

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091636 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.13

(51) Int. Cl. *A61K 35/74* (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.01.18

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ РАКА

(31) 1800927.4; 1801502.4; 1805941.0;
1806572.2; 1808628.0

(71) Заявитель:
4Д ФАРМА РИСЕРЧ ЛИМИТЕД (GB)

(32) 2018.01.19; 2018.01.30; 2018.04.10;
2018.04.23; 2018.05.25

(72) Изобретатель:
Стивенсон Александер (GB)

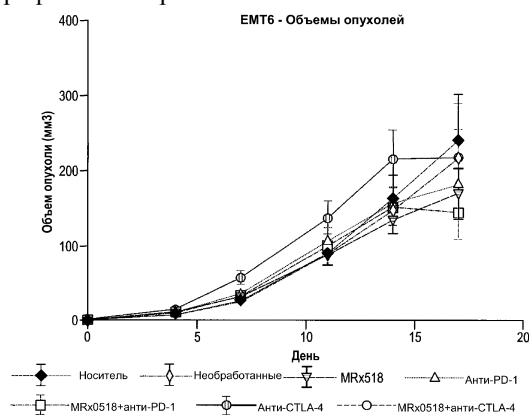
(33) GB

(86) PCT/GB2019/050141

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

(87) WO 2019/141996 2019.07.25

(57) В настоящем изобретении предложена комбинированная терапия, включающая бактериальный штамм для лечения или профилактики рака.



202091636

A1

A1

202091636

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564008EA/019

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ РАКА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к области комбинированной терапии для лечения или профилактики рака: комбинации композиции, содержащей бактериальный штамм и пембролизумаб, для лечения или профилактики рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Считается, что кишечник человека стерилен *in utero*, но сразу после рождения подвергается воздействию большого количества материнских микробов и микробов окружающей среды. После этого наступает динамический период микробной колонизации и преобладания, на который влияют такие факторы, как способ доставки, окружающая среда, диета и генотип хозяина, все из которых влияют на состав кишечной микробиоты, особенно в начальный период жизни. Впоследствии микробиота стабилизируется и становится похожей на взрослую []. Микробиота кишечника человека содержит более 500-1000 различных филофитов, относящихся в основном к двум основным типам бактерий, *Bacteroidetes* и *Firmicutes* []. Успешные симбиотические отношения, возникающие в результате бактериальной колонизации кишечника человека, привели к широкому спектру метаболических, структурных, защитных и других полезных функций. Усиленная метаболическая активность колонизированного кишечника гарантирует, что иначе неусваиваемые пищевые компоненты разлагаются с выделением промежуточных продуктов, обеспечивающих важный источник питательных веществ для хозяина. Точно так же иммунологическое значение микробиоты кишечника хорошо известно и иллюстрируется у безмикробных животных с нарушенной иммунной системой, которая функционально восстанавливается после введения комменсальных бактерий [-].

Резкие изменения в составе микробиоты были зарегистрированы при желудочно-кишечных расстройствах, таких как воспалительные заболевания кишечника (ВЗК). Например, уровни бактерий кластера XIVa *Clostridium* снижаются у пациентов с ВЗК, в то время как количество *E. coli* увеличивается, что указывает на изменение баланса симбионтов и патобионтов в кишечнике [-]. Интересно, что этот микробный дисбактериоз также связан с дисбалансом в популяциях Т-эффекторных клеток.

С учетом потенциального положительного эффекта, который некоторые бактериальные штаммы могут оказывать на кишечник животного, были предложены различные штаммы для применения при лечении различных заболеваний (см., например, [-]). Кроме того, некоторые штаммы, включая в основном штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, были предложены для применения в лечении различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, которые не связаны напрямую с кишечником (см. обзоры [] и []). Однако взаимосвязь между различными заболеваниями и различными штаммами бактерий, а также точное влияние отдельных штаммов бактерий на кишечник и на системном уровне, а также на любые конкретные виды заболеваний, плохо

охарактеризованы. Например, некоторые виды *Enterococcus* были вовлечены в развитие рака []. В противоположность этому, штаммы бактерий вида *Enterococcus gallinarum* также были описаны для применения в лечении и профилактике рака [54].

Из-за разнообразной природы рака разрабатываются различные способы лечения для лечения разных групп пациентов. Одним из методов лечения, который оказался эффективным, является использование ингибиторов иммунных контрольных точек (ИИКТ). ИИКТ представляют собой соединения, которые ингибируют способность раковых клеток предотвращать атаку иммунных клеток хозяина на раковые клетки. ИИКТ могут быть, например, терапевтическими антителами, которые были разработаны против взаимодействия между трансмембранным рецептором белка запрограммированной гибели клеток 1 (называемым PDCD1, PD-1, PD1 или CD279) и его лигандом 1, лигандом PD-1 (называемым PD-L1, PDL1 или CD274). Примером такого антитела является Пембролизумаб, который направлен на PD-1 (продается компанией Merck под торговым названием KEYTRUDA®).

Хотя лечение пациентов с диагнозом рак с помощью ИИКТ в случае, когда оно эффективно, может привести к длительным и значительным клиническим эффектам, все еще существует значительный процент пациентов, которые не отвечают или только частично отвечают на лечение ИИКТ. Поэтому в данной области техники существует потребность в новых и улучшенных способах предотвращения и лечения рака и, в частности, в способах, которые могут улучшить эффект лечения пембролизумабом.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым комбинированным способам лечения и профилактики рака. В частности, настоящее изобретение относится к улучшенным терапиям, при которых последовательное и/или частично параллельное введение бактериального штамма вида *Enterococcus gallinarum* и пембролизумаба приводит к более эффективному лечению рака, чем лечение только с помощью бактериального штамма или пембролизумаба.

Композиции, содержащие бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* эффективны в терапии в целом, а также для лечения или профилактики рака, в частности, как представлено в данном описании ниже и в [54]. Настоящее изобретение, кроме того, частично основано на неожиданном эффекте, достигнутом при введении пембролизумаба и композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*. Термины «комбинация согласно настоящему изобретению», «терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению» и «терапевтическая комбинация», в контексте настоящего документа, могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к терапевтической комбинации: (a) композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*; и (b) пембролизумаб. Следует понимать, что термин «комбинация» в контексте терапевтической комбинации не относится к компонентам (a) и (b) комбинации, которые обязательно находятся в одной и той же композиции и/или вводятся одновременно. Согласно предпочтительным вариантам осуществления (a) и (b)

терапевтической комбинации находятся в отдельных композициях. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем документе представлена комбинация согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем документе представлен способ лечения или профилактики рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, введение бактериальной композиции в контексте терапевтической комбинации предоставляет возможность лечения пациентов с диагнозом рак, которые не отвечали на лечение или показали недостаточный ответ на лечение ингибитором иммунной контрольной точки, который вводили без бактериальной композиции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациенты, которые не отвечают на лечение или частично отвечают на лечение ИИКТ, могут быть наивными по отношению к ИИКТ (т.е., они ранее не получали лечение ИИКТ), или они могли стать пациентами, не ответившими на лечение или частично ответившими на лечение после ранее успешного введения ИИКТ.

Не желая быть связанными какой-либо теорией или механизмом, этот эффект может быть связан с модуляцией медиаторов, которые повышают эффективность пембролизумаба, например, увеличение количества инфильтрирующих опухоль CD8⁺T-клеток или увеличение соотношения инфильтрирующих опухоль CD8⁺ T-клеток к клеткам FoxP3⁺.

Согласно одному аспекту в настоящем документе представлена терапевтическая комбинация для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, причем указанная терапевтическая комбинация содержит:

- (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*;
- и
- (b) пембролизумаб.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе представлена композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, в котором указанная композиция используется в комбинации с пембролизумабом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе представлена первая композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* для применения в комбинации со второй композицией, содержащей пембролизумаб, для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, в котором необязательно указанную первую композицию вводят до первого введения указанной второй композиции и/или параллельно с введением второй композиции, необязательно, когда субъект не отвечает на предшествующее лечение с использованием только ингибитора иммунной контрольной точки.

В соответствии с другим аспектом, в настоящем документе представлен способ лечения или профилактики рака у субъекта, нуждающегося в этом (также называемый в

настоящем документе «способ согласно настоящему изобретению»), причем способ включает: (a) введение субъекту композиции, содержащей штамм бактерий вида *Enterococcus gallinarum*; и (b) введение субъекту пембролизумаба.

Согласно другому аспекту, в настоящем документе представлен набор, включающий: (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*; и (b) композицию, содержащую пембролизумаб.

Согласно некоторым вариантам осуществления, рак выбран из группы, состоящей из: рака молочной железы, рака легких, рака толстой кишки, рака почек, рака печени, лимфомы (такой как неходжкинская лимфома), гепатомы и нейроэндокринного рака. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическая комбинация предназначена для применения в способе лечения или профилактики рака легких, рака молочной железы, рака почек, рака печени, лимфомы, гепатомы, нейроэндокринного рака или рака толстой кишки. Согласно некоторым вариантам осуществления, рак выбран из группы, состоящей из: меланомы, немелкоклеточной карциномы легких, рака мочевого пузыря и рака головы и шеи. В определенных вариантах осуществления терапевтическая комбинация или способ согласно настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли или предотвращения роста опухоли при лечении рака. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическая комбинация или способ согласно настоящему изобретению предназначены для применения по меньшей мере в одном из следующего: уменьшение размера опухоли, уменьшение роста опухоли, предотвращение метастазирования или предотвращение ангиогенеза.

Согласно некоторым вариантам осуществления термины «композиция», «бактериальная композиция» и «композиция согласно настоящему изобретению» могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к композиции, включенной в терапевтическую комбинацию согласно настоящему изобретению, которая включает бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*. Согласно некоторым вариантам осуществления, композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* не содержит бактерии от других видов или содержат только минимальные или биологически нерелевантные количества бактерий из другого вида. Согласно некоторым вариантам осуществления, тесно связанные штаммы *Enterococcus gallinarum* также могут быть использованы как часть терапевтической комбинации, такие как бактериальные штаммы, которые имеют последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рНК бактериального штамма *Enterococcus gallinarum*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или 2. Предпочтительно, последовательности идентична SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID

NO: 2.

Соответственно, терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению может содержать композицию, содержащую бактериальный штамм, который имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности 16s рРНК бактериального штамма *Enterococcus gallinarum*, необязательно SEQ ID NO: 2, для применения в способе лечения или профилактики рака. *Enterococcus gallinarum* В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции не относится к *Enterococcus gallinarum*, но является близкородственным штаммом.

В определенных вариантах осуществления композиция согласно настоящему изобретению предназначена для перорального введения. Пероральное введение штаммов согласно настоящему изобретению может быть эффективным для лечения рака, в частности, когда они вводятся как часть терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению. Кроме того, пероральное введение удобно для пациентов и практикующих врачей, и позволяет осуществлять доставку и/или частичную или полную колонизацию кишечника. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пембролизумаб, используемый в качестве части терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, вводят внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления каждая бактериальная композиция и пембролизумаб терапевтической комбинации присутствуют в отдельной композиции, каждая из которых, возможно, содержит носитель и/или вспомогательное вещество, подходящее для способа его введения. В определенных вариантах осуществления композиция согласно настоящему изобретению содержит один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ или носителей. В определенных вариантах осуществления пембролизумаб находится в композиции, содержащей один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ или носителей.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция согласно настоящему изобретению содержит бактериальный штамм, который был лиофилизирован. Лيوфилизация представляет собой эффективный и удобный способ приготовления стабильных композиций, позволяющие доставлять бактерии. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальный штамм в композиции способен частично или полностью колонизировать кишечник.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция содержится в продукте питания. В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция содержится в вакцине.

Согласно некоторым вариантам осуществления, бактериальная композиция содержит один штамм *Enterococcus gallinarum*. Согласно некоторым вариантам осуществления, бактериальная композиция содержит бактериальный штамм *Enterococcus gallinarum* в составе микробного консорциума. Предпочтительно бактериальная композиция содержит штамм *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером

доступа NCIMB 42488.

Согласно некоторым вариантам осуществления способа согласно настоящему изобретению бактериальную композицию вводят субъекту до первого введения пембролизумаба субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способа согласно настоящему изобретению бактериальную композицию вводят субъекту в течение по меньшей мере одной, двух, трех или четырех недель до первого введения пембролизумаба. Следует понимать, что в контексте способа согласно настоящему изобретению первое введение пембролизумаба относится к первому введению как части терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению. Перед введением терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению субъекту можно было вводить пембролизумаб без применения бактериальной композиции согласно настоящему изобретению во время/перед введением пембролизумаба. Согласно некоторым вариантам осуществления между введением терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению и предшествующим введением только пембролизумаба или только бактериальной композиции прошло по меньшей мере одна, две, три или четыре недели.

Согласно некоторым вариантам осуществления способа согласно настоящему изобретению бактериальную композицию вводят субъекту по меньшей мере частично параллельно с введением пембролизумаба субъекту. В контексте времени введения бактериальной композиции и пембролизумаба, введение по меньшей мере частично параллельно, относится к введениям, которые могут полностью перекрываться (например, введение обоих компонентов в течение 12 месяцев) или частично (например, введение одного компонента в течение 12 месяцев и введение второго компонента в течение 8 месяцев, которые могут полностью или частично перекрываться с 12-месячным периодом). Следует понимать, что параллельное введение обоих компонентов не означает, что оба компонента обязательно вводятся с использованием одного и того же режима дозирования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способа согласно настоящему изобретению бактериальную композицию вводят субъекту перед первым введением пембролизумаба и/или по меньшей мере частично параллельно с введением пембролизумаба указанному субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления бактериальную композицию вводят субъекту по меньшей мере за одну, две, три или четыре недели до первого введения пембролизумаба с последующим введением бактериальной композиции и пембролизумаба по меньшей мере частично параллельно в течение по меньшей мере двух, четырех или шести недель.

Согласно некоторым вариантам осуществления, бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* и пембролизумаб находятся в отдельных композициях, предпочтительно, причем бактериальная композиция составлена для перорального введения, в то время как пембролизумаб находится в лекарственной форме, составленной для внутривенного введения.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению предназначена для лечения или профилактики рака у

субъекта, который не отвечал на предшествующее лечение с использованием только ингибитора иммунной контрольной точки. В контексте настоящего документа, субъект, который не отвечает на лечение ингибитором иммунной контрольной точки, относится к субъекту, который не отвечает на лечение в соответствии с критериями RECIST (англ.: Response Evaluation Criteria In Solid Tumours) (критерии оценки ответа солидных опухолей) или в соответствии с критериями irRECIST (англ.: immunerelatedResponse Evaluation Criteria In Solid Tumours) (иммунозависимые критерии оценки ответа солидных опухолей).

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению предназначена для лечения или профилактики рака у субъекта, в котором только пембролизумаб или бактериальная композиция не могут обеспечить эффективное лечение или профилактику рака у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное лечение рака у субъекта включает по меньшей мере одно из следующего: уменьшение размера опухоли, уменьшение роста опухоли и/или предотвращение метастазирования до такой степени, которая приведет к полной или частичной ремиссии рака у субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению способна уменьшать размер опухоли и/или уменьшать рост опухоли, и/или предотвращать метастазирование, и/или предотвращать ангиогенез в большей степени, чем отдельно пембролизумаб или бактериальная композиция.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению предназначена для лечения рака у субъекта, так что у субъекта наблюдается полная ремиссия рака, предпочтительно в более короткие сроки, чем при применении лечения отдельно пембролизумабом или бактериальной композицией.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей Пембролизумаб, для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, которому ранее вводили композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, предпочтительно штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 42488.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, предпочтительно штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 42488, для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, диагностированного как требующий лечения с помощью Пембролизумаба.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1A: мышинная модель рака молочной железы - объем опухоли.

На фиг. 1B: Верхняя панель: зона некроза опухолей ЕМТ6 (без лечения n=6, носитель n=6, MRx0518 n=8). Нижняя панель: процент делящихся клеток в опухолях ЕМТ6. P=0,019 (без лечения n=4, общее количество подсчитанных клеток=37201,

носитель n=6, общее количество подсчитанных клеток=64297, MRx0518 n=6, общее количество подсчитанных клеток=33539).

На фиг. 1С: мышинная модель рака молочной железы - инфильтрирующие иммунные клетки. Точечные диаграммы представляют количество клеток различных иммунных маркеров от отдельных животных из каждой группы лечения.

На фиг. 1D: мышинная модель рака молочной железы - выработка цитокинов в опухолевых лизатах. Столбцы представляют собой среднее значение пг/мл общего белка в каждой группе лечения. * $p < 0,05$ между группами, использующими однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием множественных сравнений Даннетта.

На фиг. 1E: Мышиная модель рака молочной железы - выработка цитокинов в плазме крови. Столбцы представляют среднее значение пг/мл для каждой группы лечения (+/- СОС).

На фиг. 1F: Типовые изображения криосрезов подвздошной кишки из группы носителя, мышей, обработанных MRx0518 и CTLA-4, иммуномеченный антителами к CD8 α (нижние панели) и контрокрашенный DAPI (верхние панели).

На фиг. 1G: График количественного определения подмножеств исследования на животных с более чем 3 CD8 α +клетками на поле, взятых из области крипты подвздошной кишки мышей, обработанных носителем, MRx0518 или CTLA-4.

На фиг. 2: Мышиная модель рака легких - объем опухоли.

На фиг. 3A: Мышиная модель рака печени - масса печени.

На фиг. 3B: Мышиная модель рака почек - объем опухоли.

На фиг. 4A: Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках (отсутствие бактерий).

На фиг. 4B: Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках после добавления LPS.

На фиг. 4C: Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках после добавления MRX518.

На фиг. 4D: Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках после добавления MRX518 и LPS.

На фиг. 5A: Уровни цитокинов в клетках THP-1 (отсутствие бактерий).

На фиг. 5B: Уровни цитокинов в клетках THP-1 после добавления осадка бактерий.

На фиг. 5C: Уровни цитокинов в клетках THP-1 после добавления MRX518 отдельно или в комбинации с LPS.

На фиг. 6: Гистограмма, демонстрирующая процент пролиферирующих клеток CD8 $^{+}$ после различных обработок (NCD (No Cell Division) - без клеточного деления, 1RCD - одно клеточное деление, 2RCD - два клеточных деления, 3RCD - три клеточных деления, 4RCD - четыре клеточных деления).

На фиг. 7A: Схематическое представление графика лечения различных групп, используемых в Примере 6, описанном в настоящем описании ниже.

На фиг. 7В: Средний объем опухоли у мышей с опухолью, образованной клетками ЕМТ-6. Мышей либо не подвергали лечению, либо обрабатывали носителем YCFA (носитель), бактериями MRx518 в среде YCFA (MRx518), антителом к PD1 и средой YCFA (анти-PD1), антителом к CTLA-4 и средой YCFA (анти-CTLA-4), комбинацией MRx518 и антитела к PD1, или комбинацией MRx518 и антитела к CTLA-4.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактериальные штаммы

Композиции согласно настоящему изобретению содержат бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*. Примеры демонстрируют, что терапевтическая комбинация, содержащая бактерии этого вида, полезна для лечения или профилактики рака.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлена терапевтическая комбинация для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, причем указанная терапевтическая комбинация содержит:

- (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*;
- и
- (b) пембролизумаб.

Согласно некоторым вариантам осуществления, композиция, содержащая бактериальный штамм, который имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95% идентична 16s рНК последовательности бактериального штамма *Enterococcus gallinarum* может быть использована в терапевтической комбинации и способе согласно настоящему изобретению. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей бактериальный штамм, который имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, для применения в лечении или профилактике рака в сочетании с пембролизумабом. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции не относится к *Enterococcus gallinarum*, но представляет собой близкородственный штамм.

В некоторых вариантах осуществления композиция согласно настоящему изобретению содержит бактериальный штамм, который имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, например, который представляет собой *Enterococcus gallinarum*, и не содержит какой-либо другой бактериальный род. В некоторых вариантах осуществления композиция согласно настоящему изобретению содержит один штамм бактериального штамма, который имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, например, который представляет собой *Enterococcus gallinarum*, и не содержит никаких других бактериальных штаммов или видов.

Enterococcus gallinarum образует кокковидные клетки, в основном в парах или коротких цепях. Он неподвижен, а колонии на кровяном агаре или питательном агаре имеют круглую и гладкую форму. *Enterococcus gallinarum* реагирует с антисывороткой группы D по Ланцефилду. Типовой штамм *Enterococcus gallinarum* представляет собой

F87/276=PB21=ATCC 49573=CCUG 18658=CIP 103013=JCM 8728=LMG 13129=NBRC 100675=NCIMB 702313 (ранее NCDO 2313) = NCTC 12359 []. Учетный номер в GenBank для последовательности гена 16S рПНК *Enterococcus gallinarum* является AF039900 (раскрыто в настоящем описании как SEQ ID NO: 1). Типовой *Enterococcus gallinarum* штамм описан в [12].

Бактерия *Enterococcus gallinarum*, депонированная под номером доступа NCIMB 42488, была испытана в примерах и также упоминается в настоящем документе как штамм MRX518. Ссылки на MRX518 и MRx0518 используются взаимозаменяемо. Последовательность 16S рПНК для штамма MRX518, который был протестирован, представлена в SEQ ID NO: 2. Штамм MRX518 был депонирован в Международном депозитарном органе NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Шотландия), 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Шотландия) 16 ноября 2015 года под названием «*Enterococcus* sp» и получил учетный номер NCIMB 42488.

Геном штамма MRX518 содержит хромосому и плазмиду. Последовательность хромосомы для штамма MRX518 представлена в SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520. Плазмидная последовательность для штамма MRX518 представлена в SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520. Эти последовательности были получены с использованием платформы PacBio RS II.

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

Ожидается, что бактериальные штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа 42488, также будут эффективными для лечения или профилактики рака в контексте терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению. Биотип представляет собой близкородственный штамм, который имеет такие же или очень похожие физиологические и биохимические характеристики.

Штаммы, которые являются биотипами бактерий, депонированных под учетным

номером доступа NCIMB 42488 и которые подходят для применения в терапевтической комбинации настоящего изобретения, могут быть идентифицированы путем секвенирования других нуклеотидных последовательностей для бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488. Например, по существу весь геном может быть секвенирован, и штамм биотипа для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению может иметь по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательностей по меньшей мере 80% всего генома (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или 99% или по всему геному). Например, в некоторых вариантах осуществления штамм биотипа имеет по меньшей мере 98% идентичности последовательности по меньшей мере 98% своего генома или по меньшей мере 99% идентичности последовательности 99% своего генома. Другие подходящие последовательности для применения при идентификации штаммов биотипа могут включать hsp60 или повторяющиеся последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)₅ или REP, или []. Штаммы биотипа могут иметь последовательности с по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичной последовательности с соответствующей последовательностью бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488. В некоторых вариантах осуществления штамм биотипа имеет последовательность по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную относительно соответствующей последовательности штамма MRX518, депонированной как NCIMB 42488, и содержит 16S последовательность рРНК, которая по меньшей мере на 99% идентична (например, по меньшей мере на 99,5% или по меньшей мере на 99,9% идентична) последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления штамм биотипа имеет последовательность по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную соответствующей последовательности штамма MRX518, депонированной как NCIMB 42488, и имеет последовательность 16S рРНК SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет хромосому с последовательностью, идентичной SEQ ID NO:3 из WO2017/085520. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет хромосому с последовательностью по меньшей мере на 90% идентичной (например, по меньшей мере на 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательностью) последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей по меньшей мере 60% (например, по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) SEQ ID NO:3 из WO2017/085520. Например, бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению может иметь хромосому с последовательностью по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 70% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID

NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 80% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 90% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 100% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 95% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 70% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 95% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 80% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 95% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 90% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 95% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 100% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 70% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 80% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 90% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 95% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 100% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 99,5% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 90% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 99,5% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 95% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 99,5% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 98% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 99,5% идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 охватывающей 100% последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет плазмиду с последовательностью, идентичной последовательности SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет плазмиду с последовательностью по меньшей мере на 90% идентичной (например, с последовательностью по меньшей мере на 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) последовательности SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 охватывающей по

меньшей мере на 60% (например, по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) последовательности SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520. Например, бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению может иметь плазмиду с последовательностью по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 70% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или с последовательностью по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 80% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 90% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 90% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 100% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 95% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 70% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 95% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 80% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 95% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 90% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 95% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 100% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 70% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 80% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 90% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520, или по меньшей мере на 98% идентичной последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520 охватывающей 100% последовательности SEQ ID NO:4 из WO2017/085520.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет хромосому с последовательностью, идентичной SEQ ID NO:3 из WO2017/085520 и плазмиду с последовательностью, идентичной SEQ ID NO:4 из WO2017/085520.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет хромосому с последовательностью, идентичной SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, например, как описано выше, и последовательность 16S рPHK с последовательностью, идентичной к любой из SEQ ID NO: 1 или 2, например, как описано выше, предпочтительно с последовательностью 16S рPHK, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, более предпочтительно, которая содержит последовательность 16S рPHK SEQ ID NO: 2, и необязательно содержит плазмиду с

последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет хромосому с последовательностью, идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, например, как описано выше, и необязательно содержит плазмиду с последовательностью, идентичной последовательности SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и эффективен для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет хромосому с последовательностью, идентичной последовательности SEQ ID NO:3 из WO2017/085520, например, как описано выше, и последовательность 16S рПНК с последовательностью, идентичной любой из SEQ ID NO: 1 или 2, например, как описано выше, и необязательно содержит плазмиду с последовательностью, идентичной последовательности SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и эффективна для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет последовательность 16s рПНК, которая по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рПНК, представленной SEQ ID NO: 2 (например, которая содержит последовательность 16S рПНК SEQ ID NO: 2) и хромосому с последовательностью, идентичной по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 охватывающей по меньшей мере 90% последовательности SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520, и необязательно содержит плазмиду с последовательностью, идентичной последовательности SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и который эффективен для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению имеет последовательность 16s рПНК, которая по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рПНК, представленной SEQ ID NO: 2 (например, которая содержит последовательность 16S рПНК SEQ ID NO: 2) и хромосому с последовательностью, идентичной по меньшей мере на 98% (например, с последовательностью по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 99,5% идентичной) последовательности SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 охватывающей по меньшей мере 98% (например, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5%) последовательности SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 и, необязательно, содержит плазмиду с последовательностью, идентичной последовательности SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и который эффективен для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению представляет собой

Enterococcus gallinarum и имеет последовательность 16s рПНК, которая по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рПНК, представленной SEQ ID NO: 2 (например, которая содержит последовательность 16S рПНК SEQ ID NO: 2) и хромосому с последовательностью, идентичной по меньшей мере на 98% (например, с последовательностью по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 99,5% идентичной) последовательности SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 охватывающей по меньшей мере 98% (например, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5%) последовательности SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 и, необязательно, содержит плазмиду с последовательностью, идентичной последовательности SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и который эффективен для лечения или профилактики рака.

Альтернативно, штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488 и которые подходят для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, могут быть идентифицированы с использованием номера доступа NCIMB 42488, анализа депозита и рестрикционных фрагментов и/или анализа ПЦР, например, с использованием флуоресцентного полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (FAFLP - fluorescent amplified fragment length polymorphism) и геномных фингерпринтов с ПЦР повторяющихся палиндромных элементов (Rep-ПЦР), или профилирования белка, или частичного секвенирования 16S или 23s рДНК. В предпочтительных вариантах осуществления такие методы могут быть использованы для идентификации других штаммов *Enterococcus gallinarum*.

В определенных вариантах осуществления штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488 и которые подходят для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, представляют собой штаммы, которые обеспечивают тот же тип, что и бактерия, депонированная под номером доступа NCIMB 42488, при анализе путем рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA - amplified ribosomal DNA restriction analysis), например, при использовании фермента рестрикции *Sau3AI* (типовые способы и руководство см., например, [1]). Альтернативно, биотипные штаммы идентифицируются как штаммы, которые имеют те же паттерны ферментации углеводов, что и бактерия, депонированная под номером доступа NCIMB 42488. В некоторых вариантах осуществления паттерн ферментации углеводов определяют с использованием панели API 50 CHL (bioMérieux). В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм, используемый в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению является

положительным 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, D-трегалозы, гентиобиозы, D-тагатозы и глюконата калия; и/или

промежуточного соединения 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 API 50 CHL (предпочтительно с использованием панели API 50 CHL от bioMérieux).

Другие штаммы *Enterococcus gallinarum*, которые могут быть использованы в композициях и способах согласно настоящему изобретению, такие как биотипы бактерии, депонированной 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 терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению могут быть идентифицированы путем культивирования в анаэробной YCFA и/или введения бактерий в модель мыши с коллаген-индуцированным артритом типа II и затем оценки уровней цитокинов. В частности, бактериальные штаммы, которые имеют сходные паттерны роста, метаболический тип и/или поверхностные антигены с бактериями, депонированными под номером доступа NCIMB 42488, могут быть полезны в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению. Полезный штамм будет иметь сравнимую иммуномодулирующую активность со штаммом NCIMB 42488. В частности, штамм биотипа будет вызывать сопоставимые эффекты на моделях раковых заболеваний с эффектами, показанными в примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в примерах. Согласно некоторым вариантам осуществления, штамм биотипа, который можно использовать в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, представляет собой штамм, который способен вызывать сопоставимые эффекты на моделях раковых заболеваний, показанных в примерах, при введении в терапевтической комбинации или способе согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм, используемый в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, представляет собой:

Положительный по меньшей мере для одного из (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всех): ферментации маннозы, глутаматдекарбоксилазы, аргинин-ариламидазы, фенилаланин-ариламидазы, пироглутаминовая кислота-ариламидазы, тирозин-ариламидазы и гистидин-ариламидазы, и серин-ариламидазы; и/или

Промежуточного соединения по меньшей мере для одного из (например, по меньшей мере 2 или всех): β -галактозидаза-6-фосфата, β -глюкозидазы и N-ацетил- β -глюкозаминидазы; и/или

Отрицательный по меньшей мере для одного из (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или всех): ферментации раффинозы, пролинариламидазы, лейцилглицин-ариламидазы, лейцин ариламидазы, аланин-ариламидазы, глицин-ариламидазы и глутамил глутаминовая кислота-ариламидазы,

предпочтительно, как определено анализом метаболизма углеводов, аминокислот и нитратов, 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 бактериальный штамм, используемый в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, представляет собой:

Отрицательный по меньшей мере для одного из (например, по меньшей мере 2, 3 или всех 4) глицин-ариламидазы, ферментации рафинозы, пролин-ариламидазы и лейцин-ариламидазы, например, как определено анализом метаболизма углеводов, аминокислот и нитратов, предпочтительно как определено анализом Rapid ID 32A (предпочтительно с использованием системы Rapid ID 32A от BioMérieux); и/или

Положительный для промежуточного соединения для ферментации L-фукозы, предпочтительно, как определено анализом API 50 CHL (предпочтительно с использованием панели API 50 CHL от bioMérieux).

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм, используемый в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, представляет собой продуцент внеклеточного АТФ, например тот, который продуцирует 6-6,7 нг/мкл (например, 6,1-6,6 нг/мкл или 6,2-6,5 нг/мкл или $6,33 \pm 0,10$ нг/мкл) АТФ, измеренного с использованием набора для анализа АТФ (Sigma-Aldrich, MAK190). Бактериальный внеклеточный АТФ может оказывать плеiotропное действие, включая активацию передачи сигналов, опосредованной Т-клеточным рецептором (Schenk et al., 2011), стимулирование Th17-клеточной дифференциации (Atarashi et al., 2008) и индукцию секреции провоспалительного медиатора IL-1 β путем активации NLRP3-инфламмосомы (Karmarkar et al., 2016). Соответственно, бактериальный штамм, который является продуцентом внеклеточного АТФ, полезен для лечения или профилактики рака в контексте терапевтической комбинации и способа согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению содержит один или более из следующих трех генов: белок мобильного элемента; переносчик ксилозы ABC, пермеазный компонент; и FIG00632333: гипотетический белок. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению содержит гены, кодирующие белок мобильного элемента и переносчик ксилозы ABC, компонент пермеазы; белок мобильного элемента и FIG00632333: гипотетический белок; переносчик ксилозы ABC, пермеазный компонент и FIG00632333: гипотетический белок; или белок мобильного элемента, переносчик ксилозы ABC, компонент пермеазы и FIG00632333: гипотетический белок.

Особенно предпочтительным штаммом терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению является штамм *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером доступа NCIMB 42488. Это примерный штамм MRX518, протестированный в примерах и показавший свою эффективность для лечения заболевания. Изобретение

обеспечивает в соответствии с некоторыми вариантами осуществления бактериальную композицию как часть терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, содержащую клетку штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированную под номером доступа NCIMB 42488, или ее производное. Производное штамма, депонированного под учетным номером доступа NCIMB 42488, может быть дочерним штаммом (потомство) или штаммом, культивируемым (субклонированным) из оригинала.

Производное штамма композиции, содержащейся в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, может быть модифицировано, например, на генетическом уровне, без снижения биологической активности. В частности, производный штамм терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению является терапевтически активным. Производный штамм будет иметь сравнимую иммуномодулирующую активность с исходным штаммом NCIMB 42488. В частности, производный штамм будет вызывать сопоставимые эффекты на моделях раковых заболеваний в сочетании с пембролизумабом с эффектами, показанными в примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в примерах. 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 имеют те же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, что и штаммы, депонированные под номером доступа NCIMB 42488, и такие клетки включены в терапевтическую комбинацию согласно настоящему изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ссылка на клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, относится только к штамму MRX518, депонированному под номером доступа NCIMB 42488, и не относится к бактериальному штамму, который не был депонирован под номером доступа NCIMB 42488. В некоторых вариантах осуществления ссылка на клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированные под номером доступа NCIMB 42488, относится к клеткам, которые имеют те же 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 бактериальные штаммы в композициях согласно настоящему изобретению являются жизнеспособными и способны частично или полностью колонизировать кишечник.

Лечение рака

В предпочтительных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения в лечении или профилактике рака. Примеры демонстрируют, что введение терапевтических комбинаций согласно настоящему изобретению может привести к снижению роста опухоли.

В определенных вариантах осуществления лечение терапевтическими

комбинациями согласно настоящему изобретению приводит к уменьшению размера опухоли или уменьшению роста опухоли. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли или уменьшения роста опухоли. Терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению могут быть эффективными для уменьшения размера или роста опухоли. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения у пациентов с солидными опухолями. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения или предотвращения ангиогенеза при лечении рака. Терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению могут оказывать влияние на иммунную или воспалительную системы, которые играют центральную роль в ангиогенезе. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для предотвращения метастазирования.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака молочной железы. Примеры демонстрируют, что терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению могут быть эффективными для лечения рака молочной железы. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой карциному молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы IV стадии.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака легких. Примеры демонстрируют, что терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению могут быть эффективными для лечения рака легких. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака легких. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой карциному легких.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака печени. Примеры демонстрируют, что терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению могут быть эффективными для лечения рака печени. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения размера

опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака печени. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой гепатому (гепатоцеллюлярную карциному).

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака толстой кишки. Примеры демонстрируют, что терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению оказывают влияние на клетки рака толстой кишки и могут быть эффективными для лечения рака толстой кишки. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака толстой кишки. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой колоректальную аденокарциному.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака почек (также упоминаемого в настоящем документе как рак почек). Примеры демонстрируют, что терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению оказывают влияние на клетки рака почки и могут быть эффективными для лечения рака почек. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака почек. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой карциному клеток почки или переходно-клеточный рак.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике меланомы. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению оказывают влияние на меланоциты и могут быть эффективными для лечения меланомы. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении меланомы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак кишечника. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак части 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 тонкой кишки. В некоторых вариантах осуществления лечение или предотвращение происходит в месте, отличном от кишечника. В некоторых вариантах осуществления лечение или профилактика происходит в кишечнике, а также в месте, отличном от кишечника.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно

настоящему изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака. Примеры демонстрируют, что терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению могут быть эффективными для лечения многочисленных типов карциномы. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике неиммуногенного рака. Примеры демонстрируют, что терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению могут быть эффективными для лечения неиммуногенных раковых заболеваний.

Терапевтическое воздействие бактериальных композиций согласно настоящему изобретению на рак в контексте терапевтических комбинаций согласно настоящему изобретению может быть опосредовано провоспалительным механизмом. Примеры 2, 4 и 5 демонстрируют, что экспрессия ряда провоспалительных цитокинов может быть увеличена после введения MRX518. Воспаление может иметь эффект подавления рака [], и провоспалительные цитокины, такие как $TNF\alpha$, исследуются в качестве способов лечения рака []. Повышенная регуляция генов, таких как TNF , показанная в примерах, может указывать на то, что бактериальные композиции согласно настоящему изобретению могут быть полезны для лечения рака по аналогичному механизму. Повышенная регуляция лигандов CXCR3 (CXCL9, CXCL10) и $IFN\gamma$ -индуцибельных генов (IL-32) может указывать на то, что бактериальные композиции согласно настоящему изобретению вызывают ответ $IFN\gamma$ -типа. $IFN\gamma$ является мощным фактором, активирующим макрофаги, который может стимулировать тумороцидную активность [], а CXCL9 и CXCL10, например, также обладают противораковым действием [-]. Следовательно, в определенных вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему изобретению, при использовании в контексте терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, предназначены для стимуляции воспаления при лечении рака. В предпочтительных вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению, при использовании в контексте терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, предназначены для стимуляции воспаления Th1 при лечении рака. Клетки Th1 вырабатывают $IFN\gamma$ и обладают сильным противораковым действием [15]. В определенных вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению, при использовании в контексте терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, предназначены для применения при лечении рака на ранней стадии, такого как рак, который не имеет метастазирования, или рак 0 или 1 стадии. Содействие воспалению может быть более эффективным против рака на ранней стадии [15]. В определенных вариантах осуществления композиции согласно настоящему изобретению, при использовании в контексте терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, предназначены для стимуляции воспаления для усиления эффекта пембролизумаба. В определенных вариантах осуществления лечение или профилактика рака включает повышение уровня экспрессии одного или более цитокинов. Например, в некоторых вариантах осуществления, лечение или профилактика

рака включает повышение уровня экспрессии одного или более из 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 из IL-1 β , IL-6 и TNF- α . Увеличение уровней экспрессии любого из IL-1 β , IL-6 и TNF- α , как известно, свидетельствует об эффективности в лечении рака.

Примеры 4 и 5 демонстрируют, что когда бактериальный штамм, как описано в настоящем документе, используется в комбинации с липополисахаридом (LPS), наблюдается синергетическое увеличение IL-1 β . Известно, что LPS вызывает провоспалительный эффект. Таким образом, в определенных вариантах осуществления лечение или профилактика рака включает использование бактериального штамма, как описано в настоящем документе, в комбинации с агентом, который активирует IL-1 β . В определенных вариантах осуществления лечение или профилактика рака включает использование бактериального штамма, как описано в настоящем документе, в сочетании с LPS. Соответственно, терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать агент, который активирует IL-1 β . Соответственно, бактериальная композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать LPS.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении пациента, который ранее получил химиотерапию. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении пациента, который не переносил химиотерапевтическое лечение. Терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению могут быть особенно подходящими для таких пациентов. В других вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении больного раком, который не отвечал на предшествующее лечение ингибитором иммунной контрольной точки. В других вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении больного раком, который не отвечал на предшествующее лечение ингибитором PD-1, таким как, но не ограничиваясь этим, пембролизумаб. Не желая быть связанными теорией или механизмом, полагают, что бактериальная композиция согласно настоящему изобретению способна стимулировать иммунную систему субъекта посредством механизма, отличного от механизма пембролизумаба, обеспечивая тем самым дополнительный механизм для лечения пациентов, которые не отвечают на лечение ингибитором иммунных контрольных точек.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение рака с использованием терапевтической комбинации результатов изобретения является более эффективным, чем использование одного пембролизумаба, как измерено с помощью критериев RECIST (критерии оценки ответа в солидных опухолях) или критериев irRECIST (иммунозависимые критерии оценки ответа солидных опухолей). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лечение рака с использованием

терапевтической комбинации результатов изобретения является более эффективным, чем использование только бактериальной композиции, измеренной с помощью критериев RECIST (критерии оценки ответа в солидных опухолях) или критериев irRECIST (иммунозависимые критерии оценки ответа солидных опухолей). В соответствии с некоторым вариантом осуществления лечение рака с использованием терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению приводит к синергетическим клиническим эффектам по сравнению с лечением одним пембролизумабом или только бактериальной композицией, как измеряно с помощью критериев RECIST (критерии оценки ответа в солидных опухолях) или критериев irRECIST (иммунозависимые критерии оценки ответа солидных опухолей).

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для предотвращения рецидива. Бактериальные композиции в контексте терапевтических комбинаций согласно настоящему изобретению могут подходить для длительного введения. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для предотвращения прогрессирования рака.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC). В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении мелкоклеточной карциномы легких. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении плоскоклеточной карциномы. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении аденокарциномы. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении опухолей желез, карциноидных опухолей или недифференцированных карцином.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении гепатобластомы, холангиокарциномы, холангиоцеллюлярной цистаденокарциномы или рака печени, вызванного вирусной инфекцией.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении инвазивной протоковой карциномы, протоковой карциномы *in situ* или инвазивной лобулярной карциномы.

В других вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению предназначены для применения в лечении или профилактике острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза, аденокортикального рака, базально-клеточного рака, рака желчного протока, рака

мочевого пузыря, опухоли костей, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы, глиомы ствола головного мозга, рака головного мозга, мозжечковой астроцитомы, церебральной астроцитомы/злокачественной глиомы, эпендимомы, медуллобластомы, супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, рака молочной железы, бронхиальных аденом/карциноидов, лимфомы Беркитта, карциноидной опухоли, рака шейки матки, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелолейкоза, хронических миелопролиферативных расстройств, 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, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST), эмбрионально-клеточной опухоли, глиомы, детской опухоли зрительных путей и гипоталамуса, лимфомы Ходжкина, меланомы, карциномы островковых клеток, саркомы Капоши, почечно-клеточного рака, рака гортани, лейкозов, лимфом, мезотелиом, нейробластом, неходжкинской лимфомы, рака ротоглотки, рака остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака паращитовидной железы, фарингеального рака, эозинофильной аденомы, неоплазии клеток плазмы, рака предстательной железы, карциномы клеток почки, ретинобластомы, саркомы, рака яичка, рака щитовидной железы или рака матки.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтические комбинации предназначены для применения в лечении или профилактике рака, выбранного из группы, состоящей из меланомы, NSCLC (немелкоклеточного рака легких), рака мочевого пузыря и рака головы и шеи.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению содержат дополнительный противораковый агент. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дополнительный противораковый агент выбран из: иммунотерапии целевым антителом, CAR-T-клеточной терапии, онколитического вируса или цитостатического лекарственного средства.

Способ введения

Предпочтительно бактериальные композиции согласно настоящему изобретению следует вводить в желудочно-кишечный тракт, чтобы обеспечить доставку и/или частичную или полную колонизацию кишечника бактериальным штаммом согласно настоящему изобретению. Как правило, бактериальные композиции согласно настоящему изобретению вводят перорально, но они могут быть введены ректально, интраназально или буккально, или сублингвально.

В определенных вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены в виде пены, в виде спрея или геля.

В некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены в виде суппозитория, такого как суппозиторий для ректального введения, например, в форме масла теобромы (масло какао), синтетического твердого жира (например, суппоцира, випсола), глицерожелатина,

полиэтиленгликоля или мыльной глицериновой композиции.

В некоторых вариантах осуществления бактериальную композицию согласно настоящему изобретению вводят в желудочно-кишечный тракт через трубку, например, назогастральный зонд, орогастральный зонд, желудочный зонд, с помощью еюностомии (J-образная трубка), чрескожной эндоскопической гастростомии (PEG) или порт, например, порт-система, имплантируемая в области грудной стенки, обеспечивающая доступ к желудку, тонкой кишке и другим подходящим портам доступа.

Бактериальные композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены один раз или они могут быть введены последовательно как часть схемы лечения. В определенных вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему изобретению следует вводить ежедневно.

В определенных вариантах осуществления изобретения лечение согласно изобретению сопровождается оценкой микробиоты кишечника пациента. Лечение может быть повторено, если доставка и/или частичная, или полная колонизация штаммом бактериальной композиции согласно настоящему изобретению не достигнута, так что эффективность не наблюдается, или лечение может быть прекращено, если доставка и/или частичная, или полная колонизация успешна и эффективность наблюдается. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту перед первым введением пембролизумаба терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам осуществления, микробиоту кишечника субъекта оценивают после введения бактериальной композиции и перед первым введением пембролизумаба, так что пембролизумаб вводят только после доставки и/или после того, как частичная, или полная колонизация штаммом бактериального штамма в композиции будет достигнута. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению может быть введена беременному животному, например, млекопитающему, такому как человек, с тем чтобы уменьшить вероятность развития рака у ее ребенка *in utero* и/или после его рождения.

Терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению может быть введена пациенту, у которого диагностирован рак или который был идентифицирован как подверженный риску рака. Терапевтическая комбинация также может быть введена в качестве профилактической меры для предотвращения развития рака у здорового пациента.

Терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению может быть введена пациенту, у которого была выявлена патологическая кишечная микробиота. Например, у пациента может быть снижение или отсутствие колонизации *Enterococcus gallinarum*.

Бактериальные композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены в виде пищевого продукта, такого как пищевая добавка.

Как правило, терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению

предназначены для лечения людей, хотя они могут быть использованы для лечения животных, включая моногастричных млекопитающих, таких как домашняя птица, свиньи, кошки, собаки, лошади или кролики. Терапевтические комбинации согласно настоящему изобретению могут быть полезны для усиления роста и продуктивности животных. При введении бактериальной композиции животным может быть использован оральный зонд.

Согласно некоторым вариантам осуществления, пембролизумаб вводят внутривенно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пембролизумаб, который вводят внутривенно, находится в композиции, которая необязательно дополнительно содержит по меньшей мере один фармацевтически совместимый носитель или вспомогательное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления, пембролизумаб вводят внутривенно каждые приблизительно одну, две, три или четыре недели, предпочтительно каждые три недели.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, бактериальную композицию и пембролизумаб терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению вводят с использованием различных путей введения. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию вводят перорально, тогда как пембролизумаб терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению вводят другим путем. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пембролизумаб терапевтической комбинации вводят внутривенно, тогда как бактериальную композицию вводят перорально.

Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию вводят субъекту до первого введения пембролизумаба субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию вводят субъекту до первого введения пембролизумаба субъекту; причем бактериальную композицию вводят до тех пор, пока не будет достигнута доставка и/или частичная, или полная колонизация штаммом бактериального штамма в композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию вводят субъекту до первого введения пембролизумаба субъекту; причем бактериальную композицию вводят до тех пор, пока не произойдет достаточная модуляция биомаркеров, так что пембролизумаб способен лечить больного раком, который ранее не отвечал на лечение ИИКТ. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию вводят субъекту в течение по меньшей мере одной, двух, трех или четырех недель до первого введения пембролизумаба. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию вводят субъекту в течение около двух недель до первого введения пембролизумаба. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию вводят субъекту в течение по меньшей мере одной, двух, трех или четырех недель до первого введения пембролизумаба и не вводят субъекту параллельно с введением пембролизумаба.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первое введение бактериальной композиции в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению происходит до первого введения пембролизумаба. Согласно некоторым

вариантам осуществления первое введение пембролизумаба происходит не более чем через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения бактериальной композиции.

Согласно некоторым вариантам осуществления способа и терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, бактериальную композицию вводят субъекту по меньшей мере частично параллельно с введением пембролизумаба субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления, бактериальную композицию вводят субъекту в течение первого периода времени с последующим введением пембролизумаба субъекту в течение второго периода времени; причем бактериальную композицию необязательно дополнительно вводят субъекту в течение по меньшей мере части указанного второго периода времени, необязательно в течение всего второго периода времени. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию вводят субъекту в течение первого периода времени, такого как, но не ограничиваясь этим, в течение около двух недель, с последующим введением пембролизумаба субъекту в течение второго периода времени, такого как, около трех недель. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальную композицию вводят субъекту в течение первого периода времени, такого как, но не ограничиваясь этим, в течение около двух недель, с последующим введением пембролизумаба субъекту в течение второго периода времени, такого как, около трех недель; причем бактериальную композицию дополнительно вводят субъекту в течение по меньшей мере части указанного второго периода времени, предпочтительно в течение всего второго периода времени.

Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальная композиция и пембролизумаб не вводятся с одинаковой частотой. В неограничивающем примере пембролизумаб вводят внутривенно каждые три недели, тогда как бактериальную композицию вводят перорально каждый день или через день. Согласно некоторым вариантам осуществления, бактериальную композицию вводят субъекту в течение первого периода времени с последующим введением пембролизумаба субъекту в течение второго периода времени; причем бактериальную композицию необязательно дополнительно вводят субъекту в течение по меньшей мере части указанного второго периода времени; и при этом частота введения бактериальной композиции различна в первый период времени и второй период времени.

Бактериальные композиции терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению

Обычно композиция, содержащаяся в терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению, содержит бактерии. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения бактериальная композиция составлена в лиофилизированной форме. Например, бактериальная композиция согласно настоящему изобретению может содержать гранулы или желатиновые капсулы, например твердые желатиновые капсулы, содержащие бактериальный штамм согласно настоящему изобретению.

Предпочтительно бактериальная композиция согласно настоящему изобретению

содержит лиофилизированные бактерии. Лиофилизация бактерий является хорошо известной методикой и соответствующие руководства доступны, например, по ссылкам [1].

Альтернативно, бактериальная композиция согласно настоящему изобретению может содержать живую активную бактериальную культуру.

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

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

В предпочтительных вариантах осуществления бактериальная композиция терапевтической комбинации согласно настоящему изобретению инкапсулирована для обеспечения возможности доставки бактериального штамма в кишечник. Инкапсуляция защищает бактериальную композицию от деградации до доставки в целевое местоположение, например, путем разрыва с химическими или физическими стимулами, такими как давление, ферментативная активность или физический распад, которые могут быть вызваны изменениями pH. Может быть использован любой подходящий способ инкапсуляции. Типовые способы инкапсуляции включают захват внутри пористой матрицы, прикрепление или адсорбцию на поверхностях твердого носителя, самоагрегацию посредством флокуляции или сшивающих агентов, и механическое удержание за микропористой мембраной или микрокапсулой. Руководство по инкапсуляции, которое может быть полезным для приготовления композиций согласно настоящему изобретению, доступно, например, по ссылкам [2] и [3].

Бактериальная композиция может быть введена перорально и может быть в форме таблетки, капсулы или порошка. Инкапсулированные продукты являются

предпочтительными, потому что *Enterococcus gallinarum* являются анаэробами. Другие ингредиенты (такие как витамин С, например), могут быть включены в качестве поглотителей кислорода и пребиотических субстратов для улучшения доставки и/или частичной, или полной колонизации и выживания *in vivo*. Альтернативно, пробиотическая композиция согласно настоящему изобретению может быть введена перорально в виде пищевого или питательного продукта, такого как кисломолочный продукт на основе молока или сыворотки, или в виде фармацевтического препарата.

Бактериальная композиция может быть составлена в виде пробиотика.

Бактериальная композиция согласно настоящему изобретению включает терапевтически эффективное количество бактериального штамма согласно настоящему изобретению. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма является достаточным для оказания благоприятного воздействия на пациента. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма может быть достаточным, чтобы привести к доставке 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 бактериальная 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 г, 3 г, 5 г и 10 г.

Пробиотик, такой как бактериальная композиция согласно настоящему изобретению, необязательно может быть объединен по меньшей мере с одним подходящим пребиотическим соединением. Пребиотик обычно представляет собой трудноусваиваемый углевод, такой как олиго- или полисахарид, или сахароспирт, который не разлагается и не всасывается в верхних отделах пищеварительного тракта. Известные пребиотики включают коммерческие продукты, такие как инулин и трансгалактоолигосахариды.

В определенных вариантах осуществления пробиотическая бактериальная композиция согласно настоящему изобретению содержит пребиотик в количестве от около 1 до около 30% масс. по отношению к общей массе композиции (например, от 5 до 20% масс.). Углеводы могут быть выбраны из группы, состоящей из: фруктоолигосахаридов (или FOS), короткоцепочечных фруктоолигосахаридов, инулина, изомальтолигосахаридов, пектинов, ксилоолигосахаридов (или XOS (xylo-oligosaccharides)), хитозанолигосахаридов (или COS (chitosan-oligosaccharides)), бета-глюканов, гуммиарабика, модифицированных и устойчивых крахмалов, полидекстрозы, D-тагатозы, пищевых волокон из акации, рожкового дерева, овса и цитрусов. В одном аспекте пребиотики представляют собой фруктоолигосахариды с короткой цепью (для простоты, приведенные в настоящем документе ниже как FOSs-c.c (short-chain fructo-

oligosaccharides)); указанные FOSs-с.с не являются усваиваемыми углеводами, обычно полученными путем превращения свекловичного сахара и включающими молекулу сахарозы, с которой связаны три молекулы глюкозы.

Бактериальные композиции согласно настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества или носители. Примеры таких подходящих вспомогательных веществ можно найти по ссылке []. Приемлемые носители или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в области фармацевтики и описаны, например, в ссылке []. Примеры подходящих носителей включают лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и тому подобное. Примеры подходящих разбавителей включают этанол, глицерин и воду. Фармацевтический носитель, вспомогательное вещество или разбавитель может быть выбран с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики. Фармацевтические композиции могут включать в качестве или в дополнение к носителю, вспомогательному веществу или разбавителю любое подходящее связующее вещество (а), смазывающее вещество(а), суспендирующий агент(ы), покрывающий агент(ы), солюбилизующий агент(ы). Примеры подходящих связующих веществ включают крахмал, желатин, натуральные сахара, такие как глюкоза, безводная лактоза, свободно сыпучая лактоза, бета-лактоза, подсластители из кукурузы, натуральные и синтетические камеди, такие как гуммиарабик, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза и полиэтиленгликоль. Примеры подходящих смазывающих веществ включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и тому подобное. В фармацевтическую композицию могут быть включены консерванты, стабилизаторы, красители и даже ароматизаторы. Примеры консервантов включают бензоат натрия, сорбиновую кислоту и сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты. Также могут быть использованы антиоксиданты и суспендирующие агенты.

Бактериальные композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены в виде пищевого продукта. Например, пищевой продукт может обеспечивать питательную ценность в дополнение к терапевтическому эффекту согласно настоящему изобретению, например, в пищевой добавке. Аналогичным образом, пищевой продукт может быть составлен для улучшения вкуса композиции согласно настоящему изобретению или для того, чтобы сделать композицию более привлекательной для потребления, будучи более похожей на обычный продукт питания, чем на фармацевтическую композицию. В определенных вариантах осуществления композиция согласно настоящему изобретению составлена в виде молочного продукта. Термин «молочный продукт» означает любой жидкий или полутвердый продукт на основе молока или сыворотки с различным содержанием жира. Молочный продукт может представлять собой, например, коровье молоко, козье молоко, овечье молоко, обезжиренное молоко, цельное молоко, молоко, рекомбинированное из сухого молока и сыворотки без какой-либо обработки, или обработанный продукт, такой как йогурт, свернувшееся молоко,

творог, простокваша, скисшее цельное молоко, сливочное молоко и другие кисломолочные продукты. Другая важная группа включает молочные напитки, такие как сывороточные напитки, кисломолочные, сгущенное молоко, молочная смесь или детское молоко; ароматизированное молоко, мороженое; молокосодержащие продукты, такие как сладости.

В определенных вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему изобретению содержат один бактериальный штамм или вид, и не содержат никаких других бактериальных штаммов или видов. Такие бактериальные композиции могут содержать только *незначительные* или биологически нерелевантные количества других бактериальных штаммов или видов. Такие бактериальные композиции могут представлять собой культуру, которая по существу свободна от других видов микроорганизма. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция терапевтической комбинации содержит один или более штаммов видов *Enterococcus gallinarum*, и не содержит бактерий любых других видов или содержит только *незначительные* или биологически нерелевантное количество бактерий других видов.

В некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему изобретению содержат более чем один бактериальный штамм или вид. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему изобретению содержат более одного штамма из одного вида (например, более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45 штаммов) и, необязательно, не содержат бактерий любых других видов. В некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему изобретению содержат менее 50 штаммов 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 любых других видов. В некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему 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 одного и того же вида и, необязательно, не содержат бактерий других видов. В некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему 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 любого другого рода. В некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему 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 бактерий любого другого рода. В некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции согласно настоящему 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 любого другого рода. Бактериальная композиция для применения в

комбинации согласно настоящему изобретению может содержать любую комбинацию вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция содержит микробный консорциум. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция содержит бактериальный штамм, имеющий 16S рПНК последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, например, который представляет собой *Enterococcus gallinarum*, как часть микробного консорциума. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм присутствует в бактериальной композиции в сочетании с одним или более (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20) другими бактериальными штаммами из других видов, с которыми он может жить симбиотически *in vivo* в кишечнике. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция содержит бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рПНК, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, например, который является *Enterococcus gallinarum*, в сочетании с бактериальным штаммом из другого рода. В некоторых вариантах осуществления микробный консорциум включает два или более бактериальных штамма, полученных из образца фекалий одного организма, например человека. В некоторых вариантах микробный консорциум не встречается вместе в природе. Например, в некоторых вариантах осуществления микробный консорциум включает бактериальные штаммы, полученные из образцов фекалий по меньшей мере двух разных организмов. В некоторых вариантах осуществления два разных организма относятся к одному и тому же виду, например два разных человека, например два разных младенца. В некоторых вариантах осуществления два разных организма представляют собой младенца и взрослого человека. В некоторых вариантах осуществления два разных организма представляют собой млекопитающее, отличное от человека.

В некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция согласно настоящему изобретению дополнительно содержит бактериальный штамм, который имеет такую же безопасность и терапевтические характеристики эффективности как и штамм MRX518, но который не является штаммом MRX518 депонированным под номером NCIMB 42488, или который не является *Enterococcus gallinarum*.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в бактериальной композиции получают из фекалий человека. В некоторых вариантах осуществления, в которых бактериальная композиция содержит более одного бактериального штамма, все из бактериальных штаммов, которые получены из фекалий младенцев человека или если другие бактериальные штаммы присутствуют, они присутствуют только в *незначительных* количествах. Бактерии могут культивироваться после получения из фекалий младенца и использоваться в бактериальной композиции.

Как упоминалось выше, в некоторых вариантах осуществления один или более бактериальных штаммов, имеющих 16S рПНК последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, например, который является

Enterococcus gallinarum, является/являются единственным терапевтически активным(ми) агентом(ами) в бактериальной композиции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм(ы) в бактериальной композиции является/является единственным терапевтически активным агентом(ами) в композиции.

Бактериальные композиции для использования в соответствии с изобретением могут требовать или не требовать разрешения на продажу.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к вышеуказанной бактериальной композиции, причем указанный бактериальный штамм является лиофилизированным. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к вышеуказанной бактериальной композиции, причем указанный бактериальный штамм высушен распылением. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к вышеуказанной бактериальной композиции, причем бактериальный штамм лиофилизирован или высушен распылением и причем он жив. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к вышеуказанной бактериальной композиции, причем бактериальный штамм лиофилизирован или высушен распылением, и причем он является жизнеспособным. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к вышеуказанной бактериальной композиции, причем бактериальный штамм лиофилизирован или высушен распылением и причем он способен частично или полностью колонизировать кишечник. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к вышеуказанной бактериальной композиции, причем бактериальный штамм лиофилизирован или высушен распылением, и причем он жизнеспособен и способен частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых случаях лиофилизированный или высушенный распылением бактериальный штамм восстанавливается перед введением. В некоторых случаях для восстановления используется разбавитель, описанный в настоящем изобретении.

Бактериальные композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, разбавители или носители.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм, используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство представляет собой рак молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой карциному молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы IV стадии.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм, используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве,

достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство представляет собой рак легких. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой карциному легких.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм, используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство представляет собой рак печени. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой гепатому (гепатоцеллюлярную карциному).

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм, по изобретению; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство представляет собой рак толстой кишки. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой колоректальную аденокарциному.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм, по изобретению; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство представляет собой карциному.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм, по изобретению; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство представляет собой неимуногенный рак.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм, по изобретению; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство выбрано из группы, состоящей из мелкоклеточной карциномы легких, плоскоклеточной карциномы, аденокарциномы, опухолей желез, карциноидных опухолей, недифференцированных карцином.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм

по изобретению; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство выбрано из группы, состоящей из гепатобластомы, холангиокарциномы, холангиоцеллюлярной цистаденокарциномы или рака печени, вызванного вирусной инфекцией.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм по изобретению; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство выбрано из группы, состоящей из инвазивной протоковой карциномы, протоковой карциномы *in situ* или инвазивной лобулярной карциномы.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм по изобретению; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель; причем бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства при введении субъекту в комбинации с пембролизумабом; и причем расстройство выбрано из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза, аденокарциномы, базально-клеточного рака, рака желчного протока, рака мочевого пузыря, опухоли костей, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы, глиомы ствола головного мозга, рака головного мозга, мозжечковой астроцитомы, церебральной астроцитомы/злокачественной глиомы, эпендимомы, медуллобластомы, супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, рака молочной железы, бронхиальных аденом/карциноидов, лимфомы Беркитта, карциноидной опухоли, рака шейки матки, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелолейкоза, хронических миелопролиферативных расстройств, 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, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST), эмбрионально-клеточной опухоли, глиомы, детской опухоли зрительных путей и гипоталамуса, лимфомы Ходжкина, меланомы, карциномы островковых клеток, саркомы Капоши, почечно-клеточного рака, рака гортани, лейкозов, лимфом, мезотелиом, нейробластом, неходжкинской лимфомы, рака ротоглотки, рака остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака паращитовидной железы, фарингеального рака, эозинофильной аденомы, неоплазии клеток плазмы, рака предстательной железы, карциномы клеток почки, ретинобластомы, саркомы, рака яичка, рака щитовидной железы или рака матки.

В некоторых вариантах осуществления количество бактериального штамма в

бактериальной композиции составляет от около 1×10^3 до около 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм по отношению к массе композиции.

В определенных вариантах осуществления бактериальную композицию вводят в дозе 1 г, 3 г, 5 г или 10 г.

В определенных вариантах осуществления бактериальную композицию вводят способом, выбранным из группы, состоящей из перорального, ректального, подкожного, назального, буккального и подъязычного введения.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция содержит носитель, выбранный из группы, состоящей из лактозы, крахмала, глюкозы, метилцеллюлозы, стеарата магния, маннита и сорбита.

В определенных вариантах осуществления изобретение предусматривает, что бактериальная композиция содержит разбавитель, выбранный из группы, состоящей из этанола, глицерина и воды.

В некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция содержит вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из крахмала, желатина, глюкозы, безводной лактозы, лактозы свободного течения, бета-лактозы, кукурузного подсластителя, гуммиарабика, трагаканта, альгината натрия, карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленгликоля, олеата натрия, стеарата натрия, стеарата магния, бензоата натрия, ацетата натрия и хлорида натрия.

В определенных вариантах осуществления бактериальная композиция дополнительно содержит, по меньшей мере, один из консерванта, антиоксиданта и стабилизатора.

В некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция содержит консервант, выбранный из группы, состоящей из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров п-гидроксибензойной кислоты.

В определенных вариантах осуществления, когда бактериальную композицию хранят в запечатанном контейнере при температуре около $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ или около $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и контейнер помещают в атмосферу, имеющую относительную влажность 50%, по меньшей мере, 80% бактериального штамма, измеренного в колониеформирующих единицах, остается после периода, по крайней мере, около: 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года, 2,5 года или 3 года.

В некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция по изобретению предоставляется в герметичном контейнере. В некоторых вариантах осуществления герметичный контейнер представляет собой пакетик или флакон. В некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция по изобретению предоставляется в шприце.

В некоторых вариантах осуществления бактериальная композиция может предоставляться в виде фармацевтической композиции. Например, бактериальная композиция может предоставляться в виде таблетки или капсулы. В некоторых вариантах осуществления капсула представляет собой желатиновую капсулу («гелевая крышка»).

В некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции по

изобретению вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления бактериальные композиции по изобретению составлены в фармацевтическую композицию, подходящую для перорального введения. Пероральное введение может включать глотание, так что соединение попадает в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или подъязычное введение, посредством которого соединение попадает в кровоток непосредственно изо рта.

Фармацевтические составы, подходящие для перорального введения, включают твердые пробки, 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; пастилки (в том числе наполненные жидкостью); жвачки; гели; быстро диспергируемые лекарственные формы; пленки; капсулы; спреи; и буккальные/мукоадгезивные пластыри.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой кишечнорастворимую композицию, то есть гастроустойчивую композицию (например, устойчивую к желудочному pH), которая подходит для доставки композиции по изобретению в кишечник путем перорального введения. Кишечнорастворимые составы могут быть особенно полезны, когда бактерии или другие компоненты композиции чувствительны к кислоте, например, склонны к деградации в желудочных условиях.

В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимая композиция содержит кишечнорастворимое покрытие. В некоторых вариантах композиция представляет собой лекарственную форму с кишечнорастворимым покрытием. Например, композиция может представлять собой таблетку с кишечнорастворимым покрытием или капсулу с кишечнорастворимым покрытием или тому подобное. Кишечнорастворимое покрытие может представлять собой обычное кишечнорастворимое покрытие, например, обычное покрытие для таблетки, капсулы или тому подобное для пероральной доставки. Композиция может содержать пленочное покрытие, например, тонкопленочный слой кишечнорастворимого полимера, например нерастворимого в кислоте полимера.

В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимая композиция является по существу кишечнорастворимой, например, гастроустойчивой без необходимости в кишечнорастворимом покрытии. Таким образом, в некоторых вариантах композиция представляет собой кишечнорастворимую композицию, которая не содержит кишечнорастворимого покрытия. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой капсулу, изготовленную из термогелеобразующего материала. В некоторых вариантах осуществления термогелеобразующий материал представляет собой целлюлозный материал, такой как метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза или гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ). В некоторых вариантах осуществления капсула содержит оболочку, которая не содержит пленкообразующего полимера. В некоторых вариантах осуществления капсула содержит оболочку, а оболочка содержит

гидроксипропилметилцеллюлозу и не содержит какого-либо пленкообразующего полимера (например, см. [1]). В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой кишечно-кишечную капсулу (например, Vcaps® от Capsugel).

В некоторых вариантах композиция представляет собой мягкую капсулу. Мягкие капсулы представляют собой капсулы, которые могут, благодаря добавкам смягчителей, таких как, например, глицерин, сорбит, мальтит и полиэтиленгликоли, присутствующих в оболочке капсулы, иметь определенную эластичность и мягкость. Мягкие капсулы могут быть изготовлены, например, на основе желатина или крахмала. Мягкие капсулы на основе желатина коммерчески доступны от различных поставщиков. В зависимости от способа введения, такого как, например, перорально или ректально, мягкие капсулы могут иметь различную форму, они могут быть, например, круглой, овальной, продолговатой или торпедообразной формы. Мягкие капсулы могут быть получены обычными способами, такими как, например, процесс Шерера, процесс Аккогеля или процесс капли или выдувания.

Способы культивирования

Штаммы бактерий для использования в настоящем изобретении могут культивироваться с использованием стандартных методов микробиологии, как подробно описано, например, в ссылках [1].

Твердой или жидкой средой, используемой для культивирования, может быть агар YCFA или среда YCFA. YCFA среда может включать в себя (на 100 мл, приблизительные значения): Casitone (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), ресазурин (0,1 мг), гемин (1 мг), биотин (1 мкг), кобаламин (1 мкг), *n* аминокислота (3 мкг), фолиевая кислота (5 мкг) и пиридоксамин (15 мкг).

Бактериальные штаммы для использования в вакцинных композициях

Авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы бактериальной композиции по изобретению полезны для лечения или профилактики рака при введении в сочетании с пембролизумабом. Это, вероятно, является результатом воздействия бактериальных штаммов по изобретению на иммунную систему хозяина. В определенных вариантах осуществления бактериальные штаммы являются жизнеспособными. В определенных вариантах осуществления бактериальные штаммы способны частично или полностью колонизировать кишечник. В определенных вариантах осуществления бактериальные штаммы являются жизнеспособными и способны частично или полностью колонизировать кишечник. В других определенных вариантах осуществления бактериальные штаммы могут быть убиты, инактивированы или ослаблены. В определенных вариантах осуществления бактериальные композиции предназначены для введения посредством инъекции, такой как посредством подкожной инъекции.

Пембролизумаб

Терапевтическая комбинация по изобретению включает пембролизумаб. Как описано выше, пембролизумаб представляет собой антитело, которое ингибирует

иммунные контрольные точки, что позволяет иммунной системе организма атаковать клетки, которые распознаются как собственные клетки организма, включая раковые клетки.

Пембролизумаб ингибирует взаимодействие между трансмембранным рецептором белка запрограммированной гибели клеток 1 (называемым PDCD1, PD-1, PD1 или CD279) и его лигандом, лигандом 1 PD-1 (называемым PD-L1, PDL1 или CD274), посредством связывания и блокирования рецептора PD-1 и, таким образом, упоминается как ингибитор PD-1.

Пембролизумаб продается компанией Merck под коммерческим названием KEYTRUDA®.

Используемые в настоящем документе термины «специфическое связывание» или «специфически связывать» относятся к неслучайной ассоциации между двумя молекулами, то есть антителом и антигеном. Согласно некоторым вариантам осуществления, пембролизумаб, через его антиген-связывающий домен, специфически связывается с антигеном с аффинностью связывания (K_d) от $<10^{-5}$ М. В качестве альтернативы, пембролизумаб, через его антиген-связывающий домен, может связываться с антигеном с $K_d <10^{-6}$ М или $<10^{-7}$ М. K_d , как используется в настоящем документе, относится к отношению скорости диссоциации к скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}), и может быть определена с использованием любых подходящих методов, известных в данной области техники.

Согласно некоторым вариантам осуществления, пембролизумаб терапевтической комбинации вводят системно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пембролизумаб составлен для системного введения.

В соответствии с другим вариантом осуществления системное введение осуществляется парентеральным путем. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления препараты пембролизумаба по изобретению для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии или эмульсии, каждый из которых представляет отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления парентеральное введение представляет собой введение внутривенно, внутриартериально, введение в стенку кровеносного сосуда, внутримышечно, внутривентриально, внутрикожно, интравитреально, чрескожно или подкожно. Каждый из вышеупомянутых способов введения представляет отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам осуществления, пембролизумаб терапевтической комбинации вводят внутривенно.

Согласно некоторым вариантам осуществления системное введение пембролизумаба осуществляется посредством инъекции. Для введения посредством инъекции пембролизумаб может быть приготовлен в водном растворе, например, в физиологически совместимом буфере, включая, но не ограничиваясь этим, раствор Хэнка, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Составы для инъекций могут быть

представлены в единичных дозированных формах, например, в ампулах или в контейнерах с множеством доз, с необязательно добавленным консервантом. Водные инъекционные суспензии могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Необязательно, суспензия также может содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые увеличивают растворимость активных ингредиентов, чтобы обеспечить получение высококонцентрированных растворов.

В соответствии с некоторым вариантом осуществления парентеральное введение выполняется путем болюсной инъекции. Согласно другим вариантам осуществления парентеральное введение осуществляют путем непрерывной инфузии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пембролизумаб доставляют в системе с контролируемым высвобождением и составляют для внутривенной инфузии, с помощью имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте осуществления используется насос. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от терапевтической мишени, что требует только доли системной дозы.

Терапевтическая комбинация

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлена терапевтическая комбинация по изобретению для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем документе представлена терапевтическая комбинация изобретения для применения в способе лечения рака у субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак, подлежащий лечению или профилактике с использованием терапевтической комбинации изобретения, выбран из группы, состоящей из меланомы, немелкоклеточной карциномы легкого, рака мочевого пузыря и рака головы и шеи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак, подлежащий лечению или профилактике с использованием терапевтической комбинации изобретения, выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака легкого, рака толстой кишки и рака печени.

Согласно некоторым вариантам осуществления лечение рака относится по меньшей мере к одному из уменьшения размера опухоли или предотвращения роста опухоли у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическая комбинация или способ по изобретению предназначены для применения по меньшей мере в одном из следующих способов: уменьшение размера опухоли, уменьшение роста опухоли, предотвращение метастазирования или предотвращение ангиогенеза у субъекта, страдающего от рака.

Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению включает: (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*; и (b) пембролизумаб.

Согласно некоторым вариантам осуществления, бактериальная композиция терапевтической комбинации не содержит бактерии каких - либо других, отличных от *Enterococcus gallinarum* видов или содержит только минимальные или биологически нерелевантные количества бактерий другого вида. Согласно некоторым вариантам осуществления, бактериальная композиция терапевтической комбинации содержит только один штамм вида *Enterococcus gallinarum*, и не содержит бактерий любых других видов или содержит только минимальные или биологически нерелевантные количества бактерий другого вида. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальная композиция терапевтической комбинации включает штамм *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером доступа NCIMB 42488. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, бактериальная композиция терапевтической комбинации включает один штамм вида *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером доступа NCIMB 42488, и не содержит бактерий любых других видов или содержит только минимальные или биологически нерелевантные количества бактерии другого вида.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пембролизумаб находится в композиции, возможно, содержащей по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению включает: (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, причем композиция содержит единственный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером доступа NCIMB 42488, необязательно, при этом композиция не содержит бактерий каких-либо других видов или содержит только минимальные или биологически нерелевантные количества бактерий других видов; и (b) пембролизумаб.

Предпочтительно, терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению включает: (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, депонированной под номером доступа NCIMB 42488; и (b) пембролизумаб. Согласно некоторым вариантам осуществления, представленная в настоящем документе терапевтическая комбинация представляет собой терапевтическую комбинацию для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, в котором терапевтическая комбинация содержит: (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером доступа NCIMB 42488; и (b) пембролизумаб.

Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению включает: (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* ; и (b) пембролизумаб.

Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтическая комбинация согласно настоящему изобретению включает: (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, необязательно в штамма под номером доступа NCIMB 42488, при этом необязательно композиция не содержит

бактерии любых других видов и/или штаммов или содержит только минимальные или биологически нерелевантные количества бактерий других видов и/или штаммов; и (b) пембролизумаб.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в настоящем документе представлен способ лечения и/или профилактики рака у субъекта с использованием любой из терапевтических комбинаций, раскрытых в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение предлагает любую одну из терапевтических комбинаций, раскрытых в данном документе, для применения при лечении и/или профилактике рака у субъекта.

Общее

Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные методы химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, в пределах квалификации в данной области. Такие методы подробно описаны в литературе. Смотрите, *например*, ссылки [] и [-], и т.д.

Термин «содержащий» охватывает «включающий в себя», а также «состоящий из», *например*, композиция, «содержащая» X, может состоять исключительно из X или может включать в себя что-то дополнительное *например* X+Y.

Термин «около» в отношении числового значения x является необязательным и означает, например, $x \pm 10\%$.

Слово «по существу» не исключает «полностью» *например* композиция, которая является «по существу свободной» от Y может быть полностью свободной от Y. При необходимости словосочетание «по существу» может быть опущено из определения по изобретению.

Ссылки на процентную идентичность последовательностей между двумя нуклеотидными последовательностями означают, что при выравнивании этот процент нуклеотидов одинаков при сравнении двух последовательностей. Это выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательности могут быть определены с использованием программ, известных в данной области техники, например, тех, которые описаны в разделе 7.7.18 ссылки []. Предпочтительное выравнивание определяется алгоритмом поиска гомологии Смита-Уотермана с использованием аффинного поиска пропуска с штрафом за разрыв пробела 12 и штрафом за расширение пробела 2, матрица BLOSUM равна 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана раскрыт в работе [].

Если специально не указано, способ, включающий многочисленные стадии, может содержать дополнительные стадии в начале или конце способа или может содержать дополнительные промежуточные стадии. Кроме того, стадии могут быть объединены, опущены или выполнены в альтернативном порядке, если это необходимо.

Различные варианты осуществления изобретения описаны в настоящем документе. Понятно, что признаки, указанные в каждом варианте осуществления, могут быть объединены с другими указанными функциями, чтобы обеспечить дополнительные варианты осуществления. В частности, варианты осуществления, выделенные в данном

документе как подходящие, типичные или предпочтительные, могут комбинироваться друг с другом (за исключением случаев, когда они являются взаимоисключающими).

СПОСОБЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1 - Эффективность бактериального инокулята в мышинной модели рака

Реферат

В этом исследовании проверялась эффективность композиций, содержащих бактериальные штаммы по изобретению, на четырех моделях опухолей.

Материалы

Испытуемое вещество - Бактериальный штамм # MRX518.

Контрольное вещество антитело к CTLA-4 (клон: 9H10, каталог: BE0131, изотип: сирийский хомяк IgG1, Bioxcell).

Тестовые и эталонные вещества-носители - Бактериальная культуральная среда (дрожжевой экстракт, Casitone, среда с жирными кислотами (YCFA)). Каждый день инъекции мышам, антитело разбавляли PBS (ref: BE14-516F, Лонза, Франция).

Лечебные дозы - Бактерии: 2×10^8 в 200 мкл. а-CTLA-4 вводили в дозе 10 мг/кг/инъекцию. Анти-CTLA-4 вводили в объеме дозы 10 мл/кг/введение (т.е. для одной мыши весом 20 г будет вводиться 200 мкл тестируемого вещества) в соответствии с самой последней массой тела мышей.

Способы введения - Бактериальный инокулят вводили через желудочный зонд (per os, PO) через канюлю. Канюли дезинфицировали каждый день. Анти-CTLA-4 вводили в брюшную полость мышей (внутрибрюшинно, в/б).

Условия культивирования бактериального штамма - условия культивирования для бактериального штамма были следующие:

Вносили пипеткой 10 мл YCFA (из подготовленных 10 мл лабораторных пробирок E&O) в пробирки Hungate

Закрывали пробирки и продували их CO_2 с помощью шприца ввода и системы отвода

Пробирки Hungate обрабатывали в автоклаве.

При охлаждении инокулировали пробирки Hungate 1 мл глицеринового стока.

Помещали пробирки в статический инкубатор при 37 °C на 16 ч.

На следующий день отбирали 1 мл этой субкультуры и инокулировали 10 мл YCFA (предварительно нагретые продутые пробирки Hungate, все в двух экземплярах)

Помещали их в статический инкубатор при 37 °C на 5-6 ч.

Линия раковых клеток и условия культивирования -

Используемые клеточные линии подробно описаны в таблице ниже:

Клеточная линия	Тип	Порода мыши	Происхождение
EMT-6	Карцинома молочной железы	BALB/c	ATCC
LL/2 (LLC1)	Карцинома легких	C57BL/6	ATCC CRL1642

Нера1-6	Гепатоцеллюлярная карцинома	C57BL/6	IPSEN INNOVATION
RENCA	Почечная аденокарцинома	BALB/c	ATCC

Клеточная линия EMT-6 была получена из трансплантируемой карциномы молочной железы мыши, возникшей у мышей BALB/cCRGL после имплантации гиперпластического альвеолярного узелка молочной железы [1].

Клеточная линия LL/2 (LLC1) была создана из легких мыши C57BL с опухолью, возникшей в результате имплантации первичной карциномы легких Льюиса [1].

Клеточная линия Нера 1-6 является производной гепатомы мыши BW7756, возникшей у мыши C57/L [1].

Условия клеточной культуры - Все клеточные линии выращивали в монослое при 37°C в увлажненной атмосфере (5% CO₂, 95% воздуха). Культуральная среда и добавки указаны в таблице ниже:

Клеточная линия	Культуральная среда	Добавка
EMT6	RPMI 1640, содержащая 2 mM L-глутамин (ссылка: BE12-702F, Lonza)	10% эмбриональная бычья сыворотка (ссылка: # 3302, Lonza)
LL/2 (LLC1)	RPMI 1640, содержащая 2 mM L-глутамин (ссылка: BE12-702F, Lonza)	10% эмбриональная бычья сыворотка (ссылка: # 3302, Lonza)
Нера1-6	DMEM (ссылка: 11960-044, Gibco)	10% эмбриональная бычья сыворотка (ссылка: # 3302, Lonza) 2 mM L-глутамин пенициллин-стрептомицин (Sigma G-6784)
RENCA	DMEM	10% эмбриональная бычья сыворотка, 2 mM L-глутамин, 1 мкг/мл пурамицина

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

Использование животных -

Здоровые самки мышей Balb/C (BALB/cByJ), соответствующие весу и возрасту,

были получены от CHARLES RIVER (L'Arbresles) для модельных экспериментов EMT6 и RENCA.

Здоровые самки мышей C57BL/6 (C57BL16J) соответствующего веса и возраста были получены от CHARLES RIVER (L'Arbresles) для модельных экспериментов LL/2 (LLC1) и Нера1-6.

Животные содержались в состоянии здоровья SPF в соответствии с руководящими принципами FELASA, а содержание животных и экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с французскими и европейскими правилами и Руководством NRC по уходу и использованию лабораторных животных [1]. Животных содержали в помещениях для содержания животных в контролируемых условиях окружающей среды: температура: 22 ± 2 °C, влажность $55 \pm 10\%$, фотопериод (12 ч света/12 ч темноты), НЕРА-фильтрованный воздух, 15 воздухообменов в час без рециркуляции. Вольеры для животных были обеспечены стерильным и достаточным пространством с подстилочным материалом, едой и водой, экологическим и социальным обогащением (групповое размещение), как описано: клетки размером 900 см² (ссылка: green, Tecniplast) в вентилируемых стойках, подстил Epicea (SAFE), облученная диета 10 кГр (A04-10, SAFE), полноценный корм для иммунокомпетентных грызунов - экструдат R/MH, вода из бутылок с водой

Экспериментальный дизайн и лечения

Противоопухолевая активность, модель EMT6

График лечения - Начало первого дозирования считалось D0. На D0 не инокулированных мышей рандомизировали в соответствии с их индивидуальной массой тела в группы 9/8 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, Кутернон, Франция). На D0 мыши получали носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм. На D14 все мыши были инокулированы опухолевыми клетками EMT-6, как описано ниже. На D24 мыши из группы положительного контроля получали лечение антителами к CTLA-4.

График лечения приведен в таблице ниже:

Группа	№ животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	8	Необработанные	-	-	-
2	8	Носитель (среда)	-	PO	Q1Dx42
3	9	Бактериальный штамм № 1 (MRX518)	2×10 ⁸ бактерий	PO	Q1Dx42
4	8	Анти-CTLA4	10 мг/кг	В/б	TWx2

Мониторинг животных проводили, как описано ниже.

Индукция EMT6 опухолей у животных- на D14, опухоли индуцировали путем

подкожной инъекции 1×10^6 EMT-6 клеток в 200 мкл среды RPMI 1640, в правый бок мышей.

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

Противоопухолевая активность, модель LL/2 (LLC1)

График лечения - Начало первого дозирования считалось D0. На D0 не инокулированных мышей рандомизировали в соответствии с их индивидуальной массой тела в 7 групп 9/8 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, Кутернон, Франция). На D0 мыши будут получать носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм. На D14 всем мышам были инокулированы опухолевые клетки LL/2, как описано ниже. На D27 мыши из группы положительного контроля получали лечение антителами к CTLA-4.

График лечения приведен в таблице ниже:

Группа	Количество животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	8	Необработанные	-	-	-
2	9	Носитель (среда)	-	PO	Q1Dx42
3	9	Бактериальный штамм № 1 (MRX518)	2×10^8 бактерий	PO	Q1Dx42
4	8	Анти-CTLA4	10 мг/кг	В/б	TWx2

Мониторинг животных проводили, как описано ниже.

Индукция опухолей LL/2 (LLC1) у животных. На D14 опухоли индуцировали подкожной инъекцией $1 \times 10^6 \times$ LL/2 (LLC1) клеток в 200 мкл RPMI 1640 в правый бок мышей.

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

Противоопухолевая активность, модель Нера1-6

График лечения - Начало первого дозирования считалось D0. На D0 не инокулированных мышей рандомизировали в соответствии с их индивидуальной массой тела в 7 групп по 9 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, Кутернон, Франция). На D0 мыши получали носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм. На D14 всем мышам были инокулированы опухолевые клетки Нера 1-6, как описано ниже. На D16 мыши из группы положительного контроля получали лечение антителами к CTLA-4.

График лечения приведен в таблице ниже:

Группа	Количество животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	9	Необработанные	-	-	-
2	9	Носитель (среда)	-	PO	Q1Dx42
6	9	Бактериальный штамм № 4 (MRX518)	2×10^8 бактерий	PO	Q1Dx42
7	9	Анти-CTLA4	10 мг/кг	В/б	TWx2

Мониторинг животных проводили, как описано ниже.

Ортотопическая индукция опухолевых клеток Нера 1-6 у животных путем интраспленальной инъекции - На D14 один миллион (1×10^6) опухолевых клеток Нера 1-6 в 50 мкл среды RPMI 1640 трансплантировали мышам путем внутриселезеночной инъекции. Вкратце, был сделан небольшой разрез левого подреберного бока, и селезенка была выведена наружу. Селезенку экспонировали на стерильной марлевой прокладке и инъецировали под визуальным контролем суспензию клеток иглой 27-го калибра. После инокуляции клеток селезенку иссекали.

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

Оценка бремени опухоли при эвтаназии. После умерщвления печень извлекали и взвешивали.

Противоопухолевая активность, модель RENCA

График лечения - Начало первого дозирования считалось D0. На D0 не инокулированных мышей рандомизировали в соответствии с их индивидуальной массой тела в группы по 9 мышей с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, Кутернон, Франция). На D0, мыши получали носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм (2×10^8 в 200 мкл, PO). На D14 всем мышам инокулировали опухолевые клетки RENCA, инъецированные подкожно (SC) в вентральную поверхность нижней части бока, как описано ниже. Лечение анти-CTLA-4 (10 мг/кг, в/б) и анти-PDL1 (клон 10F.9G2, 10 мг/кг) начинали, когда объем опухолей достигал 50-70 мм³.

График лечения приведен в таблице ниже:

Группа	Количество животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	9	Необработанные	-	-	-
2	9	Носитель (среда)	-	PO	Q1Dx42
3	9	Бактериальный штамм (MRX518)	2×10^8 бактерий	PO	Q1Dx42
4	9	Паклитаксел	15 мг/кг	В/б	Q4D (каждые четыре дня)
5	9	Анти-CTLA4+Анти-PDL1	10 мг/кг+ 10 мг/кг	В/б	TWx2

Мониторинг животных проводили, как описано ниже.

Ортотопическую индукцию RENCA опухолевых клеток у животных путем инъекции подкожно (SC) - На D14, один миллион (1×10^6) RENCA опухолевых клеток в 50 мкл среды RPMI 1640 были пересажены с помощью инъекции SC в вентральной поверхности нижнего бедра мышей.

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

Оценка бремени опухоли при эвтаназии. Во время умерщвления опухоли собирали и оценивали их объем.

Мониторинг животных

Клинический мониторинг - длину и ширину опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля, а объем опухоли оценивали по следующей формуле []:

$$\text{Tumor volume} = \frac{\text{width}^2 \times \text{length}}{2}$$

Гуманные конечные точки []: признаки боли, страдания или дистресса: осанка боли, маска лица боли, поведение; опухоль более 10% от нормальной массы тела, но не превышающая 2000 мм³; опухоли, мешающие передвижению или питанию; изъязвленный опухоль или эрозия тканей; потеря массы тела 20%, сохраняющаяся в течение 3 дней подряд; плохое состояние тела, истощение, кахексия, обезвоживание; длительное отсутствие спонтанных реакций на внешние раздражители; учащенное дыхание, анемия, значительное кровотечение; неврологические признаки: кружение, судороги, паралич; устойчивое снижение температуры тела; вздутие живота.

Анестезия - газовая анестезия изофлураном использовалась для всех процедур: хирургического вмешательства или инокуляции, внутривенных инъекций, забора крови. Анестезия кетамин и ксилазином использовалась для хирургического вмешательства

при стереотаксии.

Обезболивание - Карпрофен или мультимодальный протокол анальгезии карпрофен/бупренорфин были адаптированы к серьезности хирургического вмешательства. Нефармакологическая помощь была предоставлена при проведении всех болезненных процедур. Кроме того, по рекомендации лечащего ветеринара оказывалась фармакологическая помощь, не мешающая исследованиям (поверхностное лечение).

Эвтаназия. Эвтаназию животных проводили путем передозировки газовой анестезией (изофлуран) с последующей цервикальной дислокацией или обескровливанием.

Результаты

Противоопухолевая активность, модель EMT6

Результаты показаны на Фиг. 1А. Лечение бактериальным штаммом по изобретению привело к явному снижению объема опухоли по сравнению с обоими отрицательными контролями. Положительный контроль также привел к уменьшению объема опухоли, как и следовало ожидать.

Чтобы дополнительно выяснить механизмы, посредством которых MRx0518 передает свои терапевтические эффекты в моделях сингенной опухоли, был проведен анализ *ex vivo* в исследованиях модели сингенной опухоли EMT6. В то время как объем опухоли является основным измерением в доклинических онкологических исследованиях, опухоли часто состоят из активно делящихся опухолевых клеток вместе с некротическим ядром. Чтобы исследовать, влияло ли лечение MRx0518 на степень некроза, обнаруженного в опухолях EMT6, парафиновые срезы в средних частях опухолей окрашивали гематоксилином и эозином. Лечение MRx0518 мышинной модели карциномы молочной железы EMT6 показало тенденцию к увеличению площади поперечного сечения некроза внутри опухоли (Фиг. 1В, верхняя панель). Чтобы исследовать, влияло ли лечение MRx0518 на делящиеся клетки в опухоли, парафиновые срезы в средних частях опухолей окрашивали пролиферативным белком Ki67 вместе со встречным окрашиванием DAPI, чтобы оценить процент клеток, делящихся в опухоли EMT6. Лечение MRx0518 мышинной модели карциномы молочной железы EMT6 значительно снижало процент делящихся клеток, наблюдаемых в опухоли (Фиг. 1В, нижняя панель, $P=0,019$).

Иммунные клеточные популяции

Дальнейшее исследование микроокружения опухоли проводилось с помощью проточной цитометрии опухоли, чтобы проверить гипотезу о том, что бактериальный штамм MRx518 обладает способностью регулировать иммунную систему, вызывая противоопухолевый эффект. Опухоли, вырезанные из разных групп лечения, разрезали на кусочки. Один кусок был подвергнут анализу проточной цитометрией. Для оценки относительного процента Т-лимфоцитов, присутствующих в опухолях, были использованы следующие маркеры: CD45, CD3, CD4, CD8, CD25 и FoxP3.

Данные проточной цитометрии показывают, что относительный процент лимфоцитов в опухолях несколько уменьшился в группах, обработанных как MRx0518,

так и анти-CTLA-4, по сравнению соответственно с носителем или контрольными животными (Фиг. 1C). Аналогично, относительный процент клеток CD4⁺, по-видимому, снижался у MRx0518 и животных, обработанных анти-CTLA-4, тогда как относительный процент клеток CD8⁺ следовал противоположной тенденции в обеих группах, хотя и с разной магнитудой. Относительный процент клеток CD4⁺FoxP3⁺ был ниже в группе, обработанной анти-CTLA-4, по сравнению с небольшим уменьшением у животных, обработанных MRx0518; однако снижение относительного процента клеток CD4⁺CD25⁺ было заметно только в группе, обработанной анти-CTLA-4. Соотношение CD8⁺/FoxP3⁺ показало большее увеличение в группе, обработанной анти-CTLA-4, чем у животных MRx0518. Эти данные, представленные в настоящем документе, подтверждают гипотезу о том, что анти-CTLA-4 антитело нацелено на регуляторные Т-клетки (Tregs) путем уменьшения их количества или ослабления их подавляющей активности в опухолевой ткани, в то же время предлагая другой способ действия для MRx0518.

Выработка цитокинов

Дополнительный фрагмент опухоли использовали для выделения общего белка и последующего анализа цитокинов вместе с образцами плазмы. Уровни белков IL-10, CXCL1, CXCL2, CXCL10, IL-1 β , IL-17A, GM-CSF, TNF- α , IL-12p70 и IFN- γ в микроокружении опухоли анализировали с помощью технологии MagPix. В то время как IL-17A и GM-CSF были ниже уровней обнаружения, все другие маркеры были экспрессированы на разумных уровнях (Фиг. 1D). Статически значимая разница наблюдалась между носителем и группой анти-CTLA-4 для IFN- γ . Выработка иммунных маркеров IL-10 и IL-12p70, по-видимому, снижалась после обработки MRx0518 по сравнению с контрольной обработкой.

Уровни цитокинов также оценивали в плазме крови тех же животных. Уровни белков IL-23, IL-6, IL-10, VEGF, CXCL1, CXCL2, CXCL10, IL-2, IL-1 β , IL-17A, GM-CSF, TNF- α , IL-12p70 и IFN- γ анализировали с помощью технологии MagPix. В целом, небольшое количество цитокинов было обнаружено в плазме крови животных либо до индукции опухоли, либо в конце исследования (Фиг. 1E). VEGF и CXCL10 были обнаружены на значительных уровнях, тогда как IL-23, IL-6, IL-10, CXCL1 и CXCL2 были обнаружены на низких уровнях. IL-2, IL-1 β , IL-17A, GM-CSF, TNF- α , IL-12p70 и IFN- γ не были обнаружены в образцах. MRx0518 значительно увеличивал выработку IL-6 в день 0. MRx0518 также, по-видимому, увеличивал выработку IL-23. VEGF и CXCL10 были значительно снижены в группе анти-CTLA-4 на 22-й день. Подобно результатам, показанным для популяций иммунных клеток, различия в выработке цитокинов в опухоли и плазме между MRx0518 и CTLA-4 позволяют предположить, что каждый из них действует по отдельному и потенциально комплементарному механизму.

Локализация CD8 α -положительных клеток в подвздошной кишке

Криосрезы подвздошной кишки толщиной 10 мкм разрезали в криостате (CM 1950 Leica), собирали на слайды из поли-L-лизина. Затем срезы сушили на воздухе в течение 1 ч, фиксировали в течение 10 мин в ледяном метаноле, промывали в PBS, блокировали в

10% BSA в PBS, pH 7,2, а затем инкубировали в течение ночи с первичным антителом (крысиное анти-мышинное-CD8 α антитело, Sigma-Aldrich, Millipore).

На следующее утро предметные стекла промывали в PBS и окрашивали вторичным антителом: козье анти-крысиное антитело-Alexa488 (Molecular Probe, Invitrogen) в течение 1 ч при комнатной температуре. После другой стадии промывки предметные стекла окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлоридом (DAPI) (Sigma-Aldrich, Millipore) и устанавливали в Vectashield (Vector Laboratories). Слайды просматривали и фотографировали с использованием микроскопа Zeiss Axioscope, оборудованного ртутной лампой, соответствующими фильтрами и апохроматическим объективом x20. Приведены примеры изображений, полученных из слайдов от носителя, MRx0518 и животных анти-CTL4 (Фиг. 1F - верхние панели: окрашивание DAPI, нижние панели: окрашивание CD8 α).

Поля зрения были исследованы у 20 животных и визуализированы с использованием времени воздействия вручную. Количество проанализированных животных и полей показано в следующей таблице:

Группа	Количество проанализированных полей	Количество мышей
Носитель	53	5
MRx0518	70	7
анти-CTL4	71	8

Изображения были оценены следующим образом: поля с ≤ 3 положительных клеток были оценены как 0, в то время как поля с более ≥ 3 клеток были оценены как 1. Результаты этого анализа показаны (Фиг. 1G).

Криосрезы подвздошной кишки, окрашенные анти-CD8 α , показали большее количество CD8 α -положительных клеток, локализованных в тканях области крипты, от животных, обработанных MRx0518 и анти-CTLA-4, по сравнению с группой носителя.

Это наблюдение согласуется с тем, что CD8 $^{+}$ Т-клетки присутствуют в кишечнике в случае инфекции или воспалительного микроокружения как часть иммунного ответа.

Противоопухолевая активность, модель LL/2 (LLC1)

Результаты показаны на Фиг. 2. Обработка бактериальным штаммом по изобретению привела к явному уменьшению объема опухоли по сравнению с обоими отрицательными контролями.

Противоопухолевая активность, модель Нера1-6

Результаты показаны на Фиг. 3А. Необработанный отрицательный контроль не выглядит так, как ожидалось, потому что вес печени был ниже в этой группе, чем в других группах. Однако отрицательная контрольная группа носителя и группа положительного контроля выглядят так, как и следовало ожидать, потому что у мышей, получавших только носитель, печени были больше, чем у мышей, получавших анти-CTLA4 антитела, что отражает большую опухолевую нагрузку в отрицательной контрольной группе носителя. Лечение бактериальным штаммом по изобретению приводило к явному

снижению веса печени (и, следовательно, опухолевой нагрузки) по сравнению с мышами в отрицательной контрольной группе носителя.

Противоопухолевая активность, модель RENCA

Результаты показаны на Фиг. 3В. Лечение монотерапией MRx0518 уменьшало объем опухоли с помощью теста/контроля на 51% (день 18) по сравнению с группами, получавшими носитель. Паклитаксел и анти-CTLA-4+анти-PDL-1 показали (почти) полное уменьшение размера опухоли на D18 и D22 по сравнению как с необработанными группами, так и с группами с носителем.

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

Пример 2 - генный анализ с помощью ПЦР

Чистая культура бактерий MRX518 была изучена в генном анализе с помощью ПЦР. Эксперимент имел две группы: 1) MRX518 совместно культивировали с клетками толстой кишки человека (CaCo2) для исследования воздействия бактерий на хозяина, и 2) MRX518 совместно культивировали на клетках CaCo2, которые были стимулированы IL1 для имитирования действия бактерий в воспалительной среде. Эффекты в обоих сценариях оценивались с помощью анализа экспрессии генов. Результаты показаны ниже:

Ген	Кратность изменения	Функция
CXCL3	28412,73	Лиганд CXCR2,
CXCL2	135,42	Лиганд CXCR2, 90% гомологии с CXCL1.
CXCL9	34,76	CXCR3-лиганд, в первую очередь считающийся хемоаттрактантом Th1-клеток (индуцируемый IFN-g)
IL8	31,81	Цитокин, хемоаттрактант (особенно нейтрофилов), многие рецепторы, включая CXCR1 и CXCR2/
CXCL1	16,48	CXCR2 лиганд, стимулирует пролиферацию клеток, а также миграцию, сверхэкспрессия является нейропротекторной при ЕАЕ.
CD40	14,33	Костимулирующая молекула, путь Т-клеточно-зависимой активации DC.
TNF	13,50	Основной провоспалительный цитокин
IL17C	12,18	Способствует антибактериальному ответу эпителия, синергическому с IL-22,
CXCL10	10,66	Близкая гомология с CXCL9, возможно также лиганд CXCR3?

HSPA1B	10,19	Белок теплового шока
NFKBIA	8,87	Передача сигналов NFkB; PI3K
JUN	7,61	Антибактериальный ответ; передача сигналов GPCR.
TNFAIP3	6,63	Передача сигналов TNF
DUSP1	6,36	Противовоспалительная фосфатаза, инактивирует MAPK
JUNB	5,36	Фактор транскрипции, передача сигналов JAK-STAT
BIRC3	4,86	Адгезивные контакты, контакты с высоким сродством
DUSP2	4,59	Противовоспалительный, инактивирует MAPK.
IL32	4,29	Провоспалительный цитокин, индуцированный IFN-g, IL-18
DUSP5	3,12	Противовоспалительный, инактивирует MAPK
FOS	3,03	Транскрипционные факторы, передача сигналов TLR, является частью AP-1
GADD45B	2,89	Рост и пролиферация клеток
CLDN4	2,61	Контакты с высоким сродством
ADM	2,57	Сигнализация NFkB
KLF10	2,49	Остановка клеточного роста, TGF-b.
DEFB4A	-2,34	Антимикробный пептид
APBA1	-2,53	Передача сигналов
IGFBP1	-2,72	Путь передачи сигналов
IL28B	-2,73	IFN-лямбда, противовирусная иммунная защита,
IL10	-3,38	Противовоспалительный цитокин
NR4A1	-5,57	Ядерный рецептор, противовоспалительный, регулятор пролиферации Т-клеток. Дифференцировка Т-хелперов
NOD2	-14,98	PRR, активатор воспаления, способствует аутофагии
INOS	-26,88	Провоспалительный, генератор оксида азота

Эти данные, по-видимому, показывают две сигнатурные экспрессии гена - лиганды CXCR1/2 (CXCL3, CXCL2, CXCL1, IL-8), которые связаны с миграцией провоспалительных клеток, и лиганды CXCR3 (CXCL9, CXCL10), что более конкретно указывает на ответы IFN-γ-типа, также поддерживаемые IL-32, который индуцируется IFN-γ.

Пример 3 - Тестирование стабильности

Композиция, описанная в настоящем документе, содержащий по меньшей мере один бактериальный штамм, описанный в настоящем документе, хранится в герметичном

контейнере при 25 °С или 4 °С и контейнер помещают в атмосфере, имеющей 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95% относительной влажности. Через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года, 2,5 года или 3 года должно сохраняться не менее 50%, 60%, 70%, 80% или 90% бактериального штамма, что измеряется в колониеобразующих единицах, определенных стандартными протоколами.

Пример 4 - Выработка цитокинов в незрелых дендритных клетках, индуцированная MRX518 по сравнению с MRX518+LPS

Реферат

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

Популяция моноцитов была выделена из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Клетки моноцитов были впоследствии дифференцированы в незрелые дендритные клетки. Незрелые дендритные клетки высевали при 200000 клеток/лунку и инкубировали с MRX518 в конечной концентрации 10^7 мкг/мл с необязательным добавлением LPS в конечной концентрации 100 нг/мл. Отрицательный контроль включал инкубацию клеток только со средой RPMI, а положительный контроль включал инкубацию клеток с LPS в конечной концентрации 100 нг/мл. Содержание цитокинов в клетках затем анализировали.

Результаты

Результаты этих экспериментов можно увидеть на Фиг. 4a-d. Добавление только MRX518 приводит к значительному 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-1β (Фиг. 4b). Комбинация MRX518 и LPS привела к синергетическому увеличению уровня вырабатываемого IL-1β (Фиг. 4d).

Вывод

MRX518 обладает способностью индуцировать более высокую выработку IL-6 и TNF-α цитокинов в незрелых дендритных клетках. Комбинация LPS и MRX518 может повышать уровни цитокинов IL-1β в незрелых дендритных клетках. Эти данные указывают на то, что MRX518 сам по себе или в комбинации с LPS может увеличить уровень воспалительных цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α, что способствует воспалению, которое может подавлять рак. Лечение с помощью MRX518 отдельно или в комбинации с может индуцировать цитокины, которые могут ограничивать рост опухоли.

Пример 5 - Выработка цитокинов в клетках THP-1, индуцированная MRX518 по сравнению с MRX518+LPS

Реферат

В этом исследовании проверялось влияние бактериального штамма MRX518 отдельно и в сочетании с LPS на выработку цитокинов в клетках THP-1, модельной клеточной линии для моноцитов и макрофагов.

Клетки THF-1 дифференцировали в среду M0 в течение 48 ч с 5 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA). Эти клетки затем инкубировали с MRX518 при конечной концентрации 10^8 /мл, с добавлением или без добавления LPS при конечной концентрации 100 нг/мл. Затем бактерии смывали и клетки инкубировали при 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. 5а-с. Добавление MRX518 без LPS приводит к увеличению уровней цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α по сравнению с контролями с отсутствием бактерий и осадка бактерий. Добавление LPS и MRX518 приводит к синергетическому увеличению продукции цитокинов.

Вывод

MRX518 обладает способностью индуцировать выработку цитокинов в клетках THP-1, которая может быть синергетически увеличена при добавлении LPS. Эти данные указывают на то, что MRX518 сам по себе или в комбинации с LPS может увеличить уровень воспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α , что способствует воспалению, которое может подавлять рак. Лечение с помощью MRX518 отдельно или в комбинации с может индуцировать цитокины, которые могут ограничивать рост опухоли.

Пример 6 - Противоопухолевая активность терапевтической комбинации MRX518 и ингибитора PD-1 или ингибитора CTLA-4

Реферат

В этом исследовании сравнивали противоопухолевую активность MRX518, ингибитора PD-1, ингибитора CTLA-4 и терапевтических комбинаций MRX518 с ингибитором PD-1 или ингибитором CTLA-4 у мышей с опухолевыми клетками EMT-6.

Материалы

Испытуемые и контрольные вещества - Бактериальный штамм № MRX518; Антитело к PD-1 (клон: RMP1-14, кат. № : BE0146, изотип: крысиный IgG2a, Bioxcell); Антитело к CTLA4 (кат. №: BE0131, Bioxcell; клон: 9H10; реактивность: мышь; изотип: IgG1 хомяка; условия хранения: + 4 °C).

Испытуемые и контрольные вещества носителей - MRX518 бактерии выращивали в бактериальной культуральной среде (экстракт дрожжей, Casitone, жирные кислоты среды (YCFA)) и хранили в виде раствора в глицерине при -80 °C. Животным вводили дозы бактерий в соответствии с протоколом исследования. Антитела к PD1 и к CTLA-4 разводили PBS (кат. №: BE14-516F, Lonza, Франция) на каждый день инъекции мышам.

Лечебные дозы - Бактерии: 2×10^8 в 200 мкл. Антитела к PD1-1 и к CTLA4 вводили в количестве 10 мг/кг массы тела в соответствии с самой последней массой тела мышей.

Способы введения. - Бактериальную композицию вводили пероральным зондом (per os, PO) через трубку в объеме 200 мкл/инъекция. Антитела к PD-1 и к CTLA-4 вводили в брюшную полость мышей (внутрибрюшинно, в/б) в объеме 10 мл/кг,

скорректированном на самую последнюю индивидуальную массу тела мышей.

Линии клеток рака и условия культивирования - Клеточная линия, которая была использована в данном исследовании, является клеточной линией EMT-6, которая была получена от ATCC (Американская коллекция типовых культур, Манассас, Вирджиния, США). Клеточная линия EMT-6 была получена из трансплантируемой карциномы молочной железы мыши, возникшей у мышей BALB/cCRGL после имплантации гиперпластического альвеолярного узелка молочной железы.

Опухолевые клетки культивировали в монослое при 37°C в увлажненной атмосфере (5% CO₂, 95% воздуха). Культуральная среда представляла собой RPMI 1640, содержащую 2 mM L-глутамин (кат. №: BE12- 702F, Lonza, Вервьерс, Бельгия), и дополненную 10% фетальной бычьей сывороткой (кат. №: 3302, Lonza). Опухолевые клетки EMT-6 адгерируются к пластиковым колбам. Для экспериментального использования опухолевые клетки отделяли от культуральной колбы путем 5-минутной обработки трипсином-версеном (кат. №: BE02-007E, Lonza), в среде Хэнкса без кальция или магния (кат. №: BE10-543F, Lonza) и нейтрализовали добавлением полной культуральной среды. Клетки подсчитывали и оценивали их жизнеспособность с помощью анализа исключения из трипанового синего 0,25%.

Использование животных- Сто тридцать (130) здоровых самок мышей Balb/C (BALB/cByJ) в возрасте 5-7 недель были получены от CHARLES RIVER (L'Arbresles) и содержались в состоянии здоровья SPF, в соответствии с руководящими принципами FELASA. Содержание животных и экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с французскими и европейскими правилами и Руководством CPN по уходу и использованию лабораторных животных. Животных содержали в клетках по 3-4 в помещениях для содержания животных в контролируемых условиях окружающей среды: температура: 22 ± 2 °C, влажность 55 ± 10%, фотопериод (12 ч света/12 ч темноты), НЕРА-фильтрованный воздух, 15 воздухообменов в час без рециркуляции. Вольеры для животных были обеспечены стерильным и достаточным пространством с подстилочным материалом, едой и водой, экологическим и социальным обогащением (групповое размещение), как описано: Верхний фильтр из поликарбоната Eurostandard типа III или IV, подстилка из кукурузного початка (кат. №: LAB COB 12, SERLAB, Франция), облученная диета 25 кГр (Ssniff® Soest, Германия), полноценный корм для иммунокомпетентных грызунов - экструдат R/M-H, стерильный, фильтрованный при 0,2 мкм воды и обогащение окружающей среды (SIZZLE-dri kraft - D20004 SERLAB, Франция). Животных индивидуально идентифицировали с помощью RFID транспондера, и в каждой клетке был присвоен определенный код. Лечение животных начинали после одной недели акклиматизации для партий 2 и 3 или после трех недель акклиматизации для партии 1.

Экспериментальный дизайн и лечения

В день -14 (D-14) 130 не инокулированных мышей рандомизировали в соответствии с их индивидуальной массой тела на 3 группы по 30 животных и 4 группы по 10 животных с использованием программного обеспечения Vivo Manager®

(Biosystemes, Кутернон, Франция). Мышей разделили на 3 партии по 10 животных на группу обработки (партия 1: 10 животных групп 1, 2 и 3; партия 2: 10 животных групп 1, 2 и 3 и партия 3: 10 животных групп 1-7) с различными точками завершения с начала исследования: D-14 или D0.

По окончании партия 3 была разделена на 2 когорты из-за графиков завершения и анализа FACS; острочка в 1 день: D24/D25. Таким образом, в каждой группе животных было 5 животных на группу обработки (4 животных из первой клетки и одно животное из клетки 2). Исходя из этических критериев, если объем опухоли был выше 1500 мм³, выбор животных для умерщвления на D24 и D25 основывался на объеме опухоли вместо клетки. Схема эксперимента изображена на Фиг. 7А и представлена ниже:

1) Партия 1 (группы 1, 2 и 3) начала обработку в D0 и была отсортирована на D14 (10 животных из групп 1-3). Они не получали опухолевых клеток и составляли группу базового уровня.

2) Партия 2 (группы 1, 2 и 3) начала лечение на D-14 и была отсортирована на D7 (10 животных из групп 1-3).

3) Партия 3 (группы с 1 по 7) начала лечение на D-14 и была отсортирована на D/24/25 (10 животных из групп 1-7). Лечение анти-PD-1 и анти-CTLA-4 начиналось на D10.

В день 0 (D0) всем мышам партий 2 и 3 (окончание на день 7 и 24/25 соответственно) инокулировали опухолевые клетки ЕМТ-6 путем подкожной инъекции 1×10^6 клеток ЕМТ-6 в 200 мкл RPMI 1640 в правый бок (30 мышей из партии 1, которых умерщвляли на D14, не получали инъекцию опухоли). Мышей лечили в соответствии со следующими группами схем лечения (TWx2=два раза в неделю):

Группа	Количество животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	30 = 10 партия 1 10 партия 2 10 партия 3	Без лечения (+ Опухоль)	-	-	-
2	30 = 10 партия 1 10 партия 2 10 партия 3	Носитель (YCFA)	-	PO	Ежедневно -14 до D0 Ежедневно -14 до D7 Ежедневно -14 до D24/25
3	30 = 10 партия 1 10 партия 2 10 партия 3	MRX518 (выращен из глицеринового стока) в YCFA	2×10^8	PO	Ежедневно -14 до D0 Ежедневно -14 до D7 Ежедневно -14 до D24/25

4	10 партия 3	Анти-PD-1 + YCFA	10 мг/кг	В/б+РО	TWx2 от D10 YCFA Ежедневно от -14 до D24/25
5	10 партия 3	Анти-PD-1+MRX518	10 мг/кг+ 2×10^8 бактерий	В/б+РО	TWx2 от D10 Бактерии ежедневно от -14 до D24/25
6	10 партия 3	Анти-CTLA-4 + YCFA	10 мг/кг	В/б+РО	TWx2 от D10 YCFA Ежедневно от -14 до D24/25
7	10 партия 3	Анти-CTLA-4+MRX518	10 мг/кг+ 2×10^8 бактерий	В/б+РО	TWx2 от D10 Бактерии ежедневно от -14 до D24/25

Следующие образцы собирали на протяжении всего эксперимента:

1. Фекалии (только для партии 3) - в трех временных точках во время исследования (D-15, D-1 и D22) образцы фекалий отбирали у восьми идентичных мышей на группу (эквивалент 80-100 мг или 6-7 фекальных гранул на мыш, но не менее 3 фекальных гранул), быстро замораживали и хранили при -80 °C.

2. Кровь - Во время умерщвления мышей (D14 для партии 1, D7 для партии 2 и D25 для партии 3) приблизительно 1 мл внутрисердечной крови собирали от каждого животного в пробирку с ЭДТА в терминальных процедурах под глубокой газовой анестезией. Кровь центрифугировали для получения плазмы, и плазму хранили при -80 °C.

3. Опухоль и селезенка - Опухоль (на D и D24/D25) и селезенку (на D7, D14 и D24/D25) собирали у от всех мышей. Клетки иммунного инфильтрата опухоли в образцах опухоли определяли количественно с помощью анализа FACS, как описано ниже.

4. Мезентериальные лимфатические узлы - На D7, D14 и D24/D25 брыжеечные лимфатические узлы всех животных в группах и в определенный момент времени собирали и быстро замораживали при -80 °C.

5. Кишечник - После эвтаназии (D7, D14 и D24/D25) несколько срезов кишечника у всех мышей в каждой группе и в каждый момент времени собирали и анализировали. Содержимое слепой кишки также собирали.

Анализ FACS

Для анализа опухолевых клеток опухоли всех мышей по группам и по времени были собраны во время умерщвления (на D7 и D24/25). Все опухоли собирали в культуральной среде HBSS. Клетки иммунного инфильтрата опухоли определяли количественно с помощью анализа FACS от каждого собранного образца. Вкратце,

собранные образцы обрабатывали механической диссоциацией и готовили в 100 мкл буфера окрашивания (PBS, 0,2% BSA, 0,02% NaN₃). Затем добавляли антитела, к выбранным маркерам, в соответствии с процедурой, описанной поставщиком для каждого антитела. Все антитела, за исключением FoxP3, предназначались для поверхностного мечения, а FoxP3 - для внутриклеточного мечения. Антитела, используемые для анализа FACS, перечислены в таблицах ниже:

Панель 1: панель жизнеспособности Т-клеток, CD45, CD3, CD4, CD8, CD25, FOXP3, PD1, B220

Ссылка	Специфичность и флуорохром		Изотип и специфичность		Поставщик
553052	CD4	PerCP	Мышь	IgG2ak	BD biosciences
553933	IgG2a	PerCP	-	IgG2ak	BD biosciences
562600	CD3	BV421	Мышь	IgG1k	BD biosciences
562601	IgG1	BV421	-	IgG1k	BD biosciences
130-110-665	CD45	Viogreen	Мышь	REA737	Miltenyi Biotec
130-104-624	REA CTL универсальный	VioGreen	-	REA293	Miltenyi Biotec
563061	CD25	BV605	Мышь	IgG1, λ	BD biosciences
562987	IgG1	BV605	-	IgG1λ	BD biosciences
130-111-601	FoxP3**	APC	Мышь	REA	Miltenyi Biotec
130-104-615	REA Control (I) **	APC	-	REA/hIgG1	Miltenyi Biotec
564997	Исправляемое пятно жизнеспособности 700	eq AF700	-	-	BD biosciences
130-109-250	CD8a	APC-Vio770	Мышь	REA	Miltenyi Biotec

130-104-634	REA	APC-Vio770	-	REA	Miltenyi Biotec
130-111-800	CD279 (= PD1)	PE	Мышь	REA802	Miltenyi Biotec
130-104-628	REA CTL универсальный	PE	-	REA293	Miltenyi Biotec
130-110-845	CD45R (B220)	FITC	Мышь	REA755	Miltenyi Biotec
130-104-626	REA CTL универсальный	FITC	-	REA293	Miltenyi Biotec

Панель 2 ассоциированные с опухолью макрофаги (ТАМ): жизнеспособность, CD45, CD3, CD11b, Ly6C, F4/80, CD68, CD80, CD206, МНСII

Ссылка	Специфичность и флуорохром		Изотип и специфичность		Поставщик
141704	CD206	FITC	Мышь	IgG2a	BioLegend
553929	IgG2a	FITC	-	IgG2ak	BD biosciences
130-116-396	CD80	PE	Мышь	REA	Miltenyi Biotec
130-104-628	REA CTL универсальный	PE	-	REA/hIgG1	Miltenyi Biotec
130-109-289	CD11b	PerCP-Vio700	мышь-человек	REA	Miltenyi Biotec
130-104-620	REA Control (S)	PerCP Vio700	-	REA	Miltenyi Biotec
130-116-530	CD3	PE-Vio770	Мышь	REA/hIgG1	Miltenyi Biotec
130-104-632	REA CTL универсальный	PE-Vio770	-	REA/hIgG1	Miltenyi Biotec
130-112-861	CD68*	Viobblue	Мышь	REA	Miltenyi Biotec
130-104-625	REA CTL универсальный *	VioBlue	-	REA/hIgG1	Miltenyi Biotec
130-102-	CD45	Viogreen	Мышь	IgG2b	Miltenyi

412					Biotec
130-102-659	IgG2b	VioGreen	-	IgG2b	Miltenyi Biotec
565694	Фиксируемое окрашивание на жизнеспособность 575V	eq BV605	-	-	BD biosciences
130-102-379	F4/80/EMR1	APC	Мышь	REA	Miltenyi Biotec
130-104-630	REA CTL универсальный	APC	-	REA	Miltenyi Biotec
130-112-233	МНСII	APC vio770	Мышь	REA/hIgG1	Miltenyi Biotec
130-104-634	REA CTL универсальный	APC-Vio770	-	REA/hIgG1	Miltenyi Biotec

Смесь инкубировали в течение 20-30 мин при комнатной температуре в темноте, промывали и ресуспендировали в 200 мкл окрашивающего буфера. Все образцы хранили на льду и защищали от света до анализа FACS. Образцы опухоли также обрабатывали контрольными антителами изотипа. Окрашенные клетки анализировали с помощью CyFlow[®] проточного цитометра (LSR II, BD Biosciences), оснащенной 3 лазерами возбуждения на длинах волн 405, 488 и 633 нм.

Для анализа образцов кишечника, тонкую кишку и толстую кишку всех мышей из групп и в определенные сроки собирали после умерщвления (на D7, D14 и D24/25). Все свежие ткани собирали в культуральной среде HBSS. Иммунные клетки в собственной пластинке слизистой оболочки определяли количественно с помощью FACS-анализа от каждой собранной пробы. Образцы были обработаны как образцы опухоли. Антитела, использованные для анализа FACS, представлены на панели 1, перечисленной выше, и эти антитела, перечисленные в таблице ниже (последующая инкубация образцов и анализ были такими же, как описано выше):

Панель 3: DC кишечника: жизнеспособность, CD45, CD3, CD11b, CD11c, МНС II, CD103

Ссылка	Специфичность и флуорохром		Изотип и специфичность		Поставщик
			мышь-человек	REA	
130-109-289	CD11b	PerCP-Vio700		REA	Miltenyi Biotec
130-104-620	REA Control (S)	PerCP Vio700	-	REA	Miltenyi Biotec

130-116-530	CD3	PE-Vio770	Мышь	REA/hIgG 1	Miltenyi Biotec
130-104-632	REA CTL универсальный	PE-Vio770	-	REA/hIgG 1	Miltenyi Biotec
560583	CD11c	AlexaFluor 700	Мышь	IgG1	BD bioscience
560555	IgG1	AlexaFluor 700	-	IgG2	BD bioscience
130-102-412	CD45	Viogreen	Мышь	IgG2b	Miltenyi Biotec
130-102-659	IgG2b	VioGreen	-	IgG2b	Miltenyi Biotec
565694	Фиксируемое окрашивание на жизнеспособност ь 575V	eq BV605	-	-	BD biosciences
130-108-184	CD103	APC	Мышь	REA	Miltenyi Biotec
130-104-630	REA CTL универсальный	APC	-	REA/hIgG 1	Miltenyi Biotec
130-112-233	МНСII	APC vio770	Мышь	REA/hIgG 1	Miltenyi Biotec
130-104-634	REA CTL универсальный	APC-Vio770	-	REA/hIgG 1	Miltenyi Biotec
130-102-327	F4/80/EMR1	FITC	Мышь	REA126	Miltenyi Biotec
130-104-626	REA CTL универсальный	FITC	-	REA293	Miltenyi Biotec

Для анализа образцов селезенки, селезенку всех мышей из групп и в определенные сроки собирали после умерщвления (на D7, D14 и D24/25). Все селезенки собирали в полной культуральной среде RPMI (10% dFBS, пенициллин/стрептомицин 1%, 2 mM L-глутамин и 55 мкМ 2-меркаптоэтанол). Клетки иммунного инфильтрата опухоли определяли количественно с помощью анализа FACS из каждого собранного образца после стимуляции в течение 72 часов CD3 и CD28. Процедура: Спленциты культивировали с помощью одной из двух стимуляций (CD3/CD28, убитый нагреванием MRx0518) и одного отрицательного контроля. Соотношение было 1:1 между убитым нагреванием MRx0518 и спленцитами на лунку. В 20 мкл убитого нагреванием образца MRx0518 содержалось 1×10^6 бактериальных клеток. Антитела к маркерам на панели 1 выше, добавляли к клеточным осадкам после каждой обработки в соответствии с процедурой, описанной поставщиком для каждого антитела. Последующую инкубацию

образцов и анализ проводили, как описано выше.

Мониторинг животных

Жизнеспособность и поведение животных регистрировали каждый день. Вес тела измеряли два раза в неделю. Длину и ширину опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля, а объем опухоли оценивали по следующей формуле:

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

Эффективность лечения оценивали с точки зрения влияния исследуемого вещества на объемы опухолей у обработанных животных по сравнению с контрольными животными. Следующие критерии оценки противоопухолевой эффективности были определены с использованием Vivo Manager® программного обеспечения (Biosystemes, Кутернон, Франция):

1. Индивидуальные и/или средние (или средние) объемы опухоли. Средние объемы опухолей в группах от 1 до 7 изображены на Фиг. 7В.

2. Время удвоения размера опухоли (DT).

3. Ингибирование роста опухоли (T/C%) определяется как *отношение* средних объемов опухолей в обработанной к контрольной группе, и вычисляется следующим образом (D_x=день измерения):

$$T/C\% = \frac{\text{Среднее значение опухоли в обработанной группе на } D_x}{\text{Средний объем опухоли в группе, получавшей носитель, на } D_x} \times 100$$

Оптимальное значение является минимальным T/C% *отношением* и отражает максимальное достигнутое ингибирование роста опухоли. Эффективным критерием отношения T/C% , в соответствии со стандартами NCI, является ≤42%.

4. Кривые относительного объема опухоли (RTV) в тестируемой и контрольной группах, где RTV рассчитывали следующим образом (D_x=день измерения; D_R= день рандомизации):

$$RTV = \frac{TV \text{ на } D_x}{TV \text{ на } D_R}$$

5. Объем V и время достижения V рассчитывали. Объем V определяется как целевой объем, выведенный из экспериментальных данных и выбранный в экспоненциальной фазе роста опухоли. Для каждой опухоли при измерении объема опухоли выбирается ближайший объем опухоли к целевому объему V. Значение этого объема V и время для достижения опухоли этого объема записывали. Для каждой группы рассчитывают среднее значение объемов опухоли V и среднее время достижения этого объема.

Пример 7 - Оценка пролиферации CD8

Для того, чтобы исследовать иммуностимулирующие эффекты MRX518 и пембролизумаба, была проведена *in vitro* оценка влияния на пролиферацию клеток CD8⁺ в комбинации MRX518 и анти PD-1 ингибитора контрольной точки.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC, криоконсервированные от

Stemcell Technologies, кат. №: 70025) были удалены из жидкого азота и оставлены на ночь в колбе. 96 луночный планшет был покрыт антителом CD3 (ThermoFisher CD3 моноклональное антитело (ОКТ3), 0,3 мкг/мл) в качестве одной половины митогенной комбинации. После периода покоя РВМС подсчитывали и окрашивали флуоресцентным индикатором клеток (набор для пролиферации CellTrace™ Far Red Cell).

Десять наборов клеток были подготовлены таким образом. К девяти из этих наборов было добавлено антитело к PD-1 (чистое функциональное качество Miltenyi Biotec CD279 (PD1), 10 мкг/мл). Ни одно антитело к PD-1 не было добавлено к дополнительному набору, который служил в качестве контрольного набора (обозначенного как набор клеток 1 в таблице ниже). Все наборы клеток затем инкубировали в течение 1,5 ч.

После инкубационного периода бактериальные тестовые компоненты были добавлены в наборы клеток с 3 по 10, как показано в следующей таблице:

Клеточный набор	Бактериальный компонент	Сокращение, представленное на Фиг. 6
1	Нет, анти-PD-1 свободный контроль	CD3/CD28
2	Нет, анти-PD-1 контроль	анти-PD1 10 мкг/мл (MY)
3	Убитые нагреванием MRX518 в соотношении 1:1*	HK MRx0518 WT 1:1
4	Убитые нагреванием MRX518 в соотношении 10:1*	HK MRx0518 WT 10:1
5	Убитые нагреванием MRX518 с нокаутом флагеллина** в соотношении 1:1*	HK MRx0518 KO 1:1
6	Убитые нагреванием MRX518 с нокаутом флагеллина** в соотношении 10:1*	HK MRx0518 KO 10:1
7	Супернатант MRX518 в соотношении 1:1***	HK MRx0518 WT SN 1:1
8	Супернатант MRX518 в соотношении 10:1***	HK MRx0518 WT SN 10:1
9	MRX518 супернатант с нокаутом флагеллина** в соотношении 1:1***	HK MRx0518 KO SN 1:1
10	MRX518 супернатант с нокаутом флагеллина** в соотношении 10:1***	HK MRx0518 KO SN 10:1

* Соотношение клеток MRX518: клетки РВМС

** Был протестирован мутант MRX518, спроектированный так, чтобы иметь

нарушенную флагеллярную сборку. Авторы изобретения понимают, что флагеллин способствует иммуностимулирующему эффекту MRX518.

*** Для множественности инфекции 1:1 (MOI) супернатант отбирали из того же количества бактерий, что и количество PBMC, обработанных супернатантом. Для MOI 10:1 супернатант отбирали из высококонцентрированной бактериальной культуры, но точное количество бактерий по отношению к PBMC не измерялось.

После добавления тестовых бактериальных компонентов, CD28 антитело (ThermoFisher CD28 моноклональное антитело (CD28.2), 1 мкг/мл) добавляли в каждый клеточный набор, как другую половину митогенной комбинации, для вызывания пролиферации. Затем в каждый набор клеток добавляли PDL-1 (R & D Systems, рекомбинантная человеческая PD-L1/B7-H1 Fc химера, 10 мкг/мл).

Наборы клеток затем инкубировали в течение 5 дней (37 °C, 5% CO₂). После инкубации клетки собирали и анализировали с помощью FACS в соответствии с клеточной флуоресценцией, передаваемой клеточным трассером, что указывает на количество делений клеток, которые произошли в инкубационный период. Результаты, показывающие процент клеток, сгруппированных по количеству делений (от отсутствия деления клеток (NCD) до 4 делений клеток (4RCD)), показаны на Фиг. 6.

Последовательности

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

```

1 taatacatgc aagtcgaacg cttttcttt caccggagct tgctccaccg aaagaaaaag
61 agtggcgaac gggtagtaac cacgtgggta acctgcccac cagaagggga taacacttgg
121 aaacaggtgc taataccgta taacactatt ttccgcatgg aagaaagttg aaaggcgctt
181 ttgcgtcact gatggatgga cccgcgggtc attagctagt tggtaggta acggctcacc
241 aaggccacga tgcatacccg acctgagagg gtgatcgccc aactgggac tgagacacgg
301 cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttcggc aatggacgaa agtctgaccg
361 agcaacccg cgtgagtga gaaggtttc ggatcgtaaa actctgttgt tagagaagaa
421 caaggatgag agtagaacgt tcattccctg acggtatcta accagaaagc caccgctaac
481 tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgccggatt tattgggcgt
541 aaagcgagcg caggcggttt cttaaagtct atgtgaaagc ccccggtca accggggagg
601 gtcattggaa actgggagac ttgagtgcag aagaggagag tggaattcca tgtgtagcgg
661 tgaatgcgt agatatatgg aggaacacca gtggcgaagg cggctctctg gtctgtaact
721 gacgtgagg ctgaaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc
781 gtaaaccgat agtgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtctgca gcaaaccgat
841 taagcactcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc
901 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccagtc
961 ttgacatcct ttgaccactc tagagataga gcttcccctt cgggggcaaa gtgacagggt
1021 gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgtgggt taagcccgc aacgagcgca
1081 acccttattg ttagttgcca tcatttagtt gggcactcta gcgagactgc cggtgacaaa
1141 ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccctt tatgacctgg gctacacacg
1201 tgctacaatg ggaagtacaa cgagttgcga agtcgcgagg ctaagctaact ctcttaaagc

```

1261 ttctctcagt tcgattgta ggctgcaact cgcctacatg aagccggaat cgctagtaat
 1321 cgcggatcag cagcgcggg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac
 1381 cagcagagtt tgtaacaccc gaagtcgggt aggtaacctt ttggagcca gccgcctaag
 1441 gtgggataga tgattgggtg gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag gtgcggctgg
 1501 atcacc

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

TGCTATACATGCAGTCGAACGCTTTTTCTTTACCCGGAGCTTGCTCCACCGAA
 AGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGG
 GGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACACTATTTTCCGCATGGAAG
 AAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCCTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGT
 TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTT
 TTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAGAACGTTCA
 TCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
 GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA
 CTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTAC
 GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
 CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAAC
 GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGG
 GCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTA
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCT
 AGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
 CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAA
 GTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA
 CTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAA
 TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCG
 AAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTG

ССЫЛКИ

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.
11. Strickertsson et al. (2014) *Genes.* 5(3): 726-738.
12. Collins et al. (1984) *Int J Syst Evol Microbiol.* 34: 220-223.
13. Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
14. Srůtková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
15. Haabeth et al. (2012) *OncoImmunology* 1(1):1146-1152.
16. Lejeune et al. (2006) *Cancer Immun.* 6:6
17. Pace et al. (1983) *PNAS.* 80:8782-6.
18. Sgadari et al. (1996) *PNAS.* 93:13791-6.
19. Sgadari et al. (1997) *Blood.* 89:2635-43.
20. Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
21. Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
22. Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
23. Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
24. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
25. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
26. US 2016/0067188
27. *Handbook of Microbiological Media*, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
28. Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
29. Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
30. *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
31. *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
32. *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
33. Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
34. Rockwell et al., (1972) *J Natl Cancer Inst.* 49:735-49.
35. Bertram and Janik (1980) *Cancer Lett.* 11:63-73.
36. Darlington (1987) *Meth Enzymol.* 151:19-38.
37. Principe d'éthique de l'expérimentation animale, Directive n°2010/63 CEE 22nd September 2010, Décret n°2013-118 1st February 2013.
38. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition.* The National

Academies Press; 2011

39. Simpson-Herren and Lloyd (1970) *Cancer Chemother Rep.* 54:143-74.
40. Workman et al. (2010) *Br. J. Cancer.* 102:1555-77.
54. WO 2017/085520

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическая комбинация для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, причем указанная терапевтическая комбинация содержит:

- (a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*;
- и
- (b) пембролизумаб.

2. Терапевтическая комбинация по п. 1, отличающаяся тем, что указанная композиция не содержит бактерий любых других видов или содержит только минимальные или биологически нерелевантные количества бактерий других видов.

3. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что терапевтическая комбинация предназначена для применения в способе лечения или профилактики рака легких, рака молочной железы, рака почек, рака печени, лимфомы, гепатомы, нейроэндокринного рака или рака толстой кишки.

4. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что терапевтическая комбинация предназначена для применения в способе уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли, предотвращения метастазирования или предотвращения ангиогенеза.

5. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, представленную SEQ ID NO: 2.

6. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция предназначена для перорального введения и/или, отличающаяся тем, что пембролизумаб предназначен для внутривенного введения.

7. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ или носителей.

8. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что бактериальный штамм лиофилизирован.

9. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что бактериальный штамм способен частично или полностью колонизировать кишечник.

10. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит один штамм *Enterococcus gallinarum*.

11. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что композиция содержит бактериальный штамм *Enterococcus gallinarum* в составе микробного консорциума.

12. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит штамм *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером доступа NCIMB 42488.

13. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов,

отличающаяся тем, что композиция содержится в пищевом продукте или в композиции вакцины.

14. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композицию вводят субъекту до первого введения пембролизумаба субъекту.

15. Терапевтическая комбинация по п.14, отличающаяся тем, что композицию вводят субъекту по меньшей мере за одну, две, три или четыре недели до первого введения пембролизумаба.

16. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композицию вводят субъекту перед первым введением пембролизумаба и/или, по меньшей мере, частично параллельно введению пембролизумаба указанному субъекту.

17. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* и пембролизумаб находятся в отдельных композициях.

18. Терапевтическая комбинация по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что субъект не отвечал на предшествующее лечение с использованием только пембролизумаба.

19. Первая композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* для применения в комбинации со второй композицией, содержащей пембролизумаб для применения в способе лечения или профилактики рака, при этом необязательно указанную первую композицию вводят до первого введения указанной второй композиции и/или параллельно с введением второй композиции.

20. Первая композиция, содержащая пембролизумаб для использования в комбинации со второй композицией, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* для применения в способе лечения или профилактики рака, при этом необязательно указанную первую композицию вводят параллельно с введением второй композиции.

21. Композиция, содержащая пембролизумаб, для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, который ранее получал введение композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, предпочтительно штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 42488.

22. Композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, предпочтительно штамм депонированный под номером доступа NCIMB 42488, для применения в способе лечения или профилактики рака у субъекта, диагностированного как требующего лечения пембролизумабом.

23. Способ лечения или профилактики рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

(а) введение субъекту композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*; и

(b) введение субъекту пембролизумаба.

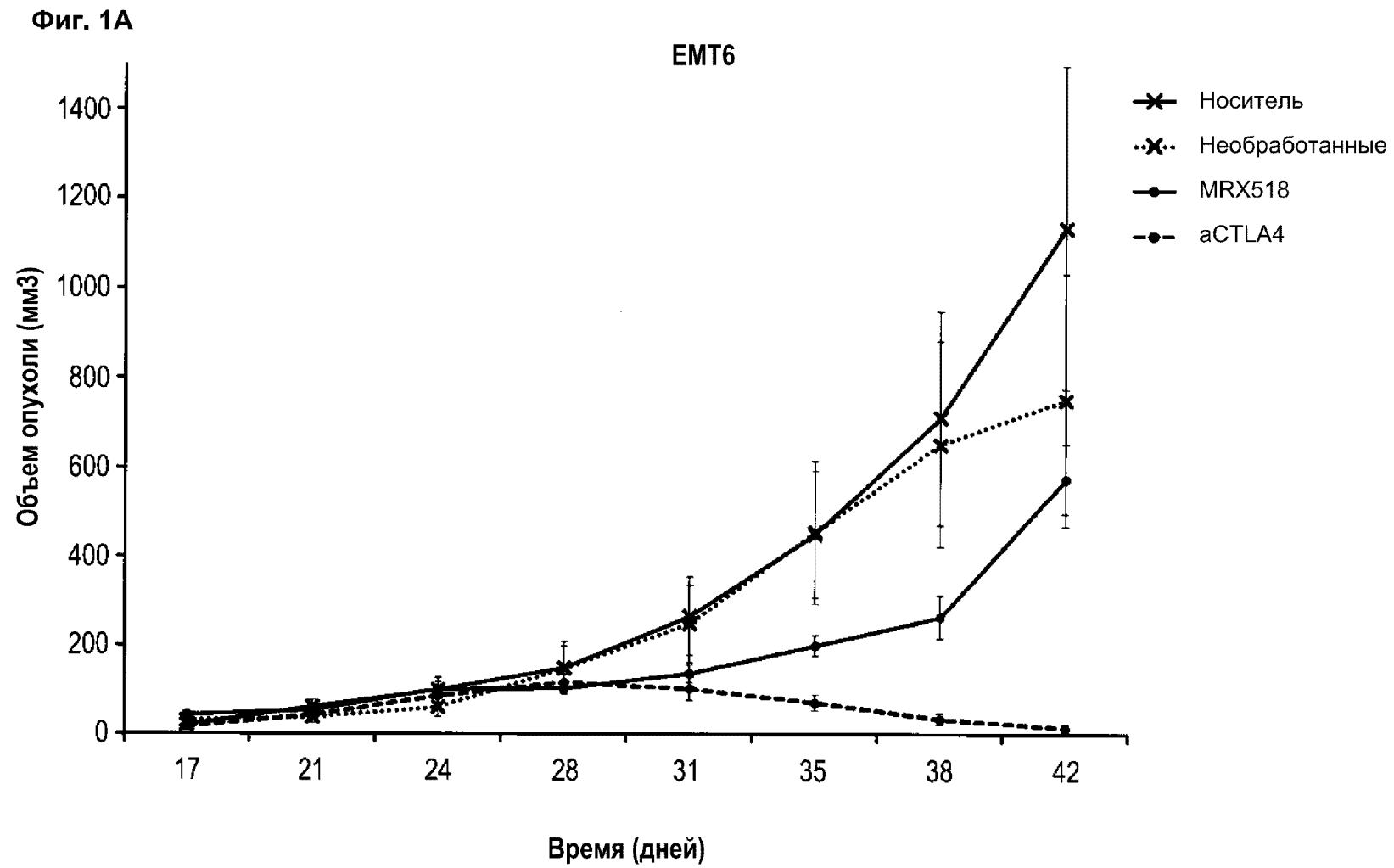
24. Набор, содержащий:

(a) композицию, содержащую бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*;

и

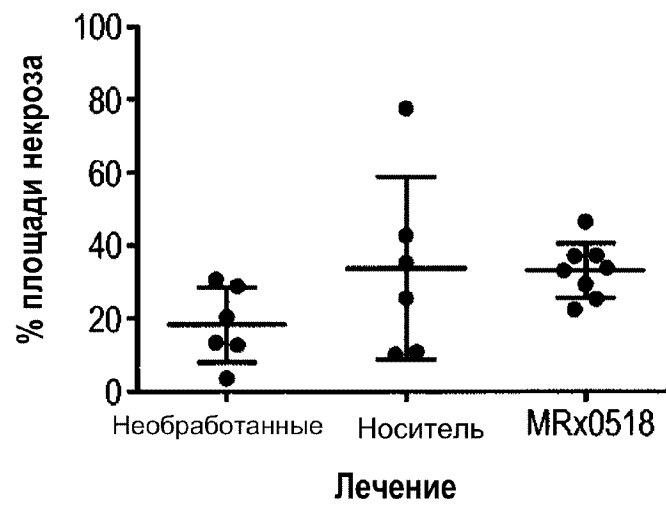
(b) композицию, содержащую пембролизумаб.

По доверенности

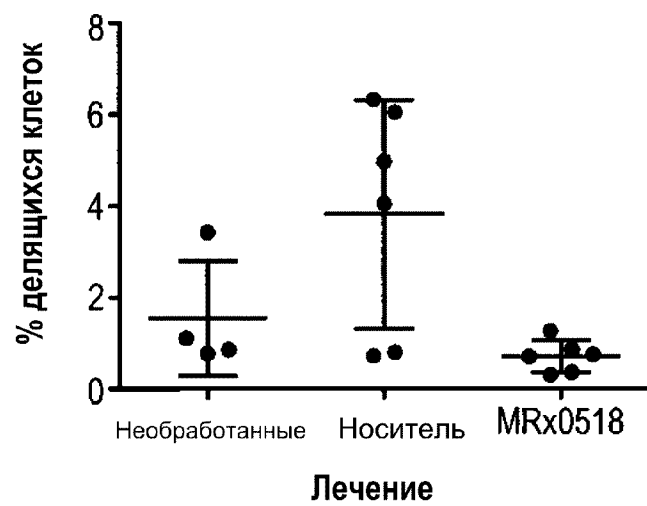


Фиг. 1В

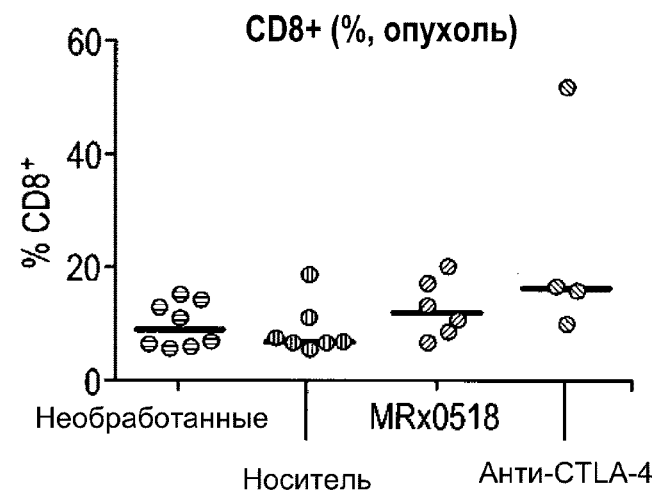
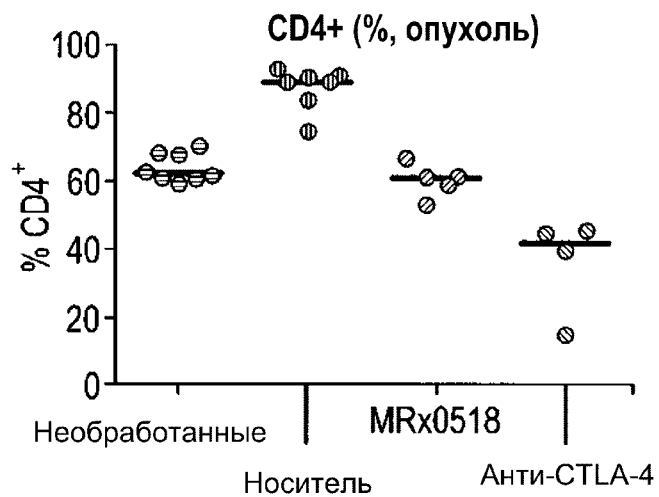
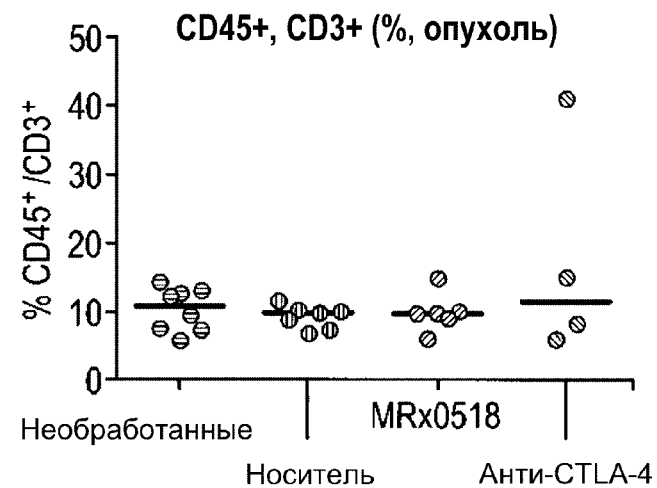
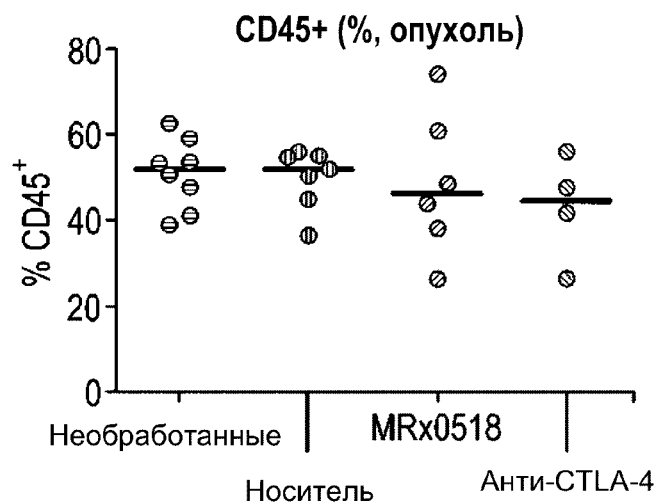
% площади некроза опухолей EMT6



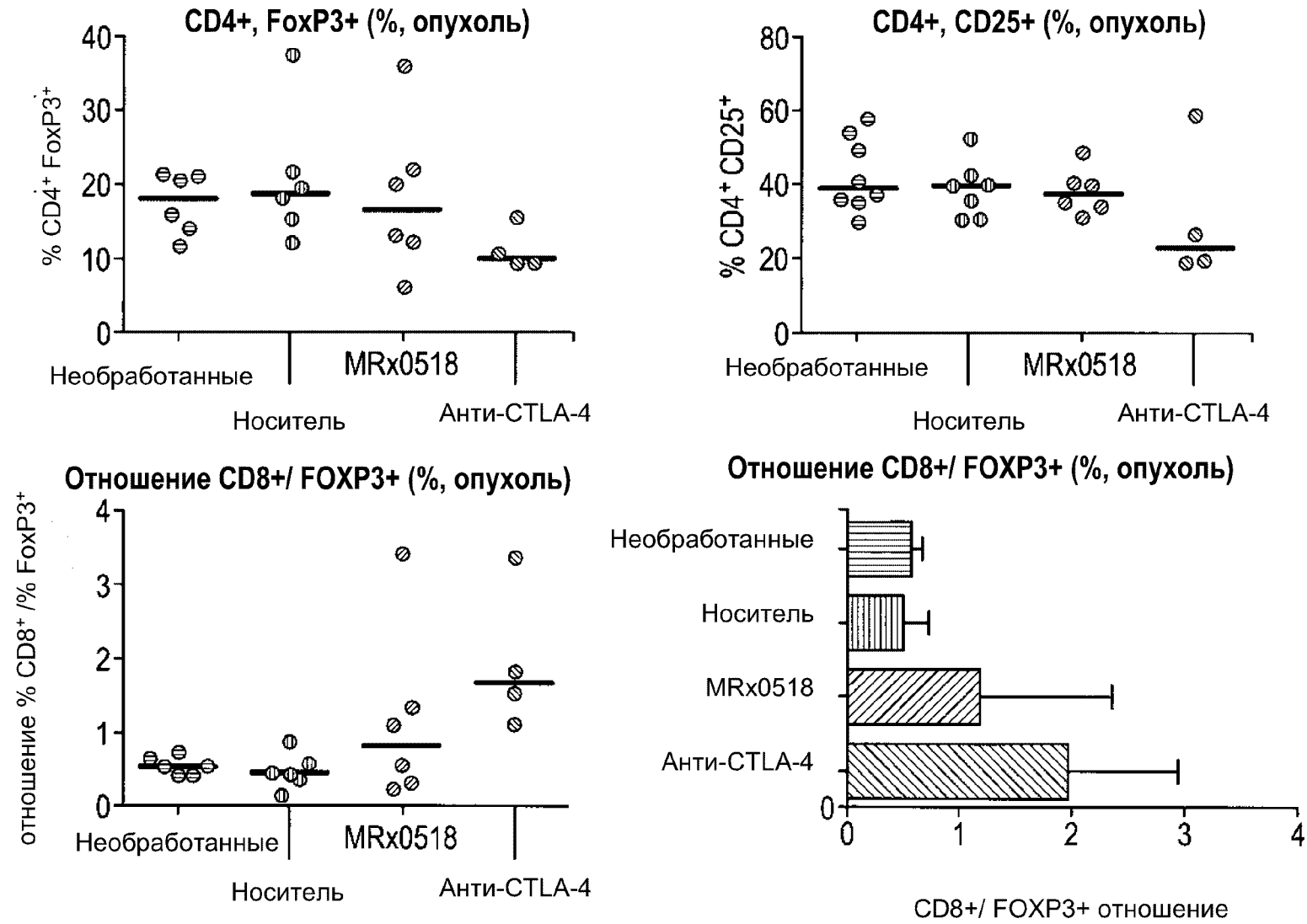
% делящихся клеток опухолей EMT6



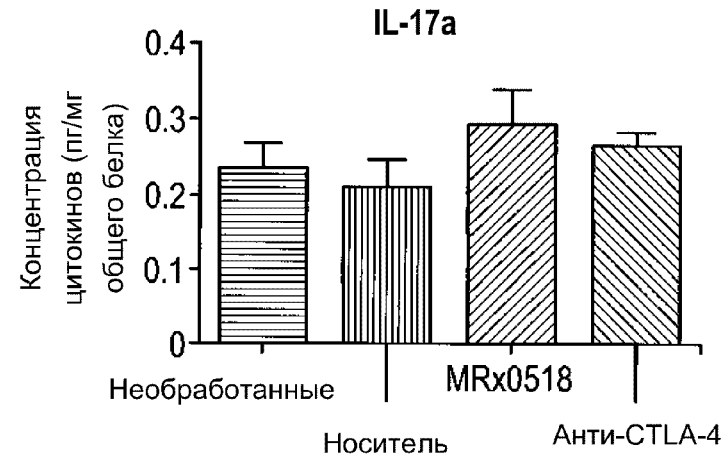
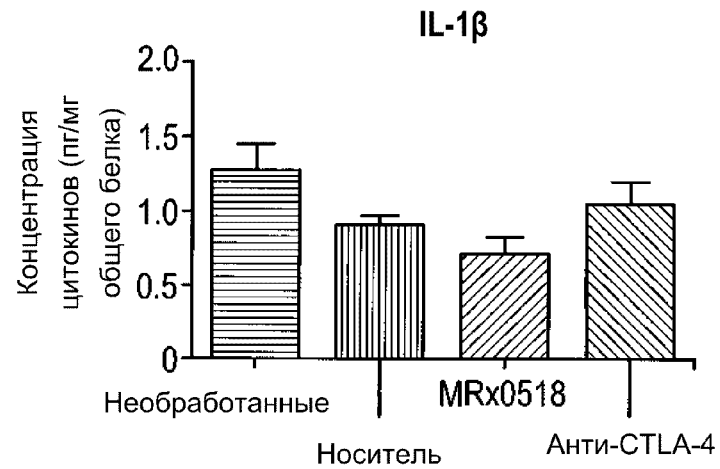
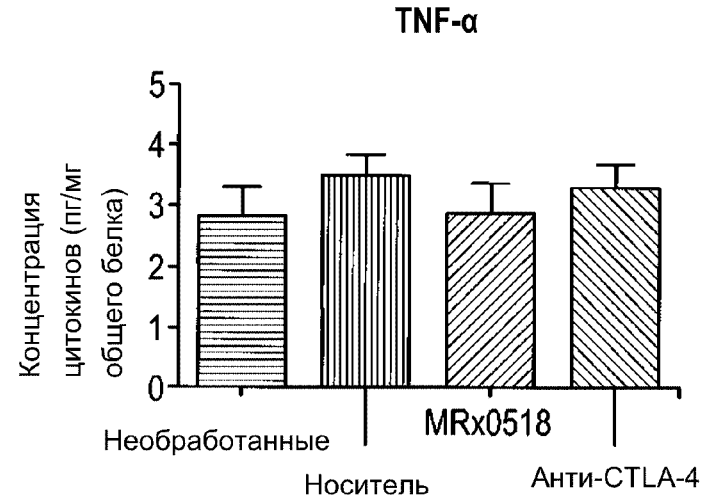
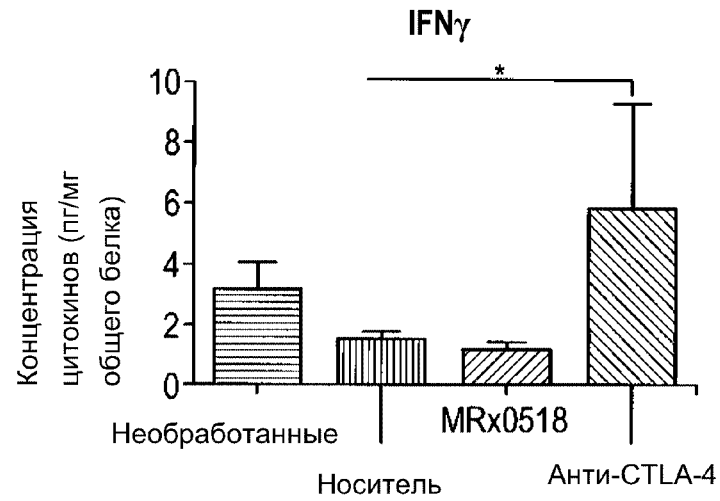
Фиг. 1С



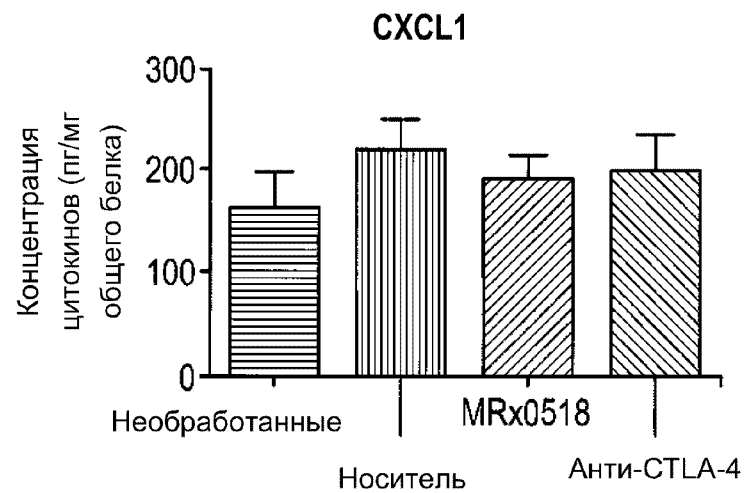
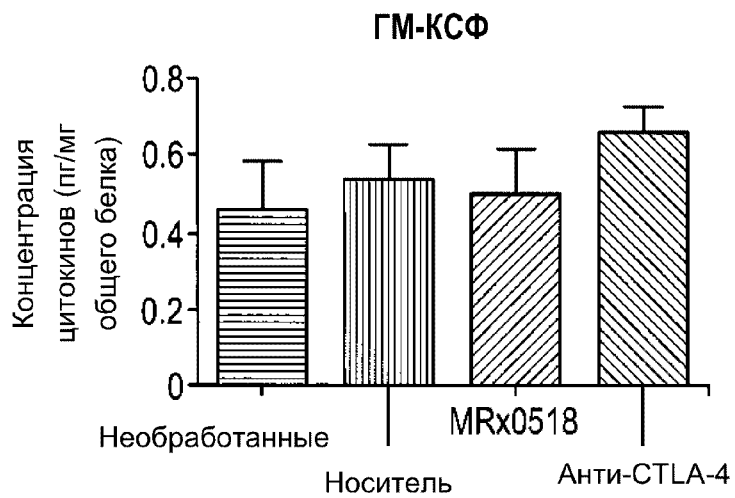
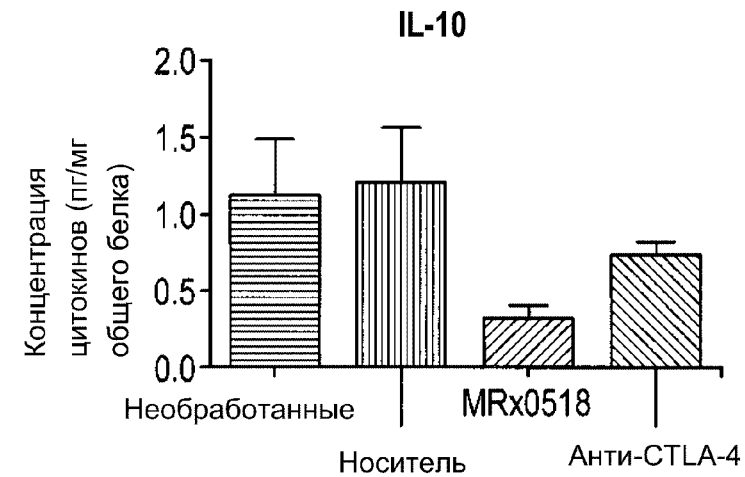
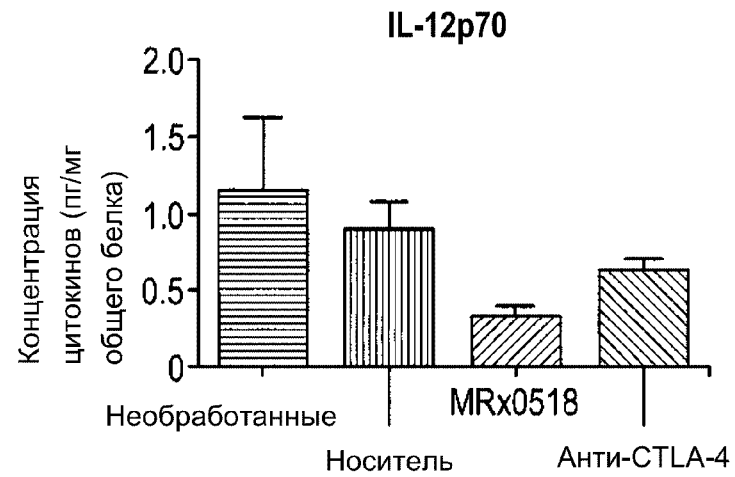
Фиг. 1C(продолж.)



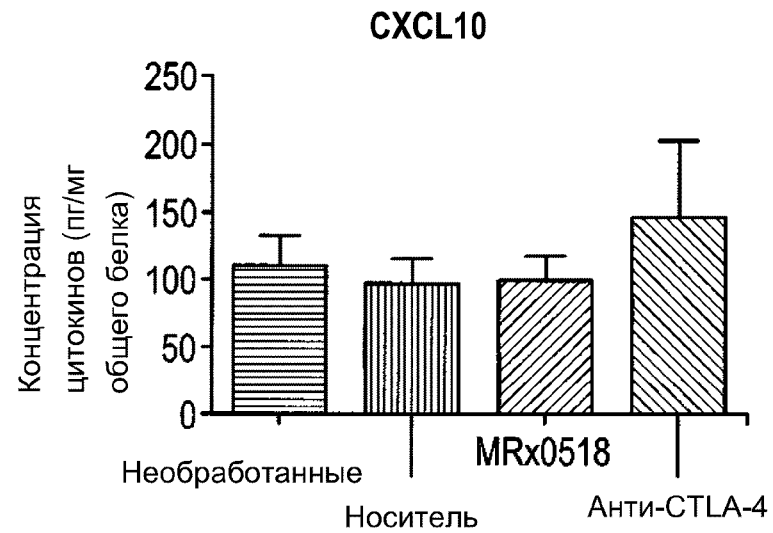
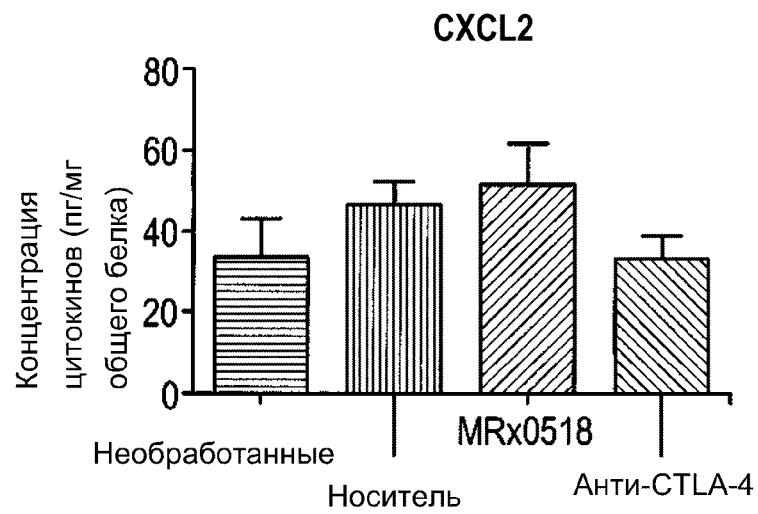
Фиг. 1D



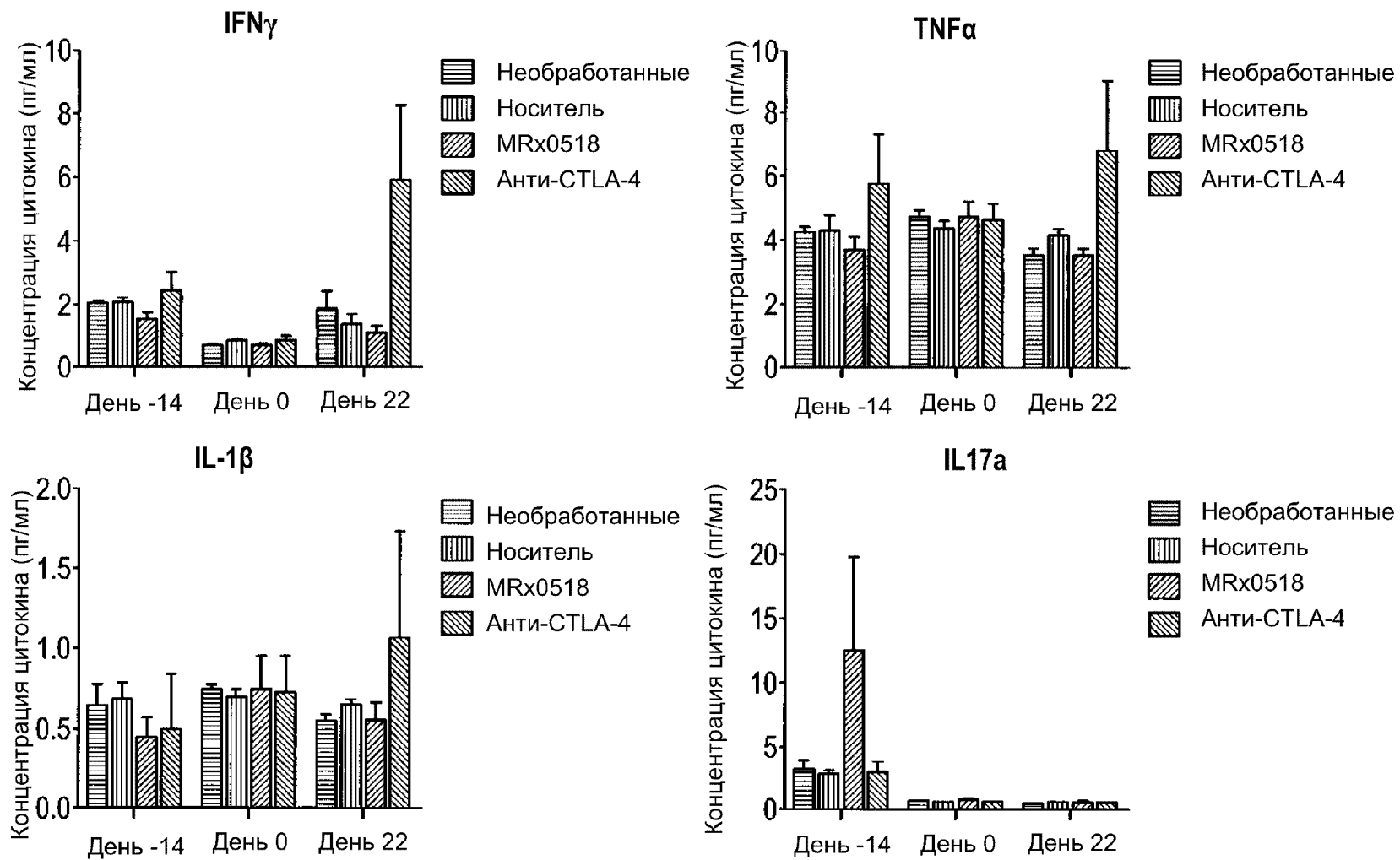
Фиг. 1D(продолж.)



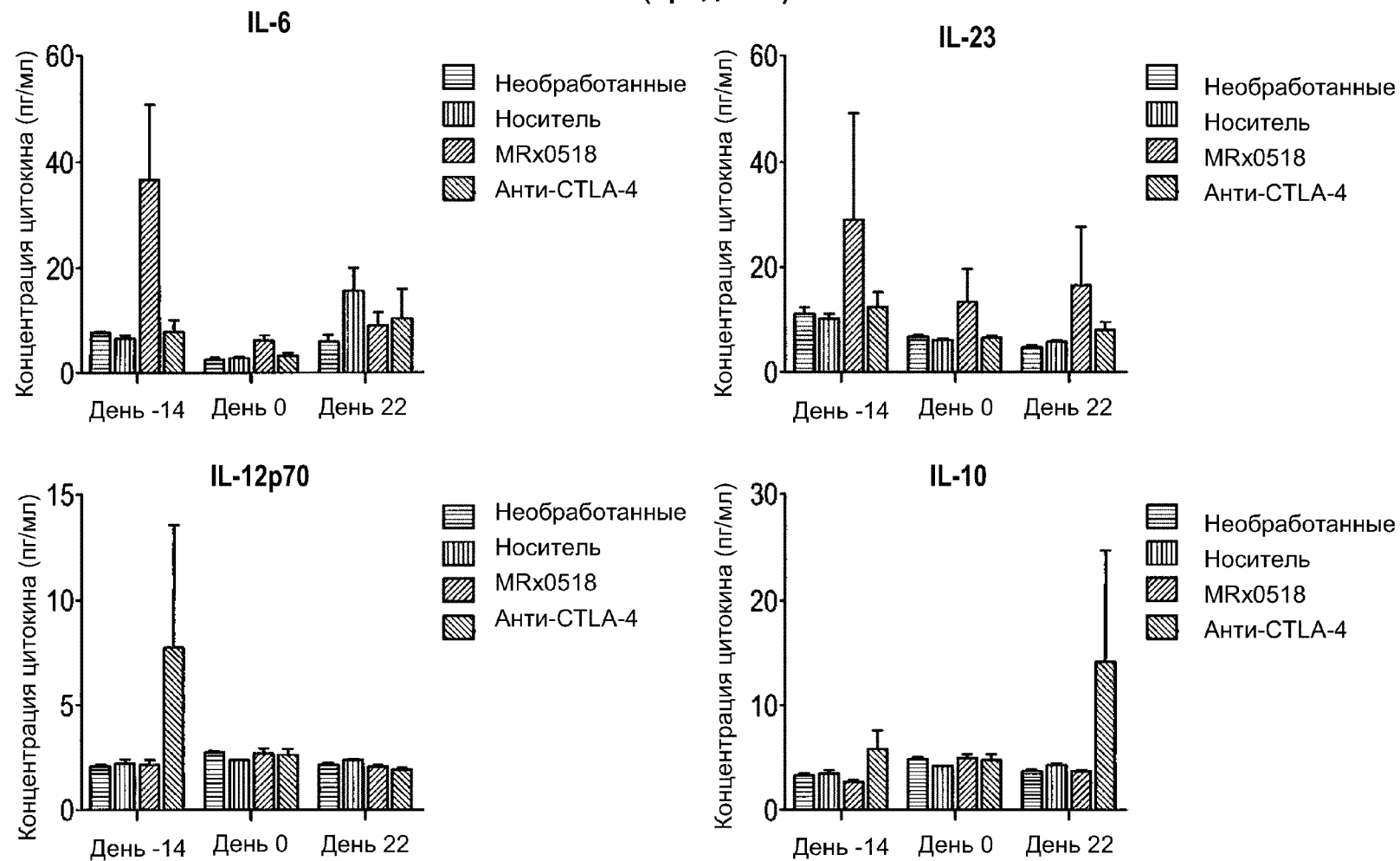
Фиг. 1D(продолж.)

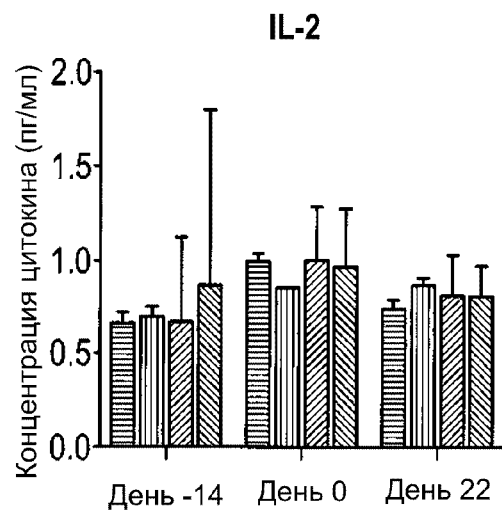


Фиг. 1Е

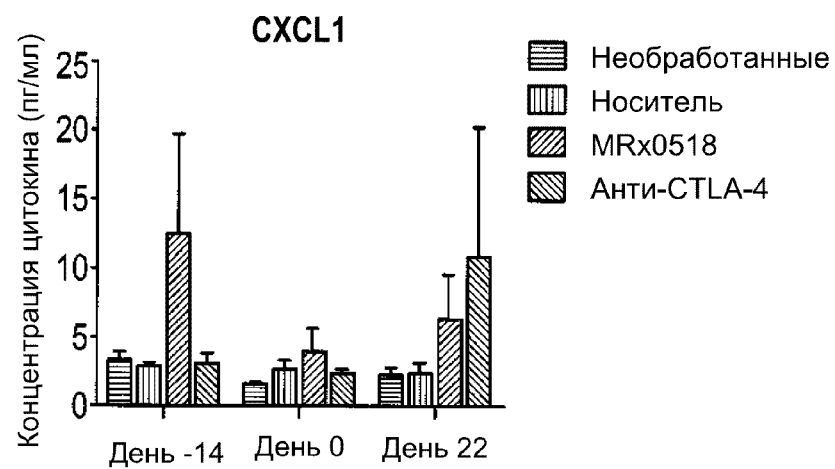
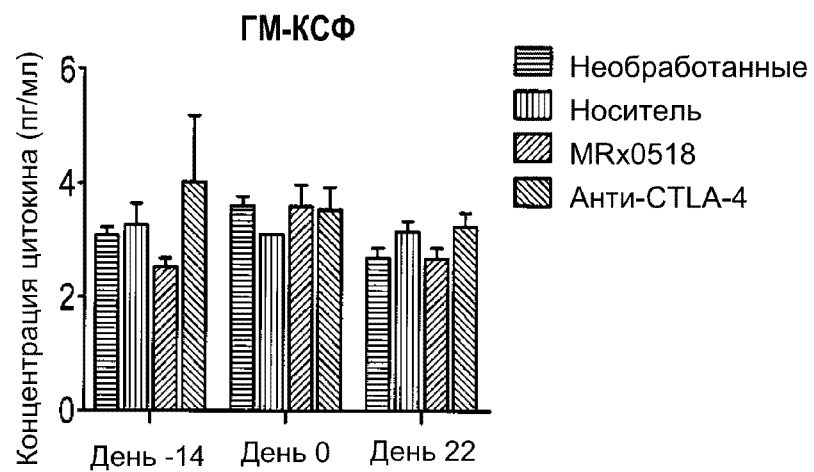
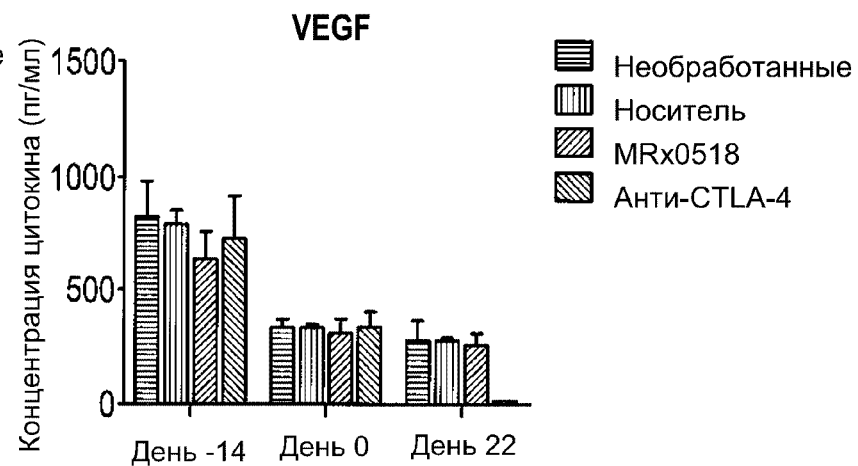


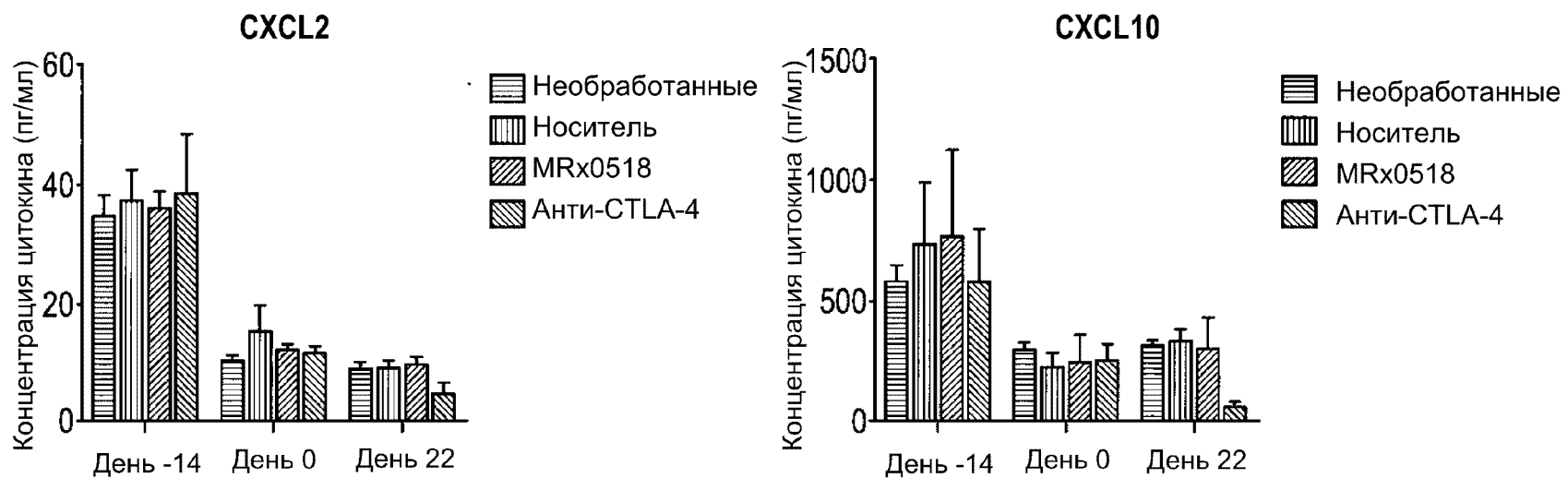
Фиг. 1Е(продолж.)





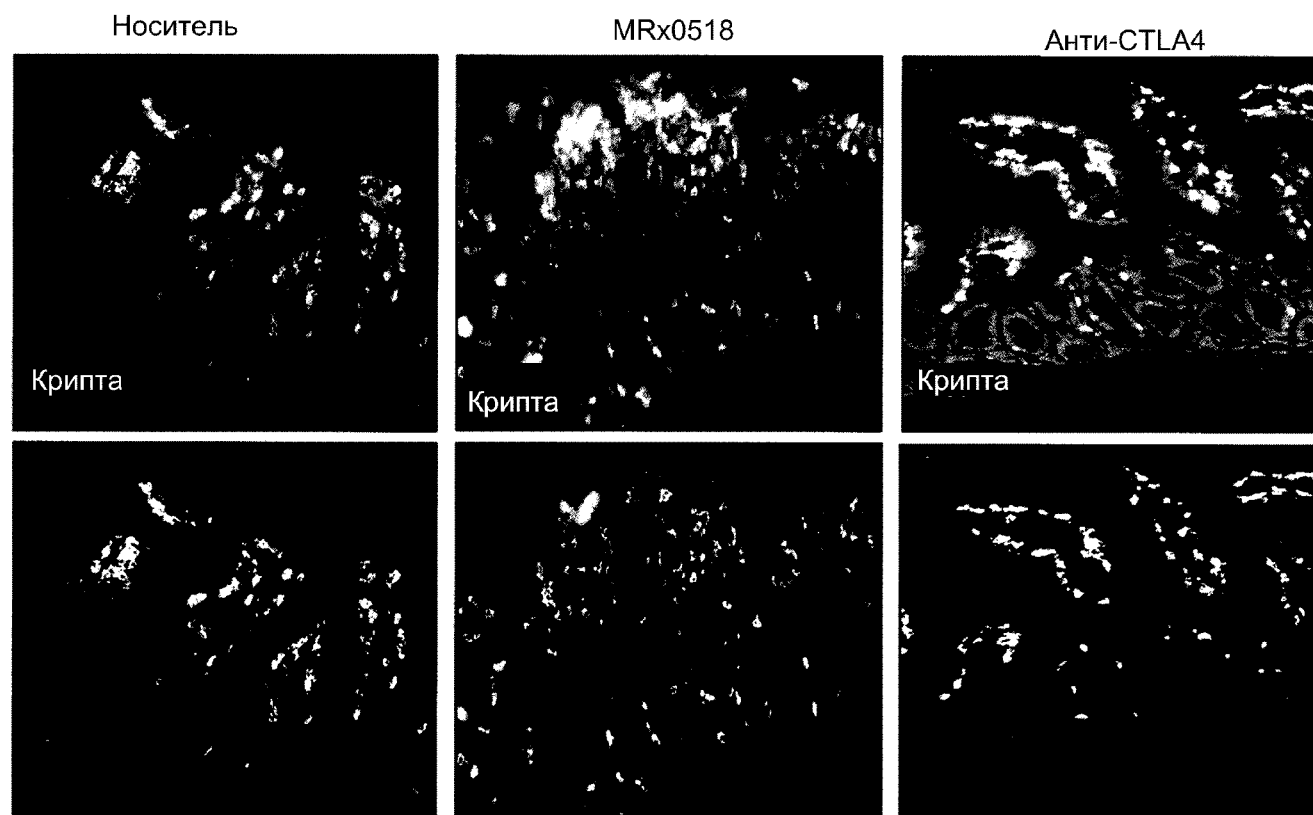
Фиг. 1Е(продолж.)





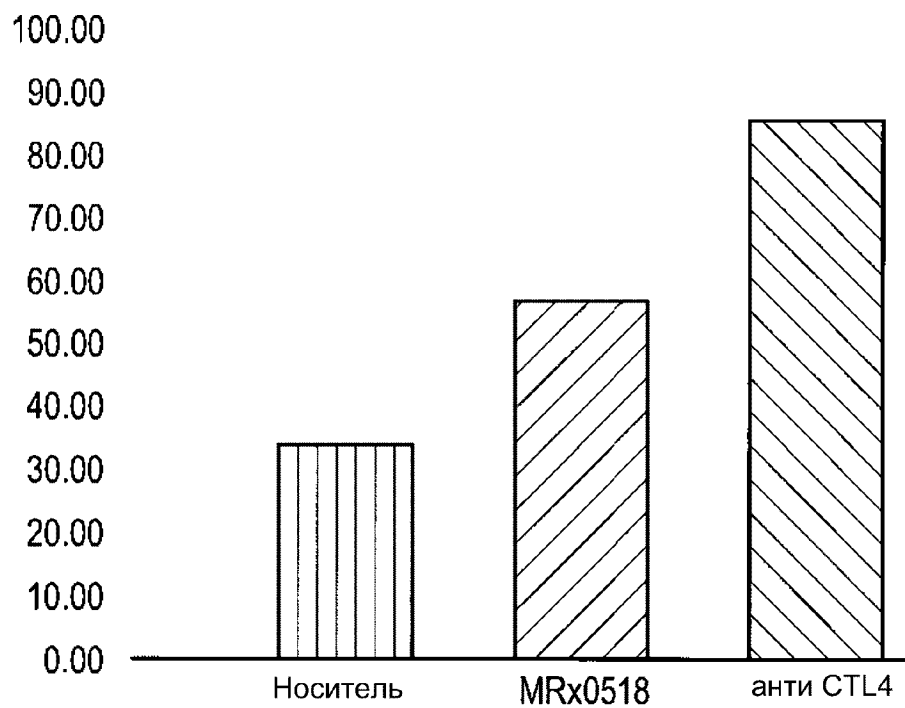
Фиг. 1Е (продолж.)

ФИГ. 1F



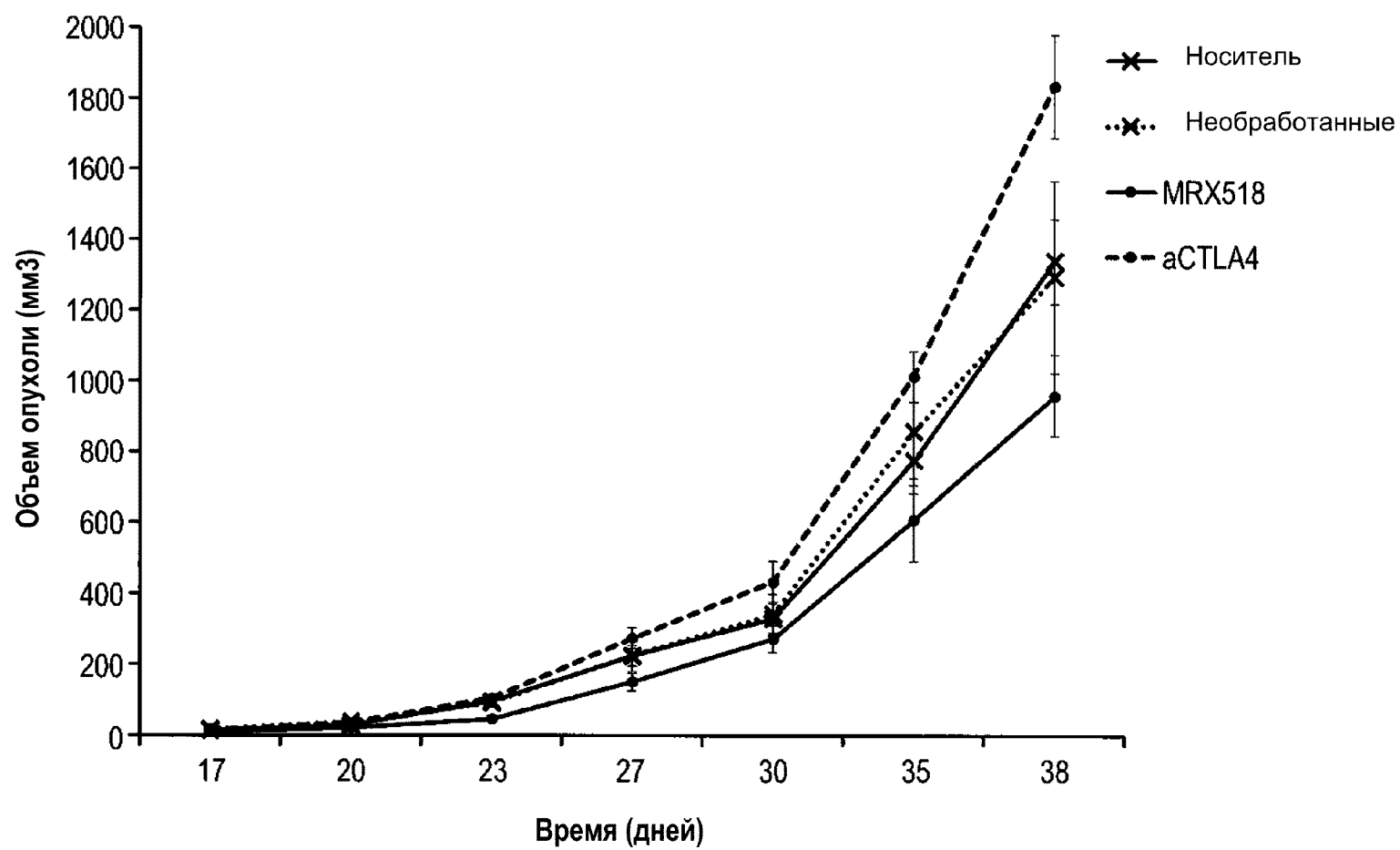
Фиг. 1G

Процент полей зрения, показывающих
более чем 3 CD8 α + клетки в области
крипты



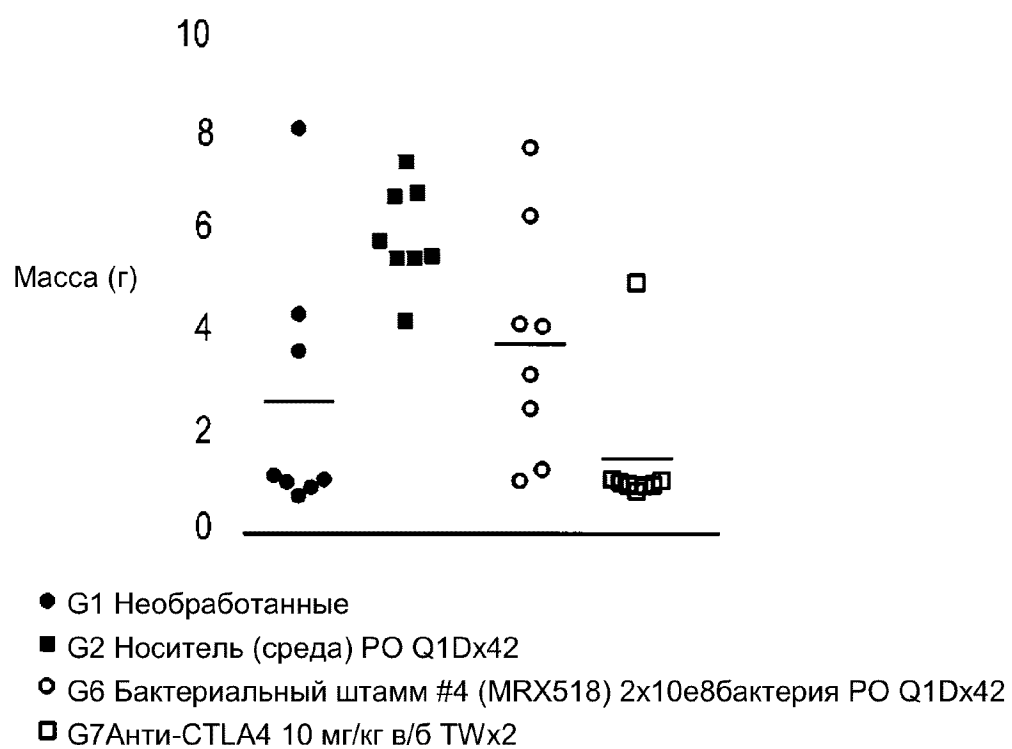
Фиг. 2

LLC



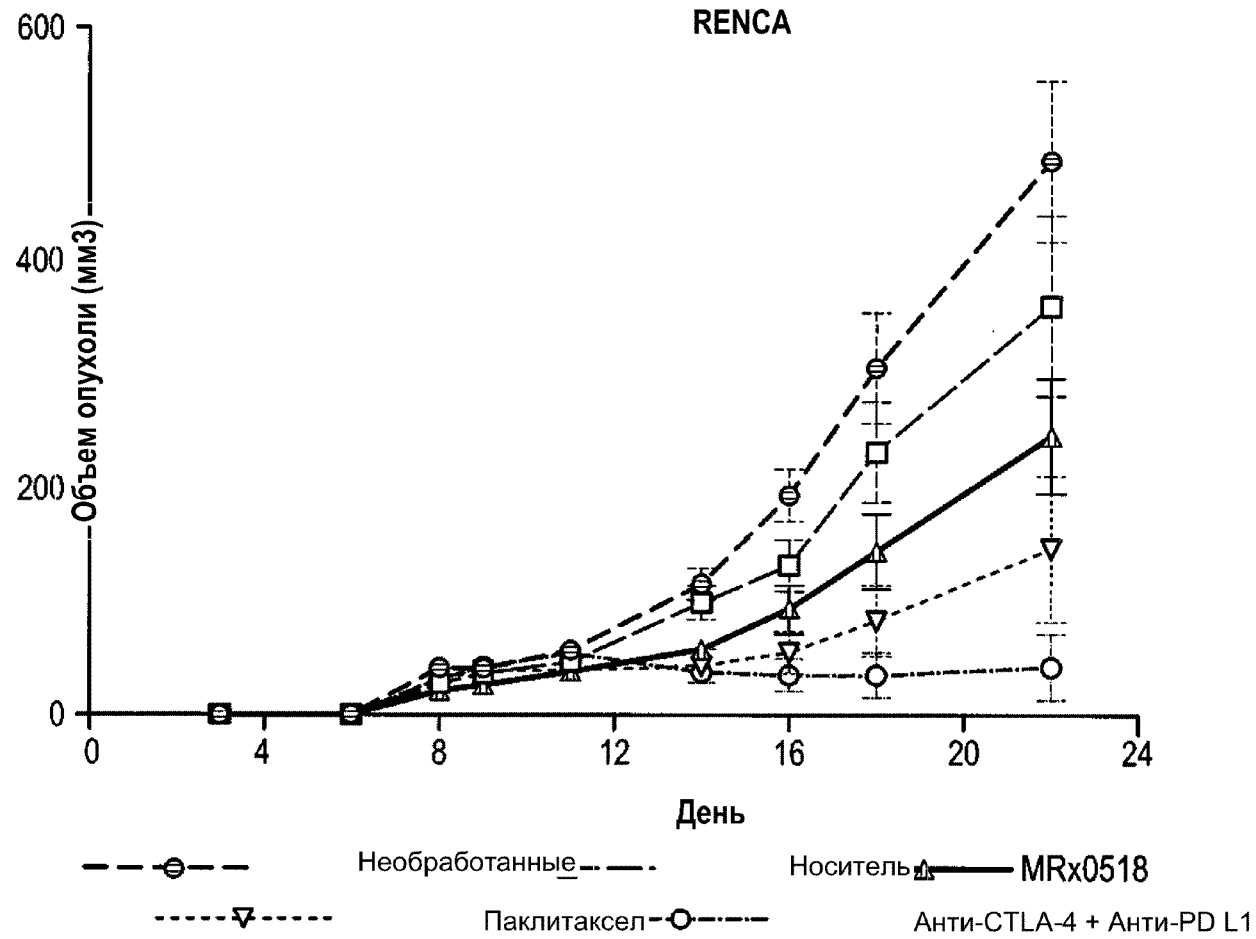
Фиг. 3А

Масса печени после эвтаназии (г)



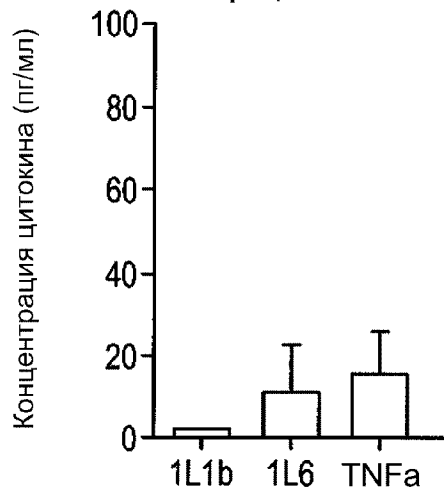
Фиг. 3В

RENCA



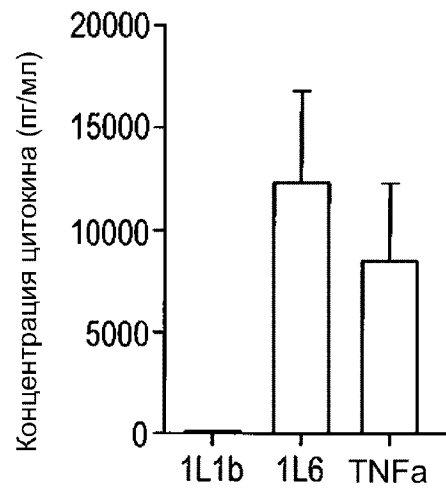
Фиг. 4А

Отрицательный контроль



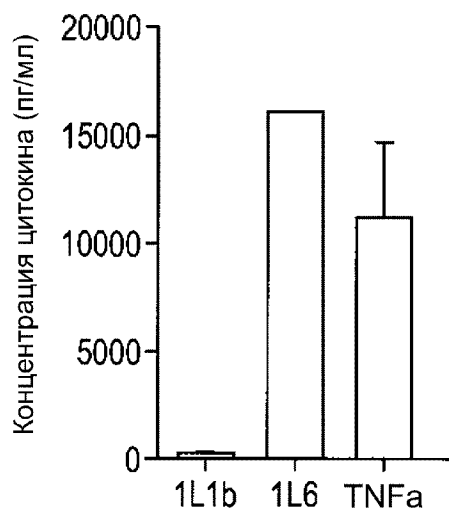
Фиг. 4В

Положительный контроль



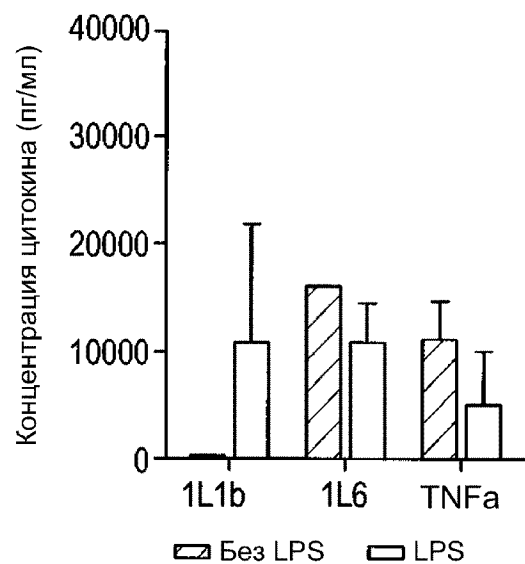
Фиг. 4С

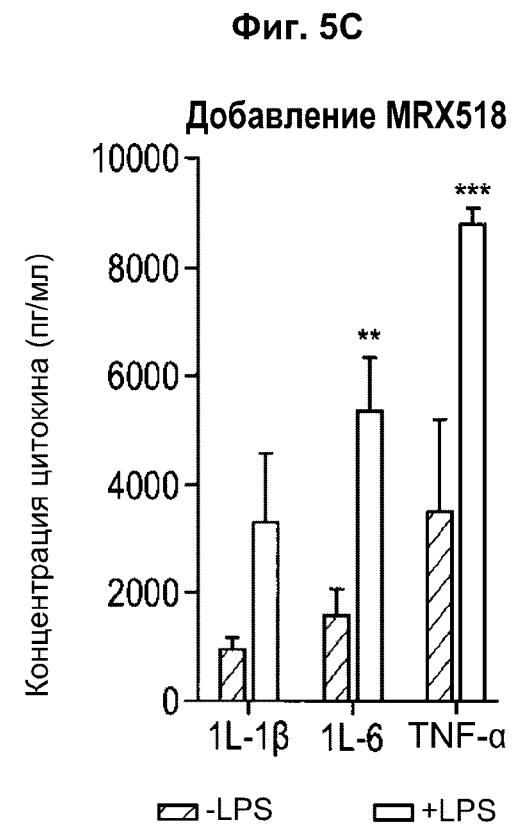
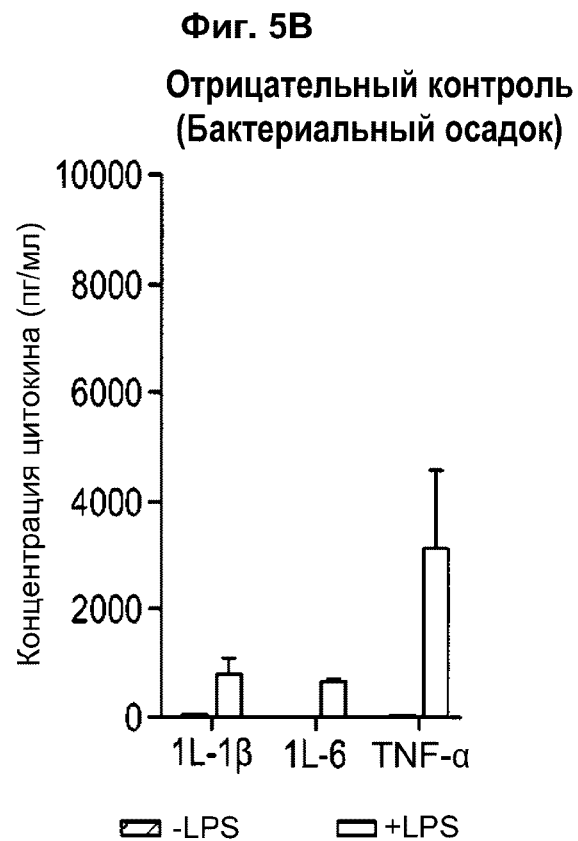
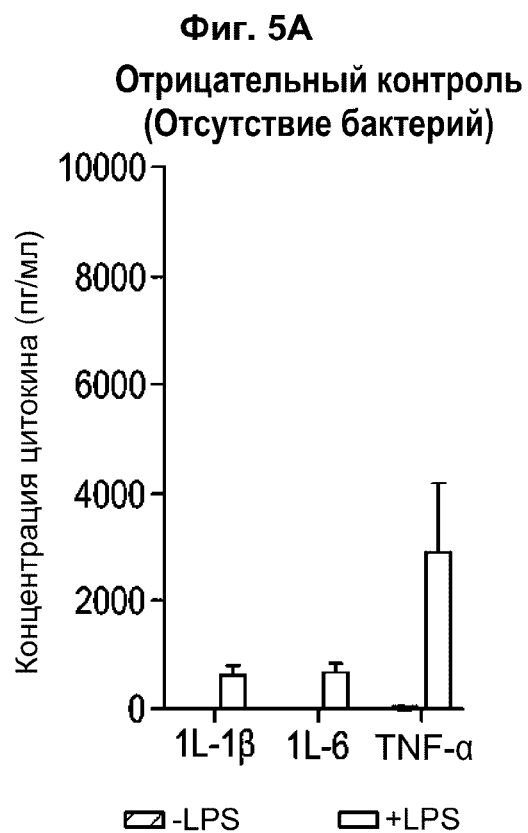
Добавление MRX518



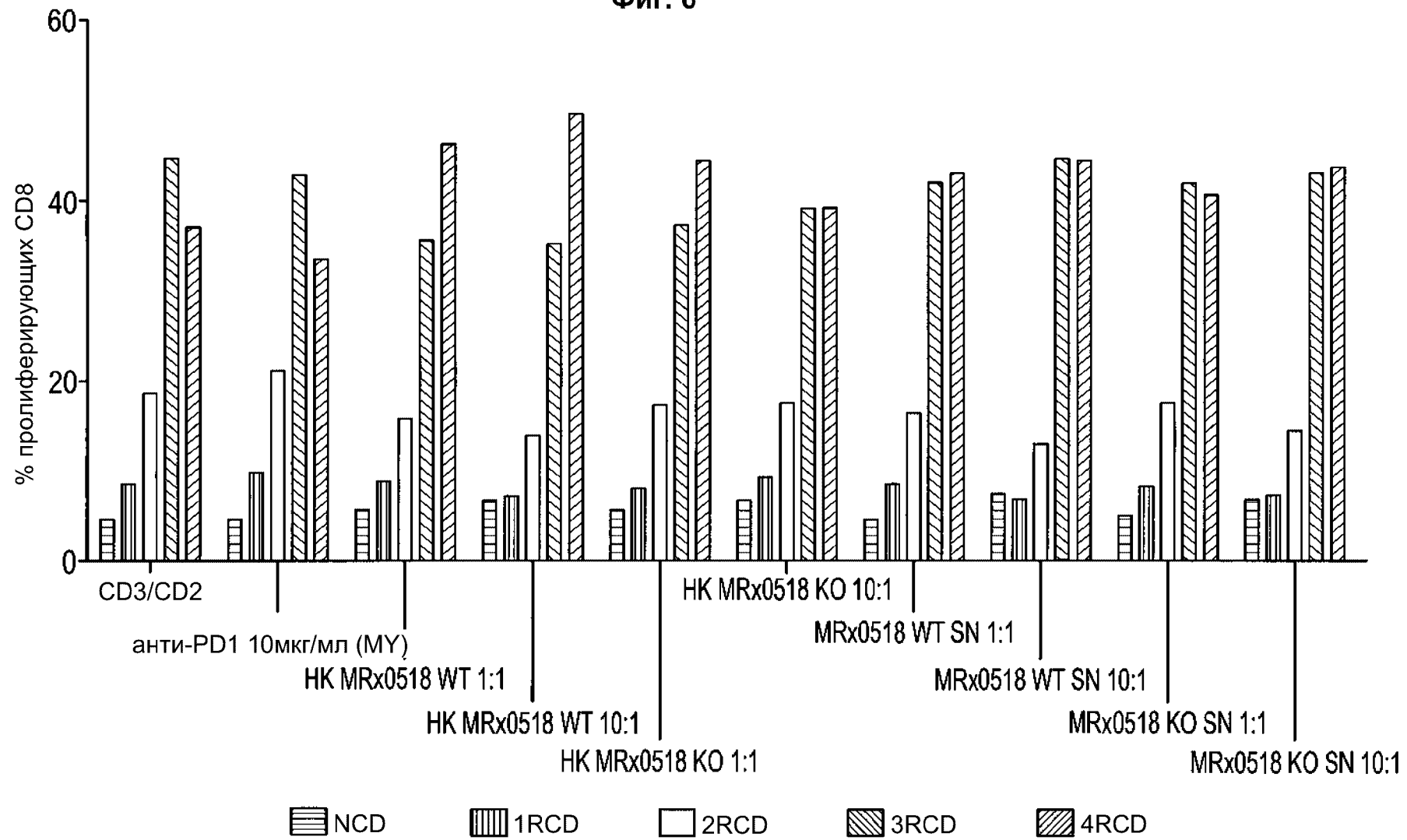
Фиг. 4D

Добавление MRX518 и LPS

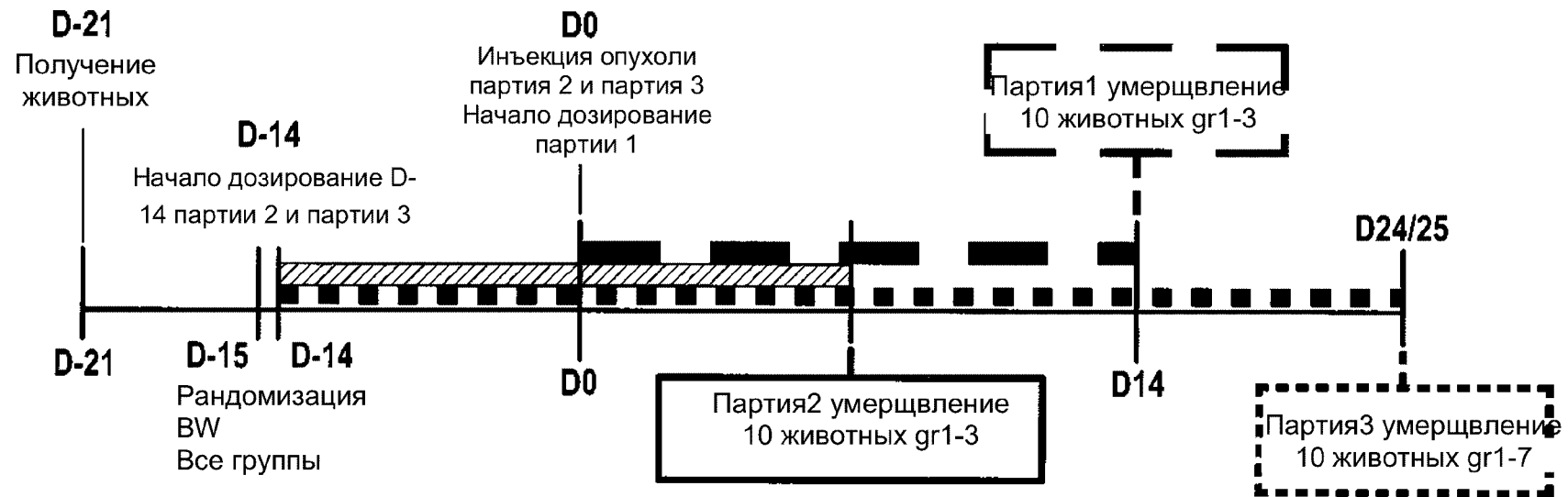




Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В

