGTTGAACAGCCGGCAATCAT
CAAACGCCCATTGCTCTGCGCGCCCGGGAAGCCTATGCTGCTTGGTTTCAGTGAATCCCGTTATCAGCAGT
TTTTTATGAGGTGTAGTCTGGCCTACTTGTACACAGGACGGTAATGTCGTGCCCGGTTATTGAGCTGAC
ACAGCAACTTATTCGTGCCCCCTCCCTGAGTCCGGATGACGCAGGCTGTGAGGCATTAATGATTGAACGCC
TGCGTAAAATCGGTTTTACCATGAGCATATGGATTTTGCGGACACGCAAAATTTTGGGCATGGCGTGGG
CGTGGCGAAACGCTGGCGTTCGCCGGGCATACTGACGTCGTACCGGCTGGCGATGTCGATCGCTGGATCAA
TCCGCCGTTTTGAGCTACGATTTCGCGACGGAATGTTGTTCCGGTCGCGGCGCGGCGGATATGAAAGGTTTAC
TGCGCGCCATGGTGGTGGCTGCTGAACGTTTTGTTGCGCAGCATCCTCATACCGGGGCGCCCTCGCATTT
TTGATTACCTCTGATGAGGAAGCCAGCGCAAAAAATGGCACCGTAAAGGTGGTTGAAGCGCTGATGGCCCG
TAACGAGCGGCTGGATTACTGTCTGGTCGGCGAACCTTCCAGTACTGAAATTGTGGGCGATGTCGTCAAAA
ACGGGCGTCGCGGTTCTCTCACCTGTAACCTCACTATCCATGGCGTTCAGGGGCACGTCGCTATCCGCAT
CTGGCGGATAAACCTGTTTCATCGCGCCGCGCCTTTTCTTAATGAACTGGTCGCTATCGAGTGGGATCGGGG
CAATGACTTTTTCCCGGCCACAGTATGCAGGTAGCCAATATCCAGGCAGGCACCGGCAGCAATAATGTCA
TTCCCGGCGAATGTTTCGTGCAGTTTAACTTCCGTTTCAGCACGGAATGACCGATGAGATGATCAAGAG
CGGGTACATGCGTGCTTGAAAAGCATCAGCTACGCTATACCGTAGACTGGTGGCTTTCCGGGCAGCCGTT
CCTGACCGCACGCGGCAAGCTGGTGGACGCGGTGGTAAACGCCATTGAGCACTATAATGAAATTAACCCGC
AATTACTGACGACGGGCGGTACGTCCGACGGACGTTTATCGCCCGTATGGGAGCGCAGGTGGTAGAACTG
GGGCCGGTGAACGCCACCATTCATAAAATTAATGAATGTGTGAATGCCGCCGATCTCCAGCTACTGGCCCG
TATGTATCAACGCATTATGGAACAGCTCGTCGCCCATCACCATCACCATCACTAAGATTACTTCGCATTGC
AATCAGCTACGGAAGCTTACGTACGGTCATACGATGAAGGCGATAAGTCGCGTAAGTTGCTAGCCCA

CGCGGCTCACCTTCACGGGTGGGCCTTTCTTCGAGACTACACCTCATCAAAAAACTGCTGATAACGGGATT
CACTGAAACCAA

SEQ ID NO:5: PhtrA-htrA-loxp-aadA-loxp

GATAATGTATTACAGGTTGCTCCGGGCTTGAAAAAGTTAAATGACATCCATTTGTCCTACTCAGGAGAGC
GTTACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTATTTGATGCA
CTAGTGCCGATCATATTCAATAACCCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTC
TGAAGAGGAGTTTACGTCCCATATGGAGTCCCGCCTTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTTAC
GTAGTGACAAATCTCTCCAAGTATGCTGCGCGGAGGCCAAGCGATCTTCTTCTTGTCCAAGATAAGCCT
GTCTAGCTTCAAGTATGACGGGCTGATACTGGGCCGGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCC
TTCGGCGCGATTTTTCGGGTTACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTGCTCATC
GCCAGCCCAGTCGGGCGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTTCAG
GAACCGGATCAAAGAGTTTCTCCGCCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCTCTTGCTTTTGTGAGC
AAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCATTC
TCCAAATTGCAGTTTCGGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACTT
CTACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGC
CGCGTTGTTTTATCAAGCCTTACGGTCAACGTAACAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCC
ATCCACTGCGGAGCCGTACAAATGTACGGCCAGCAACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTA
CCTCTGATAGTTGAGTCGATACTTCGGCGATCACCGCTTCCCTCATGACATTGCACTCCACCGCTGATGAC
ATCAGTCGATCATAGCACGATCAACGGCACTGTTGCAAATAGTCGGTGGTGATAAACTTATCATCCCTTTT
TGCTGATGGAGCTGCACATGAAGTCGAGACGTCATTGCGTTGCTAGCCAAAGCTTAGGATCCGGAACCCCTTA
ATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGAAGAGGTTCACTAGCTATCTAGAG
CTTGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTGAGAACGCTCGGTTG
CCGCCGGCGTTTTTTTATTTGGTGAGAATCCAGCCTTATCGCTGTGCGTTGATTACAGGATTATATCAGCGG
GATGACTGACCTTTACGCATGGGATGAATATCGGCGTTTATGATGGCGGTGCAACAGTAAATGGACTTTTGTA
AAGATGGACAATAAATTTTTACTTTTTTCCAGAACTTTATTCGGAACCTTCGCGTTATAAAATGAATCTGA
CGTACACAGCAATTTTTCGTTACCTGTTAATCGAGATTGAAACACATGAAAAAACACATTAGCAATGAG
TGCCTGGCTCTGAGTTAGGTTTGGCATTGTCGCTCTGTCTGCCACGGCGGCTGAAACGTCCTCTTCAG
CAATGACTGCCAGCAGATGCCAAGCCTGGCACCGATGCTCGAAAAAGTGATGCCATCGGTGGTCAGTATT
AATGTTGAAGGTAGCACACGGTGAATACGCCGCGTATGCCGCGTAATTTCCAGCAGTTCTTTGGCGATGA
CTCCCGGTTCTGCCAGGACGGTTCTCCGTTCCAGAACTTCTCCGTTCTGCCAGGGCGGTAACGGCGGCA
ACGCCGGTCAACAACAGAAATTATGGCGCTGGGCTCCGGCGTAATTTATGACGCCGCGAAGGGCTACGTC
GTCACCAACAACCACGTGGTTGATAACGCCAGCGTGATTAAAGTACAGCTTAGCGATGGGCGTAAATTCGA
TGCTAAAGTGGTGGGCAAAGATCCGCGTTCTGATATCGCGCTGATTCAAATTCAGAATCCGAAGAACCTGA
CGCGGATTAAGCTGGCGGACTCCGACGCGCTGCGCGTGGGGGATTATACCGTCGCTATTGGTAACCCGTTT
GGTCTGGGCGAAACGGTGACGTACGGTATCGTTTCGGCGCTGGGGCGTAGCGGCCTGAACGTAGAAAATTA
CGAGAACTTTATTCAGACCGACGCCGCGATTAAACCGTGTAACCTCCGGCGGCGCGCTGGTGAACCTGAACG
GTGAGCTGATCGGTATTAACACCGCGATTCTGGCGCCGGACGGCGGCAACATCGGTATCGGCTTCGCTATC
CCCAGTAACATGGTGAAAAACCTGACGTGCGAGATGGTGGAATACGGCCAGGTGAAACGCGGCAACTGGG
GATCATGGGACTGAGCTGAATTCGAATTGGCGAAAGCGATGAAAGTCGACGCCAGCGAGGCGCGTTTCG
TCAGCCAGGTGATGCCGAATTCGTCCGCGGCGAAAGCGGGTATCAAAGCCGGGGATGTCATTACCTCGCTG
AACGGTAACCGATCAGCAGCTTTGCGGCGCTGCGCGCTCAGGTGCGCACTATGCCGGTCGGCAGCAAAAT
CAGCCTCGGTCTGCTGCGTGAAGGTAAAGCGATTACGGTGAATCTGGAAGTCGACGAGAGCAGCCAGAGTC
AGGTTGATTCCAGCACCATCTTCAGCGGGATTGAAGGCGCTGAAATGAGCAATAAAGGCCAGGATAAAGGC
GTTGTGGTGAGCAGCGTGAAAGCGAACTCACCCGCCGCGCAAATTTGGCCTCAAAAAAGGCATGTGATTAT
CGGCGCTAACCAGCAGCCGGTGAAAAATATCGCCGAGCTGCGTAAGATTCTCGACAGCAAGCCGTCGGTTC
TGGCGCTGAATATTCAGCGTGGTGATAGTTCTATTTATTTGCTGATGCAGTAAGAAGTCGCGTAAGTTGCT
AGCCACGCGGCTCACCTTCACGGGTGGGCCTTTCTTCGTATACTAAGTTGAACGAAACGGGAAGGCGAAA
AGGTAAGTTCCTTTT

SEQ ID NO:6: Msbb-HR-loxp-KnaR-loxp

AGGTAGTACAGGGTTTGTGAGCATAAAGCCTCTCTTACGAGAGGCTTTATGCCGATCATATTCAATAACCC
TTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCTGAAGAGGAGTTTACGTCCCATATGG
AGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACC
GTAAAGCACGAGGAAGCGGTACGCCATTCGCCGCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTA
TGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCGCACATCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACC
ATGATATTTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTGGGCGATGCGCGCCTTGAG
CCTGGCGAACAGTTTCGGCCGGCGGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGG
CTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATCA

AGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAG
GAGATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAG
CTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCCTGCAGTTCATTTCAGGGCA
CCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAACC GGCGCCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGA
GCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGCGT
GCAATCCATCTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCTTGATCAGATCCTGATCCCCTGCGC
CATCAGATCCTTGCGGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGC
CCCAGCTGGCAATTCCGACGTCATTGCGTTGCTAGCCAAGCTTAGGATCCGGAACCTTAATATAACTTCG
TATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGAAGAGGTTCACTAGGCTTTTCCAGGGTCTGCTGAC
CGAAAAAGGAATTGTGAATAGTGTAGCGA

SEQ ID NO:7: Lpp-HR-loxp-Knar-loxp

CGGACAAAAAATGGCGCACGATGTGCGCCATTTTATATTGTGCGTCAAAGCCGATCATATTCAATAACCC
TTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCTGAAGAGGAGTTTACGTCCCATATGG
AGTCCCCTCAGAGAAGTTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACC
GTAAAGCACGAGGAAGCGGTACGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCCAACGCTA
TGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACC
ATGATATTTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTGCGGCATGCGCGCCTTGAG
CCTGGCGAACAGTTCGGCCGGCGCGAGCCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGG
CTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATCA
AGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAG
GAGATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAG
CTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCCTGCAGTTCATTTCAGGGCA
CCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAACC GGCGCCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGA
GCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGCGT
GCAATCCATCTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCTTGATCAGATCCTGATCCCCTGCGC
CATCAGATCCTTGCGGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGC
CCCAGCTGGCAATTCCGACGTCATTGCGTTGCTAGCCAAGCTTAGGATCCGGAACCTTAATATAACTTCG
TATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGAAGAGGTTCACTAGTATTAATACCCTCTAGATTGA
GTTAATCTCCATGTAGCGTTACAAGTATT

SEQ ID NO:8: fliC-HR-loxp-KnaR-loxp

GCTTTCGCTGCCTTGATTGTGTACACGTGTCGGTGAATCAATCGCCGGAGCCGATCATATTCAATAACCC
TTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCTGAAGAGGAGTTTACGTCCCATATGG
AGTCCCCTCAGAGAAGTTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACC
GTAAAGCACGAGGAAGCGGTACGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCCAACGCTA
TGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACC
ATGATATTTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTGCGGCATGCGCGCCTTGAG
CCTGGCGAACAGTTCGGCCGGCGCGAGCCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGG
CTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATCA
AGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAG
GAGATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAG
CTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCCTGCAGTTCATTTCAGGGCA
CCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAACC GGCGCCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGA
GCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGCGT
GCAATCCATCTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCTTGATCAGATCCTGATCCCCTGCGC
CATCAGATCCTTGCGGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGC
CCCAGCTGGCAATTCCGACGTCATTGCGTTGCTAGCCAAGCTTAGGATCCGGAACCTTAATATAACTTCG
TATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGAAGAGGTTCACTAGATCAATTACAACCTTGATGTTA
TTGGGCTGTTGCCACGGTTTCTCACCCT

SEQ ID NO:9: PsseA-hlyA-loxp-KnaR-loxp 质粒

CATGGTCATAGCTGTTTCTTTAATGCCCATGGCGTTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAG
CGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC
TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCAGCTTCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAAT
AAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTA
ATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACA
GGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGT
TACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGT

TGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC
TTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATATTGGAAAAC
GTCTTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA
CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGC
CGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAA
GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGG
GTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTA
TAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTAGGCCAAATAGGCCGTTTCCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATG
TTCTCTAGTGTGGTTCGTTGTTTTTGGGTGAGCCATGAGAACGAACCATTGAGATCATGCTTACTTTGCAT
GTCACTCAAAAATTTTGCCTCAAAACTGGTGAGCTGAATTTTTGTCAGTTAAAGCATCGTGTAGTGTTC
TTAGTCCGTTACGTAGGTAGGAATCTGATGAATGGTGTGGTATTTTGTACCATTCAATTTTATCTGG
TTGTTCTCAAGTTCGGTTACGAGATCCATTGTCTATCTAGTTCAACTTGGAAAATCAACGTATCAGTCGG
GCGGCTCGCTTATCAACCACCAATTTTCAATTTGCTGTAAGTGTTTAAATCTTTACTTATTGGTTTCAAAA
CCCATTTGGTTAAGCCTTTTAAACTCATGGTATGTTTCAAGCATTAACATGAACCTTAAATTCATCAAGG
CTAATCTCTATATTTGCCTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTTAGTTCTTTTAAATAACCCTCATATAAATCCTCAT
AGAGTATTTGTTTTCAAAAGACTTAACATGTTCCAGATTATATTTTATGAATTTTTTAACTGGAAAAGAT
AAGGCAATATCTCTTCACTAAAACTAATTTCAATTTTTCGCTTGAGAACTTGGCAGTATTTGTCCACTGG
AAAATCTCAAAGCCTTTAACCAGGATTCTGATTTCCACAGTCTCGTCATCAGCTCTCGGTTGCTTT
AGCTAATACACCATAAGCATTTTCCCTACTGATGTTTCATCATCTGAGCGTATTGGTTATAAGTGAACGATA
CCGTCCGTTCTTTCTTGTAGGGTTTTCAATCGTGGGGTTGAGTAGTGCCACACAGCATAAAATTAGCTTG
GTTTCATGCTCCGTTAAGTCATAGCGACTAATCGCTAGTTTCAATTTGCTTTGAAAACAATAATCAGACAT
ACATCTCAATTGGTCTAGGTGATTTTAACTACTATACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAG
TCCTTTTCTTTGAGTTGTGGGTATCTGTAAATCTGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCTGTAAATTTCTGCT
AGACCTCTGTAAATTCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTTTGTTTATATTCAAGTGGTTATAATTTATAG
AATAAGAAAGAATAAAAAAGATAAAAAAGAATAGATCCCAGCCCTGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAG
TTCCGCAGTATTACAAAAGGATGTCGCAAAACGCTGTTTGTCTCTACAAAACAGACCTTAAACCCCTAAA
GGCTTAAGTAGCACCTTCGCAAGCTCGGGCAAATCGCTGAATATTCCTTTTGTCTCCGACCATCAGGCACC
TGAGTCGCTGTCTTTTTCTGTGACATTCAGTTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAATGG
CACTACAGGCGCCTTTTATGGATTTCATGCAAGGAACTACCCATAATAACAAGAAAGCCGTCACGGGCTT
CTCAGGCGCTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTCTATCTGACTTTTTGCTGTTTTCAGCAGTCTCTGCCC
CTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCCTGACAGGTCATTTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAA
GGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGCTTACTGTCAAGAGGACATCCGGTCAGATAACCGTCATCTT
CGCTACTGTCTAGGGCGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAACGA
AAGGCCAGTCTTTTCGACTGAGCCTTTCTGTTTTATTTGATGCACTAGTGCCGATCATATTCAATAACCCCT
AATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCTGAAGAGGAGTTTACGTCCCATATGGAG
TCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGT
AAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCCATTCGCGGCTCAAGCTCTTCAGCAATATCAGGGTAGCCAACGCTATG
TCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCAT
GATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCGCGCCTTGAGCC
TGCGCAACAGTTTCGGCCGGCGGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCT
TCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAG
CGTATGCAGCCGCGCATTCGATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGA
GATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCT
GCGCAAGGAACGCCGCTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCCTGCTCTGCAGTTTATTTCAGGGCACC
GGACAGGTGCGTCTTGACAAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGC
AGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGCGTGC
AATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCATCTGTCTCTTGATCAGATCCTGATCCCTGCGCCA
TCAGATCCTTGGCGGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCC
CAGCTGGCAATTCCGACGTCATTGCGTTGTAGCCAAGCTTAGGATCCGGAACCCCTAATATAACTTCGTA
TAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGAAGAGGTTCACTAGCTATCTAGAGCTTGGACTCCTGT
TGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAAGACGCTCGGTTGCCCGGGCGTTT
TTTATTGGTGAGAAATCAAGCCCGGAAACGGGATCCTGATCTTGATCAGGCTGTGGGTAGGCCACTCTT
GGCATCGACACCAATGTGGGCCTTCATGCCAAAGTGCCACTGATTGCCTTTCTTGGTCTGATGCATCTCCG
GATCGCGTTGCTGCTCTTTGTTCTTGGTTCGAGCTGGGTGCCTCAATGATGGTGGCATCGACCAAGGTGCCT
TGAGTCATCATGACGCCTGCTTCGGCCAGCCAGCGATTGATGGTCTTGAACAATTGGCGGGCCAGTTGATG
CTGCTCCAGCAGGTGGCGGAAATTCATGATGGTGGTGGCGTCCGGCAAGGCGCTATCCAGGGATAACCGGG
CAAACAGACGCATGGAGGCGATTTTCGTACAGAGCATCTTCATCGCGCCATCGCTCAGGTTGTACCAATGC
TGCATGCAGTGAATGCGTAGCATGGTTTCCAGCGGATAAGGTGCGCGGCATTACCAGCCTTGGGGTAAAA
CGGCTCGATGACTTCCACCATGTTTTGCCATGGCAAGATCTGCTCCATGCGGGACAAGAAAATCTCTTTTC

TGGTCTGACGGCGCTTACTGCTGAATTCACCTGTCGGCGAAGGTAAGTTGATGACTCATGATGAACCCTGTT
CTATGGCTCCAGATGACAAACATGATCTCATATCAGGGACTTGTTTCGCACCTTCCTTAGCACGTTAATTAT
CTATCGTGTATATGGAGGGGATCTAGAATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAG
TCTACCAATTGCGCAACAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCATAAAAGAAAATTCAAATTTTCATCCA
TGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGATGAAATCGAT
AAGTATATACAAGGATTGGACTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGT
GCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCCATCAATC
AAAATAATGCAGACATTCAGGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCG
AATTCGGAATTAGTAGAAAAATCAACCAGATGTTCTCCCTGTAAAACGTGATTCATTAACACTCAGCATTGA
TTTGCCAGGTATGACTAATCAAGACAATAAAATCGTTGTAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACG
CAGTAAATACATTAGTGAAAAGATGGAATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAAGTCAAAAAATT
GATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTGCGAAAATTTGGTACAGCATTTAAAGCTGT
AAATAATAGCTTGAATGTAAACTTCGGCGCAATCAGTGAAGGGAAAAATGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTA
AACAAATTTACTATAACGTGAATGTTAATGAACCTACAAGACCTTCAGATTTTTTCGGCAAAGCTGTTACT
AAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAATGCAGAAAAATCCTCCTGCATATATCTCAAGTGTGGCGTATGG
CCGTCAAGTTTATTTGAAATTATCAACTAATTTCCCATAGTACTAAAGTAAAAGCTGCTTTTGATGCTGCCG
TAAGCGGAAAATCTGTCTCAGGTGATGTAGAATAACAAATATCATCAAAAAATTTCTCCTTCAAAGCCGTA
ATTTACGGAGGTTCCGCAAAAGATGAAGTTCAAATCATCGACGGCAACCTCGGAGACTTACGAGATATTTT
GAAAAAAGGCGCTACTTTTAATCGAGAAACACCAGGAGTTCCCATTGCTTATACAACAAACTTCCTAAAAG
ACAATGAATTAGCTGTTATTA AAAACAACCTCAGAATATATTGAAACAACCTTCAAAGCTTATACAGATGGA
AAAATTAACATCGATCACTCTGGAGGATACGTTGCTCAATTCACATTTCTTGGGATGAAGTAAATTATGA
TCCTGAAGGTAAACGAAATTTGTTCAACATAAAAACCTGGAGCGAAAAACAATAAAAGTAAGCTAGCTCATTTCA
CATCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCGAGAAAATATTAATGTTTACGCTAAAGAATGCAGCTGGTTTAGCT
TGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACCGGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTG
GGGCACCACGCTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAATAAGTCGACCTCGAGGACT
AGTGAACCTCTTCGAGGGACCTAATAAATTCTGTATAGCATACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTATTG
AATATGATCGGCTCGAGATTACTTCGCATTGCAATCAGCTACGGACTCAAGCTTACGTCAGGTCATACGAT
GAAGGCGATAAGTCGCGTAAGTTGCTAGCCACGCGGCTCACCTTCACGGGTGGGCCTTTCTTCGCGATCC
ACATG

SEQ ID NO:10: Pssbp1-dapE-Cm 质粒

CATGGTCATAGCTGTTTCCTTTAATGCCCATGGCGTTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAG
CGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC
TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGACTTCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAAT
AAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTA
ATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACA
GGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACAGTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGT
TACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGCAAGAAGT
TGCCCGCAGTGTTATCACTCATGTTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACTGTCAATGCCATCCGTAAGA
TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC
TTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAC
GTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA
CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGC
CGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACCTACTCTTCTCTTTTCAATATTATTGAA
GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGG
GTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATTCATGACATTAACTTA
TAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTAGGCCAAATAGGCCGTTTCAGATCCTTCCGTATTTAGCCAGTATG
TTCTCTAGTGTGGTTCGTTGTTTTTGCCTGAGCCATGAGAACGAACCATTGAGATCATGCTTACTTTGCAT
GTCACTCAAAAATTTTGCTCAAAAACCTGGTGAGCTGAATTTTTGTCAGTTAAAGCATCGTGTAGTGTTTTTC
TTAGTCCGTTACGTAGGTAGGAATCTGATGTAATGGTTGTTGGTATTTTGTACCATTCAATTTTATCTGG
TTGTTCTCAAGTTTCGTTACGAGATCCATTTGCTATCTAGTTCAACTTGGAATAACAGTATCAGTCGG
GCGGCTCGCTTATCAACCACCAATTTTCATATTGCTGTAAGTGTAAATCTTTACTTATTGGTTTTCAAAA
CCCATTGGTTAAGCCTTTTAAACTCATGGTAGTTATTTTCAAGCATTAACATGAACCTAAATTCATCAAGG
CTAATCTCTATATTTGCCTTGTGAGTTTTCTTTGAGTTAGTTCTTTTAATAACCACTCATAAATCCTCAT
AGAGTATTTGTTTTCAAAAGACTTAACATGTTCCAGATTATATTTTATGAATTTTTTAACTGGAAAAGAT
AAGGCAATATCTCTTCACTAAAAACTAATTTCTAATTTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCACTGG
AAAATCTCAAAGCCTTTAACCAGGATTCCTGATTTCCACAGTTCTCGTCATCAGCTCTCTGGTTGCTTT
AGCTAATACACCATAAGCATTTTCCCTACTGATGTTTCATCATCTGAGCGTATTGGTTATAAGTGAACGATA
CCGTCCGTTCTTTCTTGTAGGGTTTTCAATCGTGGGGTTGAGTAGTGCCACACAGCATAAAATTAGCTTG

GTTTCATGCTCCGTTAAGTCATAGCGACTAATCGCTAGTTCATTTGCTTTGAAAACAACATAATTCAGACAT
ACATCTCAATTGGTCTAGGTGATTTTAATCACTATAACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAG
TCCTTTTCTTTGAGTTGTGGGTATCTGTAAATCTGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCTGTAAATCTGCT
AGACCTCTGTAAATCCGCTAGACCTTTGTGTGTTTTTTTTGTTTATATTCAAGTGGTTATAATTTATAG
AATAAAGAAAGAATAAAAAAGATAAAAAAGATAGATCCCAGCCCTGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAG
TTCCGCAGTATTACAAAAGGATGTCGCAACGCTGTTTGCTCCTCTACAAAACAGACCTTAAACCCCTAAA
GGCTTAAGTAGCACCCCTCGCAAGCTCGGGCAAATCGCTGAATATTCTTTTGTCTCCGACCATCAGGCACC
TGAGTCGCTGTCTTTTTCGTGACATTCACTGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAAATGG
CACTACAGGCGCCTTTTATGGATTCAATGCAAGGAACTACCCATAATACAAGAAAAGCCCGTCACGGGCTT
CTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGTCTGACTTTTTGCTGTTTCTGAGTTCCTGCCCCT
CTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGGTCAATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAA
GGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGCTTACTGTCAAGAGGACATCCGGTCAGATAACCGTCATCTT
CGGCTACTGTCTAGGGCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTACCCGACAAAACAACAGATAAAACGA
AAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCTGTTTTATTTGATGCACTAGTGCCGATCATATTCATAACCCCT
AATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCTGAAGAGGAGTTTACGTCCCATATGGAG
TCCCCGTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGA
AGCCATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTGGGTATAATAT
TTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGTGAACT
CACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTTCAC
CGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGGAATCGTCTGTGGTATTCACTCCAGAGC
GATGAAAACGTTTCAGTTTGTCTCATGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGTCT
ACCGTCTTTTATTGCCATACGAAATTCGGATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCG
GATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTA
TAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGT
GGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATA
CGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTACGTGCCGATCAGACGTCAATTGCG
TTGCTAGCCAAGCTTAGGATCCGGAACCCCTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAG
GTCCCTCGAAGAGGTTCACTAGCTATCTAGAGCTTGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAA
CTCCATCTGGATTTGTTCAAGCGCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCCCCGG
AAACGGGATCCTGATCTTGATCAACCGAGGTACAACATAGTAAAAGCGCTATTGGTAATGGTACAATCGC
GCGTTTACACTTATTCAGAACGATTTTTTTCAGGAGGGCTACTTGTACACACAGGACGTAATGTCTGCC
CGGTTATTGAGCTGACACAGCAACTTATTCGTGCGCCCTCCCTGAGTCCGGATGACGCAGGCTGTGAGGCA
TTAATGATTGAACGCCTGCGTAAAATCGGTTTTACCATTGAGCATATGGATTTTGGCGACACGCAAAATTT
TTGGGCATGGCGTGGCGGTGGCGAAACGCTGGCGTTGCGCGGGCATACTGACGTCTGACCGCTGGCGATG
TCGATCGCTGGATCAATCCGCCGTTTGAGCCTACGATTGCGGACGGAATGTTGTTGCGTGGCGCGCGCG
GATATGAAAGGTTCACTGGCGGCCATGGTGGTGGCTGCTGAACGTTTTGTTGCGCAGCATCTCATCACC
GGCGCGCTCGCATTTTTGATTACCTCTGATGAGGAAGCCAGCGCAAAAAATGGCACCGTAAAGGTGGTTG
AAGCGCTGATGGCCCGTAACGAGCGGCTGGATTACTGTCTGGTGGCGAACCTTCCAGTACTGAAATTGTG
GGCGATGTCGTCAAAAACGGGCGTGGCGGTTCTCTCACCTGTAACCTCACTATCCATGGCGTTTACGGGCA
CGTCGCTATCCGCATCTGGCGGATAACCCCTGTTATCGCGCCGCGCCTTTTCTTAATGAACTGGTCGCTA
TCGAGTGGGATCGGGGCAATGACTTTTTCCCGGCCACCACTATGAGGTAGCCAATATCCAGGCAGGCACC
GGCAGCAATAATGTCATTCCCGGCGAATGTTCTGTGAGTTTAACTTCCGTTTTCAGCACGGAAGTACCGGA
TGAGATGATCAAAGAGCGGGTACATGCGCTGCTTGAAAAGCATCAGCTACGCTATACCGTAGACTGGTGGC
TTTCCGGGCAGCCGTTTCTGACCGCACGCGGCAAGCTGGTGGACGCGGTGGTAAACGCCATTGAGCACTAT
AATGAAATTAACCGCAATTACTGACGACGGCGGTACGTCCGACGACGTTTTATCGCCCGTATGGGAGC
GCAGGTGGTAGAACTGGGGCCGGTGAACGCCACCAATTCATAAAATTAATGAATGTGTGAATGCCGCCGATC
TCCAGCTACTGGCCCGTATGTATCAACGCATTATGGAACAGCTCGTCGCCCATCACCATCACCATCACTAA
GATTACTTCGATTGCAATCAGCTACGGACTCAAGCTTACGTGAGGTATACGATGAAGGCGATAAGTCGC
GTAAGTTGCTAGCCACGCGGCTCACCTTACGGGTGGGCCTTTCTTCGCGATCCACATG

SEQ ID NO:11: PsseA-hlyA-loxp-KnaR-loxp 正向引物

TTCACAGAAAAGTGTTGCCCCCTTCCATGGCGGAAGGGGACAAAGGTGAATTTGTCTACTCAGGAGAGC
GTTCA

SEQ ID NO:12: PsseA-hlyA-loxp-KnaR-loxp 反向引物

TCTGACGTACACAGCAATTTTGCCTTACCTGTTAATCGAGATTGAAACACCGAAGAAAGGCCACCCG

SEQ ID NO:13: Pssbp1-dapE-Cm 正向引物

TTGGTTTCACTGAATCCCGTTATCAGCAGTTTTTTGATGAGGTGTAGTCTATTTGTCTACTCAGGAGAGC

G

SEQ ID NO:14: Pssbp1-dapE-Cm 反向引物

CAATATTTTGCCAGCCAGTCCATGCTTATTTCTCTTACCGGAACGCTCACGAAGAAAGGCCACCCG

SEQ ID NO:15: PdapE-dapE-loxp-KnaR-loxp 正向引物

CAATATTTTGCCAGCCAGTCCATGCTTATTTCTCTTACCGGAACGCTCAATTTGTCCTACTCAG

SEQ ID NO:16: PdapE-dapE-loxp-KnaR-loxp 反向引物

TTGGTTTCAGTGAATCCCGTTATCAGCAGTTTTTTGATGAGGTGTAGTCTCGAAGAAAGGCCACCCG

SEQ ID NO:17: loxp-KnaR-loxp 正向引物

ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCGCCGATCATATTCAATAACCC

SEQ ID NO:18: loxp-KnaR-loxp 反向引物

TTATTCGATTGGATTATCTACTTTTATTACTATATTTTCGATAAAGCGTGGCTAGTGAACCTCTTCGAGGG

SEQ ID NO:19: PhtrA-htrA-loxp-aadA-loxp 正向引物

GATAATGTATTCACAGGTTGCTCCGGGCTTGAAAAAGTTAAATGACATCCATTTGTCCTACTCAGGAGAGC

SEQ ID NO:20: PhtrA-htrA-loxp-aadA-loxp 反向引物

AAAAGGAACTTTTTACCTTTTCGCCTTCCCGTTTCGTTCAACTTAGTATACGAAGAAAGGCCACCC

SEQ ID NO:21: msbB-HR-loxp-KnaR-loxp 正向引物

AGGTAGTACAGGGTTTGTGTCAGCATAAAGCCTCTCTTACGAGAGGCTTTATGCCGATCATATTCAATAACCC

SEQ ID NO:22: msbB-HR-loxp-KnaR-loxp 反向引物

TCGTACACTATTACAAATTCCTTTTCGCGTCAGCAGACCCTGGAAGCCCTAGTGAACCTCTTCGAGGG

SEQ ID NO:23: lpp-HR-loxp-KnaR-loxp 正向引物

CGGACAAAAAATGGCGCACGATGTGCGCCATTTTATATTGTGCGTCAAAGCCGATCATATTCAATAACCC

SEQ ID NO:24: lpp-HR-loxp-KnaR-loxp 反向引物

AATACTTGTAACGCTACATGGAGATTAACCTCAATCTAGAGGGTATTAATACTAGTGAACCTCTTCGAGGG

SEQ ID NO:25: fliC-HR-loxp-KnaR-loxp 正向引物

GCTTTCGCTGCCTTGATTGTGTACCACGTGTCGGTGAATCAATCGCCGGAGCCGATCATATTCAATAACCC

SEQ ID NO:26: fliC-HR-loxp-KnaR-loxp 反向引物

ACGGTGAGAAACCGTGGGCAACAGCCCAATAACATCAAGTTGTAATTGATCTAGTGAACCTCTTCGAGGG

SEQ ID NO:27: dapE (编码琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶, Gene ID: 1254005)

ATGTCGTGCCCCGTTATTGAGCTGACACAGCAACTTATTCGTGCCCCCTCCCTGAGTCCGGATGACGCAGG
CTGTCAGGCATTAATGATTGAACGCCTGCGTAAAATCGGTTTTACCATTGAGCATATGGATTTTGGCGACA
CGCAAAATTTTTGGGCATGGCGTGGGCGTGGCGAAACGCTGGCGTTCGCCGGGCATACCTGACGTCGTACCG
GCTGGCGATGTCGATCGCTGGATCAATCCGCCGTTTGGAGCCTACGATTTCGCGACGGAATGTTGTTCCGTCG
CGGCGCGGCGGATATGAAAGGTTCACTGGCGGCCATGGTGGTGGCTGCTGAACGTTTTGTTGCGCAGCATC
CTCATCACCGGGGCGCCTCGCATTTTTGATTACCTCTGATGAGGAAGCCAGCGCAAAAAATGGCACCGTA
AAGGTGGTTGAAGCGCTGATGGCCCGTAACGAGCGGCTGGATTACTGTCTGGTCGGCGAACCTTCCAGTAC
TGAAATTGTGGGCGATGTCGTCAAAAACGGGCGTCGCGGTTCTCTCACCTGTAACCTCACTATCCATGGCG
TTCAGGGGCGACGTCGCTATCCGCATCTGGCGGATAACCCTGTTTCATCGCGCCGCGCCTTTCTTAATGAA
CTGGTCGCTATCGAGTGGGATCGGGGCAATGACTTTTTCCCGGCCACCAGTATGCAGGTAGCCAATATCCA
GCGAGGCACCGGCAGCAATAATGTCATTTCCCGCGCAACTGTTCTGTCAGTTTAACTTCCGTTTCAGCACGG
AACTGACCGATGAGATGATCAAAGAGCGGGTACATGCGCTGCTTGAAAAGCATCAGCTACGCTATACCGTA
GACTGGTGGCTTTCCGGGCGAGCGGTTCCCTGACCGCACGCGCAAGCTGGTGGACGCGGTGTTAAACGCCAT
TGAGCACTATAATGAAATTAAACCGCAATTACTGACGACGGGCGGTACGTCGACGGAGCTTTTATCGCCC
GTATGGGAGCGCAGGTGGTAGAACTGGGGCCGGTGAACGCCACCATTCATAAAATTAATGAATGTGTGAAT

GCCGCCGATCTCCAGCTACTGGCCCGTATGTATCAACGCATTATGGAACAGCTCGTCGCCTGA

SEQ ID NO:28: htrA(编码丝氨酸蛋白酶, Gene ID: 1251727)

ATGAAAAAAACCACATTAGCAATGAGTGCCTGCTGAGTTTAGGTTTGGCATTGTGCGCTCTGTCTGC
CACGGCGGCTGAAACGTCCTCTTCAGCAATGACTGCCCAGCAGATGCCAAGCCTGGCACCAGATGCTCGAAA
AAGTGATGCCATCGGTGGTCAGTATTAATGTTGAAGGTAGCACCACGGTGAATACGCCCGGTATGCCGCGT
AATTTCCAGCAGTTCTTTGGCGATGACTCCCCGTTCTGCCAGGACGGTTCTCCGTTCCAGAATTCTCCGTT
CTGCCAGGGCGGCGTAACGGCGGCAACGGCGGTCAACAACAGAAATTCATGGCGCTGGGCTCCGGCGTAA
TTATTGACGCCGGAAGGGCTACGTCGTCACCAACACGTTGGTTGATAACGCCAGCGTGATTAAAGTA
CAGCTTAGCGATGGGCGTAAATTCGATGCTAAAGTGGTGGGCAAAGATCCGCGTTCTGATATCGCGCTGAT
TCAAATTCAGAATCCGAAGAACCTGACGGCGATTAAGCTGGCGGACTCCGACGCGCTGCGCGTGGGGGATT
ATACCGTCGCTATTGTTAACCCGTTTGGTCTGGGCGAAACGGTGACGTCAGGTATCGTTTCGGCGCTGGGG
CGTAGCGGCGCTGAACGTAGAAAATTACGAGAACTTTATTACAGCCGACGCCGCGATTAAACCGTGGTAACCTC
CGGCGGCGCGCTGGTGAACCTGAACGGTGAGCTGATCGGTATTAACACCCGCGATTCTGGCGCCGGACGGCG
GCAACATCGGTATCGGCTTCGCTATCCCCAGTAACATGGTGAAAAACCTGACGTCGCAGATGGTGGAAATAC
GGCCAGGTGAAACGCGCGGAACCTGGGGATCATGGGGACTGAGCTGAATTCGGAATTGGCGAAAGCGATGAA
AGTCGACGCGCCAGCGAGGCGGTTTCGTCAGCCAGGTGATGCCGAATTCGTCGCGCGCGAAAGCGGGTATCA
AAGCCGGGGATGTCATTACCTCGCTGAACGGTAAACCGATCAGCAGCTTTGCGGCGCTGCGCGCTCAGGTC
GGCACTATGCCGGTCGGCAGCAAAATCAGCCTCGGTCTGCTGCGTGAAAGGTAAAGCGATTACGGTGAATCT
GGAATGTCAGCAGAGCGCCAGAGTCAGGTTGATTCCAGCACCATCTTCAGCGGGATTGAAGGCGCTGAAA
TGAGCAATAAAGGCCAGGATAAAGGCGTTGTGGTGAGCAGCGTGAAAGCGAACTACCCGCCGCGCAAATT
GGCTCAAAAAAGGCGATGTGATTATCGGCGCTAACCCAGCAGCCGGTGAAAAATATCGCCGAGCTGCGTAA
GATTCTCGACAGCAAGCCGTCGGTTCTGGCGCTGAATATTCAGCGTGGTGATAGTTCTATTTATTTGCTGA
TGCAGTAA

SEQ ID NO:29: hlyA(编码李斯特菌溶血素, Gene ID: 987033)

ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGCGCAACAACTGAAGC
AAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATCAATTTTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCTGCAA
GTCTTAAGACGCCAATCGAAAAAGAAACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGACTACAAT
AAAAACAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGG
AAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAAGAGAAATCCATCAATCAAAATAATGCAGACATTCAAGTTGTGA
ATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCCGAATTAGTAGAAAAATCAACCA
GATGTTCTCCCTGTAAAACGTGATTCATTAACTACACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGATTAATCAAGACAA
TAAAATCGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAATACATTAGTGAAAGATGGA
ATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAGTGCAAAAATTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGT
GAATCACAATTAATTGCGAAATTTGGTACAGCATTTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATGTAAACTTCGG
CGCAATCAGTGAAGGAAAAATGCAAGAAGAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAACGTGAATGTTA
ATGAACCTACAAGACCTTCCAGATTTTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGAGTG
AATGCAGAAAAATCTCTGTCATATATCTCAAGTGTGGCGTATGGCCGTCAAGTTTATTTGAAATTATCAAC
TAATTTCCATAGTACTAAAGTAAAGCTGCTTTTGGATGCTGCGGTAAGCGGAAATCTGCTCAGGTGATG
TAGAACTAACAATATCATCAAAAATTCCTTCTCAAAGCCGTAATTTACGGAGGTTCCGCAAAAGATGAA
GTTCAAATCATCGACGGCAACCTCGGAGACTTACGAGATATTTTGAAAAAGGCGCTACTTTTAATCGAGA
AACACCAGGAGTTCCCATTTGCTTATACAACTTCTTAAAGACAATGAATTAGCTGTTATTAATAACA
ACTCAGAATATATTGAAACAACCTTCAAAGCTTATACAGATGGAAAAATTAACATCGATCACTCTGGAGGA
TACGTTGCTCAATTCAACATTTCTTGGGATGAAGTAAATTATGATCCTGAAGGTAACGAAATTGTTCAACA
TAAAAACTGGAGCGAAAAACAATAAAGTAAGCTAGCTCATTTACATCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACG
CGAGAAATATTAATGTTACGCTAAAGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGAT
GACCGGAACATTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACCACGCTTTATCCGAAATATAG
TAATAAAGTAGATAATCCAATCGAATAA

SEQ ID NO:30: 启动子 pepTp

GCAGGGGTAAAAGTGACCTGACGCAATATTTGTCTTTTCTTGCTTCTTAATAATGTTGTACAAAAAGTGA
GGTGACTACATGG

SEQ ID NO:31: 启动子 fnrSp

CGCCGCAAAGTTTGAGCGAAGTCAATAAACTCTCTACCCATTACAGGCAATATCTCTCTTGCAGGTGAATG
CAACGTCAGCGAT

SEQ ID NO:32: 启动子 ysgAp

TCAGAAGAAGCAAAAAGACACTTTACCGAAGGGTTTAACATTTTTTCGTGATACTCATCACCATGACGCAA
ATGCGTTGCATAAA

SEQ ID NO:33: 启动子 ssbp1
AACCGAGGTCACAACATAGTAAAAGCGCTATTGGTAATGGTACAATCGCGCGTTTACACTTATTCAGAACG
ATTTTTTTCAGGAG

SEQ ID NO:34: 启动子 Hip1
GGATAAAAGTGACCTGACGCAATATTTGTCTTTTCTTGCTTAATAATGTTGTCA

SEQ ID NO:35: 启动子 BBa_I14018
TGTAAGTTTATACATAGGCGAGTACTCTGTTATGG

SEQ ID NO:36: 启动子 BBa_R1074
TTAAATTTCTCTCGTCAGGCCGGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCACACTGATAGTGCTAGTGTAGAT
CAC

SEQ ID NO:37: 启动子 Ptet-Fnr
AAAATTGATCTGAATCAATATTTTGACAAAAATTGATCTGAATCAATATTTACTGAGC

SEQ ID NO:38: 启动子 Ptet-arca
GTTAATAAAATGTTATTGACAGTTAATAAAATGTTATACTGAGC

SEQ ID NO:39: 启动子 PsseA
TTAGCACGTTAATTATCTATCGTGTATATG

权 利 要 求 书

1、一种经修饰的细菌，其中与未修饰的起始菌株相比，所述细菌包含低氧调节性必需基因表达盒，所述必需基因表达盒包含受控于严格低氧诱导型启动子的所述细菌的必需基因，且所述细菌缺失至少一种参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因或其功能性表达产物。

2、权利要求 1 的经修饰的细菌，其中所述严格低氧诱导型启动子选自 *pepTp*、*fnrSp*、*ysgAp*、*ssbp1*、*Hip1*、*BBa_I14018*、*BBa_R1074*、*Ptet-arcA* 和 *Ptet-Fnr*。

3、权利要求 1 的经修饰的细菌，其中所述严格低氧诱导型启动子是 *ssbp1* 启动子。

4、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述必需基因的表达产物在所述细菌内负责 2,6-二氨基庚二酸(DAP)的合成，且当在有氧条件下培养时，所述细菌的生长依赖于培养基中额外添加的 DAP 或其类似物。

5、权利要求 4 的经修饰的细菌，其中所述必需基因选自 *dapA*、*dapB*、*dapD*、*dapE*、*argD*、*dapF* 及其任意组合。

6、权利要求 4 的经修饰的细菌，其中所述必需基因选自 *dapA* 和 *dapE*。

7、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 *HtrA* 丝氨酸蛋白酶家族基因。

8、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因的功能性表达产物是 *HtrA* 丝氨酸蛋白酶家族相关蛋白。

9、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌缺失 *HtrA* 丝氨酸蛋白酶活性。

10、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述参与或调控内源性抗氧化应激应答途径的基因是 *htrA*。

11、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌缺失 *htrA*。

12、权利要求 1-11 任一项的经修饰的细菌，其中所述必需基因是所述细菌染色体中天然存在的基因，其中所述必需基因的天然启动子被所述严格低氧诱导型启动子功能性置换，由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

13、权利要求 1-11 任一项的经修饰的细菌，其中所述必需基因表达盒是外源性的，且所述细菌染色体中天然存在的该必需基因被缺失或功能性失活，由此所述必需基因在所述细菌中的表达完全受控于所述严格低氧诱导型启动子。

14、权利要求 13 的经修饰的细菌，其中所述外源性必需基因表达盒整合于所述细菌的染色体。

15、权利要求 13 的经修饰的细菌，其中所述外源性必需基因表达盒位于所述细菌的染色体之外。

16、权利要求 15 的经修饰的细菌，其中所述外源性必需基因表达盒存在于所述细菌携带的质粒中。

17、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其进一步包含 pH 调节性表达盒，所述 pH 调节性表达盒包含受控于在酸性 pH 条件下具有活性的启动子的编码细菌来源的溶血素蛋白的基因。

18、权利要求 17 的经修饰的细菌，其中所述细菌来源的溶血素蛋白是革兰氏阴性细菌溶血素蛋白。

19、权利要求 18 的经修饰的细菌，其中所述编码革兰氏阴性细菌溶血素蛋白的基因是 *hlyA* 或 *hlyE*。

20、权利要求 19 的经修饰的细菌，其中所述 *hlyA* 或 *hlyE* 来自单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

21、权利要求 17-20 任一项的经修饰的细菌，其中所述在酸性 pH 条件

下具有活性的启动子在 pH 值低于 7.0、6.9、6.8、6.7、6.6、6.5、6.4、6.3、6.2、6.1、6.0、5.9、5.8、5.7、5.6 或 5.5 时有活性。

22、权利要求 17-21 任一项的经修饰的细菌，其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子选自 sseA、ssrA、ssaB、ssaG、ssaM 和 ssaR。

23、权利要求 17-21 任一项的经修饰的细菌，其中所述在酸性 pH 条件下具有活性的启动子是 sseA。

24、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述未修饰的起始菌株是兼性厌氧细菌。

25、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌是肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 细菌。

26、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌是埃希菌属 (*Escherichia*)、沙门菌属 (*Salmonella*)、志贺菌属 (*Shigella*)、克雷伯菌属 (*Klebsiella*)、耶尔森菌属 (*Yersinia*)、枸橼酸杆菌属 (*Citrobacter*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、沙雷菌属 (*Serratia*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、摩根菌属 (*Morganella*)、普罗威登菌属 (*Providencia*)、哈夫尼菌属 (*Hafnia*) 或泛菌属 (*Pantoea*) 细菌。

27、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌选自大肠杆菌、蟑螂埃希菌 (*E. blattae*)、弗格森埃希菌 (*E. fergusonii*)、赫尔曼埃希菌 (*E. hermannii*)、伤口埃希菌 (*E. vulneris*)、肠沙门菌 (*S. enterica*)、邦戈沙门菌 (*S. bongori*)、伤寒杆菌 (*S. typhi*)、猪霍乱沙门菌 (*S. choleraesuis*)、鼠伤寒沙门菌 (*S. typhimurium*)、痢疾志贺菌 (*S. dysenteriae*)、福氏志贺菌 (*S. flexneri*)、鲍特志贺菌 (*S. boydii*)、宋内志贺菌 (*S. sonnei*)、肺炎克雷伯菌 (*K. pneumoniae*)、产酸克雷伯菌 (*K. oxytoca*)、鼠疫耶尔森菌 (*Y. pestis*)、小肠结肠炎耶尔森菌 (*Y. enterocolitica*)、假结核耶尔森菌 (*Y. pseudotuberculosis*)、奥氏耶尔森菌 (*Y. aldouae*)、伯氏耶尔森菌 (*Y. bercovierii*)、弗氏耶尔森菌 (*Y. frederiksenii*)、中间耶尔森菌 (*Y. intermedia*)、克氏耶尔森菌 (*Y. kristensenii*)、莫氏耶尔森菌

(*Y.mollaretti*)、罗氏耶尔森菌(*Y.rohdei*)、鲁氏耶尔森菌(*Y.ruckeri*)、弗劳地枸橼酸杆菌(*C.freundii*)、科泽枸橼酸杆菌(*C.kaseri*)、布拉克枸橼酸杆菌(*C.braakii*)、产气肠杆菌(*E.aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*E.cloacae*)、日勾维肠杆菌(*E.gergoviac*)、坂崎肠杆菌(*E.sakazakii*)、泰洛肠杆菌(*E.taylorac*)、河生肠杆菌(*E.aminigenus*)、中间肠杆菌(*E.intermedius*)、阿氏肠杆菌(*E.asburia*)、生癌肠杆菌(*E.cancerogenus*)、溶解肠杆菌(*E.dissolvens*)、超压肠杆菌(*E.nimipressualis*)、黏质沙雷菌(*S.marcescens*)、嗜虫沙雷菌(*S.entomophila*)、无花果沙雷菌(*S.ficaria*)、泉居沙雷菌(*S.fonticola*)、格氏沙雷菌(*S.grimesii*)、液化沙雷菌(*S.liquefaciens*)、芳香沙雷菌(*S.odorifera*)、普城沙雷菌(*S.plymuthica*)、龙眼斑沙雷菌(*S.proteamaculans*)、深红沙雷菌(*S.rubidaea*)、解脲沙雷菌(*S.ureilytica*)、奇异变形杆菌(*P.mirabilis*)、普通变形杆菌(*P.vulgaris*)、产黏变形杆菌(*P.myxofaciens*)、潘氏变形杆菌(*P.penneri*)、豪氏变形杆菌(*P.hauseri*)、摩根摩根菌(*M.morganii*)、产碱普罗威登菌(*P.alcalifaciens*)、鲁氏普罗威登菌(*P.rustigianii*)、斯氏普罗威登菌(*P.stuartii*)、雷氏普罗威登菌(*P.rettgeri*)、亨氏普罗威登菌(*P.heimbochae*)、蜂房哈夫尼菌(*H.alvei*)和成团泛菌(*P.agglomerans*)。

28、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌是鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)。

29、权利要求 28 的经修饰的细菌，其中所述起始菌株是鼠伤寒沙门菌 SL7207。

30、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中所述细菌表达野生型脂多糖(LPS)。

31、前述权利要求任一项的经修饰的细菌，其中当施用于患有肿瘤的对象后，所述细菌能够在肿瘤组织中存活并增殖但在正常组织中被快速清除。