

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034677**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.05

(21) Номер заявки
201891200

(22) Дата подачи заявки
2016.11.21

(51) Int. Cl. **A61K 35/744** (2015.01)
C12N 1/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ РАКА, СОДЕРЖАЩИЕ
ШТАММ ENTEROCOCCUS GALLINARUM**

(31) 1520502.4; 1604924.9

(32) 2015.11.20; 2016.03.23

(33) GB

(43) 2018.08.31

(86) PCT/GB2016/053622

(87) WO 2017/085520 2017.05.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
4Д ФАРМА РИСЁРЧ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Малдер Имке Элизабет, Холт Эми
Бет, Панцика Доменико, Маккласки
Синин Мари (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) Robin Patel ET AL.: "Determination of 16S rRNA Sequences of Enterococci and Application to Species Identification of Nonmotile Enterococcus gallinarum Isolates", Journal of Clinical Microbiology, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 3399-3407, XP055333664, UNITED STATES, Retrieved from the Internet: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC105342/pdf/jm003399.pdf>, the whole document

JP-A-H08259450
JP-A-2007116991

(57) Изобретение относится к композиции для лечения или профилактики рака, содержащей бактериальный штамм Enterococcus gallinarum, такой как штамм NCIMB 42488. Также изобретение относится к вакцине и пищевому продукту для лечения или профилактики рака, содержащим заявленную композицию.

B1

034677

034677

B1

Область техники

Данное изобретение относится к области композиций, содержащих бактериальные штаммы, выделенные из пищеварительного тракта млекопитающих, и применению таких композиций для лечения заболеваний.

Уровень техники

Кишечник человека считается стерильным *in utero*, но сразу после рождения подвергается воздействию большого количества микроорганизмов матери и окружающей среды. После этого наступает динамический период колонизации и последовательной смены микроорганизмов, на который влияют такие факторы, как способ родоразрешения, окружающая среда, диета и генотип хозяина, все из которых влияют на состав микробиоты кишечника, особенно в раннем возрасте. Впоследствии микробиота стабилизируется и становится подобной таковой у взрослых [i]. Микробиота кишечника человека содержит более 500-1000 различных филотипов, относящихся, по существу, к двум основным бактериальным группам: *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [ii]. В результате эффективных симбиотических взаимосвязей, возникающих вследствие бактериальной колонизации кишечника человека, наблюдается широкий спектр метаболических, структурных, защитных и других полезных функций. Повышенная метаболическая активность колонизированного кишечника обеспечивает иного рода расщепление неперевариваемых компонентов диеты иного рода с выделением продуктов жизнедеятельности, обеспечивающих важный источник питательных веществ для хозяина. Точно так же иммунологическая значимость микробиоты кишечника хорошо известна и приведена в качестве примера у безмикробных животных с нарушенной иммунной системой, которая функционально восстанавливается после введения комменсальных бактерий [i-ii].

Существенные изменения в составе микробиоты были зарегистрированы при нарушениях желудочно-кишечного тракта, таких как воспалительное заболевание кишечника (ВЗК). Например, уровни кластера XIVa бактерий *Clostridium* у пациентов с ВЗК снижаются, в то время как количество *E. coli* повышается, что говорит о сдвиге баланса симбионтов и патобионтов в кишечнике [v-vi]. Интересно, что этот микробный дисбактериоз также связан с дисбалансом в популяциях Т-эффекторных клеток.

Принимая во внимание потенциальный положительный эффект, который могут проявлять определенные бактериальные штаммы в кишечнике животных, были предложены различные штаммы для лечения многих заболеваний (см., например, [vii-viii]). Кроме того, некоторые штаммы, включая главным образом штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, были предложены для применения при лечении различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, которые непосредственно не связаны с кишечником (см. [ix] и [x] для обзоров). Однако остается не в полной мере охарактеризована взаимосвязь между различными заболеваниями и различными бактериальными штаммами, а также точные эффекты конкретных бактериальных штаммов на кишечник как на системном уровне, так и на какие-либо конкретные виды заболеваний. Например, некоторые виды *Enterococcus* были вовлечены в появление рака [xi].

Поэтому, в данной области техники существует необходимость в разработке новых способов лечения заболеваний. Существует также необходимость в более детальном изучении потенциальных эффектов бактерий кишечника с целью дальнейшей разработки новых способов лечения с применением бактерий кишечника.

Сущность изобретения

Авторы разработали новые способы лечения и профилактики заболеваний. В частности, авторы разработали новые способы лечения и профилактики рака. В частности, авторы изобретения обнаружили, что бактериальные штаммы вида *Enterococcus gallinarum* могут быть эффективными для лечения и профилактики рака. Как описано в примерах, пероральное введение композиций, содержащих *Enterococcus gallinarum*, может уменьшить размер опухоли в мышинных моделях рака.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретение обеспечивает композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, для применения в способе лечения или

профилактики рака, такого как рак молочной железы, легких или печени. Авторы изобретения обнаружили, что обработка композициями, содержащими бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, может уменьшить рост опухоли в мышинных моделях рака молочной железы, легких и печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция предназначена для применения в способе уменьшения размера опухоли или предотвращения роста опухоли при лечении рака. Композиции с использованием *Enterococcus gallinarum* могут быть особенно эффективными для уменьшения размера опухоли или предотвращения роста опухоли при лечении рака.

В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения бактериальный штамм в композиции представляет собой *Enterococcus gallinarum*. Также могут быть использованы близко родственные штаммы, такие как бактериальные штаммы, которые имеют последовательность рПНК 16s, которая является по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичной последовательности рПНК 16s бактериального штамма *Enterococcus gallinarum*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность рПНК 16s, которая является по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2. Предпочтительно последовательность идентична SEQ ID NO: 2. Предпочтительно бактериальный штамм для применения согласно настоящему изобретению имеет последовательность рПНК 16s, представленную последовательностью SEQ ID NO: 2.

Соответственно изобретение также обеспечивает композицию, содержащую бактериальный штамм, который имеет последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности рПНК 16s бактериального штамма *Enterococcus gallinarum* для применения в способе лечения или профилактики рака. В частности, изобретение обеспечивает композицию, содержащую бактериальный штамм, который имеет последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2 для применения в способе лечения или профилактики рака. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения бактериальный штамм в композиции не относится к *Enterococcus gallinarum*. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения бактериальный штамм в композиции не относится к *Enterococcus gallinarum*, но является тесно связанным штаммом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция по настоящему изобретению предназначена для перорального введения. Пероральное введение штаммов по настоящему изобретению может быть эффективным для лечения рака. Кроме того, пероральное введение удобно для пациентов и медицинских работников, при этом оно позволяет осуществлять доставку и/или частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция по настоящему изобретению содержит одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ или носителей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция по настоящему изобретению содержит бактериальный штамм, который является лиофилизированным. Лиофилизация является эффективным и удобным способом получения стабильных композиций, которые позволяют осуществлять доставку бактерий.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается пищевой продукт, содержащий композицию, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вакцинальная композиция, содержащая композицию, как описано выше.

Кроме того, изобретение обеспечивает способ лечения или профилактики рака, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*.

При разработке вышеуказанного изобретения авторы идентифицировали и охарактеризовали бактериальный штамм, который особенно пригоден для применения в лечении. Показано, что штамм *Enterococcus gallinarum* по изобретению эффективен для лечения рака. Исходя из вышеизложенного в другом аспекте настоящего изобретения предлагается клетка штамм *Enterococcus gallinarum*, депонированной под номером доступа NCIMB 42488, или его производное. В настоящем изобретении также предлагаются композиции, содержащие такие клетки, или биологически чистые культуры таких клеток. В настоящем изобретении также предлагается клетка штамм *Enterococcus gallinarum*, депонированная под номером доступа NCIMB 42488, или ее производное, для применения в лечении, в частности рака. Аналогично изобретение обеспечивает клетку бактериального штамма, которая имеет последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2 или его производному. В настоящем изобретении также предлагаются композиции, содержащие такие клетки, или биологически чистые культуры таких клеток. Изобретение также обеспечивает клетку бактериального штамма, которая имеет последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2 или ее производному для применения в терапии, в частности для лечения или профилактики рака.

Краткое описание графических материалов

- Фиг. 1: Мышиная модель рака молочной железы - объем опухоли.
- Фиг. 2: Мышиная модель рака легких - объем опухоли.
- Фиг. 3: Мышиная модель рака печени - масса печени.
- Фиг. 4А: Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках (без бактерий).
- Фиг. 4В: Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках после добавления LPS.
- Фиг. 4С: Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках после добавления MRX518.
- Фиг. 4D: Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках после добавления MRX518 и LPS.
- Фиг. 5А: Уровни цитокинов в клетках THP-1 (без бактерий).
- Фиг. 5В: Уровни цитокинов в клетках THP-1 после добавления бактериального осадка.
- Фиг. 5С: Уровни цитокинов в клетках THP-1 после добавления MRX518 отдельно или в сочетании с LPS.

Описание настоящего изобретения

Бактериальные штаммы

Композиции по изобретению содержат бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*. Примеры демонстрируют, что бактерии этого рода полезны для лечения или профилактики рака.

Соответственно, изобретение также обеспечивает композиции, содержащую бактериальный штамм, который имеет последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности рПНК 16s бактериального штамма *Enterococcus gallinarum* для применения в терапии, например, для применения в способе лечения или предотвращения рак. В частности, изобретение также обеспечивает композиции, содержащую бактериальный штамм, который имеет последовательность рПНК 16s,

которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2 для применения в терапии, например, для применения в способе лечения или профилактики рака. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения бактериальный штамм в композиции не относится к *Enterococcus gallinarum*, но является тесно связанным штаммом.

Изобретение обеспечивает *Enterococcus gallinarum* для применения в терапии, например, для применения при лечении или профилактике рака. Аналогично, изобретение относится к композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* для применения в терапии, например, для применения при лечении или предупреждении рака. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат бактериальный штамм, который имеет последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, например, которая представляет собой *Enterococcus gallinarum* и не содержит каких-либо других бактериальных родов. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат один бактериальный штамм, который имеет последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, например, которая представляет собой *Enterococcus gallinarum* и не содержит каких-либо других бактериальных штаммов или видов.

Enterococcus gallinarum образует кокковидные клетки, в основном парами или короткими цепями. Они неподвижны, а колонии на агаре с кровью или питательном агаре являются круглыми и гладкими. *Enterococcus gallinarum* реагирует с антисывороткой Lansfield группы D. Иллюстративным штаммом *Enterococcus gallinarum* является F87/276=PB21=ATCC 49573=CCUG 18658=CIP 103013=JCM 8728=LMG 13129=NBRC 100675=NCIMB 702313 (ранее NCDO 2313)=NCTC 12359 [xii]. Номер доступа GenBank для последовательности гена 16S рПНК *Enterococcus gallinarum* составляет AF039900 (описанный в данном документе как SEQ ID NO: 1). Иллюстративный штамм *Enterococcus gallinarum* описан в [17].

Бактерия *Enterococcus gallinarum*, депонированная под номером доступа NCIMB 42488, была проанализирована в примерах и также упоминается в настоящем документе как штамм MRX518. Ссылки на MRX518 и MRxO518 используются взаимозаменяемо.

Последовательность 16S рПНК для анализируемого штамма MRX518 представлена в SEQ ID NO: 2. Штамм MRX518 был депонирован в международном депозитарном учреждении NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Абердин, AB21 9YA, Шотландия) компанией 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Абердин, AB25 2ZS, Шотландия) 16 ноября 2015 г. как "*Enterococcus* sp" и с присвоением номера доступа NCIMB 42488.

Геном штамма MRX518 содержит хромосому и плазмиду. Последовательность хромосомы для штамма MRX518 представлена в SEQ ID NO: 3. Плазмидная последовательность для штамма MRX518 представлена в SEQ ID NO: 4. Эти последовательности были сгенерированы с использованием платформы PacBio RS II.

Ожидается также, что бактериальные штаммы, тесно связанные со штаммом, испытанным в примерах, будут эффективны для лечения или профилактики рака. В некоторых вариантах реализации бактериальные штаммы по настоящему изобретению имеют последовательность рПНК 16s, которая является по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичной последовательности рПНК 16s бактериального штамма *Enterococcus gallinarum*. Предпочтительно бактериальный штамм для применения согласно настоящему изобретению имеет последовательность рПНК 16s, которая является по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2. Предпочтительно последовательность идентична SEQ ID NO: 2. Предпочтительно бактериальный штамм для применения согласно настоящему изобретению имеет последовательность рПНК 16s, представленную последовательностью SEQ ID NO: 2.

Предполагается, что бактериальные штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа 42488, эффективны для лечения или профилактики рака. Биотип является близкородственным штаммом, который имеет аналогичные или очень похожие физиологические и биохимические характеристики.

Штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488, и пригодны для применения в настоящем изобретении, можно идентифицировать путем секвенирования других нуклеотидных последовательностей для бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488. Например, по существу, весь геном можно секвенировать, а штамм биотипа для применения в настоящем изобретении может характеризоваться по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичностью последовательности по меньшей мере на участке, составляющем 80% целого генома (например, по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% или по всей длине целого генома). Например, в некоторых вариантах осуществления, штамм биотипа имеет по меньшей мере 98% идентичности последовательности по меньшей мере на 98% его генома или по меньшей мере на 99% идентичности последовательности на 99% его генома. Другие пригодные последовательности для применения при идентификации штаммов биотипов могут включать *hsp60* или повторяющиеся последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)₅, или REP или [xiii]. Штаммы биотипов могут иметь последовательности, характеризующиеся по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488. В

последовательности SEQ ID NO: 4, или с идентичностью по меньшей мере 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, охватывающей 100% последовательности SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения бактериальный штамм для применения согласно настоящему изобретению имеет хромосому с идентичностью последовательности SEQ ID NO: 3 и плазмиду с идентичностью последовательности SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм для применения в изобретении имеет хромосому с последовательностью, идентичной с SEQ ID NO: 3, например, как описано выше, и 16S рРНК-последовательность с последовательностью, идентичной любой из SEQ ID NO: 1 или 2, например как описано выше, предпочтительно с последовательностью 16S рРНК, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, более предпочтительно, который содержит последовательность 16S рРНК SEQ ID NO: 2 и необязательно содержит плазмиду с идентичностью последовательности SEQ ID NO: 4, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм для применения в изобретении имеет хромосому с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3, например, как описано выше, и необязательно содержит плазмиду с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, как описано выше, и эффективен для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм для применения в изобретении имеет хромосому с последовательностью, идентичной с SEQ ID NO: 3, например, как описано выше, и 16S рРНК-последовательность с последовательностью, идентичной последовательности любой из SEQ ID NO: 1 или 2, например, как описано выше, и необязательно содержит плазмиду с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, как описано выше, и эффективен для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах реализации бактериальные штаммы по настоящему изобретению имеют последовательность рРНК 16s, которая является по меньшей мере на 99, 99,5 или 99,9% идентичной последовательности 16S рРНК, представленной SEQ ID NO: 2 (например, который содержит последовательность 16S рРНК SEQ ID NO: 2) и хромосому с идентичностью по меньшей мере на 95% с SEQ ID NO: 3 по меньшей мере на 90% из SEQ ID NO: 3 и необязательно содержит плазмиду с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, как описано выше, и которая эффективна для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах реализации бактериальные штаммы по настоящему изобретению имеют последовательность рРНК 16s, которая является по меньшей мере на 99, 99,5 или 99,9% идентичной последовательности 16S рРНК, представленной SEQ ID NO: 2 (например, который содержит последовательность 16S рРНК SEQ ID NO: 2) и хромосому с по меньшей мере 98% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичности последовательности), с SEQ ID NO: 3 менее 98% (например, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере 99,5%) SEQ ID NO: 3 и необязательно содержит плазмиду с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, как описано выше, и которая эффективна для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах реализации бактериальные штаммы для применения в изобретении представляет собой *Enterococcus gallinarum* и имеет последовательность рРНК 16s, которая является по меньшей мере на 99, 99,5 или 99,9% идентичной последовательности 16S рРНК, представленной SEQ ID NO: 2 (например, который содержит последовательность 16S рРНК SEQ ID NO: 2) и хромосому с по меньшей мере 98% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичности последовательности), с SEQ ID NO: 3 менее 98% (например, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере 99,5%) SEQ ID NO: 3 и необязательно содержит плазмиду с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, как описано выше, и которая эффективна для лечения или профилактики рака.

В альтернативном варианте штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488, и пригодны для применения в настоящем изобретении, можно идентифицировать с помощью номера доступа NCIMB 42488 и анализа рестрикционных фрагментов и/или ПЦР-анализа, например, с применением полиморфизма длины флуоресцентных амплифицированных фрагментов (FAFLP) и (гер)ПЦР повторных ДНК-фрагментов способом генетических "отпечатков пальцев" или профилирования белка или частичного секвенирования 16S или 23S рДНК. В предпочтительных вариантах осуществления, такие способы могут быть использованы для идентификации других штаммов *Enterococcus gallinarum*.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488, и пригодны для применения в настоящем изобретении, представляют собой штаммы, которые обеспечивают такой же профиль, что и бактерия, депонированная под номером доступа NCIMB 42488, полученный при рестрикционном анализе амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA), например, при применении рестрикционного фермента *Sau3AI* (типовые способы и рекомендации см., например, [xiv]). Альтернативно, штаммы биотипа идентифицированы как штаммы, которые имеют одинаковые признаки ферментации углеводов как и бактерии, депонированные под номером доступа NCIMB 42488. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, признак ферментации углеводов определяют с использованием панели API 50 CHL (bioMérieux). В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм, используемый в изобретении, представляет собой:

(i) положительный для ферментации по меньшей мере одного из (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или всех): L-арабинозы, D-рибозы, D-ксилозы, D-галактозы, D-глюкозы, D-фруктозы, D-маннозы, N-ацетилглюкозамина, амигдалина, арбутина, салицина, D-целлобиозы, D-мальтозы, сахарозы, трегалозы, гентиобиозы, D-тагатозы и глюконата калия; и/или

(ii) промежуточный для ферментации по меньшей мере одного из (например, по меньшей мере 2, 3, 4 или всего): D-маннита, метил- α -D-гликопиранозида, D-лактозы, крахмала и L-фукозы;

предпочтительно, как определено анализом CHL API 50 (предпочтительно с использованием панели API 50 CHL от bioMérieux).

Другие штаммы *Enterococcus gallinarum*, которые полезны в композициях и способах по изобретению, такие как биотипы бактерии, депонированные под номером доступа NCIMB 42488, могут быть идентифицированы с использованием любого подходящего способа или стратегии, включая анализы, описанные в примерах. Например, штаммы для применения в данном изобретении можно идентифицировать путем культивирования в анаэробной YSCFA и/или введения бактерий в мышиную модель артрита, индуцированного коллагеном типа II, с последующей оценкой уровней цитокинов. В частности, для применения в данном изобретении могут быть пригодны бактериальные штаммы, которые имеют сходные профили роста, метаболический тип и/или поверхностные антигены с бактерией, депонированной под номером доступа NCIMB 42488. Полезный штамм будет иметь сопоставимую иммуномодулирующую активность со штаммом NCIMB 42488. В частности, штамм биотипа будет вызывать сопоставимые эффекты на моделях заболевания рака с эффектами, указанными в примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в примерах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм, используемый в изобретении, представляет собой:

(i) положительно для по меньшей мере одного из (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всех): ферментации маннозы, декарбоксилазы глутаминовой кислоты, аргининариламидазы, фенилаланинариламидазы, ариламидазы пироглутаминовой кислоты, тирозинариламидазы, гистидинариламидазы и серии ариламидазы; и/или

(ii) промежуточное соединение по меньшей мере для одного из (например, по меньшей мере 2 или всех): β -галактозидазы-6-фосфата, β -глюкозидазы и N-ацетил- β -глюкозаминидазы; и/или

(iii) отрицательный по меньшей мере для одного из (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или всего): рафинозная ферментация, пролинариламидаза, лейцилглицинариламидаза, лейцин-ариламидаза, аланиларимидаза, глицинариламидаза и алкамидаза глутамилглутаминовой кислоты,

предпочтительно, как определено анализом углеводного, аминокислотного и нитратного метаболизма, и, необязательно, анализом активности щелочной фосфатазы, более предпочтительно, как определено анализом Rapid ID 32A (предпочтительно с использованием системы Rapid ID 32A от bioMérieux).

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм, используемый в изобретении, представляет собой:

(i) отрицательный по меньшей мере для одной из (например, по меньшей мере 2, 3 или всех 4) глицинариламидазы, ферментации рафинозы, пролилариламидазы и лейцинариламидазы, например, как определено анализом углеводного, аминокислотного и нитратного метаболизма, предпочтительно как определено анализом Rapid ID 32A (предпочтительно с использованием системы Rapid ID 32A от bioMérieux); и/или

(ii) промежуточное положительное значение для ферментации L-фукозы, предпочтительно, как определено с помощью анализа API 50 CHL (предпочтительно с использованием панели API 50 CHL от bioMérieux).

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм, используемый в изобретении, представляет собой внеклеточный препарат АТФ, например один, который продуцирует 6-6,7 нг/мкл (например, 6,1-6,6 или 6,2-6,5 нг/мкл или $6,33 \pm 0,10$ нг/мкл) АТФ, как измерено с использованием набора для анализа АТФ (Sigma-Aldrich, MAK190). Бактериальный внеклеточный АТФ может иметь плейотропные эффекты, включая активацию опосредованной Т-клеточным рецептором сигнализации (Schenk et al., 2011), промотирование дифференцировки клеток Th17 клеток (Atarashi et al., 2008) и индукции секреции провоспалительного медиатора IL-1 β , активируя воспаление NLRP3 (Karmarkar et al., 2016). Соответственно, бактериальный штамм, который является внеклеточным производителем АТФ, полезен для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм для применения в изобретении содержит один или более из следующих трех генов: белок подвижного элемента; транспортер ксилозы ABC, компонент пермеазы и FIG00632333: гипотетический белок. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении содержит гены, кодирующие белок подвижного элемента и транспортер ксилозы ABC, компонент пермеазы; белок под-

вижного элемента и FIG00632333: гипотетический белок; транспортер ксилозы ABC, компонент пермеазы и FIG00632333: гипотетический белок; или белок подвижного элемента, транспортер ксилозы ABC, компонент пермеазы и FIG00632333: гипотетический белок.

Особенно предпочтительным штаммом изобретения является штамм *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером доступа NCIMB 42488. Этот иллюстративный штамм MRX518 был проанализирован в примерах, при этом продемонстрирована его эффективность при лечении заболеваний. Следовательно, изобретение обеспечивает клетку, такую как изолированная клетка, штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, или его производного. Изобретение также относится к композиции, содержащей клетку штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, или его производное. Изобретение также обеспечивает биологически чистую культуру штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного под номером доступа NCIMB 42488. В настоящем изобретении также предлагается клетка штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированная под номером доступа NCIMB 42488, или ее производное, для применения в лечении, в частности описанных в настоящем документе заболеваний. Производным штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, может быть дочерний штамм (потомство) или штамм, культивированный (субклонированный) из оригинала.

Производное штамма по данному изобретению можно модифицировать, например, на генетическом уровне, без удаления биологической активности. В частности, производный штамм по настоящему изобретению является терапевтически активным. Производный штамм будет иметь сопоставимую иммуномодулирующую активность с исходным штаммом NCIMB 42488. В частности, производный штамм будет вызывать сопоставимые эффекты на моделях заболевания рака с эффектами, указанными в примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в примерах. Как правило, производное штамма NCIMB 42488 обычно представляет собой биотип штамма NCIMB 42488.

Ссылки на клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированные под номером доступа NCIMB 42488, охватывают любые клетки, которые обладают теми же характеристиками безопасности и терапевтической эффективности, что и штаммы, депонированные под номером доступа NCIMB 42488, и такие клетки охватываются изобретением. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, ссылка на клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, относится только к штамму MRX518, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, и не относится к бактериальному штамму, который не был депонирован под номером доступа NCIMB 42488. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ссылка на клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированные под номером доступа NCIMB 42488, относится к клеткам, которые имеют те же самые характеристики безопасности и терапевтической эффективности, что и штаммы, депонированные под номером доступа NCIMB 42488, но которые не являются штаммом, депонированным под номером доступа NCIMB 42488.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения бактериальные штаммы в композициях по настоящему изобретению являются жизнеспособными и могут частично или полностью колонизировать кишечник.

Лечение рака

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения композиции по настоящему изобретению предназначены для применения в лечении или профилактике рака. Примеры демонстрируют, что введение композиций по изобретению может приводить к уменьшению роста опухоли в ряде опухолевых моделей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение с применением композиций по настоящему изобретению приводит к уменьшению размера опухоли или уменьшению роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по изобретению предназначены для уменьшения размера опухоли или уменьшения роста опухоли. Композиции по изобретению могут быть эффективными для уменьшения размера опухоли или роста. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по изобретению предназначены для применения пациентам с солидными опухолями. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения композиции по настоящему изобретению предназначены для применения с целью уменьшения или предотвращения ангиогенеза при лечении рака. Композиции по изобретению могут влиять на иммунные или воспалительные системы, которые имеют центральную роль в ангиогенезе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения композиции по настоящему изобретению предназначены для применения с целью предотвращения метастазирования.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по настоящему изобретению предназначены для применения в лечении или профилактике рака молочной железы. Примеры демонстрируют, что композиции по изобретению могут быть эффективными для лечения рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по настоящему изобретению предназначены для применения с целью уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления

изобретения, рак представляет собой рак молочной железы. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения рак представляет собой рак молочной железы IV стадии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по настоящему изобретению предназначены для применения в лечении или профилактике рака легких. Примеры демонстрируют, что композиции по изобретению могут быть эффективными для лечения рака легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по настоящему изобретению предназначены для применения с целью уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака легких. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по настоящему изобретению предназначены для применения в лечении или профилактике рака легких. Примеры показывают, что композиции по изобретению могут быть эффективными для лечения рака печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по настоящему изобретению предназначены для применения с целью уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака печени. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения рак представляет собой гепатому (гепатоцеллюлярная карцинома).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по изобретению предназначены для лечения или профилактики рака толстой кишки. Примеры демонстрируют, что композиции по изобретению оказывают влияние на раковые клетки толстой кишки и могут быть эффективными для лечения рака толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по настоящему изобретению предназначены для применения с целью уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака толстой кишки. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой колоректальную аденокарциному.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак кишечника. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой часть тела, которая не является кишечником. В некоторых вариантах осуществления рак не является раком кишечника. В некоторых вариантах осуществления рак не является колоректальным раком. В некоторых вариантах осуществления рак не является раком тонкого кишечника. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение или профилактика происходит в месте, отличном от кишечника. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение или профилактика происходит в кишечнике, а также на участке, отличном от кишечника.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике карциномы. Примеры показывают, что композиции по изобретению могут быть эффективными для лечения многочисленных видов рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике неиммуногенного рака. Примеры демонстрируют, что композиции по изобретению могут быть эффективными для лечения неиммуногенных раковых заболеваний.

Терапевтический эффект композиций по изобретению на рак может быть опосредован провоспалительным механизмом. Примеры 2, 4 и 5 демонстрируют, что экспрессия ряда провоспалительных цитокинов может быть увеличена после введения MRX518. Воспаление может оказывать противоопухолевое действие, а провоспалительные цитокины, такие как TNF α , исследуются как терапия рака. Повышение регуляции генов, таких как TNF, показанное в примерах, может указывать на то, что композиции по изобретению могут быть полезны для лечения рака с помощью аналогичного механизма. Повышение регуляции лигандов CXCR3 (CXCL9, CXCL10) и ИФН γ -индуцибельных генов (IL-32) может указывать на то, что композиции по изобретению вызывают ответ типа ИФН γ . ИФН γ является мощным фактором, активирующим макрофаг, который может стимулировать опухолизующую активность, и CXCL9 и CXCL10, например, также обладают противораковыми эффектами [17-19]. Поэтому в некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению предназначены для применения при содействии воспаления при лечении рака. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по изобретению предназначены для применения при воспалении Th1 при лечении рака. Th1 клетки продуцируют ИФН γ и обладают мощными противораковыми эффектами [20]. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению предназначены для лечения рака ранней стадии, такого как рак, который не метастазирует, или рак стадии 0 или стадии 1. Развитие воспаления может быть более эффективным в отношении ранних стадий рака [20]. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению предназначены для применения в стимулировании воспаления для усиления эффекта второго противоракового агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение или профилактика рака включает повышение уровня экспрессии одного или более цитокинов. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения лечение или профилактика рака включает в себя повышение уровня экспрессии одного или нескольких IL-1 β , IL-6 и TNF- α , например IL-1 β и IL-6, IL-1 β и TNF- α , IL-6 и TNF- α или все три IL-1 β , IL-6 и TNF- α . Известно, что повышение уровня экспрессии любого из IL-1 β , IL-6 и TNF- α свидетельствует об эффективности лечения рака.

Примеры 4 и 5 демонстрируют, что когда бактериальный штамм, как описано в данном документе, используется в комбинации с липополисахаридом (LPS), наблюдается синергическое увеличение IL-1 β .

Известно, что ЛПС вызывает провоспалительный эффект. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения лечение или профилактика включает применение бактериального штамма, как описано в данном документе, в комбинации с агентом, который активирует IL-1 β . В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение или профилактика включает применение бактериального штамма, как описано в данном документе, в сочетании с LPS. Соответственно композиция по изобретению может дополнительно содержать агент, который активирует IL-1 β . Соответственно композиция по изобретению может дополнительно содержать LPS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по изобретению предназначены для лечения пациента, который ранее получал химиотерапию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по изобретению предназначены для лечения пациента, который не переносит химиотерапевтическое лечение. Композиции по изобретению могут быть особенно полезны для таких пациентов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для предотвращения рецидива. Композиции по изобретению могут быть пригодны для долгосрочного применения. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для предотвращения прогрессирования рака.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для лечения немелкоклеточной карциномы легкого. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по изобретению предназначены для лечения мелкоклеточной карциномы легкого. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по изобретению предназначены для лечения плоскоклеточного рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для лечения аденокарциномы. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для применения при лечении опухолей желез, карциноидных опухолей или недифференцированных карцином.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для лечения гепатобластомы, холангиокарциномы, холангиоцеллюлярной цистаденокарциномы или рака печени, вызванного вирусной инфекцией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для лечения инвазивного протокового рака, рака протоков in situ или инвазивного долькового рака.

В других вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению предназначены для лечения или профилактики острой лимфобластной лейкемии (ALL), острого миелоидного лейкоза, аденокарциномы, базально-клеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, опухоли кости, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы, глиомы мозга, опухоли головного мозга, астроцитомы мозжечка, астроцитомы головного мозга/злокачественной глиомы, эпендимомы, медуллобластомы, супратенториальной примитивной нейроэктодермальной опухоли, рака молочной железы, бронхиальной аденомы/карциноидов, лимфомы Беркитта, карциноидной опухоли, рака шейки матки, хронического лимфолейкоза, хронического миелолейкозного лейкоза, хронического миелопролиферативного расстройства, рака толстой кишки, кожной Т-клеточной лимфомы, рака эндометрия, эпендимомы, рака пищевода, саркомы Юинга, внутриглазной меланомы, ретинобластомы, рака желчного пузыря, рака желудка, желудочно-кишечной карциноидной опухоли, желудочно-кишечной стромальной опухоли (GIST) глиомы, эмбрионально-клеточной опухоли, глиомы, детского зрительного пути и гипоталамуса, лимфомы Ходжкина, меланомы, карциномы островковых клеток, саркомы Капоши, рака почек, рака гортани, лейкоза, лимфомы, мезотелиомы, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, орофарингиального рака, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака паращитовидной железы, рака глотки, аденомы гипофиза, неоплазии клеток плазмы, рака предстательной железы, карциномы почек, ретинобластомы, саркомы, рака яичек, рака щитовидной железы или рака матки.

Композиции по настоящему изобретению могут быть особенно эффективными при применении в комбинации с другими терапевтическими агентами. Иммуномодулирующий эффект композиций по изобретению может быть эффективным в сочетании с более прямыми противораковыми агентами. Поэтому в некоторых вариантах осуществления изобретения относится к композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* и противораковый агент. В предпочтительных вариантах реализации изобретения противоопухолевый агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки, целенаправленную иммунотерапию антителами, терапию CAR-T-клетками, онколитический вирус или цитостатический препарат. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения композиция содержит противораковый агент, выбранный из группы, состоящей из следующих препаратов:

Yervoy (ипилимумаб, BMS); Keytruda (пембролизумаб, Merck); Opdivo (ниволумаб, BMS); MEDI4736 (AZ/MedImmune); MPDL3280A (Roche/Genentech); Термелимумаб (AZ/MedImmune); CT-011 (падилизумаб, CureTech); BMS-986015 (лирилумаб, BMS); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MSB-0010718C (Merck); PF-05082566 (Pfizer); MEDI6469 (AZ/MedImmune); BMS-986016 (BMS); BMS-663513 (упелумаб, BMS); IMP321 (Prima Biomed); LAG525 (Novartis); ARGX-110 (arGEN-X); PF-05082466 (Pfizer); CDX-1127 (варлилумаб; CellDex Therapeutics); TRX-518 (GITR Inc.); MK-4166 (Merck); JTX-2011 (Jounce Therapeutics); ARGX-115 (arGEN-X); NLG-9189 (индоксимод, NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH2201 (Innate Immunotherapeutics/AZ); NLG-919 (NewLink Genetics); анти-VISTA (JnJ); Эпакадостат (INCB024360, Incyte); F001287 (Flexus/BMS); CP 870893 (Университет Пенсильвании); MGA271 (Macrogenix); Эмактузумаб (Roche/Genentech); Галунисертиб (Эли Лилли); Улокуплумаб (BMS); BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics); Бавитуксимаб (Peregrine Pharmaceuticals); CC 90002 (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals); IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals); LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (Женский университет Эвха, Корея); Вемурафениб (Plexxikon); Дабрафениб (Genentech/GSK); BMS-777607 (BMS); BLZ945 (Мемориальный центр рака Слоан-Кеттеринг); Унитуксин (динутуксимаб, United Therapeutics Corporation); Елинцито (блинатумомаб, Amgen); Кирамза (рамуцирумаб, Eli Lilly); Газива (обинутузумаб, Roche/Biogen); Кадсила (адо-трастузумаб эмтансин, Roche/Genentech); Перьета (пертузумаб, Roche/Genentech); Адцетрис (брентуксимаб ведотин, Takeda/Millennium); Арзерра (Офатумумаб, GSK); Вектибикс (панитумумаб, Amgen); Авастин (бевацизумаб, Roche/Genentech); Эрбитукс (цетуксимаб, BMS/Merck); Бексар (тозитумомаб-I131,

GSK); Зевалин (ибритумомаб тиуксетан, Biogen); Кэмпас (алемтузумаб, Bayer); Милотарг (гемтузумаб озогамицин, Pfizer); Герцептин (трастузумаб, Roche/Genentech); Ритуксан (ритуксимаб, Genentech/Biogen); волоксимаб (Abbvie); Энаватузимаб (Abbvie); АБТ-414 (Abbvie); Эллотузумаб (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Ablynx); Озарализумаб (Ablynx); Актураб-С (Actinium); Актураб-Р (Actinium); Milatuzumab-dox (Actinium); Emab-SN-38 (Actinium); Naptumomab estafenatox (Active Biotech); AFM13 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (самализумаб, Alexion); ALT-836 (Altor Bioscience); ALT-801 (Altor Bioscience); ALT-803 (Altor Bioscience); AMG780 (Amgen); AMG 228 (Amgen); AMG820 (Amgen); AMG172 (Amgen); AMG595 (Amgen); AMG110 (Amgen); AMG232 (адекатумумаб, Amgen); AMG211 (Amgen/MedImmune); BAY20-10112 (Amgen/Bayer); Рилотумумаб (Amgen); Denosumab (Amgen); AMP-514 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/MedImmune); MEDI6383 (AZ/MedImmune); MEDI551 (AZ/MedImmune); Моксетумомаб Пасудотокс (AZ/MedImmune); MEDI565 (AZ/MedImmune); MEDI0639 (AZ/MedImmune); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MEDI562 (AZ/MedImmune); AV-380 (AVEO); AV203 (AVEO); AV299 (AVEO); BAY79-4620 (Bayer); Анетумаб равантинсина (Bayer); вантуктумаб (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); Сибротузумаб (Boehringer Ingelheim); BI-836845 (Boehringer Ingelheim); B-701 (BioClin); BIIB015 (Biogen); Обинутузумаб (Biogen/Genentech); BI-505 (Bioinvent); BI-1206 (Bioinvent); TB-403 (Bioinvent); BT-062 (Biotest) BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS); Нецитумумаб (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex); CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo); патритумаб (Daiichi Sankyo); тигатузумаб (Daiichi Sankyo); нимотузумаб (Daiichi Sankyo); DS-8895 (Daiichi Sankyo); DS-8873 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORab-004 (Eisai); MORab-009 (Eisai); MORab-003 (Eisai); MORab-066 (Eisai); LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212 (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly); циксутумумаб (Eli Lilly); фланвотумаб (Eli Lilly);

IMC-TR1 (Eli Lilly); Рамукирумаб (Eli Lilly); Табалумаб (Eli Lilly); занолимуаb (Emergent Biosolution); FG-3019 (FibroGen); FPA008 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics); FPA144 (Five Prime Therapeutics); катумаксомаb (Fresenius Biotech); IMAB362 (Ganymed); IMAB027 (Ganymed); HuMax-CD74 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745 (Gilead); GS-6624 (Gilead); OMP-21M18 (демцизумаb, GSK); мапатумумаb (GSK); IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen); IMGN853 (ImmunoGen); IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130 (Immunomedics); милатузумаb-докс (Immunomedics); IMMU-115 (Immunomedics); IMMU-132 (Immunomedics); IMMU-106 (Immunomedics); IMMU-102 (Immunomedics); Эпратузумаb (Immunomedics); Кливатузумаb (Immunomedics); IPH41 (Innate Immunotherapeutics); Даратумумаb (Janssen/Genmab); CNTO-95 (Intetumumab, Janssen); CNTO-328 (силтуксимаb, Janssen); KB004 (KaloBios); могомулизумаb (Kyowa Hakko Kirrin); KW-2871 (экроексимаb, Life Science); сонепцизумаb (Lpath); маргетуксимаb (Macrogenics); эноблитузумаb (Macrogenics); MGD006 (Macrogenics); MGF007 (Macrogenics); MK-0646 (далотузумаb, Merck); MK-3475 (Merck); Sym004 (Symphogen/Merck Serono); DI17E6 (Merck Serono); MOR208 (Morphosys); MOR202 (Morphosys); Xmaб5574 (Morphosys); BPC-1C (энситуксимаb, Precision Biologics); TAS266 (Novartis); LFA102 (Novartis); BHQ880 (Novartis/Morphosys); QGE031 (Novartis); HCD122 (лукатумумаb, Novartis); LJМ716 (Novartis); AT355 (Novartis); OMP-21M18 (Демсизумаb, OncoMed); OMP52M51 (Oncomed/GSK); OMP-59R5 (Oncomed/GSK); вантуктумаb (Oncomed/Bayer); CMC-544 (инотузумаb озогамицин, Pfizer); PF-03446962 (Pfizer); PF-04856884 (Pfizer); PSMA-ADC (Progenics); REGN1400 (Regeneron); REGN910 (несвакумаb, Regeneron/Sanofi); REGN421 (энотикумаb, Regeneron/Sanofi); RG7221, RG7356, RG7155, RG7444, RG7116, RG7458, RG7598, RG7599, RG7600, RG7636, RG7450, RG7593, RG7596, DCDS3410A, RG7414 (парсатузумаb), RG7160 (импатузумаb), RG7159 (обинтузумаb), RG7686, RG3638 (онартузумаb) RG7597 (Roche/Genentech); SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi); SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi), SGN-LIV1A (линтузумаb,

Seattle Genetics); SGN-CD33A (Сиэтлская генетика); SGN-75 (vorsetuzumab mafodotin, Seattle Genetics); SGN-19A (Seattle Genetics) SGN-CD70A (Seattle Genetics); SEA-CD40 (Seattle Genetics); ибритумомаб тиуксетан (Spectrum); MLN0264 (Takeda); ганитумаб (Takeda/Amgen); CEP-37250 (Teva); TB-403 (Thrombogenic); VB4-845 (Viventia); X Mab2512 (Xencor); X Mab5574 (Xencor); нимотузумаб (YM Biosciences); Карлумаб (Janssen); NY-ESO TCR (Adaptimmune); MAGE-A-10 TCR (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics); KTE-C19 CAR (Kite Pharma); UCART19 (Collectis); BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); ATTCK20 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); Onyx-015 (Onyx Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunwaybio); DNX-2401 (DNAtrix); VCN-01 (VCN Biosciences); Colo-Ad1 (PsiOxus Therapeutics); ProstAtak (Advantagene); Oncos-102 (Oncos Therapeutics); CG0070 (Cold Genesys); Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics); GL-ONC1 (Genelux); T-VEC (Amgen); G207 (Medigene); HF10 (Takara Bio); SEPREHVIR (HSV1716, Virtutu Biologics); OrienX010 (OrienGene Biotechnology); Пеолизин (Oncolytics Biotech); SVV-001 (Neotropix); Cacatak (CVA21, Viralytics); Алимта (Eli Lilly), цисплатин, оксалиплатин, иринотекан, фолиновая кислота, метотрексат, циклофосфамид, 5-фторурацил, Зикадия (Novartis), Тафинлар (GSK), Халькори (Pfizer), Иресса (AZ), Гилотриф (Boehringer Ingelheim), Тарцева (Astellas Pharma), Халавен (Eisai Pharma), велипариб (Abbvie), AZD9291 (AZ), Алектиниб (Chugai), LDK378 (Novartis), ганетеспиб (Synta Pharma), Тергенпуматуцел-Л (NewLink Genetics), GV1001 (Kael-GemVax), тивантиниб (ArQule); Цитоксан (BMS); Онковин (Eli Lilly); Адриамицин (Pfizer); Гемзар (Eli Lilly); Кселода (Roche); Икземпра (BMS); Абраксан (Celgene); Трелстар (Debiopharm); Таксотер (Sanofi); Нексавар (Bayer); IMMU-132 (Immunomedics); E7449 (Eisai); Термодокс (Celsion); Кометрик (Exellxis); Лонсурф (Taiho Pharmaceuticals); Камптозар (Pfizer); UFT (Taiho Pharmaceuticals); и TS-1 (Taiho Pharmaceuticals).

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более бактериальных штаммов, имеющих последовательность рНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, например, которая представляет собой *Enterinococcus gallinarum*, является единственным терапевтически активным агентом(ами) в композиции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм(ы) в композиции является/являются единственным терапевтически активным агентом(агентами) в композиции по изобретению.

Способы введения

Предпочтительно композиции по настоящему изобретению предназначены для введения в желудочно-кишечный тракт с целью обеспечения доставки и/или частичной или полной колонизации кишечника бактериальным штаммом по настоящему изобретению. Как правило, композиции по настоящему изобретению вводят перорально, но их можно вводить ректально, интраназально, или посредством буккального или сублингвального пути.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по настоящему изобретению можно вводить в форме пены, в форме спрея или геля.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по настоящему изобретению можно вводить в виде суппозитория, такого как ректальный суппозиторий, например в форме масла плодов шоколадного дерева (масло какао), синтетического твердого жира (например, суппоцир, витепсол), глицерожелатина, полиэтиленгликоля или композиции мыльного глицерина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по настоящему изобретению вводят в желудочно-кишечный тракт через зонд, такой как назогастральный зонд, орогастральный зонд, же-

лудочный зонд, еюностомический зонд (J-зонд), чрескожную эндоскопическую гастростому (ЧЭГ) или через отверстие, такое как отверстие в стенке грудной клетки, которое обеспечивает доступ к желудку, тощей кишке, и через другие пригодные отверстия для доступа.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить один раз, или их можно вводить последовательно в рамках схемы лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции по настоящему изобретению предназначены для ежедневного введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение согласно настоящему изобретению сопровождается оценкой микробиоты кишечника пациента. Лечение можно повторить, если доставка и/или частичная или полная колонизация штаммом по настоящему изобретению не достигнута и эффективность отсутствует, или лечение можно прекратить, если доставка и/или частичная или полная колонизация успешны и наблюдается эффективность.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция по изобретению может вводиться беременному животному, например млекопитающему, например человеку, чтобы уменьшить вероятность развития рака у ребенка *in utero* и/или после его рождения.

Композиции по изобретению могут вводиться пациенту, у которого был диагностирован рак, или который был идентифицирован как подверженный риску развития рака. Композиции могут также вводиться в качестве профилактической меры для предотвращения развития рака у здорового пациента.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту, который был идентифицирован как имеющий патологическую микробиоту кишечника. Например, пациент может характеризоваться уменьшенной или отсутствующей колонизацией *Enterococcus gallinarum*.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить как пищевой продукт, такой как пищевая добавка.

Как правило, композиции по настоящему изобретению предназначены для лечения людей, хотя они могут применяться для лечения животных, включая моногастрических млекопитающих, таких как домашняя птица, свиньи, кошки, собаки, лошади или кролики. Композиции по настоящему изобретению могут быть пригодны для увеличения роста и работоспособности животных. При введении животным можно применять пероральный зонд.

Композиции

Как правило, композиция по настоящему изобретению включает бактерии. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения композиция составлена в лиофилизированной форме.

Например, композиция по настоящему изобретению может содержать гранулы или желатиновые капсулы, например твердые желатиновые капсулы, содержащие бактериальный штамм по настоящему изобретению.

Предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит лиофилизированные бактерии. Лيوфилизация бактерий представляет собой общеизвестную процедуру, и соответствующие рекомендации доступны, например, в работах [xx-xxi].

В альтернативном варианте композиция по настоящему изобретению может содержать живую активную бактериальную культуру.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм в композиции по изобретению не был инактивирован, например, не был инактивирован нагреванием. В некоторых вариантах осуществления изобретения, бактериальный штамм в композиции по изобретению не был убит, например не был убит при нагревании. В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм в композиции по изобретению не был ослаблен, например не был ослаблен при нагревании. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм в композиции по изобретению не был убит, инактивирован и/или ослаблен. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм в композиции по изобретению является живым. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, бактериальный штамм в композиции по изобретению является жизнеспособным. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм в композиции по изобретению способен частично или полностью колонизировать кишечник. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм в композиции по изобретению является жизнеспособным и способен частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит смесь живых бактериальных штаммов и штаммов бактерий, которые были убиты.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения композиция по настоящему изобретению помещена в капсулу с целью обеспечения доставки бактериального штамма в кишечник. Инкапсуляция защищает композицию от расщепления до доставки к необходимому месту, например, инактивируя химические или физические факторы, такие как давление, ферментативная активность или физический распад, что может быть вызвано изменениями pH. Для инкапсуляции можно применять любой пригодный способ. Типовые способы инкапсуляции включают окружение внутри пористой матрицы, прикрепление или адсорбцию на поверхностях твердых носителей, самоагрегирование с помощью флокуляции или сшивающих агентов и механическое удерживание за микропористой мембраной или микрокапсулой. Руководство по инкапсуляции, которое может быть полезно для приготовления композиций по

изобретению, доступно, например, в ссылках [xxii] и [xxiii].

Композиция может вводиться перорально и может находиться в форме таблетки, капсулы или порошка. Инкапсулированные продукты являются предпочтительными, поскольку *Enterococcus gallinarum* являются анаэробами. Другие ингредиенты (такие как, например, витамин С) могут быть включены в качестве поглотителей кислорода и пребиотических субстратов для улучшения доставки и/или частичной или полной колонизации и выживания *in vivo*. В альтернативном варианте пробиотическая композиция по настоящему изобретению можно вводить перорально в виде пищевого или питательного продукта, такого как молоко или ферментированный молочный продукт на основе сыворотки или в виде фармацевтического препарата.

Композиция может быть составлена как пробиотик.

Композиция по настоящему изобретению включает терапевтически эффективное количество бактериального штамма по настоящему изобретению. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма является достаточным, чтобы оказать положительный эффект у пациента. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма может быть достаточным для обеспечения доставки и/или частичной или полной колонизации кишечника пациента.

Подходящая суточная доза бактерий, например, для взрослого человека, может составлять от около 1×10^3 до около 1×10^{11} колониеобразующих единиц (КОЕ); например от около 1×10^7 до около 1×10^{10} КОЕ; в другом примере от около 1×10^6 до около 1×10^{10} КОЕ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция содержит бактериальный штамм в количестве от около 1×10^6 до около 1×10^{11} КОЕ/г по отношению к массе композиции; например, от около 1×10^8 до около 1×10^{10} КОЕ/г. Доза может составлять, например, 1, 3, 5 и 10 г.

Как правило, пробиотик, такой как композиция по настоящему изобретению, в некоторых случаях комбинируют по меньшей мере с одним пригодным пребиотическим соединением. Пребиотическое соединение обычно представляет собой неперевариваемый углевод, такой как олиго- или полисахарид, или сахарный спирт, который не расщепляется или не абсорбируется в верхних отделах пищеварительного тракта. Известные пребиотики включают коммерческие продукты, такие как инулин и трансгалактоолигосахариды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пробиотическая композиция по настоящему изобретению включает пребиотическое соединение в количестве от около 1 до около 30% по весу по отношению к общему весу композиции (например, от 5 до 20% по весу). Углеводы могут быть выбраны из группы, состоящей из фруктоолигосахаридов (или FOS), короткоцепочечных фруктоолигосахаридов, инулина, изомальтоолигосахаридов, пектинов, ксилоолигосахаридов (или XOS), хитозан-олигосахаридов (или COS), бета-глюканов, модифицированной аравийской камеди и устойчивых крахмалов, полидекстрозы, D-тагатозы, волокон акации, рожкового дерева, овса и волокон цитрусовых. В одном аспекте пребиотики представляют собой короткоцепочечные фруктоолигосахариды (для простоты указаны в настоящем документе ниже как FOSs-c.c); указанные FOSs-c.c. не являются усваиваемыми углеводами, обычно получаемые путем превращения свекольного сахара, и включают молекулу сахарозы, к которой присоединены три молекулы глюкозы.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества или носители. Примеры таких подходящих носителей можно найти в ссылке [xxiv]. Приемлемые носители или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области и описаны, например, в работе [xxv]. Примеры подходящих носителей включают лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и тому подобное. Примеры пригодных разбавителей включают этанол, глицерин и воду. Выбор фармацевтического носителя, вспомогательного вещества или разбавителя может быть осуществлен с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Фармацевтические композиции могут содержать или включать в дополнение к носителю, вспомогательному веществу или разбавителю любой пригодный связующий агент (агенты), смазывающий агент (агенты), суспендирующий агент (агенты), агент (агенты) для покрытия, солюбилизующий агент (агенты). Примеры пригодных связующих агентов включают крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза, безводная лактоза, свободно текущая лактоза, бета-лактоза, кукурузные подсластители, природные и синтетические смолы, такие как акация, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза и полиэтиленгликоль. Примеры пригодных смазывающих агентов включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и тому подобное. В фармацевтической композиции могут содержаться консерванты, стабилизаторы, красители и даже ароматизаторы. Примеры консервантов включают бензоат натрия, сорбиновую кислоту и сложные эфиры р-гидроксibenзойной кислоты. Могут также применяться антиоксиданты и суспендирующие агенты.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в виде пищевого продукта. Например, пищевой продукт может обеспечить питательную пользу в дополнение к терапевтическому эффекту настоящего изобретения, например, в пищевой добавке. Подобным образом, пищевой продукт может быть составлен для улучшения вкуса композиции по настоящему изобретению или для того, что-

бы сделать композицию более привлекательной для употребления, более похожей на обычный пищевой продукт, а не на фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления изобретения композицию по настоящему изобретению составляют как продукт на основе молока. Термин "продукт на основе молока" означает любой жидкий или полутвердый продукт на основе молока или сыворотки, характеризующийся различным содержанием жира. Молочным продуктом может быть, например, коровье молоко, козье молоко, овечье молоко, обезжиренное молоко, цельное молоко, молоко, восстановленное из сухого молока и сыворотки без какой-либо обработки, или молочный продукт может представлять собой обработанный продукт, такой как йогурт, простокваша, творог, кислое молоко, кислое цельное молоко, пахта и другие кисломолочные продукты. Другая важная группа включает молочные напитки, такие как напитки из сыворотки, ферментированное молоко, сгущенное молоко, молочные напитки для детей грудного или более старшего возраста; ароматизированное молоко, мороженое; продукты, содержащие молоко, такие как сладости.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по настоящему изобретению содержат один бактериальный штамм или вид и не содержат никаких других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут содержать только *de minimis* или биологически несущественные количества других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут представлять собой культуру, которая по существу не содержит других видов организма. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения обеспечивает композицию, содержащую один или более штаммов из вида *Enterococcus gallinarum*, который не содержит бактерий из каких-либо других видов или который содержит только *de minimis* или биологически несоответствующие количества бактерий из другого вида для применения в терапии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению содержат более одного бактериального штамма или вида. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению содержат более одного штамма из одного и того же вида (например, более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45) и, необязательно, не содержат бактерий из других видов. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению содержат менее 50 штаммов из одного и того же вида (например, менее 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 штамма) и, необязательно, не содержат бактерий из других видов. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению содержат 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25 или 31-50 штаммов из одного и того же вида и, необязательно, не содержат бактерий из других видов. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению содержат более одного вида из одного и того же рода (например, более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 23, 25, 30, 35 или 40 видов) и, необязательно, не содержат бактерий из какого-либо другого рода. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению содержат менее 50 видов из одного и того же рода (например, менее 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 вида) и, необязательно, не содержат бактерии из какого-либо другого рода. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению содержат 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25 или 31-50 видов из одного и того же рода и, необязательно, не содержат бактерий из какого-либо другого рода. Изобретение включает любую комбинацию вышеизложенного.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит микробный консорциум. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения композиция включает бактериальный штамм, имеющий последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, например *Enterococcus gallinarum*, как часть микробного консорциума. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм присутствует в комбинации с одним или несколькими (например, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20) другими бактериальными штаммами из других родов, с которыми он может жить симбиотически *in vivo* в кишечнике. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения композиция включает бактериальный штамм, имеющий последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, например *Enterococcus gallinarum*, в сочетании с бактериальным штаммом от другого рода. В некоторых вариантах осуществления изобретения микробный консорциум содержит два или более бактериальных штамма, полученных из образца фекалий одного организма, например человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения микробный консорциум не встречается в природе. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения микробный консорциум содержит бактериальные штаммы, полученные из образцов фекалий по меньшей мере из двух разных организмов. В некоторых вариантах осуществления изобретения два разных организма являются одними и теми же видами, например двумя разными людьми, например двумя различными младенцами. В некоторых вариантах осуществления изобретения два разных организма представляют собой младенца и взрослого человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения два разных организма представляют собой человеческое и нечеловеческое млекопитающее.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция по изобретению дополнительно содержит бактериальный штамм, который обладает теми же характеристиками безопасности и терапев-

тической эффективности, что и штамм MRX518, но который не является MRX518, депонированным под номером доступа NCIMB 42488, или который не является *Enterococcus gallinarum*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых композиция по изобретению содержит более одного бактериального штамма, вида или рода, отдельные бактериальные штаммы, виды или роды могут быть предназначены для отдельного, одновременного или последовательного введения. Например, композиция может содержать все более чем один бактериальный штамм, виды или роды, или бактериальные штаммы, виды или роды могут храниться отдельно и вводиться отдельно, одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления изобретения более одного бактериального штамма, вида или родов хранятся отдельно, но смешиваются перед применением.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм для применения в изобретении получают из фекалий младенца человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых композиция по изобретению содержит более одного бактериального штамма, все бактериальные штаммы получают из фекалий младенца человека или, если присутствуют другие бактериальные штаммы, они присутствуют только в минимальных количествах. Бактерии, могли быть культивированы после получения из фекалий младенца человека и использовались в композиции по изобретению.

Как упоминается выше, в некоторых вариантах осуществления изобретения один или более бактериальных штаммов, имеющих последовательность рПНК 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, например, которая представляет собой *Enterococcus gallinarum*, является единственным терапевтически активным агентом(ами) в композиции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальный штамм(ы) в композиции является/являются единственным терапевтически активным агентом(агентами) в композиции по изобретению.

Для композиций, предназначенных для применения согласно настоящему изобретению, может быть обязательным или необязательным для получения разрешения на продажу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, в которой указанный бактериальный штамм является лиофилизированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, в которой указанный бактериальный штамм высушивается распылением. В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или высушен распылением и в которой он является живым. В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или высушен распылением и в которой он является жизнеспособным. В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или высушен распылением и в которой он способен частично или полностью колонизировать кишечник. В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или высушен распылением и в которой он является жизнеспособным и способен частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых случаях лиофилизированный или высушенный распылением бактериальный штамм восстанавливают перед введением. В некоторых случаях восстановление осуществляют с применением разбавителя, описанного в настоящем документе.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, разбавители или носители.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм, используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и причем расстройство представляет собой рак молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, рак представляет собой рак молочной железы. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения рак представляет собой рак молочной железы IV стадии.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: бактериальный штамм, используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и причем расстройство представляет собой рак легких. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: бактериальный штамм, используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и причем расстройство представляет собой рак печени. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения рак представляет собой гепатому (гепатоцеллюлярная карцинома).

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции,

содержащей: бактериальный штамм, используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и причем расстройство представляет собой рак толстой кишки. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой колоректальную аденокарциному.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм, используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и причем расстройство представляет собой карциному.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм, используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и причем расстройство представляет собой неиммунотенный рак.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм по изобретению; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и причем расстройство выбрано из группы, состоящей из немелкоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточной карциномы, аденокарциномы, железистых опухолей, карциноидных опухолей, недифференцированных карцином.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и причем расстройство выбрано из группы, состоящей из гепатобластомы, холангиокарциномы, холангиоцеллюлярной цистаденокарциномы или рака печени, вызванного вирусной инфекцией.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и причем расстройство выбрано из группы, состоящей из инвазивной карциномы протоков, карциномы протоков *in situ* или инвазивной дольковой карциномы.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; где бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту, нуждающемуся в этом и в котором расстройство выбрано из группы, включающей острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз, адреналокортикальную карциному, базально-клеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, опухоль кости, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому мозга, опухоль головного мозга, астроцитому мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественной глиомы, эпендимому, медуллобластому, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, рак молочной железы, бронхиальной аденомы/карциноидов, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, рак шейки матки, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкозный лейкоз, хронический миелопролиферативное расстройство, рак толстой кишки, кожную Т-клеточную лимфому, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга, внутриглазную меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка, желудочно-кишечную карциноидную опухоль, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST) глиому, эмбрионально-клеточную опухоль, глиому детского зрительного пути и гипоталамуса, лимфому Ходжкина, меланому, карциному островковых клеток, саркому Капоши, рак почек, рак гортани, лейкоз, лимфому, мезотелиому, нейробластому, неходжкинскую лимфому, орофарингиальный рак, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак парашитовидной железы, рак глотки, аденому гипофиза, неоплазию клеток плазмы, рак предстательной железы, карциному почек, ретинобластому, саркому, рак яичек, рак щитовидной железы или рак матки.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, в которой количество бактериального штамма составляет от около 1×10^3 до около 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм по отношению к весу композиции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, при этом композицию вводят в дозе 1, 3, 5 или 10 г.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, при этом композицию вводят с помощью способа, выбранного из группы, состоящей

из перорального, ректального, подкожного, назального, буккального и сублингвального пути.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, содержащая носитель, выбранный из группы, состоящей из лактозы, крахмала, глюкозы, метилцеллюлозы, стеарата магния, маннита и сорбита.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая разбавитель, выбранный из группы, состоящей из этанола, глицерина и воды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из крахмала, желатина, глюкозы, безводной лактозы, свободно текущей лактозы, бета-лактозы, кукурузного подсластителя, акации, трагаканта, альгината натрия, карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленгликоля, олеата натрия, стеарата натрия, стеарата магния, бензоата натрия, ацетата натрия и хлорида натрия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, дополнительно содержащая по меньшей мере один из консервантов, антиоксидантов и стабилизаторов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая консервант, выбранный из группы, состоящей из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров *p*-гидроксibenзойной кислоты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагается вышеописанная фармацевтическая композиция, причем когда композицию хранят в герметичном контейнере при температуре около 4 или около 25°C, и контейнер помещают в атмосферу с относительной влажностью 50%, по меньшей мере 80% бактериального штамма, измеренного в колониеобразующих единицах, остается после периода по меньшей мере около 1, 3, 6 месяцев, 1, 1,5, 2, 2,5 года или 3 лет.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция по изобретению предоставлена в герметичном контейнере, содержащем композицию, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения герметичный контейнер представляет собой пакетик или бутылку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция по изобретению предоставлена в шприце, содержащем композицию, как описано в данном документе.

Композиция по настоящему изобретению может в некоторых вариантах осуществления изобретения быть представлена в виде фармацевтической композиции. Например, композиция может быть представлена в виде таблетки или капсулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсула представляет собой желатиновую капсулу ("желатиновая капсула").

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции по изобретению вводят перорально. Пероральное введение может включать глотание, так что соединение попадает в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или сублингвальное введение, посредством которого соединение поступает в кровоток непосредственно изо рта.

Фармацевтические композиции, подходящие для перорального введения, включают твердую прессованную массу, твердые микрочастицы, полутвердые и жидкие (включая многофазные или дисперсные системы), такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие мульти- или наночастицы, жидкости (например, водные растворы), эмульсии или порошки; таблетки для рассасывания (включая заполненные жидкостью); жевательные конфеты; гели; быстро диспергирующиеся лекарственные формы; пленки; вагинальные суппозитории; спреи и буккальные/мукоадгезивные пластыри.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой энтеральный препарат, то есть кишечнорастворимый препарат (например, устойчивый к pH желудка), который подходит для доставки композиции по изобретению в кишечник путем перорального введения. Энтеральные препараты могут быть особенно полезными, когда бактерии или другой компонент композиции чувствительны к кислоте, например, подвержены деградации в желудочных условиях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения энтеральная композиция содержит энтеральное покрытие. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция представляет собой лекарственную форму с энтеральным покрытием. Например, препарат может представлять собой таблетку с энтеральным покрытием или капсулу с энтеральным покрытием, или тому подобное. Энтеральное покрытие может быть типичным энтеральным покрытием, например обычным покрытием для таблетки, капсулы или тому подобного для пероральной доставки. Препарат может содержать пленочное покрытие, например тонкопленочный слой энтерального полимера, например нерастворимый в кислоте полимер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения энтеральная композиция является, в сущности, кишечной, например гастроустойчивой, без необходимости в энтеральном покрытии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения композиция представляет собой кишечную композицию, которая не содержит энтерального покрытия. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция представляет собой капсулу, изготовленную из термогелевого материала. В некоторых вариантах осуществления изобретения термогелевым материалом является целлюлозный материал, такой как метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза или гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC). В некоторых вариантах осуществления изобретения капсула содержит оболочку, которая не содержит пленкообразующего полимера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсула содержит оболочку, а

оболочка содержит гидроксипропилметилцеллюлозу и не содержит пленкообразующего полимера (например, см. [xxvi]). В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция представляет собой, по существу, энтеральную капсулу (например, Vcaps® из Capsugel).

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция представляет собой мягкую капсулу. Мягкие капсулы представляют собой капсулы, которые благодаря добавлению смягчителей, таких как, например, глицерин, сорбит, мальтит и полиэтиленгликоли, присутствующие в оболочке капсулы, обладают определенной эластичностью и мягкостью. Мягкие капсулы могут быть получены, например, на основе желатина или крахмала. Мягкие капсулы на основе желатина коммерчески доступны у различных поставщиков. В зависимости от способа введения, такого как, например, перорально или ректально, мягкие капсулы могут иметь различные формы, они могут быть, например, круглыми, овальными, продолговатыми или торпедообразными. Мягкие капсулы могут быть получены обычными способами, такими как, например, процесс Шерера, процесс Assocel или капельный процесс или процесс обдува изнутри.

Способы культивирования

Бактериальные штаммы для применения в настоящем изобретении можно культивировать с применением стандартных микробиологических способов, как описано, например, в работах [xxvii-xxviii].

Твердая или жидкая среда, применяемая для культивирования, может представлять собой агар YCFA или среду YCFA. Среда YCFA может включать (на 100 мл, приблизительные значения): Казитон (1,0 г), дрожжевой экстракт (0,25 г), NaHCO_3 (0,4 г), цистеин (0,1 г), K_2HPO_4 (0,045 г), KH_2PO_4 (0,045 г), NaCl (0,09 г), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,09 г), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,009 г), CaCl_2 (0,009 г), резазурина (0,1 мг), гемина (1 мг), биотина (1 мкг), кобаламина (1 мкг), р-аминобензойной кислоты (3 мкг), фолиевой кислоты (5 мкг) и пиридоксамина (15 мкг).

Бактериальные штаммы для применения в вакцинных композициях

Авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы по изобретению полезны для лечения или профилактики рака. Это, вероятно, связано с тем, что бактериальные штаммы по изобретению "обманывают" иммунную систему хозяина. Поэтому композиции по изобретению могут также быть полезными для профилактики рака, когда их вводят в виде вакцинных композиций. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения бактериальные штаммы по изобретению являются жизнеспособными. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения бактериальные штаммы по изобретению способны частично или полностью колонизировать кишечник. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения бактериальные штаммы по изобретению являются жизнеспособными и способны частично или полностью колонизировать кишечник. В других некоторых таких вариантах реализации настоящего изобретения бактериальные штаммы по настоящему изобретению могут быть убиты, инактивированы или ослаблены. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения композиции могут содержать адъювант вакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции предназначены для введения путем инъекции, например путем подкожной инъекции.

Общее описание

При практической реализации настоящего изобретения применяют, если не указано иное, традиционные способы химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, которые соответствуют данной области техники. Такие способы подробно описаны в литературе. См., например, ссылки [xxix] и [xxx-xxxi] и т.д.

Термин "содержащий" охватывает "включая", а также "состоящий", например, композиция, содержащая "X", может состоять исключительно из X или может включать какой-нибудь дополнительный элемент, например, X+Y.

Термин "около" относительно численного значения x является необязательным и означает, например, $x \pm 10\%$.

Слово "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, которая "по существу не содержит" от Y, может быть полностью свободной от Y. При необходимости слово "по существу" может быть опущено из определения изобретения.

Ссылки на идентичность процентной последовательности между двумя нуклеотидными последовательностями означает, что при выравнивании этот процент нуклеотидов является одинаковым при сравнении двух последовательностей. Это выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательности можно определить с помощью программ, известных в данной области техники, например, тех, которые описаны в разделе 7.7.18 работы [xxxi]. Предпочтительное выравнивание определяется с помощью алгоритмом поиска гомологии Смита-Уотермана с использованием поиска аффинного гэпа со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продление гэпа 2, матрицы BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана описан в работе [xxxi].

Если не указано отдельно, процесс или способ, включающий множество этапов, может содержать дополнительные этапы в начале или конце способа или может содержать дополнительные промежуточные этапы. Кроме того, этапы могут быть объединены, опущены или выполнены в альтернативном порядке, если это необходимо.

В настоящем документе описаны различные варианты реализации настоящего изобретения. Следует принимать во внимание, что характеристики, указанные в каждом варианте реализации изобретения, могут быть объединены с другими указанными характеристиками, чтобы обеспечить дополнительных вариантов реализации изобретения. В частности, варианты реализации изобретения, описанные в настоящем документе как пригодные, типовые или предпочтительные, могут быть объединены друг с другом (за исключением случаев, когда они являются взаимоисключающими).

Способы осуществления настоящего изобретения

Пример 1. Эффективность бактериального инокулята в мышинных моделях рака

Краткое изложение содержания

В этом исследовании была проверена эффективность композиций, содержащих бактериальные штаммы в соответствии с изобретением в четырех моделях опухолей.

Материалы

Испытуемое вещество - Бактериальный штамм # MRX518.

Эталонное вещество - Антитело против CTLA-4 (клон: 9H10, каталог: BE0131, изотип: IgG1 Сирийский хомяк, Bioxcell).

Тестовые и эталонные вещества носителей. Бактериальная питательная среда (дрожжевой экстракт, казитон, жирная кислота (YCFA)). Ежедневные инъекции мышам, антитело разбавляли PBS (ref: BE14-516F, Лонза, Франция).

Лечебные дозы - Бактерии: 2×10^8 в 200 мкл. А-CTLA-4 вводили при дозе 10 мг/г/инъек. Анти-CTLA-4 вводили в дозе 10 мл/кг/введ. (т. е. для одной мыши массой 20 г, вводили 200 мкл испытуемого вещества) в соответствии с самой последней массой мышей.

Пути введения - Бактериальный инокулят вводили перорально через желудочный зонд (per os, П/О) через канюлю. Канюли обеззараживали каждый день. Анти-CTLA-4 вводили в перитонеальную полость мышей (внутрибрюшинно, IP).

Условия культивирования бактериального штамма.

Условия культивирования бактериального штамма были следующими:

Пипеткой переносили 10 мл YCFA (из подготовленных 10 мл лабораторных бутылок E & O) в пробирки Хангейта.

Плотно закройте пробирки и промойте с CO₂, используя систему ввода и вывода шприцев

Автоклавируйте пробирки Хангейта

После охлаждения инокулируйте пробирки Хангейта 1 мл исходного раствора глицерина

Поместите пробирки в статичный инкубатор при 37°C в течение примерно 16 ч.

На следующий день берут 1 мл этой субкультуры и инокулируют 10 мл YCFA (предварительно разогретые снова продутые пробирки Хангейта, все в двух экземплярах)

Поместите их в статичный инкубатор при 37°C в течение 5-6 ч

Линия клеток рака и условия культивирования

Используемые клеточные линии подробно описаны в таблице ниже:

Клеточная линия	Тип	Штамм мыши	Происхождение
EMT-6	Рак молочной железы	BALB/c	ATCC
LL/2 (LLC1)	Рак легких	C57BL/6	ATCC CRL1642
Нера1-6	Гепатоцеллюлярный рак	C57BL/6	IPSEN INNOVATION

Линия клеток EMT-6 была получена из трансплантированного рака молочной железы мыши, которая возникла у мышей BALB/cCRGL после имплантации гиперпластического молочного альвеолярного узла [xxxiv].

Линия клеток LL/2 (LLC1) была получена из легкого мыши C57BL с опухолью, полученной в результате имплантации первичной карциномы легкого Льюиса [xxxv].

Линия клеток Нера 1-6 является производным от гепатомы мыши BW7756, которая возникает у мыши C57/L [xxxvi].

Условия культивирования клеток.

Все клеточные линии выращивали в виде монослоя при 37°C в увлажненной атмосфере (5% CO₂, 95% воздуха). Культуральная среда и добавка указаны в таблице ниже:

Клеточная линия	Культуральная среда	Добавка
EMT6:	RPMI 1640, содержащий 2 мМ L-глутамин (ref: BE12-702F, Lonza)	10% фетальной бычьей сыворотки (ref: № 3302, Lonza)
LL/2 (LLC1)	RPMI 1640, содержащий 2 мМ L-глутамин (ref: BE12-702F, Lonza)	10% фетальной бычьей сыворотки (ref: № 3302, Lonza)
Hepa1-6	DMEM (ref: 11960-044, Gibco)	10% фетальной бычьей сыворотки (ref: № 3302, Lonza) 2 мМ L-глутамин пенициллин-стрептомицин (Sigma G-6784)

Для экспериментального использования адгезивные опухолевые клетки отделяли от культуральной колбы с помощью 5-минутной обработки трипсин-ЭДТА (ref: BE17-161E, Lonza), в среде Хэнкса без кальция или магния (ref: BE10-543F, Lonza) и нейтрализовали добавлением полной культуральной среды. Клетки подсчитывали в гемоцитометре, и их жизнеспособность оценивали по 0,25% анализу исключения трипанового синего.

Использование животных

Здоровые самки Balb/C (BALB/cByJ) мышей, совпадающих по весу и возрасту, были получены от CHARLES RIVER (L'Arbresles) для модельных экспериментов EMT6.

Здоровые самки C57BL/6 (C57BL16J) мышей, совпадающих по весу и возрасту, были получены от CHARLES RIVER (L'Arbresles) для модельных экспериментов LL/2(LLC1) и Hepa1-6.

Животные поддерживались в состоянии здоровья SPF в соответствии с руководящими принципами FELASA, а также проводились наблюдения за животными и экспериментальные процедуры в соответствии с французскими и европейскими правилами и Руководством NRC по уходу и использованию лабораторных животных [xxxvii-xxxviii]. Животные содержались в жилых помещениях в контролируемых условиях окружающей среды:

Температура: $2 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность $55 \pm 10\%$, фотопериод (12 ч света/12 ч темноты), воздух, отфильтрованный HEPA, 15 воздушных обменов в час без рециркуляции. Шкафы для животных были снабжены стерильным и адекватным пространством с материалом для подстилки, кормом и водой, экологическим и социальным обогащением (групповое жилье), как описано: 900 см² клетки (ref: green, Tecniplast) в вентилируемых стойках, подстилка Epicea (SAFE), 10 кГр облучаемая диета (A04-10, SAFE), полная пища для иммунокомпетентных грызунов - экструдат R/M-H, вода из бутылок с водой.

Дизайн эксперимента и обработка

Противоопухолевая активность, модель EMT6

График лечения - начало первого дозирования считалось D0. В D0 не привитые мыши были рандомизированы в соответствии с их индивидуальной массой тела в группы по 9/8 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, Куотернон, Франция). На D0 мыши получали носитель (культуральная среда) или бактериальный штамм. В D14 все мыши были привиты опухолевыми клетками EMT-6, как описано ниже. В D24 мыши из положительной контрольной группы получали анти-CTLA-4 антитела.

График лечения приводится в таблице ниже:

Группа	№. Животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	8	Необработанный	-	-	-
2	8	Носитель (среда)	-	ПО	Q1Dx42
3	9	Бактериальный штамм #1 (MRX518)	2x10 ⁸ бактерий	ПО	Q1Dx42
4	8	Анти-CTLA4	10 мг/кг	IP	TWx2

Мониторинг животных проводили, как описано ниже.

Индукция опухолей EMT6 у животных. В D14 опухоли индуцировали подкожной инъекцией 1×10^6 клеток EMT-6 в 200 мкл RPMI 1640 в правый бок мышей.

Эвтаназия - каждую мышь подвергали эвтаназии, когда она достигла гуманной конечной точки, как описано ниже, или после максимум 6 недель после начала дозирования.

Противоопухолевая активность, модель LL/2 (LLC1)

График лечения - начало первого дозирования считалось D0. В D0 не привитые мыши были рандомизированы в соответствии с их индивидуальной массой тела на 7 групп по 9/8 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, Куотернон, Франция). В D0 мыши получают носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм. В D14 все мыши были привиты опухолевыми

клетками LL/2, как описано ниже. В Д27 мыши из положительной контрольной группы получали анти-CTLA-4 антитела.

График лечения приводится в таблице ниже:

Группа	№ Животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	8	Необработанный	–	–	–
2	9	Носитель (среда)	–	ПО	Q1Dx42
3	9	Бактериальный штамм #1 (MRX518)	2×10 ⁸ бактерий	ПО	Q1Dx42
4	8	Анти-CTLA4	10 мг/кг	IP	TWx2

Мониторинг животных проводили, как описано ниже.

Индукция опухолей LL/2 (LLC1) у животных. В Д14 опухоли индуцировали подкожной инъекцией 1×10⁶ клеток LL/2 (LLC1) в 200 мкл RPMI 1640 в правый бок мышей.

Эвтаназия - каждую мышь подвергали эвтаназии, когда она достигла гуманной конечной точки, как описано ниже, или после максимум 6 недель после начала дозирования.

Противоопухолевая активность, модель Нера1-6

График лечения - начало первого дозирования считалось Д0. В Д0 не привитые мыши были рандомизированы в соответствии с их индивидуальной массой тела на 7 групп по 9 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, Куотернон, Франция). На Д0 мыши получали носитель (культуральная среда) или бактериальный штамм. В Д14 все мыши были привиты опухолевыми клетками Нера 1-6, как описано ниже. В Д16 мыши из положительной контрольной группы получали анти-CTLA-4 антитела.

График лечения приводится в таблице ниже:

Группа	№ Животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	9	Необработанный	–	–	–
2	9	Носитель (среда)	–	ПО	Q1Dx42
6	9	Бактериальный штамм #4 (MRX518)	2×10 ⁸ бактерий	ПО	Q1Dx42
7	9	Анти-CTLA4	10 мг/кг	IP	TWx2

Мониторинг животных проводили, как описано ниже.

Ортотопическая индукция опухолевых клеток Нера 1-6 у животных путем внутриселезеночной инъекции. В Д14 один миллион (1×10⁶) опухолевых клеток Нера 1-6 в среде 50 мкл RPMI 1640 трансплантировали путем внутриселезеночной инъекции мышам. Вкратце, был сделан небольшой разрез бокового левого подреберья, а селезенка была экстериоризована. Селезенку экспонировали на стерильной марлевой прокладке и инъецировали под визуальным контролем клеточной суспензией иглой 27 размера. После инокуляции клеток селезенку вырезали.

Эвтаназия - каждую мышь подвергали эвтаназии, когда она достигла гуманной конечной точки, как описано в разделе ниже, или после максимум 6 недель после начала дозирования.

Оценка нагрузки на опухоль при эвтаназии.

Во время прекращения печени собирали и взвешивали.

Мониторинг животных

Клинический мониторинг. Длину и ширину опухоли измеряли два раза в неделю штангенциркулями, и объем опухоли оценивался по этой формуле []:xxxix

$$\text{Объем опухоли} = \frac{\text{Ширина}^2 \times \text{Длина}}{2}$$

Гуманные конечные точки [] :xl

Признаки боли, страдания или угнетения: позы боли, маска боли на лице, поведение;

Опухоль превышает 10% от нормальной массы тела, но не превышает 2000 мм³;

Опухоли, препятствующие передвижению или питанию;

Язвенная опухоль или тканевая эрозия;

20% потеря веса тела держится 3 дня подряд;

Плохое состояние тела, истощение, кахексия, обезвоживание;

Длительное отсутствие добровольных ответов на внешние стимулы;

Быстрое затрудненное дыхание, анемия, значительное кровотечение;

Неврологические признаки: кружение, судороги, паралич;

Устойчивое снижение температуры тела;

Вздутие живота.

Анестезия - изофлурановая газовая анестезия была использована для всех процедур: хирургия или инокуляция опухоли, внутривенные инъекции, сбор крови. Кетамин и ксилазин использовались для хирургической процедуры стеректазии.

Обезболивание - Протокол обезболивания карпрофеном или мультимодальный карпрофен/бупренорфин был адаптирован к тяжести хирургической процедуры. Для всех болезненных процедур была предусмотрена нефармакологическая помощь. Кроме того, по рекомендации присутствующего ветеринарного врача была предоставлена фармакологическая помощь, не мешающая исследованиям (тема лечения).

Эвтаназия - Эвтаназия животных была выполнена путем передозировки с помощью газовой анестезии (изофлуран), за которой следует цервикальная дислокация или обескровливание.

Результаты

Противоопухолевая активность, модель EMT6

Результаты показаны на фиг. 1. Лечение бактериальным штаммом по изобретению приводило к явному уменьшению объема опухоли по сравнению с отрицательным контролем. Положительный контроль также привел к уменьшению объема опухоли, как и следовало ожидать.

Противоопухолевая активность, модель LL/2 (LLC1)

Результаты показаны на фиг. 2. Лечение бактериальным штаммом по изобретению приводило к явному уменьшению объема опухоли по сравнению с отрицательным контролем.

Противоопухолевая активность, модель Нера1-6

Результаты показаны на фиг. 3. Необработанный отрицательный контроль не проявляется так, как ожидалось, потому что вес печени в этой группе был ниже, чем в других группах. Тем не менее, отрицательный контроль носителя и группы положительного контроля проявляются так, как ожидалось, поскольку мыши, обработанные только одним носителем, имели более крупную печень, чем мыши, обработанные антителами против CTLA4, что отражает большую нагрузку на опухоль в отрицательной контрольной группе носителя. Лечение бактериальным штаммом по изобретению приводило к явному снижению массы печени (и, следовательно, к опухолевой нагрузке) по сравнению с мышами в отрицательной контрольной группе.

Эти данные показывают, что штамм MRX518 может быть полезен для лечения или профилактики рака и, в частности, для уменьшения объема опухоли при раке молочной железы, легких и печени.

Пример 2. ПЦР-анализ гена.

Чистую культуру бактерий MRX518 изучали в ПЦР анализе гена. В эксперименте было две линии: 1) MRX518 был совместно культивирован с клетками кишечника человека (CaCo2) для исследования эффектов бактерий на хозяина, и 2) MRX518 был совместно культивирован на клетках CaCo2, которые стимулировали IL1, чтобы имитировать действие бактерий в воспалительной среде. Эффекты в обоих сценариях оценивались с помощью анализа экспрессии генов. Результаты показаны ниже:

Ген	Кратное изменение	Функция
CXCL3:	28412,73	CXCR2 лиганд,
CXCL2:	135,42	CXCR2-лиганд, 90% гомология с CXCL1.
CXCL9	34,76	CXCR3-лиганд, прежде всего, рассматриваемый как хемоаттрактант Th1-клеток (индуцируемый с помощью ИФН-γ)
IL8	31,81	Цитокин, хемоаттрактант (особенно нейтрофилы), многие рецепторы, включая CXCR1 и CXCR2/
CXCL1	16,48	CXCR2-лиганд, стимулирует пролиферацию клеток, а также миграцию, сверхэкспрессия является нейпротективной в ЕАЕ.
CD40	14,33	Со-стимулирующая молекула, способ Т-клеточной зависимой DC-активации.

TNF	13,50	Основной провоспалительный цитокин
IL17C	12,18	Способствует антибактериальному ответу от эпителия, синергичному с IL-22,
CXCL10	10,66	Закрывает гомологию с CXCL9, подумайте также о лиганде CXCR3?
HSPA1B	10,19	Белки теплового шока
NFKBIA	8,87	Сигналинг NFkB; PI3K
JUN	7,61	Антибактериальный ответ; GPCR сигналинг.
TNFAIP3	6,63	TNF сигналинг
DUSP1	6,36	Противовоспалительная фосфатаза, инактивирует MAPK
JUNB	5,36	Фактор транскрипции, JAK-STAT сигналинг
BIRC3	4,86	Адгезивные соединения, плотные соединения
DUSP2	4,59	Противовоспалительное, инактивирует MAPK.
IL32	4,29	Провоспалительный цитокин, индуцированный с помощью ИФН-γ, IL-18
DUSP5	3,12	Противовоспалительное, инактивирует MAPK.
FOS	3,03	Факторы транскрипции, TLR сигналинг, составляют часть AP-1
GADD45B	2,89	Рост и пролиферация клеток
CLDN4	2,61	Плотные соединения
ADM	2,57	NFkB сигналинг
KLF10	2,49	Угнетение клеток, TGF-β сигналинг.
DEFB4A	-2,34	Антимикробный пептид
APBA1	-2,53	Сигналинг
IGFBP1	-2,72	Сигнальный путь
IL28B	-2,73	ИФН-лямбда, противовирусная иммунная защита,
IL10	-3,38	Противовоспалительный цитокин
NR4A1	-5,57	Ядерный рецептор, противовоспалительный, регулятор пролиферации Т-клеток. дифференцировка Т-хелперной клетки
NOD2	-14,98	PRR, активатор инфламасомы, способствует аутофагии
INOS	-26,88	Провоспалительный, генератор оксида азота

Эти данные, по-видимому, показывают две сигнатуры экспрессии генов - CXCR1/2 лиганды (CXCL3, CXCL2, CXCL1, IL-8), которые связаны с провоспалительной миграцией клеток и лигандами CXCR3 (CXCL9, CXCL10), что более конкретно указывает на ответы ИФН-γ-типа, также поддерживаемых IL-32, который является ИФН-γ-индуцибельным.

Пример 3. Тестирование стабильности

Композицию, описанная в настоящем документе, содержащая по меньшей мере один бактериальный штамм, описанный в настоящем документе, хранят в герметичном контейнере при 25 или 4°C, а контейнер помещают в атмосферу с относительной влажностью 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 или 95%. Через 1, 2, 3, 6 месяцев, 1, 1,5, 2, 2,5 или 3 года не менее 50, 60, 70, 80 или 90% бактериального штамма остается в количестве, измеренном в колониеобразующих единицах и определенном стандартными про-

токолами.

Пример 4. Продуцирование цитокинов в незрелых дендритных клетках, индуцированных MRX518, по сравнению с MRX518+LPS

Краткое изложение содержания

В этом исследовании тестировали влияние бактериального штамма MRX518 отдельно и в сочетании с липополисахаридом (LPS) на продукцию цитокинов в незрелых дендритных клетках.

Популяция моноцитов была выделена из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Затем клетки моноцитов дифференцировали в незрелые дендритные клетки. Незрелые дендритные клетки высевали по 200000 клеток/лунку и инкубировали с MRX518 при конечной концентрации 10^7 /мл, с необязательным добавлением LPS при конечной концентрации 100 нг/мл. Отрицательный контроль включал инкубацию клеток только со средой RPMI, а в положительном контроле инкубировали клетки с LPS при конечной концентрации 100 нг/мл. Затем анализировали содержание цитокинов в клетках.

Результаты

Результаты этих экспериментов можно увидеть на фиг. 4a-d. Добавление только MRX518 приводит к существенному увеличению уровня цитокинов IL-6 и TNF- α по сравнению с отрицательным контролем (фиг. 4a и c). Добавление LPS (положительный контроль) приводит к увеличению уровня IL-6 и TNF- α по сравнению с отрицательным контролем, но не IL-1 β (фиг. 4b). Комбинация MRX518 и LPS привела к синергетическому увеличению уровня продуцируемого IL-1 β (фиг. 4d).

Вывод.

MRX518 обладает способностью индуцировать более высокое продуцирование IL-6 и TNF- α цитокинов в незрелых дендритных клетках. Комбинация LPS и MRX518 может увеличить уровни цитокинов IL-1 β в незрелых дендритных клетках. Эти данные показывают, что MRX518 отдельно или в сочетании с LPS может увеличить воспалительные цитокины IL-1 β , IL-6 и TNF- α , что способствует воспалению, которое может подавлять рак. Лечение с помощью MRX518 отдельно или в комбинации может индуцировать цитокины, которые могут ограничить рост опухоли.

Пример 5. Продуцирование цитокинов в клетках THP-1, индуцированных MRX518, по сравнению с MRX518+LPS

Краткое изложение содержания

В этом исследовании протестировано влияние бактериального штамма MRX518 отдельно и в сочетании с LPS на продуцирование цитокинов в клетках THP-1, модельную клеточную линию для моноцитов и макрофагов.

Клетки THP-1 дифференцировали в среде M0 в течение 48 ч с 5 нг/мл форбол-12-мирикат-13-ацетата (PMA). Затем эти клетки инкубировали с MRX518 при конечной концентрации 10^8 /мл, с добавлением или без добавления LPS при конечной концентрации 100 нг/мл. Затем бактерии отмывали и клеткам давали возможность инкубироваться в нормальных условиях выращивания в течение 24 ч. Затем клетки центрифугировали и полученный супернатант анализировали на содержание цитокинов.

Результаты

Результаты этих экспериментов можно увидеть на фиг. 5a-c. Добавление MRX518 без LPS приводит к увеличению уровней цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α по сравнению с контролями без бактерий и бактериальными осадками. Добавление LPS и MRX518 приводит к синергетическому увеличению продуцирования цитокинов.

Вывод.

MRX518 обладает способностью индуцировать продукцию цитокинов в клетках THP-1, что может быть синергетически увеличено с добавлением LPS. Эти данные показывают, что MRX518 отдельно или в сочетании с LPS может увеличить воспалительные цитокины IL-1 β , IL-6 и TNF- α , что способствует воспалению, которое может подавлять рак. Лечение с помощью MRX518 отдельно или в комбинации может индуцировать цитокины, которые могут ограничить рост опухоли.

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1 (ген 16S рРНК *Enterococcus gallinarum* - AF039900)

1 taatacatgc aagtcgaacg ctttttcttt caccggagct tgctccaccg
aaagaaaaag

61 agtggcgaac gggtagtaaa cacgtgggta acctgcccac cagaagggga
taacacttgg

121 aaacaggtgc taataccgta taacactatt ttccgcatgg aagaaagttg
aaaggcgctt

181 ttgcgtcact gatggatgga cccgcggtgc attagctagt tggtagagga
acggctcacc

241 aaggccacga tgcatagccg acctgagagg gtgatcggcc aactggggac
tgagacacgg

301 cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttcggc aatggacgaa
agtctgaccg

361 agcaacgccg cgtgagttaa gaaggttttc ggatcgtaaa actctgttgt

tagagaagaa
 421 caaggatgag agtagaacgt tcatcccttg acggtatcta accagaaagc
 cacggctaac
 481 tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt
 tattgggctg
 541 aaagcgagcg caggcgggtt cttaagtctg atgtgaaagc ccccggtca
 accgggag
 601 gtcattggaa actgggagac ttgagtgcag aagaggagag tggaattcca
 tgtgtagcgg
 661 tgaaatgcgt agatatatgg aggaacacca gtggcgaagg cggctctctg
 gtctgtaact
 721 gacgtgagc ctcgaaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggt
 agtcacgccc
 781 gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgtgca
 gcaaacgcat
 841 taagcactcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat
 tgacgggggc
 901 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc
 ttaccaggtc
 961 ttgacatcct ttgaccactc tagagataga gcttccccct cgggggcaaa
 gtgacaggtg
 1021 gtgcatgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc
 aacgagcgca
 1081 acccttattg ttagttgcca tcatttagtt gggcactcta gcgagactgc
 cggtgacaaa
 1141 ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccctt tatgacctgg
 gctacacacg
 1201 tgctacaatg ggaagtacaa cgagttgcga agtcgcgagg ctaagcta
 ctcttaaagc
 1261 ttctctcagt tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagccggaat
 cgctagtaat
 1321 cgcgatcag cacgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg
 cccgtcacac
 1381 cacgagagtt tgtaacaccc gaagtcggtg aggtaacctt tttggagcca
 gccgcctaag
 1441 gtgggataga tgattgggggt gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag

gtgcggtgg

1501 atcacc

SEQ ID NO: 2 (консенсусная последовательность 16S рРНК для штамма *Enterococcus gallinarum* MRX518)

TGCTATACATGCAGTCGAACGCTTTTCTTTACCGGAGCTTGCTCCACCGAAAGAAAA
AGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGA
ACAGGTGCTAATACCGTATAACACTATTTCCGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCGT
CACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGA
TGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAGAACGTTT
ATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA
GGAGAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAA
GGCGGTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGAT
ACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
TGCAGCAAACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGG
TGGTGATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACAATG
GGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCG
ATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA
AGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTG

SEQ ID NO: 3 (хромосомная последовательность штамма MRX518)
- см. Электронный список последовательностей.

SEQ ID NO: 4 (плазмидная последовательность штамма MRX518)
- см. Электронный список последовательностей.

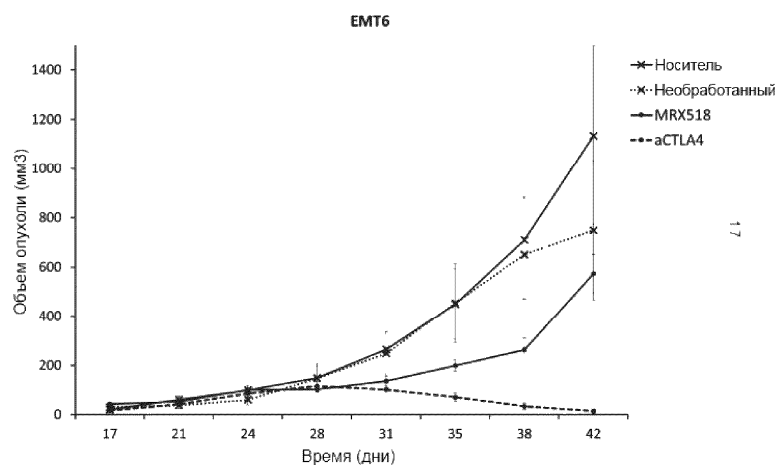
Список литературы

- [1] Spor *et al.* (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg *et al.* (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson *et al.* (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Mazmanian *et al.* (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [5] Frank *et al.* (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [6] Machiels *et al.* (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [7] WO 2013/050792
- [8] WO 2014/167338
- [9] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [10] Azad *et al.* (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [16] Strickertsson *et al.* 11 (2014) *Genes.* 5(3): 726-738.
- [17] Collins *et al.* 12 (1984) *Int J Syst Evol Microbiol.* 34: 220-223.
- [13] Masco *et al.* (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [14] Šrůtková *et al.* (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [20] Haabeth *et al.* 15 (2012) *OncolImmunology* 1 (1): 1146-1152.
- [21] Lejeune *et al.* 16 (2006) *Cancer Immun.* 6:6
- [22] Pace *et al.* 17 (1983) *PNAS* 80:8782-6.
- [23] Sgadari *et al.* 18 (1996) *PNAS* 93:13791-6.
- [25] Sgadari *et al.* 19 (1997) *Blood.* 89:2635-43.
- [20] Miyamoto-Shinohara *et al.* (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9–24.
- [27] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed By Day and McLellan, Humana Press.
- [28] Leslie *et al.* (1995) *Appl Environ Microbiol* 61, 3592–3597
- [29] Mitropoulou *et al.* (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [30] Kailasapathy, *et al.* (2002) *Curr Issues Intest Microbiol* 3(2) 39-48
- [31] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- [32] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A R. Gennaro edit. 1985)
- [33] US 2016/0067188
- [34] Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press
- [36] Strobel (2009) *Methods Mol Biol* 581:247-61.
- [37] Gennaro (2000) *Remington The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition, ISBN: 0683306472
- [38] *Molecular Biology Techniques. An Intensive Laboratory Course.* (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press).
- [44] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed (Newton & Graham eds , 1997, Springer Verlag)
- [45] *Current Protocols in Molecular Biology* (F M Ausubel *et al.* , eds , 1987) Supplement 30
- [46] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489
- [47] Rockwell *et al.* , (1972) *J Natl Cancer Inst.* 49:735–49.
- [48] Bertram and Janik (1980) *Cancer Lett* 11 63–73
- [49] Darlington (1987) *Meth Enzymol* 151:19–38
- [50] Principe d'éthique de l'expérimentation animale, Directive n°2010/63 CEE 22nd September 2010, Décret n°2013-118 1st February 2013
- [51] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition The National Academies Press; 2011
- [52] Simpson-Herren and Lloyd (1970) *Cancer Chemother Rep.* 54:143–74.
- [53] Workman *et al.* 40 (2010) *Br. J. Cancer.* 102:1555–77

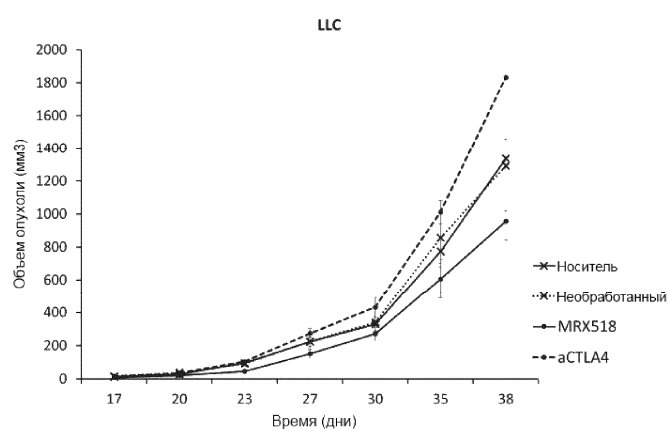
- [xiii] Masco *et al.* (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [xiv] Srůtková *et al.* (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [20] Haabeth *et al.* xv (2012) *OncolImmunology* 1 (1): 1146-1152.
- [21] Lejeune *et al.* xvi (2006) *Cancer Immun.* 6:6
- [22] Pace *et al.* xvii (1983) *PNAS* 80:8782-6.
- [23] Sgadari *et al.* xviii (1996) *PNAS* 93:13791-6.
- [25] Sgadari *et al.* xix (1997) *Blood*. 89:2635-43.
- [xx] Miyamoto-Shinohara *et al.* (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- [27] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. By Day and McLellan, Humana Press.
- [28] Leslie *et al.* (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [29] Mitropoulou *et al.* (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [30] Kailasapathy *et al.* (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [31] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- [32] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [33] US 2016/0067188
- [34] Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [36] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [37] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [38] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press).
- [44] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [45] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30
- [46] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [47] Rockwell *et al.*, (1972) *J Natl Cancer Inst.* 49:735-49.
- [48] Bertram and Janik (1980) *Cancer Lett.* 11:63-73.
- [49] Darlington (1987) *Meth Enzymol.* 151:19-38.
- [50] Principe d'éthique de l'expérimentation animale, Directive n°2010/63 CEE 22nd September 2010, Décret n°2013-118 1st February 2013.
- [51] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. The National Academies Press; 2011
- [52] Simpson-Herren and Lloyd (1970) *Cancer Chemother Rep.* 54:143-74.
- [53] Workman *et al.* xl (2010) *Br. J. Cancer.* 102:1555-77.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для лечения или профилактики рака, содержащая бактериальный штамм *Enterococcus gallinarum*.
2. Композиция по п.1, которая не содержит бактерий каких-либо других видов или которая содержит биологически незначительные количества бактерий других видов.
3. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая предназначена для лечения или профилактики рака легких, рака молочной железы, рака печени или рака толстой кишки.
4. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая уменьшает размер и рост опухоли, предотвращает метастазирование или ангиогенез.
5. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой бактериальный штамм имеет последовательность рНК 16s, представленную SEQ ID NO: 2.
6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, предназначенная для перорального введения, причем композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей, а бактериальный штамм является лиофилизированным.
7. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой бактериальный штамм способен частично или полностью колонизировать кишечник.
8. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая только штамм *Enterococcus gallinarum*.
9. Композиция по п.1, в которой бактериальный штамм *Enterococcus gallinarum* представляет собой часть микробного консорциума, содержащего два или более бактериальных штамма.
10. Пищевой продукт, содержащий композицию по любому из предшествующих пунктов, для лечения или профилактики рака.
11. Вакцина, содержащая композицию по любому из пп.1-9, для лечения или профилактики рака.
12. Штамм *Enterococcus gallinarum* NCIMB 42488 для лечения или профилактики рака.
13. Клетка штамма *Enterococcus gallinarum* по п.12 для лечения или профилактики рака.
14. Композиция для лечения или профилактики рака, содержащая штамм по п.12 и фармацевтически приемлемый носитель.



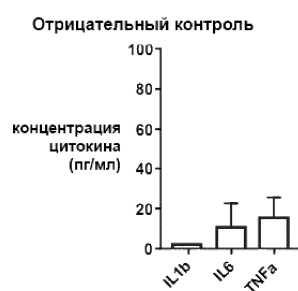
Фиг. 1



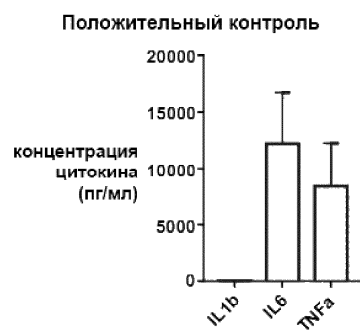
Фиг. 2



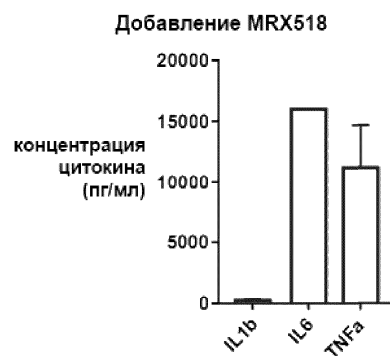
Фиг. 3



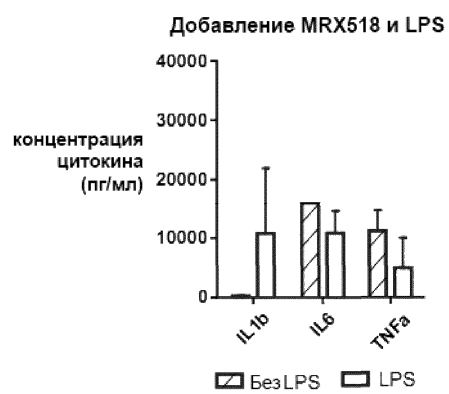
Фиг. 4А



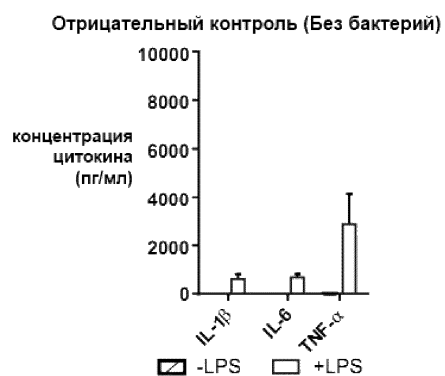
Фиг. 4В



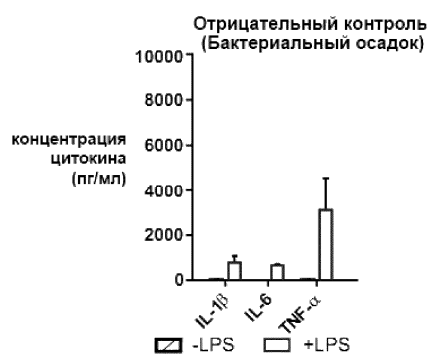
Фиг. 4С



Фиг. 4D



Фиг. 5А



Фиг. 5B



Фиг. 5C

