

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092149** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.16

(22) Дата подачи заявки
2019.03.19

(51) Int. Cl. *A61K 35/744* (2015.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ

(31) 1804384.4; 1809953.1; 18178350.7; 1811900.8;
1812378.6; 1813423.9; 1813444.5; 1816834.4;
1817641.2; 1901199.8; 1901218.6; 1901993.4;
1901992.6

(32) 2018.03.19; 2018.06.18; 2018.06.18; 2018.07.20;
2018.07.30; 2018.08.17; 2018.08.17; 2018.10.16;
2018.10.29; 2019.01.29; 2019.01.29; 2019.02.13;
2019.02.13

(33) GB; GB; EP; GB; GB; GB; GB; GB;
GB; GB; GB; GB; GB

(86) PCT/EP2019/056894

(87) WO 2019/180051 2019.09.26

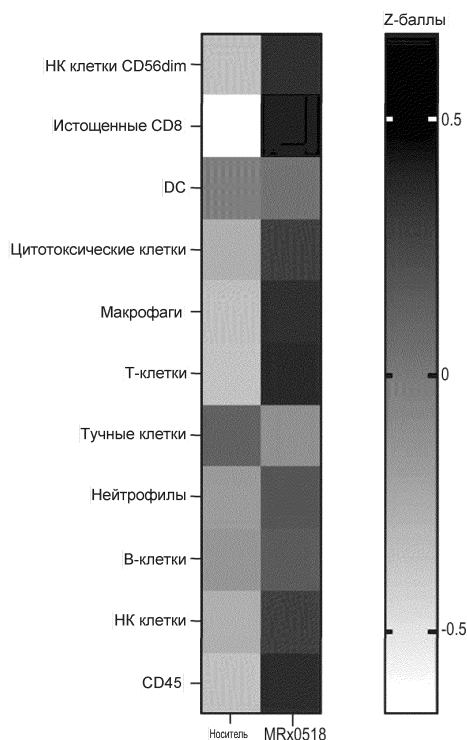
(71) Заявитель:
4Д ФАРМА РИСЕРЧ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Панцика Доменико, Холт Эми Бет,
Ахмед Суад, Этторе Анна, Малдер
Имке Элизабет, Коуи Филип, Рафтис
Эмма, Хеннесси Эмма Элизабет Клер,
Лот-Кали Дельфин Луиз Клодетт,
Кутюрье-Майар Орели Паскаль
Патрисия, Делдей Маргарет Инкстер,
Адриани Марсилио, Кристофи Мария
(GB)

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

(57) Данное изобретение относится к композициям, содержащим штаммы бактерий, для стимуляции иммунной системы, лечения и профилактики заболеваний.

Типы клеток, модулируемые MRx0518



A1

202092149

202092149

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564898EA/019

КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к области композиций, содержащих штаммы бактерий, выделенных из пищеварительного тракта млекопитающих, и к применению таких композиций при лечении заболеваний, в частности, для стимуляции иммунной системы при лечении заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Считается, что кишечник человека стерилен *in utero*, но сразу после рождения он подвергается воздействию целого ряда материнских микробов и микробов из окружающей среды. После этого наступает динамический период микробной колонизации и сукцессии, на который влияют такие факторы, как способ родоразрешения, окружающая среда, рацион и генотип хозяина, все из которых оказывают влияние на композицию кишечной микробиоты, в частности, во время раннего периода жизни. Впоследствии микробиота стабилизируется и становится такой как у взрослых [N1]. Кишечная микробиота человека содержит более 500-1000 разных филофитов, принадлежащих преимущественно двум основным группам бактерий - Bacteroidetes и Firmicutes [N2]. Успешное симбиотическое взаимодействие в результате бактериальной колонизации человеческого кишечника привело к появлению широкого ряда метаболических, структурных, защитных и других благоприятных функций. Повышенная метаболическая активность колонизированного кишечника гарантирует, что неперевариваемые в ином случае компоненты пищи расщепляются с высвобождением сопутствующих продуктов, обеспечивая важный источник питательных веществ для хозяина. Аналогично, хорошо известно иммунологическое значение кишечной микробиоты, которое можно проиллюстрировать на примере безмикробных животных, имеющих нарушенную иммунную систему, которая функционально восстанавливается после внесения комменсальных бактерий [3-5].

Были зарегистрированы серьезные изменения в композиции микробиоты при желудочно-кишечных расстройствах, таких как воспалительное заболевание кишечника (ВЗК). Например, уровни бактерий *Clostridium* кластера XIVa снижены у пациентов с ВЗК, тогда как количественные показатели *E. coli* повышены, что позволяет предположить наличие сдвига в балансе симбионтов и патобионтов в кишечнике [N3-N4]. Интересно, что этот микробный дисбиоз также связан с дисбалансами в популяциях эффекторных Т-клеток.

Признавая потенциальный положительный эффект, который некоторые штаммы бактерий могут оказывать на кишечник животных, были предложены различные штаммы для применения при лечении различных заболеваний (см., например, [N5-N6]). Кроме того, определенные штаммы, включая в основном штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, были предложены для применения при лечении различных воспалительных и

аутоиммунных заболеваний, которые напрямую не связаны с кишечником (см. [N7] и [N8] для обзора). Было высказано предположение, что некоторые штаммы *Streptococcus* и *Veillonella* и, в меньшей степени, штаммы *Enterococcus* и *Lactobacillus* обладают иммуномодулирующим эффектом, с различными влияниями на различные цитокины *in vitro*, что позволяет предположить, что данные, полученные *in vitro* с отдельными штаммами, вряд ли адекватно отражают иммунные ответы на смеси сообществ кишечной микробиоты *in vivo* [88]. Однако взаимосвязь между различными заболеваниями и различными штаммами бактерий, а также точное воздействие определенных штаммов бактерий на кишечник и на системном уровне, а также на любые определенные типы заболеваний плохо изучены.

В данной области техники требуются новые способы лечения заболеваний. Также необходимо охарактеризовать потенциальные эффекты кишечных бактерий, чтобы можно было разработать новые способы лечения с применением кишечных бактерий.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретатели разработали новые композиции, содержащие штамм бактерий вида *Enterococcus gallinarum*, которые можно применять для стимуляции иммунной системы и лечения и профилактики заболеваний. Изобретатели определили, что штаммы вида *Enterococcus gallinarum* могут сильно активировать иммунную систему и могут лечить рак, что указывает на то, что они могут также лечить другие заболевания, при которых активация иммунной системы может быть полезной.

Таким образом, изобретение относится к композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при стимуляции иммунной системы у субъекта.

В дополнительных аспектах изобретение относится к композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении, предотвращении или замедлении старения иммунной системы.

В дополнительных аспектах изобретение относится к композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, для применения в качестве адъюванта вакцины.

В дополнительных аспектах изобретение относится к композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, для применения в усилении клеточной терапии, такой как CAR-T.

Предпочтительно бактерии, применяемые в данном изобретении, представляют собой штамм, депонированный под номером доступа 42488 в NCIMB.

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, бактерия, применяемая в данном изобретении, представляет собой штамм, депонированный под номером доступа 42761 в NCIMB.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А. Мышиная модель рака молочной железы - изменения объема опухоли после индукции опухоли и таблица, показывающая статистическую значимость между

каждым из двух типов лечения в каждый момент времени.

Фиг. 1В. Верхняя вставка: Площадь некроза в опухолях ЕМТ6 (не получившие лечение $n=6$, носитель $n=6$, MRx0518 $n=8$). Нижняя вставка: Процент делящихся клеток в опухолях ЕМТ6. $P=0,019$ (не получившие лечение $n=4$, общее количество подсчитанных клеток=37201, носитель $n=6$, общее количество подсчитанных клеток=64297, MRx0518 $n=6$, общее количество подсчитанных клеток=33539).

Фиг. 1С. Мышиная модель рака молочной железы - инфильтрирующие иммунные клетки. Диаграммы разброса представляют количества клеток различных иммунных маркеров от отдельных животных из каждой группы лечения.

Фиг. 1D. Мышиная модель рака молочной железы - продукция цитокинов в опухолевых лизатах. Столбцы представляют собой среднее пг/мг общего белка из каждой группы лечения. $*p < 0,05$ между группами с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим тестом множественных сравнений Даннета.

Фиг. 1Е. Мышиная модель рака молочной железы - продукция цитокинов в плазме крови. Столбцы представляют собой среднее пг/мл из каждой группы лечения ($\pm$ SEM).

Фиг. 1F. Репрезентативные изображения криосрезов подвздошной кишки от мышей, получивших лечение носителем, MRx0518 и анти-CTLA-4, иммунологически меченных антителами против CD8 α (нижние вставки) и контрастированных DAPI (верхние вставки).

Фиг. 1G. Нанесенная на график количественная оценка подмножеств из исследований на животных с более чем 3 клетками CD8 α^+ на поле, взятыми из области крипты подвздошной кишки мышей, получивших лечение носителем, MRx0518 или анти-CTLA-4.

Фиг. 2. Мышиная модель рака легкого - изменения объема опухоли после индукции опухоли и таблица, показывающая статистическую значимость между каждым из двух типов лечения в каждый момент времени.

Фиг. 3А. Мышиная модель рака печени - масса печени.

Фиг. 3В. Мышиная модель рака почки - изменения объема опухоли после индукции опухоли и таблица, показывающая статистическую значимость между каждым из двух типов лечения в каждый момент времени.

Фиг. 4А. Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках (без бактерий).

Фиг. 4В. Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках после добавления LPS.

Фиг. 4С. Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках после добавления MRx0518MRx0518.

Фиг. 4D. Уровни цитокинов (пг/мл) в незрелых дендритных клетках после добавления MRx0518MRx0518 и LPS.

Фиг. 5А. Уровни цитокинов в клетках THP-1 (без бактерий).

Фиг. 5В. Уровни цитокинов в клетках THP-1 после добавления бактериального

осадка.

Фиг. 5С. Уровни цитокинов в клетках ТНР-1 после добавления MRx0518MRx0518 отдельно или в комбинации с LPS.

Фиг. 6 и 7. Иммуностимулирующий ответ - TNF α

Фиг. 8. Иммуностимулирующий ответ - ИЛ-12p70

Фиг. 9. Иммуностимулирующий ответ - ИЛ-10

Фиг. 10. Иммуностимулирующий ответ - ИЛ-8

Фиг. 11. Иммуностимулирующий ответ - ИЛ-23

Фиг. 12. Иммуностимулирующий ответ - ИЛ-1 β

Фиг. 13. Иммуностимулирующий ответ - ИЛ-6

Фиг. 14. Механизм действия - активация NF κ B

Фиг. 15. Механизм действия - активация TLR5

Фиг. 16А. Схематическое изображение схемы лечения различных групп, использованной в примере 8, описанном в данном документе ниже.

Фиг. 16В. Средний объем опухоли у мышей, несущих опухоль, образованную клетками ЕМТ-6. Мышей либо не лечили, либо лечили носителем YCFA (носитель), бактериями MRx0518 в среде YCFA (MRx0518), анти-CTLA-4 антителом и средой YCFA (анти-CTLA-4) или комбинацией MRx0518 и анти-CTLA-4 антитела. В представленной таблице показана статистическая значимость между каждым из двух типов лечения в каждый момент времени.

Фиг. 17. Мышиная модель рака молочной железы - объем опухоли.

Фиг. 18. Профиль API 50 CHL MRx0554.

Фиг. 19. Механизм действия - активация TLR9 с помощью MRx0518 (MRx0518_{LV}), убитого нагреванием MRx0518 (MRx0518_{HK}) и супернатанта культуры MRx0518 (MRx0518_{SN}) в репортерных клеточных линиях HEK-Blue™ hTLR9. ODN2006 использовали в качестве положительного контроля, а среда YCFA была включена в качестве отрицательного контроля для MRx0518_{SN}. Гистограмма представляет собой среднее значение не менее трех биологических повторов. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPad Prism (обычный однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Тьюки). Статистически значимые различия с соответствующим контролем продемонстрированы на графиках как **** (p < 0,0001).

Фиг. 20А-В. Индукция дифференцировки Т-клеток в популяции (А) Т-хелперных клеток и (В) цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL, Cytotoxic T Lymphocytes) с использованием убитого нагреванием MRx0518 (HK 518), супернатанта из культуры MRx0518 или среды RPMI без добавления цитокинов (без цито). * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001; **** = p ≤ 0,0001.

Фиг. 21А-Д. Продукция цитокинов in vitro (А) клетками PBMC; (В) спленоцитами; или (С) клетками ТНР-1; которые обрабатывали средой YCFA+ («носитель») или бесклеточным бактериальным супернатантом MRx0518 («MRx0518»). На Фиг. 21D

продемонстрировано кратное изменение экспрессии цитокинов после обработки клеток CaCo-2 живыми бактериями («MRx0518») по сравнению с необработанными клетками.

Фиг. 21Е. Продукция цитокинов *in vitro* спленоцитами (N=3) из клеток, которые были либо необработанными («необработанные»), обработанными чистой средой YCFA («10% YCFA») или обработанными бесклеточным бактериальным супернатантом MRx0518 («10% MRx0518»).

Фиг. 21F. Жизнеспособность спленоцитов, выделенных из мышей (N=4), измеренная с помощью МТТ-анализа. Клетки были либо необработанными («необработанные»), обработанными чистой средой YCFA («10% YCFA») или обработанными бесклеточным бактериальным супернатантом MRx0518 («10% MRx0518»).

Фиг. 22А-D. Активация промотора NF-κB в (А) клетках HEK-Blue™-hNOD2; (В) клетках HEK-Blue™-hTLR4; (С) клетках HEK-Blue™-hTLR9 или (D) клетках HEK-Blue™-hTLR5. Клетки были либо необработанными, обработанными средой YCFA («YCFA»), обработанными MRx0518 («MRx0518») или обработанными положительными контролями.

Фиг. 23. Тепловая карта, представляющая анализ NanoString микроокружения опухоли EMT6 после обработки носителем YCFA («носитель») или MRx0518 («MRx0518»).

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Section 6.01 Бактериальные штаммы

Композиции по данному изобретению содержат штамм бактерий вида *Enterococcus gallinarum*. Примеры демонстрируют, что бактерии этого рода полезны для стимуляции иммунной системы и лечения заболеваний.

Enterococcus gallinarum образует кокковидные клетки, в большей мере в парах или коротких цепях. Они являются подвижными, а колонии на агаре с кровью или питательном агаре - круглые и гладкие. *Enterococcus gallinarum* вступает в реакцию с антисывороткой Ланцефильда группы D. Типом штамма *Enterococcus gallinarum* являются F87/276=PB21=ATCC 49573=CCUG 18658=CIP 103013=JCM 8728=LMG 13129=NBRC 100675=NCIMB 702313 (ранее NCDO 2313) = NCTC 12359 [N9]. Номер доступа GenBank для генной последовательности 16S рПНК *Enterococcus gallinarum* представляет собой AF039900 (описанный в данном документе как SEQ ID NO: 1). Типовой штамм *Enterococcus gallinarum* описан в [ix].

Бактерия *Enterococcus gallinarum*, депонированная под номером доступа NCIMB 42488, была исследована в примерах и также упоминается в данном документе как штамм MRx0518. Ссылки на MRx0518 и MRx0518 используются взаимозаменяемо. Последовательность 16S рПНК для исследуемого штамма MRx0518 приведена в SEQ ID NO:2. Штамм MRx0518 был депонирован международным депозитарным ведомством NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, г. Абердин, AB21 9YA, Шотландия) компанией 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, г. Абердин, AB25 2ZS, Шотландия)

16 ноября 2015 г. как «*Enterococcus* sp» и получил номер доступа NCIMB 42488.

Геном штамма MRx0518 содержит хромосому и плазмиду. Хромосомная последовательность для штамма MRx0518 представлена в SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520. Последовательность плазмиды для штамма MRx0518 представлена в SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520. Эти последовательности были сгенерированы с использованием платформы PacBio RS II.

Бактерия *Enterococcus gallinarum*, депонированная под номером доступа NCIMB 42761, была также исследована в примерах и также упоминается в данном документе как штамм MRx0554. Ссылки на MRx0554 и MRx0554 используются взаимозаменяемо. Штамм MRx0554 был депонирован международным депозитарным ведомством NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, г. Абердин, AB21 9YA, Шотландия) компанией 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, г. Абердин, AB25 2ZS, Шотландия) 22 мая 2017 г. как «*Enterococcus gallinarum* MRx0554» и получил номер доступа NCIMB 42761. Последовательность генома этой бактерии описана в данном документе как SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782. Последовательность генома была собрана из нескольких контигов. N в последовательности представляют собой гэпы между контигами. «N» может представлять собой нуклеотид A, G, C или T. Генная последовательность 16S рПНК для штамма MRx0554 представлена в SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 3 представляет собой полноразмерную последовательность, присутствующую в сборке, вместо консенсуса пяти генов 16S, присутствующих в MRx0554.

Ожидается, что бактериальные штаммы, близкородственные штаммам, исследованным в примерах, также будут эффективными для стимулирования иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет генную последовательность 16s рПНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 1 или 2. Предпочтительно последовательность идентична SEQ ID NO: 2. Предпочтительно бактериальный штамм для применения в изобретении имеет генную последовательность 16s рПНК, представленную SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет генную последовательность 16s рПНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 3.

Ожидается, что бактериальные штаммы, которые представляют собой биотипы бактерии, депонированной под номером доступа 42488, также будут эффективны для стимуляции иммунной системы. Биотип - это близкородственный штамм, который имеет такие же или очень похожие физиологические и биохимические характеристики.

Штаммы, которые представляют собой биотипы бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488, и которые подходят для применения в изобретении, можно идентифицировать путем секвенирования других нуклеотидных последовательностей для бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488. Например, можно секвенировать практически весь геном, и штамм биотипа для

использования в изобретении может иметь по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательностей на протяжении по меньшей мере 80% всего своего генома (например, на протяжении по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% или на протяжении всего своего генома). Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, штамм биотипа имеет по меньшей мере 98% идентичности последовательности на протяжении по меньшей мере 98% своего генома или по меньшей мере 99% идентичности последовательности на протяжении 99% своего генома. Другие подходящие последовательности для применения при идентификации штаммов биотипов могут включать hsp60 или повторяющиеся последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)₅ или REP [N10]. Штаммы биотипа могут иметь последовательности с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с соответствующей последовательностью бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, штамм биотипа имеет последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с соответствующей последовательностью штамма MRx0518, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, и содержит генную последовательность 16S рПНК, которая по меньшей мере на 99% идентична (например, по меньшей мере на 99,5% или по меньшей мере на 99,9% идентична) SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, штамм биотипа имеет последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с соответствующей последовательностью штамма MRx0518, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, и имеет последовательность 16S рПНК SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет хромосому с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет хромосому с по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 на протяжении 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 изобретении может иметь хромосому с по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 на протяжении 70% SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 на протяжении 80% SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 на протяжении 90% SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520

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

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет плазмиду с последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет плазмиду с по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении по меньшей мере 60% (например, по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) SEQ ID NO: 4 WO2017/085520. Например, бактериальный штамм для применения в изобретении может иметь плазмиду с по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 70% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 80% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 90% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 100% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 95%

идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 70% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 80% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 90% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 100% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 70% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 80% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 90% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520 на протяжении 100% SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении 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 данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет хромосому с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520, например, как описано выше, и последовательность 16S rPHK с идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 или 2, например, как описано выше, предпочтительно с последовательностью 16S rPHK, которая по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 2, более предпочтительно, которая содержит последовательность 16S rPHK SEQ ID NO: 2, и необязательно содержит плазмиду с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет хромосому с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520, например, как описано выше, и необязательно содержит плазмиду с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и является эффективным для стимуляции иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет хромосому с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520, например, как описано выше, и последовательность 16S rPHK с идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 или 2, например, как описано выше, и необязательно содержит плазмиду с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и является эффективным для стимуляции иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рРНК, представленной SEQ ID NO: 2 (например, которая содержит последовательность 16S рРНК из SEQ ID NO: 2) и хромосому с по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 на протяжении по меньшей мере 90% SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 и необязательно содержит плазмиду с последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и который эффективен для стимуляции иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентична геновой последовательности 16s рРНК, представленной SEQ ID NO: 2 (например, которая содержит последовательность 16S рРНК SEQ ID NO: 2) и хромосому с по меньшей мере 98% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью последовательности) с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 на протяжении по меньшей мере 98% (например, на протяжении по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5%) SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520, и необязательно содержит плазмиду с последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и который эффективен для стимуляции иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении представляет собой *Enterococcus gallinarum* и имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рРНК, представленной SEQ ID NO: 2 (например, которая содержит последовательность 16S рРНК SEQ ID NO: 2) и хромосому с по меньшей мере 98% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью последовательности) с SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520 на протяжении по меньшей мере 98% (например, на протяжении по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5%) SEQ ID NO: 3 из WO2017/085520, и необязательно содержит плазмиду с последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 4 из WO2017/085520, как описано выше, и который эффективен для стимуляции иммунной системы.

Альтернативно, штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488, и которые подходят для применения в изобретении, могут быть идентифицированы путем использования депонированного под номером доступа NCIMB 42488 и анализа рестрикционных фрагментов и/или анализа ПЦР, например с использованием флуоресцентного анализа полиморфизма по длине амплифицированного фрагмента (FAFLP, fluorescent amplified fragment length polymorphism) и (gcp)-ПЦР фингерпринтинга повторяющегося ДНК-элемента, или профилирования белков, или частичного секвенирования 16S или 23s рДНК. В

предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, такие методы можно использовать для идентификации других штаммов *Enterococcus gallinarum*.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42488, и которые подходят для применения в изобретении, представляют собой штаммы, которые относятся к тому же паттерну, что и бактерия, депонированная под номером доступа NCIMB 42488, при анализе с помощью рестрикционного анализа амплифицированной рибосомной ДНК (ARDRA, amplified ribosomal DNA restriction analysis), например, при использовании рестрикционного фермента *Sau3AI* (примеры способов и руководства см., например, [N11]). Альтернативно, штаммы биотипа идентифицируют как штаммы, которые имеют те же паттерны ферментации углеводов, что и бактерия, депонированная под номером доступа NCIMB 42488. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, паттерн ферментации углеводов определяют с использованием панели API 50 CHL (bioMérieux). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм, используемый в изобретении, является:

положительным по 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 из): 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

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

предпочтительно, как определено при помощи анализа API 50 CHL (предпочтительно с использованием панели API 50 CHL от компании bioMérieux).

Другие штаммы *Enterococcus gallinarum*, которые применяются в композициях и способах по данному изобретению, такие как биотипы бактерий, депонированных под номером доступа NCIMB 42488, можно идентифицировать с использованием любого подходящего способа или стратегии, включая анализы, описанные в примерах. Например, штаммы для применения в изобретении могут быть идентифицированы путем оценки их эффектов по уровням цитокинов, как показано в примерах. В частности, в изобретении могут быть использованы бактериальные штаммы, которые имеют сходные паттерны роста, метаболический тип и/или поверхностные антигены с бактерией, депонированной под номером доступа NCIMB 42488. Полезный штамм будет иметь иммуномодулирующую активность, сравнимую со активностью штамма NCIMB 42488. В частности, штамм биотипа будет вызывать эффекты, сравнимые с эффектами, показанными в примерах, на моделях ракового заболевания, которые можно идентифицировать с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в примерах. Согласно некоторым вариантам осуществления данного изобретения, штамм биотипа, который можно применять в изобретении, представляет собой штамм, который

способен вызывать сравнимые эффекты на моделях ракового заболевания, показанных в примерах, при введении в способе данного изобретения.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм, используемый в изобретении, является:

Положительным по меньшей мере по одному из (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всем из): ферментации маннозы, декарбоксилазы глутаминовой кислоты, аргининариламидазы, фенилаланинариламидазы, ариламидазы пироглутаминовой кислоты, тирозинариламидазы, гистидинариламидазы и серинариламидазы; и/или

Промежуточным по меньшей мере по одному из (например, по меньшей мере 2 или всем из): β -галактозидаза-6-фосфата, β -глюкозидазы и N-ацетил- β -глюкозаминидазы; и/или

Отрицательным по меньшей мере по одному из (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или всем из): Ферментации раффинозы, пролинариламидазы, лейцилглицинариламидазы, лейцинариламидазы, аланинариламидазы, глицинариламидазы и ариламидазы глутамилглутаминовой кислоты,

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 компании bioMérieux).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм, используемый в изобретении, является:

Отрицательным по меньшей мере по одному из (например, по меньшей мере 2, 3 или всем 4 из) глицинариламидазы, ферментации раффинозы, пролинариламидазы и лейцинариламидазы, например, как определено анализом метаболизма углеводов, аминокислот и нитратов, предпочтительно как определено анализом Rapid ID 32A (предпочтительно с использованием системы Rapid ID 32A от компании bioMérieux); и/или

Промежуточно положительным по ферментации L-фукозы, предпочтительно, как определено анализом API 50 CHL (предпочтительно с использованием панели API 50 CHL от компании bioMérieux).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, используемый в изобретении бактериальный штамм, представляет собой внеклеточный продуцент 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 при измерении с помощью набора для анализа АТФ (Sigma-Aldrich, MAK190). Бактериальная внеклеточная АТФ может иметь плеiotропные эффекты, включая активацию передачи сигналов, опосредованную Т-клеточными рецепторами (Schenk et al., 2011), стимулирование дифференцировки кишечных клеток Th17 (Atarashi et al., 2008) и индукцию секреции провоспалительного медиатора ИЛ-1 β путем активации инфламасомы NLRP3 (Karmarkar et al., 2016). Соответственно, бактериальный штамм, который является внеклеточным продуцентом АТФ, полезен для

стимуляции иммунной системы в контексте способа по данному изобретению.

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

Особенно предпочтительным штаммом по изобретению является штамм *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером доступа NCIMB 42488. Это типовый штамм MRx0518, изученный в примерах и показавший свою эффективность для лечения заболевания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения, изобретение относится к бактериальной композиции как части данного изобретения, содержащей клетку штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, или его производное. Производное штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, может быть дочерним штаммом (потомством) или штаммом, культивированным (субклонированным) из исходного.

Производное штамма композиции, включенной в данное изобретение, может быть модифицировано, например, на генетическом уровне без снижения биологической активности. В частности, производный штамм по изобретению терапевтически активен. Производный штамм будет иметь иммуномодулирующую активность, сравнимую с исходным штаммом NCIMB 42488. В частности, производный штамм будет вызывать эффекты, сравнимые с эффектами на моделях ракового заболевания, если они могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в примерах. Производное штамма NCIMB 42488 обычно является биотипом штамма NCIMB 42488.

Ссылки на клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного 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 охватываются данным изобретением. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, ссылка на клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного под номером доступа NCIMB 42488, относится только к штамму MRx0518, 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 данного изобретения, ссылка на клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного 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.

Ожидается также, что бактериальные штаммы, которые представляют собой биотипы бактерии, депонированной под номером доступа 42761, также будут эффективны для стимуляции иммунной системы. Биотип - это близкородственный штамм, который имеет такие же или очень похожие физиологические и биохимические характеристики.

Штаммы, которые представляют собой биотипы бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42761, и которые подходят для применения в изобретении, можно идентифицировать путем секвенирования других нуклеотидных последовательностей для бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42761. Например, можно секвенировать практически весь геном, и штамм биотипа для использования в изобретении может иметь по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательностей на протяжении по меньшей мере 80% всего своего генома (например, на протяжении по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% или на протяжении всего своего генома). Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, штамм биотипа имеет по меньшей мере 98% идентичности последовательности на протяжении по меньшей мере 98% своего генома или по меньшей мере 99% идентичности последовательности на протяжении 99% своего генома. Другие подходящие последовательности для применения при идентификации штаммов биотипов могут включать hsp60 или повторяющиеся последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)₅ или REP [N12]. Штаммы биотипа могут иметь последовательности с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с соответствующей последовательностью бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42761. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, штамм биотипа имеет последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с соответствующей последовательностью штамма MRx0554, депонированного как NCIMB 42761. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, штамм биотипа имеет последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с соответствующей последовательностью штамма MRx0554, депонированного под номером доступа NCIMB 42761, и имеет генную последовательность 16S rPHK, которая по меньшей мере на 99% идентична (например, по меньшей мере на 99,5% или по меньшей мере на 99,9% идентична) SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, штамм биотипа имеет последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с соответствующей последовательностью штамма MRx0554, депонированного как NCIMB 42761, и имеет генную последовательность 16S rPHK SEQ ID NO: 3.

Альтернативно, штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной

под номером доступа NCIMB 42761, и которые подходят для применения в изобретении, могут быть идентифицированы путем использования депонированного под номером доступа NCIMB 42761 и анализа рестрикционных фрагментов и/или анализа ПЦР, например с использованием флуоресцентного анализа полиморфизма по длине амплифицированного фрагмента (FAFLP, fluorescent amplified fragment length polymorphism) и (гер)-ПЦР фингерпринтинга повторяющегося ДНК-элемента, или профилирования белков, или частичного секвенирования 16S или 23s рДНК.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, штаммы, которые являются биотипами бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42761, и которые подходят для применения в изобретении, представляют собой штаммы, которые относятся к тому же паттерну, что и бактерия, депонированная под номером доступа NCIMB 42761, при анализе с помощью рестрикционного анализа амплифицированной рибосомной ДНК (ARDRA, amplified ribosomal DNA restriction analysis), например, при использовании рестрикционного фермента Sau3AI (примеры способов и руководства см., например, [N13]). Альтернативно, штаммы биотипа идентифицируют как штаммы, которые имеют те же паттерны ферментации углеводов, что и бактерия, депонированная под номером доступа NCIMB 42761. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, паттерн ферментации углеводов определяют с использованием панели API 50 CHL (bioMérieux). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм, используемый в изобретении, является:

положительным по 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 из): 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

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

предпочтительно, как определено при помощи анализа API 50 CHL (предпочтительно с использованием панели API 50 CHL от компании bioMérieux).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм, используемый в изобретении, является:

положительным по 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, 18 или всех из): L-арабинозы, D-рибозы, D-ксилозы, D-галактозы, D-глюкозы, D-фруктозы, D-маннозы, N-ацетилглюкозамина, амигдалина, арбутина, эскулина, салицина, D-целлобиозы, D-мальтозы, D-сахарозы (сахарозы), D-трегалозы, гентиобиозы, D-тагатозы и глюконата калия;

промежуточным по ферментации по меньшей мере одного из (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или всех из): D-маннита, метил- α D-гликопиранозида, D-лактозы,

D-раффинозы, амидона (крахмала) и D-туранозы; и/или

отрицательным по 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, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или всех из): глицерина, эритрита, D-арабинозы, L-ксилозы, D-адонита, метил-βD-ксилоприранозида, L-сорбозы, L-рамнозы, дульцита, инозита, D-сорбита, метил- αD-маннопиранозида, D-мелибиозы, инулина, D-мелеситозы, гликогена, ксилита, D-ликсозы, D-фукозы, L-фукозы, D-арабита, L-арабита, 2-кетоглюконата калия и 5-кетоглюконата калия;

предпочтительно, как определено анализом API 50 CHL (предпочтительно с использованием панели API 50 CHL от компании bioMérieux, и предпочтительно с использованием условий, описанных в примере 10).

Другие штаммы *Enterococcus gallinarum*, которые применяются в композициях и способах по изобретению, такие как биотипы бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42761, можно идентифицировать с использованием любого подходящего способа или стратегии, включая анализы, описанные в примерах. Например, штамм для применения в изобретении можно идентифицировать путем культивирования в анаэробной среде YCFA и/или введения бактерий в мышиную модель индуцированного коллагеном артрита II типа и впоследствии оценки уровней цитокинов. В частности, в изобретении могут использовать бактериальные штаммы, которые имеют сходные паттерны роста, метаболический тип и/или поверхностные антигены с бактерией, депонированной под номером доступа NCIMB 42761. Полезный штамм будет иметь иммуномодулирующую активность, сравнимую с активностью штамма NCIMB 42761. В частности, штамм биотипа будет вызывать эффекты, сравнимые с эффектами, показанными в примерах, на моделях ракового заболевания, которые можно идентифицировать с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в примерах.

Производное штамма по изобретению можно модифицировать, например, на генетическом уровне без ослабления биологической активности. В частности, производный штамм по изобретению терапевтически активен. Производный штамм будет иметь иммуномодулирующую активность, сравнимую с исходным штаммом NCIMB 42761. В частности, производный штамм будет вызывать эффекты, сравнимые с эффектами, показанными в примерах на моделях ракового заболевания, которые можно идентифицировать с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в примерах. Производное штамма NCIMB 42761 обычно является биотипом штамма NCIMB 42761.

Ссылки на клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного под номером доступа NCIMB 42761, охватывают любые клетки, которые имеют те же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, что и штаммы, депонированные под номером доступа NCIMB 42761, и такие клетки охватываются данным изобретением. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, ссылка на

клетки штамма *Enterococcus gallinarum*, депонированного под номером доступа NCIMB 42761, относится только к штамму MRx0554, депонированному под номером доступа NCIMB 42761, и не относится к бактериальному штамму, который не был депонирован под номером доступа NCIMB 42761.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет геном с последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет геном с по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности) с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении по меньшей мере 60% (например, на протяжении по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782. Например бактериальный штамм для применения в изобретении может иметь геном с по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 70% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 80% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 90% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 100% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 70% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 80% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 90% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 100% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 70% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 80% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 90% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 98% идентичности на протяжении 95% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 100% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 99,5% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 90% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 99,5% идентичности на протяжении 95% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 99,5% идентичности на протяжении 98% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, или по меньшей мере 99,5% идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении 100% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет геном с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, например, как описано выше, и генную последовательность 16S рPHK с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или 3, например, как описано выше, предпочтительно с генной последовательностью 16S рPHK, которая по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 3, более предпочтительно, которая содержит генную последовательность 16S рPHK SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет геном с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, например, как описано выше, и эффективен для стимуляции иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет геном с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, например, как описано выше, и генную последовательность 16S рPHK с идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или 3, например, как описано выше, и эффективен для стимуляции иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении имеет генную последовательность 16S рPHK, которая по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентична генной последовательности 16S рPHK, представленной SEQ ID NO: 3 (например, которая содержит генную последовательность рPHK 16S SEQ ID NO: 3), и геном с по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении по меньшей мере 90% SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, и который эффективен для стимуляции иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм для применения в изобретении представляет собой *Enterococcus gallinarum* и имеет генную последовательность 16S рPHK, которая по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентична генной последовательности 16S рPHK, представленной SEQ ID NO: 3 (например, которая содержит генную последовательность 16S рPHK SEQ ID NO: 3), и геном с по меньшей мере 98% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью последовательности) с SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782 на протяжении по меньшей мере 98% (например, на протяжении по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5%) SEQ ID NO: 2 из WO2018/215782, и который эффективен для стимуляции иммунной системы.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, бактериальные штаммы в композициях по изобретению являются жизнеспособными и способными к частичной или полной колонизации кишечника.

В альтернативных аспектах каждого варианта осуществления данного изобретения,

бактериальный штамм в композиции по данному изобретению принадлежит к виду *Enterococcus caselliflavus*. *Enterococcus caselliflavus* очень похож на *Enterococcus gallinarum* и также содержит жгутик.

Section 6.02 Терапевтическое применение

Стимулирование иммунной системы

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к иммунной стимуляции. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению оказывает иммуностимулирующее действие, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, в частности заболеваний, характеризующихся сниженной иммунной активацией, и заболеваний, излечимых с помощью повышенного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении заболевания путем стимуляции иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при стимуляции иммунного ответа.

Композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся увеличением процентного содержания Treg в популяции клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся увеличением процентного содержания Treg в популяции клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся увеличением процентного содержания CD4+CD25+CD127- клеток в популяции клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний за счет уменьшения процентного содержания Treg в популяциях клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при снижении подавления иммунного ответа Treg. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при стимуляции иммунного ответа путем селективного снижения Treg. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при иммуностимуляции, при этом композиции по изобретению снижают количество или процентное содержание Treg.

Композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением соотношения CD8/Treg и/или активированных CD8/Treg клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения,

Композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении

заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток в популяциях клеток, при этом увеличение количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток приводит к иммунной стимуляции. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при стимуляции иммунного ответа путем увеличения количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток.

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии провоспалительных молекул, таких как провоспалительные цитокины. Примеры провоспалительных молекул, которые могут демонстрировать увеличение уровней экспрессии при введении композиций по данному изобретению, включают ИЛ-8, ИЛ-12p70, ИЛ-23, TNF- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию провоспалительных молекул, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии провоспалительных молекул, таких как провоспалительные цитокины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения или профилактики заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности провоспалительных молекул, в частности заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности провоспалительных цитокинов. В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности ИЛ-8, ИЛ-12p70, ИЛ-23, TNF- α , ИЛ-1 β и/или ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-23, TNF- α , ИЛ-1 β и/или ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимулировании иммунного ответа путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-8, ИЛ-12p70, ИЛ-23, TNF- α , ИЛ-1 β и/или ИЛ-6.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-1 β . ИЛ-1 β представляет собой провоспалительный цитокин [N14]. Продукция и секреция ИЛ-1 β регулируется инфламмасомой, белковым комплексом, который связан с активацией воспалительной

реакции [N15]. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию ИЛ-1 β , композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии ИЛ-1 β . В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности ИЛ-1 β . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-1 β .

Примеры также показывают, что введение композиций по изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-23. ИЛ-23 был связан с воспалением [N16,N17]. Предполагаемые функции ИЛ-23 в иммунном ответе включают стимулирование пролиферации CD4⁺ Т-клеток памяти и стимуляцию секреции ИФН- γ дендритными клетками (ДК) [N18]. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию ИЛ-23, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии ИЛ-23. В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности ИЛ-23. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-23. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для стимулирования иммунного ответа путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-23.

Примеры показывают, что введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии фактора некроза опухолей альфа (TNF- α). TNF- α представляет собой провоспалительный цитокин, который, как известно, участвует в различных сигнальных путях, способствующих гибели клеток. TNF- α инициирует апоптоз путем связывания со своим когнатным рецептором TNFR-1, что приводит к каскаду событий расщепления в апоптотическом пути [N19]. TNF- α может также вызывать некроз через RIP киназозависимый механизм [N20]. Поскольку введение композиций по данному изобретению демонстрирует увеличение экспрессии TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, в частности, для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии TNF- α . В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний,

характеризующихся снижением экспрессии и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для лечения или профилактики заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для стимулирования иммунного ответа путем увеличения экспрессии и/или активности TNF- α .

Примеры также показывают, что введение композиций по изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-6. ИЛ-6 - провоспалительный цитокин, который вырабатывается во время воспаления и способствует дифференцировке наивных CD4⁺ Т-клеток и дифференцировке CD8⁺ Т-клеток в цитотоксические Т-клетки [N21]. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию ИЛ-6, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии ИЛ-6. В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для стимулирования иммунного ответа путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-6.

Betelli et al.[N22] сообщили, что ИЛ-6 ингибирует экспансию Treg. Поскольку примеры показывают, что композиции по данному изобретению могут увеличивать экспрессию ИЛ-6, композиции по данному изобретению могут избирательно уменьшать количество или процентное содержание Treg за счет увеличения экспрессии ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для иммуностимуляции путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-6. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для иммуностимуляции путем уменьшения количества или процентного содержания Treg.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стимуляция иммунной системы согласно данному изобретению включает активацию TLR5 или усиление активации TLR5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стимуляция иммунной системы согласно данному изобретению включает активацию TLR9 или усиление активации TLR9. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стимуляция иммунной системы согласно данному изобретению включает активацию TLR5 и TLR9 или усиление активации TLR9 и TLR5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, стимуляция иммунной системы согласно данному изобретению включает индукцию и/или усиление дифференцировки Т-клеток, таких как, но не ограничиваясь ими, Т-хелперные клетки и цитотоксические Т-клетки.

Сигнальные пути TLR завершаются активацией транскрипционного фактора ядерного фактора-каппаВ (NF-κB). NF-κB контролирует экспрессию ряда генов воспалительных цитокинов, включая TNF-α. Иммунная стимуляция вызывает, например, димеризацию TLR5, который впоследствии рекрутирует MyD88 и активирует протеинкиназы, включая IRAK1, IRAK2, IRAK4 и IRAK-M. Активация этих киназ приводит к ядерной локализации NF-κB, который является провоспалительным цитокином [N23].

Как показано в примерах, композиции по данному изобретению приводят к увеличению экспрессии NF-κB. Поскольку введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию провоспалительного цитокина NF-κB, композиции по данному изобретению могут быть полезны для стимуляции иммунного ответа. Кроме того, композиции по изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, в частности заболеваний, характеризующихся пониженной активацией иммунной системы, и/или заболеваний, которые излечиваются с помощью повышенного иммунного ответа. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве иммуностимулятора за счет повышения уровня и/или активности NF-κB. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения заболеваний, характеризующихся сниженной иммунной активацией, за счет повышения уровня и/или активности NF-κB. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения заболеваний, которые лечатся с помощью повышенного иммунного ответа, путем повышения уровня и/или активности NF-κB.

В частности, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активации NF-κB. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активации NF-κB.

Активация NF-κB важна для вызова врожденных иммунных ответов и последующего развития адаптивных иммунных ответов. Таким образом, агонисты TLR, такие как композиции по данному изобретению, вероятно, будут полезны в качестве адъювантов для лечения инфекционных заболеваний, аллергии и опухолей, способствуя как врожденным, так и адаптивным иммунным ответам. [xxiii]. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения инфекционных заболеваний, аллергии и/или опухолей. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения инфекционных заболеваний, аллергии и/или опухолей путем повышения уровня и/или активности NF-κB.

Примеры также демонстрируют, что композиции по данному изобретению способствуют дифференцировке Т-хелперных клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции дифференцировки Т-хелперных клеток и/или цитотоксических Т-лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, заболевание, которое лечат композициями по данному изобретению, не является раком.

Применение в качестве адъюванта вакцины

Примеры показывают, что введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии фактора некроза опухолей альфа (TNF- α). Известно, что TNF- α важен для ответа на вакцины. Например, было показано, что TNF- α необходим для эффективного ответа на вакцину при вакцинации пожилого населения против гриппа [N24]. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины при терапии гриппа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для усиления иммунного ответа против антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции для введения в комбинации с антигеном. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для введения пациенту незадолго до или после вакцинации.

Enterococcus gallinarum и, в частности, штамм MRx0518 имеют жгутики, и флагеллины могут быть агонистами TLR5. Агонисты TLR разрабатываются в качестве адъювантов вакцин для различных типов антигенов, особенно у пожилого населения [N25]. Также данные в примерах подтверждают, что флагеллин MRx0518 является агонистом TLR5. Следовательно, композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адъювантов вакцины, в частности, для вакцины, вводимой пожилым пациентам (например, возрастом старше 40, 50, 60, 70 или 80 лет), у которых может быть снижена активность иммунной системы. Передача сигналов TLR5 также играет ключевую роль в ассоциированных с возрастом ответах врожденного иммунитета [N26]. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции предназначены для усиления врожденного иммунного ответа. Хотя агонисты TLR5 разрабатываются в качестве адъювантов вакцин, все они получены из известных патогенов и/или являются синтетическими. Напротив, композиции по данному изобретению содержат комменсальные бактерии.

Примеры также показывают, что введение композиций по изобретению может

приводить к увеличению экспрессии ИЛ-6. Повышенная экспрессия ИЛ-6 была связана с реакциями на вакцины при многих заболеваниях. Например, ИЛ-6 продуцировался воспалительными моноцитами CD14⁺CD16⁻ после того, как взрослым вводили вакцину против гриппа [N27], и более высокие уровни ИЛ-6 были связаны с достижением ответа на вакцину против гриппа [N28]. Кроме того, ИЛ-6 продуцировался после инъекции адьювантной системы AS03 [N29], и было продемонстрировано, что снижение регуляции ИЛ-6 у мышей снижает ответ Т-хелперных клеток после введения противотуберкулезной вакцины [N30]. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию ИЛ-6, композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины при терапии туберкулеза.

Кроме того, было продемонстрировано, что экспрессия ИЛ-6 и TNF- α коррелирует с эффективностью терапевтической вакцины против ВИЧ [Huang et al], вакцины против туберкулеза и вакцины против хламидиоза [N31]. Su et al. [N32] показали, что совместная инокуляция ИЛ-6 или TNF- α с FMDV ДНК-вакциной приводила к увеличению экспрессии ИФН- γ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, более высокой экспрессии ИЛ-4 в CD4⁺ Т-клетках и более высокому антиген-специфическому цитотоксическому ответу. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию ИЛ-6 и TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения в качестве адьюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения в качестве адьюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности ИЛ-6. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения в качестве адьюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности TNF- α и ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины при терапии ВИЧ. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины при терапии хламидиоза.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-1 β . Li et al. [N33] показали, что адьювант гидроксид алюминия активировал секрецию ИЛ-1 β , и предположили, что сам ИЛ-1 β может действовать как адьювант. Поскольку было показано, что введение композиций по

данному изобретению увеличивает экспрессию ИЛ-1 β , композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адъюванта вакцины. Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может увеличивать соотношение CD8⁺ Т-клеток к Treg. Продemonстрировано, что адъюванты стимулируют CD8⁺ Т-клетки [N34], и, поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает соотношение CD8⁺ Т-клеток к Treg, композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины путем увеличения соотношения CD8⁺ Т-клеток к Treg.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии или уровней CXCR3 лигандов CXCL9 и CXCL10. Все известные адъюванты, такие как ASO3, CpG, GLA-SE, α GalCer увеличивают CXCL9 и 10 [N35,N36], что дает основание предполагать, что композиции по данному изобретению будут эффективны в качестве адъювантов. Кроме того, CXCL9 и 10 связаны с ответами ИФН γ /Th1 и стимулируют ответы антител [N37]. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для использования для стимуляции ответа антител против антигена, в частности, патогенного или ракового антигена. Кроме того, CXCL9 является более чувствительным показателем, чем ИФН- γ , для индуцированных вакциной Т-клеточных ответов у добровольцев, получавших исследуемые вакцины против малярии [N38]. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для использования для стимуляции Т-клеточного ответа антител против антигена, в частности, патогенного или ракового антигена. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины за счет повышения уровня и/или активности CXCL9 и CXCL10. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции предназначены для применения при защите от малярии.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии или уровней ИЛ-12p70. Этот эффект был связан с эффективностью адъюванта вакцины, и ИЛ-12 был предложен в качестве самого адъюванта [N39], что дает основание предполагать, что композиции по данному изобретению будут эффективны в качестве адъювантов. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины за счет повышения уровня и/или активности ИЛ-12p70.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, при применении в качестве адъюванта вакцины композиции по данному изобретению будут вводить сами по

себе, чтобы обеспечить адъювантный эффект для антигена, который вводился пациенту отдельно. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композицию по данному изобретению вводят перорально, тогда как антиген вводят парентерально.

Композиции по данному изобретению можно использовать для усиления иммунного ответа на любой полезный антиген. Примеры антигенов для применения в изобретении включают: вирусные антигены, такие как вирусные поверхностные белки; бактериальные антигены, такие как белковые и/или сахаридные антигены; грибковые антигены; паразитарные антигены; и опухолевые антигены. Изобретение особенно полезно для вакцин против вируса гриппа, ВИЧ, анкилостомоза, вируса гепатита В, вируса простого герпеса, бешенства, респираторно-синцитиального вируса, цитомегаловируса, *Staphylococcus aureus*, хламидиоза, коронавируса SARS, вируса ветряной оспы, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, вируса Эпштейна-Барр, вируса папилломы человека и *т. д.* Другие антигены для применения в данном изобретении включают гликопротеиновые и липогликановые антигены, антигены архей, антиген Е меланомы (MAGE), карциноэмбриональный антиген (CEA), MUC-1, HER2, сиалил-Tn (STn), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), ген опухоли Вильмса (WT1), CA-125, простатоспецифический антиген (PSA, prostate-specific antigen), антигены вируса Эпштейна-Барр, неоантигены, онкобелки, амилоид-бета, Tau, PCSK9 и вещества, вызывающие привыкание, например никотин, алкоголь или опиаты.

Предпочтительные антигены для применения в данном изобретении включают антигены патогенов и опухолевые антигены. Антиген вызовет иммунный ответ, специфичный для антигена, который будет эффективен для защиты от инфицирования патогеном или для атаки опухоли. Антигенами могут быть, например, пептиды или полисахариды.

Изобретение также относится к применению: (i) водного препарата антигена; и (ii) композиции, содержащей бактериальный штамм из вида *Enterococcus gallinarum*, при производстве лекарственного средства для повышения иммунного ответа у пациента.

Иммунный ответ, вызываемый этими способами и применениями, обычно будет включать выработку антител, предпочтительно выработку защитных антител.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum* сконструирован для презентирования антигена. Презентирование антигена на бактериальном штамме по данному изобретению может максимизировать иммуностимулирующую активность и дополнительно усиливать защитный иммунный ответ, генерируемый против антигена. Кроме того, производство и доставка терапевтических средств, содержащих антиген и бактерии по данному изобретению, таким образом могут быть более эффективными и действенными, чем когда каждый из антигена и композиции, содержащей бактериальный штамм, производятся и вводятся отдельно. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей бактериальный штамм

вида *Enterococcus gallinarum*, который презентрует антиген, например на своей клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция, содержащая бактериальный штамм, который презентует антиген, предназначена для применения в качестве антигена вакцины. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антиген получен из ВИЧ, анкилостомоза, вируса гепатита В, вируса простого герпеса, бешенства, респираторно-синцитиального вируса, цитомегаловируса, *Staphylococcus aureus*, хламидиоза, коронавируса SARS, вируса ветряной оспы, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, вируса Эпштейна-Барр или вируса папилломы человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антиген представляет собой гликопротеиновый антиген, липогликановый антиген, антиген архей, антиген Е меланомы (MAGE, melanoma antigen E), карциноэмбриональный антиген (CEA, Carcinoembryonic antigen), MUC-1, HER2, сиалил-Tn (STn), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), ген опухоли Вильмса (WT1), CA-125, простатоспецифический антиген (PSA, prostate-specific antigen), антигены вируса Эпштейна-Барр, неоантигены, онкобелки, бета-амилоид, Тау, PCSK9 или вызывающее привыкание вещество, такое как алкоголь, опиаты и т.п.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактерии по данному изобретению дополнительно экспрессируют один или более антигенов. Обычно антиген экспрессируется рекомбинантно и будет гетерологичен бактериям по данному изобретению. Следовательно, изобретение относится к бактериальному штамму вида *Enterococcus gallinarum*, который экспрессирует гетерологичный антиген. Антиген может быть частью полипептида слияния, экспрессируемого с одним или более полипептидами, гомологичными бактериям. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактерии экспрессируют антиген как неслитый полипептид. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей клетку бактериального штамма вида *Enterococcus gallinarum*, при этом клетка экспрессирует гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция предназначена для применения в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к клетке бактериального штамма вида *Enterococcus gallinarum*, при этом клетка экспрессирует гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетка предназначена для применения в качестве вакцины.

Примеры антигенов для применения в изобретении включают: вирусные антигены, такие как вирусные поверхностные белки; бактериальные антигены, такие как белковые и/или сахаридные антигены; грибковые антигены; паразитарные антигены; и опухолевые антигены. Дополнительные антигены для экспрессии в бактериальном штамме вида *Enterococcus gallinarum* включают гликопротеиновые и липогликановые антигены, антигены архей, антиген Е меланомы (MAGE, melanoma antigen E), карциноэмбриональный антиген (CEA, Carcinoembryonic antigen), MUC-1, HER2, сиалил-

Tn (STn), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), ген опухоли Вильмса (WT1), СА-125, простатоспецифический антиген (PSA, prostate-specific antigen), антигены вируса Эпштейна-Барр, неоантигены, онкобелки, бета-амилоид, Тау, PCSK9 и вещества, вызывающие привыкание, например никотин, алкоголь, опиаты и т.п.

Изобретение также может быть полезно для усиления ответа на вакцины против неинфекционных заболеваний, таких как повышенный холестерин (например, через антиген PCSK9).

Изобретение также может быть полезно для усиления ответа на вакцины против веществ, вызывающих привыкание, например никотина, алкоголя или опиатов.

Клеточная терапия

Терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T)

Примеры также показывают, что введение композиций по изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-6. Повышенная экспрессия ИЛ-6 коррелировала с ответом на терапию CD19 CAR-T хронического лимфоцитарного лейкоза. Увеличение сывороточного ИЛ-6 было связано с размножением CAR-T-клеток, тогда как ингибирование ИЛ-6 было связано с ингибированием пролиферации CAR-T-клеток [N40]. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию ИЛ-6, композиции по данному изобретению могут быть полезны в клеточной терапии, в особенности в терапии CAR-T-клетками. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в клеточной терапии. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в терапии CAR-T-клетками. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении хронического лимфолейкоза.

Было показано, что селективное истощение Treg повышает эффективность цитотоксических лимфоцитов [N41]. CAR-T-клетки являются подмножеством цитотоксических лимфоцитов, и поэтому считается, что избирательное истощение Treg является эффективным при терапии CAR-T-клетками. Поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению истощает Treg, композиции по данному изобретению могут быть полезны в клеточной терапии, в особенности в терапии CAR-T-клетками.

Следовательно, композиции по данному изобретению могут быть полезны в клеточной терапии, в частности, для усиления ответа на клеточную терапию.

Терапия мезенхимальными стволовыми клетками (MSC, mesenchymalstem cell)

Сообщалось, что терапия мезенхимальными стволовыми клетками (MSC) обладает иммуностимулирующими свойствами. Когда MSC обрабатывают LPS, они активируют провоспалительные цитокины ИЛ-6 и ИЛ-8, что вызывает повышенную пролиферацию В-клеток [N42]. Следовательно, поскольку было показано, что композиции по данному изобретению увеличивают экспрессию ИЛ-6, они могут быть полезны в комбинации с

терапией клетками MSC.

Терапия трансплантацией стволовых клеток

Сообщалось, что вместо применения недифференцированных стволовых клеток в терапии трансплантацией стволовых клеток, может быть полезным дифференцировать стволовые клетки до некоторой степени перед их трансплантацией. Например, Heng et al.[N43] сообщили, что кардиомиогенная дифференцировка стволовых клеток может быть полезной благодаря более высокой эффективности приживления, усиленной регенерации миоцитов и ускоренному восстановлению функции сердца. Поскольку введение композиций по данному изобретению инициировало дифференцировку нейронов в недифференцированных клетках нейробластомы, композиции по данному изобретению могут быть полезны для дифференцировки стволовых клеток в терапии трансплантацией стволовых клеток.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток - это трансплантация мультипотентных гемопоэтических стволовых клеток, обычно получаемых из костного мозга, периферической крови или пуповинной крови. Было показано, что колонизация кишечника Enterococci (*Enterococcus gallinarum* и *Enterococcus casseliflavus*) перед аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток приводит впоследствии к значительному увеличению 2-летней выживаемости пациентов благодаря снижению безрецидивной смертности [N44]. Следовательно, иммуномодулирующий эффект показанный в примерах, может быть полезен в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для улучшения выживаемости после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и, в частности, после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Композиции по данному изобретению могут быть полезны в комбинации с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Композиции по данному изобретению могут быть эффективными для усиления успешного ответа пациента на аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению вводят до трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению вводят после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для введения пациенту, которому запланирована трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для введения пациенту, перенесшему трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток.

«Старение» иммунной системы

Fulop et al.[N45] определили, что увеличение количества Treg клеток и уменьшение

количества В-клеток связано со старением в адаптивной иммунной системе. Следовательно, композиции по данному изобретению можно использовать для предотвращения или задержки старения иммунной системы. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в предотвращении старения иммунной системы. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при замедлении старения иммунной системы, характеризующегося увеличением количества Тreg-клеток. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при замедлении старения иммунной системы, характеризующегося уменьшением количества В-клеток. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при замедлении старения иммунной системы, характеризующегося увеличением количества Тreg-клеток и уменьшением количества В-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при замедлении старения иммунной системы за счет уменьшения количества Тreg-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при замедлении старения иммунной системы за счет увеличения количества В-клеток. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при замедлении старения иммунной системы за счет уменьшения количества Тreg-клеток и увеличения количества В-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении заболеваний, вызванных старением иммунной системы. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении заболеваний, связанных со старением, путем задержки и/или предотвращения старения иммунной системы.

Кроме того, было высказано предположение, что адъюванты вакцины могут преодолевать старение иммунной системы [N46]. Поскольку композиции по данному изобретению подходят для применения в качестве адъюванта вакцины, композиции по данному изобретению могут быть полезны для предотвращения или задержки старения иммунной системы. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины для задержки и/или предотвращения старения иммунной системы. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины, при этом композиции задерживают и/или предотвращают старение иммунной системы.

Заболевания, связанные со старением иммунной системы, включают сердечно-сосудистые заболевания, рак, сахарный диабет 2 типа [N47] и аутоиммунные расстройства

[N48].

Section 6.03 Режимы введения

Предпочтительно композиции по данному изобретению предназначены для введения в желудочно-кишечный тракт, чтобы обеспечить возможность доставки и/или частичной или полной колонизации кишечника бактериальным штаммом по изобретению. Обычно композиции по данному изобретению вводят перорально (включая сублингвально), но их можно вводить ректально или интраназально.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению можно вводить в виде пены, в виде спрея или геля.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению можно вводить в виде суппозитория, такого как ректальный суппозиторий, например в форме композиции на основе масла какао (какао-масла), синтетического твердого жира (например, суппоцира, витепсола), глицеро-желатина, полиэтиленгликоля или мыльного глицерина.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению можно вводить в желудочно-кишечный тракт через трубку, такую как назогастральный зонд, орогастральный зонд, желудочный зонд, трубка для еюностомии (J-трубки), посредством чрескожной эндоскопической гастростомии (ЧЭГ), или через порт, такой как порт-система в области грудной стенки, которая обеспечивает доступ к желудку, тонкой кишке, и другие подходящие порты доступа.

Композиции по данному изобретению можно вводить один раз или же их можно вводить последовательно как часть схемы лечения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению следует вводить ежедневно.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, лечение по данному изобретению сопровождается оценкой микробиоты кишечника пациента. Лечение может быть повторено, если доставка и/или частичная или полная колонизация штаммом по данному изобретению не достигается, так что эффективность не наблюдается, или лечение может быть прекращено, если доставка и/или частичная или полная колонизация успешны и эффективность наблюдается.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композицию по данному изобретению можно вводить беременному животному, например, млекопитающему, такому как человек, с целью снижения вероятности развития заболевания у ребенка *in utero* матери и/или после его рождения.

Композиции по данному изобретению можно вводить пациенту, у которого диагностировано заболевание или состояние, опосредованное сниженной иммунной активностью, или который был идентифицирован как подверженный риску заболевания или состояния, опосредованного сниженной иммунной активностью. Композиции также можно вводить в качестве профилактической меры для предотвращения развития заболеваний или состояний, опосредованных снижением иммунной активности у здорового пациента.

Композиции по данному изобретению можно вводить пациенту, у которого была диагностирована недостаточная иммунная активность или который был идентифицирован как подверженный риску недостаточной иммунной активности. Например, у пациента может быть снижена или отсутствовать колонизация *Enterococcus*, и в особенности *Enterococcus gallinarum*.

Композиции по данному изобретению можно вводить в виде пищевого продукта, такого как пищевая добавка.

Как правило, композиции по данному изобретению предназначены для лечения людей, хотя их можно использовать для лечения животных, включая млекопитающих с однокамерным желудком, таких как домашняя птица, свиньи, кошки, собаки, лошади или кролики. Композиции по данному изобретению можно применять для повышения роста и производительности животных. При введении животным можно использовать принудительное кормление через зонд.

Section 6.04 Композиции

В общем случае композиция по данному изобретению содержит бактерии. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, композиция составлена в лиофилизированной форме. Например, композиция по данному изобретению может включать гранулы или желатиновые капсулы, например твердые желатиновые капсулы, содержащие штамм бактерий по данному изобретению.

Предпочтительно композиция по данному изобретению содержит лиофилизированные бактерии. Лيوфилизация бактерий - это хорошо отработанная процедура, и соответствующие руководства доступны, например, в справочных материалах [N49,N50].

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

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, композиция по данному изобретению инкапсулирована, чтобы обеспечить доставку бактериального штамма в кишечник. Инкапсуляция защищает композицию от деградации до доставки в целевую локацию за счет, например, разрушения вследствие химического или физического воздействия, такого как давление, ферментативная активность или физическая дезинтеграция, которое может быть обусловлено изменениями в pH. Можно использовать любой подходящий способ инкапсуляции. Типовые методики инкапсуляции включают включение в пористую матрицу, прикрепление или адсорбцию к поверхности твердого носителя, самоагрегацию посредством флокуляции или с перекрестно-сшивающими агентами и механическое удержание за микропористой мембраной или в микрокапсуле. Руководство по инкапсулированию, которое может быть полезно для приготовления композиций по данному изобретению, доступно, например, в ссылках [N51] и [N52].

Композицию можно вводить перорально, и она может иметь форму таблетки, капсулы или порошка. Инкапсулированные продукты предпочтительнее, поскольку

Enterococcus являются анаэробами. Можно включать другие ингредиенты (например, такие как витамин С) в качестве поглотителей кислорода и пребиотических субстратов для улучшения доставки и/или частичной или полной колонизации, а также выживаемости *in vivo*. В альтернативном варианте пробиотическую композицию по изобретению можно вводить перорально в качестве пищевого или питательного продукта, такого как ферментированный молочный продукт на основе молока или молочной сыворотки, или в виде фармацевтического продукта.

Композиция может быть приготовлена в виде пробиотика.

Композиция по изобретению содержит терапевтически эффективное количество бактериального штамма по изобретению. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма является достаточным для оказания благоприятного действия на пациента. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма может быть достаточным для доставки в кишечник пациента и/или частичной или полной колонизации кишечника.

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 другом примере от около 1×10^7 до около 1×10^{11} КОЕ; в другом примере от около 1×10^8 до около 1×10^{10} КОЕ; в другом примере от около 1×10^8 до около 1×10^{11} КОЕ.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, доза бактерий составляет по меньшей мере 10^9 клеток в день, например, по меньшей мере 10^{10} , по меньшей мере 10^{11} или по меньшей мере 10^{12} клеток в день.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит бактериальный штамм в количестве от около 1×10^6 до около 1×10^{11} КОЕ/г относительно массы 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.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, в которой количество бактериального штамма составляет от около 1×10^3 до около 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм по отношению к массе композиции.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, при этом композиция вводится в дозе между от 500 мг до 1000 мг, между от 600 мг до 900 мг, между от 700 мг до 800 мг, между от 500 мг до 750 мг или между от 750 мг до 1000 мг. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, при этом лиофилизированные бактерии в фармацевтической композиции вводятся в дозе между от 500 мг до 1000 мг, между от 600 мг до 900 мг, между от 700 мг до 800 мг, между от 500 мг до 750 мг или между от 750 мг до 1000 мг.

Как правило, пробиотик, такой как композиция по данному изобретению, необязательно комбинируют с по меньшей мере одним подходящим пребиотическим соединением. Пребиотическое соединение обычно представляет собой неперевариваемый углевод, такой как олиго- или полисахарид, или сахарный спирт, который не расщепляется и не всасывается в верхней части пищеварительного тракта. Известные пребиотики включают коммерческие продукты такие как инулин и трансгалакто-олигосахариды.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, пробиотическая композиция по данному изобретению содержит пребиотическое соединение в количестве от около 1 до около 30% по массе относительно общей массы композиции (например, от 5 до 20% по массе). Углеводы могут быть выбраны из группы, состоящей из фрукто-олигосахаридов (или ФОС), короткоцепочечных фрукто-олигосахаридов, инулина, изомальт-олигосахаридов, пектинов, ксило-олигосахаридов (или КОС), хитозан-олигосахаридов (или ХОС), бета-глюканов, модифицированных аравийской камедью и устойчивых крахмалов, полидекстрозы, D-тагатозы, волокон акации, рожкового дерева, овса и волокон цитрусовых. В одном аспекте пребиотики представляют собой короткоцепочечные фрукто-олигосахариды (для упрощения называемые в данном документе ФОСк-ц.у.); указанные ФОСк-ц.у. являются неперевариваемыми углеводами, в общем случае получаемыми посредством превращения свекольного сахара и включения молекулы сахарозы, к которой присоединяют три молекулы глюкозы.

Композиции по данному изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители. Примеры таких подходящих эксципиентов можно найти по ссылке [N53]. Приемлемые носители или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области и описаны, например, в ссылке [N54]. Примеры подходящих носителей включают лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и т. п. Примеры подходящих разбавителей включают этанол, глицерин и воду. Выбор фармацевтического носителя, эксципиента или разбавителя можно осуществлять в соответствии с предполагаемым путем введения и стандартной фармацевтической практикой. Фармацевтические композиции могут содержать в качестве эксципиента или разбавителя, или в дополнение к ним любые подходящие связующие вещества, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, вещества для пленочного покрытия, солюбилизующие агенты. Примеры подходящих связующих веществ включают крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза, безводная лактоза, лактоза, препятствующая слеживанию и комкованию, бета-лактоза, кукурузные подсластители, природные и синтетические камеди, такие как аравийская камедь, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу и полиэтиленгликоль. Примеры подходящих смазывающих веществ включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т.п. В фармацевтической композиции могут присутствовать консерванты, стабилизаторы, красители и даже ароматизирующие агенты. Примеры консервантов включают бензоат

натрия, сорбиновую кислоту и сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты. Также можно использовать антиоксиданты и суспендирующие агенты.

Композиции по данному изобретению можно готовить в виде пищевого продукта. Например, пищевой продукт может иметь питательную ценность помимо терапевтического эффекта по данному изобретению, например, как в пищевой добавке. Аналогично, пищевой продукт можно приготовить, чтобы усилить вкус композиции по данному изобретению или чтобы сделать композицию более привлекательной для употребления за счет большей схожести с обычным пищевым продуктом, чем с фармацевтической композицией. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композицию по данному изобретению готовят в виде продукта на основе молока. Термин «продукт на основе молока» означает любой жидкий или полутвердый продукт на основе молока или молочной сыворотки, имеющий разное содержание жира. Продукт на основе молока может представлять собой, например, коровье молоко, козье молоко, овечье молоко, сепарированное молоко, цельное молоко, молоко, восстановленное из сухого молока и сыворотки без какой-либо обработки, или обработанный продукт, такой как йогурт, свернувшееся молоко, творог, кислое молоко, кислое цельное молоко, кефир и другие кисломолочные продукты. Другая важная группа включает молочные напитки, такие как напитки на основе молочной сыворотки, ферментированное молоко, сгущенное молоко, молоко для младенцев или детей; молоко с вкусовыми наполнителями, мороженое; молокосодержащие пищевые продукты, такие как конфеты.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут содержать один бактериальный штамм или вид и могут не содержать любые другие бактериальные штаммы или виды. Такие композиции могут содержать только *de minimis* или биологически нерелевантные количества других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут представлять собой культуру, которая практически не содержит другие виды организмов.

Для композиций для применения в соответствии с изобретением может требоваться разрешение на продажу или нет.

В некоторых случаях лиофилизированный бактериальный штамм восстанавливают перед введением. В некоторых случаях восстановление осуществляют с помощью разбавителя, описанного в данном документе.

Композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты, разбавители или носители.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: бактериальный штамм по данному изобретению; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение

относится к фармацевтической композиции, содержащей: бактериальный штамм по данному изобретению; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предотвращения заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: бактериальный штамм по данному изобретению; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предотвращения заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: бактериальный штамм по данному изобретению; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предотвращения заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: бактериальный штамм по данному изобретению; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предотвращения заболевания или состояния, опосредованного провоспалительными цитокинами, такими как ИЛ-1 β , TNF- α , MIP-3 α , ИЛ-23 или ИЛ-6. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: бактериальный штамм по данному изобретению; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предотвращения заболевания или состояния, опосредованного TNF- α .

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, в которой количество бактериального штамма составляет от около 1×10^3 до около 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм по отношению к массе композиции.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, при этом композицию вводят в дозе 1 г, 3 г, 5 г или 10 г.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, при этом композиция вводится способом, выбранным из группы, состоящей из перорального, ректального, подкожного, назального, буккального и сублингвального введений.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, содержащей носитель, выбранный из группы, состоящей из лактозы, крахмала, глюкозы, метилцеллюлозы, стеарата магния, маннита и сорбита.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, содержащей разбавитель, выбранный из группы, состоящей из этанола, глицерина и воды.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, содержащей эксципиент, выбранный из группы, состоящей из крахмала, желатина, глюкозы, безводной лактозы, лактозы, препятствующей слеживанию и комкованию, бета-лактозы, кукурузного подсластителя, аравийской камеди, трагаканта, альгината натрия, карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленгликоля, олеата натрия, стеарата натрия, стеарата магния, бензоата натрия, ацетата натрия и хлорида натрия.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, дополнительно содержащей по меньшей мере одно из консерванта, антиоксиданта и стабилизатора.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, содержащей консервант, выбранный из группы, состоящей из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров п-гидроксибензойной кислоты.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, при этом указанный бактериальный штамм лиофилизирован.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, при этом когда композиция хранится в герметичном контейнере при температуре около 4°C или около 25 °C, и контейнер помещается в атмосферу имеющую относительную влажность 50%, по меньшей мере 80% бактериального штамма, измеренного в колониеобразующих единицах, остается после периода, составляющего по меньшей мере около: 1 месяца, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 1,5 лет, 2 лет, 2,5 лет или 3 лет.

Section 6.05 Способы культивирования

Бактериальные штаммы для применения в данном изобретении можно культивировать, используя стандартные методики микробиологии, подробно описанные, например, в ссылках [N55,,N56].

Твердой или жидкой средой, используемой для культивирования, может быть агар YCFA или среда YCFA. Среда YCFA может содержать (на 100 мл, приблизительные значения): Казитон (1,0 г), дрожжевой экстракт (0,25 г), NaHCO_3 (0,4 г), цистеин (0,1 г), K_2HPO_4 (0,045 г), KH_2PO_4 (0,045 г), NaCl (0,09 г), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,09 г), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,009 г), CaCl_2 (0,009 г), резазурин (0,1 мг), гемин (1 мг), биотин (1 мкг), кобаламин (1 мкг), *n*-аминобензойную кислоту (3 мкг), фолиевую кислоту (5 мкг) и пиридоксамин (15 мкг).

Section 6.06 Бактериальные штаммы для применения в вакцинных композициях

Авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы по данному изобретению полезны для лечения или профилактики заболеваний или состояний,

связанных со снижением иммунной активности. Вероятно, это является результатом действия, которое бактериальные штаммы по изобретению оказывают на иммунную систему хозяина. Следовательно, композиции по данному изобретению также могут быть полезны для предотвращения заболеваний или состояний при введении в виде вакцинных композиций. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, бактериальные штаммы по данному изобретению также могут быть убитыми, инактивированными или ослабленными. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, композиции могут содержать адъювант вакцины. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции предназначены для введения путем инъекции, например путем подкожной инъекции.

Section 6.07 Общие положения

При практической реализации данного изобретения применяют, если не указано иное, традиционные методы химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии в рамках компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. См., *например*, ссылки [N57] и [N58, N59], etc.

Термин «содержащий» охватывает значение «включающий», а также «состоящий из», например композиция, «содержащая» X, может состоять исключительно из X или же может содержать некоторые дополнительные элементы, например X+Y.

Термин «около» в связи с числовым значением x является необязательным и означает, например $x \pm 10\%$.

Выражение «по существу» не исключает значение «полностью», например композиция, которая «по существу свободна» от Y, может быть полностью свободной от Y. При необходимости, выражение «по существу» может быть исключено из определения по изобретению.

Ссылки на процент идентичности последовательности между двумя нуклеотидными последовательностями означают, что при выравнивании этот процент нуклеотидов является одинаковым при сравнении двух последовательностей. Такое выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательности можно определять, используя программное обеспечение, известное в данной области техники, например описанное в разделе 7.7.18 ссылки [N60]. Предпочтительное выравнивание определяют по алгоритму поиска гомологии Смита - Уотермана, используя аффинный поиск гэпов со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продление гэпа 2, матрицу BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита - Уотермана описан в ссылке [N61].

Если специально не указано иное, процесс или способ, содержащий ряд этапов, может содержать дополнительные этапы в начале или конце способа или может содержать дополнительные промежуточные этапы. Также этапы могут быть объединены, исключены или проведены в альтернативном порядке в случае необходимости.

В данном документе описаны различные варианты реализации. Следует понимать, что признаки, установленные в каждом варианте реализации, можно комбинировать с другими установленными признаками, чтобы обеспечить дополнительные варианты

реализации. В частности, варианты осуществления данного изобретения, описанные в данном документе как подходящие, типичные или предпочтительные, можно комбинировать друг с другом (за исключением случаев, когда они взаимоисключающие).

СПОСОБЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Section 7.01 Пример 1 - Эффективность бактериального инокулята на мышинных моделях рака

Краткое содержание

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

Материалы

Тестируемое вещество - Бактериальный штамм № MRx0518.

Эталонное вещество - Анти-CTLA-4 антитело (клон: 9H10, каталог: BE0131, изотип: IgG1 сирийского хомяка, Bioxcell).

Носители исследуемых и контрольных веществ - Бактериальная культуральная среда (среда с дрожжевым экстрактом, казитоном, жирными кислотами (YCFA)). При ежедневной инъекции мышам антитело разбавляли ФСБ (PBS - phosphate-buffered saline) (ссылка: BE14-516F, Lonza, Франция).

Лечебные дозы - Бактерии: 2×10^8 в 200 мкл. Анти-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 массой 20 г будет вводиться 200 мкл тестируемого вещества) в соответствии с самой последней массой тела мышей.

Пути введения - Бактериальный инокулят вводили через желудочный зонд (per os, ПО) через канюлю. Канюли обеззараживали каждый день. Анти-CTLA-4 вводили в брюшную полость мышей (внутрибрюшинно, ВБ).

Условия культивирования бактериального штамма - Условия культивирования бактериального штамма были следующими:

Переносили пипеткой 10 мл YCFA (из подготовленных лабораторных бутылок E&O на 10 мл) в пробирки Хангейта

Закрывали пробирки и продували их CO₂, используя шприцевую систему ввода и вывода

Автоклавировали пробирки Хангейта

После охлаждения инокулировали пробирки Хангейта 1 мл исходной культуры в глицерине

Помещали пробирки в статический инкубатор 37°C на около 16 часов

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

Помещали их в статический инкубатор 37°C на от 5 до 6 часов

Линия раковых клеток и условия культивирования -

Используемые клеточные линии подробно описаны в таблице ниже:

Клеточная линия	Тип	Мышиный	Происхождение
-----------------	-----	---------	---------------

		штамм	
EMT-6	Карцинома молочной железы	BALB/c	ATCC
LL/2 (LLC1)	Карцинома легкого	C57BL/6	ATCC CRL1642
Hepa1 -6	Гепатоцеллюлярная карцинома	C57BL/6	IPSEN INNOVATION
RENCA	Аденокарцинома почек	BALB/c	ATCC

Клеточная линия EMT-6 была получена из трансплантируемой мышинной карциномы молочной железы, которая возникла у мышей BALB/cCRGL после имплантации гиперпластического альвеолярного узла молочной железы [N62].

Клеточная линия LL/2 (LLC1) была получена из легкого мыши C57BL/6, несущего опухоль, возникшую в результате имплантации первичной карциномы легкого Льюиса [N63].

Клеточная линия Нера 1-6 является производной гепатомы мыши BW7756, которая возникла у мыши C57/L [N64].

Условия культивирования клеток - Все клеточные линии выращивали в виде монослоя 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% фетальной бычей сыворотки (ссылка: № 3302, Lonza)
LL/2 (LLC1)	RPMI 1640, содержащая 2 mM L-глутамин (ссылка: BE12-702F, Lonza)	10% фетальной бычей сыворотки (ссылка: № 3302, Lonza)
Hepa1 -6	DMEM (ссылка: 11960-044, Gibco)	10% фетальной бычей сыворотки (ссылка: № 3302, Lonza) 2 mM L-глутамин пенициллин-стрептомицин (Sigma G-6784)
RENCA	DMEM	10% фетальной бычей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 1 мкг/мл пуромицина

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

Использование животных -

Здоровые самки мышей BALB/C (BALB/cByJ) соответствующей массы и возраста были получены из CHARLES RIVER для модельных экспериментов EMT6 и RENCA.

Здоровые самки мышей C57BL/6 (C57BL/6J) соответствующей массы и возраста были получены из CHARLES RIVER (L'Arbresles) для модельных экспериментов LL/2(LLC1) и Hepa1-6.

Животных поддерживали в состоянии здоровья SPF в соответствии с рекомендациями FELASA, а условия содержания животных и экспериментальные процедуры выполнялись в соответствии с французскими и европейскими правилами и Руководством NRC по уходу и использованию лабораторных животных [N65,N66]. Животных содержали в жилых помещениях в контролируемых условиях окружающей среды: Температура: 22 ± 2 °C, влажность $55 \pm 10\%$, фотопериод (12 часов света/12 часов темноты), воздух фильтрованный через HEPA, 15 воздухообменов в час без рециркуляции. Вольеры для животных были обеспечены стерильным и адекватным пространством с подстилкой, пищей и водой, а также обогащенной окружающей и социальной средой (групповое размещение), как описано: клетки площадью 900 см² (ссылка: green, Tecniplast) в вентилируемых стеллажах, подстилка Epicea (SAFE), 10 кГр облученная диета (A04-10, SAFE), полное питание для иммунокомпетентных грызунов - экструдат R/M-H, вода из бутылок с водой.

Экспериментальный дизайн и варианты лечения

Противоопухолевое действие, модель EMT6

График лечения - Начало первого дозирования рассматривалось как день D0. В D0 непривитые мыши были рандомизированы в соответствии с их индивидуальной массой тела на группы по 9/8 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, г. Кутернон, Франция). В D0 мыши получали носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм. В D14 всем мышам прививали опухолевые клетки EMT-6, как описано ниже. В D24 мыши из группы положительного контроля получали лечение анти-CTLA-4 антителами.

График лечения представлен в таблице ниже:

Группа	Колич. животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	8	Не получ. леч.	-	-	-
2	8	Носитель (среда)	-	ПО	Q1Dx42
3	9	Бактериальный штамм № 1 (MRx0518)	2×10^8 бактерий	ПО	Q1Dx42
4	8	Анти-CTLA4	10 мг/кг	ВБ	TWx2

Наблюдение за животными проводили, как описано ниже.

Индукция опухолей EMT6 у животных - В D14 опухоли индуцировали подкожной

инъекцией 1×10^6 клеток ЕМТ-6 в 200 мкл RPMI 1640 в правый бок мышей.

Эвтаназия - Каждую мышь умерщвляли, когда она достигла гуманной конечной точки, как описано ниже, или максимум через 6 недель после начала дозирования.

Противоопухолевое действие, модель LL/2 (LLC1)

График лечения - Начало первого дозирования рассматривалось как день Д0. В Д0 непривитые мыши были рандомизированы в соответствии с их индивидуальной массой тела в 7 групп по 9/8 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, г. Кутернон, Франция). В Д0 мыши получали носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм. В Д14 всем мышам прививали опухолевые клетки LL/2, как описано ниже. В Д27 мыши из группы положительного контроля получали лечение анти-CTLA-4 антителами.

График лечения представлен в таблице ниже:

Группа	Колич. животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	8	Не получ. леч.	-	-	-
2	9	Носитель (среда)	-	ПО	Q1Dx42
3	9	Бактериальный штамм № 1 (MRx0518)	2×10^8 бактерий	ПО	Q1Dx42
4	8	Анти-CTLA4	10 мг/кг	ВБ	TWx2

Наблюдение за животными проводили, как описано ниже.

Индукция опухолей LL/2 (LLC1) у животных - В Д14 опухоли индуцировали подкожной инъекцией 1×10^6 клеток LL/2 (LLC1) в 200 мкл RPMI 1640 в правый бок мышей.

Эвтаназия - Каждую мышь умерщвляли, когда она достигла гуманной конечной точки, как описано ниже, или максимум через 6 недель после начала дозирования.

Противоопухолевое действие, модель Нера1-6

График лечения - Начало первого дозирования рассматривалось как день Д0. В Д0 непривитые мыши были рандомизированы в соответствии с их индивидуальной массой тела в 7 групп по 9 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, г. Кутернон, Франция). В Д0 мыши получали носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм. В Д14 всем мышам прививали опухолевые клетки Нера 1-6, как описано ниже. В Д16 мыши из группы положительного контроля получали лечение анти-CTLA-4 антителами.

График лечения представлен в таблице ниже:

Группа	Колич. животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	9	Не получ. леч.	-	-	-

2	9	Носитель (среда)	-	ПО	Q1Dx42
6	9	Бактериальный штамм № 4 (MRx0518)	2×10^8 бактерий	ПО	Q1Dx42
7	9	Анти-CTLA4	10 мг/кг	ВБ	TWx2

Наблюдение за животными проводили, как описано ниже.

Ортотопическая индукция опухолевых клеток Нера 1-6 у животных посредством внутриселезеночной инъекции - В Д0 один миллион (1×10^6) опухолевых клеток Нера 1-6 в 50 мкл среды RPMI 1640 трансплантировали мышам посредством внутриселезеночной инъекции. Вкратце, был сделан небольшой разрез на левом подреберье и выведена селезенка. Селезенку выводили на стерильный марлевый тампон и вводили под визуальным контролем суспензию клеток с помощью иглы 27-го калибра. После инокуляции клеток селезенку иссекали.

Эвтаназия - Каждую мышь умерщвляли, когда она достигла гуманной конечной точки, как описано в разделе ниже, или максимум через 6 недель после начала дозирования.

Оценка опухолевой нагрузки при эвтаназии - Во время окончания лечения, печени собирали и взвешивали.

Противоопухолевое действие, модель RENCA

График лечения - Начало первого дозирования рассматривалось как день Д0. В Д0 непривитые мыши были рандомизированы в соответствии с их индивидуальной массой тела в группы по 12 мышей. В Д0 мыши получали носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм (2×10^8 в 100 мкл, ПО). В Д14 всем мышам прививали опухолевые клетки RENCA, инъецированные ПК в левую заднюю часть бока, как описано ниже. Лечение анти-CTLA-4 (клон 9Д9, 10 мг/кг, ВБ) и анти-PDL1 (клон 10F.9G2, 10 мг/кг, ВБ) начинали в Д17.

График лечения представлен в таблице ниже:

Группа	Колич. животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	12	Не получ. леч.	-	-	-
2	12	Носитель (среда)	-	ПО	QD
3	12	Бактериальный штамм (MRx0518)	2×10^8 бактерий	ПО	QD
4	12	Паклитаксел	15 мг/кг	ВБ	Q4D (каждые четыре дня)
5	12	Анти-CTLA4+Анти- PDL1	10 мг/кг+ 10 мг/кг	ВБ	BIW (дважды в неделю) С

					дня 3
--	--	--	--	--	-------

Наблюдение за животными проводили, как описано ниже.

В Д14 (после 2 недель бактериального дозирования/предварительного лечения) 5×10^5 жизнеспособных клеток в 100 мкл PBS вводили подкожно в левый задний бок каждой мыши (которую стерилизовали хирургическим спиртом), по 1 шприцу и игле на мыш. Места имплантации брили за день до имплантации клеток.

Эвтаназия - Каждую мышь умерщвляли, когда она достигла гуманной конечной точки, как описано в разделе ниже, или максимум через 6 недель после начала дозирования.

Оценка опухолевой нагрузки при эвтаназии - Во время прекращения лечения опухоли собирали и оценивали их объем.

Мониторинг животных

Клинический мониторинг - Длину и ширину опухоли измеряли 2-3 раза в неделю штангенциркулем, и по этой формуле оценивали объем опухоли [N67]:

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

Гуманные конечные точки [N68]: Признаки боли, страдания или дистресса: поза боли, маска боли на морде, поведение; Опухоль, превышающая 10% нормальной массы тела, но не превышающая 2000 мм³; Опухоли, мешающие передвижению или питанию; Язвенная опухоль или эрозия тканей; 20% потеря массы тела остающаяся в течение 3 последовательных дней; Плохое состояние тела, изнурение, кахексия, обезвоживание; Длительное отсутствие произвольных реакций на внешние раздражители; Учащенное затрудненное дыхание, анемия, сильное кровотечение; Неврологические признаки: кружение, судороги, паралич; Стойкое снижение температуры тела; Вздутие живота.

Анестезия - Анестезия изофлурановым газом использовалась для всех процедур: хирургии или инокуляции опухоли, в/в инъекции, сбора крови. Анестезия кетаминот и ксилазином использовалась для хирургической процедуры стереотаксии.

Аналгезия - Протокол обезболивания карпрофеном или мультимодального обезболивания карпрофеном/бупренорфином был адаптирован к тяжести хирургической процедуры. Для всех болезненных процедур оказывалась немедикаментозная помощь. Кроме того, по рекомендации лечащего ветеринара оказывалась фармакологическая помощь, не мешающая исследованиям (топическое лечение).

Эвтаназия - Эвтаназию животных проводили путем передозировки газовой анестезии (изофлуран) с последующим смещением шейных позвонков или обескровливанием.

Результаты

Противоопухолевое действие, модель ЕМТ6

Результаты проиллюстрированы на Фиг. 1А. Лечение бактериальным штаммом по данному изобретению привело к четкому уменьшению объема опухоли по сравнению с

обоими отрицательными контролями. Положительный контроль также привел к уменьшению объема опухоли, как и ожидалось.

Для дальнейшего выяснения механизмов, посредством которых MRx0518 выражает свои терапевтические эффекты в моделях сингенной опухоли, был проведен анализ *ex vivo* в исследованиях модели сингенной опухоли ЕМТ6. 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 выяснить, влияет ли обработка MRx0518 на степень некроза, обнаруженного в опухолях ЕМТ6, парафиновые срезы опухолей из средней части живота окрашивали гематоксилином и эозином. Лечение MRx0518 мышинной модели карциномы молочной железы ЕМТ6 показала тенденцию к увеличению площади поперечного сечения некроза внутри опухоли (Фиг. 1В, верхняя вставка). Чтобы выяснить, влияет ли лечение MRx0518 на делящиеся клетки в опухоли, парафиновые срезы опухоли из средней части живота окрашивали пролиферационным белком Ki67 вместе с контрастированием DAPI для оценки процента делящихся клеток в опухоли ЕМТ6. Лечение MRx0518 мышинной модели карциномы молочной железы ЕМТ6 значительно снизила процент делящихся клеток, наблюдаемых в опухоли (Фиг. 1В, нижняя вставка, $P=0,019$).

Популяции иммунных клеток

Дальнейшее исследование микроокружения опухоли было проведено с помощью проточной цитометрии опухоли, чтобы изучить гипотезу о том, что бактериальный штамм MRx0518 обладает способностью регулировать иммунную систему, вызывая противоопухолевый эффект. Опухоли, удаленные из разных групп лечения, разрезали на части. Одна часть была подвергнута анализу проточной цитометрии. Для оценки относительного процента Т-лимфоцитов, присутствующих в опухолях, были использованы следующие маркеры: CD45, CD3, CD4, CD8, CD25 и FoxP3.

Предварительные данные проточной цитометрии, представленные на Фиг. 1С (и дополнительно подтвержденные описанными ниже данными, представленными на Фиг. 23), демонстрируют, что относительный процент лимфоцитов в опухолях был немного снижен как в группах, получивших лечение MRx0518, так и в группах, получивших лечение анти-CTLA-4, когда сравнивали соответственно с животными носителя или контрольными животными. Аналогичным образом, относительный процент клеток CD4⁺ оказался сниженным у животных, получивших лечение MRx0518 и анти-CTLA-4, в то время как относительный процент клеток CD8⁺ имел противоположную тенденцию в обеих группах, хотя и с разной величиной. Относительный процент CD4⁺FoxP3⁺ клеток был ниже в группе, получившей лечение анти-CTLA-4 по сравнению с небольшим снижением у животных, получивших лечение MRx0518; однако снижение относительного процента клеток CD4⁺CD25⁺ было заметно только в группе, получившей лечение анти-CTLA-4. Соотношение CD8⁺/FoxP3⁺ показало большее увеличение в группе, получившей лечение анти-CTLA-4, чем в группе животных MRx0518. Эти представленные в данном документе данные подтверждают гипотезу о том, что анти-CTLA-4 антитело нацелено на

регуляторные Т-клетки (Treg), уменьшая количество их клеток или ослабляя их супрессивную активность в опухолевой ткани, одновременно предполагая другой способ действия для MRx0518.

Дополнительное исследование микроокружения опухоли было выполнено с использованием анализа NanoString опухолевых тканей, чтобы исследовать, обладает ли бактериальный штамм MRx0518 способностью регулировать иммунную систему, индуцируя противоопухолевый эффект в модели EMT6. Собирали опухоли, иссеченные из групп, получивших носитель и лечение MRx0518. РНК экстрагировали из опухолевой ткани с использованием реагента TRIzol (ThermoFisher) с последующей очисткой с использованием набора RNeasy Mini (Qiagen), включая обработку ДНКазой I (Qiagen). Затем РНК использовали для анализа Nanostring с использованием панели PanCancer Mouse IO 360. Ранее были показаны характерные гены для различных популяций клеток, и их использовали для измерения численности этих популяций:

Тип клеток	Гены-маркеры
НК-клетки CD56dim	Il21r, Kir3dl1, Kir3dl2
Истощенные CD8	Cd244, Eomes, Lag3, Ptger4
ДК	Ccl2, Cd209e, Hsd11b1
Цитотоксические клетки	Ctsw, Gzma, Gzmb, Klrbl, Klrd1, Klrk1, Nkg7, Prf1
Макрофаги	Cd163, Cd68, Cd84, Ms4a4a
Т-клетки	Cd3d, Cd3e, Cd3g, Cd6, Sh2d1a, Tratl
Тучные клетки	Cpa3, Hdc, Ms4a2
Нейтрофилы	Ceacam3, Csf3r, Fcgr4, Fpr1
В-клетки	Blk, Cd19, Fcrlb, Ms4a1, Pnoc, Spiib, Tcl1, Tnfrsf17
НК клетки	Ncr1, Xcl1
CD45	Ptprc

Z-баллы для каждой популяции клеток были рассчитаны с использованием линейных оценок типа клеток, предоставленных анализом NanoString (Фиг. 23, тепловая карта).

Данные NanoString демонстрируют, что количество В-клеток, CD45, Т-клеток, цитотоксических и НК-клеток было увеличено в опухолевой ткани получившей лечение MRx0518 группы по сравнению с животными, получившей лечение носителем (Фиг. 23). Представленные в данном документе данные подтверждают гипотезу о том, что MRx0518 обладает иммуностимулирующим действием за счет увеличения лейкоцитов, в частности НК-клеток, Т-клеток и цитотоксических клеток в микроокружении опухоли.

Продукция цитокинов

Дополнительный кусочек опухоли использовали для экстракции общего белка и последующего анализа цитокинов вместе с образцами плазмы. Уровни белков ИЛ-10, CXCL1, CXCL2, CXCL10, ИЛ-1 β , ИЛ-17A, ГМКФС (GM-CSF), TNF- α , ИЛ-12p70 и ИФН- γ

в микроокружении опухоли анализировали с помощью технологии MagPlex. В то время как уровни ИЛ-17А и GM-CSF были ниже уровня обнаружения, все другие маркеры экспрессировались на умеренных уровнях (Фиг. 1D). Наблюдалась значимая разница между группой носителя и анти-CTLA-4 для ИФН- γ . Продукция иммунных маркеров ИЛ-10 и ИЛ-12p70 казалась сниженной после обработки MRx0518 по сравнению с контрольными обработками.

Уровни цитокинов также оценивали в плазме крови тех же животных. Уровни белков ИЛ-23, ИЛ-6, ИЛ-10, VEGF, CXCL1, CXCL2, CXCL10, ИЛ-2, ИЛ-1 β , ИЛ-17А, GM-CSF, TNF- α , ИЛ-12p70 и ИФН- γ анализировали с помощью технологии MagPlex. В целом, небольшая продукция цитокинов была обнаружена в плазме крови животных либо до индукции опухоли, либо в конце исследования (Фиг. 1E). VEGF и CXCL10 были обнаружены на значительных уровнях, в то время как ИЛ-23, ИЛ-6, ИЛ-10, CXCL1 и CXCL2 были обнаружены на низких уровнях. ИЛ-2, ИЛ-1 β , ИЛ-17А, GM-CSF, TNF- α , ИЛ-12p70 и ИФН- γ не были обнаружены в образцах. MRx0518 значительно увеличил продукцию ИЛ-6 в день 0. MRx0518, по-видимому, также увеличивает продукцию ИЛ-23. VEGF и CXCL10 были значительно подавлены в группе анти-CTLA-4 в день 22. Подобно результатам, продемонстрированным для популяций иммунных клеток, различия в продукции цитокинов в опухоли и плазме между MRx0518 и анти-CTLA-4 дают основание предполагать, что каждый из них действует по различному и потенциально комплементарному механизму.

Локализация CD8 α положительных клеток в подвздошной кишке

Криосрезы подвздошной кишки толщиной 10 мкм делали на криостате (CM 1950 Leica), переносили на предметные стекла с поли-L лизином. Затем срезы сушили на воздухе в течение 1 часа, фиксировали в течение 10 минут в ледяном метаноле, промывали PBS, блокировали 10% BSA в PBS pH 7,2 перед тем, как инкубировать в течение ночи с первичным антителом (крысиное-анти-мышинное CD8 α антитело, Sigma-Aldrich, Millipore).

На следующее утро предметные стекла промывали PBS и окрашивали вторичным антителом: козье-анти-крысиное антитело-Alexa488 (Molecular Probe, Invitrogen) в течение 1 часа при комнатной температуре. После еще одной стадии промывки предметные стекла контрастировали 4', 6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлоридом (DAPI) (Sigma-Aldrich, Millipore) и помещали в Vectashield (Vector Laboratories). Срезы просматривали и фотографировали с помощью микроскопа Zeiss Axioscope Microscope, оборудованного ртутной лампой, соответствующими фильтрами и апохроматическим объективом x20. Показаны примеры изображений, полученных со срезов животных получивших носитель, MRx0518 и анти-CTLA4 (Фиг. 1F - верхние вставки: окрашивание DAPI, нижние вставки: окрашивание CD8 α).

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

Группа	Количество проанализированных полей	Количество мышей
Наполнитель	53	5
MRx0518	70	7
Анти-CTLA4	71	8

Изображения оценивались следующим образом: поля с ≤ 3 положительными клетками оценивались как 0, а поля с более ≥ 3 клетками оценивались как 1. Результаты этого анализа представлены на (Фиг. 1G).

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

Это наблюдение согласуется с присутствием CD8⁺ Т-клеток в кишечнике в случае инфекции или воспалительного микроокружения как части иммунного ответа.

Противоопухолевое действие, модель LL/2 (LLC1)

Результаты продемонстрированы на Фиг. 2. Лечение бактериальным штаммом по данному изобретению привело к четкому уменьшению объема опухоли по сравнению с обоими отрицательными контролями.

Противоопухолевое действие, модель Нера1-6

Результаты показаны на Фиг. 3А. Не получивший лечение отрицательный контроль выглядит не так, как можно было бы ожидать, потому что масса печени в этой группе была ниже, чем в других группах. Однако группы отрицательного контроля с носителем и группы положительного контроля выглядят, как и следовало ожидать, поскольку у мышей, получивших лечение только носителем, печень больше, чем у мышей, получивших лечение анти-CTLA4 антителами, что отражает большую опухолевую нагрузку в группе отрицательного контроля с носителем. Обработка бактериальным штаммом по данному изобретению привела к явному снижению массы печени (и, следовательно, опухолевой нагрузки) по сравнению с мышами в группе отрицательного контроля с носителем.

Противоопухолевое действие, модель RENCA

Результаты продемонстрированы на Фиг. 3В. Лечение с помощью монотерапии MRx0518 уменьшило объем опухоли по сравнению с тестом/контролем на 51% (день 18) по сравнению с группами, получившими лечение носителем. Паклитаксел и анти-CTLA-4⁺ анти-PDL-1 продемонстрировали (почти) полное уменьшение размера опухоли в Д18 и Д22 по сравнению как с не получившими лечение группами, так и с группами носителя.

Эти данные показывают, что штамм MRx0518 может быть полезен для лечения или профилактики других заболеваний, связанных со сниженной активностью иммунной системы.

Section 7.02 Пример 2 - ПЦР-анализ генов

Чистую культуру бактерий MRx0518 исследовали с помощью ПЦР-анализа генов. В эксперименте было две группы: 1) MRx0518 совместно культивировали с клетками толстой кишки человека (CaCo2) для исследования воздействия бактерий на хозяина, и 2) MRx0518 совместно культивировали на клетках CaCo2, которые стимулировали ИЛ1, чтобы имитировать влияние бактерий в воспалительном окружении. Эффекты в обоих сценариях оценивались с помощью анализа экспрессии генов. Результаты приведены ниже:

Ген	Кратность изменения	Функция
CXCL3	28412,73	Лиганд CXCR2,
CXCL2	135,42	Лиганд CXCR2, гомология 90% с CXCL1.
CXCL9	34,76	Лиганд CXCR3, в первую очередь рассматриваемый как хемоаттрактант Th1-клеток (индуцируемый ИФН-γ)
ИЛ8	31,81	Цитокин, хемоаттрактант (особенно нейтрофилы), многие рецепторы, включая CXCR1 и CXCR2/
CXCL1	16,48	Лиганд CXCR2 стимулирует пролиферацию клеток, а также миграцию, сверхэкспрессия является нейропротекторной при ЕАЕ.
CD40	14,33	Костимулирующая молекула, путь Т-клеточной активации ДК.
TNF	13,50	Главный провоспалительный цитокин
ИЛ17C	12,18	Способствует антибактериальному ответу эпителия, синергетический с ИЛ-22,
CXCL10	10,66	Тесная гомология с CXCL9, предполагаемый также лиганд CXCR3?
HSPA1B	10,19	Белок теплового шока
NFKBIA	8,87	Передача сигналов NFκB; 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	Адгезионные соединения, плотные соединения
DUSP2	4,59	Противовоспалительная, инактивирует MAPK
ИЛ32	4,29	Провоспалительный цитокин, индуцированный ИФН-γ,

		ИЛ-18
DUSP5	3,12	Противовоспалительный, инактивирует MAPK
FOS	3,03	Факторы транскрипции, передача сигналов TLR, входит в состав AP-1
GADD45 B	2,89	Рост и пролиферация клеток
CLDN4	2,61	Плотные соединения
ADM	2,57	Передача сигналов NFκB
KLF10	2,49	Остановка роста клеток, передача сигналов TGF-β
DEFB4A	-2,34	Антимикробный пептид
APBA1	-2,53	Передача сигналов
IGFBP1	-2,72	Путь передачи сигналов
ИЛ28B	-2,73	ИФН-лямбда, противовирусная иммунная защита
ИЛ10	-3,38	Противовоспалительный цитокин
NR4A1	-5,57	Ядерный рецептор, противовоспалительный, регулятор пролиферации Т-клеток Дифференцировка Т-хелперных клеток
NOD2	-14,98	PRR, активатор инфламасом, способствует аутофагии
INOS	-26,88	Провоспалительный, генератор оксида азота

Эти данные, по-видимому, демонстрируют две сигнатуры экспрессии генов - лиганды CXCR1/2 (CXCL3, CXCL2, CXCL1, ИЛ-8), которые связаны с миграцией провоспалительных клеток, и лиганды CXCR3 (CXCL9, CXCL10), что более конкретно указывает на ответы типа ИФН-γ, также поддерживаемые ИЛ-32, который является ИФН-γ-индуцибельным. Эти данные дают основание предполагать, что композиции по данному изобретению полезны для стимуляции иммунной системы.

Section 7.03 Пример 3 - Исследование стабильности

Описанную в данном документе композицию, содержащую по меньшей мере один описанный в данном документе бактериальный штамм, хранят в герметично закрытом контейнере при 25°C или 4°C, а контейнер помещен в атмосферу, содержащую относительную влажность 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95%. Через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года, 2,5 года или 3 года должно оставаться по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или 90% бактериального штамма при измерении в колониеобразующих единицах по стандартному протоколу.

Section 7.04 Пример 4 - Продукция цитокинов незрелыми дендритными клетками, индуцированная MRx0518, по сравнению с MRx0518+LPS

Краткое содержание

В этом исследовании проверялось влияние бактериального штамма MRx0518 отдельно и в комбинации с липополисахаридом (LPS, lipopolysaccharide) на продукцию цитокинов в незрелых дендритных клетках.

Популяцию моноцитов выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) (PBMC, peripheral blood mononuclear cell). Затем моноцитарные клетки дифференцировались в незрелые дендритные клетки. Незрелые дендритные клетки высевали по 200 000 клеток/лунку и инкубировали с MRx0518 до конечной концентрации 10^7 /мл с необязательным добавлением LPS до конечной концентрации 100 нг/мл. Отрицательный контроль включал инкубирование клеток только со средой RPMI, а при положительных контролях инкубировали клетки с LPS в конечной концентрации 100 нг/мл. Затем анализировали содержание цитокинов в клетках.

Результаты

Результаты этих экспериментов можно увидеть на Фиг. 4a-d. Добавление только MRx0518 приводит к значительному увеличению уровня цитокинов ИЛ-6 и TNF- α по сравнению с отрицательным контролем (Фиг. 4a и c). Добавление LPS (положительный контроль) приводит к увеличению уровня ИЛ-6 и TNF- α по сравнению с отрицательным контролем, но не с ИЛ-1 β (Фиг. 4b). Комбинация MRx0518 и LPS приводила к синергическому увеличению уровня продуцируемого ИЛ-1 β (Фиг. 4d).

Вывод

MRx0518 обладает способностью индуцировать более высокую продукцию цитокинов ИЛ-6 и TNF- α в незрелых дендритных клетках. Комбинация LPS и MRx0518 может повышать уровни цитокинов ИЛ-1 β в незрелых дендритных клетках. Эти данные показывают, что MRx0518 сам по себе или в комбинации с LPS может увеличивать содержание воспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и TNF- α , что способствует воспалению.

Section 7.05 Пример 5 - Продукция цитокинов THP-1 клетками, индуцированная MRx0518, по сравнению с MRx0518+LPS

Краткое содержание

В этом исследовании проверялось влияние бактериального штамма MRx0518 отдельно и в комбинации с LPS на продукцию цитокинов в клетках THP-1, модельной клеточной линии для моноцитов и макрофагов.

Клетки THP-1 дифференцировали в среде M0 в течение 48 часов с помощью 5 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA). Эти клетки впоследствии инкубировали с MRx0518 в конечной концентрации 10^8 /мл с добавлением или без добавления LPS в конечной концентрации 100 нг/мл. Затем бактерии смывали и клетки инкубировали в нормальных условиях роста в течение 24 часов. Затем клетки центрифугировали и полученный супернатант анализировали на содержание цитокинов.

Результаты

Результаты этих экспериментов можно увидеть на Фиг. 5a-c. Добавление MRx0518 без LPS приводит к увеличению уровней цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и TNF- α по сравнению с

контрольными образцами без бактерий и с бактериальным осадком. Добавление LPS и MRx0518 приводит к синергетическому увеличению продукции цитокинов.

Вывод

MRx0518 обладает способностью индуцировать продукцию цитокинов в клетках ТНР-1, которая может быть синергетически повышена при добавлении LPS. Эти данные показывают, что MRx0518 сам по себе или в комбинации с LPS может увеличивать содержание воспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и TNF- α , что способствует воспалению.

Section 7.06 Пример 6 - Анализ цитокинов

Section 7.07 Введение

Section 7.08 Авторы изобретения стремились дополнительно проанализировать иммуностимулирующий эффект композиций по данному изобретению. Авторы изобретения проанализировали экспрессию конкретных цитокинов из макрофагов ТНР-1 и дендритных клеток, полученных из моноцитов, после обработки MRx0518. Макрофаги и дендритные клетки являются ключевыми компонентами врожденной иммунной системы, действуют как посредники между врожденной и адаптивной иммунными системами и вызывают рестимуляцию в кишечнике, где они выделяют различные цитокины для модуляции иммунного ответа.

Section 7.09 Были проанализированы цитокины, участвующие во врожденном иммунном ответе (TNF- α , ИЛ-12 и ИЛ-10), а также цитокины, участвующие в рекрутинге и активации адаптивных иммунных клеток (ИЛ-8, ИЛ-23, ИЛ-1 β и ИЛ-6).

Section 7.10 Методика

Section 7.11 Бактериальные штаммы

MRx0518

LPS использовали как положительный контроль

Результаты

Результаты продемонстрированы на Фиг. 6-13. MRx0518 индуцирует сильный и характерный иммуностимулирующий профиль в происходящих из ТНР-1 макрофагах и происходящих из моноцитов ДК. Цитокины, участвующие во врожденном иммунном ответе (TNF- α , ИЛ-12 и ИЛ-10), значительно индуцируются MRx0518 как в ДК, так и в макрофагах. MRx0518 вызывает очень сильную и значительную индукцию ИЛ-8 как в макрофагах, так и в ДК. MRX0581 вызывает очень сильную и значительную индукцию ИЛ-23 и ИЛ-6. MRx0518 также индуцировал ИЛ-1 β .

Обсуждение

Эти данные демонстрируют, что MRx0518 обладает иммуностимулирующими свойствами и может быть эффективной композицией для иммуностимуляции.

Пример 7 - Механизм действия

Дальнейшие эксперименты были проведены для определения характеристик механизма действия, с помощью которого MRx0518 стимулирует иммунную систему. Был выбран анализ сигнального репортера TLR5, данные представлены на Фиг. 14 и 15.

Супернатант MRx0518 был самым сильным активатором TLR5 и NF-κB. Кроме того, супернатант обрабатывали различными литическими ферментами, и было обнаружено, что трипсин нейтрализует большую часть активности.

Section 7.12 Пример 8 - Адъювантная иммуностимулирующая активность MRx0518 в терапевтической комбинации с ингибитором CTLA-4

Краткое содержание

В этом исследовании сравнивали противоопухолевую активность MRx0518, ингибитора CTLA-4 и терапевтических комбинаций MRx0518 с ингибитором CTLA-4 у мышей, несущих опухолевые клетки EMT-6.

Материалы

Тестовые и эталонные вещества - Бактериальный штамм № MRx0518; Анти-CTLA4 антитело (ссылка: BE0131, Bioxcell; клон: 9H10; реактивность: мышь; изотип: IgG1 хомяка; условия хранения: +4 °C).

Тестовые и эталонные вещества носителей - Бактерии MRx0518 выращивали в бактериальной культуральной среде (среда с дрожжевым экстрактом, казитоном, жирными кислотами (YCFA)) и хранили в виде исходной культуры в глицерине при -80 °C. Животным вводили дозу бактерий в соответствии с протоколом исследования. Анти-CTLA-4 антитела разбавляли PBS (ссылка: BE14-516F, Lonza, France) каждый день инъекции мышам.

Лечебные дозы - Бактерии: 2×10^8 в 200 мкл. Анти-CTLA4 антитела вводили в дозе 10 мг/кг массы тела в соответствии с последней массой тела мышей.

Пути введения - Бактериальную композицию вводили через желудочный зонд (per os, ПО) через зонд в объеме 200 мкл/инъекция. Анти-CTLA-4 антитела вводили в брюшную полость мышей (внутрибрюшинно, ВБ) в объеме 10 мл/кг, скорректированном с учетом последней индивидуальной массы тела мышей.

Линия раковых клеток и условия культивирования - В этом исследовании использовалась линия клеток EMT-6, полученная из ATCC (Американская коллекция типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния, США). Клеточная линия EMT-6 была получена из трансплантируемой мышью карциномы молочной железы, которая возникла у мышей BALB/cCRGL после имплантации гиперпластического альвеолярного узла молочной железы.

Опухолевые клетки выращивали в виде монослоя при 37°C в увлажненной атмосфере (5% CO₂, 95% воздуха). Культуральная среда представляла собой RPMI 1640, содержащую 2 mM L-глутамина (ссылка: BE12-702F, Lonza, г. Вербье, Бельгия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ссылка: 3302, Lonza). Опухолевые клетки EMT-6 прикрепляются к пластиковым колбам. Для экспериментального использования опухолевые клетки отделяли от культуральной колбы 5-минутной обработкой трипсин-версеном (ссылка: BE02-007E, Lonza) в среде Хэнкса без кальция или магния (ссылка: BE10-543F, Lonza) и нейтрализовали добавлением полной культуральной среды. Клетки подсчитывали и их жизнеспособность оценивали с помощью анализа исключения с 0,25%

трипановым синим.

Использование животных - Здоровые самки мышей BALB/C (BALB/cByJ) в возрасте 5-7 недель были получены от CHARLES RIVER (L'Arbresles) и поддерживались 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 NRC по уходу и использованию лабораторных животных. Животных содержали по 3-4 на клетку в жилых помещениях в контролируемых условиях окружающей среды: Температура: 22 ± 2 °C, влажность $55 \pm 10\%$, фотопериод (12 часов света/12 часов темноты), воздух фильтрованный через HEPA, 15 воздухообменов в час без рециркуляции. Вольеры для животных были обеспечены стерильным и адекватным пространством с подстилкой, пищей и водой, а также обогащенной окружающей и социальной средой (групповое размещение), как описано: Верхний фильтр, поликарбонатные клетки Евростандарта типа III или IV, подстилка на основе кукурузных початков (ссылка: LAB COB 12, SERLAB, Франция), облученный 25 кГр рацион (Ssniff® Soest, Германия), полноценный корм для иммунокомпетентных грызунов - экструдат R/MH, стерильный, фильтрованная на 0,2 мкм вода и обогащенная окружающая среда (SIZZLE-dri kraft - D20004 SERLAB, Франция). Животные индивидуально идентифицируются с помощью RFID-транспондера, и каждая клетка была помечена особым кодом. Лечение животных начинали после одной недели акклиматизации для партий 2 и 3 или после трех недель акклиматизации для партии 1.

Экспериментальный дизайн и варианты лечения

В день -14 (Д-14) непривитые мыши были рандомизированы в соответствии с их индивидуальной массой тела в 3 группы по 30 животных и 2 группы по 10 животных с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, г. Кутернон, Франция). Мышей разделили на 3 партии по 10 животных в каждой группе лечения (партия 1: 10 животных в группах 1, 2 и 3; партия 2: 10 животных в группах 1, 2 и 3; партия 3: 10 животных в группах 1 по 5) с разными точками окончания от начала исследования: Д-14 или Д0.

При окончании исследования партия 3 была разделена на 2 когорты, согласно окончанию исследования и графиков анализа FACS; они были смещены на 1 день: Д24/Д25. Таким образом, в каждой когорте животных было по 5 животных на группу лечения (4 животных из клетки один и одно животное из клетки 2). Основываясь на этических критериях, если объем опухоли превышал 1500 мм^3 , отбор животных для умерщвления в Д24 и Д25 основывался на объеме опухоли, а не на клетке. Схема эксперимента изображена на Фиг. 16А и кратко изложена ниже:

1) Партия 1 (группы 1, 2 и 3) начала лечение в Д0 и была забита в Д14 (10 животных образуют группы с 1 по 3). Они не получали опухолевые клетки и составляли исходную группу.

2) Партия 2 (группа 1, 2 и 3) начала лечение в Д-14 и была забита в Д7 (10 животных образуют группы с 1 по 3).

3) Партия 3 (группы 1 по 5) начала лечение в Д-14 и была забита в Д24/25 (10 животных образуют группы с 1 по 5). Лечение анти-CTLA-4 началось в Д10.

В день 0 (Д0) всем мышам партий 2 и 3 (окончание исследования в день 7 и 24/25 соответственно) прививали 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, которые были умерщвлены в Д14, не получили инъекции опухоли). Мышей лечили в соответствии со следующими схемами лечения групп (TWx2=два раза в неделю):

Группа	Колич. животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	30 = 10 партия 1 10 партия 2 10 партия 3	Не получившие лечение (+ Опухоль)	-	-	-
2	30 = 10 партия 1 10 партия 2 10 партия 3	Носитель (YCFA)	-	ПО	Ежедневно -14 до Д0 Ежедневно -14 до Д7 Ежедневно с -14 до Д24/25
3	30 = 10 партия 1 10 партия 2 10 партия 3	MRx0518	2×10^8	ПО	Ежедневно -14 до Д0 Ежедневно -14 до Д7 Ежедневно с -14 до Д24/25
4	10 партия 3	Анти-CTLA-4+YCFA	10 мг/кг	ВБ+ПО	TWx2 в Д10 Ежедневно YCFA -14 до Д24/25
5	10 партия 3	Анти-CTLA-4+MRx0518	10 мг/кг + 2×10^8 бактерий	ВБ+ПО	TWx2 в Д10 Бактерии Ежедневно от -14 до Д24/25

Мониторинг животных

Жизнеспособность и поведение животных регистрировали каждый день. Массу тела измеряли дважды в неделю. Длину и ширину опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем, и по этой формуле оценивали объем опухоли по следующей формуле:

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

Эффективность лечения оценивали по влиянию тестируемого вещества на объемы опухоли получивших лечение животных по сравнению с контрольными животными.

Следующие критерии оценки противоопухолевой эффективности определяли с использованием программного обеспечения Vivo Manager® (Biosystemes, г. Кутернон, Франция). Средние объемы опухолей в группах 1 по 5 показаны на Фиг. 16В. На протяжении всего исследования прогрессирование роста опухоли наблюдалось во всех группах, за исключением группы, получившей лечение MRx0518+анти-CTLA-4, где регрессия роста опухоли происходила с дня 14 после индукции опухоли. Лечение MRx0518+Анти-CTLA-4 значительно снижало рост опухоли по сравнению с группой, получившей лечение носителем, на день 21 и 24 после индукции опухоли. Комбинированное лечение MRx0518 с анти-CTLA-4 было наиболее эффективным для снижения роста опухоли у мышей BALB/c, несущих подкожно привитые опухоли EMT6. Эти данные демонстрируют, что MRx0518 обладает иммуностимулирующим действием.

Section 7.13 Пример 9 - Эффективность бактериального инокулята на мышинных моделях рака

Краткое содержание

В этом исследовании проверялась эффективность композиций, содержащих бактериальные штаммы согласно данному изобретению, на модели опухоли.

Материалы

Тестируемое вещество - Бактериальный штамм № MRx0554.

Эталонное вещество - Анти-CTLA-4 антитело (клон: 9H10, каталог: BE0131, изотип: IgG1 сирийского хомяка, Bioxcell).

Носители исследуемых и контрольных веществ - Бактериальная культуральная среда (среда с дрожжевым экстрактом, казитоном, жирными кислотами (YCFA - Yeast extract, Casitone, Fatty Acid medium)). При ежедневной инъекции мышам антитело разбавляли PBS (ссылка: BE14-516F, Lonza, Франция).

Лечебные дозы - Бактерии: 2×10^8 в 200 мкл YCFA. Анти-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 массой 20 г будет вводиться 200 мкл тестируемого вещества) в соответствии с самой последней массой тела мышей.

Пути введения - Бактериальный инокулят вводили через желудочный зонд (per os, ПО) через канюлю. Канюли обеззараживали каждый день. Анти-CTLA-4 вводили в брюшную полость мышей (внутрибрюшинно, ВБ).

Условия культивирования бактериального штамма - Условия культивирования бактериального штамма были следующими:

Переносили пипеткой 10 мл YCFA (из подготовленных лабораторных бутылок E&O на 10 мл) в пробирки Хангейта

Закрывали пробирки и продували их CO₂, используя шприцевую систему ввода и вывода

Автоклавировали пробирки Хангейта

После охлаждения инокулировали пробирки Хангейта 1 мл исходной культуры в глицерине

Помещали пробирки в статический инкубатор 37°C на около 16 часов

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

Помещали их в статический инкубатор 37°C на от 5 до 6 часов

Линия раковых клеток и условия культивирования -

Используемые клеточные линии подробно описаны в таблице ниже:

Клеточная линия	Тип	Мышиный штамм	Происхождение
EMT-6	Карцинома молочной железы	BALB/c	ATCC

Клеточная линия EMT-6 была получена из трансплантируемой мышинной карциномы молочной железы, которая возникла у мышей BALB/cCRGL после имплантации гиперпластического альвеолярного узла молочной железы [N69].

Условия культивирования клеток - Все клеточные линии выращивали в виде монослоя 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-глутамина (ссылка: BE12-702F, Lonza)	10% фетальной бычьей сыворотки (ссылка: № 3302, Lonza)

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

Использование животных -

Здоровые самки мышей BALB/C (BALB/cByJ) соответствующей массы и возраста были получены из CHARLES RIVER (L'Arbresles) для модельных экспериментов EMT6.

Животных поддерживали в состоянии здоровья СПФ (SPF - Specific Pathogen Free) в соответствии с рекомендациями FELASA, а условия содержания животных и экспериментальные процедуры выполнялись в соответствии с французскими и европейскими правилами и Руководством NRC по уходу и использованию лабораторных животных [N70,N71]. Животных содержали в жилых помещениях в контролируемых условиях окружающей среды: Температура: 22 ± 2 °C, влажность 55 ± 10%, фотопериод (12 часов света/12 часов темноты), воздух фильтрованный через HEPA, 15 воздухообменов в час без рециркуляции. Вольеры для животных были обеспечены стерильным и адекватным пространством с подстилкой, пищей и водой, а также обогащенной окружающей и социальной средой (групповое размещение), как описано:

клетки площадью 900 см² (ссылка: green, Tecniplast) в вентилируемых стеллажах, подстилка Erisca (SAFE), 10 кГр облученная диета (A04-10, SAFE), полное питание для иммунокомпетентных грызунов - экструдат Р/М-Н, вода из бутылок с водой.

Экспериментальный дизайн и варианты лечения

Противоопухолевое действие, модель ЕМТ6

График лечения - Начало первого дозирования рассматривалось как день Д0. В Д0 непривитые мыши были рандомизированы в соответствии с их индивидуальной массой тела на группы по 8-9 с использованием программного обеспечения Vivo manager® (Biosystemes, г. Кутернон, Франция). В Д0 мыши получали носитель (культуральную среду) или бактериальный штамм. В Д14 всем мышам прививали опухолевые клетки ЕМТ-6, как описано ниже. В Д24 мыши из группы положительного контроля получали лечение анти-CTLA-4 антителами.

График лечения представлен в таблице ниже:

Группа	Колич. животных	Лечение	Доза	Способ введения	График лечения
1	8	Не получ. леч.	-	-	-
2	8	Носитель (среда)	-	ПО	38 дней ЕМТ6
3	8	MRx0554	2×10^8 бактерий	ПО	38 дней ЕМТ6
4	8	Анти-CTLA4	10 мг/кг	ВБ	TWx2, Д10, Д13, Д17 и Д20 для ЕМТ6

Наблюдение за животными проводили, как описано ниже.

Индукция опухолей ЕМТ6 у животных - В Д14 опухоли индуцировали подкожной инъекцией 1×10^6 клеток ЕМТ-6 в 200 мкл RPMI 1640 в правый бок мышей.

Эвтаназия - Каждую мышь умерщвляли, когда она достигла гуманной конечной точки, как описано ниже, или максимум через 6 недель после начала дозирования.

Мониторинг животных

Клинический мониторинг - Длину (length) и ширину (width) опухоли измеряли дважды в неделю штангенциркулем, и объем опухоли оценивали по этой формуле [N72]:

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

Гуманные конечные точки [N73]: Признаки боли, страдания или дистресса: поза боли, маска боли на лице, поведение; Опухоль, превышающая 10% нормальной массы тела, но не превышающая 2000 мм³; Опухоли, мешающие передвижению или питанию; Язвенная опухоль или эрозия тканей; 20% потеря массы тела остающаяся в течение 3 последовательных дней; Плохое состояние тела, исхудание, кахексия, обезвоживание;

Длительное отсутствие произвольных реакций на внешние раздражители; Учащенное затрудненное дыхание, анемия, сильное кровотечение; Неврологические признаки: кружение, судороги, паралич; Стойкое снижение температуры тела; Вздутие живота.

Анестезия - Анестезия изофлурановым газом использовалась для всех процедур: хирургии или инокуляции опухоли, в/в инъекции, сбора крови. Анестезия кетамин и ксилазином использовалась для хирургической процедуры стереотаксии.

Анальгезия - Протокол обезболивания карпрофеном или мультимодального обезболивания карпрофеном/бупренорфином был адаптирован к тяжести хирургической процедуры. Для всех болезненных процедур оказывалась немедикаментозная помощь. Кроме того, по рекомендации лечащего ветеринара оказывалась фармакологическая помощь, не мешающая исследованиям (топическое лечение).

Эвтаназия - Эвтаназию животных проводили путем передозировки газовой анестезии (изофлуран) с последующим смещением шейных позвонков или обескровливанием.

Результаты

Противоопухолевое действие, модель ЕМТ6

Результаты продемонстрированы на Фиг. 17. Лечение бактериальным штаммом по данному изобретению привело к четкому уменьшению объема опухоли по сравнению с обоими отрицательными контролями. Положительный контроль также привел к уменьшению объема опухоли, как и ожидалось.

Эти данные показывают, что штамм MRx0554 может быть полезен для лечения или профилактики других заболеваний, связанных со сниженной активностью иммунной системы.

Section 7.14 Пример 10 - Анализ углеводного обмена. API 50 CHL анализ MRx0554

Система тестирования индекса аналитического профиля (API, Analytical Profile Index) состоит из полос, которые содержат миниатюрные биохимические тесты, которые определяют ферментативную активность у бактериальных видов. Эти тесты обычно используются для определения характеристик новых штаммов. Тестирование API 50 CHL проводилось для изучения углеводного обмена в MRx0554. В соответствии с инструкциями производителя бактерии культивировали в 10 мл бульона YCFA в течение 16-18 часов при 37°C на анаэробной рабочей станции. Эту культуру разбавляли в 10 мл среды API CHL, так чтобы достичь плотности, примерно эквивалентной стандарту МакФарланда № 2, и 110 мкл этой смеси использовали для инокуляции каждой купулы на наборе тест-полосок API 50 CH. Тест-полоски инкубировали в увлажненном инкубационном боксе при 37°C на анаэробной рабочей станции в течение 48 часов, после чего регистрировали цвет каждой купулы и присваивали отрицательное, промежуточно положительное, положительное или недостоверное значения.

При использовании анализа API 50 CHL, MRx0554 дал положительный результат на ферментацию L-арабинозы, D-рибозы, D-ксилозы, D-галактозы, D-глюкозы, D-фруктозы, D-маннозы, N-ацетилглюкозамина, амигдалина, арбутина, эскулина, салицина,

D-целлобиозы, D-мальтозы, D-сахарозы (сахарозы), D-трегалозы, гентиобиозы, D-тагатозы и глюконата калия (Фиг. 18). Промежуточные реакции наблюдались для D-маннита, метил- α -D-глюкопиранозида, D-лактозы, D-рафинозы, амидона (крахмала) и D-туранозы.

Section 7.15 Пример 11 - Активация TLR9

Section 7.16 Для дальнейшего выяснения механизма, с помощью которого MRx0518 стимулирует иммунную систему, использовали TLR9 репортерные HEK-Blue™ клетки человека (InvivoGen, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США) для тестирования влияния MRx0518 на активацию TLR9.

Section 7.17 Поддержание клеточных линий и бактериальных штаммов

Section 7.18 TLR9 репортерные HEK-Blue™ клетки человека (InvivoGen, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США) выращивали в DMEM с добавлением 10% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки (FBS), 4 mM L-глутамина, 4,5 мг/мл глюкозы, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл Normocin™ (InvivoGen), 10 мкг/мл бластоцидина (InvivoGen) и 100 мкг/мл зеоцина (InvivoGen) до плотности 90%. Клетки поддерживали при 37°C и 5% CO₂. Для анализов клетки один раз промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) (Sigma-Aldrich, г. Гиллингем, Англия, Великобритания) и ресуспендировали в среде для роста без антибиотиков при плотности 450 000 клеток/мл. Все реагенты были поставлены Sigma Aldrich, если не указано иное. MRx0518 E. gallinarum обычно культивировали в среде с дрожжевым экстрактом, казитоном, жирными кислотами (YCFA, E&O Laboratories, г. Боннибридж, Шотландия, Великобритания) при 37°C в анаэробном шкафу (Don Whitley Scientific, г. Шипли, Англия, Великобритания).

Section 7.19 Анализ репортерных TLR9

Section 7.20 Следующие композиции были проверены на их способность индуцировать активацию TLR9:

1. Живая фракция MRx0518 (MRx0518LV) - Бактериальные культуры поздней логарифмической фазы центрифугировали при 5000 x g в течение 5 минут при комнатной температуре для получения бактериальных фракций. Осажденные бактерии промывали один раз в PBS и ресуспендировали в среде для культивирования клеток без антибиотиков, до соответствующего разведения.

2. Фракция супернатанта MRx0518 (MRx0518SN) - Супернатанты культур собирали и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и разводили водой.

3. Убитая нагреванием фракция MRx0518 (MRx0518HK) - Бактериальные культуры были инактивированы нагреванием в течение 40 мин при 80°C и подготовлены, как описано выше для живой фракции.

Section 7.21

Section 7.22 MRx0518LV и MRx0518HK использовались при множественности инфицирования (MOI) 100:1. Для MRx0518SN использовался эквивалентный объем MOI 100:1. Синтетический CpG-олигонуклеотид ODN2006 (InvivoGen) использовали в качестве положительного контроля анализа в концентрации 5 мкМ. YCFA использовали в

качестве отрицательного контроля. Количество жизнеспособных клеток определяли путем посева.

Section 7.23 TLR9 репортерные HEK-Blue™ клетки человека инкубировали с указанными выше обработками в течение 22 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Анализы были проведены с использованием QUANTI-Blue™ (InvivoGen) в соответствии с рекомендациями производителя в течение 2 часов. Результаты, изображенные на Фиг. 19, являются средними по меньшей мере из трех независимых экспериментов. Статистическую значимость определяли с помощью обычного одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и тестов множественных сравнений Тьюки.

Section 7.24 Результаты демонстрируют, что живые фракции и фракции супернатанта были способны активировать TLR9.

Section 7.25 Пример 12 - Дифференцировка Т-клеток

Способность MRx0518 индуцировать дифференцировку Т-клеток исследовали *in vitro* на моноклеарных клетках периферической крови (PBMC, peripheral blood mononuclear cell, Stemcell, Кат.: 70025). Вкратце, PBMC высевали в 96-луночные планшеты с анти-CD3 (Ebioscience, анти-CD3 моноклональное антитело (клон ОКТ3), функциональный класс, кат. No. 16-0037-81) 400 000/лунку в 50 мкл среды cRPMI на лунку (cRPMI содержит RPMI 1640 (+ L-глут., 21875-034) 2 mM конечная концентр. исходного раствора 200 mM; 10% HI FBS (Gibco life technologies, 10082-147); 50 мкM меркаптоэтанол (Gibco Life Technologies, 21985-023); и 1% пен./стреп. (P4333, 10 мг/мл). Затем в каждую лунку добавляли убитый нагреванием MRx0518 (приготовленный инкубацией при 80°C в течение 30 минут, после чего культуры промывали PBS и ресуспендировали в соответствующей среде для культивирования клеток, а количество жизнеспособных клеток подтверждалось посевом) в каждую лунку, 400 0000 в 100 мкл/лунка.

Через 3 дня в инкубаторе при 37°C клетки удаляли и повторно суспендировали в среде, содержащей PMA- (Sigma, Кат. №P8139), иономицин (Sigma, Кат. № I3909) и GolgiSTOP (BD, Кат. № 554724) в течение 5 часов. Исходный раствор PMA составлял 1 мг/мл в DMSO, который затем разводили до 100 мкг/мл (для каждого образца требовалось 50 нг/мл в cRPMI), исходный раствор иономицина составлял 1 mM в DMSO (использовали 1 мкM в cRPMI) и концентрацию GolgiStop использовали при 4 мкл/6 мл. Супернатанты пропускали через фильтр 0,22 мкM и соответствующим образом разводили в среде для совместного культивирования.

Затем клетки подвергали окрашиванию методом проточной цитометрии:

После промывания клетки инкубировали с красителем для определения жизнеспособности (Fixable Dye Viability 405/520 от Miltenyi biotec, 1 мкл/образец) + Fc блок человека, кат. 564219 (1 мкл/образец) в PBS в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре. Затем поверхностные антитела (по 2 мкл каждого) добавляли непосредственно в лунки на 10 минут в темноте при комнатной температуре - CD3-APC-Vio 770 (Miltenyi, кат. №. 130-113-136), CD4-VioBlue (Miltenyi, кат. №. 130-114-534) и

CD25-VioBright FITC (Miltenyi, кат. № 130-113-283). Затем клетки дважды промывали PBS и центрифугировали при 300 g/5 мин/КТ.

Затем использовали буфер для окрашивания фактора транскрипции eBioscience FoxP3 для фиксации и повышения проницаемости клеток (кат. № 00-5523). В соответствии с протоколом eBioscience был приготовлен буфер для перм./фиксации с использованием 1 части раствора концентрата и 3 частей разбавителя. Клетки фиксировали в течение 1 часа при КТ, а затем промывали 2х в 1х перманентной промывке и центрифугировали при 300 g/5 мин/КТ. После внутриклеточного окрашивания добавляли антитела к фактору транскрипции к образцам в перм. промывке (1х) в течение 45 минут/в темноте/при комнатной температуре или в холодильнике в течение ночи (до 18 часов) с последующей 2х промывкой антител с использованием перм. промывки (300 мкл) и ресуспендировали в PBS (250 мкл) для анализа на цитометре:

Внутриклеточные маркеры	Факторы транскрипции
2 мкл анти-ИЛ10-PE	5,5 мкл анти-FoxP3-PE-Cy7
2 мкл анти-ИФН γ -PE Vio770	9 мкл анти-Tbet-APC
10 мкл анти-ИЛ17a-APC	9 мкл анти-RoRyt-PE

Анти ИФН γ -PE Vio770 антитела человека (Miltenyi, кат. № 130-114-025).

Анти ИЛ10-PE антитела человека (Miltenyi, кат. № 130-112-728).

Анти ИЛ17a-APC антитела человека (Miltenyi, кат. № 130-099-202).

Анти RORyt-PE антитела человека (Miltenyi, кат. № 130-103-837).

Анти Tbet-APC антитела человека (Miltenyi, кат. № 130-098-655)

Анти-Foxp3 моноклональные антитела (236A/E7), PE-Cy7 (ebioscience) кат. № 25-4777-41

Как видно на Фиг. 20А-В, как супернатант MRx0518 (SP 518) так и убитый нагреванием MRx0518 (НК 518) были способны индуцировать дифференцировку Т-хелперных клеток и цитотоксических Т-клеток, соответственно, даже в отсутствие цитокинов для индукции дифференцировки (без цито)

Пример 13 - MRx0518-индуцированная цитокиновая сигнатура

Спленоциты выделяли от мышей C57BL/6 и помещали в 96-луночные планшеты с плотностью 900 000 клеток/лунку в RPMI1640 с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамина, 100 Ед/мл пен./стреп. (Sigma-Aldrich) и 55 мкМ β -меркаптоэтанола (Gibco). Клетки обрабатывали различными концентрациями пустой среды (YSCFA⁺) или бактериального супернатанта из стационарной фазы в течение 72 часов. Бесклеточные супернатанты собирали после каждой временной точки и хранили при -80°C для анализа цитокинов. Цитокины измеряли с использованием набора множественных прокартаплекс MO Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg 17plex (Invitrogen). Клеточную пролиферацию необработанных спленоцитов или спленоцитов, обработанных 10% средой YSCFA или 10% супернатантом бактериального MRx0518, измеряли с использованием анализа МТТ (Millipore), как показано на Фиг. 21F.

Живые растущие бактерии MRx0518 инкубировали в течение до 2 часов с линией эпителиальных клеток CaCo-2 кишечника человека и с линией клеток человеческих моноцитов/макрофагов THP-1. Ответ хозяина анализировали сразу (CaCo-2) или после дополнительной 24-часовой инкубации (THP-1).

Замороженные PBMC здоровых людей были приобретены в Stem Cells Technologies (г. Кембридж, Великобритания). Клетки размораживали и оставляли на ночь в полной среде роста (RPMI 1640 с 10% FBS, 55 мкМ β-меркаптоэтанола, 2 мМ L-глутамина и 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Для эксперимента клетки высевали с плотностью 750 000 клеток/лунку в 48-луночные планшеты и обрабатывали в полной среде роста 10% бактериальными супернатантами в присутствии или в отсутствие 1 нг/мл LPS. Среда для культивирования клеток добавляли в необработанные лунки. Клетки оставляли отдыхать на 72 часа, после чего собирали бесклеточные супернатанты и центрифугировали в течение 3 минут при 10 000 g при 4 °С. Образцы хранили при -80°С для анализа цитокинов. Количественное определение цитокинов проводили с использованием мультиплексного иммуноанализа ProcartaPlex в соответствии с рекомендациями производителя (Thermo Fischer Scientific). Вкратце, 50 мкл бесклеточных супернатантов совместной культуры использовали для количественной оценки цитокинов с использованием системы MAGPIX® MILLIPLEX® (Merck) с программным обеспечением xPONENT (Luminex, г. Остин, штат Техас, США). Данные анализировали с использованием аналитического программного обеспечения MILLIPLEX® (Merck) с использованием 5-параметрической логистической кривой и вычитания фона для преобразования средней интенсивности флуоресценции в значения пг/мл.

Данные представлены на Фиг. 21A-D как среднее из двух технических повторов 10 биологических повторов (PBMC) или трех биологических повторов (спленоцитов) и демонстрируют продукцию цитокинов в (A) PBMC; (B) спленоцитах; (C) клетках THP-1; и (D) клетках CaCo-2 после обработки пустой средой YCFA («носитель») или бактериями MRx0518/бесклеточным бактериальным супернатантом MRx0518 («MRx0518»). Фиг. 21E изображает дополнительные данные, относящиеся к секреции цитокинов спленоцитами (N=3), из клеток, которые были либо необработанными («необработанные»), обработанными пустой средой YCFA («10% YCFA»), либо обработанными бесклеточным бактериальным супернатантом MRx0518 («10% MRx0518»).

Как видно на Фиг. 21A-D, обработка различных клеток супернатантом бактериального MRx0518 приводила к иммуностимуляции, о чем свидетельствует увеличение продукции цитокинов.

Пример 14 - Активация NF-κB

Активация промотора NF-κB была протестирована на клетках HEK293, совместно экспрессирующих репортерный ген индуцибельной NF-κB секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) с одним из: гена NOD2 человека, генами TLR4, TLR9 или TLR5 (клетки HEK-Blue™-hNOD2, HEK-Blue™-hTLR5, HEK-Blue™-hTLR9 и HEK-

Blue™-hTLR4, соответственно, от InvivoGen, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США).

Вкратце, клетки HEK-TLR4 поддерживали в DMEM 4,5 г/л D-глюкозы с добавлением 10% (об./об.) инактивированной нагреванием ФБС, 4 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл нормоцина, 1х селекционной среды HEK-Blue; для HEK-TLR5 и HEK-TLR9 использовали ту же среду, за исключением использования 2 mM L-глутамин. HEK-TLR5 и HEK-TLR9 были отобраны с использованием 30 мкг/мл и 10 мкг/мл бластицидина соответственно и 100 мкг/мл зеоциновой среды для обеих клеточных линий в культуре.

Для эксперимента клетки промывали PBS, диссоциировали в PBS и собирали в ростовой среде. Клетки высевали в 96-луночные планшеты при плотности 25 000 клеток/луночка для HEK-TLR4 и HEK-TLR5, 80 000 клеток/луночка для HEK-TLR9 и 50 000 клеток/луночка для HEK-NOD2.

Чтобы оценить чувствительность клеток к их лигандам, клетки обрабатывали 1 нг/мл LPS (HEK-TLR4), 1 нг/мкл сверхчистого флагеллина из *Salmonella typhimurium* (HEK-TLR5), 1 мкМ ODN2006 CPG (положительный контроль HEK-TLR9) или 1 мкМ ODN2006 GPC (отрицательный контроль HEK-TLR9), 1 нг/мл L18-MDP и инкубировали в инкубаторе с CO₂ при 37 °C. Обработки продолжали в течение 22 часов при 37°C и 5% CO₂, после чего определение активности секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) в супернатанте клеточной культуры проводилось с использованием раствора QUANTI-blue в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 20 мкл среды для культивирования клеток собирали и анализировали на наличие SEAP путем смешивания с 200 мкл среды для обнаружения QUANTI-Blue. После 2-часовой (HEK-TLR4 и HEK-TLR5) или 4-часовой (HEK-TLR9 и HEK-NOD2) инкубации при 37°C измеряли оптическую плотность при 655 нм на считывающем устройстве для микропланшетов (iMark microplate, Bio-Rad).

Как видно на Фиг. 22A-D (продемонстрированы результаты усредненных технических повторов для трех независимых экспериментов), активация промотора NF-κB измерялась в клетках, которые были либо необработанными («необработанные»), обработанными средой YCFA+ («YCFA») или обработанными MRx0518 («MRx0518»). Были использованы следующие положительные контроли (1 нг) - L18-MDP (для клеток HEK-Blue™-hNOD2, Фиг. 22A), липополисахарид, LPS (для HEK-Blue™-hTLR4, Фиг. 22B), CPG или pegC (для HEK-Blue™-hTLR9, Фиг. 22C) или рекомбинантный флагеллин из *S. typhimurium*, FLA (для HEK-Blue™-hTLR5, Фиг. 22D). Клетки инкубировали с различными обработками при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 22 часов. Для измерения активации промотора NF-κB (N=3) смешивали QUANTI-Blue™ (InvivoGen) с супернатантами клеток, планшеты инкубировали в течение 2 часов и измеряли оптическую плотность при 655 нм.

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 ttcgcatgg aagaaagttg aaaggcgctt
 181 ttgcgtcact gatggatgga cccgcgggtgc attagctagt tggtaggta acggctcacc
 241 aaggccacga tgcatacccg acctgagagg gtgatcgcc acactgggac tgagacacgg
 301 cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttcggc aatggacgaa agtctgaccg
 361 agcaacgccg cgtgagtga gaaggttttc ggatcgtaaa actctgttgt tagagaagaa
 421 caaggatgag agtagaacgt tcatcccttg acggtatcta accagaaagc cagggtaac
 481 tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgcgggatt tattgggctg
 541 aaagcgagcg caggcggttt cttaagtctg atgtgaaagc ccccggtca accggggagg
 601 gtcattggaa actgggagac ttgagtgcag aagaggagag tggaattcca tgttagcgg
 661 tgaatgcgt agatatatgg aggaacacca gtggcgaagg cggctctctg gtctgtaact
 721 gacgtgagg ctgaaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggt agtcacgcc
 781 gtaaacgatg agtgctaagt gtggagggt ttcgccctt cagtgtgca gcaaagcat
 841 taagcactcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc
 901 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccagtc
 961 ttgacatct ttgaccactc tagagataga gcttccctt cgggggcaaa gtgacagggt
 1021 gtgcatggt gtcgtcagct cgtgctgta gatgtgggt taagtccgc aacgagcgca
 1081 accctattg ttagtgcga tcatctggt gggcactcta gcgagactgc cgtgacaaa
 1141 ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccct tatgacctg gctacacag
 1201 tgctacaatg ggaagtacaa cgagttgca agtcgcgagg ctaagctaat ctctaaagc
 1261 ttctctcagt tcgattgta ggctgcaact cgcctacatg aagccggaat cgctagta
 1321 ccgggatcag cagccgcgg tgaatacgt cccgggctt gtacacaccg cccgtcacac
 1381 cagagagtt tgaacaccc gaagtcggtg aggtaacctt ttggagcca gccgcctaag
 1441 gtgggataga tgattgggt gaagtcgta caaggtagcc gtatcggaag gtgcggctgg
 1501 atcacc

SEQ ID NO: 2 (консенсусная последовательность 16S рPHK для штамма *Enterococcus gallinarum* MRx0518)

TGCTATACATGCAGTCGAACGCTTTTTCTTTACCCGGAGCTTGCTCCACCGAA
 AGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGG
 GGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAAACTATTTTCCGCATGGAAG
 AAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCCTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGT
 TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTT
 TTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAGAACGTTCA
 TCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
 GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA
 CTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTAC

GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
 CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAAC
 GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGG
 GCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTA
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCT
 AGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
 CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAA
 GTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA
 CTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAA
 TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCCG
 AAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTG

SEQ ID NO: 3 (ген 16S pPHK для штамма *Enterococcus gallinarum* MRx0554)

1 taatacatgc aagtcgaacg cttttcttt caccggagct tgcaccacg aaagaaaaag
 61 agtggcgaac gggtagtaac cacgtgggta acctgcccac cagaagggga taacacttgg
 121 aaacaggtgc taataccgta taacactatt ttccgcatgg aagaaagtgg aaaggcgctt
 181 ttgcgtact gatggatgga cccgcgggtgc attagctagt tggtaggta acggtcacc
 241 aaggccacga tgcataccg acctgagagg gtgatcgcc acactgggac tgagacacgg
 301 cccagactcc tacgggagcg agcagtaggg aatcttcggc aatggacgaa agtctgaccg
 361 agcaacgccg cgtgagtga gaaggtttc ggatcgtaaa actctgttgt tagagaagaa
 421 caaggatgag agtagaacgt tcatccctg acggtatcta accagaaagc cagggtaac
 481 tacgtccag cagccgcgt aatacgtagg tggcaagcgt tgcggatt tattggcgct
 541 aaagcgagcg caggcggttt cttagtctg atgtgaaagc ccccggtca accggggagg
 601 gtcattgga actgggagac ttgagtgcag aagaggagag tggaattcca tgttagcgg
 661 tgaaatgcgt agatatatgg aggaacacca gtggcgaagg cggctctctg gtctgtaact
 721 gacgtgagg ctcgaaagcg tgggagcga acaggattag ataccctgt agtcacgcc
 781 gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgtgca gcaaagcat
 841 taagcactcc gctggggag tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat tgacggggg
 901 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccagtc
 961 ttgacatct ttgaccactc tagagataga gcttcccctt cgggggcaaa gtgacaggc
 1021 gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgtgggt taagtccgc aacgagcga
 1081 acccttattg ttagtcca tcatctagt gggcactcta gcgagactgc cggtgacaaa
 1141 ccggaggaag gtgggatga cgtcaaatca tcatgccct tatgacctgg gctacacag
 1201 tgctacaatg ggaagtacaa cgagttgcga agtcgcgagg ctaagctaat ctctaaagc
 1261 ttctctcagt tcggattgta ggctgcaact cgctacatg aagccggaat cgtagtaat
 1321 cgcggatcag cagcccgcg tgaatacgt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac
 1381 cagagagtt tgaacaccc gaagtcggtg aggtaacctt ttggagcca gccgcctaag
 1441 gtgggataga tgattgggt gaagtcgtaa caagtagcc gtatcggaag gtgcggctgg
 1501 atcacc

ССЫЛКИ

- [N1] Spor et al. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [N2] Eckburg et al. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [N3] Frank et al. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [N4] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [N5] WO 2013/050792
- [N6] WO 2014/167338
- [N7] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [N8] Azad et al. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [N9] Collins et al. (1984) *Int J Syst Evol Microbiol.* 34: 220-223.
- [N10] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [N11] Srůtková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [N12] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [N13] Srůtková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [N14] Ren and Torres (2009) *Brain Res Rev.*;60(1):57-64
- [N15] Martinon et al. (2002) *Mol Cell.*;10(2):417-26.
- [N16] Murphy et al. (2003) *J Exp Med.* 2003; 198(12): 1951-1957.
- [N17] Chan et al. (2006) *J Exp Med.*; 203(12): 2577-2587.
- [N18] *The Immune Response Basic and Clinical Principles*, 1st Edition (2006)
- [N19] Gaur and Aggarwal (2003). *Biochem Pharmacol.*;66(8):1403-8.
- [N20] Wang and Lin (2008) *Acta Pharmacol Sin.*; 29(11): 1275-1288.
- [N21] Tanaka et al. (2014) *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 6(10): a016295.
- [N22] Bettelli et al. (2006) *Nature* 441:235-238
- [N23] Kawai and Akira (2007) *Trends in Molecular Medicine* 13, 11, 460-469
- [N24] Bloch et al. (2016) *Eur Cytokine Netw.*;27(3):63-67
- [N25] Weinberger (2018) *Curr Opin Pharmacol*, 41, 34-41.
- [N26] Lim (2015) *Aging Cell* 14, 907-915
- [N27] Mohanty et al. (2015) *J Infect Dis*, 211(7) 1174-1184.
- [N28] Fernandez-Ruiz et al.,(2015) *Vaccine* 2015 33(51)
- [N29] Morel et al.,(2011) *Vaccine*, 29(13) 2461-2473.
- [N30] Leal et al.,(2001) *Immunol* 103(3) 375-381
- [N31] Knudsen et al. (2016), *Sci Reps*, 6 (19570).
- [N32] Su et al.,(2008) *Vaccine* 26(40), 5111-22
- [N33] Li et al, (2007) *J Immunol*, 178(8), 5271-5276
- [N34] Coffman et al.,(2012) *Immunity* 33(4) 492-503
- [N35] Olafsdottir et al., *Vaccine* 33(40) 5302-5307
- [N36] Didierlaurent et al., *J Immunol* 2014, 193(4) 1920-1930
- [N37] Park et al., (2002) *J Immunol*, 169(3), 1433-1443
- [N38] Berthoud et al. (2009) *J Immunol Methods* 340(1) 33-41
- [N39] Mori et al. (2012), *Eur J Immunol* 42, 2709-2719

- [N40] Fraietta, et al. (2018) *Nat Med.* 24(5):563-571
- [N41] Zhou, et al. (2010) *Blood* 116(14):2484-93.
- [N42] Glenn and Whartenby (2014) *World J Stem Cells.*; 6(5): 526-539.
- [N43] Heng et al. (2004) *Cardiovasc Res.* 2004 Apr 1;62(1):34-42.
- [N44] Rashidi et al. (2018) *Biol Blood Marrow Transplant* 24, 1260-1263
- [N45] Fulop et al (2013) *Crit Rev Oncog.* 2013;18(6):489-513.
- [N46] Bektas et al. (2017) *J Leukoc Biol.*;102(4):977-988.
- [N47] Fulop et al (2016) *Rev Invest Clin.*;68(2):84-91.
- [N48] Fulop et al. (2018) *Front Immunol.*;8:1960.
- [N49] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- [N50] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [N51] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [N52] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [N53] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Edition, (1994), отредактировано A Wade and PJ Weller
- [N54] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [N55] *Handbook of Microbiological Media*, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [N56] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [N57] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [N58] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [N59] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [N60] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- [N61] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489
- [N62] Rockwell et al., (1972) *J Natl Cancer Inst.* 49:735-49.
- [N63] Bertram and Janik (1980) *Cancer Lett.* 11:63-73.
- [N64] Darlington (1987) *Meth Enzymol.* 151:19-38.
- [N65] Principe d'éthique de l'expérimentation animale, Directive n°2010/63 CEE 22nd September 2010, Décret n°2013-118 1st February 2013.
- [N66] *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition.* The National Academies Press; 2011
- [N67] Simpson-Herren and Lloyd (1970) *Cancer Chemother Rep.* 54:143-74.
- [N68] Workman et al. (2010) *Br. J. Cancer.* 102:1555-77.
- [54] WO 2017/085520
- [N69] Rockwell et al., (1972) *J Natl Cancer Inst.* 49:735-49.
- [N70] Principe d'éthique de l'expérimentation animale, Directive n°2010/63 CEE 22nd September 2010, Décret n°2013-118 1st February 2013.
- [N71] *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition.* The National

Academies Press; 2011

[N72] Simpson-Herren and Lloyd (1970) *Cancer Chemother Rep.* 54:143-74.

[N73] Workman et al. (2010) *Br. J. Cancer.* 102:1555-77.

[88] Van den Bogert et al. (2014), *PLOS One*; 9(12): 1-20,

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, предназначенная для применения при стимуляции иммунной системы у субъекта.
2. Композиция для применения по п. 1, предназначенная для применения при лечении, предотвращении или задержке старения иммунной системы.
3. Композиция для применения по п. 1, предназначенная для применения в качестве адъюванта вакцины.
4. Композиция для применения по п. 1, предназначенная для применения в усилении клеточной терапии, такой как CAR-T.
5. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, предназначенная для применения при увеличении уровня экспрессии и/или активности ИЛ-12p70, ИЛ-8, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-23 и/или TNF- α .
6. Композиция по любому из предыдущих пунктов, предназначенная для применения при увеличении уровня и/или активности NF- κ B.
7. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой бактериальный штамм имеет генную последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 2, или в которой бактериальный штамм имеет генную последовательность 16s рНК, представленную последовательностью SEQ ID NO: 2.
8. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой бактериальный штамм имеет генную последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 3, или в которой бактериальный штамм имеет генную последовательность 16s рНК, представленную последовательностью SEQ ID NO: 3.
9. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, в которой бактериальный штамм представляет собой штамм, депонированный под номером доступа 42488 в NCIMB.
10. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, в которой бактериальный штамм представляет собой штамм, депонированный под номером доступа 42761 в NCIMB.
11. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, предназначенная для перорального введения.
12. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, содержащая один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей.
13. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, в которой бактериальный штамм лиофилизирован.
14. Пищевой продукт, содержащий композицию по любому из предыдущих пунктов, предназначенный для применения по любому из предыдущих пунктов.
15. Способ лечения или профилактики заболевания или состояния, связанного со сниженной иммуностимуляцией, включающий введение композиции, содержащей

бактериальный штамм вида *Enterococcus gallinarum*, нуждающемуся в этом пациенту.

16. Композиция, содержащая клетку бактериального штамма, определенного по любому из пп. 1-14, при этом клетка экспрессирует один или более гетерологичных антигенов.

17. Композиция по п. 16, в которой клетка презентрует один или более гетерологичных антигенов.

18. Композиция по п. 16 или п. 17 предназначенная для применения в качестве вакцины.

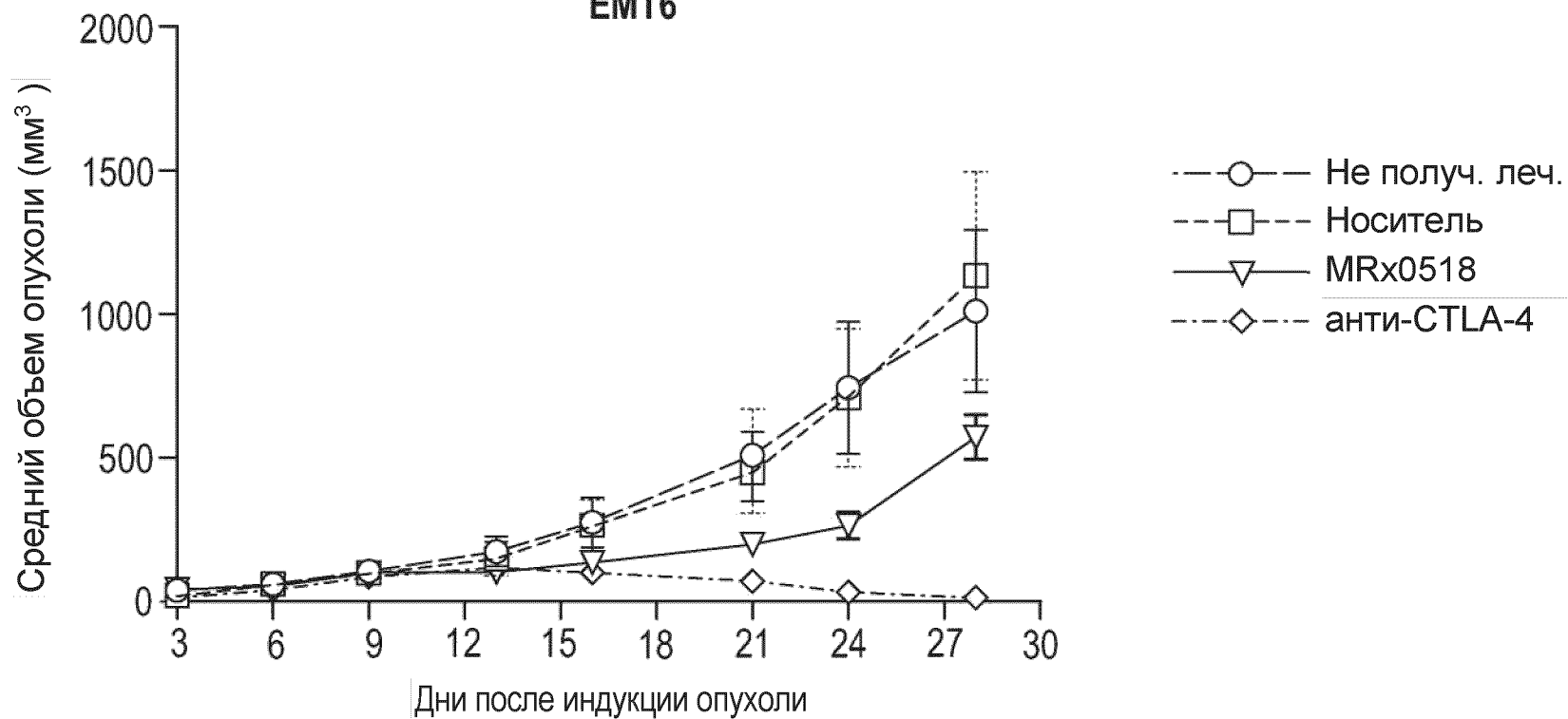
19. Клетка бактериального штамма, определенного по любому из пп. 1-14, экспрессирующая один или более гетерологичных антигенов.

20. Клетка по п. 19, презентующая один или более гетерологичных антигенов.

21. Клетка по п. 19 или п. 20 предназначенная для применения в качестве вакцины.

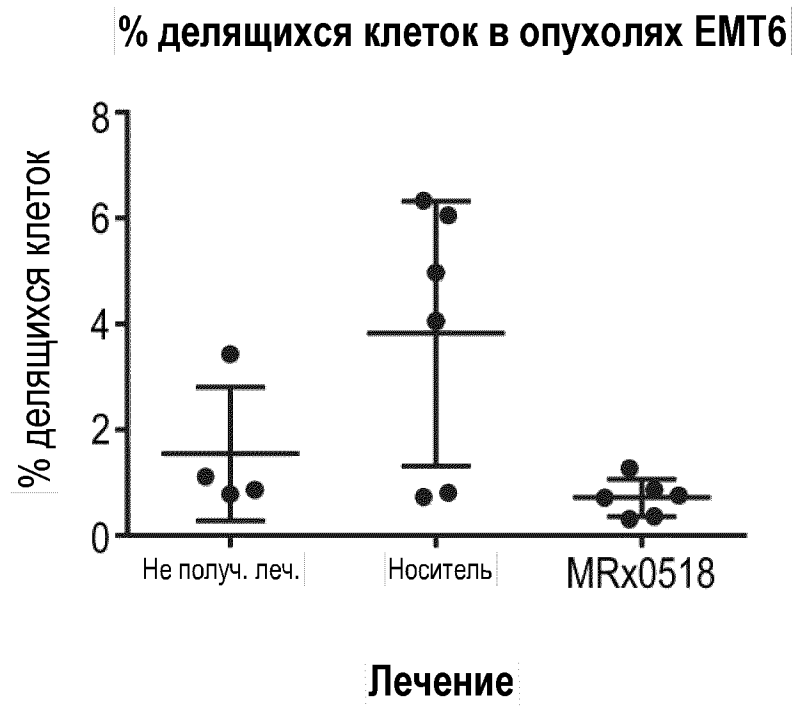
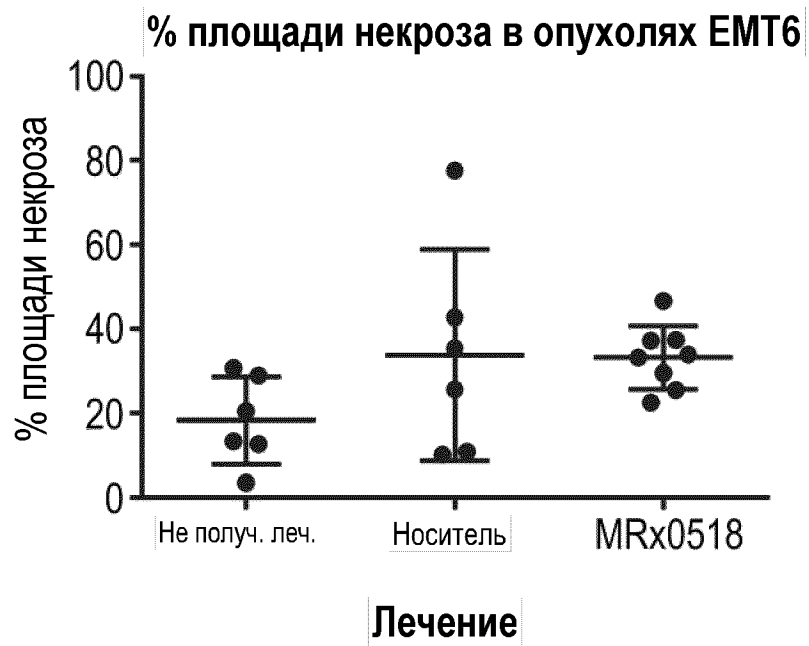
По доверенности

ФИГ. 1А
EMT6

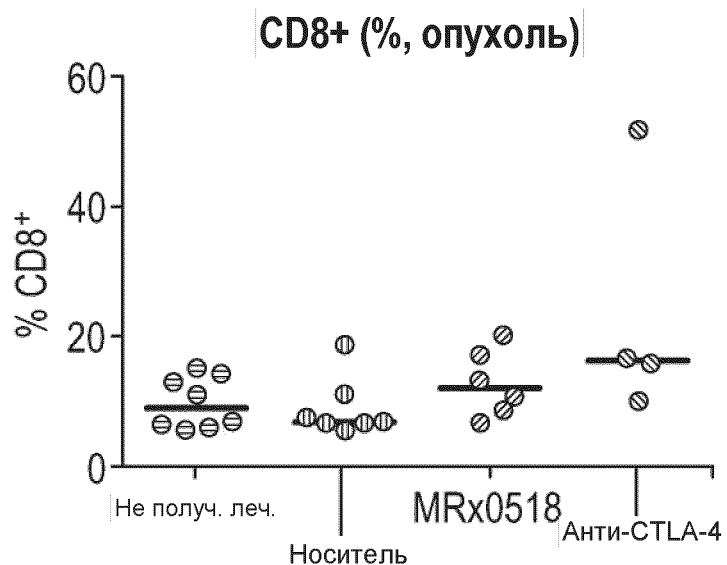
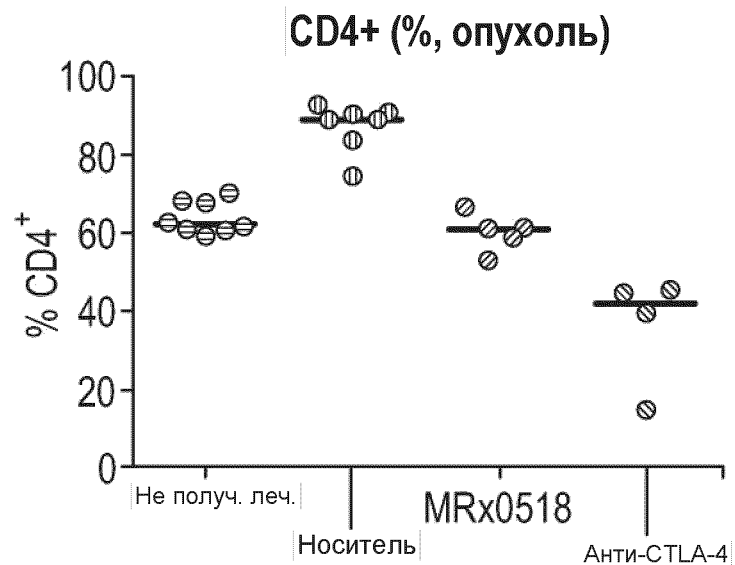
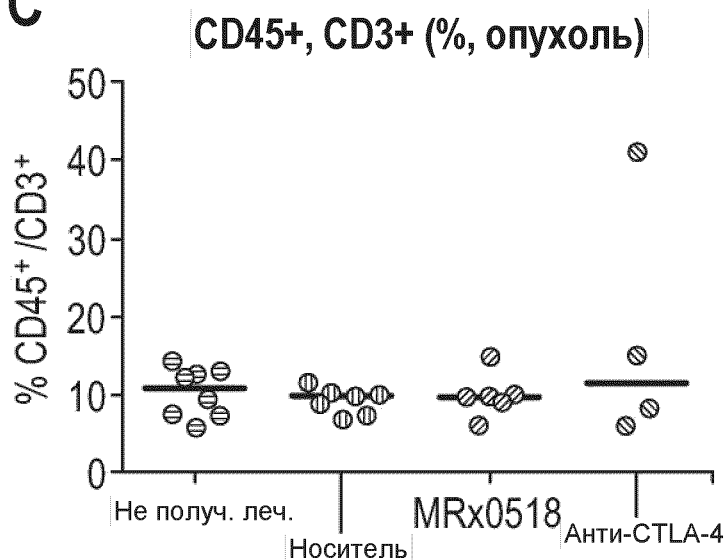
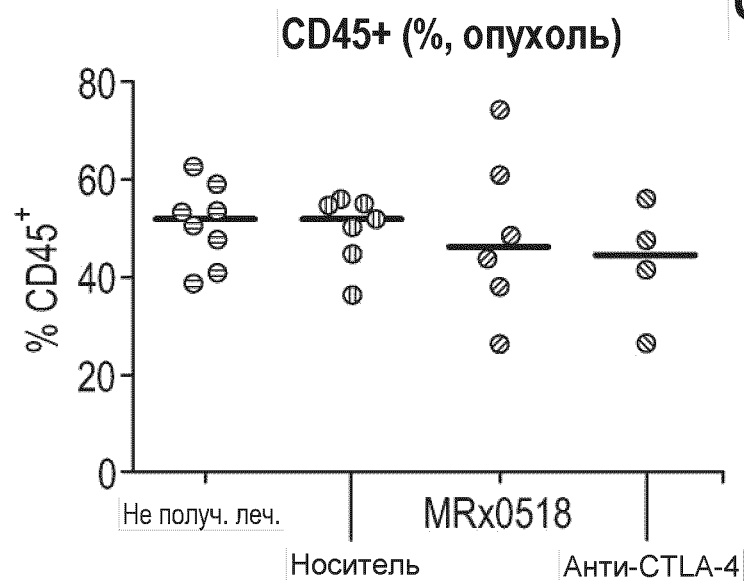


Сутки	3	6	9	13	16	21	24	28
Не получ. леч. по сравн. с носителем	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.
Не получ. леч. по сравн. с MRx0518	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	**	*
Не получ. леч. по сравн. с анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*	****	****
Носитель по сравн. с MRx0518	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*	**
Носитель по сравн. с анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	****	****
MRx0518 по сравн. с анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	**

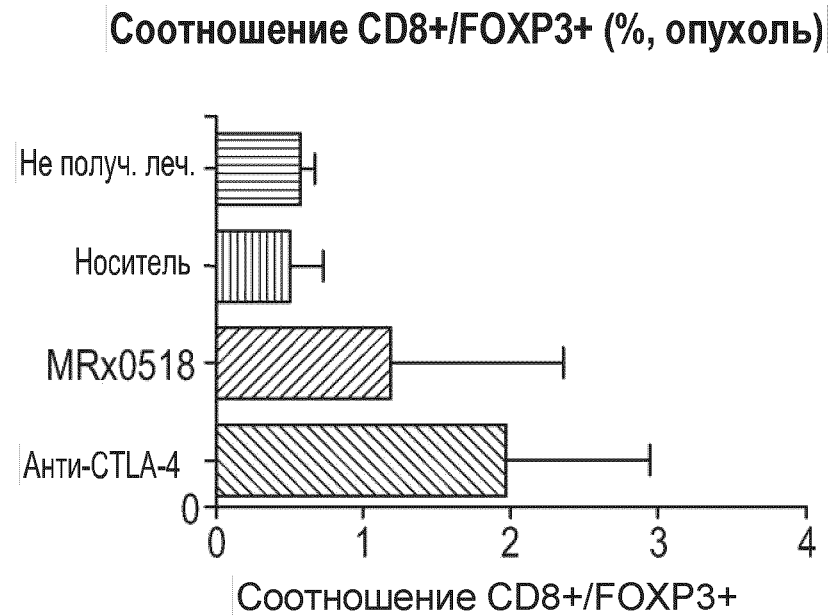
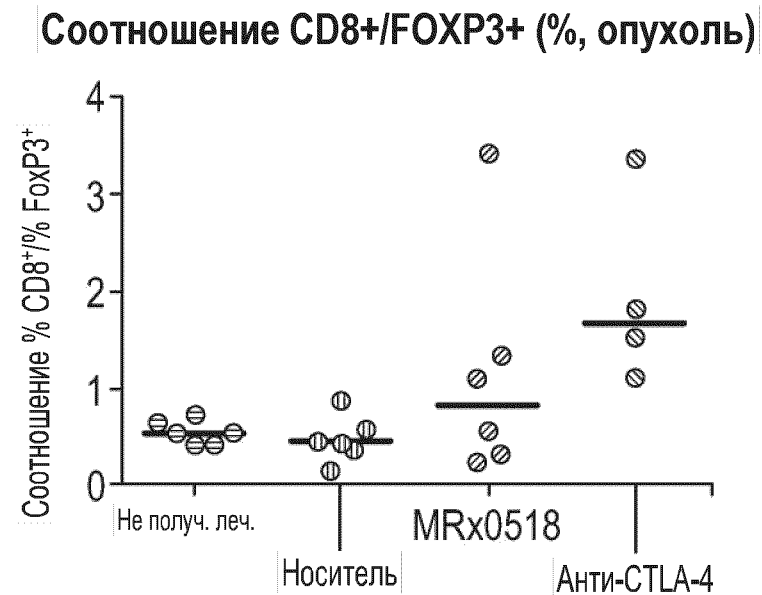
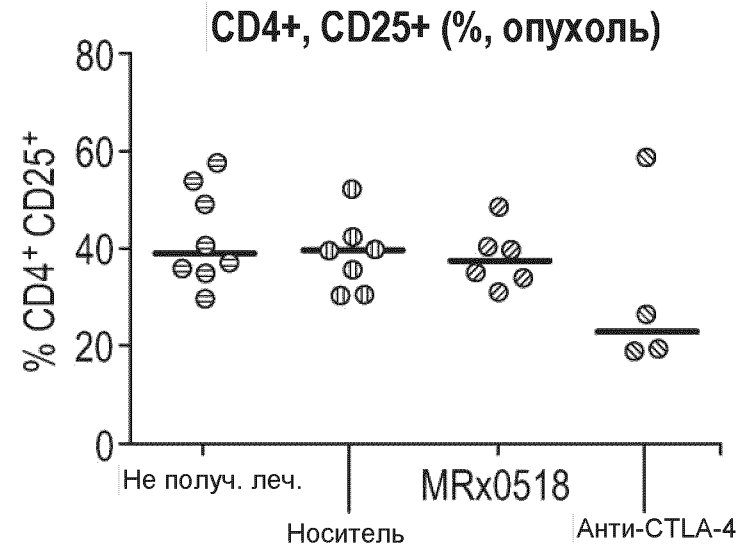
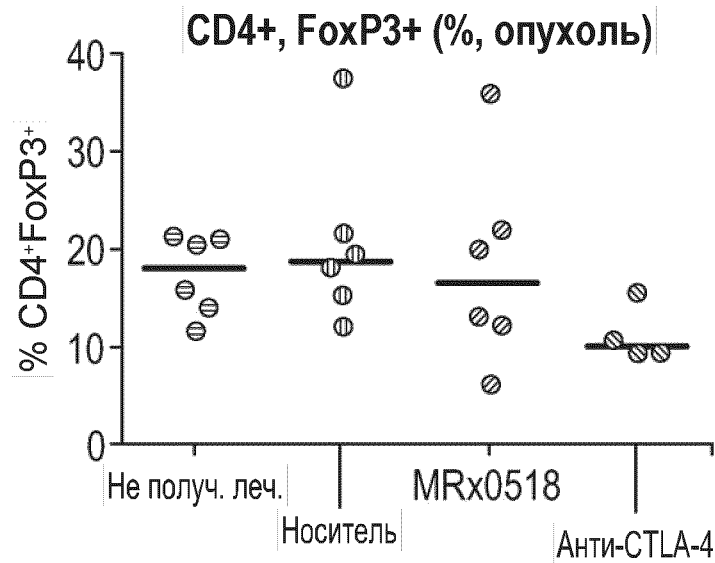
ФИГ. 1В



ФИГ. 1С

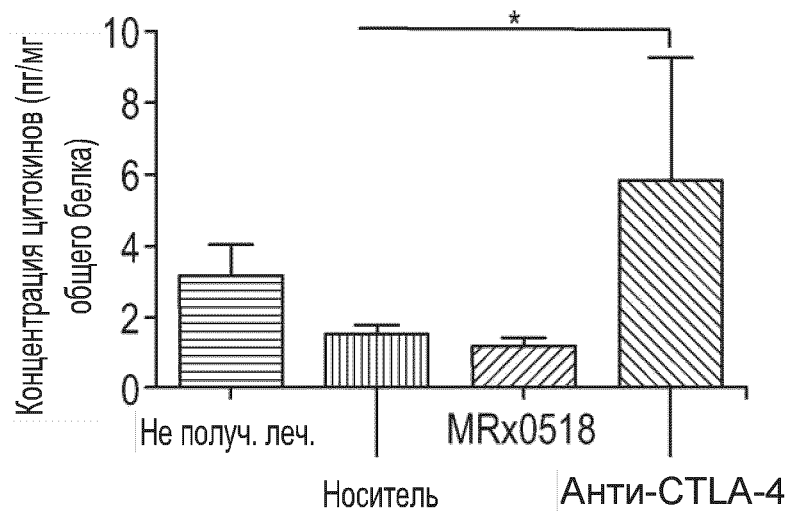


ФИГ. 1С (продолж.)

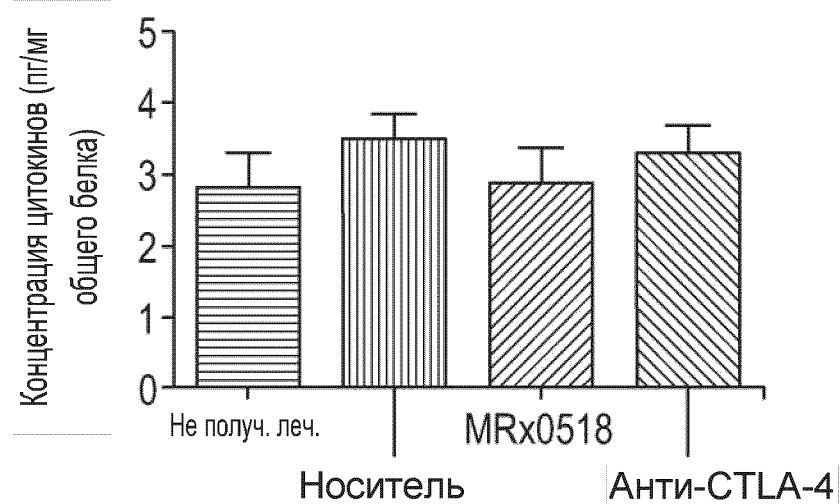


ФИГ. 1D

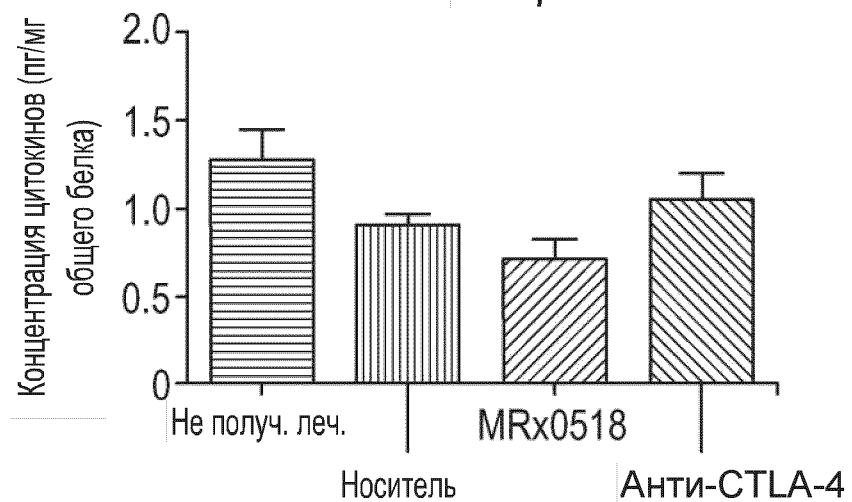
ИФН γ



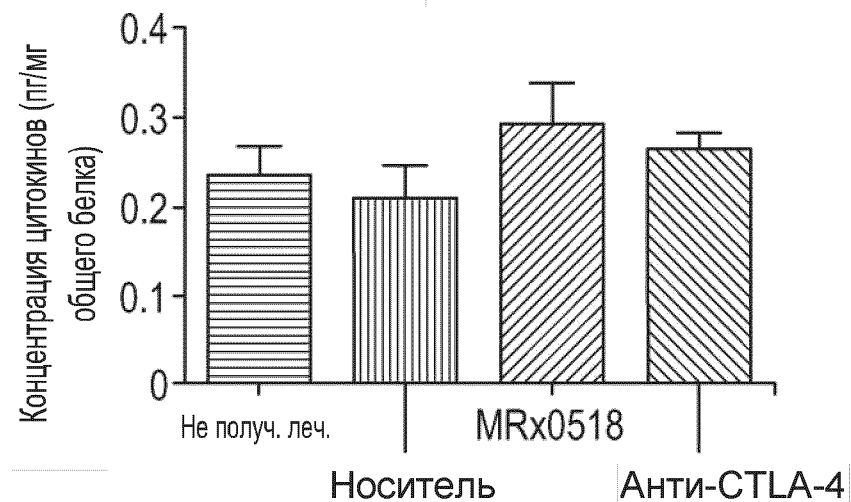
TNF- α



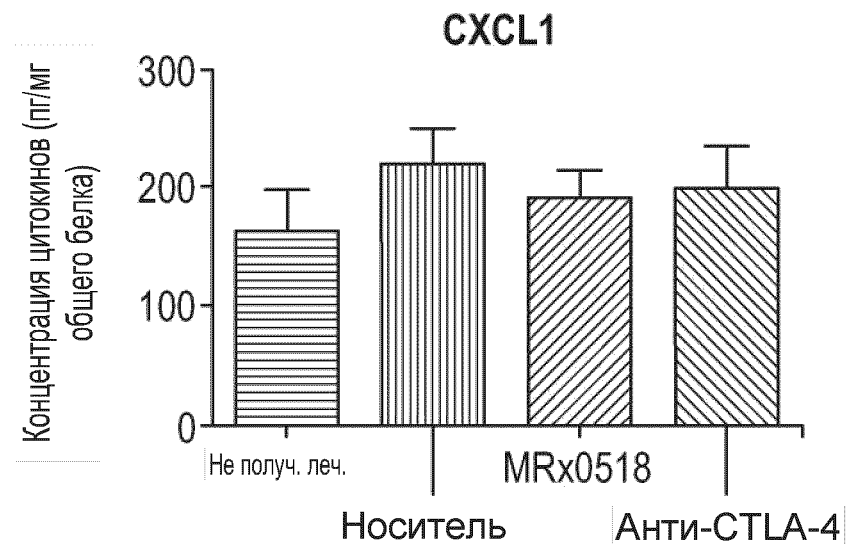
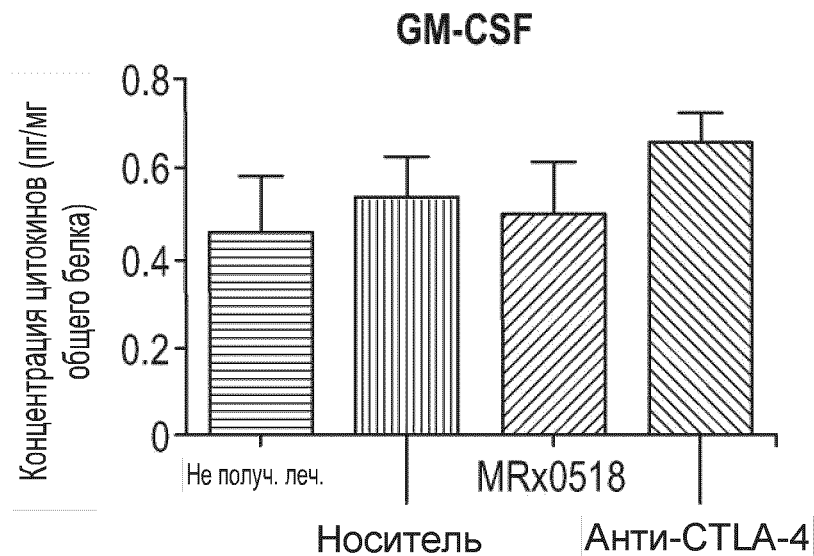
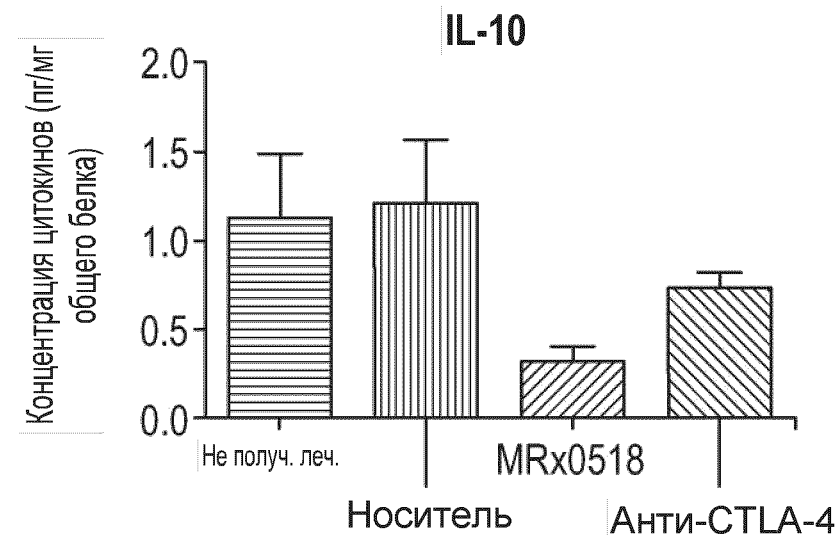
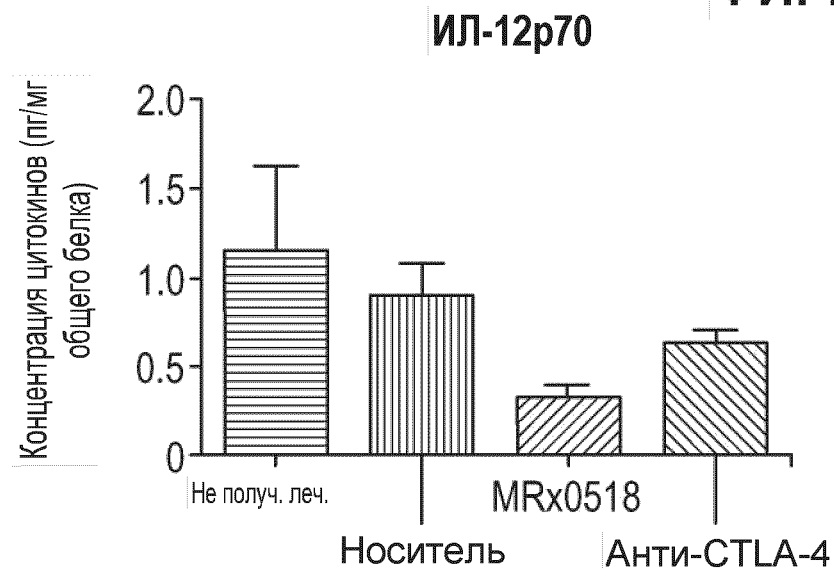
ИЛ-1 β



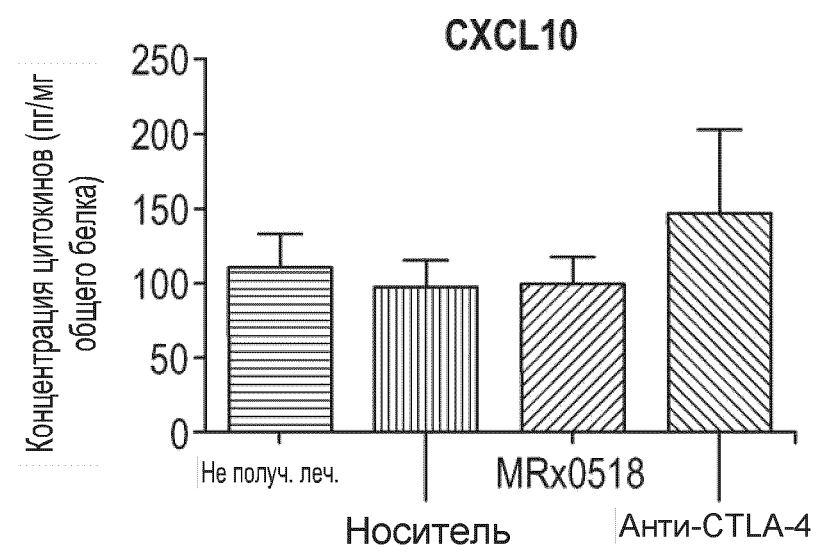
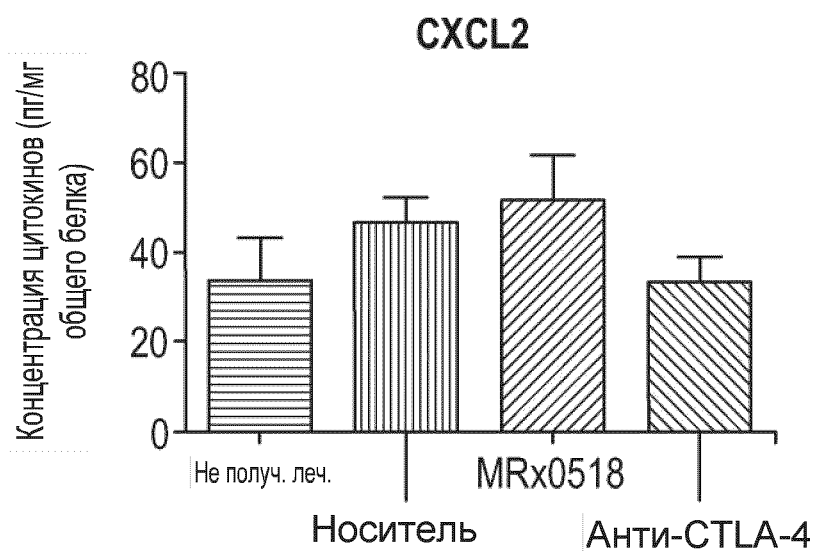
ИЛ-17а



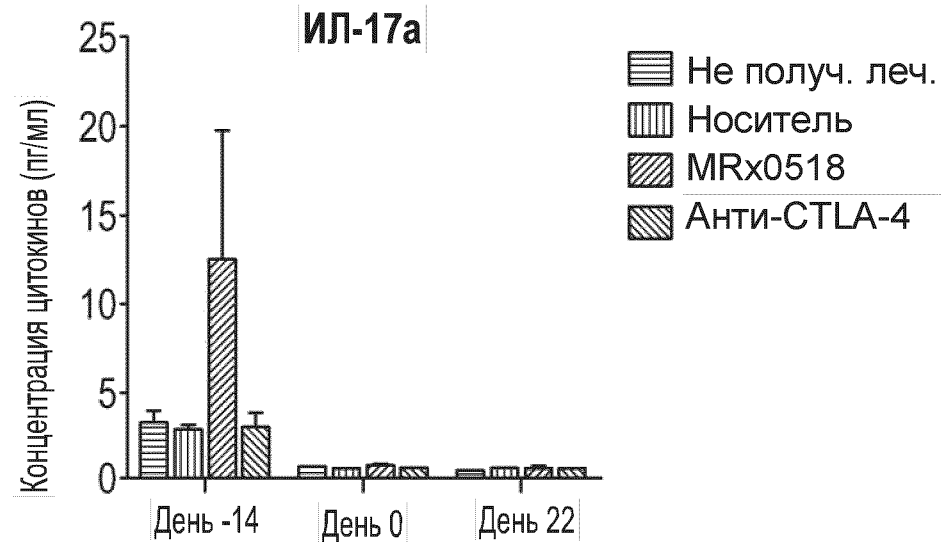
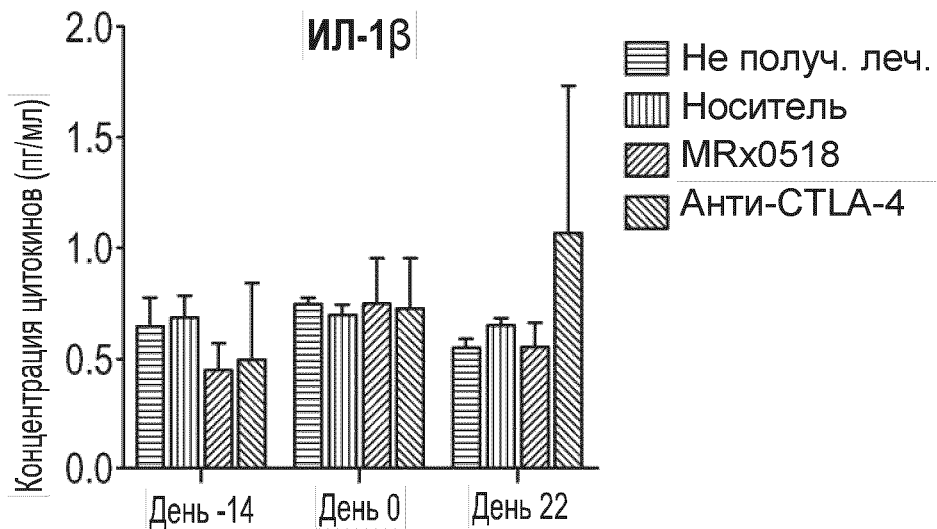
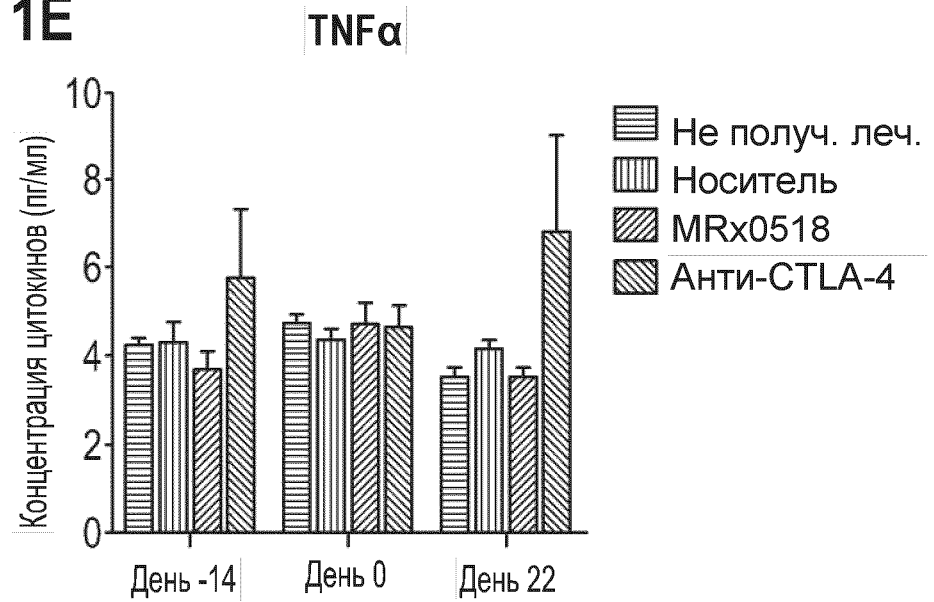
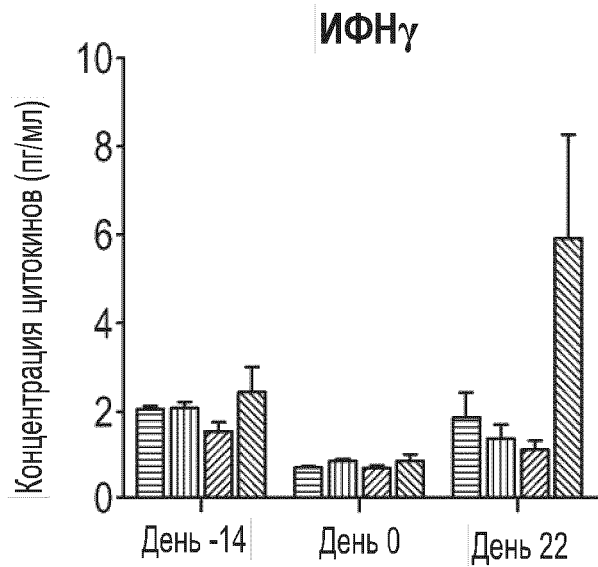
ФИГ. 1D (продолж.)



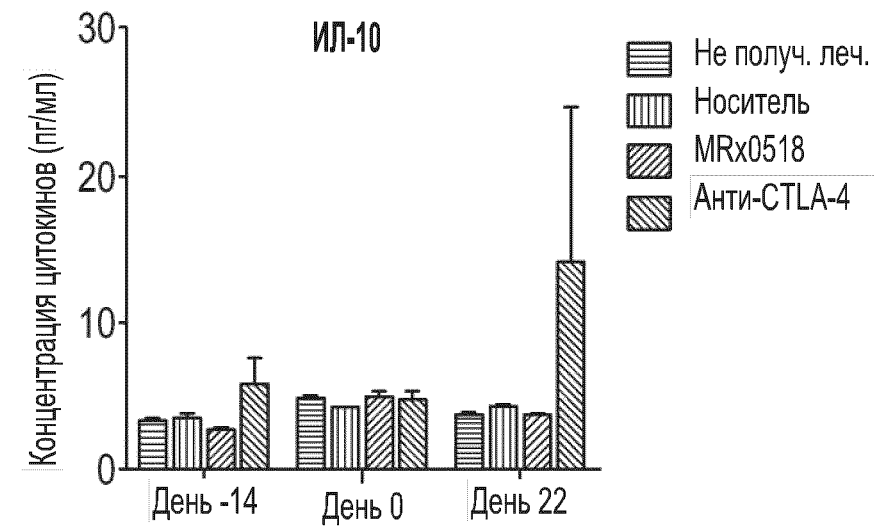
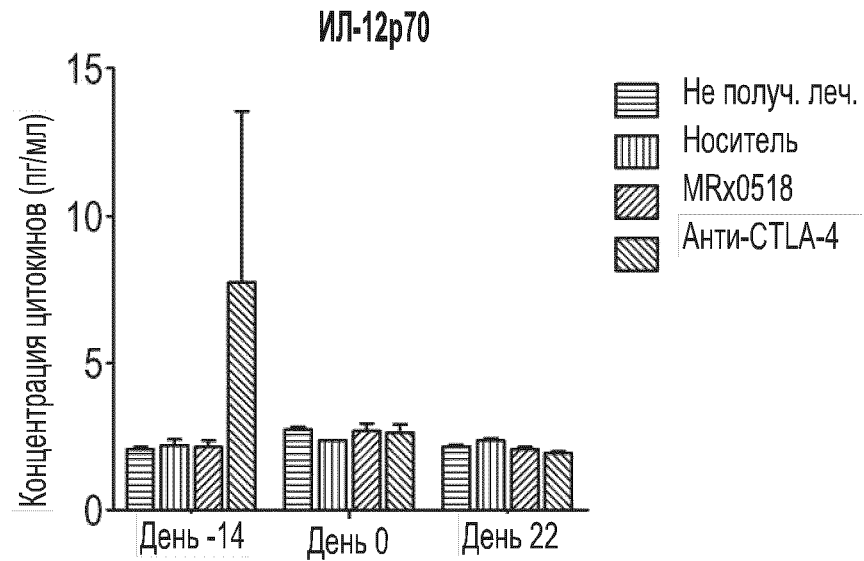
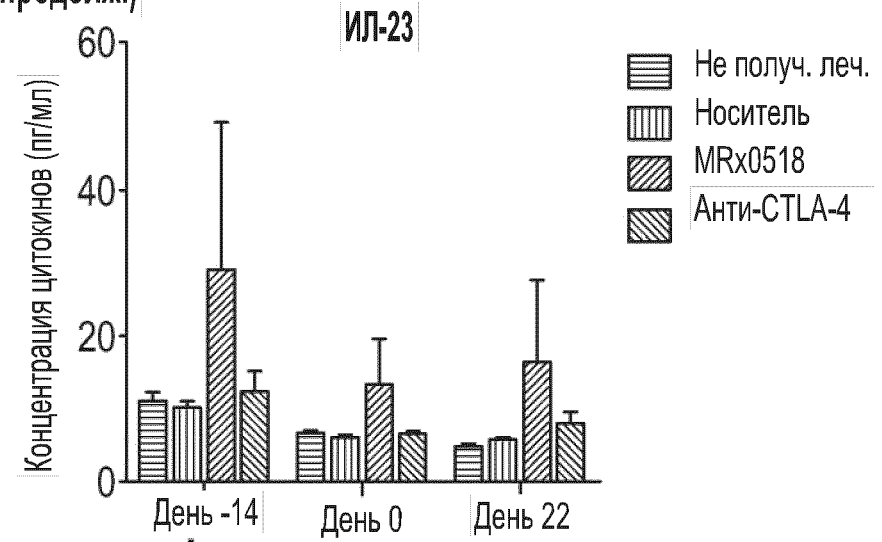
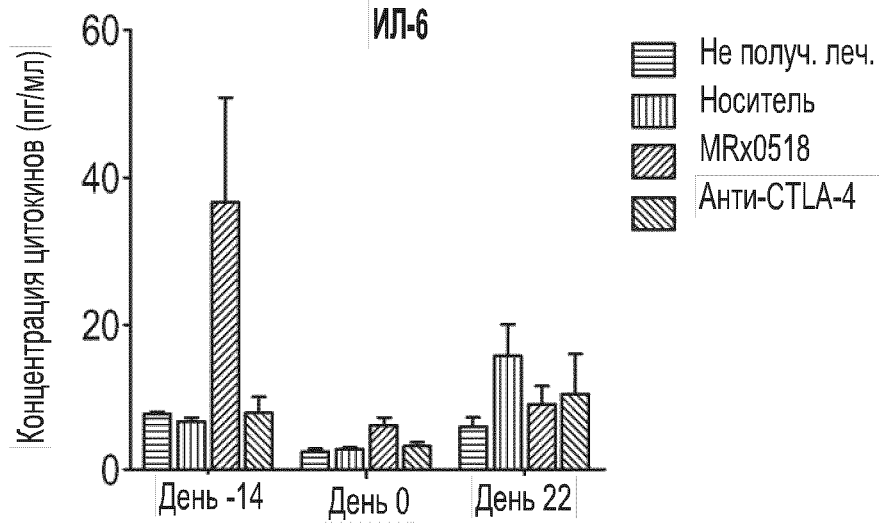
ФИГ. 1D (продолж.)



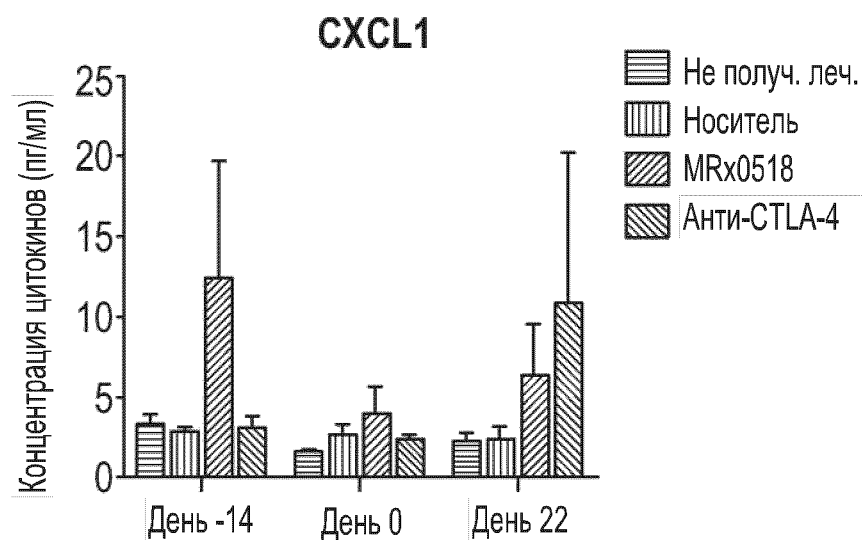
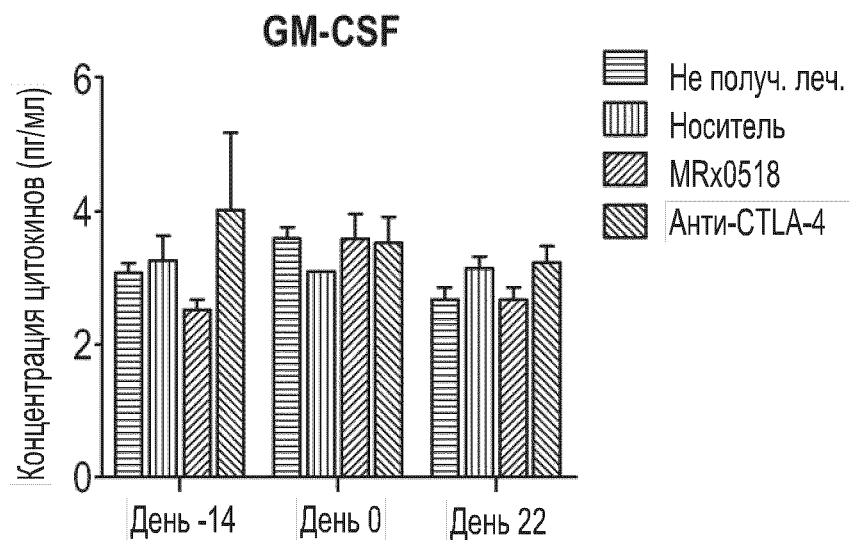
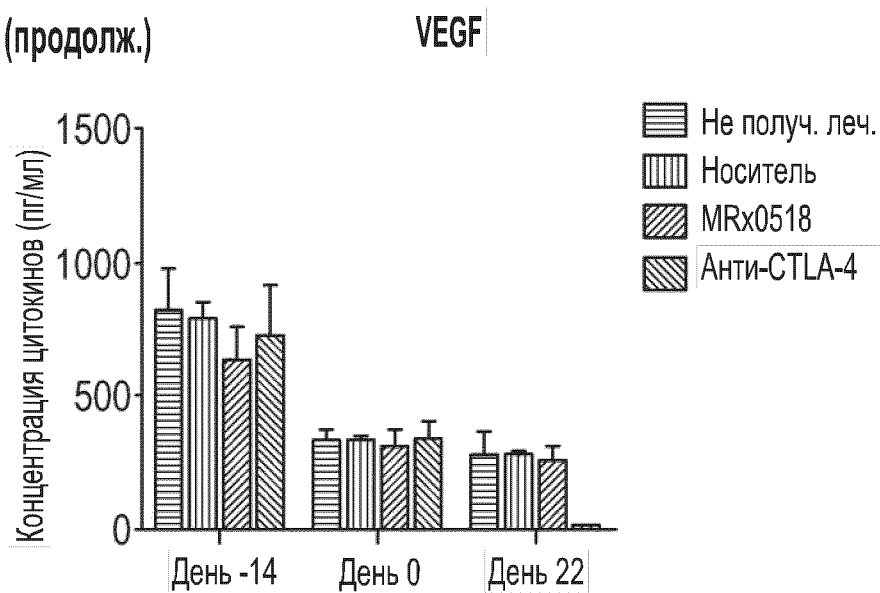
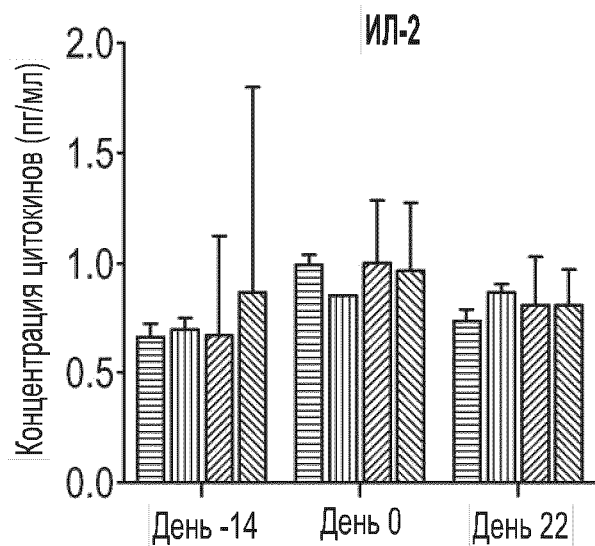
ФИГ. 1Е

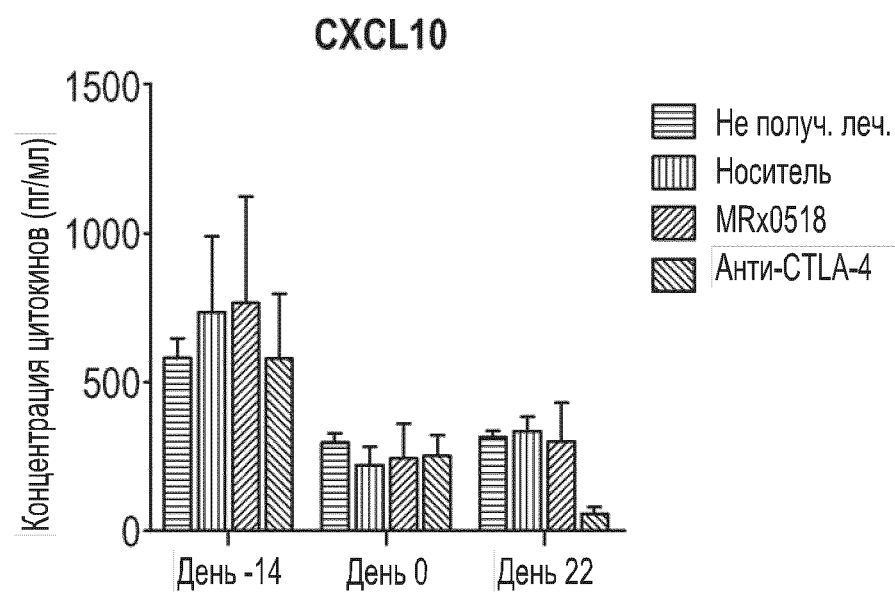
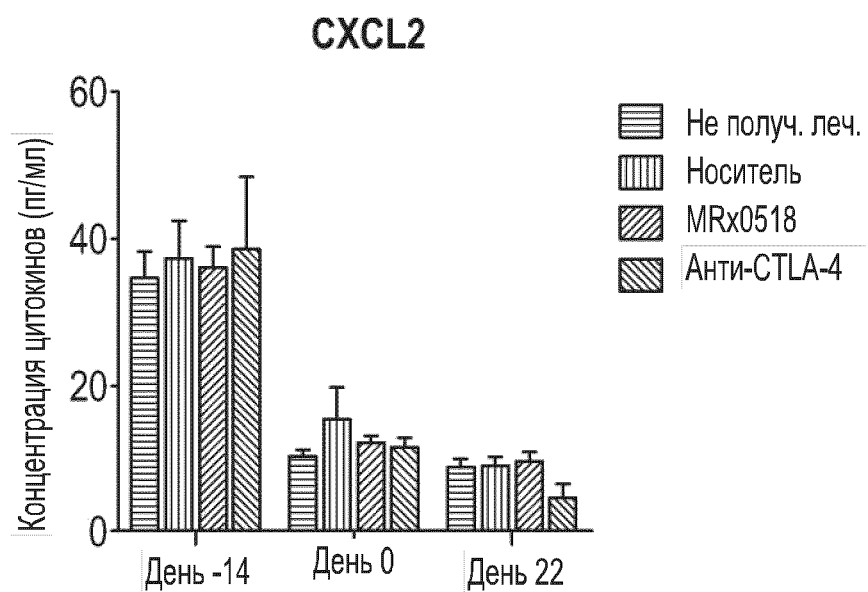


ФИГ. 1Е (продолж.)



ФИГ. 1Е (продолж.)





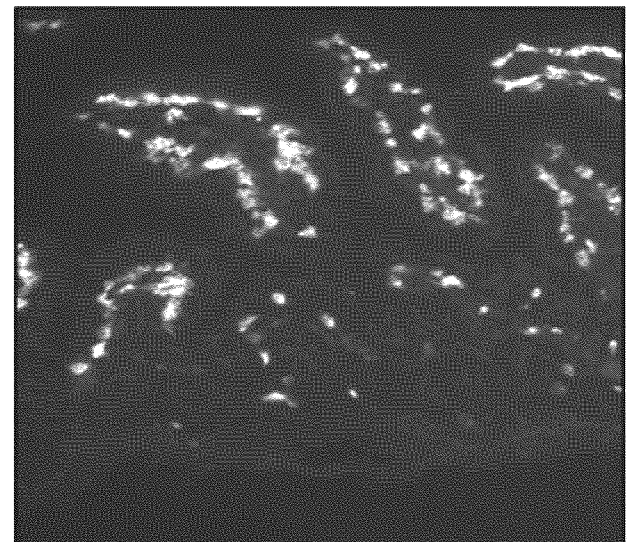
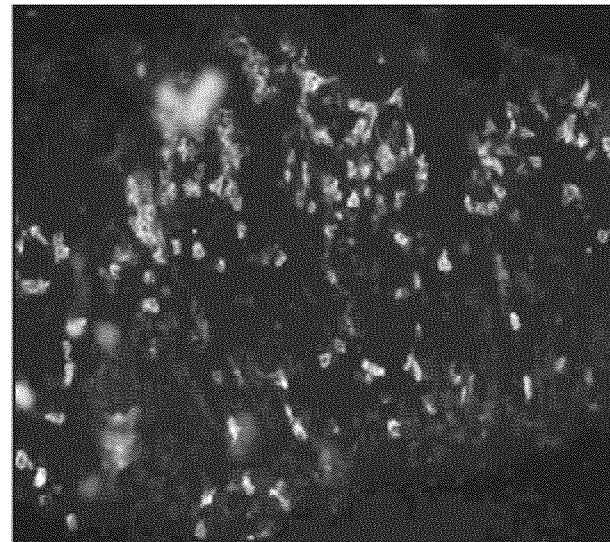
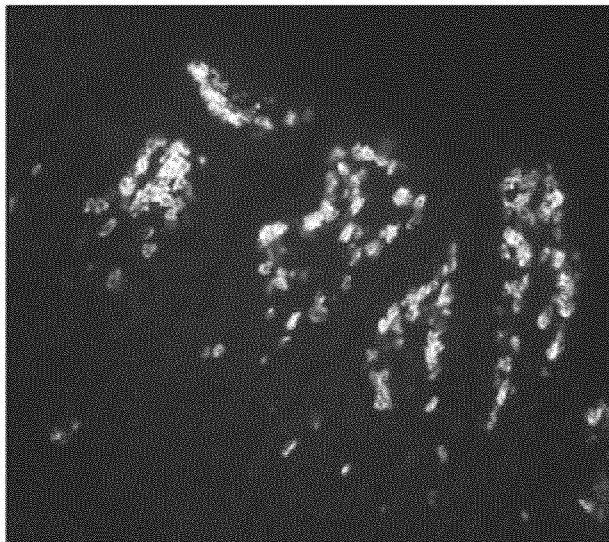
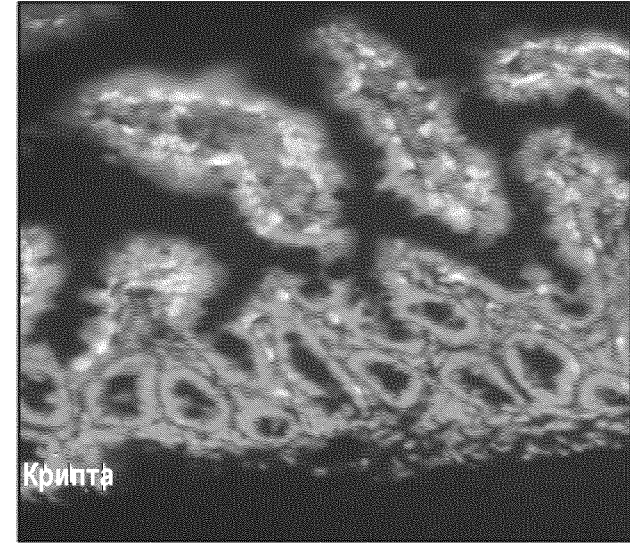
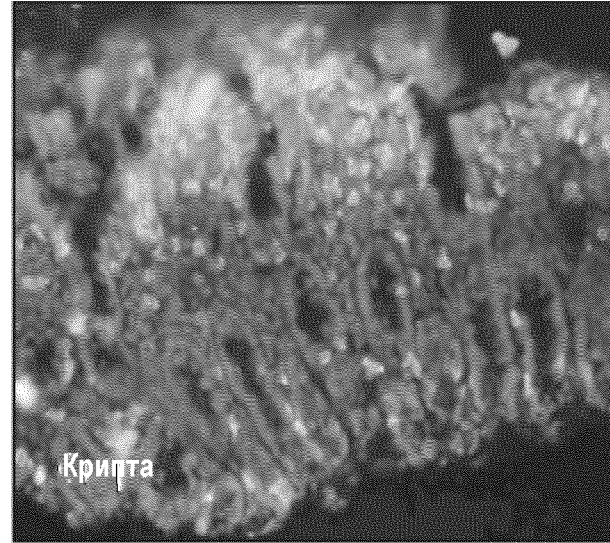
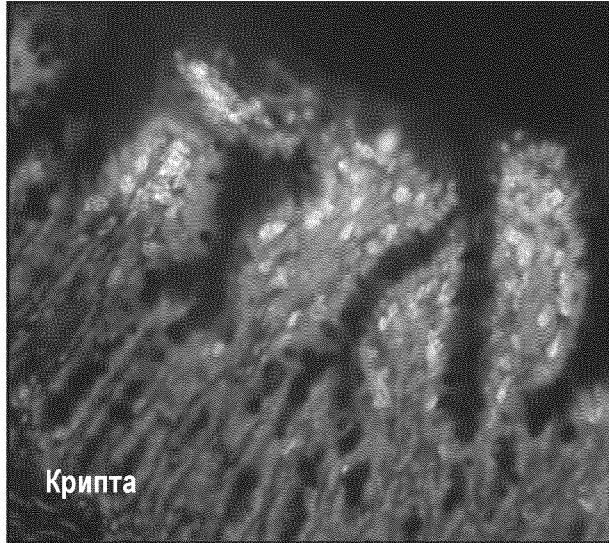
ФИГ. 1Е (продолж.)

ФИГ. 1F

Носитель

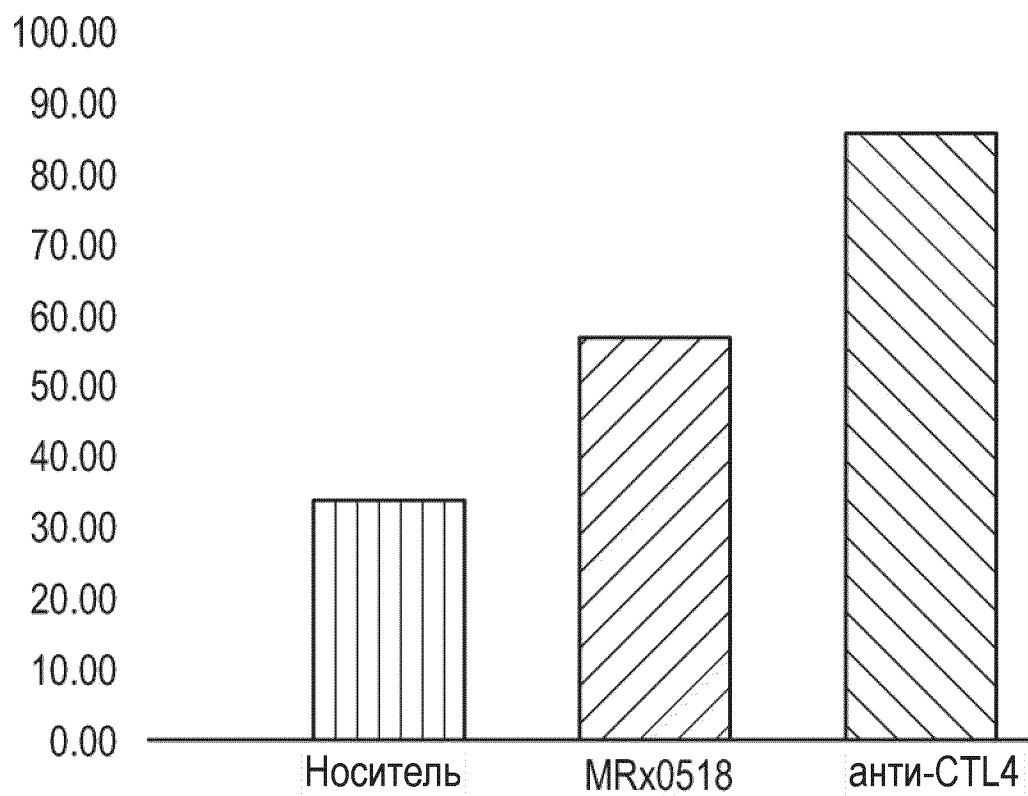
MRx0518

Анти-CTLA4

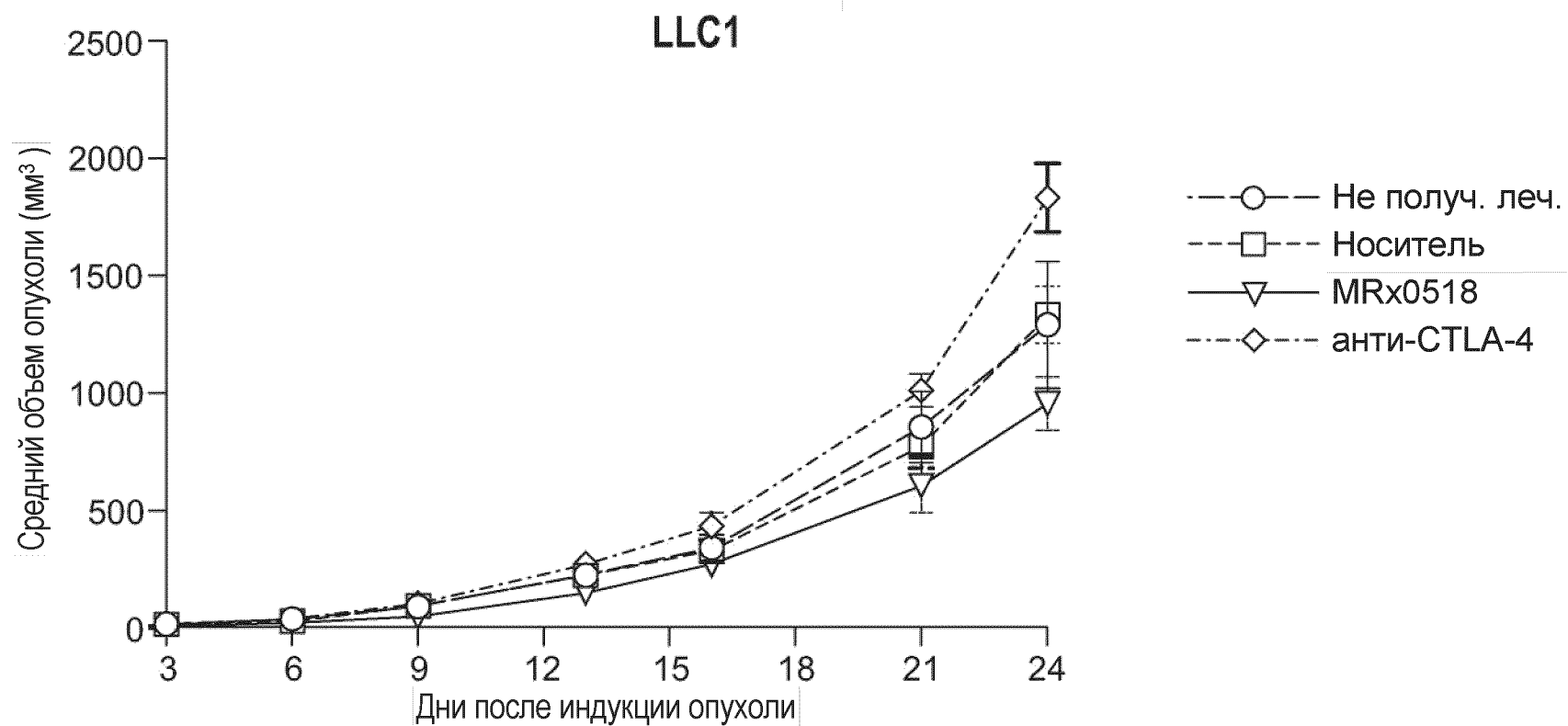


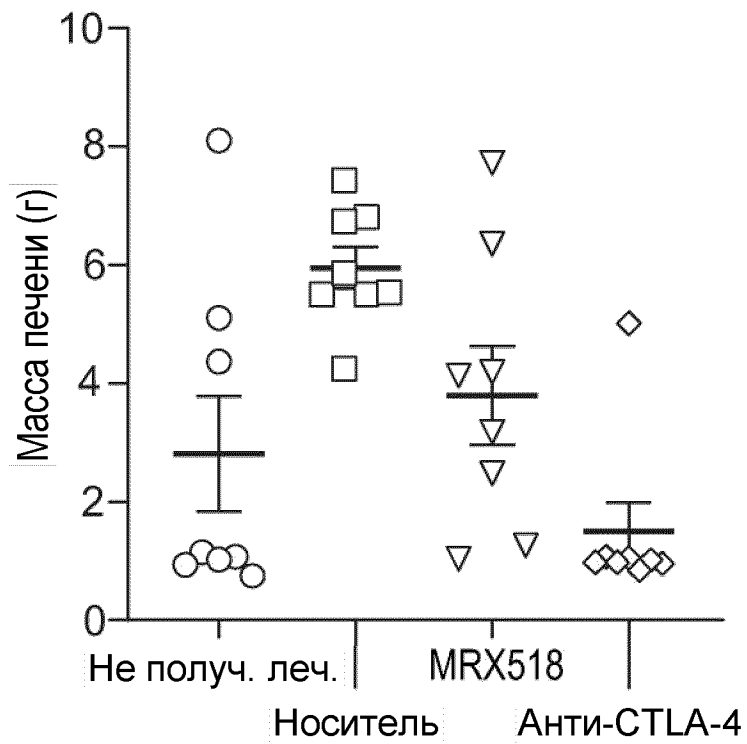
ФИГ. 1G

**Процент просмотренных полей, демонстрирующих более
чем 3 клетки CD8 α ⁺ в области крипты**

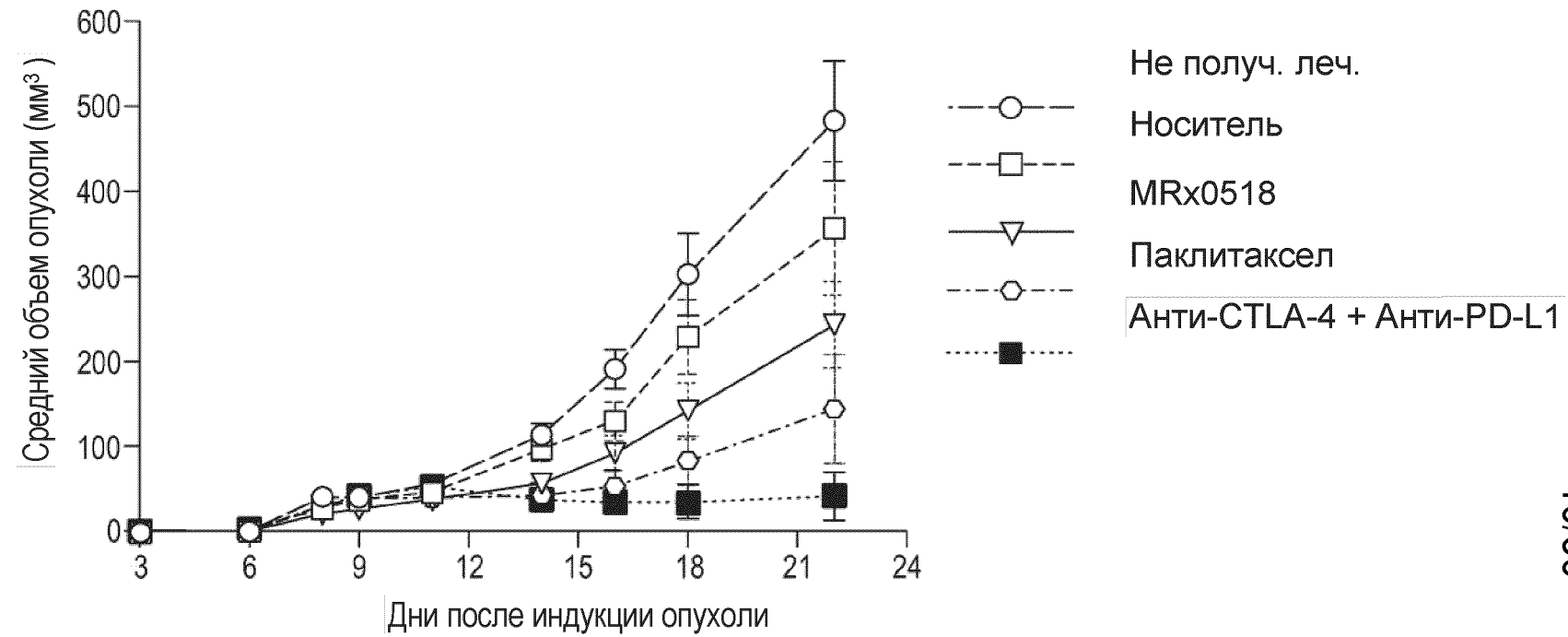


ФИГ. 2

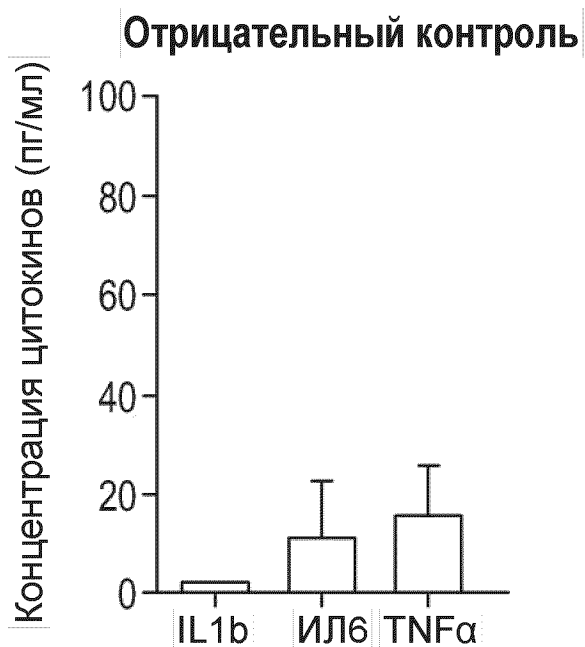
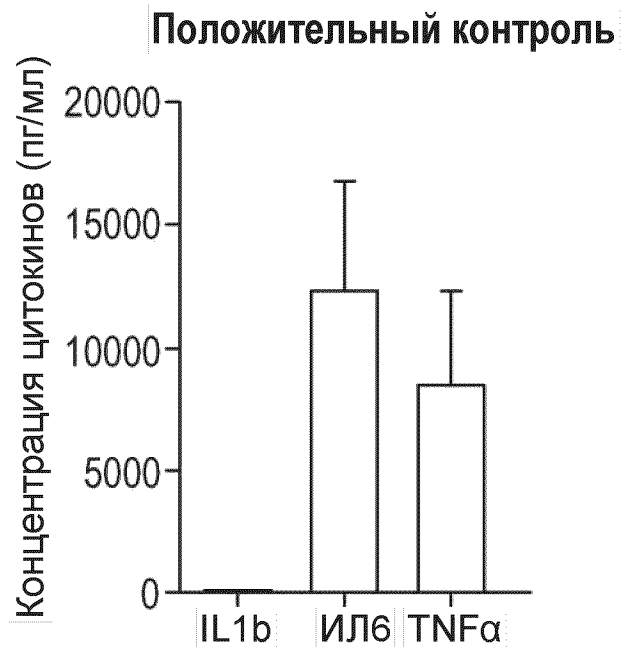
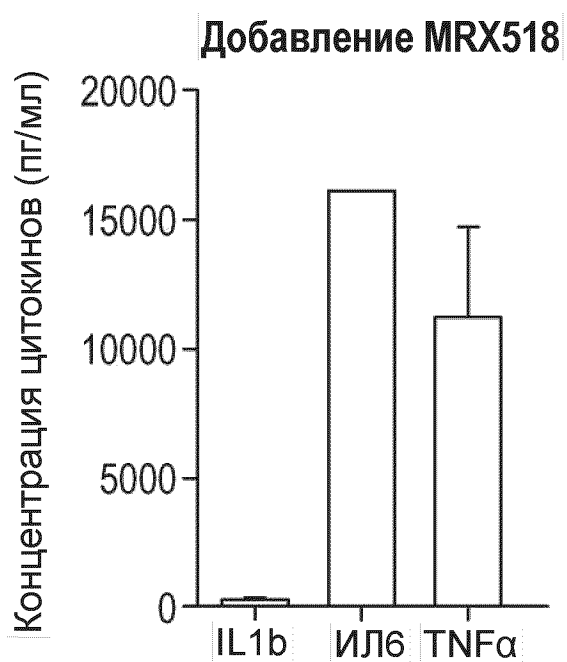
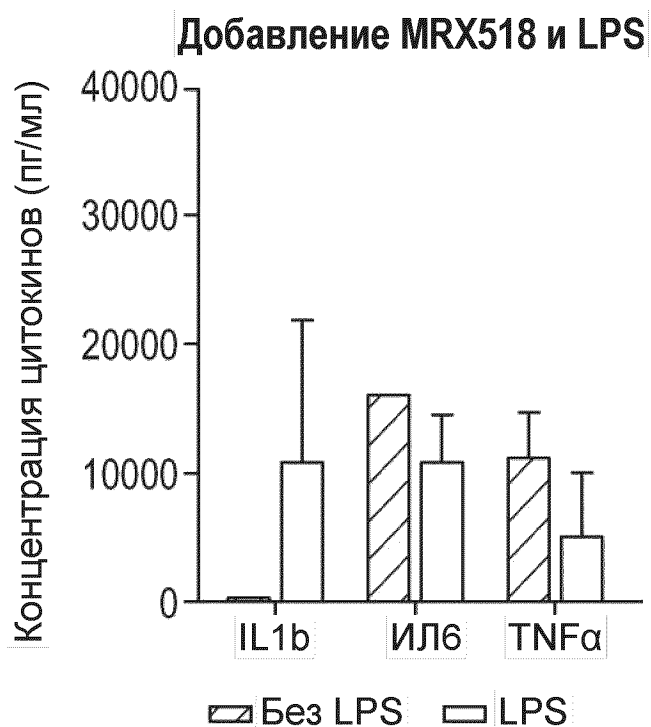


ФИГ. 3А**Нера1 -6**

ФИГ. 3В
RENCA

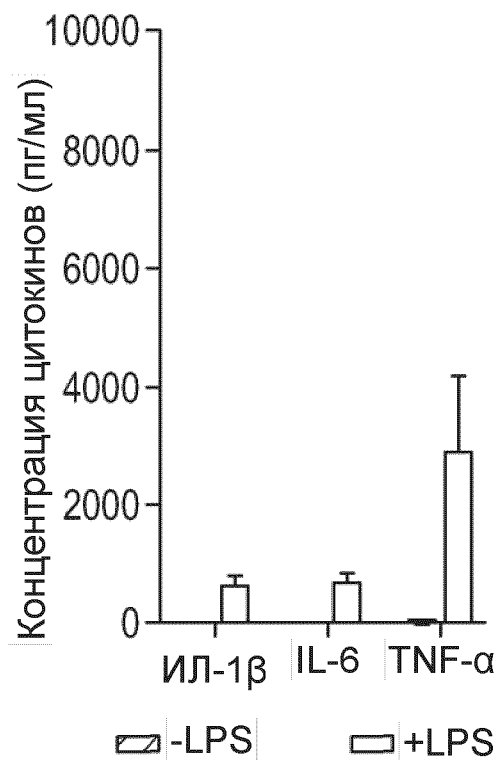


Сутки	3	6	8	9	11	14	16	18	22
Не получ. леч. по сравн. с носителем	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	**
Не получ. леч. по сравн. с MRx0518	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*	****	****
Не получ. леч. по сравн. с паклитакселем	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	***	****	****
Не получ. леч. по сравн. с анти-CTLA-4/анти-PD-L1	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	****	****	****
Носитель по сравн. с MRx0518	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*
Наполнитель по сравн. с паклитакселем	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	***	****
Наполнитель по сравн. с анти-CTLA-4/анти-PD-L1	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*	****	****
MRx0518 по сравн. с паклитакселем	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*
MRx0518 по сравн. с анти-CTLA-4/анти-PD-L1	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*	****
Паклитаксел по сравн. с анти-CTLA-4/анти-PD-L1	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*

ФИГ. 4А**ФИГ. 4В****ФИГ. 4С****ФИГ. 4D**

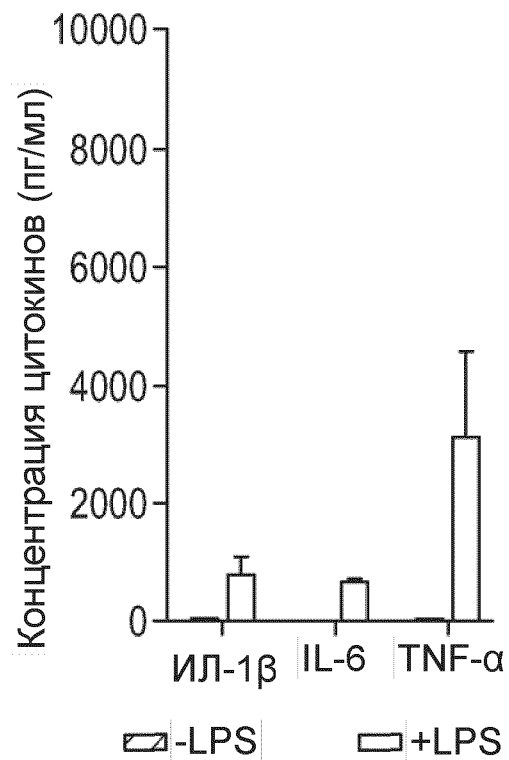
ФИГ. 5А

Отрицательный контроль
(Без бактерий)



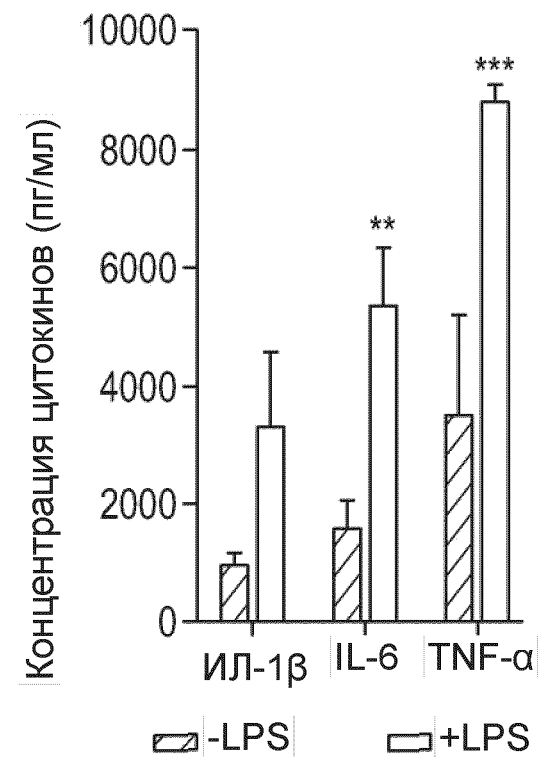
ФИГ. 5В

Отрицательный контроль
(Бактериальный осадок)

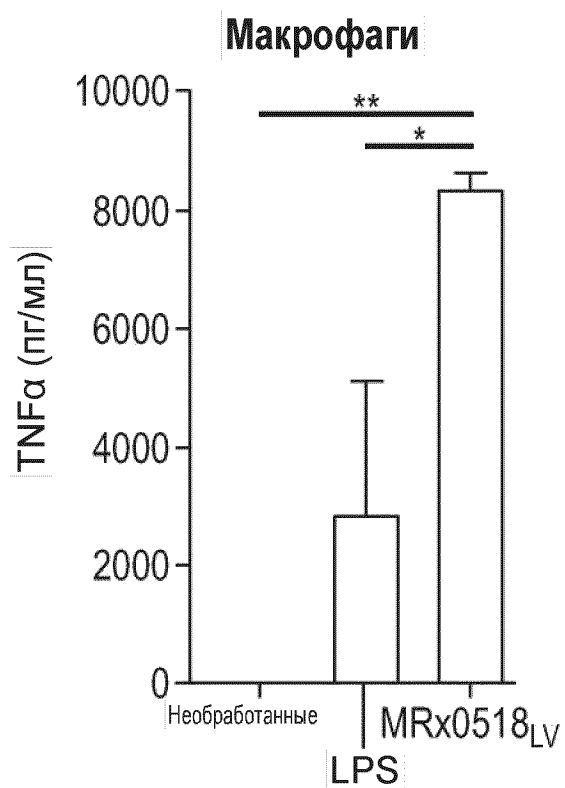


ФИГ. 5С

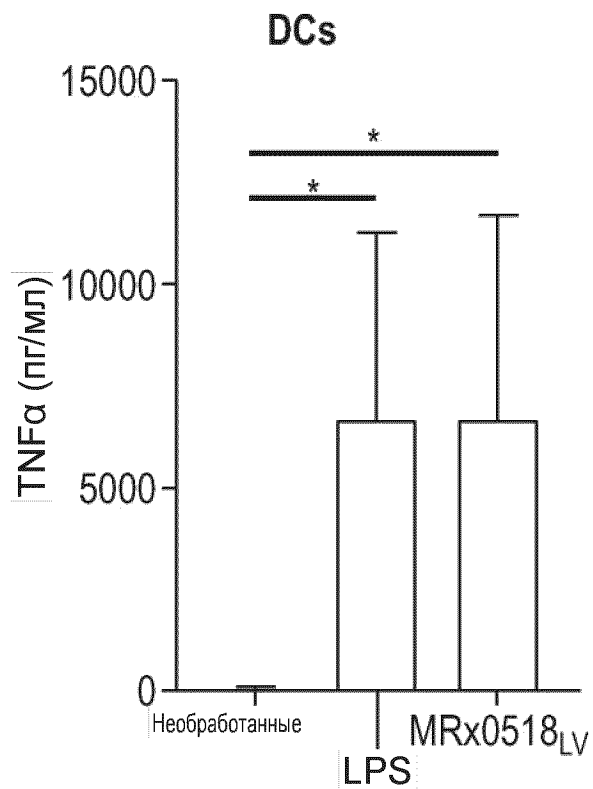
Добавление MRX518



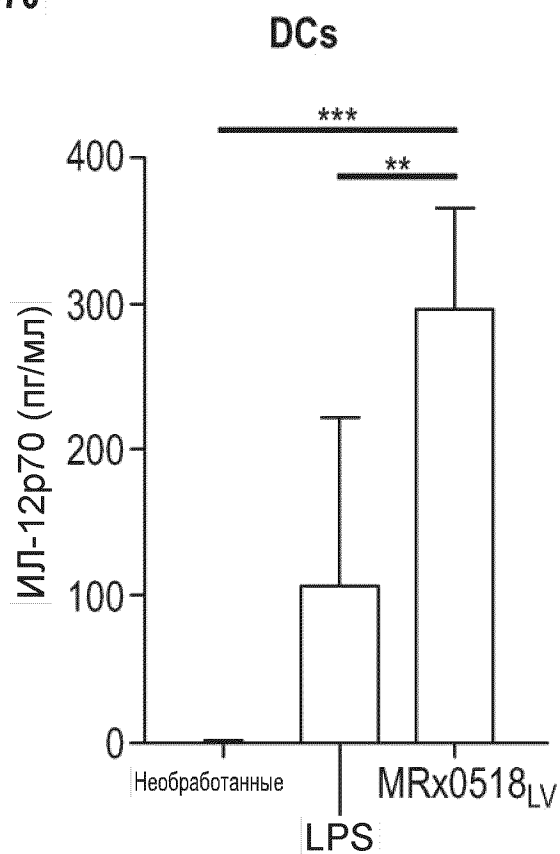
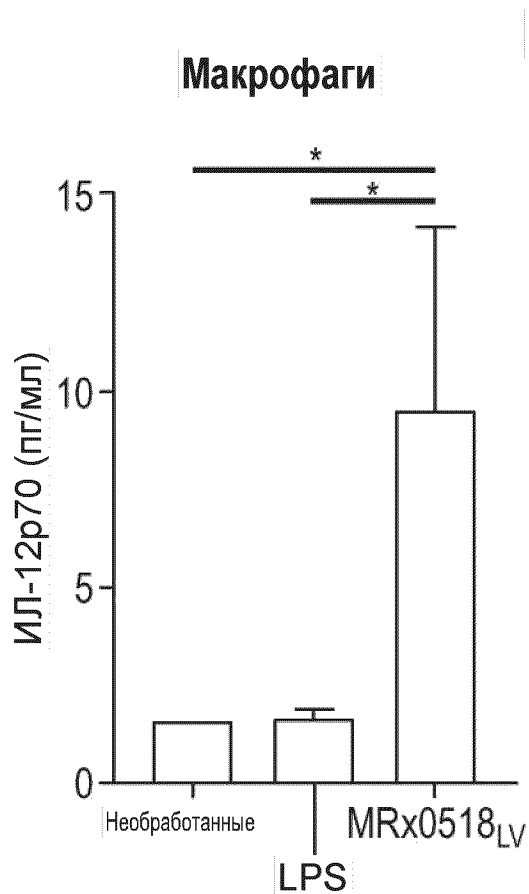
ФИГ. 6



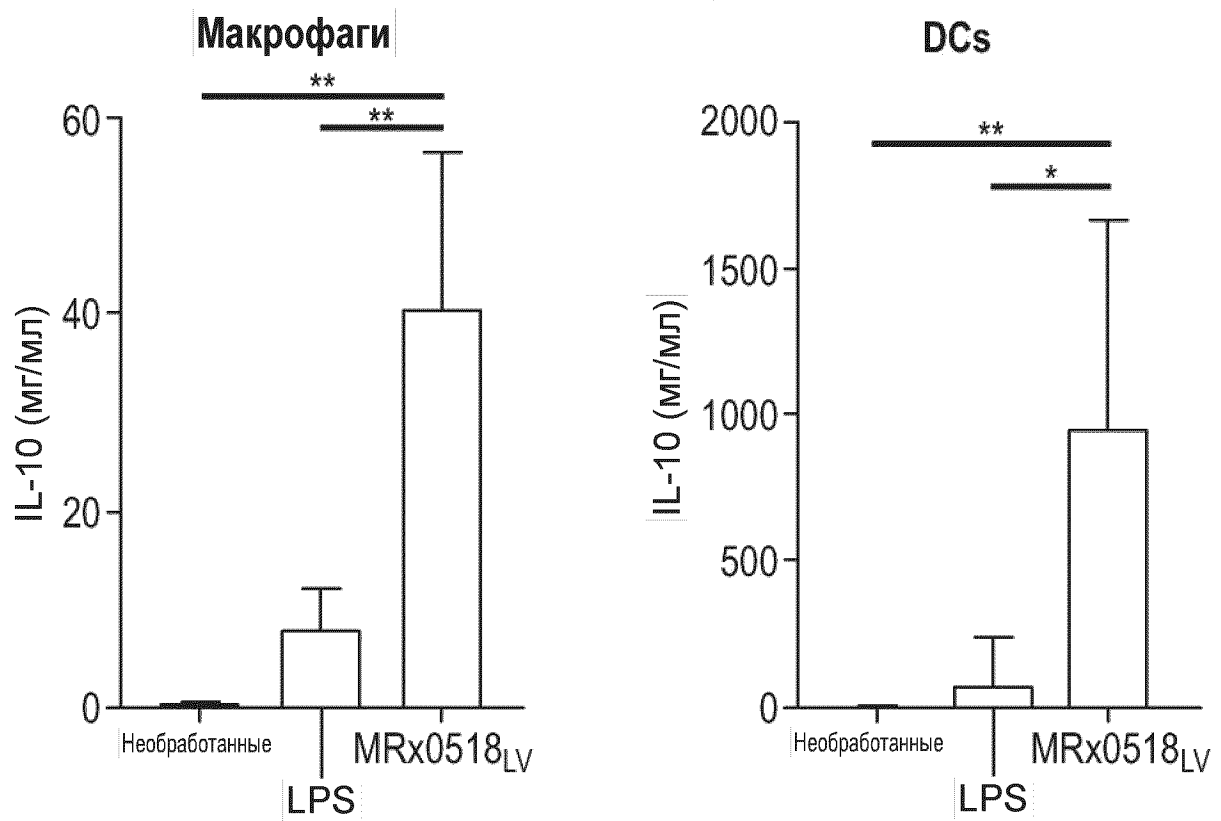
ФИГ. 7



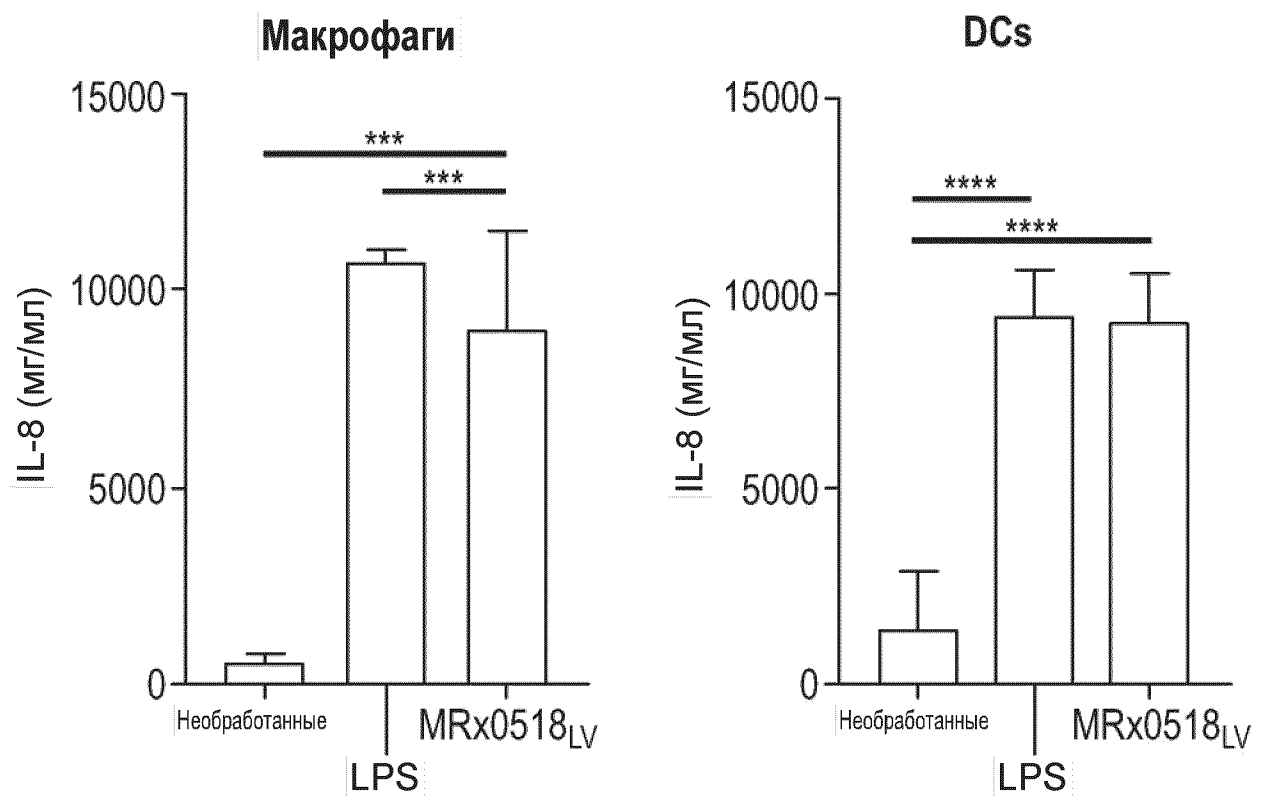
ФИГ. 8



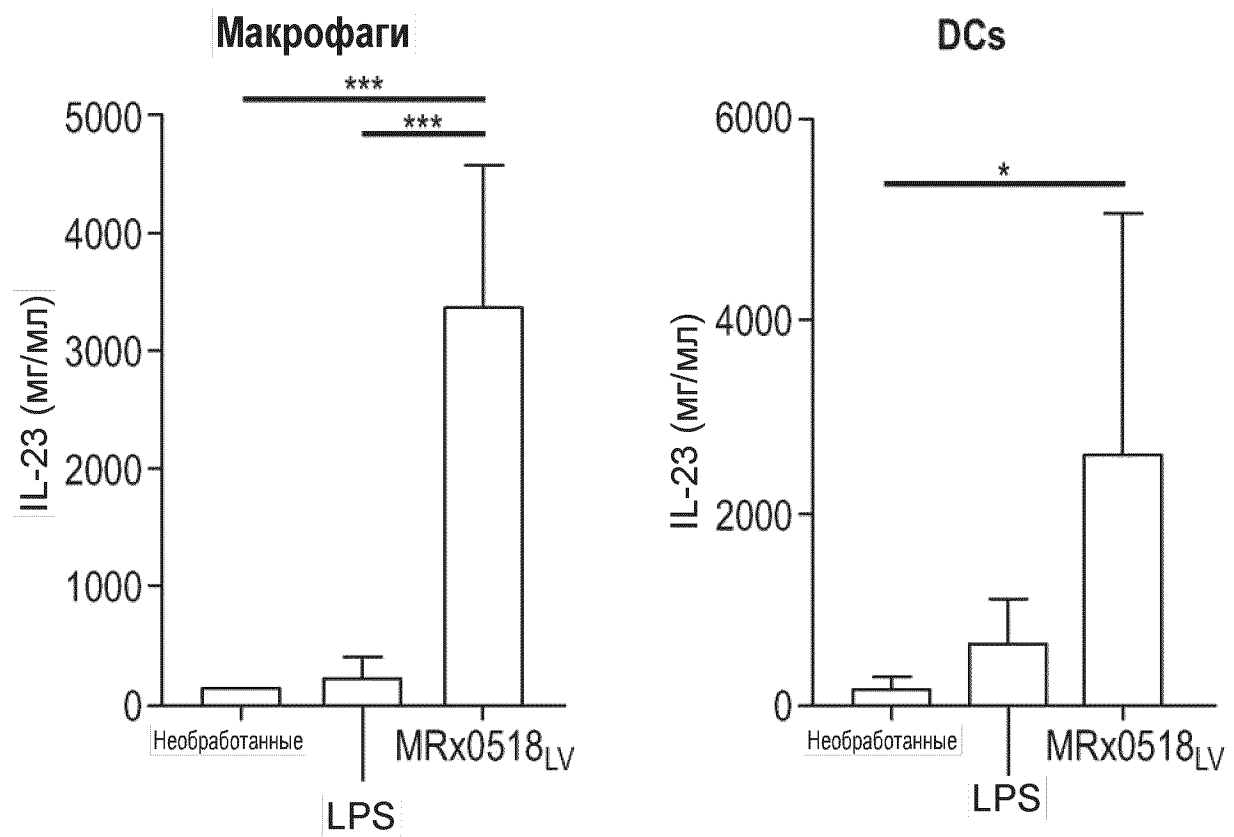
ФИГ. 9



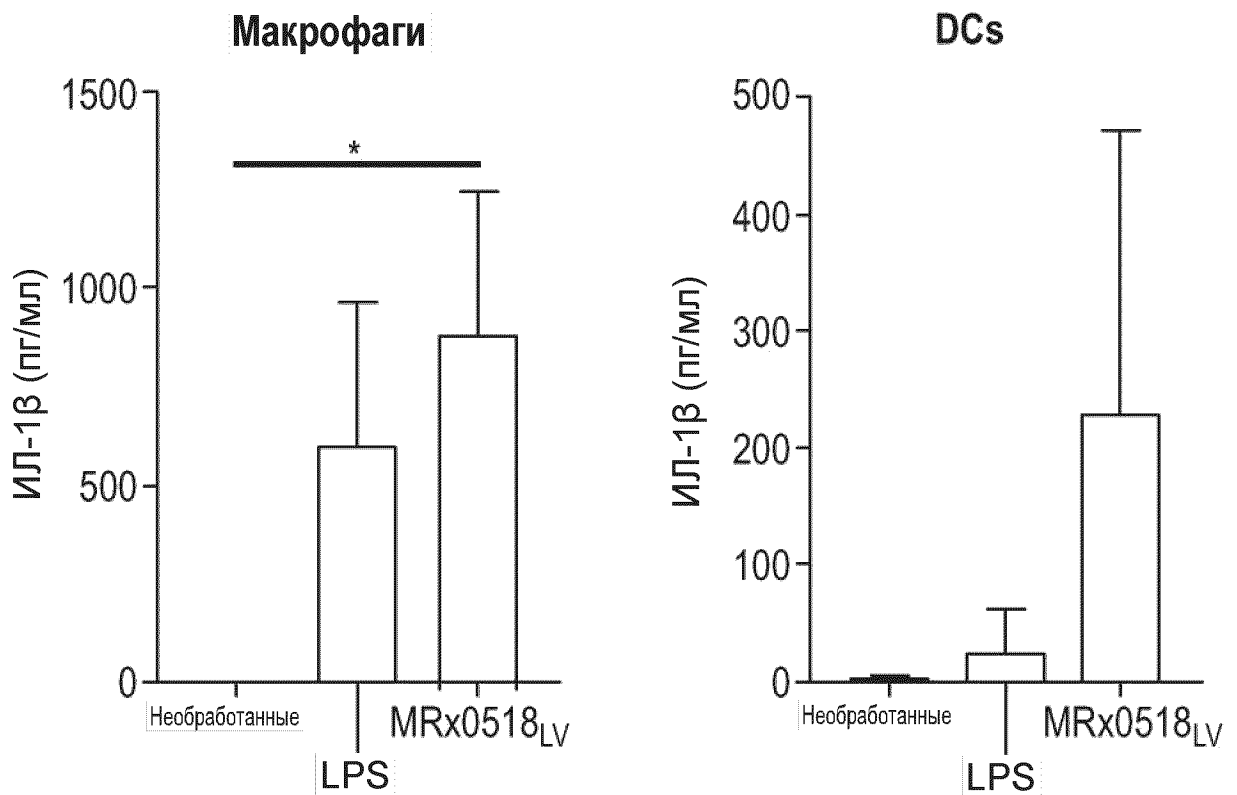
ФИГ. 10



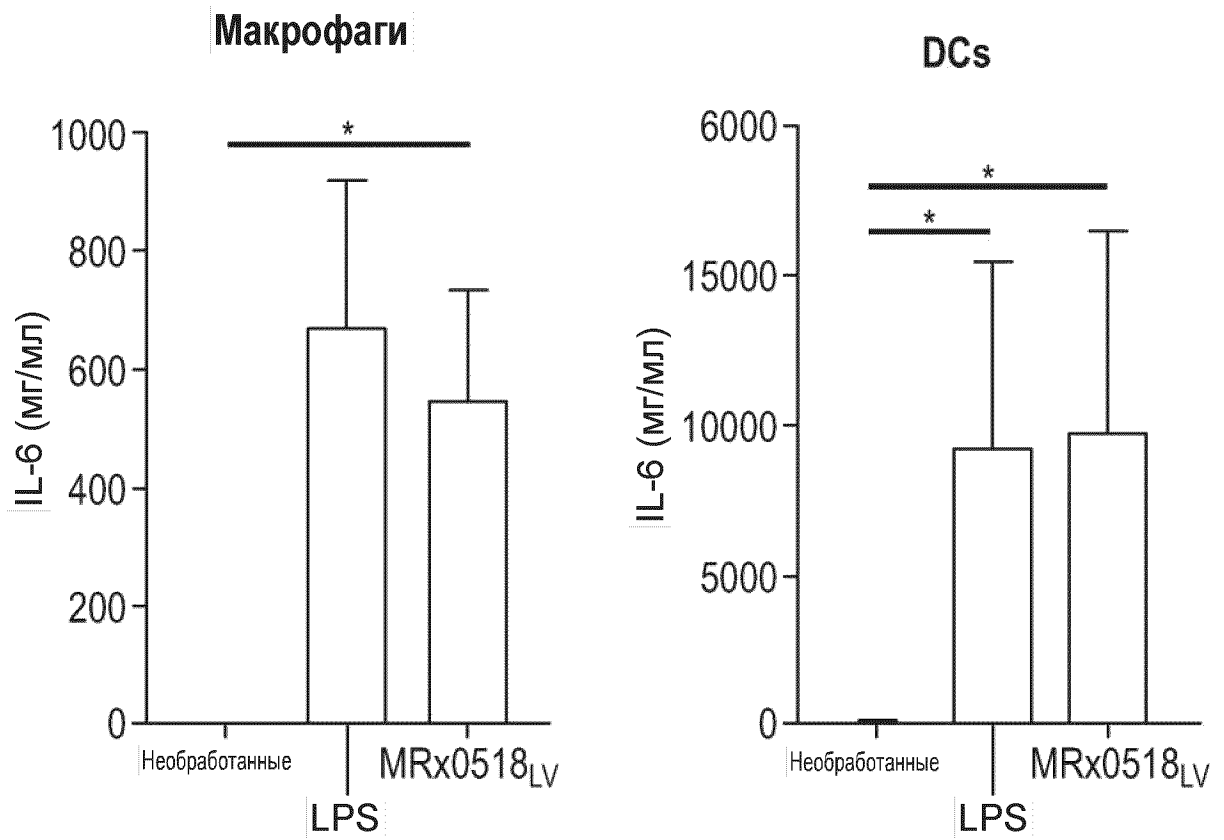
ФИГ. 11



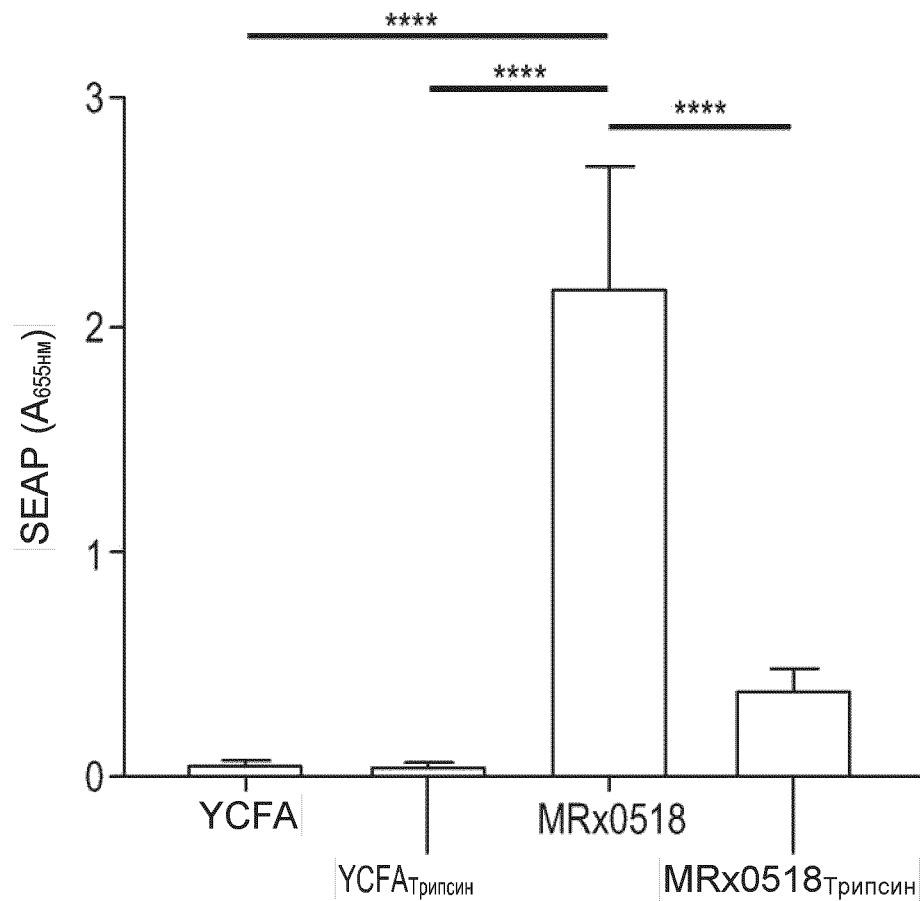
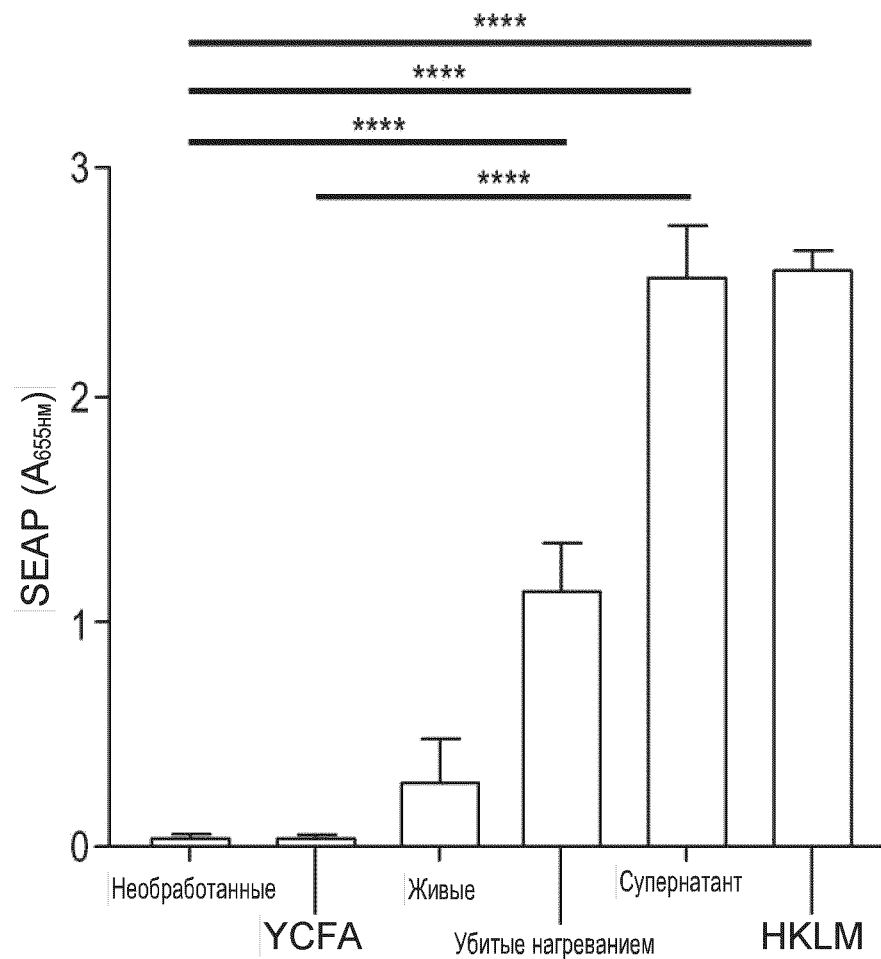
ФИГ. 12



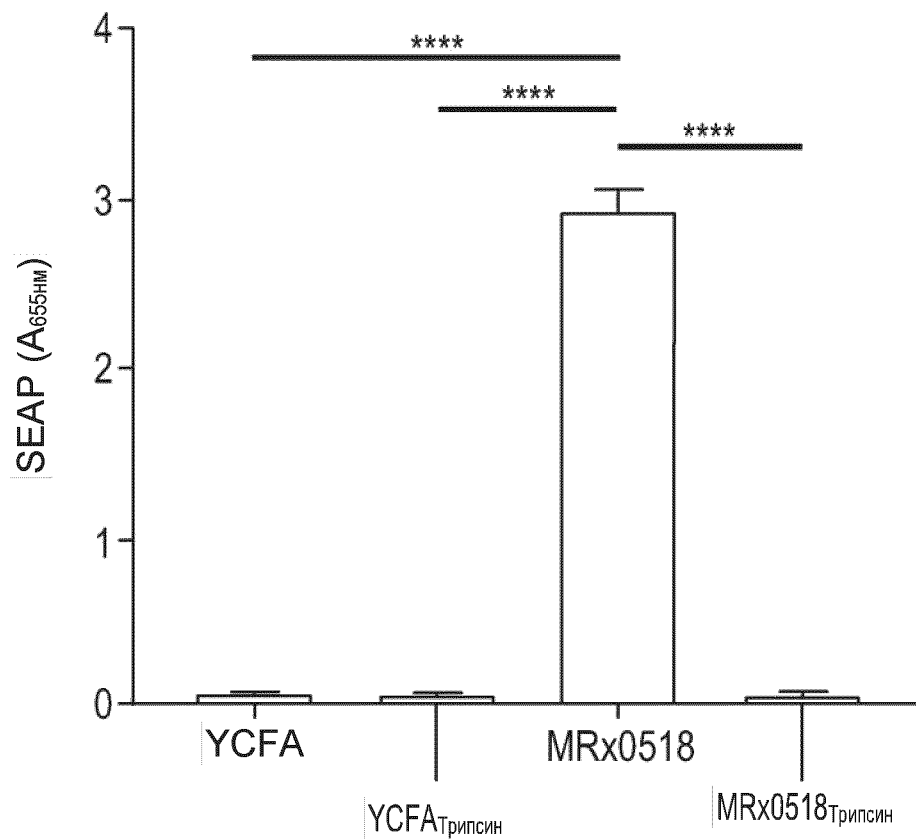
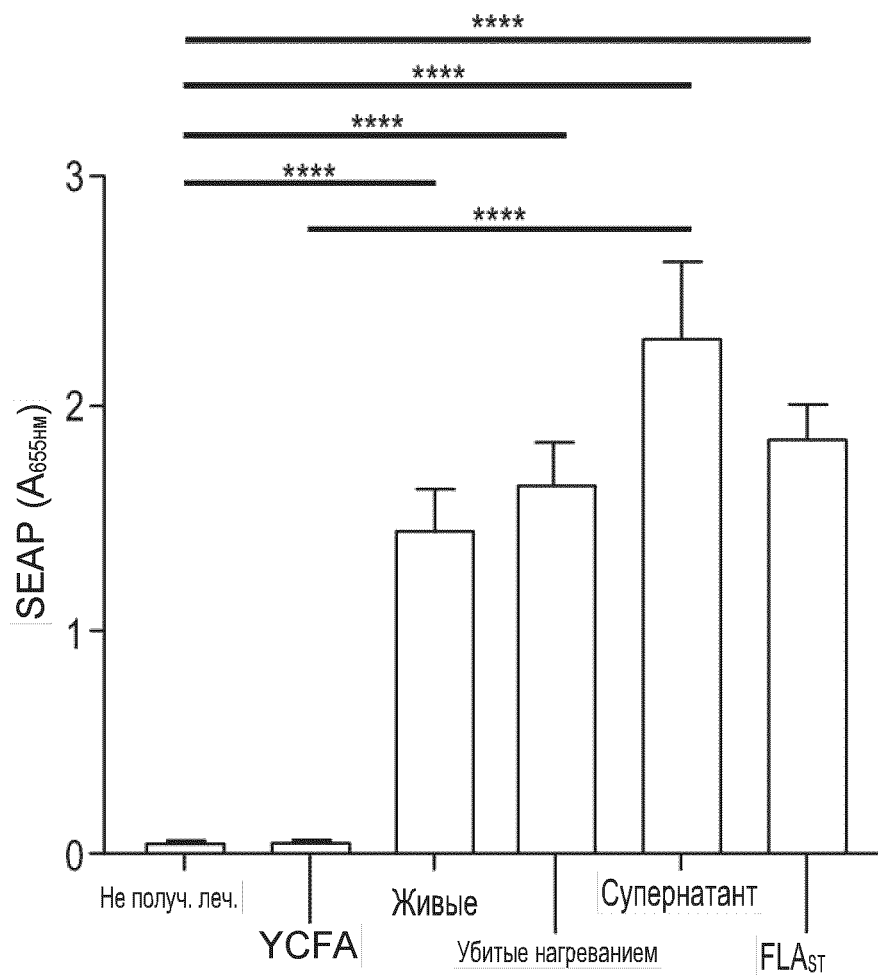
ФИГ. 13



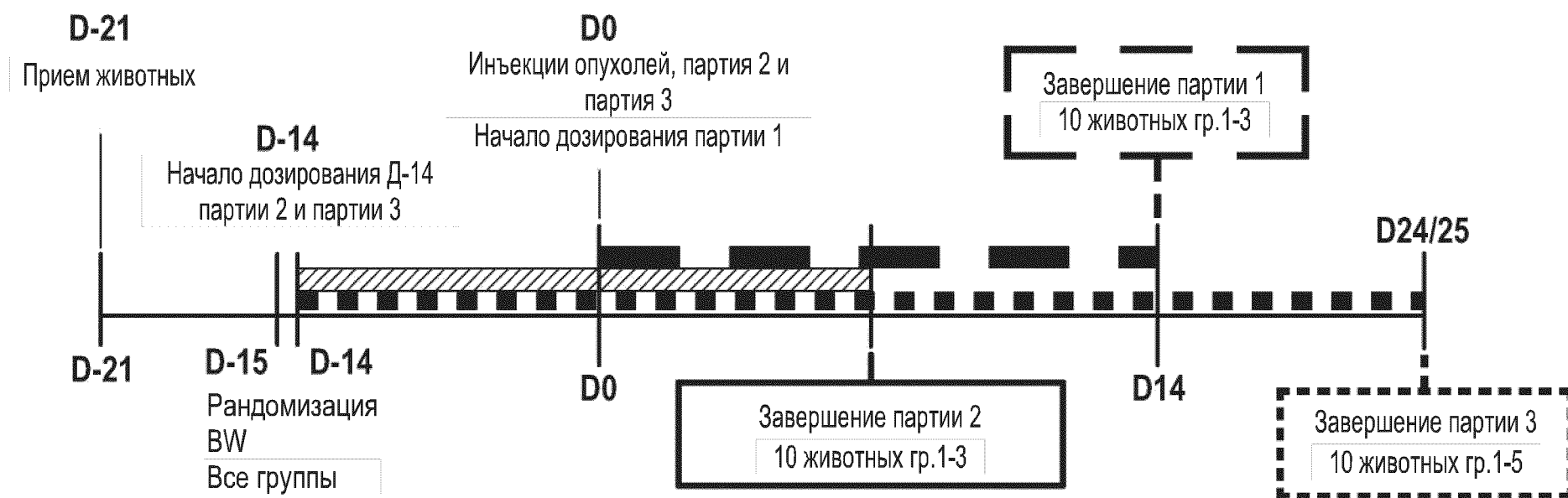
ФИГ. 14
NF-κB



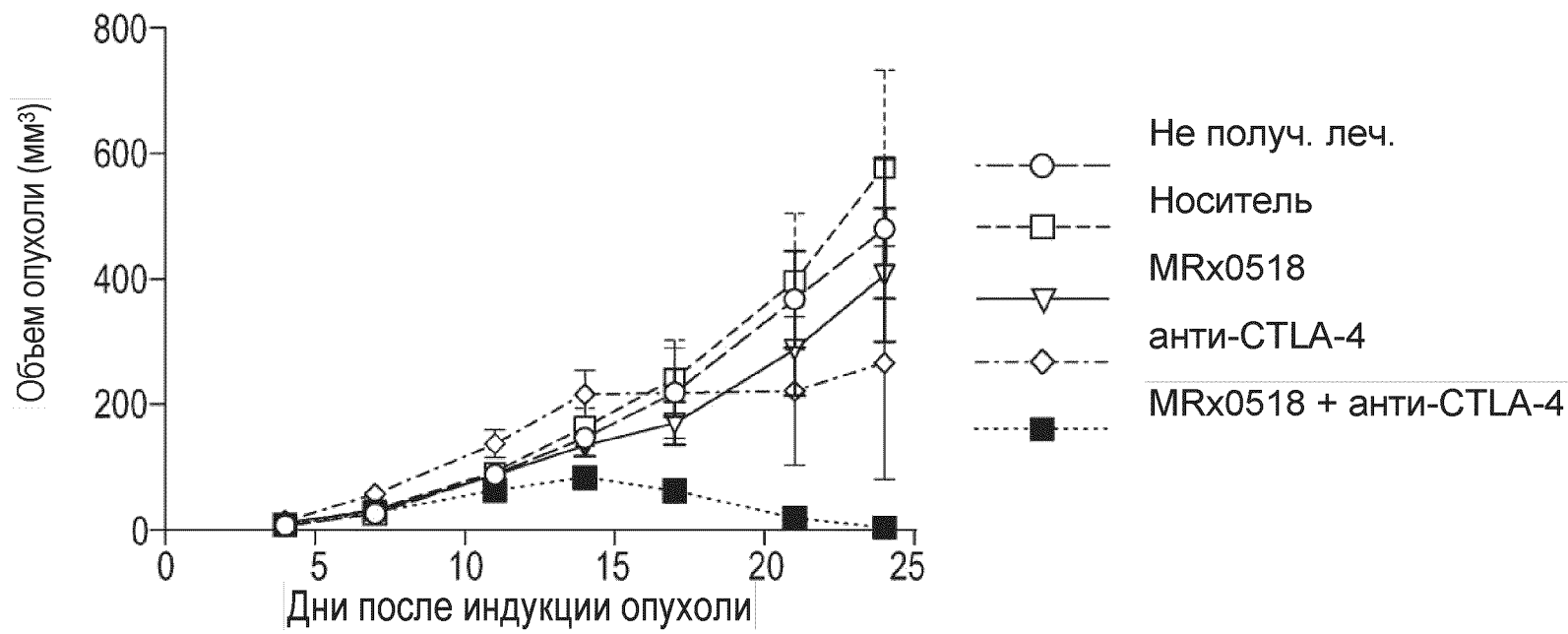
ФИГ. 15
TLR5



ФИГ. 16А

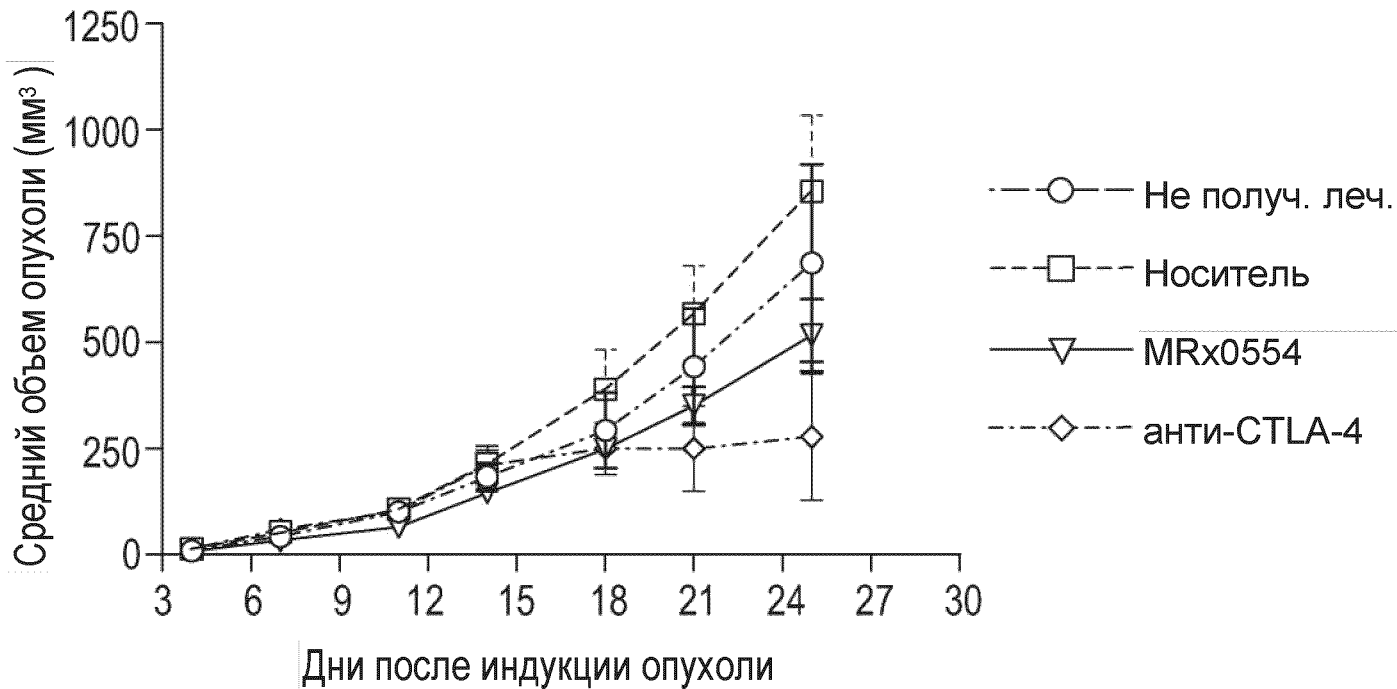


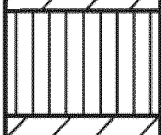
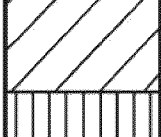
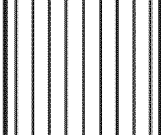
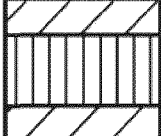
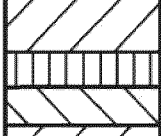
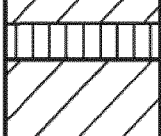
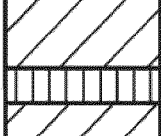
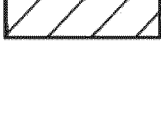
ФИГ. 16В
EMT6



Сутки	4	7	11	14	17	21	24
Не получ. леч. по сравн. с носителем	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.
Не получ. леч. по сравн. с MRx0518	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.
Не получ. леч. по сравн. с анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.
Не получ. леч. по сравн. с MRx0518 + анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	***	****
Носитель по сравн. с MRx0518	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.
Носитель по сравн. с анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	**
Носитель по сравн. с MRx0518 + анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	***	****
MRx0518 по сравн. с анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.
MRx0518 по сравн. с MRx0518 + анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*	****
анти-CTLA-4 по сравн. с MRx0518 + анти-CTLA-4	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	нзнач.	*

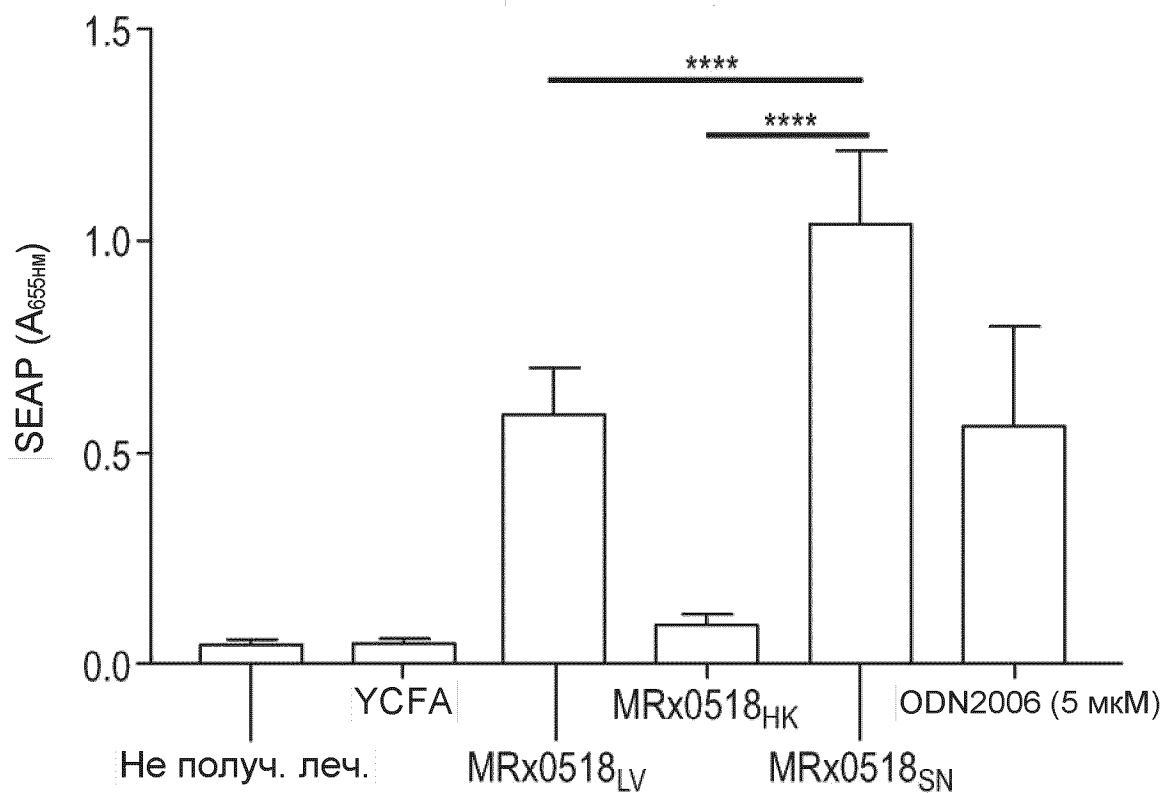
EMT6

[illegible]

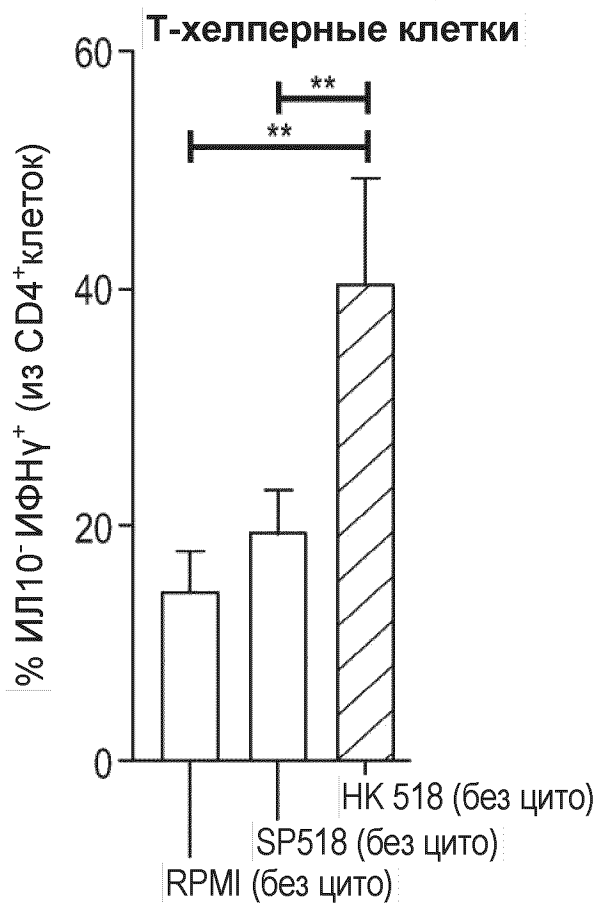
Исследование	MRx0554	Расшифровка
Контроль		Отрицательный
Глицерин		Отрицательный
Эритрит		Отрицательный
D-арабиноза		Отрицательный
L-арабиноза		Отрицательный
D-рибоза		Отрицательный
D-ксилоза		Отрицательный
L-ксилоза		Отрицательный
D-адонит		Отрицательный
Метил-бетаD-ксилопиранозид		Отрицательный
D-галактоза		Отрицательный
D-глюкоза		Отрицательный
D-фруктоза		Отрицательный
D-манноза		Отрицательный
L-сорбоза		Отрицательный
L-рамноза		Отрицательный
Дульцит		Отрицательный
Инозит		Отрицательный
D-маннит		Отрицательный
D-сорбит		Отрицательный
Метил-альфаD-маннопиранозид		Отрицательный
Метил-альфаD-гликопиранозид		Отрицательный
N-ацетилглюкозамин		Отрицательный
Амигдалин		Отрицательный
Арбутин		Отрицательный
Эскулин		Отрицательный
Салицин		Отрицательный
D-целлобиоза		Отрицательный
D-мальтоза		Отрицательный
D-лактоза		Отрицательный
D-мелибиоза		Отрицательный
D-сахароза (сахароза)		Отрицательный
D-трегалоза		Отрицательный
Инулин		Отрицательный
D-мелецитоза		Отрицательный
D-раффиноза		Отрицательный
Амидон (Крахмал)		Отрицательный
Гликоген		Отрицательный
Ксилит		Отрицательный
Гентиобиоза		Отрицательный
D-тураноза		Отрицательный
D-луксоза		Отрицательный
D-тагатоза		Отрицательный
D-фукоза		Отрицательный
L-фукоза		Отрицательный
D-арабит		Отрицательный
L-арабит		Отрицательный
Глюконат калия		Отрицательный
2-Кетоглюконат калия		Отрицательный
5-Кетоглюконат калия		Отрицательный

ФИГ. 18

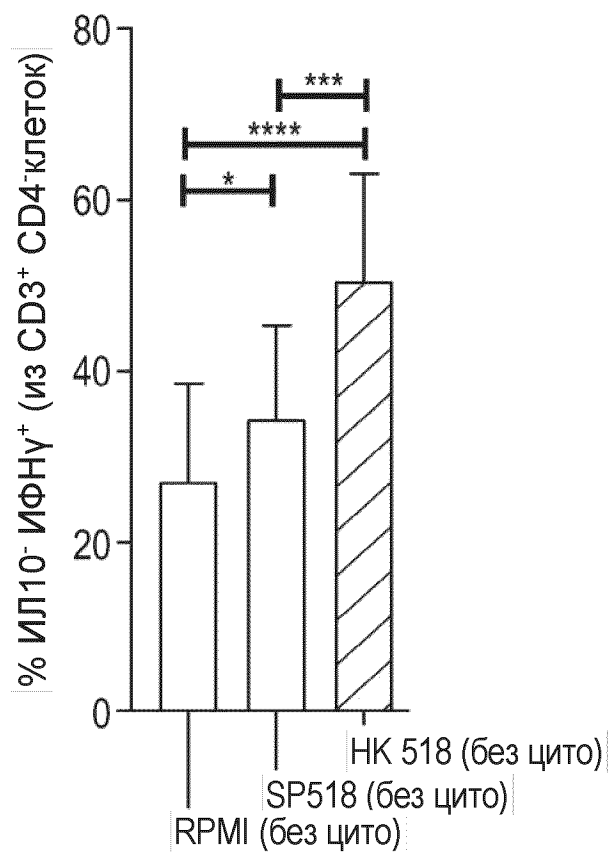
ФИГ. 19

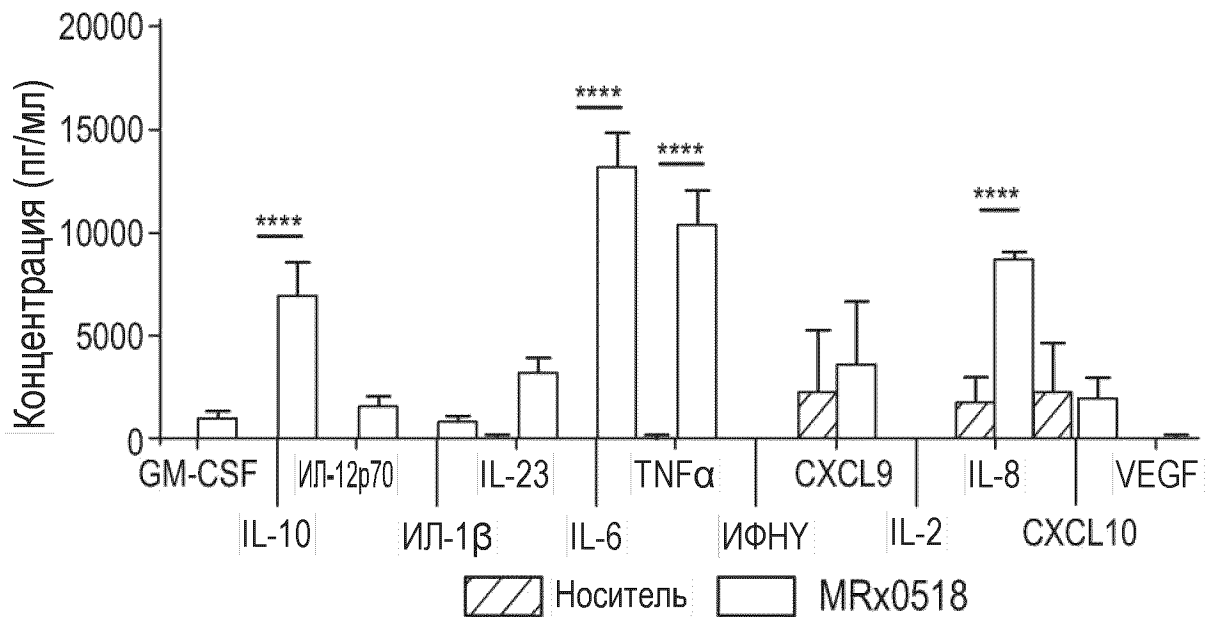
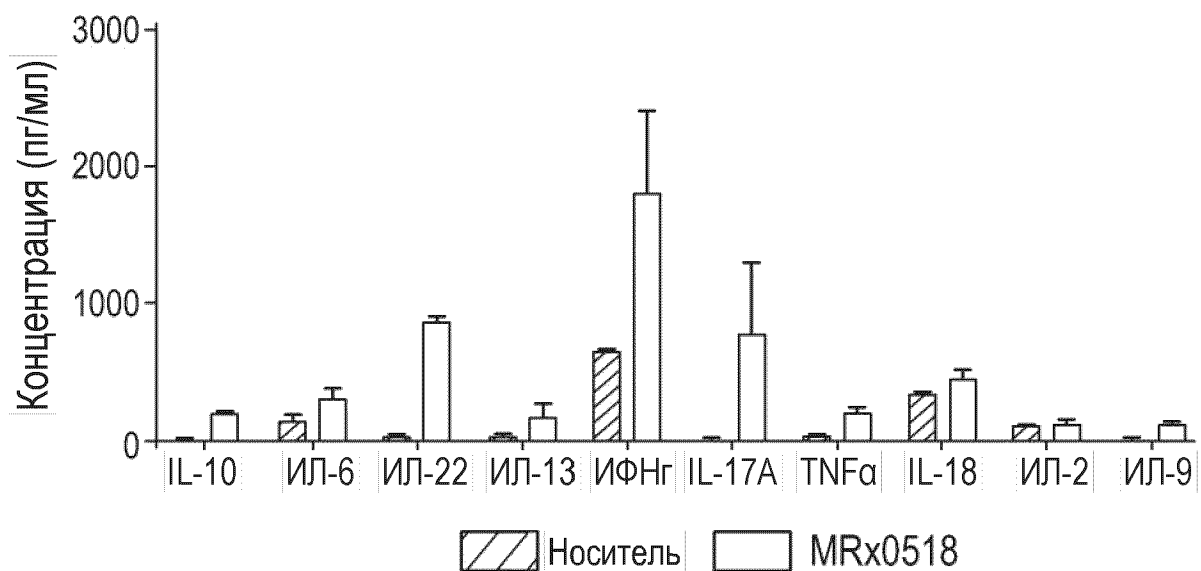


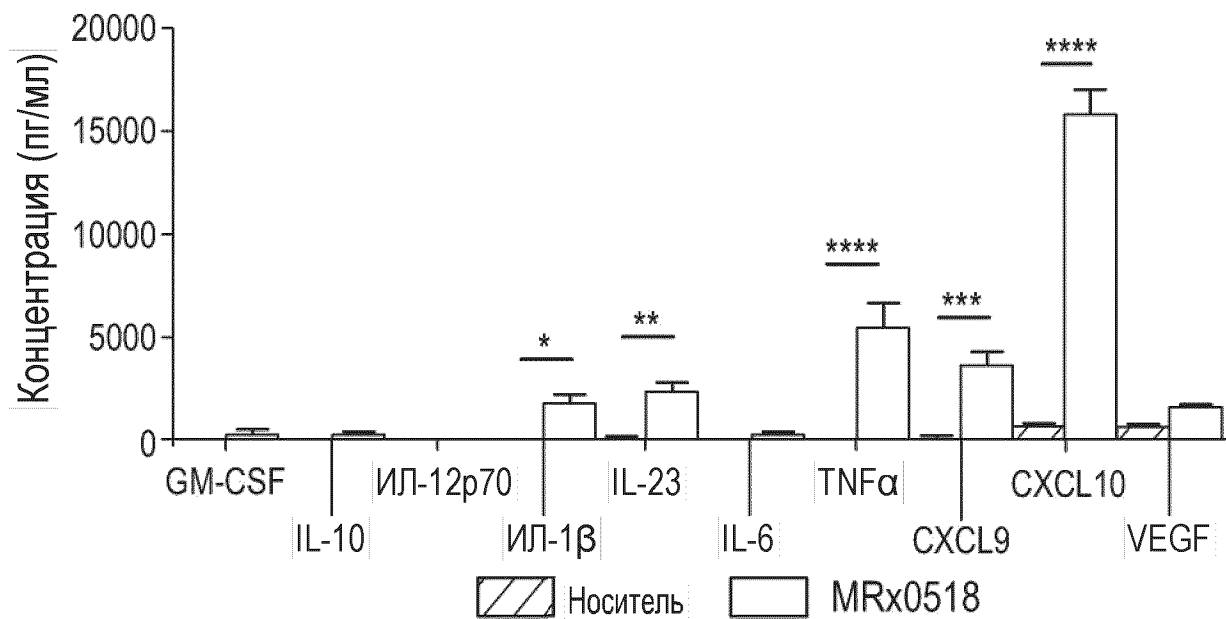
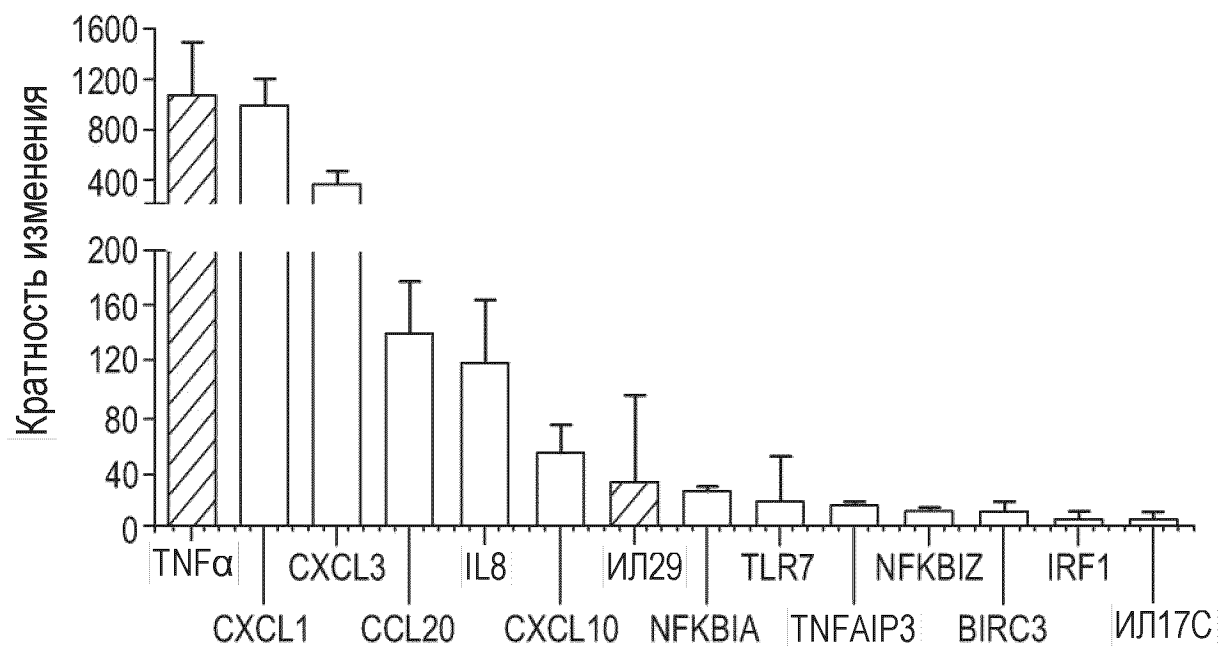
ФИГ. 20А



ФИГ. 20В

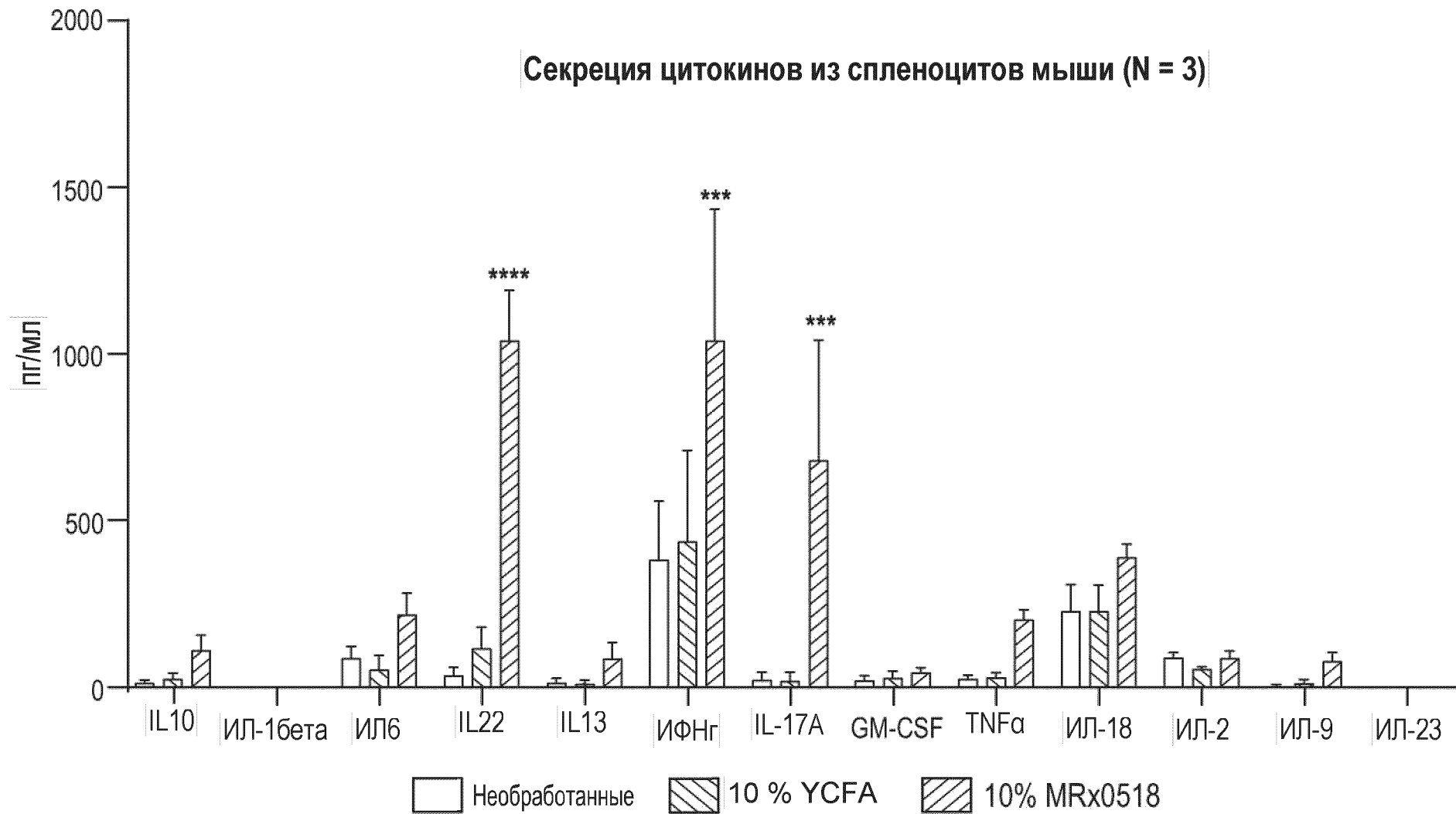


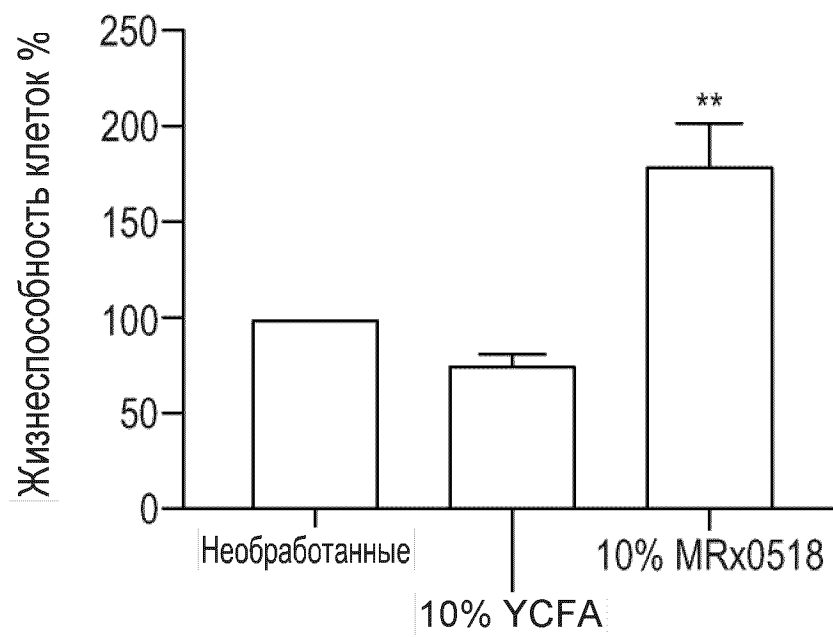
ФИГ. 21А**Продукция цитокинов РВМС****ФИГ. 21В****Продукция цитокинов спленocyтaми**

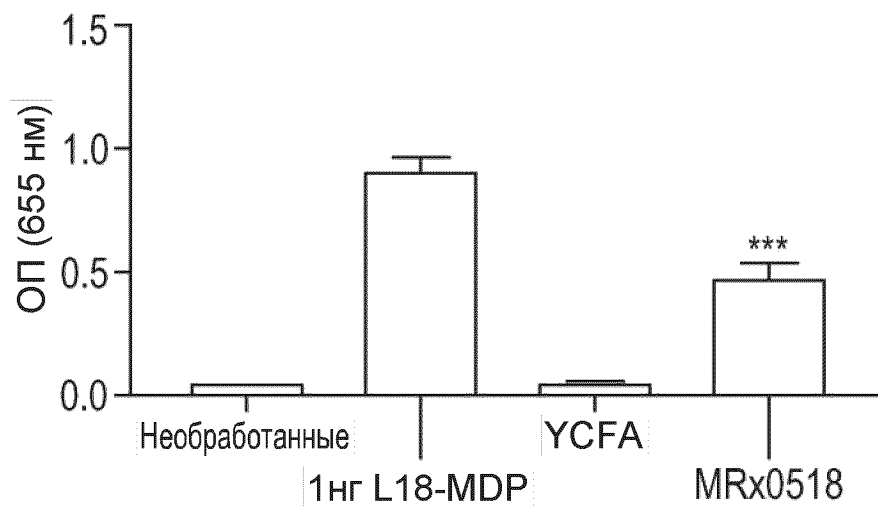
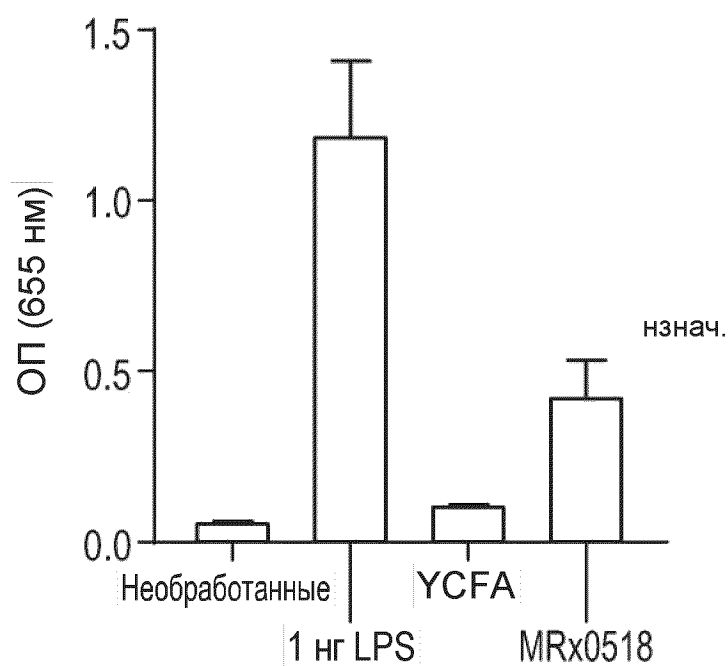
ФИГ. 21С**Продукция цитокинов ТНР-1****ФИГ. 21D****Экспрессия цитокинов Сасо-2**

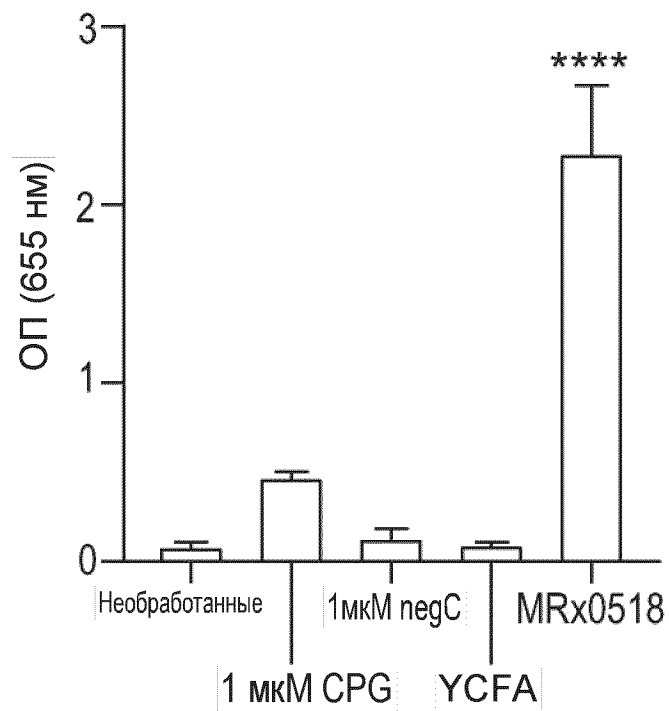
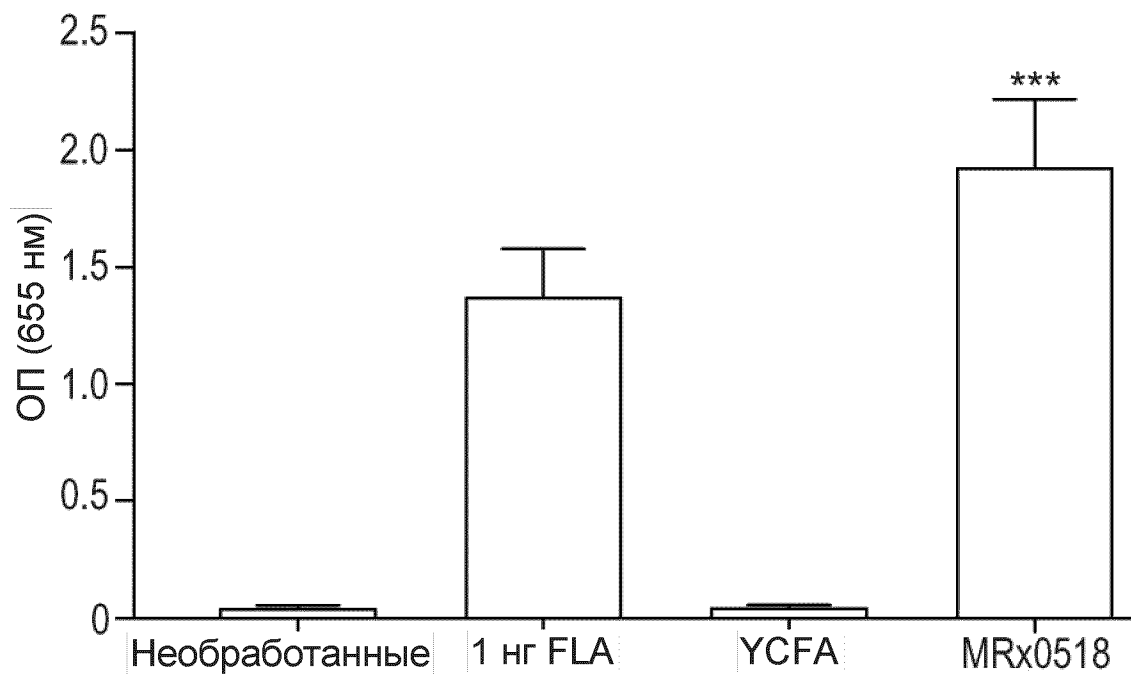
ФИГ. 21Е

Секреция цитокинов из спленоцитов мыши (N = 3)



ФИГ. 21F**Анализ МТТ спленоцитов мыши N = 4**

ФИГ. 22А**Активация промотора NFkB-AP1 в HEKhNOD2 (N = 3)****ФИГ. 22В****Активация промотора NF-κβ-AP1 в HEKTLR4 N = 3**

ФИГ. 22С**Активация промотора NF- κ B-AP1 в HEKTLR9 N = 3****ФИГ. 22D****Активация промотора NF- κ B-AP1 в HEKTLR5 N = 3**

ФИГ. 23 Типы клеток, модулируемые MRx0518