

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092549 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.20

(22) Дата подачи заявки
2019.05.13

(51) Int. Cl. *A61K 35/74* (2015.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ

(31) 18171893.3; 18178136.0; 1810386.1;
1813460.1; 1817642.0; 1820264.8;
1820256.4

(32) 2018.05.11; 2018.06.15; 2018.06.25;
2018.08.17; 2018.10.29; 2018.12.12;
2018.12.12

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

(86) PCT/EP2019/062238

(87) WO 2019/215346 2019.11.14

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

(72) Изобретатель:
Малдер Имке Элизабет, Фотиаду
Партена, Холт Эми Бет, Ахмед Суад,
Этторре Анна, Юилл Саманта (GB),
Дайнен Тед, Крайан Джон (IE)

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

(57) В данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в стимуляции иммунной системы у субъекта.

A1

202092549

202092549

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565642EA/042

КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение принадлежит к области композиций, содержащих бактериальные штаммы, выделенные из пищеварительного тракта млекопитающих, и применению таких композиций в лечении заболевания, в частности, рака, и, в частности, в стимуляции иммунной системы в лечении заболевания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Считается, что кишечник человека является стерильным *in utero*, однако он подвергается воздействию большого разнообразия материнских и средовых микроорганизмов непосредственно после рождения. Таким образом, происходит динамический период микробной колонизации и сукцессии, которые находятся под влиянием факторов, таких как способ рождения, окружение, питание и генотип хозяина, все из которых влияют на состав кишечной микробиоты, особенно во время раннего периода жизни. Впоследствии микробиота стабилизируется и становится похожей на присущую взрослому организму [i]. Микробиота кишечника человека содержит более 500-1000 различных филотипов, принадлежащих по сути к двум основным бактериальным типам, *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [ii]. Успешные симбиотические связи, возникающие в результате бактериальной колонизации кишечника человека, привели к возникновению широкого разнообразия метаболических, структурных, защитных и других полезных функций. Повышенная метаболическая активность колонизированного кишечника обеспечивает то, что в ином отношении неперевариваемые компоненты пищи разрушаются с высвобождением побочных продуктов, обеспечивая важный источник питательных веществ для хозяина. Аналогичным образом, иммунологическая важность микробиоты кишечника является общепризнанной и представлена в качестве примера у безмикробных животных, которые имеют нарушенную иммунную систему, которая функционально восстанавливается после введения комменсальных бактерий [iii].

Значительные изменения состава микробиоты были описаны при желудочно-кишечных нарушениях, таких как воспалительная болезнь кишечника (IBD). Например, уровни бактерий *Clostridium XIVa* кластера снижаются у пациентов с IBD, в то время как число *E. coli* повышается, что указывает на сдвиг баланса симбионтов и патобионов в кишечнике [-]. Интересным является то, что микробный дисбиоз также ассоциирован с нарушением баланса популяций Т-эффektorных клеток.

Учитывая потенциальное положительное влияние, который определенные бактериальные штаммы могут оказывать на кишечник животного, различные штаммы были предложены для применения в лечении различных заболеваний (см., например, [-]). Кроме того, определенные штаммы, в том числе главным образом штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, были предложены для применения в лечении различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, которые непосредственно не связаны с кишечником (см. []

и [] в целях ознакомления). В то же время, связь между различными заболеваниями и различными бактериальными штаммами, а также точные эффекты определенных бактериальных штаммов на кишечник и на системном уровне и на любые определенные типы заболеваний недостаточно охарактеризованы.

В WO2015038731 обсуждается способ лечения рака толстого кишечника с помощью разрушения биопленки толстого кишечника путем введения антимикробного агента или пробиотического агента. В данной заявке приведено большое количество бактерий, которые могут быть использованы в пробиотике, но не приводится демонстрация эффективности какой-либо из бактерий в лечении рака толстого кишечника. Вместо этого данная заявка обращает внимание на диагностический потенциал биопленок при колоректальном раке.

По номеру доступа XP002787383 в базе данных EMBL предложена последовательность гена 16S рРНК предлагаемого *Megasphaera* sp, а по номеру доступа XP002787384 в базе данных EMBL предложен ген 16S рРНК штамма *Megasphaera massiliensis*. В этих документах подробно описан геномный анализ выделенных штаммов и не дано никаких указаний относительно терапевтического эффекта *Megasphaera*.

Ahmed et al (подано в *Frontiers Cellular Neuroscience*) рассматривает *in vitro* характеристику бактериальных штаммов, полученных из кишечной микробиоты.

В данной области техники требуются новые способы лечения заболеваний. Также имеет место требование к потенциальным эффектам бактерий кишечника, подлежащих характеристике, в связи с чем могут быть разработаны новые виды терапии с помощью бактерий кишечника.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы данного изобретения разработали новые композиции, содержащие штамм бактерий рода *Megasphaera*, который может быть использован для стимуляции иммунной системы и лечения и предупреждения заболеваний, в частности, рака.

Таким образом, в данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в стимуляции иммунной системы у субъекта. Предпочтительно бактериальный штамм принадлежит к виду *Megasphaera massiliensis*.

В дополнительных аспектах в данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм *Megasphaera*, для применения в лечении или предупреждении рака, такого как метастатическая меланома, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, нейробластома, глиобластома, карцинома, рак легких, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак предстательной железы, лимфома и/или рак желудка. В дополнительных аспектах в данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в лечении или предупреждении рака, такого как колоректальный рак и/или гематологические злокачественные новообразования.

В дополнительных аспектах в данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в лечении, предупреждении или замедлении старения иммунной системы.

В дополнительных аспектах в данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в качестве адъюванта вакцины.

В дополнительных аспектах в данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в усилении клеточной терапии, такой как CAR-T.

Предпочтительно бактерии, используемые в данном изобретении, представляют собой штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа 42787.

Дополнительные пронумерованные варианты осуществления данного изобретения представлены ниже:

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в стимуляции иммунной системы у субъекта.

2. Композиция в соответствии с вариантом осуществления 1 для применения в лечении или профилактике рака, такого как метастатическая меланома, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, нейробластома, глиобластома, карцинома, рак легких, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак предстательной железы, лимфома, рак желудка, колоректальный рак и/или гематологические злокачественные новообразования.

3. Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 2, отличающаяся тем, что указанная композиция обладает ингибирующей активностью гистондеацетилазы.

4. Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 2 или вариантом осуществления 3, отличающаяся тем, что указанная композиция активизирует провоспалительные цитокины.

5. Композиция для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 2-4 для снижения проницаемости кишечного барьера.

6. Композиция в соответствии с вариантом осуществления 1 для применения в лечении, предупреждении или задержке старения иммунной системы.

7. Композиция в соответствии с вариантом осуществления 1 для применения в качестве адъюванта вакцины.

8. Композиция в соответствии с вариантом осуществления 1 для применения в усилении клеточной терапии, такой как CAR-T.

9. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения в повышении уровня экспрессии и/или активности каспазы 3, MAP2, IL-1 β , IL-23 и/или TNF- α .

10. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения в способе выборочного снижения количества и/или процента Treg в популяции клеток.

11. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16S рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16S рРНК бактериального штамма рода *Megasphaera*.

12. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12, или отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, представленную любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12.

13. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой *Megasphaera massiliensis*.

14. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 1, или отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, которая, представленную SEQ ID NO: 1.

15. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа 42787.

16. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для перорального введения.

17. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей или носителей.

18. Композиция в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм является лиофилизированным.

19. Продукт питания, содержащий указанную композицию в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления.

20. Способ лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния со сниженной иммуностимуляцией, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Megasphaera*, пациенту, нуждающемуся в этом.

21. Композиция, содержащая клетку бактериального штамма в соответствии с вариантами осуществления 1-16, отличающаяся тем, что указанная клетка экспрессирует один или несколько гетерологичных антигенов.

22. Композиция в соответствии с вариантом осуществления 21, отличающаяся тем, что указанная клетка презентует один или несколько гетерологичных антигенов.

23. Композиция в соответствии с вариантом осуществления 21 или вариантом осуществления 22 для применения в качестве вакцины.

24. Клетка бактериального штамма в соответствии с вариантом осуществления 1-18, отличающаяся тем, что указанная клетка экспрессирует один или несколько гетерологичных антигенов.

25. Клетка в соответствии с вариантом осуществления 24, отличающаяся тем, что указанная клетка презентрует один или несколько гетерологичных антигенов.

26. Клетка в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 25 для применения в качестве вакцины.

27. Бактериальный штамм для применения в терапии, при этом бактериальный штамм имеет последовательность 16S рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12.

28. Бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рРНК, представленную любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12, для применения в терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1: Уровни экспрессии β 3-тубулина: иммуноокрашивание и визуализация клеток (Фиг. 1A); иммуноблоттинг (Фиг. 1B).

Фигура 2: Уровни экспрессии MAP2: иммуноокрашивание и визуализация клеток (Фиг. 2A); иммуноокрашивание (Фиг. 2B); кратности изменения экспрессии (Фиг. 2C).

Фигура 3: Изменение экспрессии DRD2

Фигура 4: Изменение экспрессии Casp3

Фигура 5: Изменение жизнеспособности клеток

Фигура 6: Клеточное фенотипирование CD4 Т-клеток-хелперов (Фиг. 6A); CD4+ активированных клеток (Фиг. 6B); Treg-клеток (Фиг. 6C); CD8 цитотоксических Т-клеток (Фиг. 6D); CD8+ активированных клеток (Фиг. 6E); В-клеток (Фиг. 6F); соотношения CD8/Treg (Фиг. 6G); соотношения активированных CD8/Treg (Фиг. 6H).

Фигура 7: Анализ цитокинов IL-1 β (Фиг. 7A); TNF- α (Фиг. 7B); IL-23 (Фиг. 7C); IL-6 (Фиг. 7D); MIP-3 α (Фиг. 7E); CXCL9 (Фиг. 7F); MCP-1 (Фиг. 7G); IL-10 (Фиг. 7H); GM-CSF (Фиг. 7I).

Фигура 8: Стратегия гейтирования, используемая для анализа различных популяций иммунных клеток (CD4, CD8 и CD19+ клеток) с помощью проточной цитометрии, для данных, представленных на Фиг. 6.

Фигура 9: Секреция интерлейкина-8 (IL-8).

Фигура 10: Изменение активности гистондеацетилазы (HDAC).

Фигура 11A: Изменения, индуцированными штаммами, активности деацетилазы целой клетки и клеточного лизата; **Фигура 11B:** Продуцирование метаболитов штаммами; **Фигура 11C:** Изменения, индуцированные кислотой, активности деацетилазы.

Фигура 12A: Ингибирование HDAC1; **Фигура 12B:** Ингибирование HDAC2; **Фигура 12C:** Ингибирование HDAC3.

Фигура 13А: Ингибирование HDAC класса I; **Фигура 13В:** Ингибирование HDAC1; **Фигура 13С:** Ингибирование HDAC2; **Фигура 13D:** Ингибирование HDAC3.

Фигура 14: Влияние на функцию кишечного барьера.

Фигура 15: Изменения экспрессии Toll-подобного рецептора 4 (TLR-4) в гиппокампе.

Фигура 16: Изменения экспрессии TNF- α в гиппокампе.

Фигура 17: Изменения экспрессии интерлейкина-1 β (IL-1 β) в гиппокампе.

Фигура 18: Изменения экспрессии интерлейкина-6 (IL-6) в гиппокампе.

Фигура 19: Изменения экспрессии CD11b в гиппокампе.

Фигура 20: Изменения экспрессии TLR-4 в миндалевидном теле.

Фигура 21: Изменения экспрессии CD11b в миндалевидном теле.

Фигура 22: Изменения экспрессии IL-6 в миндалевидном теле.

Фигура 23: Изменения экспрессии TLR-4 в префронтальной коре.

Фигура 24: Изменения экспрессии CD11b в префронтальной коре.

Фигура 25: Изменения экспрессии IL-6 в префронтальной коре.

Фигура 26: Влияние на продуцирование интерферона γ из спленцитов мышей, которым вводили MRx0029

Фигура 27: Влияние на продуцирование IL-1 β из спленцитов мышей, которым вводили MRx0029

Фигура 28: Влияние на продуцирование IL-6 из спленцитов мышей, которым вводили MRx0029

Фигура 29: Влияние на продуцирование TNF- α из спленцитов мышей, которым вводили MRx0029

Фигура 30: Влияние на продуцирование CXCL1 из спленцитов мышей, которым вводили MRx0029

Фигура 31: Экспрессия гена MAP2 в линии клеток SKMEL2 после различных обработок по сравнению с GAPDH. «YCFA» = YCFA+

Фигура 32: Клоногенное выживание линии клеток SKMEL2 после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 33: Рост клеток SKMEL2 на мягком агаре после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 34: Передача сигналов ERK (фосфорилированные ERK1 и 2 (p44 и p42)/общая ERK) в линии клеток SKMEL2 после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 35: Экспрессия гена MAP2 в линии клеток SKMEL28 после различных обработок по сравнению с GAPDH. «YCFA» = YCFA+

Фигура 36: Клоногенное выживание линии клеток SKMEL28 после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 37: Рост клеток SKMEL28 на мягком агаре после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 38: Передача сигналов ERK (фосфорилированные ERK1 и 2 (p44 и p42)/общая ERK) в линии клеток SKMEL28 после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 39: Экспрессия гена MAP2 в линии клеток SKMEL31 после различных обработок по сравнению с GAPDH. «YCFA» = YCFA+

Фигура 40: Клоногенное выживание линии клеток SKMEL31 после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 41: Рост клеток SKMEL31 на мягком агаре после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 42: Передача сигналов ERK (фосфорилированные ERK1 и 2 (p44 и p42)/общая ERK) в линии клеток SKMEL31 после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 43: Экспрессия гена MAP2 в линии клеток 451Lu после различных обработок по сравнению с GAPDH. «YCFA» = YCFA+

Фигура 44: Клоногенное выживание линии клеток 451Lu после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 45: Рост клеток 451Lu на мягком агаре после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 46: Передача сигналов ERK (фосфорилированные ERK1 и 2 (p44 и p42)/общая ERK) в линии клеток 451Lu после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 47: Экспрессия гена MAP2 в линии клеток HT-29 после различных обработок по сравнению с GAPDH. «YCFA» = YCFA+

Фигура 48: Клоногенное выживание линии клеток HT-29 после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 49А: Рост клеток HT-29 на мягком агаре после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Figure 49В: Рост клеток HT-29 на мягком агаре после различных обработок (фотография планшетов с агаром). «YCFA» = YCFA+

Фигура 50: Передача сигналов ERK (фосфорилированные ERK1 и 2 (p44 и p42)/общая ERK) в линии клеток HT29 после различных обработок. «YCFA» = YCFA+

Фигура 51: Обзор пути с участием MAP-киназы (из [72]).

Фигура 52: Экспрессия РНК GPR109a в дифференцированных клетках Caco-2 (А) без обработки и (В) с обработкой форболмириостатом в дополнение к MRx0029. «YCFA» = YCFA+

Фигура 53: Индукция секреции IL-8 из клеток HT29 с помощью (А) MRx0029 с кондиционированной средой и (В) только MRx0029.

Фигура 54: Анализ метаболитов штамма *Megasphaera massiliensis* NCIMB 42787.

Фигура 55: Продуцирование валериановой кислоты в супернатанте для штаммов MRx0029 и референтных штаммов *Megasphaera massiliensis*.

Фигура 56: Производство и потребление органических кислот в MRx0029 и референтными штаммами *Megasphaera massiliensis*.

Фигура 57: Подавление NSE/енолазы 2 с помощью MRX029. «YCFA» = YCFA+.

Фигура 58: Производство и потребление органических кислот NCIMB 42787, NCIMB 43385, NCIMB 43388 и NCIMB 43389.

Фигура 59: Активация секреции IL-6 в клетках U373 NCIMB 42787 и другими депонированными штаммами (n=3).

Фигура 60: Подавление енолазы 2 с помощью NCIMB 42787, NCIMB 43385, NCIMB 43388, NCIMB 43389, NCIMB 43386 и NCIMB 43387.

Фигура 61А: NCIMB 42787 и другие депонированные штаммы повышают экспрессию MAP2; **Фиг. 61В и С:** Модуляция уровней цитокинов и промотора NFκB-AP1 с помощью NCIMB 42787.

Фигура 62: NCIMB 42787 продуцирует масляную, валериановую и гексановую кислоты.

Фигура 63: Иммуностимулирующая активность метаболитов, продуцируемых NCIMB 42787.

Фигура 64: Анализ роли метаболитов в иммуностимулирующей активности NCIMB 42787.

Фигура 65: Штамм NCIMB 43387 *Megasphaera* оказывает влияние на экспрессию мРНК IDO-1 в толстом кишечнике у мышей BALB/c.

Фигура 66: Штаммы NCIMB 43385 и NCIMB 43387 *Megasphaera* оказывают влияние на экспрессию мРНК Trh1 в толстом кишечнике у мышей BALB/c.

Фигура 67: Штамм NCIMB 43385 *Megasphaera* модулирует производство IFNγ и IL-6 при стимуляции ConA спленоцитов из мышей BALB/c.

Фигура 68: Штамм NCIMB 43385 *Megasphaera* модулирует экспрессию IL-6 и CD11b в головном мозге мышей BALB/c.

Фигура 69: Штамм NCIMB 42787 модулирует экспрессию TLR4 в миндалевидном теле мышей BALB/c.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактериальные штаммы

Композиции по данному изобретению содержат бактериальный штамм рода *Megasphaera*. Примеры демонстрируют, что бактерии этого рода пригодны для стимуляции иммунной системы и для лечения заболевания, в частности, рака. Предпочтительные бактериальные штаммы представляют собой вид *Megasphaera massiliensis*.

Примеры видов *Megasphaera* для применения в данном изобретении включают в себя *Megasphaera elsdonii*, *Megasphaera cerevisiae*, *Megasphaera massiliensis*, *Megasphaera indica*, *Megasphaera paucivorans*, *Megasphaera sueciensis* и *Megasphaera micronuciformis*. Дополнительным примером вида *Megasphaera* для применения в данном изобретении является *Megasphaera hexanoica*. *Megasphaera* представляют собой облигатно анаэробных

сбраживающих лактат желудочно-кишечных микроорганизмов жвачных и нежвачных млекопитающих, в том числе людей.

Типовой штамм *M. massiliensis* представляет собой NP3 (=CSUR P245=DSM 26228) [xvi]. Номер доступа в GenBank последовательностей гена 16S рРНК штамма *M. massiliensis* NP3 представляет собой JX424772.1.

Бактерия *Megasphaera massiliensis*, исследуемая в разделе Примеры, обозначается в данном документе как штамм MRx0029. Последовательность 16S рРНК штамма MRx0029, который был исследован, представлена в SEQ ID NO:1.

Штамм MRx0029 был депонирован с разрешения международного депозитария NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Шотландия) 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road, Aberdeen, AB25 2ZS, Шотландия) 13 июля 2017 г. в виде “*Megasphaera massiliensis* MRx0029” и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42787.

Бактериальные штаммы, близкородственные штамму, исследованному в Примерах, также, как предполагается, будут эффективными для стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 1. Предпочтительно бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, представленную SEQ ID NO: 1.

Бактериальные штаммы, которые представляют собой биотипы штаммов MRx0029, также, как предполагается, будут эффективными для стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака. Биотип представляет собой близкородственный штамм, который имеет те же самые или очень похожие физиологические и биохимические характеристики.

Штаммы, которые представляют собой биотипы штаммов MRx0029 и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, могут быть идентифицированы с помощью секвенирования других нуклеотидных последовательностей штаммов MRx0029. Например, по сути весь геном может быть секвенирован, а биотиповый штамм для применения в данном изобретении может иметь по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичность последовательности в пределах по меньшей мере 80% своего всего генома (например, в пределах по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99%, или в пределах своего всего генома). Другие подходящие последовательности для применения в идентификации биотиповых штаммов могут включать в себя hsp60 или повторяющиеся последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)₅ или REP или [xvii]. Биотиповые штаммы могут иметь последовательности с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичностью последовательности к соответствующей последовательности штамма MRx0029.

В качестве альтернативы штаммы, которые представляют собой биотипы штаммов MRx0029 и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, могут быть идентифицированы с использованием штаммов MRx0029 и рестрикционного анализа фрагментов и/или ПЦР, например, с помощью полиморфизма длины флуоресцентных амплифицированных фрагментов (FAFLP) и ПЦР-фингерпринтинга повторяющихся ДНК-элементов (rep), или профилирования белков, или частичного секвенирования 16S или 23S rDNA. В предпочтительных вариантах осуществления такие методики могут быть использованы для идентификации других штаммов *Megasphaera massiliensis*.

В определенных вариантах осуществления штаммы, которые представляют собой биотипы штаммов MRx0029 и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, представляют собой штаммы, которые обеспечивают тот же самый паттерн, что и штаммы MRx0029, при анализе с помощью рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA), например, при использовании фермента рестрикции Sau3AI (касательно иллюстративных способов и руководства см., например, [xviii]). В качестве альтернативы биотиповые штаммы идентифицируют в виде штаммов, которые имеют те же самые паттерны сбраживания углеводов, что и штаммы MRx0029.

Другие штаммы *Megasphaera*, которые являются пригодными в композициях и способах по данному изобретению, такие как биотипы штаммов MRx0029, могут быть идентифицированы с помощью любого подходящего способа или стратегии, в том числе анализов, описанных в Примерах. Например, штаммы для применения в данном изобретении могут быть идентифицированы при добавлении к клеточному лизату или целым клеткам и исследованы в отношении экспрессии MAP2, экспрессии DRD2, уровней цитокинов или выживаемости клеток. В частности, бактериальные штаммы, которые имеют аналогичные паттерны роста, метаболический тип и/или поверхностные антигены, что и штаммы MRx0029, могут быть пригодными в данном изобретении. Пригодный штамм будет иметь сопоставимую иммуномодулирующую активность по сравнению со штаммами MRx0029. В частности, биотипный штамм будет оказывать сопоставимые эффекты на экспрессию MAP2, экспрессию DRD2, уровни цитокинов или выживаемость клеток, как продемонстрировано в Примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в Примерах. Биотипный штамм может оказывать сопоставимые эффекты на ингибирующую активность гистондеацетилазы, как продемонстрировано в Примерах, которые можно идентифицировать с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в Примерах.

В некоторых вариантах осуществления бактериальные штаммы, используемые в изобретении, могут быть идентифицированы с помощью стандартного профилирования продуцирования и потребления метаболитов бактериальным штаммом. Авторы данного изобретения обнаружили, что бактериальный штамм, используемый в Примерах,

продуцирует бутират, валериановую кислоту и гексановую кислоту и потребляет ацетат и пропионат (см. Фиг. 54-56). Было обнаружено, что штаммы Ref 1, Ref 2 и Ref 3 *Megasphaera massiliensis* также потребляют и продуцируют эти метаболиты (см. Фиг. 54-56). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм по данному изобретению продуцирует один или несколько из метаболитов бутирата, валериановой кислоты и гексановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм по данному изобретению потребляет одно или оба из ацетата и пропионата. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм по данному изобретению продуцирует бутират, валериановую кислоту и гексановую кислоту и потребляет ацетат и пропионат.

Особенно предпочтительным штаммом по данному изобретению является штамм *Megasphaera massiliensis* MRx0029. Он представляет собой иллюстративный штамм, исследуемый в Примерах и, как продемонстрировано, является эффективным для лечения заболевания. Таким образом, в данном изобретении представлена клетка, такая как выделенная клетка, штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029 или его производного. В данном изобретении также представлена композиция, содержащая клетку штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029 или его производного. В данном изобретении также представлена биологически чистая культура штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029. В данном изобретении также представлена клетка штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029 или его производного, для применения в лечении, в частности, заболеваний, описанных в данном документе.

Особенно предпочтительным штаммом по данному изобретению является штамм *Megasphaera massiliensis*, депонированный под номером доступа NCIMB 42787. Он представляет собой иллюстративный штамм MRx0029, исследованный в Примерах и который, как продемонстрировано, является эффективным для стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака. Таким образом, в данном изобретении представлена клетка, такая как выделенная клетка, штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного. В данном изобретении также представлена композиция, содержащая клетку штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного. В данном изобретении также представлена биологически чистая культура штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787. В данном изобретении также представлена клетка штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного, для применения в лечении, в частности, заболеваний, описанных в данном документе.

Производное штамма по данному изобретению может представлять собой дочерний штамм (потомство) или штамм, культивированный (субклонированный) из исходного штамма. Производное штамма по данному изобретению может быть модифицированным, например, на генетическом уровне, без устранения биологической активности. В частности, производный штамм по данному изобретению является

терапевтически активным. Производный штамм будет иметь сопоставимую терапевтическую активность по сравнению со штаммом MRx0029. В частности, производный штамм будет оказывать сопоставимые эффекты на экспрессию MAP2, экспрессию DRD2, уровни цитокинов или выживаемость клеток, как продемонстрировано в Примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в Примерах. Производный штамм может оказывать сопоставимые эффекты на ингибирующую активность гистондеацетилазы, как продемонстрировано в Примерах, которые можно идентифицировать с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в Примерах. Производное штамма MRx0029 будет, как правило, представлять собой биотип штамма MRx0029.

Ссылки на клетки штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029 охватывают любые клетки, которые имеют те же самые характеристики безопасности и терапевтической эффективности, что и у штамма MRx0029, и такие клетки охвачены данным изобретением.

В предпочтительных вариантах осуществления бактериальные штаммы в композициях по данному изобретению являются жизнеспособными и способными частично или полностью колонизировать кишечник.

Авторы данного изобретения обнаружили, что штаммы *Megasphaera massiliensis* повышают активацию воспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , TNF- α , MIP-3 α , IL-23, IL-8 и/или IL-6.

Авторы данного изобретения обнаружили, что штаммы *Megasphaera massiliensis* повышают активацию иммунных клеток и усиливают секрецию цитокинов, таких как IL-1 β , TNF- α , MIP-3 α , IL-23, IL-8 и/или IL-6.

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 42787, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака, наиболее предпочтительно рака головного мозга, такого как нейробластома. В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 42787, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, глиобластомы, карциномы, рака легких, хронической лимфоцитарной лимфомы, рака предстательной железы, лимфомы, рака желудка, колоректального рака и/или гематологических злокачественных новообразований.

В предпочтительных вариантах осуществления бактериальные штаммы в композициях по данному изобретению являются жизнеспособными и способными частично или полностью колонизировать кишечник.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению не содержит клетку штамма 42787 *Megasphaera massiliensis*.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм рода *Megasphaera*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 42787.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 42787.

Эти бактериальные штаммы были депонированы в международный депозитарный орган NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) компанией 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road, Aberdeen, AB25 2ZS, Шотландия) 6 мая 2019 г. как *Megasphaera massiliensis* (под номерами доступа в NCIMB 43388 и в NCIMB 43389) и *Megasphaera* spp. (номера доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386 и NCIMB 43387). Соответственно, в альтернативном варианте осуществления композиции по данному изобретению содержат один или несколько из этих бактериальных штаммов или их биотипов или производных. Во избежание сомнений, Ref 1, упомянутый выше, представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43385, Ref 2, упомянутый выше, представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43388, а Ref 3, упомянутый выше, представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43389.

Бактериальные штаммы, близкородственные штаммам, исследованным в Примерах, также, как предполагается, будут эффективными для стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении представляет собой штамм *Megasphaera massiliensis*, депонированный под номером доступа NCIMB 43388. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43388, или его производного, для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43388, или его производного, для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43388, для применения при любом из заболеваний, описанных в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43388, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака, наиболее предпочтительно рака мозга, такого как нейробластома. В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая

штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43388, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, глиобластомы, карциномы, рака легких, хронической лимфоцитарной лимфомы, рака предстательной железы, лимфомы, рака желудка, колоректального рака и/или гематологических злокачественных новообразований.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению не содержит клетку штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 43388. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм рода *Megasphaera*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43388. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43388.

Соответственно, в определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении представляет собой штамм *Megasphaera massiliensis*, депонированный под номером доступа NCIMB 43389. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43389, или его производного, для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43389, или его производного, для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43389, для применения при любом из заболеваний, описанных в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43389, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака, наиболее предпочтительно рака мозга, такого как нейробластома. В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43389, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, глиобластомы, карциномы, рака легких, хронической лимфоцитарной лимфомы, рака предстательной железы, лимфомы, рака желудка, колоректального рака и/или гематологических злокачественных новообразований.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению не содержит клетку штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 43389. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм рода *Megasphaera*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43389. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43389.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 9. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, представленную SEQ ID NO: 9. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлен бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рРНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 9, для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлен бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рРНК, представленную SEQ ID NO: 9, для применения в терапии.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 10. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, представленную SEQ ID NO: 10. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлен бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рРНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 10, для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлен бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рРНК, представленную SEQ ID NO: 10, для применения в терапии.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16S рРНК бактериального штамма рода *Megasphaera*. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении принадлежит роду *Megasphaera*.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении представляет собой штамм *Megasphaera*, депонированный под

номером доступа NCIMB 43385. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43385, или его производного, для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43385, или его производного, для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43385, для применения при любом из заболеваний, описанных в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43385, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака, наиболее предпочтительно рака мозга, такого как нейробластома. В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43385, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, глиобластомы, карциномы, рака легких, хронической лимфоцитарной лимфомы, рака предстательной железы, лимфомы, рака желудка, колоректального рака и/или гематологических злокачественных новообразований.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению не содержит клетку штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 43385. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм рода *Megasphaera*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43385. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43385.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении представляет собой штамм *Megasphaera*, депонированный под номером доступа NCIMB 43386. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43386, или его производного, для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43386, или его производного, для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка

штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43386, для применения при любом из заболеваний, описанных в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43386, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака, наиболее предпочтительно рака мозга, такого как нейробластома. В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43386, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, глиобластомы, карциномы, рака легких, хронической лимфоцитарной лимфомы, рака предстательной железы, лимфомы, рака желудка, колоректального рака и/или гематологических злокачественных новообразований.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению не содержит клетку штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 43386. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм рода *Megasphaera*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43386. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43386.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении представляет собой штамм *Megasphaera*, депонированный под номером доступа NCIMB 43387. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43387, или его производного, для применения в терапии. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43387, или его производного, для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 43387, для применения при любом из заболеваний, описанных в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43387, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в стимуляции иммунной системы и для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака, наиболее предпочтительно рака мозга, такого как нейробластома. В предпочтительных

вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 43387, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, глиобластомы, карциномы, рака легких, хронической лимфоцитарной лимфомы, рака предстательной железы, лимфомы, рака желудка, колоректального рака и/или гематологических злокачественных новообразований.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению не содержит клетку штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 43387. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм рода *Megasphaera*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43387. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композициях по настоящему изобретению представляет собой бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, при этом бактериальный штамм не представляет собой штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43387.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 11. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 12. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 8, 11 или 12. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлен бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рНК, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 8, 11 или 12, для применения в терапии.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рНК, представленную SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рНК, представленную SEQ ID NO: 11. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рНК, представленную SEQ ID NO: 12. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рНК, представленную SEQ ID NO: 8,

11 или 12. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлен бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рРНК, представленную SEQ ID NO: 8, 11 или 12, для применения в терапии.

Предполагается, что бактериальные штаммы, которые представляют собой биотипы одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, также будут эффективны для стимуляции иммунной системы, а также для лечения и предупреждения заболевания, в частности, рака. Биотип представляет собой близкородственный штамм, который имеет те же самые или очень похожие физиологические и биохимические характеристики.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлены бактериальные штаммы, депонированные под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, или их биотипы, для применения в терапии.

Штаммы, которые представляют собой биотипы одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, могут быть идентифицированы с помощью секвенирования других нуклеотидных последовательностей для одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389. Например, по сути весь геном может быть секвенирован, а биотиповый штамм для применения в данном изобретении может иметь по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичность последовательности в пределах по меньшей мере 80% своего всего генома (например, в пределах по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99%, или в пределах своего всего генома). Другие подходящие последовательности для применения в идентификации биотиповых штаммов могут включать в себя hsp60 или повторяющиеся последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)₅ или REP. Биотиповые штаммы могут иметь последовательности по меньшей мере с 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389.

В качестве альтернативы штаммы, которые представляют собой биотипы одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, могут быть идентифицированы с помощью одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, и рестрикционного анализа фрагментов и/или ПЦР, например, с помощью полиморфизма длины флуоресцентных амплифицированных фрагментов (FAFLP) и ПЦР-

фингерпринтинга повторяющихся ДНК-элементов (rep), или профилирования белков, или частичного секвенирования 16S или 23S rDNA. В предпочтительных вариантах осуществления такие методики могут быть применены для идентификации других штаммов *Megasphaera massiliensis*.

В определенных вариантах осуществления штаммы, которые представляют собой биотипы одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, представляют собой штаммы, которые обеспечивают тот же самый паттерн, что и один или несколько из штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, при анализе с помощью рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA), например, при использовании рестрикционного фермента *Sau3AI*. В качестве альтернативы биотипные штаммы идентифицируют как штаммы, которые имеют те же паттерны ферментации углеводов, что и один или несколько штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389.

Другие штаммы, которые являются пригодными в композициях и способах по данному изобретению, такие как биотипы одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, могут быть идентифицированы с использованием любого подходящего способа или стратегии, в том числе анализов, описанные в Примерах. Например, штаммы для применения в данном изобретении могут быть идентифицированы при добавлении к клеточному лизату или целым клеткам и исследованы в отношении экспрессии MAP2, экспрессии DRD2, уровней цитокинов или выживаемости клеток. В частности, бактериальные штаммы, которые имеют аналогичные паттерны роста, метаболический тип и/или поверхностные антигены к одному или нескольким штаммам, депонированным под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, могут быть пригодными в данном изобретении. Пригодный штамм будет иметь сопоставимую иммуномодулирующую активность с одним или несколькими штаммами, депонированными под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389. В частности, биотипный штамм будет оказывать сопоставимые эффекты на экспрессию MAP2, экспрессию DRD2, уровни цитокинов или выживаемость клеток, как продемонстрировано в Примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в Примерах. Биотипный штамм может оказывать сопоставимые эффекты на ингибирующую активность гистондеацетилазы, как продемонстрировано в Примерах, которые можно идентифицировать с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в Примерах.

В определенных вариантах осуществления предпочтительные штаммы по данному изобретению представляют собой штаммы, депонированные под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389. Они представляют собой иллюстративные штаммы, исследуемые в Примерах и, как продемонстрировано, являются эффективными для лечения заболевания. Таким образом, в данном изобретении представлена клетка, такая как выделенная клетка одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, или их производного. В данном изобретении также представлена композиция, содержащая клетку одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, или их производного. В данном изобретении также представлена биологически чистая культура одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389. В данном изобретении также представлена клетка одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, или их производного, для применения в терапии, в частности, для лечения заболеваний, описанных в данном документе.

Производное штамма по данному изобретению может представлять собой дочерний штамм (потомство) или штамм, культивированный (субклонированный) из исходного штамма. Производное штамма по данному изобретению может быть модифицированным, например, на генетическом уровне, без устранения биологической активности. В частности, производный штамм по данному изобретению является терапевтически активным. Производный штамм будет иметь сопоставимую терапевтическую активность с одним или несколькими штаммами, депонированными под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389. В частности, производный штамм будет оказывать сопоставимые эффекты на экспрессию MAP2, экспрессию DRD2, уровни цитокинов или выживаемость клеток, как продемонстрировано в Примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в Примерах. Производный штамм может оказывать сопоставимые эффекты на ингибирующую активность гистондеацетилазы, как продемонстрировано в Примерах, которые можно идентифицировать с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в Примерах. Производное одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389, обычно будет представлять собой биотип одного или нескольких штаммов, депонированных под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43386, NCIMB 43387, NCIMB 43388 и/или NCIMB 43389 соответственно.

Авторы данного изобретения обнаружили, что бактериальный штамм, использованный в Примерах, продуцирует 2-метилпропановую кислоту и 3-

метилпропановую кислоту и потребляет муравьиную кислоту (см. Фиг. 58). Было обнаружено, что штаммы, депонированные под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43388 и NCIMB 43389, также продуцируют 2-метилпропановую кислоту и 3-метилпропановую кислоту. Кроме того, было обнаружено, что штаммы, депонированные под номерами доступа NCIMB 43385 и NCIMB 43388, также потребляли муравьиную кислоту. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм по данному изобретению продуцирует один или несколько метаболитов 2-метилпропановой кислоты и 3-метилпропановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм по данному изобретению потребляет муравьиную кислоту. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм по данному изобретению продуцирует 2-метилпропановую кислоту и 3-метилпропановую кислоту и потребляет муравьиную кислоту. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм по данному изобретению продуцирует бутират, валериановую кислоту, гексановую кислоту, 2-метилпропановую кислоту и 3-метилпропановую кислоту и потребляет ацетат, пропионат и муравьиную кислоту.

В определенных вариантах осуществления продуцирование бутирата и/или валериановой кислоты вызывает секрецию IL-8. Соответственно, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут стимулировать иммунную систему за счет продуцирования бутирата и/или валериановой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению не содержат *Megasphaera elsdenii*. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм, используемый в композициях и способах по данному изобретению, не представляет собой *Megasphaera elsdenii*.

Терапевтическое применение

Стимуляция иммунной системы

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к иммунной стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) человека. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению оказывает иммуностимулирующий эффект на РВМС, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболевания, в частности, заболеваний, характеризующихся сниженной активацией иммунной системы, и заболеваний, излечимых с помощью повышенного иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для стимуляции иммунной системы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении заболевания с помощью стимуляции иммунной системы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа.

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к снижению процента содержания Treg в РВМС (Фиг. 6С). Treg, также

известные как Т-супрессоры, представляют собой популяцию Т-клеток, которые функционируют с подавлением иммунного ответа. Treg характеризуются высокой экспрессией маркера клеточной поверхности CD25 и низкой экспрессией CD127 []. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению избирательно снижает популяцию Treg (Фиг. 6С), композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся увеличением процента Treg в популяции клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения или предупреждения заболеваний, характеризующихся повышением процента Treg в популяции клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения или предупреждения заболеваний, характеризующихся увеличением процента клеток CD4+CD25+CD127- в популяции клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью снижения процента Treg в популяциях клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении подавления иммунного ответа с помощью Treg. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью селективного снижения Treg. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в иммуностимуляции, при этом композиции по данному изобретению снижают количество или процент Treg.

Примеры демонстрируют, что композиции по данному изобретению могут быть способны избирательно целенаправленно воздействовать на Treg без значительного воздействия на клетки, такие как В-клетки, CD4 Т-клетки или CD8 Т-клетки. Таким образом, композиции по данному изобретению могут избирательно снижать Treg в РВМС без значительного влияния на процент других исследуемых типов клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в избирательном снижении количества или процента Treg, при этом количество или процент CD4 Т-клеток существенно не изменяется. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в избирательном снижении количества или процента Treg, при этом количество или процент CD8 Т-клеток существенно не изменяется. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в избирательном снижении количества или процента Treg, при этом количество или процент В-клеток существенно не изменяется. В дополнительном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в избирательном снижении количества или процента Treg, при этом количество или процент В-клеток, CD4 Т-клеток и/или CD8 Т-клеток существенно не изменяется.

Снижение процента Treg было особенно неожиданным, поскольку штамм *Megasphaera massiliensis* MRx0029 продуцирует бутират, а бутират был ассоциирован с

повышенными уровнями Treg-клеток в крови и повышенной активностью Treg []. Таким образом, было неожиданным, что композиции по данному изобретению приведут к снижению процента Treg в PBMC.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению соотношения CD8 клеток к Treg-клеткам. CD8+ Т-клетки (CD8клетки) представляют собой цитотоксические Т-клетки и играют ключевую роль в иммунной защите от внутриклеточных патогенов. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает соотношение как CD8/Treg-клеток, так и активированных CD8/Treg-клеток (Фиг. 6G и Фиг. 6H), композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся снижением соотношения CD8/Treg и/или активированных CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением соотношения CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением соотношения активированных CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью снижения процента Treg в популяциях клеток, тем самым повышая соотношение CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью снижения процента Treg в популяциях клеток, тем самым повышая соотношение CD8/Treg-клеток, при этом повышение соотношения CD8/Treg-клеток приводит к иммуностимуляции. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением соотношения активированных активированных CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью снижения процента Treg в популяциях клеток, тем самым повышая соотношение CD8/Treg-клеток, при этом повышение соотношения активированных CD8/Treg-клеток приводит к иммунной стимуляции. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения соотношения CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения соотношения активированных CD8/Treg-клеток.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению процента CD19+CD3-клеток в PBMC (Фиг. 6F). Таким образом, введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению процента В-клеток в популяции клеток. Поскольку было

продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает процент В-клеток, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процента В-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процента В-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процента CD19+CD3-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью увеличения количества или процента В-клеток в популяциях клеток, где увеличение количества или процента В-клеток приводит к иммунной стимуляции. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью увеличения количества или процента В-клеток.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению процента CD8 Т-цитотоксических клеток (Фиг. 6D) в PBMC. Следовательно, введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению процента CD8 Т-клеток в популяции клеток. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает процент CD8 Т-цитотоксических клеток, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процента CD8 Т-цитотоксических клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процента CD8 Т-цитотоксических клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью увеличения количества или процента CD8 Т-цитотоксических клеток в популяциях клеток, при этом увеличение количества или процента CD8 Т-цитотоксических клеток приводит к иммунной стимуляции. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью увеличения количества или процента CD8 Т-цитотоксических клеток.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению процента CD8+ активированных клеток (Фиг. 6E) в PBMC. Следовательно, введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению процента CD8+ активированных клеток в популяции клеток. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает процент CD8+ активированных клеток, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся уменьшением

количества или процента CD8⁺ активированных клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процента CD8⁺ активированных клеток. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью увеличения количества или процента CD8⁺ активированных клеток в популяциях клеток, при этом увеличение количества или процента CD8⁺ активированных клеток приводит к иммунной стимуляции. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью увеличения количества или процента CD8⁺ активированных клеток.

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии провоспалительных молекул в РВМС, таких как провоспалительные цитокины (Фиг. 7 и Фиг. 9). Примеры иммуностимулирующих (например, провоспалительных) молекул, которые продемонстрировали повышение уровней экспрессии при введении композиций по данному изобретению, включают IL-23, TNF- α , IL-1 β , MIP-3 α , IL-8 и IL-6. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает экспрессию иммуностимулирующих (например, провоспалительных) молекул, композиции по данному изобретению могут быть пригодны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии провоспалительных молекул, таких как провоспалительные цитокины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности провоспалительных молекул, в частности, заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности провоспалительных цитокинов. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности IL-23, TNF- α , IL-1 β , MIP-3 α и/или IL-6. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности IL-8. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности CD11b. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-23, TNF- α , IL-1 β , MIP-3 α и/или IL-6. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-8. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в

лечения или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности CD11b. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-23, TNF- α , IL-1 β , MIP-3 α и/или IL-6. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-8. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности CD11b.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии IL-1 β в РВМС. IL-1 β представляет собой провоспалительный цитокин [xxi]. Продуцирование и секреция IL-1 β регулируется инфламмасомой, белковым комплексом, который ассоциирован с активацией воспалительной реакции [xxii]. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию IL-1 β , композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии IL-1 β . В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности IL-1 β . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-1 β . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-1 β . В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности IL-1 β . В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-1 β . В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в стимулировании иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-1 β .

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии IL-23. IL-23 был связан с воспалением [.] . Предположительные функции IL-23 в иммунном ответе включают стимулирование пролиферации CD4⁺ Т-клеток памяти и стимулирование секреции IFN- γ дендритными клетками (DC) [xxv]. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию IL-23, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии IL-23. В конкретном варианте осуществления композиции по

данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности IL-23. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-23. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-23. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности IL-23. В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-23. В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в стимулировании иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-23.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии макрофагального воспалительного белка-3 (MIP3- α) или CCL20 в РВМС. MIP3- α представляет собой воспалительный хемокин, который связывается с рецептором CCR6 и действует в качестве хемоаттрактанта для DC и Т-клеток памяти. MIP3- α ассоциирован с запуском адаптивного иммунного ответа путем рекрутинга незрелых DC к участку воспаления [xxvi]. Нарушение экспрессии MIP3- α было ассоциировано с такими заболеваниями, как воспалительное заболевание кишечника [xxvii]. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию MIP3- α , композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии MIP3- α . В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности MIP3- α . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности MIP3- α . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности MIP3- α . В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности MIP3- α . В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности MIP3- α . В одном варианте осуществления бактериальный

штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в стимулировании иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности МРЗ- α .

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии фактора некроза опухоли 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 с его когнатным рецептором TNFR-1, что приводит к каскаду событий расщепления в апоптотическом пути [xxviii]. TNF- α может также запускать некроз через механизм, RIP киназа-зависимый механизм [xxix]. Поскольку введение композиций по данному изобретению демонстрирует повышение экспрессии TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, в частности, для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии TNF- α . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении заболеваний, характеризующихся сниженной экспрессией TNF- α . В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности TNF- α . В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в стимулировании иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности TNF- α .

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии IL-6 в РВМС. IL-6 представляет собой провоспалительный цитокин, который продуцируется во время воспаления и способствует дифференцировке незрелых CD4⁺ Т-клеток и дифференцировке CD8⁺ Т-клеток в цитотоксические Т-клетки [xxx]. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию IL-6, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии IL-6. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или

активности IL-6. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-6. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-6. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности IL-6. В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-6. В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в стимулировании иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-6.

Bettelli et al. [xxx] сообщили, что IL-6 ингибирует продуцирование Treg. Поскольку Примеры демонстрируют, что композиции по данному изобретению повышают экспрессию IL-6, композиции по данному изобретению могут выборочно уменьшать количество или процент Treg за счет увеличения экспрессии IL-6. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в иммуностимуляции с помощью увеличения экспрессии IL-6. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в иммуностимуляции с помощью уменьшения количества или процента Treg. В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в иммуностимуляции с помощью повышения экспрессии IL-6. В другом варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в иммуностимуляции с помощью уменьшения количества или процента Treg.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии IL-8 (см. Пример 8). IL-8 представляет собой провоспалительный цитокин, секретлируемый преимущественно макрофагами, с иммуностимулирующими эффектами. Он индуцирует хемотаксис в целевых клетках, в первую очередь нейтрофилах, но также и других гранулоцитах, заставляя их мигрировать к участку инфекции. IL-8 также стимулирует фагоцитоз. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию IL-8, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии IL-8. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности IL-8. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-8. В одном варианте

осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-8. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии IL-8 и/или активности IL-8. В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-8. В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в стимулировании иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности IL-8.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии CD11b (см. Пример 12). CD11b представляет собой провоспалительный цитокин с иммуностимулирующими эффектами. CD11b экспрессируется на поверхности многих лейкоцитов, участвующих в системе врожденного иммунитета, и опосредует воспаление, регулируя адгезию и миграцию лейкоцитов. CD11b участвует в нескольких иммунных процессах, например в фагоцитозе, клеточной цитотоксичности, хемотаксисе и клеточной активации. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию CD11b, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии CD11b. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности CD11b. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимулировании иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности CD11b. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии CD11b и/или активности CD11b. В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении заболеваний с помощью повышения экспрессии и/или активности CD11b. В одном варианте осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в стимулировании иммунного ответа с помощью повышения экспрессии и/или активности CD11b.

Примеры демонстрируют, что композиции по данному изобретению могут индуцировать активацию промотора NF-κB-*Ap1* (см. Фиг. 61). NF-κB участвует в активации иммунного ответа, в частности, с помощью стимуляции экспрессии медиаторов воспаления и цитокинов, участвующих в иммунном ответе, например, IL-6. Как указано

выше, повышение экспрессии IL-6 способствует стимуляции иммунной системы, и, таким образом, активации пути с участием NF-κB имеет иммуностимулирующую активность. Соответственно, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению активируют передачу сигналов с участием NF-κB и, таким образом, стимулируют иммунную систему. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению стимулируют экспрессию медиаторов воспаления и иммуностимулирующих цитокинов м помощью увеличения активации промотора NF-κB.

Рак

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака головного мозга, в частности, нейробластомы. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении меланомы, в частности, метастатической меланомы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака головного мозга. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении нейробластомы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении меланомы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы. В наиболее предпочтительном варианте осуществления композиция по данному изобретению содержит бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* и предназначена для применения в лечении или предупреждении рака головного мозга, в частности, нейробластомы. В дополнительном наиболее предпочтительном варианте осуществления композиция по данному изобретению содержит бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* и предназначена для применения в лечении или предупреждении меланомы, в частности, метастатической меланомы.

Примеры (Пример 1) демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии бета-тубулина класса III (β3-тубулина) в недифференцированных клетках нейробластомы. β3-тубулин широко известен как нейрональный маркер [xxxii]. Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии белка 2, ассоциированного с микротрубочками (MAP2), в недифференцированных клетках нейробластомы. MAP2 преимущественно экспрессируется в нейронах и функционирует для того, чтобы стабилизировать микротрубочки, способствовать развитию дендритов и разрастанию нейритов [xxxiii]. MAP2 известен в качестве маркера дифференцированных нейронов.

Агенты, вызывающие дифференцировку клеток, были ассоциированы с терапевтическими средствами против рака, поскольку введение агентов, дифференцирующих клетки, коррелировало с ингибированием опухолевого роста [xxxiv]. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении рака. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака с помощью индукции дифференцировки клеток, в частности, дифференцировки нейронов. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака головного мозга с помощью индукции дифференцировки нейронов, в частности, в лечении нейробластомы.

Кроме того, было обнаружено, что MAP2 в значительной степени экспрессируется в первичных кожных меланомах, но имеет сниженную экспрессию в метастатических меланомах [xxxv]. Было высказано предположение, что повышенная экспрессия белков, стабилизирующих микротрубочки, или обработка белками, стабилизирующими микротрубочки, такими как MAP2, могут препятствовать динамической нестабильности микротрубочек, которая требуется во время деления клеток. Таким образом, предполагается, что активация MAP2 препятствует делению клеток и задерживает рост опухоли при раке [35]. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения рака, в частности метастатических видов рака. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в способе лечения рака. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака, опосредованного снижением экспрессии MAP2. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для лечения или предупреждения рака, характеризующегося сниженной или отсутствующей экспрессией MAP2. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для повышения экспрессии MAP2 при лечении рака. В предпочтительном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении меланомы. В предпочтительном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении меланомы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтические комбинации по данному изобретению оказывают влияние на меланоциты и могут быть эффективными для лечения меланомы. В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении меланомы.

В частности, Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии MAP2 в недифференцированных клетках нейробластомы. Поскольку MAP2 широко известен как маркер дифференцированных нейронов, и было продемонстрировано, что его экспрессия оказывает влияние на рак, композиции по данному изобретению могут быть особенно пригодными для лечения рака головного мозга, такого как нейробластома. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в способе лечения рака головного мозга. В предпочтительном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в способе лечения нейробластомы.

Кроме того, Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к значительному снижению экспрессии дофаминового рецептора D2 (DRD2) (см. Пример 2 и Фиг. 3). DRD2 представляет собой рецептор, связанный с G-белком (GPCR), и он является частью семейства дофаминовых рецепторов. DRD2 участвует в сигнальных путях, которые способствуют выживанию клеток, и, следовательно, связан с раком. Сверхэкспрессия или активация DRD2 связаны с несколькими типами рака, поскольку злокачественные клетки демонстрируют повышенную экспрессию DRD2 по сравнению с нормальными клетками [xxxvi]. Было продемонстрировано, что ингибирование DRD2 с помощью DRD2-специфических антагонистов оказывает противоопухолевые эффекты. Было продемонстрировано, что антагонисты DRD2 обладают противоопухолевой эффективностью при многих видах рака, в том числе раке молочной железы [xxvii][xxviii], глиобластоме [xxxix][xl][xli], нейробластоме [xlii], гепатоцеллюлярной карциноме [xlili], раке легких, раке предстательной железы [xliv], раке шейки матки [xlv], раке яичников [xlvi], лимфоме [xlvii] и раке желудка [xlviii]. Таким образом, композиции, которые снижают уровень экспрессии DRD2, могут быть пригодны для лечения рака. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению снижает экспрессию DRD2, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении рака, в частности, для применения в лечении или предупреждении рака, характеризующегося повышенной экспрессией DRD2. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения или предупреждения рака, характеризующегося повышенной экспрессией и/или активностью DRD2. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении экспрессии и/или активности DRD2 при лечении рака. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения рака, в частности, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головного мозга, в частности, глиобластомы и нейробластомы, карциномы, в частности, гепатоцеллюлярной карциномы, рака легких, рака предстательной железы, лимфомы и/или рака желудка. В одном варианте

осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения или предупреждения рака с помощью снижения уровня и/или активности DRD2.

Prabhu et al. сообщили, что ONC201, антагонист DRD2, продемонстрировал эффективность в сокращении размеров опухолей на моделях глиобластомы. Экспрессия DRD2 повышается в глиобластомных опухолях, и поэтому DRD2 является привлекательной мишенью для лекарственных препаратов против рака []. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении глиобластомы.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии каспазы 3 (Casp3) в клетках SH-SY5Y. Каспазы представляют собой часть семейства цистеиновых протеаз и, как известно, способствуют апоптозу. Casp3 известен как «исполнительная каспаза», которая играет важную роль в каскаде расщепления клеточных белков в пути апоптоза. Подавление экспрессии Casp3 ранее было продемонстрировано при различных видах рака из опухолевых тканей молочной железы, яичников и шейки матки, и считается, что снижение экспрессии Casp3 способствует выживанию клеток в раковой ткани [1]. Таким образом, композиции, которые повышают уровень экспрессии исполнительных каспаз, в частности, Casp3, могут быть пригодны для лечения рака. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию Casp3, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении рака, в частности, для применения в лечении или предупреждении рака, опосредованного экспрессией Casp3. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для лечения или предупреждения рака, характеризующегося сниженной или отсутствующей экспрессией Casp3. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения различных видов рака, характеризующихся сниженной или отсутствующей экспрессией исполнительных каспаз. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения или предупреждения рака, характеризующегося сниженной или отсутствующей экспрессией Casp3. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для повышения экспрессии Casp3 при лечении рака. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения рака, в частности, рака молочной железы, рака яичников и/или рака шейки матки. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения рака с помощью повышения уровня и/или активности Casp3.

Кроме того, сообщалось, что каспазы участвуют в процессах, отличных от апоптоза, таких как дифференцировка клеток [1]. Примеры (Пример 1 и Пример 3) демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии нейрональных маркеров β 3-тубулина и MAP2, а также к повышению экспрессии Casp3 в недифференцированных клетках нейробластомы.

Поскольку композиции по данному изобретению могут приводить к повышению экспрессии нейрональных маркеров и белков, которые, как известно, играют роль в дифференцировке клеток, композиции по данному изобретению могут быть пригодны для дифференцировки нейронов из недифференцированных клеток.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к снижению жизнеспособности недифференцированных клеток нейробластомы (Фиг. 5). В частности, примеры демонстрируют, что введение MRx0029 в концентрации 5% или 10% вызывает значительное дозозависимое снижение жизнеспособности клеток (Фиг. 5).

Известно, что снижение жизнеспособности клеток или повышенная гибель раковых клеток является мишенью для лечения рака [lii]. Таким образом, композиции, которые снижают жизнеспособность клеток в линиях раковых клеток, таких как линии клеток нейробластомы, могут быть пригодны для лечения рака. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака с помощью снижения жизнеспособности клеток. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака с помощью повышения клеточной смерти.

Кроме того, поскольку Примеры демонстрируют, что композиции по данному изобретению как повышают экспрессию Casp3, так и снижают жизнеспособность клеток (Фиг. 4 и Фиг. 5), предполагается, что композиции по данному изобретению снижают жизнеспособность клеток с помощью повышения апоптоза. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в повышении апоптоза. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака с помощью повышения клеточной смерти, в частности, с помощью повышения апоптоза. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении видов рака с помощью снижения жизнеспособности клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении видов рака с помощью снижения жизнеспособности клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении видов рака с помощью повышения апоптоза. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении видов рака с помощью повышения апоптоза. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении видов рака, характеризующихся сниженной или отсутствующей экспрессией Casp3, с помощью повышения апоптоза. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для повышения апоптоза при лечении рака. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для снижения жизнеспособности клеток при лечении рака.

Примеры демонстрируют, что композиции по настоящему изобретению повышают экспрессию как Casp3, так и MAP2. Таким образом, повышение Casp3 и снижение MAP2 могут быть связаны.

Ацетилирование и деацетилирование гистонов представляют собой важные эпигенетические регуляторы экспрессии генов. Эпигенетическая регуляция представляет собой мощный инструмент для регуляции всех аспектов клеточной функции. Гистондеацетилазы (HDAC) подавляют экспрессию генов, удаляя ацетильные группы из ϵ -N-ацетиллизиновой аминокислоты на гистоне, способствуя более плотному охвату ДНК гистонами и приводя к подавлению транскрипции вследствие недоступности нуклеосом. HDAC имеет 18 изоформ, которые разделены на четыре класса: класса I, II, III и IV. Изменения уровней HDAC наблюдали при многих типах заболеваний, в том числе, например, различных видах рака, инфекционных заболеваниях, воспалительных заболеваниях и нейродегенеративных заболеваниях [liii, liv, lv].

Ингибиторы HDAC (HDACi) представляют собой новый класс перспективных противораковых лекарственных препаратов, которые, как было продемонстрировано, вызывают остановку роста, дифференцировку, апоптоз, снижение ангиогенеза и модуляцию иммунного ответа в различных линиях раковых клеток [lvi, lvii, lviii, lix]. Несмотря на то, что точный механизм, с помощью которого опосредуется клиническая активность этих агентов, остается неясным, в настоящее время исследуется широкий спектр HDACi в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Кроме того, благодаря очевидной противоопухолевой активности в исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo*, многие HDACi быстро прошли клиническую разработку, как в виде монотерапии, так и в комбинации с другими противоопухолевыми агентами [lx]. Среди них вориностат (Zolinza™), ромидепсин (Istodax™) и белиностат (Beleodaq™) получили одобрение FDA США для лечения лимфомы. Лимфома и другие виды злокачественных новообразований крови (также называемых гематологическими злокачественными опухолями или гематологическими злокачественными новообразованиями) особенно чувствительны к HDACi. Микробиота кишечника со своим огромным разнообразием и метаболической емкостью представляет собой огромный метаболический резервуар для продуцирования широкого разнообразия молекул со способностью воздействовать на активность HDAC. В нескольких исследованиях оценивали ингибирующую активность HDAC метаболитов микробного происхождения, отличных от бутирата, которая, как было продемонстрировано, приводит к ингибированию HDAC и ассоциирована с улучшением двигательной функции при болезни Гентингтона [lxi].

Примеры демонстрируют, что композиции по данному изобретению ингибируют активность HDAC, в частности, HDAC класса I, например HDAC2 (Примеры 9 и 10). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению модулируют активность HDAC. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению ингибируют HDAC. В

определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению ингибируют HDACi. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC класса I. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC класса II. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC класса III. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC класса IV. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC1. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC2. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC3. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC с помощью продуцирования валериановой кислоты. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают активность HDAC с помощью продуцирования бутирата натрия. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждения рака с помощью снижения активности HDAC. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении различных видов рака, ассоциированных с HDAC. В определенных вариантах осуществления данного изобретения композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, нейроblastомы, глиобlastомы, карциномы, рака легких, хронического лимфоцитарного лейкоза, рака предстательной железы, лимфомы, колоректального рака, гематологических злокачественных новообразований и/или рака желудка с помощью снижения активности HDAC. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждения гематологических злокачественных новообразований с помощью снижения активности HDAC.

В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC композиций по данному изобретению приводит к остановке роста. В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC композиций по данному изобретению приводит к остановке клеточного цикла. В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC композиций по данному изобретению приводит к дифференцировке клеток. В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC композиций по данному изобретению приводит к апоптозу. В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC композиций по данному изобретению приводит к снижению ангиогенеза. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC композиций по данному изобретению приводит к

модуляции иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении активности HDAC в качестве монотерапии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении активности HDAC в качестве комбинированной терапии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в комбинации с другим противоопухолевым агентом. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в комбинации с более чем одним другим противоопухолевым агентом. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в комбинации с химиотерапевтическим агентом. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в комбинации с ингибитором протеасом. В дополнительных аспектах композиции по данному изобретению представляют собой эпигенетические регуляторы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся эпигенетическими аберрациями.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* модулирует активность HDAC. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* ингибирует HDAC. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* представляет собой HDACi. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC класса I. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC класса II. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC класса III. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC класса IV. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC1. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC2. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC3. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC с помощью продуцирования валериановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает активность HDAC с помощью продуцирования бутирата натрия. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении рака с помощью снижения активности HDAC. В предпочтительных вариантах осуществления

бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении различных видов рака, ассоциированных с HDAC. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, нейробластомы, глиобластомы, карциномы, рака легких, хронического лимфоцитарного лейкоза, рака предстательной железы, лимфомы, колоректального рака, гематологических злокачественных новообразований и/или рака желудка с помощью снижения активности HDAC. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении гематологических злокачественных новообразований с помощью снижения активности HDAC.

В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC бактериального штамма вида *Megasphaera massiliensis* приводит к остановке роста. В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC бактериального штамма вида *Megasphaera massiliensis* приводит к остановке клеточного цикла. В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC бактериального штамма вида *Megasphaera massiliensis* приводит к дифференцировке клеток. В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC бактериального штамма вида *Megasphaera massiliensis* приводит к апоптозу. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* приводит к снижению ангиогенеза. В определенных вариантах осуществления ингибирующая активность в отношении HDAC бактериального штамма вида *Megasphaera massiliensis* приводит к модуляции иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в снижении активности HDAC в качестве монотерапии. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в снижении активности HDAC в качестве комбинированной терапии. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в комбинации с другим противоопухолевым агентом. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в комбинации с более чем одним другим противоопухолевым агентом. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в комбинации с химиотерапевтическим агентом. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в комбинации с ингибитором протеасом. В дополнительных аспектах бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* представляет собой эпигенетический регулятор. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для

применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся эпигенетическими абберациями.

Композиции по данному изобретению способны регулировать проницаемость эпителия путем модификации внутриклеточной передачи сигналов, участвующих в экспрессии и локализации белков, участвующих в барьерной функции кишечника. В частности, композиции по данному изобретению усиливают экспрессию мРНК окклюдина, виллина, белка плотных контактов 1 (TJP1) и белка плотных контактов 2 (TJP2). Таким образом, композиции по данному изобретению повышают барьерную функцию кишечника и снижают проницаемость кишечника (Пример 11). В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения для повышения барьерной функции кишечника. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения для снижения проницаемости кишечника. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении снижения барьерной функции кишечника. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении повышенной проницаемости кишечника. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний или патологических состояний, которые характеризуются снижением барьерной функции кишечника. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении заболеваний или патологических состояний, которые характеризуются повышенной проницаемостью кишечника. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении снижения барьерной функции кишечника вследствие лучевой терапии или химиотерапии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении повышенной проницаемости кишечника вследствие лучевой терапии или химиотерапии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении кахексии с помощью повышения барьерной функции кишечника. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении кахексии с помощью снижения проницаемости кишечника. В определенных вариантах осуществления кахексия представляет собой раковую кахексию.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в повышении барьерной функции кишечника. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в снижении проницаемости кишечника. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида

Megasphaera massiliensis предназначен для применения в лечении или предупреждении снижения барьерной функции кишечника. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении повышенной проницаемости кишечника. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении заболеваний или патологических состояний, которые характеризуются снижением барьерной функции кишечника. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении заболеваний или патологических состояний, которые характеризуются повышенной проницаемостью кишечника. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении снижения барьерной функции кишечника, возникающей в результате лучевой терапии или химиотерапии. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении повышенной проницаемости кишечника, возникающей в результате лучевой терапии или химиотерапии. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении с помощью повышения барьерной функции кишечника. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении кахексии с помощью снижения проницаемости кишечника. В определенных вариантах осуществления кахексия представляет собой раковую кахексию.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции предназначены для лечения рака у пациента, проходящего лучевую терапию или химиотерапию. В таких вариантах осуществления композицию можно вводить до, во время или после лучевой терапии или химиотерапии. Пациентам, проходящим лучевую терапию или химиотерапию, не следует вводить какое-либо агент, который индуцирует протекание кишечника, но *Megasphaera massiliensis* стимулирует функцию кишечного барьера [Ixii], поэтому композиции по данному изобретению являются особенно подходящими для лечения пациентов, проходящих лучевую терапию или химиотерапию. Было продемонстрировано, что активация TLR-5 нормализует повреждение эпителия, индуцированное излучением радиацией, *in vivo* [Ixiii]. Композиции по данному изобретению также активируют иммунную систему. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения, индуцированного лучевой терапией. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении повреждения, индуцированного лучевой терапией.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к снижению опухолевого роста.

В определенных вариантах осуществления лечение композициями по данному изобретению приводит к уменьшению размера опухоли или снижению опухолевого роста. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения уменьшения размера опухоли или снижения опухолевого роста. Композиции по данному изобретению могут быть эффективными для уменьшения размера опухоли или снижения опухолевого роста. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения у пациентов с солидными опухолями. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении или предупреждении ангиогенеза при лечении рака. Композиции по данному изобретению могут оказывать влияние на иммунную или воспалительную системы, которые играют центральную роль в ангиогенезе. Композиции по данному изобретению могут обладать антиметастатической активностью. Бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* может обладать антиметастатической активностью. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в предупреждении метастазирования. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в предупреждении метастазирования.

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к снижению процента содержания Treg в РВМС (Фиг. 6С). Treg участвуют в развитии рака, а инфильтрация Treg в опухолевую ткань была связана с неблагоприятным прогнозом [lxiv]. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению избирательно снижает популяцию Treg (Фиг. 6С), композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении рака. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению пригодны в лечении или предупреждении различных видов рака, характеризующихся повышением процента Treg в популяции клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения или предупреждения различных видов рака, характеризующихся увеличением процента клеток CD4+CD25+CD127- в популяции клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении различных видов рака с помощью снижения количества или процента Treg, в частности, в раковой ткани. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака с помощью селективного снижения Treg.

Было высказано предположение, что избирательное уменьшение количества Treg и активация эффекторных Т-клеток, таких как CD8+ Т-клетки, будет представлять собой эффективную терапию рака [64]. Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению соотношения CD8 клеток к Treg-клеткам. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает соотношение как CD8/Treg-клеток, так и

активированных CD8/Treg-клеток (Фиг. 6G и Фиг. 6H), композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении рака. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении различных видов рака, характеризующихся снижением соотношения CD8/Treg-клеток и активированных CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении различных видов рака, характеризующихся снижением соотношения CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении различных видов рака, характеризующихся снижением соотношения активированных CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака с помощью снижения процента Treg в популяциях клеток, тем самым повышая соотношение CD8/Treg-клеток. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака с помощью снижения процента Treg в популяциях клеток, тем самым повышая соотношение активированных CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака с помощью повышения соотношения CD8/Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака с помощью повышения соотношения активированных CD8/Treg-клеток.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии IL-1 β . При раке, ассоциированном с колитом, снижение экспрессии IL-1 β в опухолевых участках было связано с такими симптомами, как повышенный исход заболевания и заболеваемость [Lxv]. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию IL-1 β , композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении рака. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для лечения или предупреждения различных видов рака, характеризующихся сниженной или отсутствующей экспрессией IL-1 β . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака с помощью повышения экспрессии IL-1 β .

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии фактора некроза опухоли 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 с его когнатным рецептором TNFR-1, что приводит к каскаду событий расщепления в апоптотическом пути. TNF- α может также запускать некроз через механизм, RIP киназа-зависимый механизм. Поскольку многие различные виды рака имеют дефектные апоптотические и некротические пути, а TNF- α , как известно,

опосредует эти пути клеточной смерти, TNF- α является потенциальной мишенью для терапии рака. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении рака, в частности, для применения в лечении или предупреждении рака, опосредованного экспрессией TNF- α . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения различных видов рака, опосредованных экспрессией TNF- α , в частности, различных видов рака со сниженной экспрессией и/или активностью TNF- α . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения рака. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения рака с помощью повышения уровня и/или активности TNF- α .

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака молочной железы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении рака молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении рака молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой карциному молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы IV стадии.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака легких. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении рака легких. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении рака легких. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении рака легких. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой карциному легких.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака печени. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении рака печени. В определенных вариантах

осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении рака печени. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении рака печени. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой гепатому (гепатоцеллюлярную карциному).

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении меланомы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении меланомы. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении меланомы. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении меланомы. В предпочтительных вариантах осуществления меланома представляет собой метастатическую меланому.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака яичников. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении рака яичников. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении рака яичников. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении рака яичников.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака шейки матки. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении рака шейки матки. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении рака шейки матки. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении рака шейки матки.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении нейробластомы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному

осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой острый лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой хронический лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой острый миелогенный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой хронический миелогенный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой острый лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой миелодиспластический синдром.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении хронического лимфоцитарного лейкоза. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении хронического лимфоцитарного лейкоза. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении хронического лимфоцитарного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении хронического лимфоцитарного лейкоза.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении лимфомы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении лимфомы. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении лимфомы. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении лимфомы. В определенных вариантах осуществления лимфома представляет собой лимфому Ходжкина. В определенных вариантах осуществления лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака

желудка. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении рака желудка. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении рака желудка. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении рака желудка.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака толстого кишечника. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении колоректального рака. Композиции по данному изобретению могут оказывать влияние на раковые клетки толстого кишечника и могут быть эффективными для лечения рака толстого кишечника. Композиции по данному изобретению могут оказывать влияние на раковые клетки толстого кишечника и могут быть эффективными для лечения колоректального рака. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении рака толстого кишечника. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении колоректального рака. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении рака толстого кишечника. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении рака толстого кишечника. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении колоректального рака. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой колоректальную аденокарциному.

В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака почек (также называемого в данном документе как рак почки). В определенных вариантах осуществления терапевтические комбинации по данному изобретению предназначены для применения в уменьшении размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза в лечении рака почки. В определенных вариантах

осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении рака почек (также называемого в данном документе как рак почки). В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в уменьшении размера опухоли, снижении опухолевого роста или уменьшении ангиогенеза при лечении рака почки. Примеры демонстрируют, что терапевтические комбинации по данному изобретению оказывают влияние на клетки рака почки и могут быть эффективными для лечения рака почки. В предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой почечно-клеточную карциному или переходно-клеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак происходит из кишечника. В некоторых вариантах осуществления рак происходит из части тела, которая не представляет собой кишечник. В некоторых вариантах осуществления рак не представляет собой рак кишечника. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рак не представляет собой колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления рак не представляет собой рак тонкого кишечника. В некоторых вариантах осуществления лечение или предупреждение происходит в участке, отличном от кишечника. В некоторых вариантах осуществления лечение или предупреждение происходит в кишечнике, а также участке, отличном от кишечника.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении карциномы. Композиции по данному изобретению могут быть эффективными для лечения многих типов карциномы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении неиммуногенного рака. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении карциномы. Бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* может быть эффективным для лечения многих типов карциномы. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* предназначен для применения в лечении или предупреждении неиммуногенного рака. Примеры демонстрируют, что композиции по данному изобретению могут быть эффективными для лечения неиммуногенного рака.

Терапевтические эффекты композиций по данному изобретению в отношении рака могут быть опосредованы провоспалительным механизмом. Экспрессия ряда провоспалительных цитокинов может повышаться после введения MRx0029. Воспаление может иметь опухольсупрессорный эффект [Ixvi], и провоспалительные цитокины, такие как TNF- α , исследуются в качестве видов терапии рака [Ixvii]. Активация генов, таких как TNF- α , демонстрируемое в Примерах, может указывать на то, что композиции по данному изобретению могут быть пригодны для лечения рака с помощью аналогичного механизма. Активация лиганда CXCR3, такого как CXCL9), может указывать на то, что композиции по данному изобретению вызывают ответ IFN γ -типа. IFN γ представляет собой

эффективный фактор активации макрофагов, который может стимулировать туморицидную активность [lxviii], а CXCL9, например, также оказывает противоопухолевые эффекты [lxix-lxx lxxi]. Примеры демонстрируют, что экспрессия ряда провоспалительных цитокинов может повышаться после введения MRx0029. Таким образом, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для стимуляции воспаления при лечении рака. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для стимуляции воспаления, обусловленного Th1, при лечении рака. Th1-клетки продуцируют IFN γ и оказывают сильные противоопухолевые эффекты [66]. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака на ранней стадии, такого как рак, не имеющий метастазов, или рак на стадии 0 или стадии 1. Стимуляция воспаления может быть более эффективной против различных видов рака на ранней стадии [66]. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для усиления эффекта второго противоопухолевого агента. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимуляции воспаления для усиления эффекта второго противоопухолевого агента. В некоторых вариантах осуществления лечение или предупреждение рака включает повышение уровня экспрессии одного или нескольких цитокинов. В некоторых вариантах осуществления лечение или предупреждение рака включает повышение уровня экспрессии одного или нескольких провоспалительных цитокинов. Например, в некоторых вариантах осуществления лечение или предупреждение рака включает повышение уровня экспрессии одного или нескольких из IL-1 β , IL-6, MIP-3 α , CXCL9, IL-23, MCP-1, GM-CSF и TNF- α . В некоторых вариантах осуществления лечение или предупреждение рака включает повышение уровня экспрессии одного или нескольких из IL-1 β и MIP-3 α . Известно, что повышение уровней экспрессии любого из IL-1 β , IL-6 и TNF- α указывает на эффективность лечения рака.

Когда бактериальный штамм, описанный в данном документе, применяется в комбинации с липополисахаридом (LPS), может наблюдаться синергетическое повышение уровня IL-1 β . Известно, что LPS вызывает провоспалительный эффект. Таким образом, в определенных вариантах осуществления лечение или предупреждение включает применение бактериального штамма, описанного в данном документе, в комбинации с агентом, который активирует IL-1 β . В определенных вариантах осуществления лечение или предупреждение включает применение бактериального штамма, описанного в данном документе, в комбинации с LPS. Соответственно, композиция по данному изобретению может дополнительно включать агент, который активирует IL-1 β . Соответственно, композиция по данному изобретению может дополнительно содержать LPS.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении пациента, который ранее получал химиотерапию. В определенных вариантах осуществления композиции по данному

изобретению предназначены для применения в лечении пациента, который не переносил химиотерапевтическое лечение. Композиции по данному изобретению могут быть особенно подходящими для таких пациентов.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для предупреждения рецидива. Композиции по данному изобретению могут быть подходящими для длительного введения. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в предупреждении прогрессирования рака.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению предназначены для лечения мелкоклеточной карциномы легких. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению предназначены для лечения мелкоклеточной карциномы легких. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению предназначены для лечения плоскоклеточной карциномы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении аденокарциномы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении железистых опухолей, карциноидных опухолей или недифференцированных карцином.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении гепатобластомы, холангиокарциномы, холангиоцеллюлярной цистаденокарциномы или рака печени, являющегося результатом вирусной инфекции.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении инвазивной протоковой карциномы, протоковой карциномы *in situ* или инвазивной дольковой карциномы.

В дополнительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза, аденокарциномы, базальноклеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, опухоли костей, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы, глиомы ствола головного мозга, опухоли головного мозга, астроцитомы мозжечка, астроцитомы/злокачественной глиомы головного мозга, эпендимомы, медуллобластомы, супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, рака молочной железы, бронхиальные аденом/карциноидов, лимфомы Беркитта, карциноидной опухоли, рака шейки матки, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, хронических миелопролиферативных заболеваний, рака толстого кишечника, кожной Т-клеточной лимфомы, рака эндометрия, эпендимомы, рака пищевода, саркомы Юинга, внутриглазной меланомы, ретинобластомы, рака желчного пузыря, рака желудка, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, опухоли стромальных клеток желудочно-кишечного тракта (GIST), опухоли зародышевых клеток, глиомы, зрительных

путей у детей и гипоталамуса, лимфомы Ходжкина, меланомы, островковой карциномы, саркомы Капоши, почечно-клеточного рака, рака гортани, лейкозов, лимфом, мезотелиомы, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, рака ротоглотки, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака парашитовидной железы, рака глотки, аденомы гипофиза, неоплазии плазматических клеток, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, ретинобластомы, саркомы, рака яичек, рака щитовидной железы или рака матки. В дополнительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении гематологических злокачественных новообразований, множественной миеломы или миелодиспластических синдромов.

Композиции по данному изобретению могут быть особенно эффективными при применении в комбинации с другими терапевтическими агентами. Иммуномодулирующие эффекты композиций по данному изобретению могут быть эффективными в комбинации с более прямыми противоопухолевыми агентами. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* и противоопухолевый агент. В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению, содержащая бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, предназначена для применения в стимуляции рака для усиления его восприимчивости к лечению вторым противоопухолевым агентом. В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению, содержащая бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, предназначена для применения в лечении рака, такого как рак головного мозга, с помощью повышения его восприимчивости к лечению вторым противоопухолевым агентом. Второй противоопухолевый агент можно вводить одновременно или после композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, например, по меньшей мере через день, неделю или месяц.

В предпочтительных вариантах осуществления противоопухолевый агент представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек, иммунотерапию целевым антителом, терапию CAR-T-клетками, онколитический вирус или цитостатическое лекарственное средство. В предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит противоопухолевый агент, выбранный из группы, состоящей из: ервоя (ипилимумаб, BMS); кейтруды (пембролизумаб, Merck); опдиво (ниволумаб, BMS); MEDI4736 (AZ/MedImmune); MPDL3280A (Roche/Genentech); тремелимумаба (AZ/MedImmune); CT-011 (пидилизумаб, CureTech); BMS-986015 (лиритимумаб, BMS); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MSB-0010718C (Merck); PF-05082566 (Pfizer); MEDI6469 (AZ/MedImmune); BMS-986016 (BMS); BMS-663513 (упелумаб, BMS); IMP321 (Prima Biomed); LAG525 (Novartis); ARGX-110 (arGEN-X); PF-05082466 (Pfizer); CDX-1127 (варлилумаб; CellDex Therapeutics); TRX-518 (GITR Inc.); MK-4166 (Merck); JTX-2011 (Jounce Therapeutics); ARGX-115 (arGEN-X); NLG-9189 (индоксимод, NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH2201 (Innate Immunotherapeutics/AZ); NLG-919 (NewLink Genetics);

анти-VISTA (JnJ); эпакадостата (INCB24360, Incyte); F001287 (Flexus/BMS); CP 870893 (Университет Пенсильвании); MGA271 (Macrogenix); эмактузумаба (Roche/Genentech); галунизертиба (Eli Lilly); улокуплумаба (BMS); BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics); бавитуксимаба (Peregrine Pharmaceuticals); CC 90002 (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals); IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals); LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (Ewha Women's University, Корея); вемурафениба (Plexxikon); дабрафениба (Genentech/GSK); BMS-777607 (BMS); BLZ945 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre); унитуксина (динутуксимаб, United Therapeutics Corporation); блинцито (блинатумомаб, Amgen); кирамзы (рамуцирумаб, Eli Lilly); газивы (обинутузумаб, Roche/Biogen); кадцилы (адо-трастузумаб эмтанзин, Roche/Genentech); перьеты (пертузумаб, Roche/Genentech); адцетриса (брентуксимаб ведотин, Takeda/Millennium); арзерры (офатумумаб, GSK); вектибикса (панитумумаб, Amgen); авастина (бевацизумаб, Roche/Genentech); эрбитукса (цетуксимаб, BMS/Merck); бексара (тозитумомаб-I131, GSK); зевалина (ибритумомаб тиуксетан, Biogen); кампаты (алемтузумаб, Bayer); милотарга (гемтузумаб озогамин, Pfizer); герцептина (трастузумаб, Roche/Genentech); ритуксана (ритуксимаб, Genentech/Biogen); волоксимаба (Abbvie); Enavatuzumab (Abbvie); ABT-414 (Abbvie); элотузумаба (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Ablynx); озарализумаба (Ablynx); актимаба-С (Actinium); актимаба-Р (Actinium); милатузумаба-докс (Actinium); эмаба-SN-38 (Actinium); наптумонмаба эстафенатокса (Active Biotech); AFM13 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (самализумаб, Alexion); ALT-836 (Altor Bioscience); ALT-801 (Altor Bioscience); ALT-803 (Altor Bioscience); AMG780 (Amgen); AMG 228 (Amgen); AMG820 (Amgen); AMG172 (Amgen); AMG595 (Amgen); AMG110 (Amgen); AMG232 (адекатумумаб, Amgen); AMG211 (Amgen/MedImmune); BAY20-10112 (Amgen/Bayer); рилотумумаба (Amgen); денозумаба (Amgen); AMP-514 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/MedImmune); MEDI6383 (AZ/MedImmune); MEDI551 (AZ/MedImmune); Moxetumomab pasudotox (AZ/MedImmune); MEDI565 (AZ/MedImmune); MEDI0639 (AZ/MedImmune); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MEDI562 (AZ/MedImmune); AV-380 (AVEO); AV203 (AVEO); AV299 (AVEO); BAY79-4620 (Bayer); анетумаба равтанзина (Bayer); ванциктумаба (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); сибротузумаба (Boehringer Ingelheim); BI-836845 (Boehringer Ingelheim); B-701 (BioClin); BИВ015 (Biogen); обинутузумаба (Biogen/Genentech); BI-505 (Bioinvent); BI-1206 (Bioinvent); TB-403 (Bioinvent); BT-062 (Biotest) BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS); нецитумумаба (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex); CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo); патримумаба (Daiichi Sankyo); тигатузумаба (Daiichi Sankyo); нимотузумаба (Daiichi Sankyo); DS-8895 (Daiichi Sankyo); DS-8873 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORab-004 (Eisai); MORab-009 (Eisai); MORab-003 (Eisai); MORab-066 (Eisai); LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212 (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly); циксутумумаба (Eli Lilly);

фланвотумаба (Eli Lilly); IMC-TR1 (Eli Lilly); рамуцикураба (Eli Lilly); табалумаба (Eli Lilly); занолимумаба (Emergent Biosolution); FG-3019 (FibroGen); FPA008 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics); FPA144 (Five Prime Therapeutics); катумаксомаба (Fresenius Biotech); IMAB362 (Ganymed); IMAB027 (Ganymed); HuMax-CD74 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745 (Gilead); GS-6624 (Gilead); OMP-21M18 (демцизумаб, GSK); мапатумумаба (GSK); IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen); IMGN853 (ImmunoGen); IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130 (Immunomedics); милатузумаба-докс (Immunomedics); IMMU-115 (Immunomedics); IMMU-132 (Immunomedics); IMMU-106 (Immunomedics); IMMU-102 (Immunomedics); эпратузумаба (Immunomedics); кливатузумаба (Immunomedics); IPH41 (Innate Immunotherapeutics); даратумумаба (Janssen/Genmab); CNTO-95 (Intetumumab, Janssen); CNTO-328 (силтуксимаб, Janssen); KB004 (KaloBios); моголизумаба (Kyowa Hakko Kirrin); KW-2871 (экроексимаб, Life Science); сонепцизумаба (Lpath); маргетуксимаба (Macrogenics); эноблитузумаба (Macrogenics); MGD006 (Macrogenics); MGF007 (Macrogenics); МК-0646 (далотузумаб, Merck); МК-3475 (Merck); Sym004 (Symphogen/Merck Serono); DI17E6 (Merck Serono); MOR208 (Morphosys); MOR202 (Morphosys); Xmab5574 (Morphosys); BPC-1C (энзитуксимаб, Precision Biologics); TAS266 (Novartis); LFA102 (Novartis); BHQ880 (Novartis/Morphosys); QGE031 (Novartis); HCD122 (лукатумумаб, Novartis); LJM716 (Novartis); AT355 (Novartis); OMP-21M18 (Demcizumab, OncoMed); OMP52M51 (Oncomed/GSK); OMP-59R5 (Oncomed/GSK); вантуктумаба (Oncomed/Bayer); СМС-544 (инотузумаб озогамицин, Pfizer); PF-03446962 (Pfizer); PF-04856884 (Pfizer); PSMA-ADC (Progenics); REGN1400 (Regeneron); REGN910 (несвакумаб, Regeneron/Sanofi); REGN421 (энотикумаб, Regeneron/Sanofi); RG7221, RG7356, RG7155, RG7444, RG7116, RG7458, RG7598, RG7599, RG7600, RG7636, RG7450, RG7593, RG7596, DCDS3410A, RG7414 (парсатузумаб), RG7160 (имгатузумаб), RG7159 (обинтузумаб), RG7686, RG3638 (онартузумаб), RG7597 (Roche/Genentech); SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi); SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi), SGN-LIV1A (линтузумаб, Seattle Genetics); SGN-CD33A (Seattle Genetics); SGN-75 (ворзетузумаб мафодотин, Seattle Genetics); SGN-19A (Seattle Genetics) SGN-CD70A (Seattle Genetics); SEA-CD40 (Seattle Genetics); ибритумомаба тиуксетана (Spectrum); MLN0264 (Takeda); ганитумаба (Takeda/Amgen); CEP-37250 (Teva); ТВ-403 (Thrombogenic); VB4-845 (Viventia); Xmab2512 (Xencor); Xmab5574 (Xencor); нимотузумаба (YM Biosciences); карлумаба (Janssen); NY-ESO TCR (Adaptimmune); MAGE-A-10 TCR (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics); KTE-C19 CAR (Kite Pharma); UCART19 (Collectis); BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); АТТСК20 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); Онух-015 (Onyx Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunwaybio); DNX-2401 (DNATRIX); VCN-01 (VCN Biosciences); Colo-Ad1 (PsiOxus Therapeutics); ProstAtak (Advantagene); онкоса-102 (Oncos Therapeutics); CG0070 (Cold Genesys); пекса-вака (JX-594, Jennerex Biotherapeutics); GL-ONC1 (Genelux); T-VEC (Amgen); G207 (Medigene); HF10 (Takara

Bio); SEPREHVIR (HSV1716, Virttu Biologics); OrienX010 (OrienGene Biotechnology); реолизина (Oncolytics Biotech); SVV-001 (Neotropix); какатака (CVA21, Viralytics); алименты (Eli Lilly), цисплатина, оксалиплатина, иринотекана, фолиновой кислоты, метотрексата, циклофосамида, 5-фторурацила, зикадии (Novartis), тафинлара (GSK), ксалкори (Pfizer), ирессы (AZ), гилотрифа (Boehringer Ingelheim), тарцевы (Astellas Pharma), халавена (Eisai Pharma), велипариба (Abbvie), AZD9291 (AZ), алектиниба (Chugai), LDK378 (Novartis), генетеспиба (Synta Pharma), тергенпуматуцела-L (NewLink Genetics), GV1001 (Kael-GemVax), тивантиниба (ArQule); цитоксана (BMS); онковина (Eli Lilly); адриамицина (Pfizer); гемзара (Eli Lilly); кселоды (Roche); иксемпры (BMS); Abraxane (Celgene); трелстара (Debiopharm); таксотера (Sanofi); нексавара (Bayer); IMMU-132 (Immunomedics); E7449 (Eisai); термодокса (Celsion); кометрика (Exellxis); лонсурфа (Taiho Pharmaceuticals); камптозара (Pfizer); UFT (Taiho Pharmaceuticals); и TS-1 (Taiho Pharmaceuticals).

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм *Megasphaera massiliensis*, депонированный под номером доступа NCIMB 42761, является единственным терапевтически активным агентом в композиции по данному изобретению.

Авторы данного изобретения определили, что бактериальные штаммы из рода *Megasphaera* могут быть особенно эффективными для лечения или предупреждения рака, включающего передачу сигналов онкогенной внеклеточной сигнальной киназы (ERK). Внеклеточная сигнальная киназа (ERK), представляет собой нижестоящий эффектор в киназном пути митоген-активируемого белка (MAP), высококонсервативного пути передачи сигнала, встречающегося у всех эукариот [Ixxii]. Путь MAP-киназы регулирует такие процессы, как пролиферация, дифференциация, выживаемость и апоптоз клеток, а aberrантная активация пути тесно связана с патогенезом рака. Как описано в примерах, введение композиций, содержащих штаммы *Megasphaera*, может ингибировать передачу сигналов с участием ERK в линиях раковых клеток; т.е., снижать клеточные уровни фосфорилированной ERK по сравнению с общим белком ERK. Авторы данного изобретения также определили, что лечение штаммами *Megasphaera* может снижать клоногенную выживаемость линий раковых клеток, включающих онкогенную передачу сигналов с участием ERK, в частности, в клеточных линиях меланомы и колоректального рака. Авторы данного изобретения также установили, что лечение штаммами *Megasphaera* может индуцировать экспрессию гена белка 2, ассоциированного с микротрубочками (MAP2), что указывает на особую пригодность в лечении метастатических различных видов рака.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в способе лечения или предупреждения рака, при этом рак включает онкогенную передачу сигнала с участием ERK.

Термин «онкогенная передача сигналов с участием ERK», используемый в данном документе, относится к раку, включающему нарушение регуляции передачи клеточных

сигналов, такое как независимую от раздражителя передачу сигналов посредством пути с участием MAP киназы, результатом которого является сверхактивная передача сигналов с участием ERK (как изоформы ERK1, так и ERK2, или обеих), которая способствует увеличению пролиферации и/или выживаемости раковых клеток. ERK1 является активной (т.е., передающей сигнал), если фосфорилируется в положениях Thr202 и Tyr204. ERK2 является активной (т.е., передающей сигнал), если фосфорилируется в положениях Thr173 и Tyr185. Соответственно, «онкогенная передача сигналов с участием ERK» может быть результатом присутствия онкогенных мутаций (мутации приобретения функции) или сверхэкспрессии положительных регуляторов пути с участием MAP киназы, или онкогенных мутаций (мутации потери функции) или подавления экспрессии отрицательных регуляторов пути MAP киназы.

Рак, включающий онкогенную передачу сигналов с участием ERK, в качестве альтернативы можно определить в виде рака, «проявляющего» или «характеризующегося» онкогенной передачей сигналов с участием ERK. Рак, включающий онкогенную передачу сигнала с участием ERK, может быть в качестве альтернативы определен в виде рака, при котором пролиферация и/или выживание злокачественных клеток «стимулируется», «индуцируется» или «активируется» с помощью передачи сигнала с участием ERK. Рак, включающий онкогенную ERK, в качестве альтернативы может быть определен в виде рака, включающего, проявляющего или характеризуемого «независимой от раздражителя» передачей сигнала с участием ERK.

«Онкогенная мутация» охватывает любые аминокислотные вариации в белке по сравнению с белком дикого типа, которые способствуют пролиферации и/или выживаемости раковых клеток, в том числе, но не ограничиваясь ими, замены (в том числе замены одной аминокислоты), вставки и/или делеции. Как отмечалось выше, онкогенные мутации могут представлять собой мутации потери функции или приобретения функции, в зависимости от белка и его функции в пути с участием MAP-киназы. «Сверхэкспрессия» или «сниженная экспрессия» относятся соответственно к повышенной или сниженной экспрессии белка в раковой клетке по сравнению с незлокачественной клеткой.

Соответственно, различные виды рака, включающие онкогенную передачу сигналов с участием ERK, включают те, которые содержат онкогенную мутацию или сверхэкспрессию BRAF, NRAS, ARAF, CRAF, EGFR, GRB2, SOS, HRAS, KRAS4A, KRAS4B, MEK1, MEK2, ERK1 или ERK2; такие как BRAF, ARAF, CRAF, EGFR, GRB2, SOS, HRAS, MEK1, MEK2, ERK1 или ERK2. Эти белки являются положительными регуляторами пути MAP киназы (т.е., онкопротеинами) [72]. Например, рак может включать онкогенную мутацию в BRAF, NRAS, ARAF, CRAF, EGFR, GRB2, SOS, HRAS, MEK1, MEK2, ERK1 или ERK2.

Различные виды рака, включающие онкогенную передачу сигнала с участием ERK, также включают те, которые содержат (в качестве альтернативы или в качестве дополнения к вышеуказанным онкогенным мутациям/сверхэкспрессии) онкогенную

мутацию или снижение экспрессии RSK, DUSP1, DUSP5, DUSP6 или SPRY. Эти белки являются отрицательными регуляторами пути MAP киназы (т.е., белками-супрессорами опухоли) [72].

Любой вид рака, включающий онкогенную передачу сигналов с участием ERK, можно лечить или предупреждать с применением композиций по данному изобретению, например, солидные опухоли или гематологические злокачественные новообразования. Такие различные виды рака включают, но не ограничиваются ими, колоректальный рак, меланому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз, аденокарциному, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, опухоль костей, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола головного мозга, опухоль головного мозга, астроцитому мозжечка, астроцитому/злокачественную глиому головного мозга, эпендимому, медуллобластому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, рак молочной железы, бронхиальные аденомы/карциномы, лимфому Беркитта, карциномную опухоль, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелолиферативные заболевания, кожную Т-клеточную лимфому, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга, внутриглазную меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка, карциномную опухоль желудочно-кишечного тракта, опухоль стромальных клеток желудочно-кишечного тракта (GIST), опухоль зародышевых клеток, глиому, зрительных путей у детей и гипоталамуса, лимфому Ходжкина, островковую карциному, саркому Капоши, почечно-клеточный рак, рак гортани, лейкозы, лимфомы, мезотелиому, нейробластому, неходжкинскую лимфому, рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак парашитовидной железы, рак глотки, аденому гипофиза, неоплазию плазматических клеток, рак предстательной железы, почечно-клеточную карциному, ретинобластому, саркому, рак яичек, рак щитовидной железы или рак матки.

Любой вид рака, включающий онкогенную передачу сигналов с участием ERK, можно лечить или предупреждать с помощью композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Megasphaera*, и предпочтительно колоректальный рак, меланому, рак предстательной железы, аденокарциному легких, такую как немелкоклеточную аденокарциному легких, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, лейкоз, такой как волосатоклеточный лейкоз или острый миелоидный лейкоз, глиому, пилоцитарную астроцитому, рак яичников, папиллярный или фолликулярный рак щитовидной железы, семиному, рак печени, миелодиспластический синдром, рак почек или болезнь Ходжкина.

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в способе лечения или предупреждения рака, включающем онкогенную мутацию в BRAF, необязательно при этом рак дополнительно включает сверхэкспрессию BRAF. Авторы данного изобретения определили, что лечение штаммами *Megasphaera* может ингибировать клоногенную выживаемость, подавлять передачу сигналов с участием ERK

и повышать экспрессию гена MAP2 в линиях раковых клеток, содержащих онкогенные мутации BRAF, в частности, онкогенную мутацию BRAF V600E в клеточных линиях колоректального рака и меланомы. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении также представлена композиция, содержащая штамм бактерий рода *Megasphaera*, для применения в способе лечения или предупреждения рака, включающего онкогенную мутацию в положении 600 BRAF, предпочтительно BRAF V600E. В особо предпочтительных вариантах осуществления рак представляет собой колоректальный рак или меланому.

В дополнение к онкогенной мутации в положении 600 BRAF (например, V600E) или вместо нее, рак может включать онкогенную мутацию, выбранную из BRAF K601E, G469A, G469V, L597R, K601N, G464V, N581S, L597Q, A598V, G464R, G466A или G469E; необязательно при этом рак представляет собой колоректальный рак. В другом варианте осуществления, в дополнение к мутации V600E или вместо нее, рак может включать онкогенную мутацию, выбранную из BRAF V600K, V600R или V600D; необязательно при этом рак представляет собой меланому.

В дополнительном аспекте в данном изобретении также представлена композиция, содержащая штамм бактерий вида *Megasphaera massiliensis*, для применения в способе лечения колоректального рака, такого как метастатический колоректальный рак. Как продемонстрировано в примерах, авторы данного изобретения обнаружили, что штаммы *Megasphaera massiliensis* могут ингибировать клоногенную выживаемость и передачу сигнала с участием ERK в клеточных линиях колоректального рака.

В дополнительном аспекте в данном изобретении также представлена композиция, содержащая штамм бактерий вида *Megasphaera massiliensis*, для применения в способе лечения колоректального рака, такого как метастатическая меланома. Как продемонстрировано в примерах, авторы данного изобретения обнаружили, что штаммы *Megasphaera massiliensis* могут ингибировать клоногенную выживаемость и передачу сигнала с участием ERK в клеточных линиях меланомы. Кроме того, способность штаммов *Megasphaera massiliensis* индуцировать экспрессию гена MAP2 в клеточных линиях меланомы указывает на особую эффективность против метастатической меланомы.

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор BRAF вводят одновременно, отдельно или последовательно по отношению к введению композиции, содержащей штамм бактерий рода *Megasphaera*. Предпочтительно ингибитор BRAF является селективным ингибитором BRAF^{V600E}, предпочтительно выбранным из вемурафениба, дабрафениба или энкорафениба. Более предпочтительно, ингибитор BRAF представляет собой вемурафениб.

В дополнительном аспекте в данном изобретении также представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera* и ингибитор BRAF, предпочтительно те, которые определены выше, для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении или предупреждении рака.

В предпочтительных вариантах осуществления аналог цитидина вводят одновременно, отдельно или последовательно по отношению к введению композиции, содержащей штамм бактерий рода *Megasphaera*. Предпочтительно аналог цитидина выбран из азацитина-с, децитабина или зебуларина. Более предпочтительно аналог цитидина представляет собой азацитин-с.

В дополнительном аспекте в данном изобретении также представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera* и аналог цитидина, предпочтительно те, которые определены выше, для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении или предупреждении рака.

В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор полимеризации тубулина или ингибитор деполимеризации тубулина вводят одновременно, отдельно или последовательно по отношению к введению композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Megasphaera*. Предпочтительно ингибитор полимеризации тубулина или ингибитор деполимеризации тубулина выбирают из из паклитаксела, абраксана, доцетаксела, эпотилона, (+)-дискодермолида, колхицина, комбретастина, 2-метоксиэстрадиола, E7010, винкристина, винбластина, винорелбина или винфлунина; более предпочтительно паклитаксела.

В дополнительном аспекте в данном изобретении также представлена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera* и ингибитор полимеризации тубулина или ингибитор деполимеризации тубулина, предпочтительно те, которые определены выше, для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении или предупреждении рака. В дополнительном аспекте в данном изобретении также представлена композиция, содержащая штамм бактерий рода *Megasphaera*, для применения в терапии рака с помощью повышения чувствительности рака к ингибитору полимеризации или деполимеризации тубулина, предпочтительно определенным выше.

В дополнительных таких вариантах осуществления в данном изобретении представлена:

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в способе лечения или предупреждения рака, в частности, при этом рак включает онкогенную передачу сигнала с участием ERK.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 1, при этом рак включает онкогенную мутацию или сверхэкспрессию BRAF, NRAS, ARAF, CRAF, EGFR, GRB2, SOS, HRAS, KRAS4A, KRAS4B, MEK1, MEK2, ERK1 или ERK2.

Композиция для применения в соответствии с любым предыдущих вариантов осуществления, при этом рак включает онкогенную мутацию или снижение экспрессии RSK, DUSP1, DUSP5, DUSP6 или SPRY.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 2, при этом рак включает онкогенную мутацию или сверхэкспрессию BRAF, ARAF, CRAF, EGFR, GRB2, SOS, HRAS, MEK1, MEK2, ERK1 или ERK2.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 2, при этом рак включает онкогенную мутацию BRAF, NRAS, ARAF, CRAF, EGFR, GRB2, SOS, HRAS, MEK1, MEK2, ERK1 или ERK2.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом рак включает онкогенную мутацию в BRAF или NRAS, необязательно при этом рак дополнительно включает сверхэкспрессию BRAF или NRAS.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 6, при этом рак включает онкогенную мутацию в BRAF, необязательно при этом рак дополнительно включает сверхэкспрессию BRAF.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 7, при этом рак включает онкогенную мутацию в положении 600 BRAF.

Композиция для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 6-8, при этом рак включает онкогенную мутацию, выбранную из BRAF V600E, K601E, G469A, G469V, L597R, K601N, G464V, N581S, L597Q, A598V, G464R, G466A или G469E; необязательно при этом рак представляет собой колоректальный рак.

Композиция для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 6-8, при этом рак включает онкогенную мутацию, выбранную из BRAF V600E, V600K, V600R или V600D; необязательно при этом рак представляет собой меланому.

Композиция для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 6-10, при этом рак включает онкогенную мутацию BRAF V600E.

Композиция для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 6-11, при этом рак включает онкогенную мутацию NRAS Q61R, при этом необязательно рак представляет собой меланому.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом рак выбирают из колоректального рака, меланомы, рака предстательной железы, аденокарциномы легких, такой как немелкоклеточная аденокарцинома легких, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, лейкоза, такого как волосатоклеточный лейкоз или острый миелоидный лейкоз, глиомы, пилоцитарной астроцитомы, рака яичников, папиллярного или фолликулярного рака щитовидной железы, семиномы, рака печени, миелодиспластического синдрома, рака почек или болезни Ходжкина.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом рак представляет собой колоректальный рак.

Композиция для применения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-13, при этом рак представляет собой меланому.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом бактериальный штамм принадлежит к виду *Megasphaera massiliensis*.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления в способе ингибирования передачи сигналов с участием ERK1 и/или ERK2 при лечении или предупреждении рака.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления в способе ингибирования фосфорилирования ERK1 и/или ERK2 при лечении или предупреждении рака.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления в способе индукции экспрессии гена MAP2 при лечении или предупреждении рака.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления в способе уменьшения размера опухоли, опухолевого роста, предупреждения или ингибирования метастазирования или предупреждения ангиогенеза при лечении или профилактике рака.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления в способе ингибирования метастазирования при лечении рака.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом способ включает одновременное, раздельное или последовательное введение ингибитора BRAF по отношению к введению композиции.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 22, при этом BRAF избирательно ингибирует BRAF^{V600E}, предпочтительно при этом ингибитор BRAF выбирают из вемурафениба, дабрафениба или энкорафениба.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 23, при этом ингибитор BRAF представляет собой вемурафениб.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом способ включает одновременное, раздельное или последовательное введение аналога цитидина по отношению к введению композиции.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 25, где аналог цитидина выбирают из азациитидина-с, децитабина или зебуларина.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 26, при этом аналог цитидина представляет собой азациитидин-с.

Композиция для применения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом способ включает одновременное, раздельное или последовательное введение ингибитора полимеризации тубулина или ингибитора деполимеризации тубулина по отношению к введению композиции.

Композиция для применения в соответствии с вариантом осуществления 28, при этом ингибитор полимеризации тубулина или ингибитор деполимеризации тубулина выбирают из паклитаксела, абраксана, доцетаксела, эпотилона, (+)-дискотермолида, колхицина, комбретастатина, 2-метоксиэстрадиола, E7010, винкристина, винбластина, винорелбина или винфлунина.

Предпочтительно различные виды рака, включающие онкогенную передачу сигналов с участием ERK, которые можно лечить или предупреждать с применением композиций по данному изобретению (в частности, тех, которые содержат бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*), включают, но не ограничиваются ими, колоректальный рак, меланому, рак предстательной железы, аденокарциному легких, такую как немелкоклеточную аденокарциному легких, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, лейкоз, такой как волосатоклеточный лейкоз или острый миелоидный лейкоз, глиому, пилоцитарную астроцитому, рак яичников, папиллярный или фолликулярный рак щитовидной железы, семиному, рак печени, миелодиспластический синдром, рак почек и болезнь Ходжкина. Сообщалось, что такие различные виды рака включают сверхактивный путь с участием MAP-киназы (т.е., онкогенную передачу сигналов ERK) [72].

В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении рака, включающего онкогенную мутацию в BRAF или NRAS, необязательно при этом рак дополнительно включает сверхэкспрессию BRAF или NRAS. Предпочтительно композиции по данному изобретению (в частности, те, которые содержат бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*) предназначены для применения в лечении или предупреждении рака, который включает онкогенную мутацию в BRAF и необязательную сверхэкспрессию BRAF.

Онкогенные мутации в BRAF включают V600E, K601E, G469A, G469V, L597R, K601N, G464V, N581S, L597Q, A598V, G464R, G466A или G469E, которые были идентифицированы в различных видах колоректального рака [lxxiii], и композиции по данному изобретению (в частности, те, которые содержат бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*), могут быть применены для лечения или предупреждения таких различных видов рака. Дополнительные онкогенные мутации в BRAF включают V600E, V600K, V600R, или V600D, которые были идентифицированы в различных видах меланомы [], и композиции по данному изобретению (в частности, те, которые содержат бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*), могут быть применены для лечения или предупреждения таких различных видов рака. Аминокислоты в BRAF пронумерованы в соответствии с записью UniProt P15056 [lxxv] (BRAF дикого типа).

В особо предпочтительном варианте осуществления композиции по данному изобретению (в частности, те, которые содержат бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*) предназначены для применения в лечении или предупреждении рака, который включает мутацию BRAF V600E. Линии раковых клеток SKMEL28, 451Lu и HT29 содержат эту мутацию в BRAF, и в Примерах было обнаружено, что штамм *Megasphaera* ингибирует клоногенную выживаемость, ингибирует передачу сигналов с участием ERK и индуцирует экспрессию гена MAP2 в таких клеточных линиях. Рак может дополнительно включать онкогенную мутацию NRAS Q61R. Линия раковых клеток

SKMEL2 содержит эту мутацию в NRAS, и в Примерах было обнаружено, что штамм *Megasphaera* индуцирует экспрессию гена MAP2 в этой линии клеток.

Клеточная линия HT29, используемая в Примерах, представляет собой линию клеток колоректального рака, и было обнаружено, что штамм *Megasphaera* ингибирует клоногенную выживаемость и ингибирует передачу сигнала с участием ERK в этой клеточной линии. Таким образом, в особо предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению (в частности, те, которые содержат бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*) применяют для лечения или предупреждения колоректального рака, такого как колоректальный рак, который включает мутацию BRAF V600E.

Клеточные линии SKMEL2, SKMEL28 и 451Lu, применяемые в Примерах, представляют собой линии клеток меланомы, и было обнаружено, что штамм *Megasphaera* ингибирует клоногенную выживаемость, ингибирует передачу сигналов с участием ERK и индуцирует экспрессию гена MAP2 в таких клеточных линиях. Таким образом, в особо предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению (в частности, те, которые содержат бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*) применяют для лечения или предупреждения меланомы, такой как меланома, которая включает мутацию BRAF V600E.

В другом аспекте композиции по данному изобретению включает бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* для применения в способе лечения колоректального рака. В другом аспекте композиции по данному изобретению включает бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* для применения в способе лечения меланомы.

В любом из аспектов и вариантов осуществления, подробно описанных выше, композиция по данному изобретению (в частности, композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*) предпочтительно предназначена для применения в лечении метастатического рака. Как сообщается в Примерах, было обнаружено, что штамм *Megasphaera* усиливает экспрессию гена MAP2. Было обнаружено, что MAP2 в значительной степени экспрессируется в первичных кожных меланомах, но имеет сниженную экспрессию в метастатических меланомах []. Было высказано предположение, что повышенная экспрессия белков, стабилизирующих микротрубочки, или обработка белками, стабилизирующими микротрубочки, такими как MAP2, могут препятствовать динамической нестабильности микротрубочек, которая требуется во время деления клеток. Следовательно, предполагается, что активация MAP2 препятствует делению клеток и задерживает рост опухоли при раке [76], что указывает на то, что композиции по данному изобретению могут иметь особое применение в лечении метастатических видов рака.

Как продемонстрировано в Примерах, композиции по данному изобретению, содержащие штамм *Megasphaera*, оказывают влияние на индукцию экспрессии гена MAP2 и ингибирование передачи сигнала с участием ERK в клеточных линиях меланомы и колоректального рака. Таким образом, композиции по данному изобретению пригодны в

способах ингибирования передачи сигналов с участием ERK, таких как передача сигналов с участием ERK1 и/или ERK2, при лечении или предупреждении рака, включающего онкогенную передачу сигналов с участием ERK, как определено выше. Композиции по данному изобретению также пригодны в способах ингибирования фосфорилирования ERK, такого как фосфорилирование ERK1 и/или ERK2, при лечении или предупреждении таких различных видов рака. Композиции по данному изобретению также пригодны в способах индукции экспрессии гена MAP2 при лечении или предупреждении таких различных видов рака. Экспрессия гена MAP2 была ассоциирована с повышенной чувствительностью рака к соединениям, целенаправленно воздействующим на микротрубочки, таким как паклитаксел []. Таким образом, композиции по данному изобретению можно применять для повышения чувствительности таких различных видов рака к ингибитору полимеризации или деполимеризации тубулина, в частности, паклитакселу. Композиции по данному изобретению также пригодны в способах уменьшения размера опухоли, снижения опухолевого роста, предупреждения или ингибирования метастазирования или предупреждения ангиогенеза при лечении или предупреждении рака, включающем онкогенную передачу сигнала с участием ERK. В результате влияния на экспрессию гена MAP2, продемонстрированную в Примерах, композиции по данному изобретению предпочтительно применять в способах ингибирования метастазирования при лечении таких различных видов рака.

В дополнительном аспекте композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, предназначена для применения в способе ингибирования передачи сигналов с участием ERK1 и/или ERK2 при лечении или предупреждении рака. В дополнительном аспекте композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, предназначена для применения в способе ингибирования фосфорилирования ERK1 и/или ERK2 при лечении или предупреждении рака. В дополнительном аспекте композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, предназначена для применения в способе индукции экспрессии гена MAP2 при лечении или предупреждении рака. В указанных дополнительных аспектах предпочтительно, чтобы различные виды рака были охарактеризованы, как подробно описано выше («Различные виды рака и их характеристики»).

В некоторых вариантах осуществления композиция по данному изобретению предназначена для лечения рака тонкого кишечника, такого как аденокарцинома тонкого кишечника. Обработанная метотрексатом линия клеток HT29, применяемая в примерах, имеет фенотип, напоминающий эпителиальные клетки тонкого кишечника, и было продемонстрировано, что композиции по данному изобретению оказывают благоприятное влияние на такие клетки. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению применяют для стимуляции апоптоза при лечении или предупреждении рака, в частности, рака тонкого кишечника.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению предназначена для применения в способе индукции экспрессии гена GPR109a при лечении или предупреждении рака.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению предназначена для применения в способе индукции повышения уровней IL-8 при лечении или предупреждении рака.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению предназначена для применения в лечении колоректального рака, такого как колоректальная аденокарцинома. Линия клеток Caco-2, используемая в примерах, представляет собой линию клеток колоректальной аденокарциномы, и было продемонстрировано, что композиции по данному изобретению оказывают благоприятное влияние на такие клетки.

В определенных вариантах осуществления композиции предназначены для лечения или предупреждения метастатической меланомы, мелкоклеточного рака легких или аденосквамозной карциномы легких. Влияние на NSE, продемонстрированное в примерах, предполагает, что композиции по данному изобретению могут быть особенно эффективными против этих различных видов рака.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению не предназначена для применения в лечении рака. В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению предназначена для применения в лечении заболевания или нарушения, не представляющего собой рак.

Применение в качестве адъюванта вакцины

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). Известно, что TNF- α важен для вакцинных ответов. Например, было продемонстрировано, что TNF- α был необходим для эффективного вакцинного ответа при вакцинации против гриппа пожилого населения []. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины с помощью повышения уровня и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины при терапии гриппа. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в усилении иммунного ответа против антигена. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция для введения в комбинации с антигеном. В определенных вариантах осуществления композиции по

данному изобретению предназначены для введения пациенту незадолго до или после вакцинации.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии IL-6. Повышенная экспрессия IL-6 была ассоциирована с вакцинными ответами при многих заболеваниях. Например, IL-6 продуцировался воспалительными моноцитами CD14+CD16- после того, как взрослым вводили вакцину против гриппа [lxxix], и более высокие уровни IL-6 были ассоциированы с достижением вакцинного ответа на противогриппозную вакцину [lxxx]. Кроме того, IL-6 продуцировался после инъекции адьювантной системы AS03 [lxxxi], и было продемонстрировано, что подавление IL-6 у мышей снижает ответ Т-клеток-хелперов после введения противотуберкулезной вакцины [lxxxii]. Поскольку введение композиций по данному изобретению, как было продемонстрировано, повышает экспрессию IL-6, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины с помощью повышения уровня и/или активности IL-6. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины при терапии туберкулеза.

Кроме того, было продемонстрировано, что экспрессия IL-6 и TNF- α коррелирует с эффективностью терапевтической вакцины против ВИЧ [Huang et al], противотуберкулезной вакцины и противохламидиозной вакцины [lxxxiii]. Su et al. [lxxxiv] Su et al. продемонстрировали, что коинокуляция IL-6 или TNF- α с ДНК-вакциной против FMDV приводила к повышению экспрессии IFN- γ CD4+ и CD8+ Т-клетками, более высокой экспрессии IL-4 в CD4+ Т-клетках и более высокому антигенспецифическому цитотоксическому ответу. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию IL-6 и TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адьюванта вакцины с помощью повышения уровня и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адьюванта вакцины с помощью повышения уровня и/или активности IL-6. В конкретном варианте осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адьюванта вакцины с помощью повышения уровня и/или активности TNF- α и IL-6. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины при терапии ВИЧ. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины при терапии хламидиоза.

Примеры демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии МР-3 α . Было продемонстрировано, что МР-3 α повышает ответ на вакцину против ВИЧ [lxxxv]. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию МР-3 α , композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адьюванта вакцины.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии ИЛ-1 β . Li et al. [lxxxvi] продемонстрировали, что адьювант гидроксид алюминия активировал секрецию ИЛ-1 β , и предположили, что сам ИЛ-1 β может выступать в качестве адьюванта. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию ИЛ-1 β , композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адьюванта вакцины. Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может повышать соотношение CD8 $^+$ Т-клеток к Treg. Было продемонстрировано, что адьюванты стимулируют CD8 $^+$ Т-клетки [lxxxvii], и поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает соотношение CD8 $^+$ Т-клеток к Treg, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины с помощью повышения соотношения CD8 $^+$ Т-клеток к Treg.

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии ИЛ-8. Повышенная экспрессия ИЛ-8 была ассоциирована с вакцинными ответами при многих заболеваниях. Например, более высокие уровни ИЛ-8 были ассоциированы с достижением вакцинного ответа на вакцину против птичьего гриппа [lxxxviii]. Кроме того, ИЛ-8 выступает в качестве молекулярного адьюванта в модели ДНК-вакцинации [lxxxix]. Таким образом, ИЛ-8 может быть использован в качестве иммуностимулятора для повышения иммунной эффективности, например, вакцины против птичьего гриппа. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию ИЛ-8, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины с помощью повышения уровня и/или активности ИЛ-8. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адьюванта вакцины при терапии гриппа. В некоторых вариантах осуществления при применении в качестве адьюванта вакцины композиции по данному изобретению будут вводиться сами по себе, чтобы обеспечить эффект адьюванта

для антигена, который вводили пациенту отдельно. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению вводят перорально, а антиген вводят парентерально.

Композиции по данному изобретению можно применять для усиления иммунного ответа на любой пригодный антиген. Иллюстративные антигены для применения в связи с данным изобретением включают вирусные антигены, такие как вирусные поверхностные белки; бактериальные антигены, такие как белковые и/или сахаридные антигены; грибковые антигены; паразитарные антигены; и опухолевые антигены. Данное изобретение особенно пригодно для вакцины против вируса гриппа, ВИЧ, анкилостомы, вируса гепатита В, вируса простого герпеса, бешенства, респираторно-синцитиального вируса, цитомегаловируса, *Staphylococcus aureus*, хламидиоза, коронавируса SARS, вируса варицелла-зостер, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, вируса Эпштейна-Барра, вируса папилломы человека и т.д. Дополнительные антигены для применения в связи с данным изобретением включают гликопротеиновые и липогликановые антигены, антигены архей, антиген меланомы E (MAGE), карциноэмбриональный антиген (CEA), MUC-1, HER2, сиалил-Tn (STn), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), ген опухоли Вильмса (WT1), CA-125, простатоспецифический антиген (PSA), антигены вируса Эпштейна-Барра, неоантигены, онкопротеины, амилоид-бета, тау-белок, PCSK9 и вещества, вызывающие привыкание, например никотин, алкоголь или опиаты.

Предпочтительные антигены для применения в связи с данным изобретением включают антигены патогенов и опухолевые антигены. Антиген будет вызывать иммунный ответ, специфичный для антигена, который будет эффективен для защиты от заражения патогеном или атаки опухоли. Антигенами могут представлять собой, например, пептиды или полисахариды.

В данном изобретении также представлено применение: (i) водного препарата антигена; и (ii) композиции, содержащей штамм бактерий рода *Megasphaera*, предпочтительно вид *Megasphaera massiliensis*, при получении лекарственного средства для повышения иммунного ответа у пациента.

Иммунный ответ, вызываемый с помощью этих способов и путей применения, как правило, будет включать ответ антител, предпочтительно защитный ответ антител.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм рода *Megasphaera* сконструирован для презентации антигена. Презентация антигена на бактериальном штамме по данному изобретению может сводить к максимуму иммуностимулирующую активность и дополнительно усиливать защитный иммунный ответ, генерируемый против антигена. Кроме того, получение и доставка терапевтических средств, содержащих антиген и бактерии по данному изобретению, могут быть более эффективными и действенными таким образом, чем когда каждое из антигена и композиции, содержащей бактериальный штамм, получают и вводят отдельно. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая

бактериальный штамм рода *Megasphaera*, который презентует антиген, например, на своей клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая бактериальный штамм, который презентует антиген, предназначена для применения в качестве вакцинного антигена. В некоторых вариантах осуществления антиген получают из ВИЧ, анкилостомы, вируса гепатита В, вируса простого герпеса, бешенства, респираторно-синцитиального вируса, цитомегаловируса, *Staphylococcus aureus*, хламидии, коронавируса SARS, вируса варицелла-зостер, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, вируса Эпштейна-Барра или вируса папилломы человека. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой гликопротеиновый антиген, липогликановый антиген, антиген архей, антиген меланомы E (MAGE), карциноэмбриональный антиген (CEA), MUC-1, HER2, сиалил-Tn (STn), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), опухолевый ген Вильмса (WT1), CA-125, простатоспецифический антиген (PSA), антигены вируса Эпштейна-Барра, неоантигены, онкопротеины, бета-амилоид, тау-белок, PCSK9 или вещества, вызывающие привыкание, такие как алкоголь, опиаты и т.п.

В некоторых вариантах осуществления бактерии по данному изобретению экспрессируют один или несколько антигенов. Как правило, антиген экспрессируется рекомбинантно и будет гетерологичен бактериям по данному изобретению. Таким образом, в данном изобретении представлен бактериальный штамм рода *Megasphaera*, который экспрессирует гетерологичный антиген. Антиген может представлять собой часть слитого полипептида, экспрессируемого с одним или несколькими полипептидами, гомологичными бактериям. В некоторых вариантах осуществления бактерии экспрессируют антиген в виде неслитого полипептида. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлена композиция, содержащая клетку бактериального штамма рода *Megasphaera*, при этом клетка экспрессирует гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления композиция предназначена для применения в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлена клетка бактериального штамма рода *Megasphaera*, при этом клетка экспрессирует гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления клетка предназначена для применения в качестве вакцины.

Иллюстративные антигены для применения в связи с данным изобретением 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 антигена для экспрессии в бактериальном штамме рода *Megasphaera* включают гликопротеиновый и липогликановый антигены, антиген архей, антиген меланомы E (MAGE), карциноэмбриональный антиген (CEA), MUC-1, HER2, сиалил-Tn (STn), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), опухолевый ген Вильмса (WT1), CA-125, простатоспецифический антиген (PSA), антигены вируса Эпштейна-Барра, неоантигены,

онкопротеины, бета-амилоид, тау-белок, PCSK9 и вещества, вызывающие привыкание, например, алкоголь, опиаты или т.п.

Данное изобретение также может быть пригодно для усиления ответа на вакцины против неинфекционных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные нарушения, и в этом случае антигеном для применения в связи с данным изобретением может быть бета-амилоид или тау-белок. Другие такие антигены неинфекционных заболеваний включают PCSK9 (для лечения повышенного холестерина).

Данное изобретение также может быть пригодно для усиления вакцинного ответа против веществ, вызывающих привыкание, например, никотина, алкоголя или опиатов.

Виды клеточной терапии

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

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может приводить к повышению экспрессии IL-6. Повышенная экспрессия IL-6 коррелировала с ответом на терапию CD19 CAR-T хронического лимфоцитарного лейкоза. Повышение сывороточного IL-6 было ассоциировано с экспансией CAR-T-клеток, тогда как ингибирование IL-6 было ассоциировано с ингибированием пролиферации CAR-T-клеток [1]. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению повышает экспрессию IL-6, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в клеточной терапии, в частности, в терапии CAR-T-клетками. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в клеточной терапии. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в CAR-T-клеточной терапии. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении хронического лимфоцитарного лейкоза.

Неожиданным образом Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению избирательно снижали процент Treg в популяции PBMC (Фиг. 6C). Было продемонстрировано, что избирательное истощение Treg повышает эффективность цитотоксических лимфоцитов [T_H1]. CAR-T-клетки представляют собой подгруппу цитотоксических лимфоцитов, и поэтому считается, что избирательное истощение Treg-клеток эффективно при терапии CAR-T-клетками. Поскольку было продемонстрировано, что введение композиций по данному изобретению истощают Treg, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в клеточной терапии, в частности, в терапии CAR-T-клетками.

Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в клеточной терапии, в частности, для усиления ответа на клеточную терапию.

Терапия мезинхимальными стволовыми клетками (MSC)

Сообщалось, что терапия мезинхимальными стволовыми клетками (MSC) обладает иммуностимулирующими свойствами. Когда MSC обрабатывают LPS, они активируют провоспалительные цитокины IL-6 и IL-8, что вызывает повышенную пролиферацию B-клеток [T_H2]. Таким образом, поскольку было продемонстрировано, что композиции по

данному изобретению повышают экспрессию IL-6, они могут быть пригодны в комбинации с клеточной терапией MSC.

Терапия трансплантацией стволовых клеток

Сообщалось, что вместо применения недифференцированных стволовых клеток в терапии трансплантацией стволовых клеток может быть эффективным до некоторой степени дифференцировать стволовые клетки до трансплантации. Например, Heng et al. [xciii] сообщали, что кардиомиогенная дифференцировка стволовых клеток может быть эффективной благодаря более высокой эффективности приживления, усиленной регенерации миоцитов и повышенному восстановлению сердечной функции. Поскольку введение композиций по данному изобретению инициировало дифференцировку нейронов в недифференцированных клетках нейробластомы, композиции по данному изобретению могут быть пригодны для дифференцировки стволовых клеток в терапии трансплантацией стволовых клеток.

Старение иммунной системы

Примеры также демонстрируют, что введение композиций по данному изобретению может избирательно истощать Treg и повышать количество В-клеток (Фиг. 6С и Фиг. 6F). Fulop et al. [xciv] определили, что повышение количества Treg-клеток и снижение количества В-клеток ассоциированы со старением адаптивной иммунной системы. Таким образом, композиции по данному изобретению можно применять для предупреждения или задержки старения иммунной системы. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в предупреждении старения иммунной системы. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в задержке старения иммунной системы, характеризующегося повышением количества Treg-клеток. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в задержке старения иммунной системы, характеризующегося снижением количества В-клеток. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в задержке старения иммунной системы, характеризующегося повышением количества Treg-клеток и снижением количества В-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в задержке старения иммунной системы с помощью снижения количества Treg-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в замедлении старения иммунной системы с помощью повышения количества В-клеток. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в задержке старения иммунной системы с помощью снижения количества Treg-клеток и повышения количества В-клеток. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении заболеваний, вызванных старением иммунной системы. В одном варианте осуществления композиции по данному

изобретению предназначены для применения в лечении заболеваний, связанных со старением, с помощью задержки и/или предупреждения старения иммунной системы.

Кроме того, было высказано предположение, что адъюванты вакцин могут бороться со старением иммунной системы [xcv]. Поскольку композиции по данному изобретению являются подходящими для применения в качестве адъюванта вакцины, композиции по данному изобретению могут быть пригодны для предупреждения или замедления старения иммунной системы. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в задержке и/или предупреждении старения иммунной системы в качестве адъюванта вакцины. В другом варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины, при этом композиции задерживают и/или предупреждают старение иммунной системы.

Заболевания, которые ассоциированы со старением иммунной системы, включают сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, рак, сахарный диабет 2 типа [xcvi] и аутоиммунные нарушения [xcvii]. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении сердечно-сосудистого заболевания с помощью задержки и/или предупреждения старения иммунной системы. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении нейродегенеративных заболеваний. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона, с помощью задержки и/или предупреждения старения иммунной системы. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рака с помощью задержки и/или предупреждения старения иммунной системы. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении сахарного диабета 2 типа. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении сахарного диабета 2 типа с помощью задержки и/или предупреждения старения иммунной системы. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении аутоиммунных нарушений. В одном варианте осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении аутоиммунных нарушений с помощью задержки и/или предупреждения старения иммунной системы.

Пути введения

Предпочтительно композиции по данному изобретению предназначены для введения в желудочно-кишечный тракт с целью обеспечения доставки и/или частичной или полной колонизации кишечника бактериальным штаммом по данному изобретению.

Как правило, композиции по данному изобретению вводят перорально, однако они могут быть введены ректально, интраназально или с помощью буккального или сублингвального путей.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть введены в виде пены, крема или геля.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть введены в виде суппозитория, такого как ректальный суппозиторий, например, в форме масла какао (какао-масла), синтетического твердого жира (например, супокир, витепсол), глицерожелатина, полиэтиленгликоля или мыльной глицериновой композиции.

В определенных вариантах осуществления композицию по данному изобретению вводят в желудочно-кишечный тракт с помощью зонда, такого как назогастральный зонд, орогастральный зонд, желудочный зонд, еюностомический зонд (J-зонд), чрескожной эндоскопической гастростомии (PEG) или порта, такого как порт-система, имплантируемая в области грудной клетки, которая обеспечивает доступ к желудку, тощей кишке, а также другие подходящие порты доступа.

Композиции по данному изобретению могут быть введены однократно или они могут быть введены последовательно как часть схемы лечения. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для ежедневного введения.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения лечение в соответствии с данным изобретением сопровождается оценкой микробиоты кишечника пациента. Лечение можно повторять, если доставки и/или частичная или полная колонизация штаммом по данному изобретению не достигаются, в результате чего эффективность не наблюдается, или лечение может быть прекращено, если доставка и/или частичная или полная колонизация являются успешными и эффективность наблюдается.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению может быть введена беременному животному, например, млекопитающему, такому как человек, с целью снижения вероятности рака, развивающегося у его ребенка *in utero* и/или после рождения.

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

Композиции по данному изобретению могут быть введены пациенту, у которого был диагностирован рак или который был идентифицирован как имеющий риск развития

рака. Например, пациент может иметь пониженную или отсутствующую колонизацию *Megasphaera*, и, в частности, *Megasphaera massiliensis*.

Композиции по данному изобретению, могут быть введены в качестве продукта питания, такого как пищевая добавка.

Как правило, композиции по данному изобретению предназначены для лечения людей, хотя они могут быть использованы для лечения животных, в том числе моногастрических млекопитающих, таких как домашняя птица, свиньи, кошки, собаки, лошади или кролики. Композиции по данному изобретению могут быть пригодны для усиления роста и характеристик животных. При введении животным может быть использован желудочный зонд.

Композиции

Как правило, композиция по данному изобретению содержит бактерии. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения композицию составляют в лиофилизированной форме. Например, композиция по данному изобретению может содержать гранулы или желатиновые капсулы, например, твердые желатиновые капсулы, содержащие бактериальный штамм по данному изобретению.

Предпочтительно композиция по данному изобретению содержит лиофилизированные бактерии. Лиофилизация бактерий представляет собой общепризнанную процедуру, а соответствующее руководство доступно, например, в литературных источниках [xcviii, xcix,c].

В качестве альтернативы композиция по данному изобретению может содержать живую, активную бактериальную культуру.

В предпочтительных вариантах осуществления композиция по данному изобретению является инкапсулированной с целью обеспечения доставки бактериального штамма в кишечник. Инкапсулирование приводит к защите композиции от распада до введения в целевой участок, с помощью, например, разрыва в результате химических или физических стимулов, например, давления, ферментативной активности или физической дезинтеграции, которые могут быть активированы изменениями pH. Может быть использован любой подходящий способ инкапсулирования. Иллюстративные методики инкапсулирования включают в себя захват в пористый матрикс, прикрепление или адсорбцию на твердых поверхностях носителя, самоагрегацию в результате флокуляции или с помощью сшивающих агентов, а также механического сдерживания за микропористой мембраной или микрокапсулой. Руководство по инкапсулированию, которое может быть пригодным для получения композиций по данному изобретению, доступно, например, в литературных источниках [ci] и [cii].

Указанная композиция может быть введена перорально и может находиться в форме таблетки, капсулы или порошка. Инкапсулированные продукты являются предпочтительными, поскольку *Megasphaera* представляют собой анаэробов. Другие ингредиенты (такие как, например, витамин C) могут быть включены в качестве поглотителей кислорода и пребиотических субстратов с целью улучшения доставки и/или

частичной или полной колонизации и выживания *in vivo*. В качестве альтернативы пробиотическая композиция по данному изобретению может быть введена перорально в качестве продукта питания или питательного продукта, такого как сброженный молочный продукт на основе молока или сыворотки или в виде фармацевтического продукта.

Указанная композиция может быть составлена в виде пробиотика.

Композиция по данному изобретению содержит терапевтически эффективное количество бактериального штамма по данному изобретению. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма является достаточным для того, чтобы оказать положительный эффект при введении пациенту. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма может быть достаточным для того, чтобы привести к доставке и/или частичной или полной колонизации кишечника пациента.

Подходящая суточная доза бактерий, например, для взрослого человека, может составлять от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{11} колониеобразующих единиц (CFU); например, от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^{10} CFU; в другом примере от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 1×10^{10} CFU; в другом примере от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^{11} CFU; в другом примере от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{10} CFU; в другом примере от приблизительно 1×10^8 до приблизительно 1×10^{11} CFU.

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

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена упомянутая выше фармацевтическая композиция, при этом содержание бактериального штамма составляет от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм по отношению к массе композиции.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена указанная выше фармацевтическая композиция, при этом композицию вводят в дозе от 500 до 1000 мг, от 600 до 900 мг, от 700 до 800 мг, от 500 до 750 мг или от 750 до 1000 мг. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена указанная выше фармацевтическая композиция, при этом лиофилизированные бактерии в фармацевтической композиции вводят в дозе от 500 до 1000 мг, от 600 до 900 мг, от 700 до 800 мг, от 500 до 750 мг или от 750 до 1000 мг.

В типичном случае пробиотик, такой как композиция по данному изобретению, необязательно комбинируют, по меньшей мере, с одним подходящим пребиотическим соединением. Пребиотическое соединение обычно представляет собой трудноусваиваемый углевод, такой как олиго- или полисахарид, или сахарный спирт,

который не расщепляется или всасывается в верхнем отделе пищеварительного тракта. Известные пребиотики включают в себя коммерческие продукты, такие как инулин и трансгалактоолигосахариды.

В определенных вариантах осуществления пребиотическая композиция по данному изобретению содержит пребиотическое соединение в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 30% по массе, по отношению к общей массе композиции (например, от 5 до 20% от массы). Углеводы могут быть выбраны из группы, состоящей из: фруктоолигосахаридов (или FOS), короткоцепочечных фруктоолигосахаридов, инулина, изомальтолигосахаридов, пектинов, ксилоолигосахаридов (или XOS), хитозанолигосахаридов (или COS), бета-глюканов, аравийской камеди, модифицированных и устойчивых крахмалов, полидекстрозы, D-тагатозы, волокон из акации, волокон рожкового дерева, овса и цитрусовых. В одном аспекте пребиотики представляют собой короткоцепочечные фруктоолигосахариды (для простоты продемонстрированные в данном документе ниже в виде FOS-с.с); указанные FOS-с.с. представляют собой трудноусваиваемые углеводы, как правило, получаемые в результате превращения свекловичного сахара и содержащие молекулу сахарозы, с которой связаны три молекулы глюкозы.

Композиции по данному изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые наполнители или носители. Примеры таких подходящих наполнителей могут быть найдены в источнике литературы [ciii]. Приемлемые носители или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области и описаны, например, в источнике литературы [civ]. Примеры подходящих носителей включают в себя лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и т.п. Примеры подходящих разбавителей включают в себя этанол, глицерин и воду. Выбор фармацевтического носителя, наполнителя или разбавителя может быть выполнен на основании предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики. Фармацевтические композиции могут содержать в качестве или в качестве дополнения носителя, наполнителя или разбавителя любое (любые) подходящий (подходящие) связывающее (связывающие) вещество (вещества), смазывающее (смазывающие) вещество (вещества), суспендирующий (суспендирующие) агент (агенты), покрывающий (покрывающие) агент (агенты), солюбилизующий (солюбилизующие) агент (агенты). Примеры подходящих связывающих веществ включают в себя крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза, безводная лактоза, свободно сыпучая лактоза, бета-лактоза, кукурузные подсластители, природные и синтетические смолы, такие как аравийская камедь, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза или полиэтиленгликоль. Примеры подходящих смазывающих веществ включают в себя олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т.п. Консерванты, стабилизаторы, красители и даже ароматизаторы могут быть представлены в фармацевтической композиции. Примеры консервантов включают в себя

бензоат натрия, сорбиновую кислоту и сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты. Также могут быть использованы антиоксиданты и суспендирующие агенты.

Композиции по данному изобретению могут быть составлены в виде продукта питания. Например, продукт питания может обеспечивать питательный эффект в дополнение к терапевтическому эффекту по данному изобретению, например, в пищевой добавке. Аналогичным образом, продукт питания может быть составлен с целью усиления вкуса композиции по данному изобретению или с целью создания более привлекательной для потребления композиции в результате большего сходства с распространенным продуктом питания, а не с фармацевтической композицией. В определенных вариантах осуществления композицию по данному изобретению составляют в виде продукта на основе молока. Термин «продукт на основе молока» означает любой жидкий или полужидкий продукт на основе молока или сыворотки, имеющий варьирующее содержание жира. Продукт на основе молока может представлять собой коровье молоко, козье молоко, овечье молоко, обезжиренное молоко, цельное молоко, молоко, воссоединенное с порошковым молоком и сывороткой без какой-либо обработки, или обработанный продукт, такой как йогурт, простокваша, сырный сгусток, кислое молоко, кислое цельное молоко, пахта и другие кисломолочные продукты. Другая важная группа включает в себя молочные напитки, такие как напитки из молочной сыворотки, кисломолочные продукты, сгущенное молоко, молоко для молочные смеси для младенцев или новорожденных; молоко со вкусовыми наполнителями, мороженое; молокосодержащие продукты, такие как конфеты.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат один бактериальный штамм или вид и не содержат никакие другие бактериальные штаммы или виды. Такие композиции могут содержать только незначительные или биологически незначимые количества других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут представлять собой культуру, которая по сути не содержит других видов организмов.

Композиции для применения в соответствии с данным изобретением могут требовать или могут не требовать регистрацию.

В некоторых случаях лиофилизированный бактериальный штамм введением композиции разбавляют. В некоторых случаях разведение происходит с помощью применения разбавителя, описанного в данном документе.

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

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению; и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм присутствует в количестве, достаточном для лечения нарушения, при введении субъекту, нуждающемуся в этом; и при этом нарушение представляет собой рак, такой как нейробластома, рак головного мозга, меланому, рак

предстательной железы, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак печени или рак желудка. В дополнительном варианте осуществления рак представляет собой рак яичников, рак шейки матки, глиобластома, карциному, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому или гематологические злокачественные новообразования.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, опосредованного MAP2. В предпочтительных вариантах осуществления указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак, такой как нейробластома, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак печени или рак желудка. В дополнительном варианте осуществления рак представляет собой рак яичников, рак шейки матки, глиобластома, карциному, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому или гематологические злокачественные новообразования.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, опосредованного ВЗ-тубулином. В предпочтительных вариантах осуществления указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак, такой как нейробластома, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак печени или рак желудка. В дополнительном варианте осуществления рак представляет собой рак яичников, рак шейки матки, глиобластома, карциному, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому или гематологические злокачественные новообразования.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, опосредованного DRD2. В предпочтительных вариантах осуществления указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак, такой как нейробластома, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак печени или рак желудка. В дополнительном варианте осуществления рак представляет собой рак яичников, рак шейки матки, глиобластома, карциному, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому или гематологические злокачественные новообразования.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, опосредованного HDAC. В предпочтительных вариантах осуществления указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак, такой как нейробластома, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак печени или рак желудка, рак яичников, рак шейки матки, глиобластома, карцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфома или злокачественные гематологические заболевания.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, опосредованного IL-1 β , TNF- α , MIP-3 α , IL-23 или IL-6. В предпочтительном варианте осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, опосредованного TNF- α . В предпочтительном варианте осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, опосредованного IL-8. В предпочтительном варианте осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, опосредованного CD11b. В предпочтительных вариантах осуществления указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак, такой как нейробластома, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак печени или рак желудка. В дополнительном варианте осуществления указанный рак представляет собой рак яичников, рак шейки матки, глиобластому, карциному, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому или гематологические злокачественные новообразования.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель;

при этом бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, опосредованного Casp3. В предпочтительных вариантах осуществления указанное заболевание или патологическое состояние представляет собой рак, такой как нейробластома, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак молочной железы, рак легких, рак печени или рак желудка. В дополнительном варианте осуществления указанный рак представляет собой рак яичников, рак шейки матки, глиобластому, карциному, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому или гематологические злокачественные новообразования.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена упомянутая выше фармацевтическая композиция, при этом содержание бактериального штамма составляет от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм по отношению к массе композиции.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена упомянутая выше фармацевтическая композиция, при этом указанную композицию вводят в дозе 1 г, 3 г, 5 г или 10 г.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена упомянутая выше фармацевтическая композиция, при этом указанную композицию вводят с помощью способа, выбранного из группы, состоящей из перорального, ректального, подкожного, назального, буккального и сублингвального введения.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая носитель, выбранный из группы, состоящей из лактозы, крахмала, глюкоза, метилцеллюлозы, стеарата магния, маннита и сорбита.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая разбавитель, выбранный из группы, состоящей из этанола, глицерина и воды.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена упомянутая выше фармацевтическая композиция, содержащая наполнитель, выбранный из группы, состоящей из крахмала, желатина, глюкозы, безводной лактозы, свободно сыпучей лактозы, бета-лактозы, кукурузного подсластителя, аравийской камеди, трагаканта, альгината натрия, карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленгликоля, олеата натрия, стеарата магния, бензоата натрия, ацетата натрия и хлорида натрия.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена фармацевтическая композиция, дополнительно содержащая, по меньшей мере, одно из консерванта, антиоксиданта и стабилизатора.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая консервант, выбранный из группы, состоящей из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров п-гидроксибензойной кислоты.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена указанная выше фармацевтическая композиция, при этом бактериальный штамм является лиофилизированным.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении представлена упомянутая выше фармацевтическая композиция, при этом указанная композиция хранится в закупоренном контейнере при приблизительно 4°C или приблизительно 25°C и контейнер помещен в атмосферу, имеющую 50% относительную влажность, по меньшей мере, 80% бактериального штамма, измеренного в колониеобразующих единицах, сохраняется после периода, по меньшей мере, приблизительно: 1 месяца, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 1,5 лет, 2 лет, 2,5 лет или 3 лет.

Способы культивирования

Бактериальные штаммы для применения в данном изобретении могут быть культивированы с помощью стандартных микробиологических методик, как подробно описано, например, в литературных источниках [cv, cvi, cvii].

Твердая или жидкая среда, используемые для культивирования, могут представлять собой агар YCFA или среду YCFA. Среда YCFA содержит (на 100 мл, примерные значения): казитон (1,0 г), дрожжевой экстракт (0,25 г), NaHCO₃ (0,4 г), цистеин (0,1 г), K₂HPO₄ (0,045 г), KH₂PO₄ (0,045 г), NaCl (0,09 г), (NH₄)₂SO₄ (0,09 г), MgSO₄ · 7H₂O (0,009 г), CaCl₂ (0,009 г), резарузин (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).

Бактериальные штаммы для применения в вакцинных композициях

Авторы данного изобретения обнаружили, что бактериальные штаммы по данному изобретению пригодны для лечения или предупреждения заболеваний или патологических состояний, ассоциированных со сниженной иммунной активностью. По-видимому, это является результатом того влияния, которое бактериальные штаммы по данному изобретению оказывают на иммунную систему хозяина. Таким образом, композиции по данному изобретению могут также быть пригодны для предупреждения заболеваний или патологических состояний, таких как рак, введении в качестве вакцинных композиций. В определенных вариантах осуществления бактериальные штаммы по данному изобретению могут быть убитыми, инактивированными или аттенуированными. В определенных таких вариантах осуществления композиции могут содержать адъювант вакцины. В определенных вариантах осуществления указанные композиции предназначены для введения с помощью инъекции, например, с помощью подкожной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* снижает уровни муравьиной кислоты. Муравьиная кислота представляет собой конъюгированное основание формиата, которое участвовало в нарушении митохондриального транспорта электронов и выработки энергии в результате ингибирования активности цитохромоксидазы, концевой акцептора электронов в цепи

переноса электронов. Соответственно, снижение содержания муравьиной кислоты и, следовательно, формиата должно снижать частоту клеточной смерти с помощью ингибирования цитохромоксидазой накопления активных форм кислорода. Соответственно, в определенных вариантах осуществления бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* стимулирует иммунную систему при лечении заболевания с помощью снижения уровней муравьиной кислоты.

Общие указания

Практическое применение указанного изобретения будет осуществляться, если не указано иное, с помощью стандартных способов химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики в полном объеме объясняются в литературе. См., например, литературные источники [cviii] и [cix,] и др.

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

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

Выражение «по сути» не исключает «полностью», например, композиция, которая «по сути не содержит» Y, может полностью не содержать Y. При необходимости выражение «по сути» может быть опущено из определения по данному изобретению.

Ссылки на процент идентичности последовательности между двумя нуклеотидными последовательностями означает, что при выравнивании указанный процент нуклеотидов является тем же самым при сравнении с указанными двумя последовательностями. Указанное выравнивание и указанный процент гомологии или идентичности последовательности могут быть определены с помощью компьютерных программ, известных в данной области техники, например, программ, описанных в разделе 7.7.18 источника литературы [cxvi]. Предпочтительное выравнивание определяют с помощью алгоритма поиска гомологии Smith-Waterman с использованием поиска аффинных гэпов, при этом штраф за открытие гэпа составляет 12 и штраф за продление гэпа составляет 2, матрица BLOSUM составляет 62. Алгоритм поиска Smith-Waterman раскрыт в литературном источнике [cxvii].

Если явно не указано, то процесс или способ, содержащий несколько стадий, могут включать дополнительные стадии в начале или в конце способа, или могут включать дополнительные промежуточные стадии. Кроме того, этапы можно комбинирования, опускать или осуществлять в альтернативном порядке, при необходимости.

Различные варианты осуществления описаны в данном документе. Необходимо понимать, что характеристики, определенные в каждом варианте осуществления, могут быть комбинированы с другими определенными характеристиками, для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. В частности, варианты осуществления, выделенные в данном документе как подходящие, типичные или предпочтительные,

могут быть комбинированы друг с другом (кроме случаев, когда они являются взаимоисключающими).

ПУТИ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1 - MRx0029 индуцирует зрелый фенотип в клетках SH-SY5Y

Введение

Авторы данного изобретения пытались определить влияние MRx0029 на экспрессию маркеров нейродифференцировки, β 3-тубулина и MAP2 в клетках нейробластомы. β 3-Тубулин представляет собой маркер преддифференцировки нейронов, а MAP2 представляет собой маркер зрелых (дифференцированных) нейронов.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Клеточная линия

Клетки SH-SY5Y

Способ

qPCR

SH-SY5Y высевали в 10 см чашки Петри с плотностью 2×10^6 клеток. Через 24 ч клетки обрабатывали средой для дифференцировки (среда для дифференцировки, содержащая 1% FBS без RA) с 10% бактериальными супернатантами или YCFA+, 10 мкМ RA, 200 мкМ гексановой кислоты или 200 мкМ вальпроевой кислоты в течение 17 часов. Затем были получены иллюстративные изображения с помощью фазово-контрастного микроскопа EVOS XL при увеличении 40X/0,65. Клетки собирали и суммарную РНК выделяли в соответствии с протоколом для мининабора RNeasy (Qiagen). кДНК получали с помощью высокоэффективного набора для обратной транскрипции кДНК (Applied Biosystems). Экспрессию генов измеряли с помощью qPCR. GAPDH использовали в качестве внутреннего контроля. Кратность изменения рассчитывали в соответствии со способом $2^{(-\Delta\Delta ct)}$.

Иммуномечение и визуализация клеток

Клетки высевали на 8-луночные предметные стекла (Marienfeld Laboratory Glassware) по 5×10^4 клеток/луночка в течение ночи и обрабатывали 10% бактериальным супернатантом в течение 24 часов. Для дифференцировки клетки обрабатывали 10 нМ RA за 5 дней до обработки супернатантом, не содержащих бактериальных клеток, в течение 24 ч.

После этого клетки фиксировали 4% параформальдегидом в PBS в течение 20 минут при комнатной температуре (КТ). Фиксированные клетки промывали PBS и пермеабелизовали 1% Triton X-100 в PBS в течение 10 минут. После промывания PBS препараты инкубировали блокирующим буфером (4% BSA/PBS) в течение 1 ч при КТ до добавления анти-MAP2 антитела или β 3-тубулина (sc-74421 и sc-80005 соответственно, Santa Cruz Biotechnology Inc), разведенного в 1% BSA/PBS в течение 12 ч при 4 °C. Затем их промывали дважды PBS, после этого инкубировали с конъюгированным с Alexa Flour 488 антителом к мышинному антителу (Molecular Probes Inc) и конъюгированным с Alexa

Flour 594 фаллоидином (ab176757, Abcam) в течение 1 ч при КТ. После промывания 3X PBS препараты окрашивали DAPI и заключали с Vectashield® (Vector Laboratories). Препараты исследовали с помощью микроскопа Axioskop 50 (Zeiss), оснащенного объективом 63x/1,2 W Korr и наборами фильтров, подходящих для детекции используемых флуорохромов. Выставленное вручную время воздействия в случае цифрового получения изображений, иммуномеченных MAP-2, поддерживали постоянным, обеспечивая сравнение между различными лунками и видами обработки. Время воздействия фаллоидина (F-актина) и DAPI варьировало с целью соответствия полю зрения. Рандомизированные поля зрения получали с помощью фотоаппарата QImaging, контролируемого программным обеспечением Image Pro Plus. Изображения сохраняли в виде файлов TIFF и открывали в Adobe Photoshop CC 2015.1.2. Изображения с использованием MAP-2, DAPI и фаллоидина затем накладывали и сливали. Иллюстративные изображения выбирали для иллюстрации различий в количестве и положении исследуемых белков.

Иммуноблоттинг

Клетки SH-SY5Y культивировали в указанных условиях, описанных выше, обрабатывали MRx0029 в течение 24 часов и затем лизировали в буфере RIPA, содержащем коктейль из ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics, Великобритания). Концентрацию белка оценивали с помощью набора для анализа BCA (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс), разделяли с помощью SDS-PAGE и переносили на мембрану PVDF. Затем мембраны блокировали 5% обезжиренным сухим молоком или 5% BSA и инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами (соответственно MAP2 и β 3-тубулином). Затем блоты инкубировали с соответствующим конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) вторичным антителом, а белки выявляли с помощью набора для хемилюминесцентной детекции (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс). Как и в случае MAP2, так и в случае β 3-тубулина, β -актин выступал в качестве контроля с целью наблюдения вариабельности нагружения белка в образцах.

Результаты

MRx0029 индуцирует экспрессию β 3-тубулина в недифференцированных клетках нейробластомы SH-SY5Y. На Фиг. 1 изображено, что обработка MRx0029 повышала экспрессию β 3-тубулина по сравнению с необработанными клетками SH-SY5Y.

MRx0029 индуцирует экспрессию MAP2 в недифференцированных клетках нейробластомы SH-SY5Y. На Фиг. 2 изображено, что обработка MRx0029 значительно повышала экспрессию MAP2 по сравнению с необработанными клетками SH-SY5Y.

Обсуждение

Результаты демонстрируют, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию для стимуляции дифференцировки, в частности, дифференцировки нейронов. Кроме того, результаты демонстрируют, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию при лечении рака головного мозга, в частности, нейробластомы, и меланомы, в частности, метастатической меланомы.

Пример 2 - MRx0029 снижает экспрессию DRD2 в клетках SH-SY5Y***Введение***

Авторы данного изобретения пытались определить влияние MRx0029 на экспрессию DRD2 в клетках нейробластомы.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Клеточная линия

Клетки SH-SY5Y

Способ

Авторы данного изобретения измеряли изменение экспрессии DRD2 в клетках нейробластомы с помощью того же способа, что описан в Примере 1.

Результаты

MRx0029 снижает экспрессию DRD2 в клетках нейробластомы SH-SY5Y. На Фиг. 3 изображено, что обработка MRx0029 значительно снижала экспрессию DRD2 по сравнению с необработанными клетками SH-SY5Y.

Обсуждение

Это демонстрирует, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию в лечении рака.

Пример 3 - MRx0029 индуцирует активацию каспазы 3 в клетках SH-SY5Y***Введение***

Авторы данного изобретения пытались определить влияние MRx0029 на экспрессию каспазы 3 (Casp3) в клетках нейробластомы.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Клеточная линия

Клетки SH-SY5Y

Способ

Авторы данного изобретения измеряли изменение экспрессии Casp3 в клетках нейробластомы.

Результаты

MRx0029 индуцирует активацию Casp3 в недифференцированных клетках нейробластомы SH-SY5Y. На Фиг. 4 изображено, что обработка MRx0029 повышала экспрессию Casp3 по сравнению с необработанными клетками SH-SY5Y. В частности, на Фиг. 4 продемонстрировано, что введение MRx0029 повышало экспрессию Casp3 в три раза по сравнению с контролем.

Обсуждение

В недифференцированных клетках SH-SY5Y повышение экспрессии гена Casp3 с помощью MRx0029 могло быть связано как с дифференцировкой клеток, так и с индукцией запрограммированной клеточной смерти, такой как апоптоз.

Каспаза 3 представляет собой исполнительную каспазу и, таким образом, ассоциирована с апоптозом. Нарушение регуляции апоптоза было связано с различными видами рака, и поэтому результаты демонстрируют, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию в лечении рака.

Было продемонстрировано, что каспазы играют роль в клеточной дифференцировке. Таким образом, повышение экспрессии Casp3 после обработки MRx0029 демонстрирует, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию для повышения дифференцировки клеток.

Пример 4 - анализ МТТ в клетках SH-SY5Y

Введение

Авторы данного изобретения пытались определить влияние MRx0029 на жизнеспособность клеток нейробластомы с помощью анализа МТТ, который представляет собой широко распространенный способ оценки метаболической активности клеток, которая отражается в количестве жизнеспособных клеток.

Бактериальные штаммы

Megasphaera massiliensis MRx0029

Клеточная линия

Клетки SH-SY5Y

Способ

Анализ МТТ

Клетки SH-SY5Y высевали с плотностью посева 10000 клеток/лунка, через 24 часа клетки обрабатывали 100 мкл среды для выращивания с 1% FBS с различными концентрациями (выраженными в виде процента об./об.) супернатантов, не содержащих бактериальных клеток, из культур стационарной фазы в течение 22 ч. После этого добавляли 10 мкл раствора МТТ и клетки инкубировали в инкубаторе с CO₂ в течение 4 ч, в конце этого времени в каждую лунку добавляли 100 мкл изопропанола с 0,04% HCl. Поглощение измеряли при длине волны 560 нм и референтной длине волны 655 нм. Набор для анализа МТТ приобретали в Merck Millipore (№ в каталоге ST01).

Результаты

MRx0029 продемонстрировал дозозависимые эффекты на жизнеспособность клеток нейробластомы, при этом 10% MRx0029 снижал жизнеспособность на примерно 70% по сравнению с контролем. Обработка 10% супернатантом MRx0029, не содержащим бактериальных клеток, продемонстрировала снижение жизнеспособности клеток. Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 5.

Обсуждение

Это демонстрирует, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию в повышении клеточной смерти, и, таким образом, MRx0029 может представлять собой эффективную композицию для применения в лечении рака.

Пример 5 - Базовое фенотипирование клеток РВМС от здоровых доноров

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Способ

Обработка РВМС

Замороженные РВМС здоровых людей приобретали в Stem Cells Technologies (Кембридж, Великобритания). Вкратце, клетки размораживали и оставляли в течение ночи в полной среде для роста (RPMI 1640 с 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 55 мкМ 2-меркаптоэтанол и 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Для эксперимента клетки высевали с плотностью 750000 клеток/лунку в 48-луночные планшеты и обрабатывали в полной среде для роста с 10% супернатантами бактерий в присутствии или в отсутствие 1 нг/мл LPS. Среду для культивирования клеток добавляли в необработанные лунки. Клетки оставляли в покое на 72 ч, после чего собирали супернатанты, не содержащие клеток, и центрифугировали в течение 3 минут при 10000 g при 4 °С. Образцы хранили при -80°С для анализа цитокинов.

Иммунофенотипирование

$1,5 \times 10^6$ клеток на образец окрашивали фиксирующим красителем для определения жизнеспособности (Miltenyi) для различения живых и мертвых клеток в течение 10 мин. при КТ. После этого клетки окрашивали смесью антител, перечисленных ниже (Miltenyi), для базового иммунофенотипирования (CD3/CD4/CD8/CD25/CD127 и CD19), и инкубировали в течение 10 мин. при КТ.

Проводили эксперименты для измерения процента следующих клеточных популяций:

CD4⁺ CD3⁺ клетки (маркеры CD4 Т-клеток-хелперов)

CD4⁺ CD25⁺ клетки (маркеры CD4⁺ активированных клеток)

CD25⁺⁺ CD17⁻ клетки из популяции CD4⁺ клеток (маркеры Treg-клеток)

CD8⁺ CD3⁺ клетки (маркеры цитотоксических Т-клеток)

CD25⁺ CD8⁺ клетки (маркеры CD8⁺ активированных клеток)

CD19⁺ CD3⁻ клетки (маркеры В-клеток).

Определяли соотношение CD8⁺/Treg и соотношение активированных CD8/Treg.

Антитела

Aria	AB-флуорохром
V2	CD3-VioBlue
APC Cy7	CD4-APC-Vio 770
PE-Cy7	CD8-PE-Vio 770
PE	CD25-PE
APC	CD127-APC
FITC	CD19-VioBright 515

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 6.

Наиболее неожиданным результатом является влияние обработки MRx0029 на процент CD25⁺⁺ CD17⁻ клеток, которые представляют собой Treg-клетки (см. Фиг. 6C). MRx0029 выборочно снижал процент Treg в популяции PBMC. Обработка MRx0029 существенно не изменяла процент CD4 Т-клеток-хелперов, CD4⁺ активированных клеток, цитотоксических Т-клеток, CD8⁺ активированных клеток или В-клеток.

Обработка MRx0029 повышала соотношение CD8⁺/Treg и соотношение активированных клеток CD8/Treg по сравнению с необработанными клетками (см. Фиг. 6G и Фиг. 6H).

Обсуждение

Наблюдение того, что обработка MRx0029 избирательно снижала процент Treg, тем самым повышая соотношения CD8/Treg и активированных CD8/Treg, является неожиданным, поскольку MRx0029 продуцирует бутират, а продуцирование бутирата было связано с увеличением популяции Treg.

Базовый профиль иммунофенотипирования MRx0029 в PBMC от здоровых доноров предполагает, что обработка MRx0029 снижает относительный процент Treg в популяции лимфоцитов, что отражается в повышении соотношения CD8/Treg-клеток.

Это демонстрирует, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию для стимуляции иммунного ответа и снижения иммунной супрессии с помощью Treg. Результаты также демонстрируют, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию для применения в лечении рака.

Пример 6 - Анализ цитокинов PBMC от здоровых доноров

Введение

Авторы данного изобретения пытались дополнительно проанализировать PBMC после инкубации с MRx0029. Авторы данного изобретения анализировали экспрессию определенных цитокинов из PBMC после обработки MRx0029, в том числе провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β и IL-23.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Способ

Обработка РВМС

РВМС обрабатывали, как описано в Примере 5.

Количественная оценка цитокинов

Количественную оценку цитокинов проводили с использованием мультиплексного иммунологического анализа ProcartaPlex в соответствии с рекомендациями производителя (Thermo Fischer Scientific). Вкратце, 50 мкл супернатантов кокультуры, не содержащих клеток, использовали для количественной оценки цитокинов с использованием системы MAGPIX® MILLIPLEX® (Merck) с программным обеспечением xPONENT (Luminex, Остин, Техас, США). Данные анализировали с помощью аналитического программного обеспечения MILLIPLEX® (Merck) с использованием 5-параметрической логистической кривой и вычитания фоновых значений для преобразования средней интенсивности флуоресценции в значения пг/мл.

Результаты

Результаты анализа цитокинов MRx0029 в культуре РВМС от здоровых доноров продемонстрировали иммуностимулирующий профиль для MRx0029. В частности, обработка MRx0029 повышала экспрессию TNF- α , IL-1 β и IL-23.

Результаты также демонстрируют, что обработка MRx0029 повышала экспрессию MIP-3 α , IL-6 и IL-10. Уровни экспрессии MCP-1, CXCL9 и GM-CSF были аналогичны контролям.

Обсуждение

Это демонстрирует, что MRx0029 обладает иммуностимулирующими свойствами и может представлять собой эффективную композицию для иммуностимуляции. Результаты также демонстрируют, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию в лечении рака.

Пример 7 - Проточно-цитометрический анализ различных клеточных популяций

Введение

Авторы данного изобретения пытались дополнительно проанализировать РВМС после инкубации с MRx0029. Проточно-цитометрический анализ применяли для определения процентов CD4 клеток (CD4+ CD3+), Treg (CD25++ CD127-) CD8 клеток (CD8+ CD3+) и В-клеток (CD19+ CD3-).

Способ

Обработка РВМС

РВМС обрабатывали, как описано в Примере 5.

Проточно-цитометрический анализ различных клеточных популяций

$1,5 \times 10^6$ клеток на образец окрашивали фиксирующим красителем для определения жизнеспособности (Miltenyi) для различения живых и мертвых клеток в течение 10 мин. при КТ. После этого клетки окрашивали смесью антител, перечисленных ниже (Miltenyi),

для базового иммунофенотипирования (CD3/CD4/CD8/CD25/CD127 и CD19), и инкубировали в течение 10 мин. при КТ. Затем клетки промывали и ресуспендировали в PBS и незамедлительно анализировали с использованием FACS Aria II, оснащенного синим (488 нм), красным (633 нм) и фиолетовым (405 нм) лазерами. FMO включали во все эксперименты. Для анализа использовали программу FlowJo версии 10.4.2 (FlowJo, LLC).

Результаты

Результаты экспериментов проточной цитометрии продемонстрированы на Фиг. 8.

На Фиг. 8А продемонстрировано, что 0,73% PBMC представляли собой Treg (CD25++ CD127-).

Обсуждение

Результаты демонстрируют, что MRx0029 может быть пригодным для снижения Treg. Кроме того, результаты демонстрируют, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию для стимуляции иммунного ответа и снижения иммунной супрессии с помощью Treg. Результаты также демонстрируют, что MRx0029 может представлять собой эффективную композицию для применения в лечении рака.

Пример 8 - MRx0029 повышает секрецию IL-8 в клетках MG U373

Введение

Авторы данного изобретения пытались определить влияние MRx0029 на секрецию IL-8 в клетках нейробластомы. Клетки глиобластомы (астроцитомы) человека обрабатывали композициями, содержащими MRx0029 в комбинации с LPS, с целью наблюдения их способности модулировать уровни IL-8. IL-8 представляет собой провоспалительный цитокин, секретируемый преимущественно макрофагами, с иммуностимулирующими эффектами.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Клеточная линия

MG U373 представляет собой глиобластомы (астроцитому) человека, происходящую из злокачественной опухоли, а клетки приобретали в Sigma-Aldrich (№ в кат. 08061901-1VL). Клетки глиобластомы (астроцитомы) человека MG U373 выращивали в MEM (Sigma Aldrich, № в кат. M-2279) с добавлением 10% FBS, 1% Pen Strep, 4 mM L-Glut, 1X раствора MEM заменимых аминокислот и 1X пирувата натрия.

Способ

После выращивания клетки MG U373 высевали в 24-луночный планшет по 100000 клеток/лунка. Клетки обрабатывали только LPS (1 мкг/мл) или 10% бактериальным супернатантом из MRx0029 в течение 24 ч. LPS представляет собой известный стимулятор провоспалительных цитокинов, таких как IL-8. После этого супернатанты, не содержащие клеток, центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин. при 4°C. IL-8 измеряли с помощью набора для ELISA IL-8 человека от RnDtech (№ в кат. 900-K18) в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 9. Обработка клеток бактериальными штаммами приводила к повышению секреции IL-8 независимо от наличия LPS.

Обсуждение

Результаты демонстрируют, что MRx0029 может быть пригодным для повышения секреции IL-8. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболевания, в частности, заболеваний, характеризующихся сниженной активацией иммунной системы, и заболеваний, излечимых с помощью повышенного иммунного ответа.

Пример 9 - MRx0029 снижает уровни активности гистондеацетилазы в клетках HT-29

Введение

Изучали способность композиций, содержащих MRx0029, изменять активность гистондеацетилазы. HDACi, как было продемонстрировано, вызывают остановку роста, дифференцировку, апоптоз, снижение ангиогенеза и модуляцию иммунного ответа в различных линиях раковых клеток.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Клеточная линия

Использовали клеточную линию HT-29, поскольку присутствовала гистондеацетилаза.

Способ

Не содержащие клеток супернатанты бактериальных культур в стационарной фазе выделяли с помощью центрифугировали и фильтровали на 0,22 мкм фильтре. Клетки HT-29 использовали через 3 дня после наступления конfluence и использовали в сниженных количествах в 1 мл DTS за 24 часа до начала эксперимента. Клетки HT-29 подвергали воздействию 10% не содержащего клеток супернатанта, разведенного в DTS, и оставляли для инкубации в течение 48 часов. Затем белки нуклеазы экстрагировали с помощью набора для экстракции нуклеаз Sigma Aldrich и образцы мгновенно замораживали до измерения активности HDAC. Активность для измерения активности HDAC оценивали флуорометрически с помощью набора Sigma Aldrich (Великобритания).

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 10. На Фиг. 10 продемонстрировано, что MRx0029 способен приводить к снижению уровней активности гистондеацетилазы.

Обсуждение

Результаты демонстрируют, что MRx0029 является перспективным кандидатом для применения в лечении или предупреждении заболеваний, характеризующихся эпигенетическими абберациями, с помощью ингибирования активности HDAC. Рак представляет собой заболевание, характеризующееся эпигенетическими абберациями.

Кроме того, ингибиторы HDAC (HDACi) представляют собой новый класс перспективных противораковых лекарственных препаратов, которые, как было продемонстрировано, вызывают остановку роста, дифференцировку, апоптоз, снижение ангиогенеза и модуляцию иммунного ответа в различных линиях раковых клеток. Таким образом, результаты демонстрируют, что композиции по данному изобретению могут быть эффективны в лечении или предупреждении рака.

Пример 10 - Дополнительный анализ механизма ингибирования гистондеацетилазы

Введение

Микробиота кишечника со своим огромным разнообразием и метаболической емкостью представляет собой огромный метаболический резервуар для продуцирования широкого разнообразия молекул со способностью воздействовать на активность HDAC. Таким образом, авторы данного изобретения были заинтересованы определить, какие метаболиты отвечают за ингибирование HDAC и дополнительно выявить механизмы, с помощью которых достигается ингибирование.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Способ

Сбор бактериальных культур и не содержащих клеток супернатантов

Чистые культуры бактерий выращивали в анаэробных условиях в бульоне YCFA+ до тех пор, пока они не достигали своей стационарной фазы роста. Культуры центрифугировали при 5000 x g в течение 5 минут и супернатант, не содержащий клеток (CFS), фильтровали с помощью 0,2 мкм фильтра (Millipore, Великобритания). 1 мл аликвот CFS до использования хранили при -80 °C. Бутират натрия, гексановую кислоту и валериановую кислоту получали от Sigma Aldrich (UK) и суспензии готовили в бульоне YCFA+.

Количественная оценка SCFA и MCFA бактериальных супернатантов

Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) и среднецепочечные жирные кислоты (MCFA) из бактериальных супернатантов анализировали и количественно оценивали с помощью MS Omics APS следующим образом. Образцы подкисляли с помощью хлористоводородной кислоты и добавляли меченые дейтерием внутренние стандарты. Все образцы анализировали в случайном порядке. Анализ выполняли с помощью высокополярной колонки (колонка Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм), инсталлированной в GC (7890B, Agilent), соединенной с квадрупольным детектором (59977B, Agilent). Систему контролировали с помощью ChemStation (Agilent). Первичные материалы преобразовывали в формат netCDF с помощью Chemstation (Agilent), до того, как данные импортировали и обрабатывали в Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) с использованием программного обеспечения PARADISE, описанного в [].

Анализ специфической активности HDAC

Специфическую ингибирующую активность HDAC анализировали в случае HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 с помощью флуорогенных аналитических наборов для каждого типа HDAC (BPS Bioscience, Калифорния). Анализы проводили в соответствии с инструкциями производителя и анализ каждого образца проводили в трех повторах. Не содержащие клеток супернатанты разбавляли 1 к 10 и подвергали воздействию специфических белков HDAC, предоставляемых в наборе для поддержания соответствия между способами.

Результаты

Метаболиты комменсальных микроорганизмов, ингибирующие гистондеацетилазу, представляют собой бутират и валериановую кислоту

MRx0029, супернатант которого продемонстрировал ингибирование HDAC как в цельных клетках HT29, так и клеточных лизатах HT29 (см. Фиг. 11А), продуцировал валериановую кислоту и гексановую кислоту в средних концентрациях 5,08 мМ и 1,60 мМ соответственно (Фиг. 11В).

Для исследования того, какие метаболиты отвечали за индуцированном штаммом ингибирование HDAC, различные концентрации гексановой кислоты, валериановой кислоты и бутирата натрия измеряли в случае ингибирования их HDAC в отношении цельных клеток HT-29 и клеточного лизата HT-29. Результаты на Фиг. 11С демонстрирует значимое ($P < 0,05$) ингибирование активности HDAC с помощью бутирата натрия в цельных клетках, а также клеточном лизате, в то время как гексановая кислота не демонстрировала значимой ингибирующей активности. Валериановая кислота также ингибировала активность HDAC в цельных клетках, а также в клеточном лизате (* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$)).

Высокоэффективные общие ингибиторы исследованных HDAC целенаправленно воздействуют на HDAC класса I.

Исследовали специфический профиль ингибирования HDAC исследуемого бактериального штамма. Анализы специфического ингибирования HDAC (BPS Bioscience, Калифорния) выполняли в случае HDAC класса I и класса II. Способность бактериального штамма приводить к ингибированию ферментов HDAC сравнивали с бутиратом, гексановой и валериановой кислотой. Результаты демонстрируют, что MRx0029 представляет собой очень высокоэффективный ингибитор ферментов HDAC класса I (HDAC1, 2 и 3). Ингибирование HDAC класса II не было таким значительным (данные не продемонстрированы).

Обсуждение

Штамм с ингибирующей активностью в отношении HDAC продуцировал значительные количества валериановой кислоты и гексановой кислоты, а также значительные количества бутирата натрия (Фиг. 11В). При исследовании в виде чистых соединений валериановая кислота и бутират натрия приводили к значимому ингибированию HDAC ($p < 0,0001$).

Интересным является то, что результаты в случае специфической активности HDAC демонстрируют, что исследуемый штамм представляет собой высокоэффективный

ингибитор HDAC класса I и, в частности, HDAC2 (Фиг. 12 и Фиг. 13). HDAC класса I (HDAC1, 2, 3 и 8) содержатся в ядре и повсеместно экспрессируются в нескольких типах клеток человека. HDAC 1-3 имеют более чем 50% общей гомологии, однако имеют различные структуры и клеточные функции [схix]. Они главным образом участвуют в выживаемости, пролиферации и дифференцировке клеток, и, таким образом, их ингибирование может быть пригодным в ряде заболеваний [схх]; [схxi]; [схxii]; [схxiii]; [схxiv]. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть особенно пригодны для лечения заболеваний, при которых активность HDAC класса I является повышенной. В частности, композиции по данному изобретению могут быть особенно пригодны для лечения различных видов рака, при которых активность HDAC класса I является повышенной. Например, композиции по данному изобретению могут быть особенно пригодны для лечения различных видов рака, при которых активность HDAC2 является повышенной.

Пример 11 - Модулирование функции кишечного барьера и проницаемости кишечника с помощью MRx0029

Введение

Исследовали способность MRx0029 вызывать любое нарушение функции кишечного барьера. Монослой эпителиальных продуцирующих муцин клеток HT29-mtx [] использовали в качестве модели *in vitro* для оценки повреждения кишечного барьера и иммунной стимуляции после обработки MRx0029.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Способы

Экстракция РНК и qPCR-анализ

Суммарную РНК экстрагировали с помощью мининабора RNeasy (Qiagen, Манчестер, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя, и концентрацию РНК определяли с помощью поглощения при 260/280 нм с использованием спектрофотометра (nano-Drop ND-1000; Thermo Scientific, Вилмингтон, Делавер). В случае анализа экспрессии мРНК кДНК получали из суммарной РНК с помощью высокопроизводительного набора для обратной транскрипции (Applied Biosystems, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Реакции обратной транскрипции выполняли в термоциклере (Biometra, Германия) при 25°C в течение 10 мин., 37°C в течение 120 мин. и 85°C в течение 5 мин., удерживали при 4 °C. Полученную в результате кДНК амплифицировали в двух повторах с помощью ПЦР-анализа SYBR-Green, а продукты определяли на ПЦР-устройстве в реальном времени QuantStudio 6 flex (Applied Biosystems, Великобритания) с помощью стандартизированного профиля (исходная денатурация при 95°C в течение 10 мин., с последующими 40 циклами по 15 секунд денатурации при 95°C и 60 секунд отжига/удлинения при 60/65 °C, в зависимости от праймеров). Стадию диссоциации добавляли через 40 циклов с целью получения

кривой плавления. Анализ выполняли с помощью программного обеспечения для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems QuantStudio v1.2.

Результаты

Дифференцированные клетки HT29-mtx, подверженные воздействию форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA), секретировали значительное количество IL-8; в отличие от этого, обработка в течение 24 часов бактериальными супернатантами MRx0029, приводила к индукции даже более низкой секреции IL-8 по сравнению с необработанными клетками и клетками, обработанными UCSFA+ (Фиг. 14A).

Изучали способность MRx0029 регулировать проницаемость эпителия в результате модификации внутриклеточной передачи сигнала включала в себя экспрессию и локализацию белков, участвующих в образовании кишечного барьера.

РНК выделяли и количественный анализ RT-PCR (qRT-PCR) выполняли для характеристики изменений экспрессии генов белков плотных контактов во время инкубации с MRx0029. Введение MRx0029 приводило к повышению экспрессии мРНК окклюдина, виллина, белка плотных контактов 1 и 2 (соответственно TJP1 и TJP2) через 2 ч после инкубации (Фиг. 14B).

Результаты *in vitro* сравнивали с данными из параллельного анализа *ex vivo* в отношении кишечника мышей, которым скармливали MRx0029. Экспрессию генов TJP1 и окклюдина количественно оценивали в толстом кишечнике и подвздошной кишке. Данные *ex vivo* точно отражают данные *in vitro*, поскольку MRx0029 был способен значимо повышать активность TJP1 и окклюдина ($p=0,073$) в участке толстой кишки в кишечнике мыши (Фиг. 14C+14D). MRx0029 также был способен снижать функцию проницаемости в толстом кишечнике тех же самых мышей (Фиг. 14F).

Обсуждение

Результаты демонстрируют, что MRx0029 способен регулировать проницаемость эпителия путем модификации внутриклеточной передачи сигналов, участвующих в экспрессии и локализации белков, участвующих в барьерной функции кишечника (окклюдина, виллина, TJP1 и TJP2). Таким образом, результаты демонстрируют, что MRx0029 функционирует для повышения барьерной функции кишечника и снижения проницаемости кишечника. Таким образом, композиции по данному изобретению эффективны для лечения или предупреждения заболеваний или патологических состояний, которые характеризуются снижением барьерной функции кишечника или повышенной проницаемостью кишечника.

Пример 12

Введение

Авторы данного изобретения пытались проанализировать экспрессию генов воспалительных маркеров в ткани головного мозга из гиппокампа, миндалевидного тела и префронтальной коры мышей, которым скармливали MRx0029. Авторы данного изобретения также исследовали влияние на продуцирование цитокинов селезенкой у тех же самых мышей, которым вводили MRx0029.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Способы*Животные*

Взрослые самцы мышей BALBc (Envigo, Великобритания) размещали по группам в условиях 12-часового цикла света-темноты; стандартный корм для грызунов и вода были доступны в неограниченном количестве. Все эксперименты осуществляли в соответствии с Европейскими руководствами при одобрении Комитетом по контролю этических норм обращения с животными Ирландского национального университета в Корке. Возраст животных составлял 8 недель в начале эксперимента.

Схема исследования

Животным давали адаптироваться к комнате для содержания в течение одной недели после прибытия в комплекс для содержания животных. Они получали с помощью желудочного зонда (доза 200 мкл) живых биотерапевтических препаратов в дозе 1×10^9 КОЕ в течение 6 последовательных дней между 15:00 и 17:00. На день 7 животных декапитировали и ткани извлекали для эксперимента.

Сбор тканей

Животных умерщвляли в случайном порядке в зависимости от обработки и условий исследования; забор образцов происходил между 9.00 и 14.30. Кровь из туловища собирали в пробирки с калий-EDTA (этилендиаминтетрауксая кислота) и центрифугировали в течение 15 минут при 4000 g. Плазму крови выделяли и хранили при -80°C для последующего анализа. Головной мозг быстро вырезали, рассекали и каждую область головного мозга мгновенно замораживали на сухом льду и хранили при -80°C для последующего анализа. Селезенку удаляли, собирали в 5 мл среду RPMI (с L-глутамином и бикарбонатом натрия, R8758 Sigma+10% FBS (F7524, Sigma) + 1% Pen/Strep (P4333, Sigma)) и обрабатывали сразу после иммуностимуляции ex-vivo. Ткань кишечника (2-3 см сегменты подвздошной кишки и толстой кишки, рядом со слепой кишкой вырезали, и использовали наиболее удаленный 1-2 см ткани слепой кишки) помещали в камеры Ussing для анализа кишечной проницаемости. Слепую кишку удаляли, взвешивали и хранили при -80°C для анализа SCFA.

Анализ цитокинов в селезенке

Селезенку извлекали незамедлительно в 5 мл среды RPMI после умерщвления и незамедлительно культивировали. Клетки селезенки вначале гомогенизировали в указанной среде RPMI, затем инкубировали в течение 5 минут с 1 мл буфера для лизиса RBC (11814389001 ROCHE, Sigma). Добавляли еще 10 мл среды RPMI, затем с последующим 200G центрифугированием в течение 5 минут. Затем супернатант фильтровали через 40 мкм сито. Клетки подсчитывали и высевали ($4000000/\text{мл}$ среды). Через 2,5 ч после адаптации клетки стимулировали липополисахаридом (LPS-2 мкг/мл) или конкавалином А (ConA-2,5 мкг/мл) в течение 24 ч. После стимуляции супернатанты собирали для оценки высвобождения цитокинов с использованием набора для

провоспалительной панели 1 (мышь) V-PLEX Kit (Meso Scale Discovery, Мериленд, США) в случае TNF- α , IL-10, IL-1 β , интерферона γ , CXCL2 и IL6. Анализы выполняли с помощью MESO QuickPlex SQ 120, SECTOR Imager 2400, SECTOR Imager 6000, SECTOR S 600.

Анализ экспрессии генов

Суммарную РНК экстрагировали с помощью набора для выделения miRNA mirVana™ (Ambion/Life technologies, Пейсли, Великобритания) и обрабатывали ДНКазой (Turbo DNA-free, Ambion/Life technologies) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК количественно оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Уилмингтон, Делавэр, США) в соответствии с инструкциями производителя. Качество РНК оценивали с помощью биоанализатора Agilent Bioanalyzer (Agilent, Стокпорт, Великобритания) в соответствии с процедурой производителя и рассчитывали число целостности РНК (RIN). РНК со значением RIN >7 использовали для последующих экспериментов. РНК обратно транскрибировали в кДНК с помощью высокопроизводительного набора кДНК Applied Biosystems (Applied Biosystems, Уоррингтон, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, обратную транскриптазу Multiscribe (50 ЕД/мкл) (1)(2)(1)(10) добавляли в виде части мастер-микса при КТ, инкубировали при 25°C в течение 10 минут, при 37°C в течение 2 часов, при 85°C в течение 5 минут и хранили при 4°C. Количественную ПЦР проводили с помощью зондов (6-карбоксит-флуоресцеин - FAM), сконструированных Applied Biosystems для специфических целевых генов мыши, в то время как β -актин использовали в качестве эндогенного контроля. Реакционные смеси для амплификации содержали 1 мкл кДНК, 5 мкл 2X мастер-микс для ПЦР (Roche), 900 нМ каждого праймера и составляли в общей сложности 10 мкл при добавлении не содержащей РНКазы воды. Все реакции осуществляли в тройном повторе с помощью 96-луночных планшетов в системе LightCycler®480. Условия термоциклирования были такими, как рекомендовано производителем (Roche) для 55 циклов. Для проверки загрязнения при амплификации в каждом цикле содержались не содержащие матриц контроли в тройном повторе для каждого использованного зонда. Фиксировали значения порогового цикла (Ct). Данные нормализовали с помощью β -актина и преобразовывали с помощью способа 2- $\Delta\Delta$ CT и представляли в виде кратного изменения по сравнению с контрольной группой.

Статистический анализ

Нормально распределенные данные представляли в виде среднего \pm SEM; непараметрические совокупности данные представляли в виде медианы с интерквартильной шириной. Непарный двухсторонний t-критерий применяли для анализа параметрических данных, а критерий Манна-Уитни использовали для непараметрических данных. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена использовали для корреляционного анализа в объединенных совокупностях данных. p-Значение < 0,05 считали значимым во всех случаях.

Результаты - Экспрессия генов

Экспрессию генов воспалительных маркеров [IL-1 β , IL6, CD11b, TNF- α и TLR-4] анализировали в ткани головного мозга из гиппокампа, миндалевидного тела и префронтальной коры. На Фиг. 15-25 продемонстрированы изменения экспрессии генов после обработки MRx0029 в области гиппокампа, миндалевидного тела и префронтальной коры. Обработка MRx0029 значительно приводила к повышению экспрессии TLR-4 в миндалевидном теле (Фиг. 20). Обработка MRx0029 также приводила к повышению экспрессии CD11b в миндалевидном теле (Фиг. 21).

Результаты - Влияние на экспрессию цитокинов из спленоцитов

Анализ спленоцитов ex-vivo включает в себя воздействие на спленоциты (клетки, выделенные из селезенки, основного органа, участвующего в иммунной защите) бактерио- или вирус-имитирующей атаки.

Обработка MRx0029 приводила к снижению интерферона γ , интерлейкина 1 β и интерлейкина 6 после воздействия LPS (Фиг. 26, 27 и 28 соответственно).

Обработка MRx0029 приводила к повышению уровней хемоаттрактанта CXCL1 (Фиг. 30).

Обсуждение

Обработка MRx0029 значимо повышала экспрессию провоспалительных цитокинов TLR-4 и CD11b в миндалевидном теле. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть пригодны в лечении заболеваний, в частности, заболеваний, характеризующихся сниженной активацией иммунной системы, и заболеваний, излечимых с помощью повышенного иммунного ответа.

Пример 13 - Исследование стабильности

Композиция, описанная в данном документе, содержащая, по меньшей мере, один бактериальный штамм, описанный в данном документе, хранится в закупоренном контейнере при 25°C или 4°C и контейнер помещен в атмосферу, имеющую 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95% относительную влажность. Через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года, 2,5 года или 3 года, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% бактериального штамма будет сохраняться, что определяют с помощью колониеобразующих единиц, определенных стандартными протоколами.

Пример 14 - Анализ влияния *M. massiliensis* на путь передачи сигнала с участием ERK

Материалы и способы

Экстракция РНК и qPCR-анализ MAP2

Клетки высевали в 12-луночные планшеты с плотностью 2×10^5 клеток/луночка. Через 24 часа клетки обрабатывали DMSO или вемурафенибом (662005; EMD Millipore); VEMU; SKMEL28, SKMEL31, 451Lu, HT29 (1 мкМ), SKMEL2 (10 мкМ) или азациитидином-С (A3656; Sigma Aldrich; AzaC; 5 мкг/мл), или обоими лекарственными препаратами (VEMU+Aza) совместно, в присутствии 10% супернатантов бактерий или в их отсутствие (UCFA+). Суммарную РНК экстрагировали с помощью мини-набора RNeasy (Qiagen, Манчестер, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя, а

концентрацию РНК определяли на спектрофотометре при 260/280 нм (NanoDrop ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Лафборо). В случае анализа экспрессии мРНК кДНК получали из 2000 нг суммарной РНК с помощью высокопроизводительного набора для обратной транскрипции (Thermo Fisher, Лафборо) в соответствии с инструкциями производителя. Реакции обратной транскрипции выполняли в термоциклере (Biometra, Германия) при 25°C в течение 10 мин., 37°C в течение 120 мин. и 85°C в течение 5 мин. Полученную в результате кДНК амплифицировали в двух повторах с помощью ПЦР-анализа SYBR-Green, а продукты выявляли на ПЦР-устройстве в реальном времени QuantStudio 6 flex (Applied Biosystems, Великобритания) с помощью стандартизированного профиля (исходная денатурация при 95°C в течение 10 минут, с последующими 40 циклами по 10 секунд денатурации при 95°C и 30 секунд отжига/удлинения при 65 °C). Стадию диссоциации добавляли через 40 циклов с целью получения кривой плавления. Анализ выполняли с помощью программного обеспечения для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems QuantStudio v1.2. Праймерные последовательности для GAPDH и MAP2 изображены ниже.

Вестерн-блоттинг

После 24-часовой обработки соответствующими препаратами в присутствии 10% супернатанта бактерий или в его отсутствие (YCFA+), экстракты белка получали путем лизирования клеток в буфере RIPA (R0278; Sigma Aldrich) с добавлением ингибиторов протеаз (таблетки полного коктейля ингибиторов протеаз; Roche, Швейцария) и 1 мМ/л ортованадата натрия, 0,5 мМ/л PMSF. Количественную оценку белка проводили с помощью анализа белка BCA. Затем равные количества общего белка (20 мкг/полоса) разделяли с помощью SDS-PAGE на 4-15% градиентном геле (BioRad) и переносили на мембраны из поливинилидендифторида (PVDF) (Thermo Fisher Scientific, Лафборо). После блокирования с помощью 5% BSA или обезжиренного сухого молока в TBST (10 мМ Tris, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,5% Tween 20) в течение 60 мин., мембраны зондировали первичными антителами против фосфо-ERK (9101S, 1:1000, Cell Signalling; New England Biolabs (UK)) или суммарной ERK (4696S, 1:1000, Cell signalling; New England Biolabs (UK)).

Белки, представляющие интерес, обнаруживали с помощью соответствующего вторичного антитела, конъюгированного с HRP (1:10000, Thermo Fisher Scientific, Лафборо), проявляли с помощью субстрата для вестерн-блоттинга с использованием ECL Super Signal PicoPlus (34577; Thermo Fisher Scientific, Лафборо) и визуализировали в Chemidoc XRS Imager (BioRad).

Рост, не зависящий от заякорения (анализ роста на мягком агаре), в 96-луночных планшетах

Смесь из 25 мкл предварительно нагретой (37 °C) 2× соответствующей среды для роста (EMEM для линий клеток меланомы; DMEM с высоким содержанием глюкозы для HT29), содержащей 20% FBS, 4 мМ L-Glu, 2× NEAA, 0,6% бикарбоната натрия, 200 ЕД/мл пенициллин/стрептомицин (Invitrogen) и 25 мкл предварительно нагретого (47 °C) 1,2%

нобль-агара (A5431; Sigma Aldrich) высевали в каждую лунку 96-луночного микропланшета с тем, чтобы функционировать в качестве предварительного слоя для анализа. Десять микролитров клеточных суспензий, содержащих $0-2 \times 10^3$ клеток, смешивали с 25 мкл 2× среды для роста и 35 мкл 0,8% нобль-агара в 96-луночном круглодонном полипропиленовом микропланшете и переносили в 96-луночный микропланшет, содержащий затвердевшие предварительные слои. Клеткам давали возможность расти в течение 2 дней, а затем каждые три дня подпитывали средой, содержащей лекарственные препараты, в присутствии 10% супернатантов бактерий или YCFA+. Их оставили расти в увлажненном инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в течение 1-2 недель, прежде чем рост мягкого агара оценивали с помощью 96-луночного анализа трансформации клеток CytoSelect (CBA-130; Cell Biolabs) в соответствии с протоколом производителя. Рост клеток измеряли с использованием многолуночного планшет-ридера Tecan Infinite F200 Pro Series (Tecan Biosystems) при длине волны возбуждения при 485 нм и длине волны излучения при 530 нм.

Рост, не зависящий от заякорения (анализ роста на мягком агаре), в 32-мм планшете

Смесь 1 мл предварительно нагретой (37 °C) 2× соответствующей среды для роста (EMEM для клеточных линий меланомы; DMEM с высоким содержанием глюкозы для HT29) и 1 мл предварительно нагретого (47 °C) 0,8% нобль-агара в планшет (0,4% конечный агар) смешивали с 1 мл суспензии клеток и высевали на 0,6% слой агара/предварительный слой роста клеток (2 мл) в 6-луночный планшет. Клеткам давали возможность расти в увлажненном инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в течение 21-28 дней. Их подпитывали лекарственными препаратами в отсутствие (YCFA+) или в присутствии 10% супернатанта бактерий каждые три дня. Колонии фотографировали с помощью микроскопа Evos XL Core (Thermo Fisher Scientific, Лафборо).

Клоногенный анализ

Клетки обрабатывали трипсином и высевали по 200 клеток/лунка в 12-луночные планшеты. Через 48 часов клетки обрабатывали соответствующими лекарственными препаратами в отсутствие (YCFA+) или в присутствии 10% супернатанта бактерий и повторно подпитывали каждые три дня. На 21 день после высевания клетки фиксировали в ледяном метаноле и окрашивали кристаллическим фиолетовым синим. Подсчитывали колонии (50 клеток) и рассчитывали фракцию выживания как количество колоний, деленное на количество высеянных клеток в (эффективность высевания) из обработанных, деленное на эффективность высевания контроля.

Пример 14А - Линия клеток меланомы SKMEL2

Эффекты следующих обработок оценивали в отношении линии клеток меланомы SKMEL2 (BRAF ДТ; онкогенная мутация N61R в Nras): (1) MRX0029; (2) вемурафениб (VEMU) в YFCA+ среде; (3) VEMU и MRX029; (4) азациитидин-С (Aza-c) в YFCA+ среде; (5) Aza-c и MRX029; (6) VEMU, Aza-c и MRX0029.

Экспрессию гена MAP2 в линии клеток SKMEL2 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 31. Все обработки MRX029 (отдельно или в комбинации с VEMU и/или Aza-c) повышали экспрессию гена MAP2 по сравнению с обоими отрицательными контролями (только клеточная линия и YCFA+). Клоногенную выживаемость линии клеток SKMEL2 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 32. Рост на мягком агаре линии клеток SKMEL2 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 33. VEMU+Aza-c повышали ингибирование роста на мягком агаре с помощью MRX029. Передача сигналов с участием ERK в линии клеток SKMEL2 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 34 (VEMU, Aza-c и MRX029 не оценивали).

Эти результаты указывают на то, что MRX0029 отдельно или в комбинации с вемурафенибом и/или азациитидином-С может оказывать эффекты индукции экспрессии гена MAP2 в линии клеток меланомы (SKMEL2). Кроме того, вемурафениб+азациитидин-С усиливали ингибирование роста на мягком агаре с помощью MRX0029. Исходя из этого, ожидается, что композиции по данному изобретению будут пригодны для лечения или предупреждения различных видов рака, в частности, метастатического рака, в частности, метастатической меланомы.

Пример 14В - Линия клеток меланомы SKMEL28

Эффекты следующих обработок оценивали в отношении линии клеток меланомы SKMEL28 (онкогенная мутация V600E в BRAF): (1) MRx0029; (2) вемурафениб (VEMU) в YCFA+ среде; (3) VEMU и MRx0029; (4) азациитидин-С (Aza-c) в YCFA+ среде; (5) Aza-c и MRX0029; (6) VEMU, Aza-c и MRx0029.

Экспрессию гена MAP2 в линии клеток SKMEL28 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 35. Клоногенную выживаемость линии клеток SKMEL28 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 36. MRx0029 в комбинации с VEMU и/или Aza-c снижал клоногенную выживаемость по сравнению с обоими отрицательными контролями (YCFA+ и только линия клеток). Рост на мягком агаре линии клеток SKMEL28 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 37. Передача сигналов с участием ERK в линии клеток SKMEL28 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 38 (VEMU, Aza-c и MRx0029 не оценивали). Все обработки MRx0029 (отдельно или в комбинации с VEMU или Aza-c) снижали передачу сигналов с участием ERK по сравнению с отрицательным контролем (YFCA+).

Эти результаты указывают на то, что MRx0029 отдельно или в комбинации с вемурафенибом и/или азациитидином-С может оказывать эффекты ингибирования передачи сигналов с участием ERK и снижения клоногенной выживаемости линии клеток

меланомы, содержащей мутацию BRAF V600E (SKMEL28). Исходя из этого, ожидается, что композиции по данному изобретению будут пригодны для лечения или предупреждения различных видов рака, в частности, тех, которые включают онкогенную передачу сигнала с участием ERK, особенно меланом. В частности, ожидается, что композиции по данному изобретению будут пригодны для лечения или предупреждения таких различных видов рака, содержащих онкогенную мутацию в BRAF, в частности, в положении 600, и особенно мутацию BRAF V600E.

Пример 14C - Линия клеток меланомы SKMEL31

Эффекты следующих обработок оценивали в отношении линии клеток меланомы SKMEL31 (гетерозиготной в отношении BRAF V600E): (1) MRx0029; (2) вемурафениб (VEMU) в YFCA+ среде; (3) VEMU и MRx0029; (4) азациитидин-С (Aza-c) в YFCA+ среде; (5) Aza-c и MRx0029; (6) VEMU, Aza-c и MRx0029.

Экспрессию гена MAP2 в линии клеток SKMEL31 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 39. Клоногенную выживаемость линии клеток SKMEL31 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 40. Рост на мягком агаре линии клеток SKMEL31 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 41. VEMU, Aza-c и VEMU+Aza-c повышали рост на мягком агаре и ингибирование клоногенной выживаемости с помощью MRx0029. Передача сигналов с участием ERK в линии клеток SKMEL31 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 42 (VEMU, Aza-c и MRx0029 в комбинации не оценивали). Все обработки MRx0029 (отдельно или в комбинации с VEMU или Aza-c) снижали передачу сигналов с участием ERK по сравнению с отрицательным контролем (YFCA+).

Пример 14D - Линия клеток меланомы 451Lu

Эффекты следующих обработок оценивали в отношении линии клеток меланомы 451Lu (онкогенная мутация V600E в BRAF): (1) MRx0029; (2) вемурафениб (VEMU) в YFCA+ среде; (3) VEMU и MRx0029; (4) азациитидин-С (Aza-c) в YFCA+ среде; (5) Aza-c и MRx0029; (6) VEMU, Aza-c и MRx0029.

Экспрессию гена MAP2 в линии клеток 451Lu оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 43. Все обработки MRx0029 (отдельно или в комбинации с VEMU и/или Aza-c) повышали экспрессию гена MAP2 по сравнению с отрицательным контролем только клеточной линией. Клоногенную выживаемость линии клеток 451Lu оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 44. Все обработки MRx0029 (отдельно или в комбинации с VEMU и/или Aza-c) снижали клоногенную выживаемость по сравнению с обоими отрицательными контролями (только клеточная линия, и YCFCA+ +DMSO). Рост на мягком агаре линии клеток 451Lu оценивали с использованием протокола, приведенного в

разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 45. Азацитидин-С усиливал ингибирование роста на мягком агаре с помощью MRx0029. Передача сигналов с участием ERK в линии клеток 451Lu оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 46 (VEMU, Aza-с и MRx0029 в комбинации не оценивали). MRx0029 в комбинации с VEMU или Aza-с снижал передачу сигналов с участием ERK по сравнению с отрицательным контролем (YFCA+ +DMSO).

Эти результаты указывают на то, что MRx0029 отдельно или в комбинации с вемурафенибом и/или азацитидином-С оказывает эффекты индукции экспрессии гена MAP2 и снижения клоногенной выживаемости и роста линии клеток меланомы, несущей онкогенную мутацию BRAF V600E (451Lu). Исходя из этого, ожидается, что композиции по данному изобретению будут пригодны для лечения или предупреждения различных видов рака, в частности, тех, которые включают онкогенную передачу сигнала с участием ERK, особенно меланом, таких как метастатические меланомы. В частности, ожидается, что композиции по данному изобретению будут пригодны для лечения или предупреждения таких различных видов рака, содержащих онкогенную мутацию в BRAF, в частности, в положении 600, и особенно мутацию BRAF V600E.

Пример 14Е - Линия клеток колоректального рака HT29

Эффекты следующих обработок оценивали в отношении линии клеток колоректального рака HT29 (онкогенная мутация V600E в BRAF): (1) MRx0029; (2) вемурафениб (VEMU) в YFCA+ среде; (3) VEMU и MRx0029; (4) азацитидин-С (Aza-с) в YFCA+ среде; (5) Aza-с и MRx0029; (6) VEMU, Aza-с и MRx0029.

Экспрессию гена MAP2 в линии клеток HT29 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 47. MRx0029 в комбинации с VEMU и/или Aza-с повышал экспрессию гена MAP2 по сравнению с обоими отрицательными контролями (только клеточная линия и YFCA+). Клоногенную выживаемость линии клеток HT29 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 48. Все обработки MRx0029 (отдельно или в комбинации с VEMU и/или Aza-с) снижали клоногенную выживаемость по сравнению с обоими отрицательными контролями (только клеточная линия, и YFCA+ +DMSO). Aza-с повышал эффекты MRx0029 в ингибировании клоногенной выживаемости. Рост линии клеток HT29 на мягком агаре оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 49а и b. Передачу сигналов с участием ERK в линии клеток HT29 оценивали с использованием протокола, приведенного в разделе «Материалы и способы», а результаты изображены на Фиг. 50 (VEMU, Aza-с и MRx0029 в комбинации не оценивали). Оценивали эффекты только MRx0029 на передачу сигналов с участием ERK по сравнению с отрицательным контролем (YFCA+ + DMSO).

Эти результаты указывают на то, что MRx0029 отдельно или в комбинации с вемурафенибом и/или азацитидином-С оказывает эффекты индукции экспрессии гена

MAP2, снижения клоногенной выживаемости и ингибирования передачи сигналов с участием ERK в линии клеток, несущей онкогенную мутацию V600E (HT29). Исходя из этого, ожидается, что композиции по данному изобретению будут пригодны для лечения или предупреждения различных видов рака, в частности, тех, которые включают онкогенную передачу сигнала с участием ERK, особенно различных видов колоректального рака, таких как метастатический колоректальный рак. В частности, ожидается, что композиции по данному изобретению будут пригодны для лечения или предупреждения таких различных видов рака, содержащих онкогенную мутацию в BRAF, в частности, в положении 600, и особенно мутацию BRAF V600E.

Пример 15 - Экспрессия РНК GPR109a в дифференцированных клетках Caco-2

GPR109a представляет собой рецептор, связанный с G-белком, экспрессируемый в обращенной к просвету апикальной мембране эпителиальных клеток толстого кишечника и кишечника. Сайленсинг экспрессии GPR109a встречается в линиях клеток различных видов рака толстого кишечника, и, как сообщалось, индукция его экспрессии индуцирует апоптоз опухолевых клеток в присутствии продуктов бактериальной ферментации, таких как бутират [сxxiv].

Клетки HT29mtx высевали в 12-луночные планшеты и дифференцировали в течение 10 дней; затем их лишали сыворотки в течение 12 часов, а затем подвергали воздействию 10% супернатанта, полученного из бактерий стационарной фазы, в течение 24 часов. Клетки собирали и суммарную РНК выделяли в соответствии с протоколом для мининабора RNeasy (Qiagen). кДНК получали с помощью высокоэффективного набора для обратной транскрипции кДНК (Applied Biosystems). Экспрессию генов измеряли с помощью qPCR. β -Актин использовали в качестве внутреннего контроля. Кратность изменения рассчитывали в соответствии со способом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ [сxxvii]. Последовательности используемых прямого и обратного праймеров представлены в виде SEQ ID NO: 6 и 7 соответственно.

Дифференцированные Caco-2 образуют поляризованные апикальные/слизистые и базолатеральные/серозные мембраны, которые непроницаемы и структурно и функционально аналогичны эпителиальным клеткам тонкого кишечника. Обработка клеток Caco-2 MRx0029 вызвала повышенную экспрессию GPR109a (Фиг. 52A). Кроме того, Caco-2, обработанные супернатантом форбол-12-миристан-13-ацетата (РМА), демонстрировали более высокую экспрессию РНК GPR109a, чем при обработке только РМА (или РМА в среде YCFA+) - см. Фиг. 52B. Таким образом, эти данные указывают на то, что композиции по данному изобретению могут быть пригодны при лечении различных видов рака, особенно различных метастатических видов рака, в частности, метастатического колоректального рака или рака тонкого кишечника, такого как аденокарцинома тонкого кишечника, и, в частности, тех, включающих онкогенную передачу сигналов с участием ERK. Эти данные также указывают на то, что композиции по данному изобретению могут влиять на такую обработку посредством механизма индукции апоптоза в результате экспрессии GPR109a.

Пример 16 - Влияние MRx0029 на секрецию IL-8 линией клеток HT29

Дифференцированные клетки HT29 образуют поляризованные апикальные/слизистые и базолатеральные/серозные мембраны, которые непроницаемы и структурно и функционально аналогичны эпителиальным клеткам тонкого кишечника.

Клетки HT29 высевали в 12-луночные планшеты с плотностью 200 000 клеток/лунка. Клетки дифференцировались в течение 10 дней (смена среды каждые 2 дня). В день эксперимента клетки помещали в анаэробный вытяжной шкаф и промывали анаэробным уравновешенным раствором HANK. Затем к клеткам добавляли 900 мкл среды для роста (без FBS и антибиотиков). Бактериальные клетки ресуспендировали в среде для роста (без FBS и антибиотиков) и затем добавляли в общей сложности 10^7 CFU на 100 мкл. Клетки коинкубировали с бактериями в течение 2 ч в анаэробном вытяжном шкафу. После этого клетки промывали средой для роста без FBS, но содержащей антибиотики. Клетки оставляли в покое в 1 мл кондиционированной среды THP1 в течение 24 ч. После 24-часовой инкубации супернатант собирали и центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин. и при 4 °C. Образцы замораживали при -80°C до дальнейшего использования.

Кондиционированная среда THP1: THP1 высевали в колбу T25 с плотностью 4×10^6 /колба. Клетки обрабатывали в среде RPMI (содержащей 2 mM L-глутамин без FBS) с 1 мкг/мл LPS или LPS+5 mM АТФ (АТФ добавляли через 3 часа после LPS). Клетки оставляли на 24 часа. После этого собирали кондиционированную среду (CM) с помощью центрифугирования клеток при 250 g в течение 5 мин. и при 4°C. Для обработки клеток HT29 использовали различные CM. Небольшую аликвоту замораживали при -80°C для ELISA.

Супернатанты из различных образцов собирали и проводили анализ цитокинов в соответствии с инструкциями производителя с использованием набора ELISA для IL-8 человека от RnD Systems. GraphPad Prism7 использовали для построения графика и анализа данных.

MRx0029 повышал секрецию IL-8, который является мощным иммуностимулирующим цитокином (Фиг 53). Эти данные демонстрируют иммуностимулирующую активность MRx0029.

Как отмечалось выше, секреция IL-8 повышает пролиферацию В-клеток. В-клетки участвовали в модуляции иммунного ответа в отношении опухолей. Действительно, секреция противоопухолевых антител В-клетками является мощным механизмом опухолевого контроля. Хорошо известно, что продуцирование опухолеспецифических антител может запускать естественные клетки-киллеры для связывания с константным доменом антител, что приводит к лизису опухолевых клеток посредством антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Таким образом, композиции по данному изобретению могут оказывать влияние на лечение рака посредством соответствующей модуляции В-клеточного ответа, обеспечивая усиление противоопухолевых иммунных ответов.

На основании того факта, что механизм патологии большинства различных видов рака включает уклонение от надзора со стороны иммунной системы хозяина, любой механизм, участвующий в стимуляции иммунного ответа, будет иметь терапевтически благоприятное действие. Таким образом, ожидается, что композиции по данному изобретению будут пригодны для лечения или предупреждения различных видов рака.

Пример 17 - Анализ метаболитов

Введение

Микробиота кишечника со своим огромным разнообразием и метаболической емкостью представляет собой огромный метаболический резервуар для продуцирования широкого разнообразия молекул. Авторы данного изобретения пытались определить, какие короткоцепочечные жирные кислоты и среднецепочечные жирные кислоты продуцируются и потребляются штаммом NCIMB 42787 *M. massiliensis* и другим штаммом *M. massiliensis*, обозначаемым в данном документе как Ref 1, Ref 2 и Ref 3.

Материалы и способы

Сбор бактериальных культур и не содержащих клеток супернатантов

Чистые культуры бактерий выращивали в анаэробных условиях в бульоне YCFA+ до тех пор, пока они не достигали своей стационарной фазы роста. Культуры центрифугировали при 5000 x g в течение 5 минут и не содержащий клеток супернатант (CFS) фильтровали с помощью 0,2 мкм фильтра (Millipore, Великобритания). 1 мл аликвот CFS до использования хранили при -80°C. Бутират натрия, гексановую кислоту и валериановую кислоту получали от Sigma Aldrich (UK) и суспензии готовили в бульоне YCFA+.

Количественная оценка SCFA и MCFA бактериальных супернатантов

Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) и среднецепочечные жирные кислоты (MCFA) из бактериальных супернатантов анализировали и количественно оценивали с помощью MS Omics APS следующим образом. Образцы подкисляли с помощью хлористоводородной кислоты и добавляли меченые дейтерием внутренние стандарты. Все образцы анализировали в случайном порядке. Анализ выполняли с помощью высокополярной колонки (колонка Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм), инсталлированная в GC (7890B, Agilent), соединенном с квадрупольным детектором (59977B, Agilent). Систему контролировали с помощью ChemStation (Agilent). Первичные материалы преобразовывали в формат netCDF с помощью Chemstation (Agilent), до того, как данные импортировали и обрабатывали в Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) с использованием программного обеспечения PARADISE, описанного в [cxxxviii].

Результаты

Как изображено на Фиг. 54-56, штамм 42787 продуцирует валериановую кислоту, бутират и гексановую кислоту и потребляет пропионат и ацетат. Авторы данного изобретения также обнаружили другие штаммы вида *M. massiliensis*, которые

продуцируют сопоставимые уровни валериановой кислоты, гексановой кислоты и бутирата и потребляют аналогичные количества ацетата и пропионата.

Пример 18 - Подавление енолазы 2

На Фиг. 57 продемонстрировано, что MRx0029 обладает статистически значимым эффектом, подавляя нейронспецифическую енолазу (NSE)/енолазу 2. Считается, что NSE поддерживает повышенные метаболические потребности опухолевых клеток, защищает опухолевые клетки от стрессовых условий и способствует их инвазии и миграции [сххix]. Он также участвует в прогрессировании метастатической меланомы [сххх], выживаемости и прогрессировании мелкоклеточного рака легких [сххxi], а также прогнозе аденоскомазной карциномы легких [схххii]. Таким образом, ожидается, что композиции по данному изобретению будут эффективными для лечения и предупреждения рака, в частности, метастатической меланомы, мелкоклеточного рака легких и аденоскомазной карциномы легких.

Пример 19 - Анализ метаболитов

В дополнение к данным, представленным в Примере 17, на Фиг. 58 продемонстрировано, какие другие короткоцепочечные жирные кислоты продуцируются и потребляются штаммом NCIMB 42787 *M. massiliensis* и другими штаммами, депонированными под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43388 и NCIMB 43389.

Штамм NCIMB 42787 *M. massiliensis* снижает содержание муравьиной кислоты при одновременном повышении уровней 2-метилпропановой и 3-метилпропановой кислот (Фиг. 58). Таким образом, штамм NCIMB 42787 продуцирует 2-метилпропановую и 3-метилпропановую кислоты и потребляет муравьиную кислоту. Авторы данного изобретения также обнаружили, что другие депонированные штаммы продуцируют сопоставимые уровни 2-метилпропановой и 3-метилпропановой кислот и потребляют аналогичные количества муравьиной кислоты.

Пример 20 - Снижение IL-6

Введение

Бактериальные штаммы исследовали в отношении их способности запускать повышение секреции IL-6 клеточной линией астроцитомы U373.

Материалы и способы

Клеточную линию глиобластомы (астроцитомы) человека (U373) поддерживали в 25 мл MEME 4,5 г/л D-глюкозы с добавлением 10% инактивированной нагреванием FBS, 4 mM L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 5 мкг/мл плазмоцина, 1% незаменимых аминокислот, 1% пирувата натрия (называемого полной средой для роста).

Клетки помещали в 24-луночные планшеты при плотности 100000 клеток/лунка в 1 мл полной среды для роста и оставляли в покое при 37 °C/5% CO₂ на 72 ч. В день обработки среду удаляли из каждой лунки, клетки промывали 0,5 мл промывочной среды (бессывороточная MEME), 0,9 мл стимулирующей среды (среда MEME, содержащая 2% FBS). Через 1 ч после преинкубации клетки удаляли из CO₂ инкубатора и обрабатывали

100 мкл супернатанта бактерий. В качестве контроля использовали среду YCFA+. Затем клетки инкубировали еще в течение 24 ч при 37°C/5% CO₂, после чего бесклеточные супернатанты собирали и центрифугировали при 10000 g при 4°C в течение 3 мин. Образцы разделяли на аликвоты в микропробирки на 1,5 мл и хранили при -80°C для ELISA hIL-6.

Результаты и выводы

На Фиг. 59 продемонстрировано, что штамм NCIMB 42787 M. massiliensis повышал секрецию IL-6 в клетках U373 по сравнению с необработанными и YCFA+ контролями. Другие депонированные штаммы, в частности, NCIMB 43389, также повышали секрецию IL-6. Дополнительными депонированными штаммами являются NCIMB 43385, NCIMB 43388, NCIMB 43386 и NCIMB 43387.

Секреция IL-6 повышает пролиферацию В-клеток. Как указано выше, повышенная пролиферация В-клеток может выступать в качестве мощного механизма повышения улучшения иммунного ответа против рака (например, с помощью продуцирования антител и запуска ADCC).

Действительно, иммуностимулирующая активность демонстрируется не только депонированным штаммом, но и родственными депонированными штаммами. Таким образом, ожидается, что композиции по данному изобретению, содержащие штаммы рода Megasphaera или их биотипы, будут пригодны в лечении или предупреждении различных видов рака.

Пример 21 - Подавление енолазы 2

Материалы и способы

Линию клеток нейробластомы SH-SY5Y выращивали в 50% MEM и 50% питательной смеси F-12 среды Хэма с добавлением 2 mM L-глутамин, 10% термоинактивированной FBS, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. SH-SY5Y высевали в 6-луночные планшеты с плотностью $0,5 \times 10^6$ клеток. Через 24 ч клетки обрабатывали в среде для дифференцировки (среда для роста, содержащая 1% FBS) 10% супернатантом бактерий или YCFA+ в течение 17 ч. Клетки собирали и суммарную РНК выделяли в соответствии с протоколом для миниатора RNeasy (Qiagen). кДНК получали с помощью высокоэффективного набора для обратной транскрипции кДНК (Applied Biosystems). Экспрессию генов измеряли с помощью qPCR. GAPDH использовали в качестве внутреннего контроля. Кратность изменения рассчитывали в соответствии со способом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Используемые наборы праймеров приведены в виде SEQ ID NO: 2, 3, 13 и 14.

Результаты

На Фиг. 60 продемонстрировано, что штамм NCIMB 42787 M. massiliensis обладает статистически значимым эффектом подавления нейронспецифической енолазы (NSE)/енолазы 2. Кроме того, авторы данного изобретения также обнаружили, что депонированные референтные штаммы вызывают статистически значимое снижение енолазы 2 по сравнению с контролем культуры YCFA+. В частности, штаммы,

депонированные под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43388, NCIMB 43389, NCIMB 43386 и NCIMB 43387, вызывали значительное подавление енолазы 2.

Вывод

Соответственно, в соответствии с комментариями в Примере 18 выше, ожидается, что композиции по данному изобретению в определенных вариантах осуществления, содержащих иллюстративные референтные штаммы, будут эффективными для лечения и предупреждения рака, в частности, метастатической меланомы, мелкоклеточного рака легких и аденоскомаозной карциномы легких.

Пример 22 - Снижение MAP2

Материалы и способы

Линию клеток нейробластомы SH-SY5Y выращивали в 50% MEM и 50% питательной смеси F-12 среды Хэма с добавлением 2 mM L-глутамина, 10% термоинактивированной FBS, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. SH-SY5Y высевали в 6-луночные планшеты с плотностью $0,5 \times 10^6$ клеток. Через 24 ч клетки обрабатывали в среде для дифференцировки (среда для роста, содержащая 1% FBS) 10% супернатантом бактерий или YCFA+ в течение 17 ч. Клетки собирали и суммарную РНК выделяли в соответствии с протоколом для мининабора RNeasy (Qiagen). кДНК получали с помощью высокоэффективного набора для обратной транскрипции кДНК (Applied Biosystems). Экспрессию генов измеряли с помощью qPCR. GAPDH использовали в качестве внутреннего контроля. Кратность изменения рассчитывали в соответствии со способом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Используемые наборы праймеров приведены в виде SEQ ID NO: 2, 3, 4 и 5.

Результаты

На Фиг. 61А продемонстрировано, что штамм NCIMB 42787 *M. massiliensis* и другие депонированные штаммы вызывают статистически значимое повышение экспрессии MAP2 по сравнению с контролями (т.е., отрицательным контролем и контролем средой). В частности, штаммы, депонированные под номерами доступа NCIMB 43385, NCIMB 43388, NCIMB 43389, NCIMB 43386 и NCIMB 43387, вызывали значительное повышение экспрессии MAP2. Исходя из этого, ожидается, что композиции по данному изобретению будут пригодны для лечения или предупреждения различных видов рака, в частности, метастатического рака, в частности, метастатической меланомы.

Пример 23 - Модуляция секреции цитокинов в клетках НМС3, подвергаемых воздействию TNF α , при обработке штаммом NCIMB 42787 *M. massiliensis*

Введение

Клетки НМС3 обрабатывали TNF α , и секрецию IL-8 измеряли после обработки бесклеточными супернатантами из стационарной фазы культуры NCIMB 42787.

Материалы и способы

Клетки микроглии человека НМС3 выращивали в среде EMEM с добавлением глутамина, содержащей 15% инактивированной нагреванием FBS, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки НМС3 высевали в 24-луночные

планшеты с плотностью 50000 клеток/лунка. Клетки оставляли в инкубаторе с CO₂ в течение 48 ч. Затем клетки промывали холостым раствором EMEM и предварительно обрабатывали 2% средой для роста с FBS с 10 нг/мл TNF- α в течение 1 ч. После этого 10% бесклеточные супернатанты бактерий для стационарных культур роста NCIMB 42787 (выделенных, как описано выше) добавляли в обработанные TNF- α и необработанные лунки и инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37°C в течение 24 ч. Бесклеточные супернатанты собирали и центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин. и при 4 °C. Образцы разделяли на аликвоты в микропробирки на 1,5 мл и хранили при -80°C для ELISA hIL-8.

Секрецию IL-8 анализировали с использованием стандартных наборов для ELISA hIL-8 в соответствии с протоколом производителя в бесклеточных супернатантах из клеток HMC3, обработанных, как описано выше. Образцы измеряли при 405 нм с коррекционной длиной волны, установленной на 655 нм на микропланшет-ридере (iMark, Bio-Rad). Необработанные данные наносили на график и анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7.

Статистический анализ

Нормально распределенные данные представлены в виде среднего \pm SEM; однофакторный дисперсионный анализ (тест множественного сравнения Сидака) использовали для анализа данных, представленных в данной работе. р-Значение < 0,05 считали значимым во всех случаях.

Результаты

NCIMB 42787 индуцирует секрецию IL-8 в отсутствие стимуляции (Фиг. 61B). Как указано выше, IL-8 участвует в активации иммунной системы, в частности, путем стимуляции пролиферации В-клеток.

Пример 24 - Активация промотора NF- κ B в клетках HEK-TLR4 с помощью NCIMB 42787 M. massiliensis

Введение

Чтобы проверить, будет ли обработка NCIMB 42787 индуцировать активность промотора NF- κ B-Ap1, индуцированную вовлечением TLR4, клетки HEK-TLR4 обрабатывали бесклеточными супернатантами бактерий для NCIMB 42787 отдельно или в комбинации с LPS.

Материалы и способы

Репортерные клетки HEK293-Blue, стабильно экспрессирующие TLR4 человека (HEK-TLR4), культивировали в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки HEK-TLR4 поддерживали в DMEM 4,5 г/л D-глюкозы с добавлением 10% (об./об.) инактивированной нагреванием FBS, 4 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл нормоцина, среды для селекции 1X HEK-Blue.

Вкратце, клетки промывали PBS, диссоциировали в PBS и собирали в среде для роста. Клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 25000 клеток/лунка. Чтобы оценить влияние штаммов бактерий на LPS, индуцирующее активацию промотора

NF-κB, клетки обрабатывали 10 нг/мл LPS в присутствии или в отсутствие 10% супернатантов (выделенных, как описано выше) и инкубировали в CO₂ инкубаторе. Обработка продолжалась в течение 22 часов при 37°C и 5% CO₂, после чего определение активности секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) в супернатанте клеточной культуры проводили с использованием раствора QUANTI-blue в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 20 мкл бесклеточного супернатанта собирали и анализировали на наличие SEAP путем смешивания с 200 мкл стерильно фильтрованной среды для детекции QUANTI-Blue. После 2 ч инкубации при 37°C оптическую плотность измеряли при 655 нм на микропланшет-ридере (iMark microplate, Bio-Rad).

Статистический анализ

Нормально распределенные данные представлены в виде среднего ± SEM; однофакторный дисперсионный анализ (тест множественного сравнения Сидака) использовали для анализа данных, представленных в данной работе. p-Значение < 0,05 считали значимым во всех случаях.

Результаты

NCIMB 42787 сам по себе индуцировал активацию промотора NF-κB-*Ap1* (Фиг. 61C).

NF-κB участвует в активации иммунного ответа, в частности, с помощью стимуляции экспрессии медиаторов воспаления и цитокинов, участвующих в иммунном ответе, например, IL-6. Как указано выше, повышение экспрессии IL-6 способствует стимуляции иммунной системы, и, таким образом, активации пути с участием NF-κB имеет иммуностимулирующую активность. Соответственно, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению активируют передачу сигналов с участием NF-κB и, таким образом, стимулируют иммунную систему.

Пример 25 - Штаммы *M. massiliensis* продуцирует масляную, валериановую и гексановую кислоты

Материалы и способы

Экстракцию SCFA из YCFA+, YCFA+ с добавлением стандартной смеси SCFA (40 mM уксусной кислоты и 20 mM муравьиной кислоты, пропионовой кислоты, масляной кислоты, валериановой кислоты и гексановой кислоты) проводили в соответствии с методом De Baere et al..

Анализ HPLC SCFA

Детекцию и количественную оценку SCFA с помощью HPLC проводили по методу De Baere et al.¹³³ с незначительными модификациями. Вкратце, анализ HPLC выполняли с использованием системы HPLC Waters e2695, оснащенной детектором 2998 Waters Photodiode Array (PDA) (Waters Limited, Элстри, Великобритания). Анализ HPLC стандартов SCFA, SCFA, экстрагированных из BCFS MRx0005 и MRx0029 и гексанового, диэтилэфирного, этилацетатного, ацетонитрилового и метанолового экстрактов MRx0005 и MRx0029, проводили с использованием колонки Xselect® HSS T3 3,5 мкм 4,6×150 мм LC (Waters Limited, Элстри, Великобритания). Анализ LC проводили с использованием

матричного фотодиодного детектора (PDA), установленного для анализа длин волн 200-800 нм. Детекцию и количественную оценку SCFA выполняли при 210 нм. Подвижная фаза состояла из 25 мМ натрий-фосфатного буфера в воде для HPLC (рН с доведением до 3,0 с помощью фосфорной кислоты (А) и ацетонитрила (В)). Метод LC для обнаружения и количественной оценки SCFA выполняли с использованием системы растворителей со следующим градиентом: t0' А=95%, В=5%; t10' А=95%, В=5%; t30' А=30%, В=70%; t31' А=0%, В=100%; t36' А=0%, В=100%; t38' А=5%, В=95%; t60' А=5%, В=95%; поток=1 мл/мин.

Калибровочную кривую по семи точкам получали для каждой SCFA путем инъекции 20 мкл двукратного серийного разведения SCFA (40 мМ уксусной кислоты и 20 мМ муравьиной кислоты, пропионовой кислоты, масляной кислоты, валериановой кислоты и гексановой кислоты). Количественную оценку-эффективность экстракции рассчитывали по следующей формуле:

$$\frac{[\text{SCFA в YCFA+добавлена и извлечена}]}{[\text{SCFA в YCFA+добавлена и не извлечена}]}$$

Эффективность экстракции использовали для определения концентрации отдельных SCFA в каждом образце. Продуцирование конкретных SCFA рассчитывали путем вычитания количества соответствующих SCFA, присутствующих в контрольной среде без добавок.

Целенаправленная метаболомика: анализ метаболитов бактерий и жирных кислот

Анализ образцов проводил с помощью MS-Omics (Копенгаген, Дания). Смешанный объединенный образец (образец QC) получали путем взятия аликвоты из каждого образца. Этот образец анализировали через равные интервалы на протяжении всей последовательности. Матричные эффекты исследовали для количественно определенных соединений путем добавления в образец QC как минимум двух уровней.

Для анализа GC-метаболитов образцы дериватизировали метилхлорформатом с помощью слегка модифицированной версии протокола, описанного Smart et al.. Все образцы анализировали в случайном порядке. Анализ выполняли с помощью GC (7890B, Agilent), соединенного с квадрупольным детектором (59977B, Agilent). Первичные материалы преобразовывали в формат netCDF с помощью Chemstation (Agilent), до того, как данные импортировали и обрабатывали в Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) с использованием программного обеспечения PARADISE, описанного Johnsen et al..

Для анализа SCFA образцы подкисляли с помощью хлористоводородной кислоты и добавляли меченые дейтерием внутренние стандарты. Анализ выполняли с помощью высокополярной колонки (колонка Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм), установленной в GC (7890B, Agilent), соединенной с квадрупольным детектором (59977B, Agilent). Первичные материалы преобразовывали в формат netCDF с помощью Chemstation (Agilent), до того, как данные импортировали и обрабатывали в Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) с использованием программного обеспечения PARADISE, описанного Johnsen et al.¹³⁵.

Результаты

Анализ жирных кислот с использованием целевой метаболомики продемонстрировал, что NCIMB 42787 продуцирует бутановую (масляную), пентановую (валериановую) и гексановую (капроновую) кислоту как в линейной, так и в разветвленной формах (C4-C6) (Фиг. 62A). Кроме того, в бесклеточном супернатанте NCIMB 42787 соотношение 4-гидроксифенилуксусная кислота:среда повышалось. Анализ HPLC бесклеточных супернатантов использовали для контроля продуцирования муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной, валериановой и гексановой кислоты (на основании времени удерживания и спектра поглощения соответствующих SCFA) NCIMB 42787. Типичные хроматограммы для стандартов SCFA, наложенных на бесклеточные супернатанты NCIMB 42787, экстрагированные для SCFA, представлены на Фиг. 62С. Анализ HPLC подтвердил продуцирование масляной, валериановой и гексановой кислоты NCIMB 42787.

Пример 26 - Метанольные фракции M. massiliensis, содержащие бутират и валерат, демонстрируют иммуностимулирующую активность в клетках U373

Для исследования роли SCFAs в снижении секреции IL-8, клетки U373 обрабатывали возрастающими концентрациями бутирата натрия (SB), валерата натрия (SV) и гексановой кислоты (HA).

Способы

Клетки U373 получали, как описано выше. Клетки предварительно обрабатывали в течение 1 часа указанным выше LPS с концентрацией 1 мкг/мл и инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Через 1 ч после предварительной инкубации клетки удаляли из CO₂ инкубатора и обрабатывали возрастающей концентрацией свежеприготовленного бутирата натрия (SB), валерата натрия (SV) и гексановой кислоты (HA).

Статистический анализ

Нормально распределенные данные представлены в виде среднего \pm SEM; однофакторный дисперсионный анализ (тест множественного сравнения Сидака) использовали для анализа данных, представленных в данной работе. р-Значение < 0,05 считали значимым во всех случаях.

Результаты и выводы

Исследуемые концентрации охватывали диапазон концентраций, измеряемых в бесклеточных супернатантах для различных жирных кислот, и учитывали тот факт, что только 10% вышеупомянутых супернатантов использовали в клеточных анализах. Как SB, так и SV повышали индуцированную LPS секрецию IL-8 в одних и тех же клетках (Фиг. 63), предполагая, что присутствие обоих SCFA, вероятно, способствовало индукции IL-8 при добавлении NCIMB 42787 в культуру. HA не ингибировала секрецию IL-8 после воздействия LPS. Ни одна из исследуемых SCFA сама по себе не индуцировала секрецию IL-8 выше базального уровня (контроль необработанными клетками). Разбавленная смесь из трех SCFA воспроизводила биологическую активность бесклеточного супернатанта NCIMB 42787 как в присутствии, так и в отсутствие LPS.

Соответственно, в определенных вариантах осуществления масляная и/или валериановая кислота участвуют в генерации П-8, и, таким образом, важны для стимуляции иммунной системы, например, посредством пролиферации В-клеток. Таким образом, в определенных вариантах осуществления бактериальные штаммы по данному изобретению стимулируют иммунную систему посредством продуцирования масляной и/или валериановой кислоты.

Пример 27 - SCFA, генерируемые NCIMB 42787, по меньшей мере частично отвечают за иммуностимулирующую активность

Введение

Для дальнейшего подтверждения того, что активность NCIMB 42787 обусловлена, по меньшей мере, частично, SCFA, бесклеточный супернатант бактерий фракционировали с использованием различных растворителей с возрастающей полярностью. Анализ HPLC депротенизированных неочищенных экстрактов (гексан, F5; диэтиловый эфир, F4; этилацетат, F3; ацетонитрил, F4; метанол, F1) супернатантов этого штамма проводили для анализа биохимической сложности бесклеточных супернатантов стационарной фазы NCIMB 42787, а также для субфракционирования соединений на основе полярности и растворимости.

Способы

Последовательные экстракции растворителем - приготовление неочищенных экстрактов

Три биологические повторности BCFS и YCFA+ штамма NCIMB 42787 (контроль средой) последовательно экстрагировали гексаном (HEX), диэтиловым эфиром (DE), этилацетатом (EtOAc), ацетонитрилом (ACN) и метанолом (MeOH) со степенью чистоты для HPLC. Вкратце, 20 мл BCFS помещали в стеклянные флаконы и экстрагировали при комнатной температуре (КТ) в 20 мл HEX на роторном шейкере (70 об./мин.) в течение 30 мин. Всего на каждом BCFS и YCFA+ контроле средой выполняли по три экстракции. Оставшиеся водные слои затем экстрагировали при КТ в 20 мл DE, EtOAc на роторном шейкере MX-RD-Pro (70 об./мин.) в течение 30 мин. в общей сложности три раза. Объединенные экстракты каждого образца сушили при пониженном давлении в роторном испарителе R-300, оборудованном вакуумным насосом V-300 (Büchi, Flawil, Швейцария), при температуре, не превышающей 30 °С. Полученные экстракты повторно солюбилизировали в 2 мл соответствующего растворителя и помещали аликвоты в четыре пробирки Эппендорфа на 1,5 мл (по 500 мкл каждой соответствует 5 мл исходного образца). Оставшиеся водные слои затем экстрагировали при КТ в 20 мл DE, EtOAc на роторном шейкере MX-RD-Pro (70 об./мин.) в течение 30 мин. в общей сложности три раза. Объединенные экстракты каждого образца сушили при пониженном давлении в роторном испарителе R-300, оборудованном вакуумным насосом V-300 (Büchi, Flawil, Швейцария), при температуре, не превышающей 30 °С. Полученные экстракты повторно солюбилизировали в 2 мл соответствующего растворителя и помещали аликвоты в четыре

пробирки Эппендорфа на 1,5 мл (по 500 мкл каждой соответствует 5 мл исходного образца).

Оставшиеся водные слои упаривали досуха с использованием роторного испарителя R-300. Полученные сухие экстракты экстрагировали в течение 30 мин. в 20 мл ACN в общей сложности три раза. Экстракты ACN объединяли, упаривали досуха с использованием роторного испарителя, повторно растворяли в 2 мл ACN и разделяли на аликвоты в четыре пробирки Эппендорфа на 1,5 мл (по 500 мкл каждая). Оставшиеся сухие экстракты (нерастворимая в ACN часть экстрактов) затем экстрагировали в течение 30 мин. в 20 мл MeOH в общей сложности три раза. Экстракты MeOH объединяли, упаривали досуха с использованием роторного испарителя R-300, повторно растворяли в 2 мл MeOH и разделяли на аликвоты в четыре пробирки Эппендорфа на 1,5 мл (по 500 мкл каждая).

Аликвоты неочищенных экстрактов хранили в течение ночи при -20°C , индуцируя осаждение белковых компонентов. После осаждения в течение ночи каждую аликвоту центрифугировали при 10000 g в течение 6 мин. и переносили в новую пробирку на 2 мл. Осаждение в течение ночи повторяли три раза, после чего экстракты сушили в RVC 2-18 CDPlus speedvac (Christ, Osterode am Harz, Германия) и взвешивали. Все высушенные аликвоты каждого экстракта хранили при -80°C до дальнейшего использования.

Обработка

Клетки U373 получали, как описано выше. Клетки предварительно обрабатывали в течение 1 ч с помощью 1 мкг/мл LPS, как указано выше. После этого клетки удаляли из CO_2 инкубатора и обрабатывали 100 мкл различных фракций. Фракции из среды использовали в качестве контроля. Бесклеточные супернатанты собирали через 24 ч после обработки и анализировали с помощью ELISA в отношении секреции IL-8 (как указано выше).

Статистический анализ

Нормально распределенные данные представлены в виде среднего \pm SEM; однофакторный дисперсионный анализ (тест множественного сравнения Сидака) использовали для анализа данных, представленных в данной работе. p-Значение $< 0,05$ считали значимым во всех случаях.

Результаты

Анализ HPLC подтвердил избирательную экстракцию и приближенное фракционирование соединений, присутствующих в депротеинизированных супернатантах. Нефракционированный NCIMB 42787 индуцировал секрецию IL-8 в клетках U373 как в присутствии, так и в отсутствие LPS, и такая же активность происходила под действием метанольной фракции F1, таким образом, подтверждая важную роль масляной и валериановой кислоты в продуцировании IL-8 этими типами клеток (Фиг. 64А и В).

Таким образом, как указано выше, в определенных вариантах осуществления продуцирование масляной и/или валериановой кислоты стимулировало иммунную

систему. Соответственно, в определенных вариантах осуществления бактериальные штаммы по данному изобретению стимулируют иммунную систему посредством продуцирования масляной и/или валериановой кислоты.

Пример 28 - Референтный штамм NCIMB 43387 Megasphaera значительно снижает экспрессию мРНК IDO-1 в толстом кишечнике у мышей BALB/c

На Фиг. 65 продемонстрировано, что NCIMB 43387 вызывает значительное снижение (количественно определенное с помощью qPCR, нормализованной на β -актин) экспрессии мРНК IDO-1 в толстом кишечнике мышей BALB/c по сравнению с контролем носителем.

IDO-1 участвует в стимулировании иммуносупрессии в ответ на воспаление или инфекцию. Соответственно, управление снижением экспрессии IDO-1 ассоциировано с иммуностимуляцией. Кроме того, снижение IDO-1 снижает пролиферативную и миграционную способность раковых клеток и улучшает иммунный надзор против опухолей. Таким образом, в определенных вариантах осуществления бактериальные штаммы по данному изобретению служат для снижения экспрессии IDO-1. В определенных вариантах осуществления иммуностимуляция ассоциирована со снижением экспрессии IDO-1. Кроме того, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предупреждают метастатический опухолевый рост. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению эффективны для лечения и предупреждения рака, в частности, метастатической меланомы, мелкоклеточного рака легких и аденосквамозной карциномы легких, в свете их активности против метастазов.

Пример 29 - Штаммы Megasphaera, депонированные под номерами доступа NCIMB 43385 и NCIMB 43387, снижают экспрессию мРНК Trh-1 в толстом кишечнике у мышей BALB/c

Мышам BALB/c вводили живые биотерапевтические препараты и выделяли ткани для анализа экспрессии генов с помощью qPCR.

На Фиг. 66 продемонстрирована способность композиций по данному изобретению снижать экспрессию мРНК Trh-1 (с использованием количественной оценки с помощью qPCR, нормализованной на β -актин) по сравнению с контролем носителем.

Известно, что снижение Trh-1 ассоциировано с повышенной устойчивостью к раку и снижением роста раковых клеток. Кроме того, снижение активности Trh-1 стимулирует иммунную систему, обеспечивая достаточные уровни незаменимой аминокислоты триптофана для тучных клеток для того, чтобы управлять противоопухолевым иммунитетом. Соответственно, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению снижают уровни экспрессии Trh-1. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению запускают иммуностимуляцию и лечат и/или предупреждают заболевания, раскрытые в данном документе, с помощью снижения уровней Trh-1.

Пример 30 - Штамм Megasphaera, депонированный под номером доступа NCIMB 43385, повышает продуцирование IFN γ и IL-6 при стимуляции ConA спленоцитов из мышей BALB/c

Живые биотерапевтические штаммы проверяли *ex vivo* в отношении эффективности продуцирования иммунных маркеров в спленоцитах, выделенных из мышей BALB/c и стимулированных ConA.

На Фиг. 67 продемонстрирована способность композиций по данному изобретению значительно повышать продуцирование провоспалительных цитокинов IFN γ и IL-6. Как указано выше, оба эти цитокина участвуют в стимуляции иммунного ответа. Кроме того, IFN γ обладает значительной противоопухолевой активностью.

Соответственно, как указано выше, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению повышают продуцирование IFN γ и/или IL-6 и, таким образом, направляют стимуляцию иммунного ответа. Соответственно, в определенных вариантах осуществления терапевтический эффект композиций по данному изобретению связан с повышением продуцирования IFN γ и/или IL-6.

Пример 31 - Референтный штамм Megasphaera, депонированный под номером доступа NCIMB 43385, значительно повышает экспрессию IL-6 и CD11b

Мышам BALB/c вводили живые биотерапевтические препараты и выделяли ткани для анализа экспрессии генов с помощью qPCR.

На Фиг. 68 продемонстрирована способность NCIMB 43385 значительно повышать экспрессию IL-6 и CD11b в гиппокампе мышей BALB/c по сравнению с контролем носителем.

Соответственно, как указано выше, композиции по данному изобретению в определенных вариантах осуществления повышают экспрессию провоспалительных цитокинов, участвующих в стимуляции иммунного ответа, в частности, IL-6 и CD11b. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению терапевтически эффективны в свете повышения экспрессии IL-6 и CD11b.

Пример 32 - NCIMB 42787 повышает экспрессию TLR4

Мышам BALB/c вводили живые биотерапевтические препараты и выделяли ткани для анализа экспрессии генов с помощью qPCR.

На Фиг. 69 продемонстрирована способность NCIMB 42787 значительно повышать экспрессию TLR4 в миндалевидном теле мышей BALB/c по сравнению с контролем носителем.

TLR4 ассоциирован с активацией иммунного ответа. Соответственно, повышение экспрессии TLR4 будет улучшать иммуностимуляцию. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению повышают экспрессию TLR4. В определенных вариантах осуществления повышение экспрессии TLR4 повышает иммунный ответ. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению повышают иммунный ответ и обладают терапевтическим эффектом при

лечении заболеваний, описанных в данном документе, посредством повышения экспрессии TLR4.

Последовательности

SEQ ID NO:1 (консенсусная последовательность 16S рПНК штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029)

TGAGAAGCTTGCTTCTTATCGATTCTAGTGGCAAACGGGTGAGTAACGCGTA
 AGCAACCTGCCCTTCAGATGGGGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGAATA
 CGTTCTTTCCGCCGCATGACGGGAAGAAGAAAGGGAGGCCTTCGGGCTTTCGCTGG
 AGGAGGGGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAAACGGCCCACCAAGGCGAC
 GATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAACGATGACGGCCTTCGGGTGTAAAGTTCTGTTATATGGGAC
 GAACAGGACATCGGTAAATACCCGGTGTCTTTGACGGTACCGTAAGAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA
 TTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGCATCGCAAGTCGGTCTTAAAAGTGCGGG
 GCTTAACCCCGTGAGGGGACCGAAACTGTGAAGCTCGAGTGTGGAGAGGAAAGCG
 GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAA
 AGCGGCTTTCTGGACGACAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGCAAACG
 GGATTAGATAACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGT
 ATCGACTCCTTCTGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGC
 CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGT
 GGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATTGATTGCTACGG
 AAAGAGATTTCCGGTCTTCTTCGGAAGACAAGAAAACAGGTGGTGCACGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCT
 TCTGTTGCCAGCACCTCGGGTGGGGACTCAGAAGAGACTGCCGCAGACAATGCGGA
 GGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGT
 АТАСААТGGCTCTТААТАGAGGGAAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCAA
 AACAGAGTCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCAGGAATCG
 СТАGТААТCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
 GCCCGTCAACACCACGAAAGTCATTACACCCGAAGCCGGTGAGGCAACCGCAAG

Праймеры, используемые для qPCR

Название	Прямая последовательность	Обратная последовательность
GAPDH	GGTATCGTGGAAGGACTCATG (SEQ ID NO: 2)	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC (SEQ ID NO: 3)
MAP2	CTCAGCACCGCTAACAGAGG (SEQ ID NO: 4)	CATTGGCGCTTCTCTCCTC (SEQ ID NO: 5)
GPR109a	ATGTTGGCTATGAACCGCCAG (SEQ ID NO: 6)	GCTGCTGTCCGATTGGAGA (SEQ ID NO: 7)

SEQ ID NO: 8 (консенсусная последовательность 16S рПНК штамма *Megasphaera*,

депонированного под номером доступа NCIMB 43385)

GGCTGGTTCCTTGCGGTTGCCTCACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTTTCGTGG
 TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGTATGCTGACCT
 GCGATTACTAGCGATTCTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTG
 GGACTCTGTTTTTGGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCTTCGCTTCCCTCTATTAAGAGCC
 ATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCC
 GCCTTCCTCCGCATTGTCTGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCTTAGTGCTGGCA
 ACAGAAGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
 GCTGACGACAGCCGTGCACCACCTGTTTTCTTGTCTTCCGAAGAAGAACCGGAAATC
 TCTTCCGTAGCAATCAATGTCAAGGCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCAATT
 AAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTT
 GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGAGT
 CGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAA
 TCCCGTTTGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTGTCGTCCAGAAAGCCGCT
 TTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTCACCGCTACACTAGGAATTCCG
 CTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTCACAGTTTCGGTCCCCTCACGGGGTTAAGCCCCG
 CACTTTTAAGACCGACTTGCGATGCCGCCTGCGCGCCCTTACGCCAATAAATCCG
 GACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCT
 TTCTCTTACGGTACCGTCAGGGATAACGGGTATTGACCGCTATCCTGTTTCGTCCCAT
 ATAACAGAACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAG
 ACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGT
 GTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTCATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTCGCCTTG
 GTGGGCCGTTACCCCTCCAAGTACTAGCTAATCAGACGCAAGCCCCTCCTCCAGCGAAAG
 CCCGAAGGCCTCCCTTCTTCATCCCGTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTCGGTATT
 AGCAGCCGTTTCCAGCTGTTGTCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCGTACTC
 ACCCGTTTGCCACTCGAATTGATAAGAAGCAAGCTTCTCATC

SEQ ID NO: 9 (консенсусная последовательность 16S рРНК штамма *Megasphaera
 massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 43388)

GGCTGGTTCCTTGCGGTTGCCTCACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTTTCGTGG
 TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGTATGCTGACCT
 GCGATTACTAGCGATTCTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTG
 GGACTCTGTTTTTGGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCTTCGCTTCCCTCTATTAAGAGCC
 ATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCC
 GCCTTCCTCCGCATTGTCTGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCGAGGTGCTGGC
 AACAGAAGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG
 AGCTGACGACAGCCGTGCACCACCTGTTTTCTTGTCTTCCGAAGAAGAACCGGAAAT
 CTCTTCCGTAGCAATCAATGTCAAGGCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCAATT
 AAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTT
 GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGAGT
 CGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAA

TCCCGTTTGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTGTCGTCCAGAAAGCCGCT
 TTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCG
 CTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTCACAGTTTCGGTCCCCTCACGGGGTTAAGCCCCG
 CACTTTTAAGACCGACTTGCGATGCCGCCTGCGCGCCCTTACGCCAATAATTCCG
 GACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCT
 TTCTCTTACGGTACCGTCAAAGACACCGGGTATTAACCGATGTCCTGTTTCGTCCCAT
 ATAACAGAACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCCGTACG
 ACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGT
 GTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTCATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTCGCCTTG
 GTGGGCCGTTACCCCTCCAACCTAGCTAATCAGACGCAAGCCCCTCCTCCAGCGAAAG
 CCCGAAGGCCTCCCTTTCTTCTTCCCCTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTCGGTATT
 AGCAGCCGTTTCCAGCTGTTGTCCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCGTACTC
 ACCCGTTTGCCACTAGAATCGATAAGAAGCAAGCTTCTCATGTCTTCT

SEQ ID NO: 10 (консенсусная последовательность 16S рPHK штамма *Megasphaera*
massiliensis, депонированного под номером доступа NCIMB 43389)

CGACGGCTGGTTCCTTGCGGTTGCCTCACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTTTC
 GTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGTATGCTG
 ACCTGCGATTACTAGCGATTCCCTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGA
 ACTGGGACTCTGTTTTTGGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCTTCGCTTCCCTCTATTAAG
 AGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCAT
 CCCCCTTCCCTCCGCATTGTCTGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCGAGGTGCT
 GGCAACAGAAGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
 ACGAGCTGACGACAGCCGTGCACCACCTGTTTTCTTGTCTTCCGAAGAAGAACCGBA
 AATCTCTTTCCGTAGCAATCAATGTCAAGGCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCG
 AATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCA
 GCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAG
 GAGTCGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTAT
 CTAATCCCGTTTGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTGTCGTCCAGAAAGC
 CGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAAT
 TCCGCTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTCACAGTTTCGGTCCCCTCACGGGGTTAAGC
 CCCGCACTTTTAAGACCGACTTGCGATGCCGCCTGCGCGCCCTTACGCCAATAAT
 TCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGT
 GGCTTTCCTTACGGTACCGTCAAAGACACCGGGTATTAACCGATGCCCTGTTTCGTC
 CCATATAACAGAACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCCG
 TCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
 CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTCATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTCGC
 CTTGGTGGGCCGTTACCCCTCCAACCAGCTAATCAGACGCAAGCCCCTCCTCCAGCG
 AAAGCCCGAAGGCCTCCCTTTCTTCTTCCCCTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTCGG
 TATTAGCAGCCGTTTCCAGCTGTTGTCCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCGTT

ACTCACCCGTTTGCCACTAGAAATCGATAAGAAGCAAGCTTCTCATGTCTTCTCGTTC
GACTTGCAT

SEQ ID NO: 11 (консенсусная последовательность 16S рРНК штамма *Megasphaera*, депонированного под номером доступа NCIMB 43386)

CGACGGCTGGTTCCTTGCGGTTGCCTCACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTTTC
GTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGTATGCTG
ACCTGCGATTACTAGCGATTCCCTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGA
ACTGGGACTCTGTTTTTGGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCTTCGCTTCCCTCTATTAAG
AGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCAT
CCCCGCCTTCCCTCCGCATTGTCTGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCTTAGTGCT
GGCAACAGAAGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
ACGAGCTGACGACAGCCGTGCACCACCTGTTTTCTTGTCTTCCGAAGAAGAACCGGA
AATCTCTTCCGTAGCAATCAATGTCAAGGCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCG
AATTAACACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCA
GCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAG
GAGTCGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTAT
CTAATCCCGTTTGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTGTCGTCCAGAAAGC
CGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAAT
TCCGCTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTACAGTTTCGGTCCCCTCACGGGGTTAAGC
CCCGCACTTTTAAGACCGACTTGCATGCCGCCTGCGCGCCCTTACGCCAATAAT
TCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGT
GGCTTCTCTTACGGTACCGTCAGGGATAACGGGTATTGACCGCTATCCTGTTCGTC
CCATATAACAGAACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCCG
TCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTCGC
CTTGGTGGGCCGTTACCCCTCCAAGTAGCTAATCAGACGCAAGCCCCTCCTCCAGCG
AAAGCCCGAAGGCCTCCCTTTCTTTCATCCCGTTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTCGG
TATTAGCAGCCGTTTCCAGCTGTTGTCCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCGTT
ACTCACCCGTTTGCCACTCGAATTGATAAGAAGCAAGCTTCTCATCTCTTCTCGTTTCG
ACTGCA

SEQ ID NO: 12 (консенсусная последовательность 16S рРНК штамма *Megasphaera*, депонированного под номером доступа NCIMB 43387)

TCGAACGGCTGGTTCCTTGCGGTTGCCTCACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTT
TCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGTATGC
TGACCTGCGATTACTAGCGATTCCCTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCC
GAACTGGGACTCTGTTTTTGGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCTTCGCTTCCCTCTATTA
AGAGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGT
CATCCCCGCCTTCCCTCCGCATTGTCTGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCTTAGT
GCTGGCAACAGAAGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAGCCGTGCACCACCTGTTTTCTTGTCTTCCGAAGAAGAACC

GGAAATCTCTTTCCGTAGCAATCAATGTCAAGGCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCG
 TCGAATTAAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT
 CAGCCTTGCGGGCCGTA CTCCCCAGGCGGGATACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGA
 AGGAGTCGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGT
 ATCTAATCCCGTTTGTCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTGTCGTCCAGAAA
 GCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCGCTACACTAGGA
 ATCCGCTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTCACAGTTTCGGTCCCCTCACGGGGTTAA
 GCCCCGCACTTTTAAGACCGACTTGCGATGCCGCCTGCGCGCCCTTTACGCCCAATA
 ATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCC
 GTGGCTTCTCTTACGGTACCGTCAGGGATAACGGGTATTGACCGCTATCCTGTTCG
 TCCCATATAACAGA ACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTC
 CGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG
 GGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTCATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTC
 GCCTTGGTGGGCCGTTACCCCTCCA ACTAGCTAATCAGACGCAAGCCCCTCCTCCAG
 CGAAAGCCCGAAGGCCTCCCTTTCTTCATCCCGTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTC
 GGTATTAGCAGCCGTTTCCAGCTGTTGTCCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCG
 TTA CTACCCGTTTGGCACTCGAATTGATAAGAAGCAAGCTTCTCATCTCTTCTCGTT
 CGACTTGCA

Праймеры, используемые для qPCR енолазы

Название	Прямая последовательность	Обратная последовательность
NSE	CCCTGTATCGTAAGAACGGT (SEQ ID NO: 13)	GCCACCATTGATCACGTTGA (SEQ ID NO: 14)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [i] Spor et al. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [ii] Eckburg et al. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [iii] Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [iv] Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [v] Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [vi] Frank et al. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [vii] Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [viii] Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [ix] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [x] WO 2013/050792
- [xi] WO 03/046580
- [xii] WO 2013/008039
- [xiii] WO 2014/167338
- [xiv] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [xv] Azad et al. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [xvi] Padmanabhan et al. (2013) *Standards in Genomic Sciences* 8:525-538
- [xvii] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [xviii] Srůtková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [xix] Kondělková et al. (2010) *Acta Medica (Hradec Kralove).*;53(2):73-7.
- [xx] Zhang et al. (2016) *BMC Gastroenterol.*; 16: 84.
- [xxi] Ren and Torres (2009) *Brain Res Rev.*;60(1):57-64
- [xxii] Martinon et al. (2002) *Mol Cell.*;10(2):417-26.
- [xxiii] Murphy et al. (2003) *J Exp Med.* 2003; 198(12): 1951-1957.
- [xiv] Chan et al. (2006) *J Exp Med.*; 203(12): 2577-2587.
- [xv] *The Immune Response Basic and Clinical Principles*, 1st Edition (2006)
- [xvi] Hoover et al. (2002) *J Biol Chem.* 277(40):37647-54.
- [xvii] Kaser et al. (2004) *J Clin Immunol.*;24(1):74-85.
- [xviii] Gaur and Aggarwal (2003). *Biochem Pharmacol.*;66(8):1403-8.
- [xix] Wang and Lin (2008) *Acta Pharmacol Sin.*; 29(11): 1275-1288.
- [xxx] Tanaka et al. (2014) *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 6(10): a016295.
- [xxxii] Bettelli et al. (2006) *Nature* 441:235-238
- [xxxiii] Menezes and Luskin (1994) *Journal of Neuroscience*, 14 (9) 5399-5416;
- [xxxiv] Bhat et al. (2006) *Nucleic Acids Res.*;34(13):3819-32.
- [xxxv] Andreeff et al. (2003), *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition.
- [xxxvi] Soltani MH et al, (2005) *Am J Pathol*;166:1841-50
- [xxxvii] Jandaghi et al. (2016) *Gastroenterology*;151(6):1218-1231.
- [xxxviii] Pornour et al. (2015) *Recent Pat Anticancer Drug Discov.*;10(2):214-23.
- [xxxix] Sachlos et al. (2012) *Cell.*;149(6):1284-97
- [xl] Li et al. (2014), *Oncotarget.*;5(4):882-93.

- [xl] Visnyei et al. (2011) *Mol Cancer Ther.*;10(10):1818-28.
- [xli] Cheng et al. (2015) *Cell Death Dis.*;6:e1753
- [xlii] Shin et al. (2012) *Biol Pharm Bull.* ;35(7):1069-75.
- [xliii] Chen et al. (2011) *PLoS One.*;6(11):e27186
- [xliv] Arvigo et al. (2010) *J Endocrinol.* ;207(3):309-17.
- [xlv] Mao et al. (2015) *J Obstet Gynaecol Res.*;41(8):1240-5
- [xlvi] Park et al. (2014) *Oncotarget.*;5(13):4929-34.
- [xlvii] Spengler et al. (2011) *Anticancer Res.*;31(12):4201-5.
- [xlviii] Mu et al. (2014) *Oncol Rep.*;31(5):2107-14.
- [xlix] Prabhu et al. (2017) *Neuro-Oncology*, 19(6) vi60
- [l] Devarajan et al. (2002) *Oncogene*. 12;21(57):8843-51.
- [li] Bell and Megeney (2017) *Cell Death Differ.*;24(8):1359-1368.
- [lii] Gerl and Vaux (2005) *Carcinogenesis*. 2005 Feb;26(2):263-70.
- [liii] Barnes et al. (2005) *Eur Respir J*. 25:552-563.
- [liv] Gray SG, Dangond F. (2006) *Epigenetics*. 1:67-75.
- [lv] Grabiec et al. (2008) *Arthritis Res Ther*.10:226.
- [lvi] Saito et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:4592-4597.
- [lvii] Butler et al. (2000) *Cancer Res*. 60:5165-5170.
- [lviii] Mwakwari et al. (2010) *Curr Top Med Chem*. 10 (14): 1423-40.
- [lix] Monneret C. (2007) *Anti-Cancer Drugs*. 18 (4): 363-70.
- [lx] Chun, (2015) *Arch Pharm Res*. 38(6):933-49.
- [lxi] Abel and Zukin (2008) *Curr Opin Pharmacol*, 2008. 8(1): 57-64.
- [lxii] PCT/EP2018/065858
- [lxiii] Toshkov et al. (2017) *Radiat Res*. 187(5):570-580
- [lxiv] Tanaka and Sakaguchi (2017) *Cell Res.*;27(1):109-118.
- [lxv] Allen et al. (2010) *J Exp Med.*;207(5):1045-56.
- [lxvi] Haabeth et al. (2012) *OncoImmunology* 1(1):1146-1152.
- [lxvii] Lejeune et al. (2006) *Cancer Immun.* 6:6
- [lxviii] Pace et al. (1983) *PNAS*. 80:8782-6.
- [lxix] Sgadari et al. (1996) *PNAS*. 93:13791-6.
- [lxx] Arenberg et al. (1996) *J. Exp. Med.* 184:981-92.
- [lxxi] Sgadari et al. (1997) *Blood*. 89:2635-43.
- [lxxii] Liu et al., (2018) *Acta Pharmaceutica Sinica B*; 8, 4; 552-562
- [lxxiii] Jones et al. (2017). *J Clin Oncol*. 2017 Aug 10; 35(23): 2624-2630
- [lxxiv] Ascierto et al. (2012) *Journal of Translational Medicine*. 10, 85
- [lxxv] <https://www.uniprot.org/uniprot/P15056>
- [lxxvi] Soltani MH et al, (2005) *Am J Pathol*;166:1841-50
- [lxxvii] Xie (2016); *Med Res Rev*; 36,2: 300-312
- [lxxviii] Bloch et al. (2016) *Eur Cytokine Netw.*;27(3):63-67
- [lxxix] Mohanty et al. (2015) *J Infect Dis*, 211(7) 1174-1184.

- [lxxx] Fernandez-Ruiz et al.,(2015) *Vaccine* 2015 33(51)
- [lxxxii] Morel et al.,(2011) *Vaccine*, 29(13) 2461-2473.
- [lxxxiii] Leal et al.,(2001) *Immunol* 103(3) 375-381
- [lxxxiiii] Knudsen et al. (2016), *Sci Repts*, 6 (19570).
- [lxxxv] Su et al.,(2008) *Vaccine* 26(40), 5111-22
- [lxxxvi] Song, *Mol Ther* 2007
- [lxxxvii] Li et al, (2007) *J Immunol*, 178(8), 5271-5276
- [lxxxviii] Coffman et al.,(2012) *Immunity* 33(4) 492-503
- [lxxxix] Ruan et al. (2014) *Acta Virol.* 58(4):356-8
- [lxxxix] Wang et al. (2016) *Oncotarget.* 20; 7(51)
- [xc] Fraietta, *Nat Med* 2018
- [xci] Zhou, *Blood* 2010
- [xcii] Glenn and Whartenby (2014) *World J Stem Cells.*; 6(5): 526-539.
- [xciii] Heng et al. (2004) *Cardiovasc Res.* 2004 Apr 1;62(1):34-42.
- [xciv] Fulop et al
- [xcv] Bektas et al. (2017) *J Leukoc Biol.*;102(4):977-988.
- [xcvi] Fulop et al (2016) *Rev Invest Clin.*;68(2):84-91.
- [xcvii] Fulop et al. (2018) *Front Immunol.*;8:1960.
- [xcviii] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- [xcix] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [c] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [ci] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [cii] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [ciii] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- [civ] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [cv] *Handbook of Microbiological Media*, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [cvi] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [cvii] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [cviii] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [cix] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [cx] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [cxi] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)

[cxii] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[cxiii] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)

[cxiv] Ausubel et al. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).

[cxv] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)

[cxvi] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30

[cxvii] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489

[cxviii] Johnsen et al (2017) *Journal of Chromatography A*. 1503: 57-64

[cxix] West and Johnstone (2014) *J Clin Invest.* 124, 30-39

[cxx] Glauben et al. (2006) *J Immunol*, 176: 5015-5022

[cxxi] Angiolilli et al. (2017) *Ann Rheum Dis*, 76: 277-285

[cxxii] Gonneaud et al. (2014) *J Inflamm*, 11: 43

[cxxiii] Alenghat et al. (2013) *Nature*, 504: 153-157

[cxxiv] Felice et al. (2015) *Ailment Pharmacol Ther*, 41: 26-38

[cxxv] Gagnon et al (2013) *J Microbiological Methods*. 94: 274-279

[cxxvi] Thangaraju et al. (2009). *Cancer Res.* 67, 9: 2826-2832

[cxxvii] Livak & Schmittgen (2001). *Methods*. 25,4:402-8

[cxxviii] Johnsen et al (2017) *Journal of Chromatography A*. 1503: 57-64

[cxxix] Vizin and Kos (2015) *Radiol Oncol*. 49(3): 217-226

[cxxx] Selvan et al. (2008) *AACR Annual Meeting* Apr 12-16, 2008

[cxxxii] Bonner et al. (2000) *Clinical Cancer Research* 6:597-601

[cxxxiii] Zhi et al. (2016) *Oncotarget*. 7(40):64798-64809

[cxxxiiii] De Baere et al. (2013) *J Pharm Biomed Anal*, 80: 107-115

[cxxxv] Smart et al. (2010) *Nat Protoc*, 5(10), 1709-1729

[cxxxvi] Johnsen et al. (2017) *J Chromatogr A*, 1503, 57-64

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в стимуляции иммунной системы у субъекта.
2. Композиция по п. 1 для применения в лечении или профилактике рака, такого как метастатическая меланома, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, нейробластома, глиобластома, карцинома, рак легких, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак предстательной железы, лимфома, рак желудка, колоректальный рак и/или гематологические злокачественные новообразования.
3. Композиция для применения по п. 2, отличающаяся тем, что указанная композиция обладает ингибирующей гистондеацетилазу активностью.
4. Композиция для применения по п. 2 или п. 3, отличающаяся тем, что указанная композиция активизирует провоспалительные цитокины.
5. Композиция для применения по любому из пп. 2-4 для применения для снижения проницаемости кишечного барьера.
6. Композиция по п. 1 для применения в лечении, предупреждении или задержке старения иммунной системы.
7. Композиция по п. 1 для применения в качестве адъюванта вакцины.
8. Композиция по п. 1 для применения в усилении клеточной терапии, такой как CAR-T.
9. Композиция по любому из предыдущих пунктов для применения в повышении уровня экспрессии и/или активности каспазы 3, MAP2, IL-1 β , IL-23 и/или TNF- α .
10. Композиция по любому из предыдущих пунктов для применения в способе выборочного снижения количества и/или процента Treg в популяции клеток.
11. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16S рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16S рРНК бактериального штамма рода *Megasphaera*.
12. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12, или отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, представленную любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12.
13. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой *Megasphaera massiliensis*.
14. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 1, или отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, представленную SEQ ID NO: 1.

15. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа 42787.

16. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для перорального введения.

17. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей или носителей.

18. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм является лиофилизированным.

19. Продукт питания, содержащий указанную композицию по любому из предыдущих пунктов, для применения по любому из предыдущих пунктов.

20. Способ лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния со сниженной иммуностимуляцией, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Megasphaera*, пациенту, нуждающемуся в этом.

21. Композиция, содержащая клетку бактериального штамма по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что указанная клетка экспрессирует один или несколько гетерологичных антигенов.

22. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что указанная клетка презентует один или несколько гетерологичных антигенов.

23. Композиция по п. 21 или п. 22 для применения в качестве вакцины.

24. Клетка бактериального штамма определенная согласно любому из пп. 1-18, отличающаяся тем, что указанная клетка экспрессирует один или несколько гетерологичных антигенов.

25. Клетка по п. 24, отличающаяся тем, что указанная клетка презентует один или несколько гетерологичных антигенов.

26. Клетка по п. 24 или п. 25 для применения в качестве вакцины.

27. Бактериальный штамм для применения в терапии, при этом бактериальный штамм имеет последовательность 16S рПНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12.

28. Бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рПНК, представленную любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12, для применения в терапии.

По доверенности

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(по статье 34(2)БРСТ для сведений)

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в стимуляции иммунной системы у субъекта, где бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, которая по меньшей мере на 97% идентична SEQ ID NO: 1.

2. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, где бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1; (a) для применения при лечении или профилактике рака; (b) для применения для лечения, профилактики или задержки иммунного старения; (c) для применения в качестве адъюванта вакцины; или (d) для применения в терапии химерных антигенных рецепторов Т-клеток (CAR-T), терапии мезенхимальных стволовых клеток (MSC) или терапии трансплантации стволовых клеток.

3. Композиция для применения по п. 1 или 2 для применения в лечении или профилактике рака, такого как метастатическая меланома, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, нейробластома, глиобластома, карцинома, рак легких, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак предстательной железы, лимфома, рак желудка, колоректальный рак и/или гематологические злокачественные новообразования.

4. Композиция для применения по п. 3, отличающаяся тем, что указанная композиция обладает ингибирующей гистондеацетилазу активностью.

5. Композиция для применения по п. 3 или п. 4, отличающаяся тем, что указанная композиция активизирует провоспалительные цитокины.

6. Композиция для применения по п. 1 или 2 для применения в лечении, предупреждении или задержке старения иммунной системы.

7. Композиция для применения по п. 1 или 2 для применения в качестве адъюванта вакцины.

8. Композиция для применения по п. 1 или 2 для применения в терапии CAR-T, MSC или трансплантации стволовых клеток.

9. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, которая по меньшей мере на 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12, или отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, представленную любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12.

10. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой *Megasphaera massiliensis*.

11. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена 16s рРНК, которая по меньшей мере на 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 1, или отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность гена

16s рPHК, представленную SEQ ID NO: 1.

12. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа 42787.

13. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для перорального введения.

14. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей или носителей.

15. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм является лиофилизированным.

16. Продукт питания, содержащий указанную композицию для применения по любому из предыдущих пунктов, для применения по любому из предыдущих пунктов.

17. Композиция, содержащая клетку бактериального штамма по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что указанная клетка экспрессирует один или несколько гетерологичных антигенов, для применения в качестве вакцины.

18. Композиция для применения по п. 17, отличающаяся тем, что указанная клетка презентует один или несколько гетерологичных антигенов.

19. Клетка бактериального штамма определенная согласно любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что указанная клетка экспрессирует один или несколько гетерологичных антигенов, для применения в качестве вакцины.

20. Клетка по п. 19, отличающаяся тем, что указанная клетка презентует один или несколько гетерологичных антигенов.

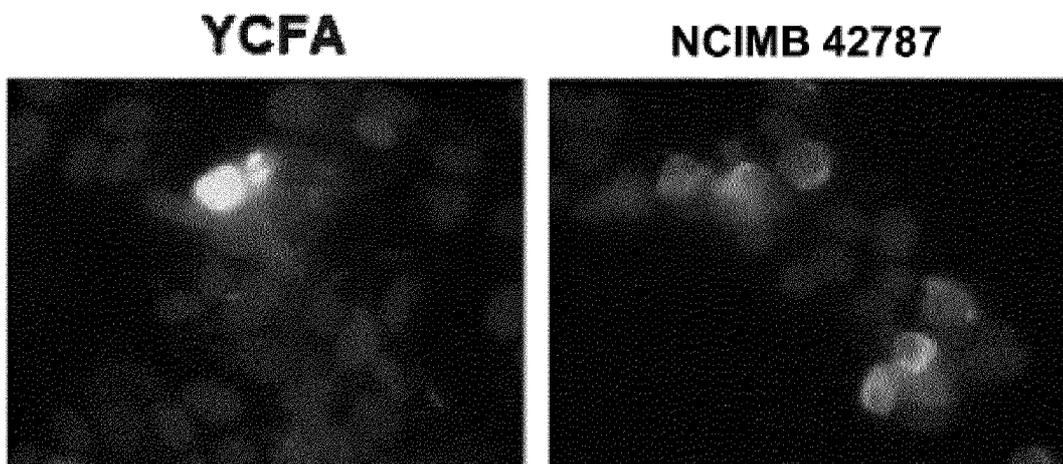
21. Бактериальный штамм для применения в терапии, при этом бактериальный штамм имеет последовательность 16S рPHК, которая по меньшей мере на 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12.

22. Бактериальный штамм, имеющий последовательность 16S рPHК, представленную любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12, для применения в терапии.

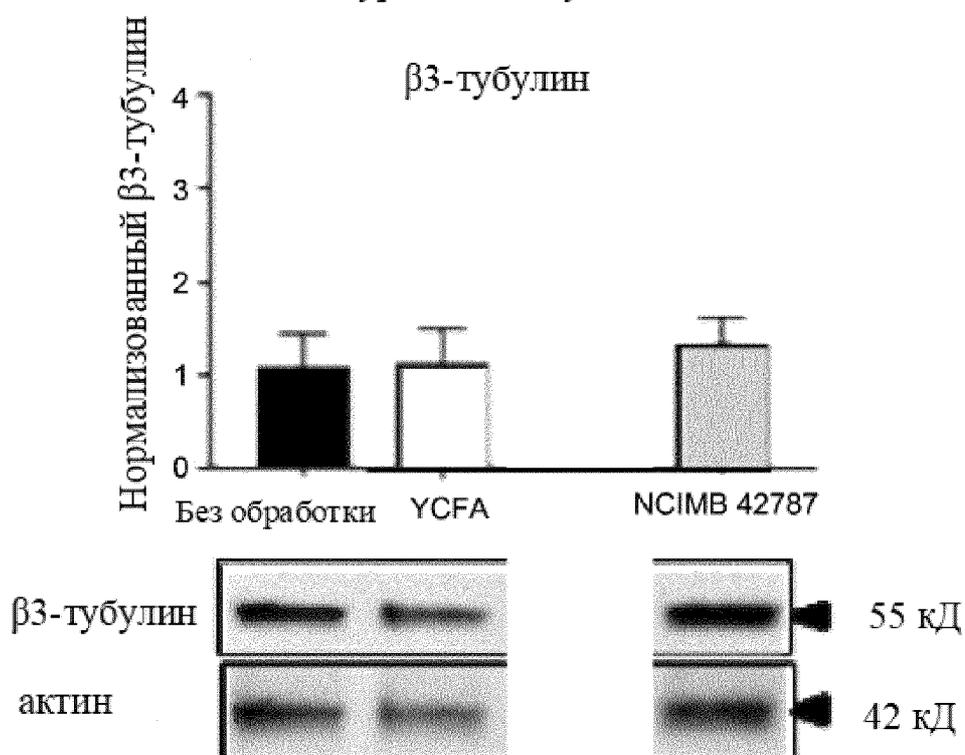
1/72

Фигура 1: Уровень экспрессии β 3-тубулина

Фигура 1А: Иммуномечение и визуализация клеток

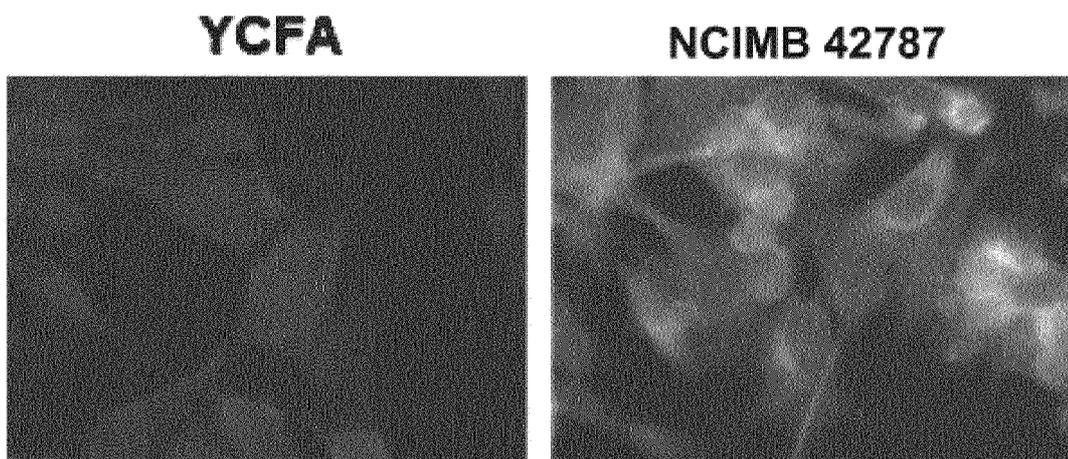


Фигура 1В: Иммуноблоттинг

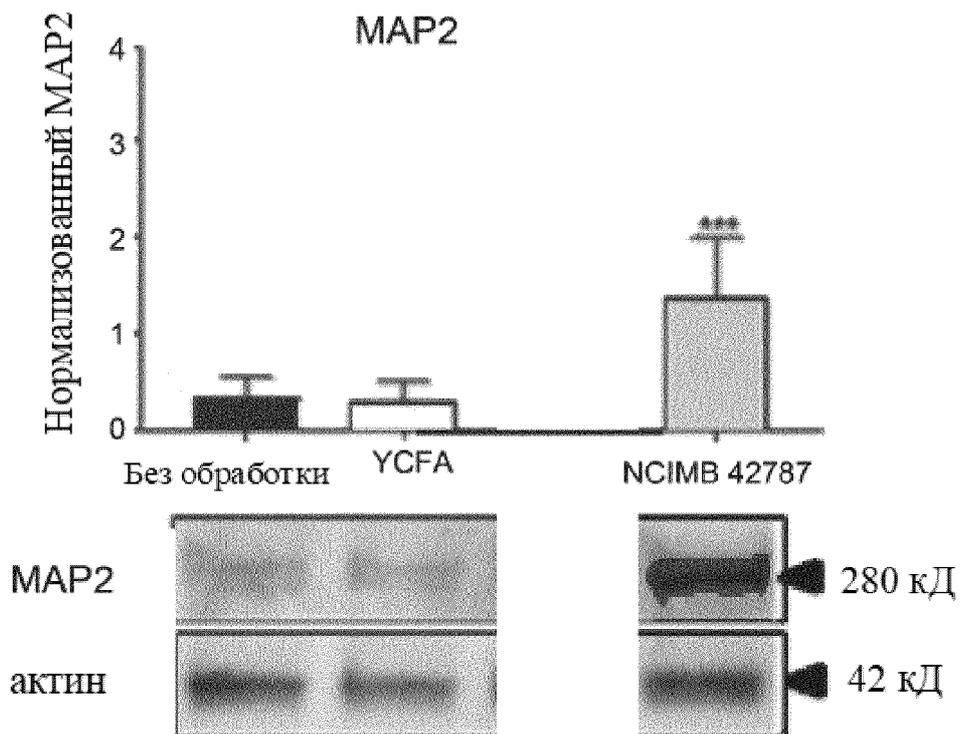


Фигура 2: Уровень экспрессии MAP2

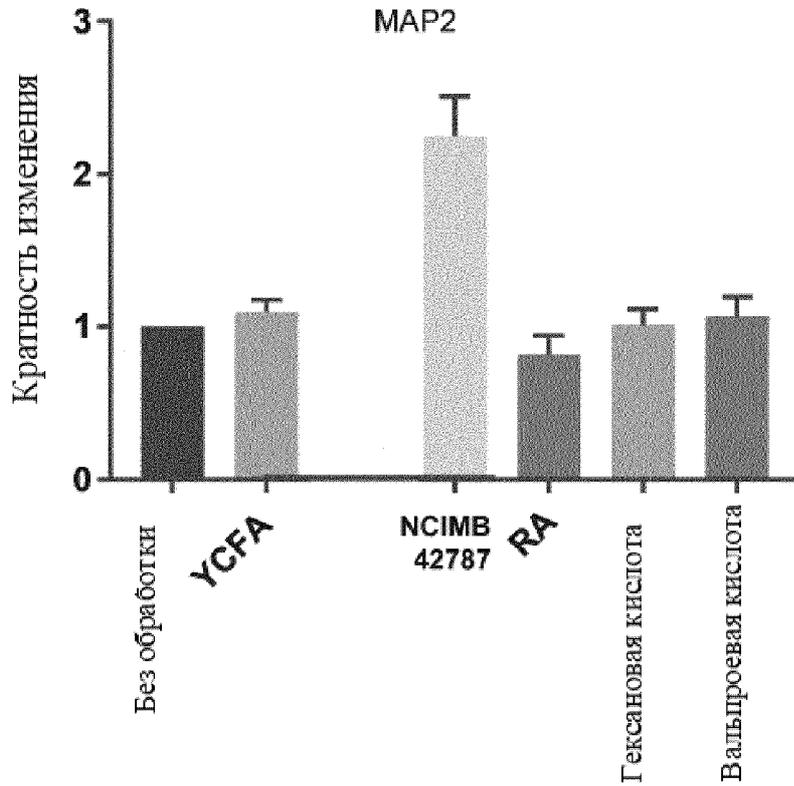
Фигура 2А: Иммуномечение и визуализация клеток



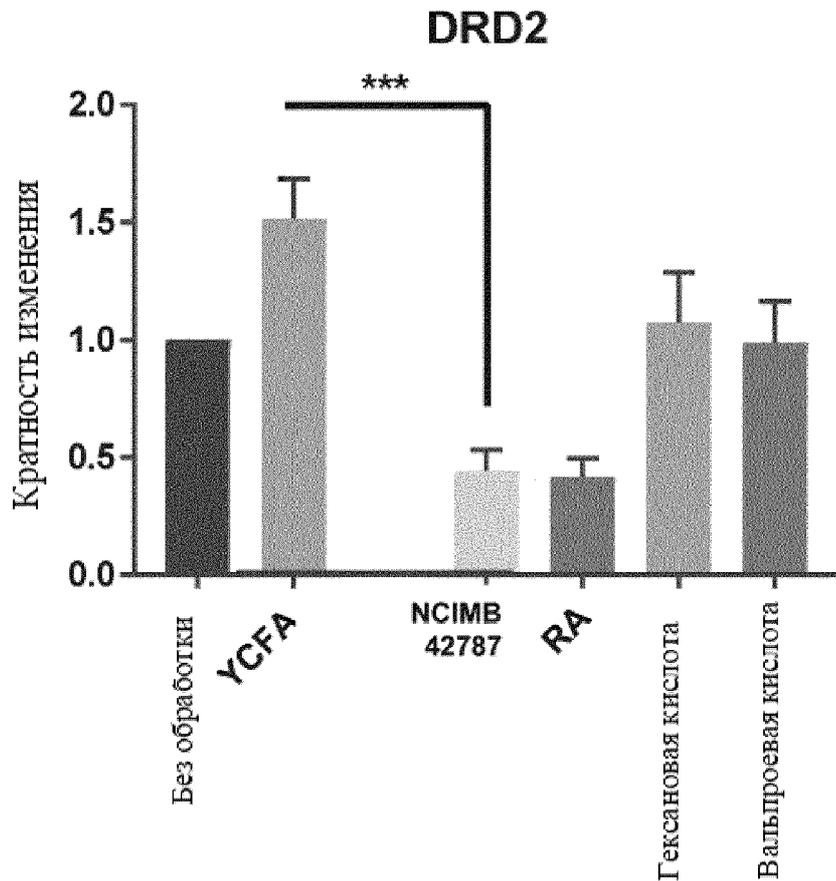
Фигура 2В: Иммуноблоттинг



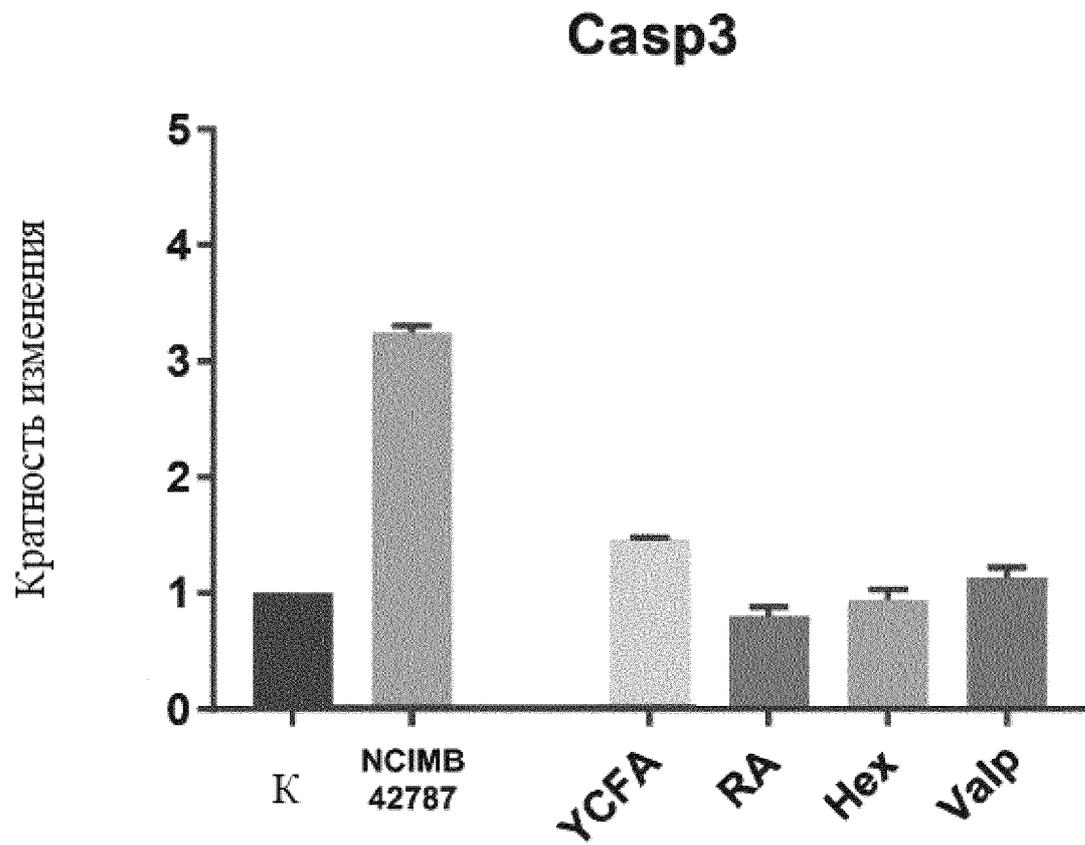
Фигура 2С: Кратность изменения экспрессии



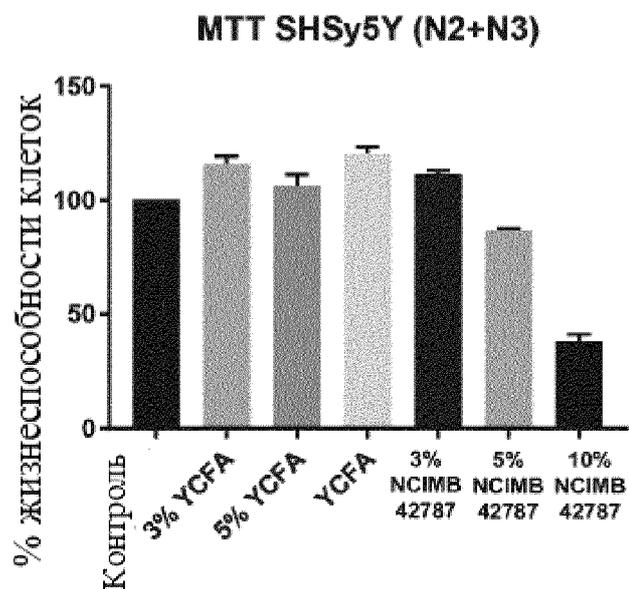
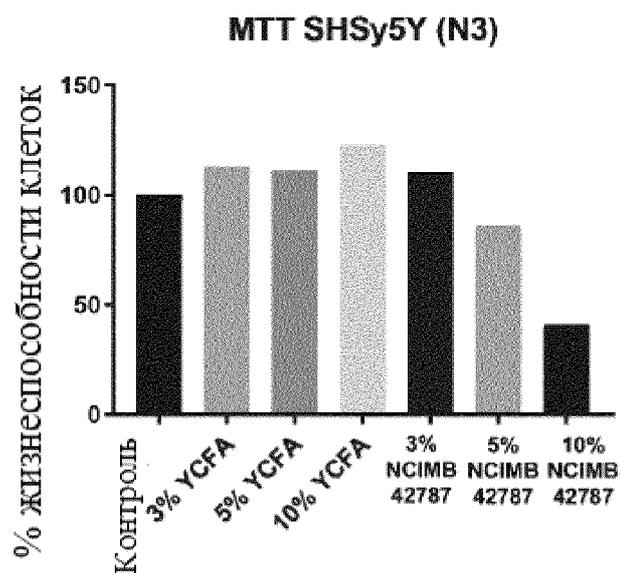
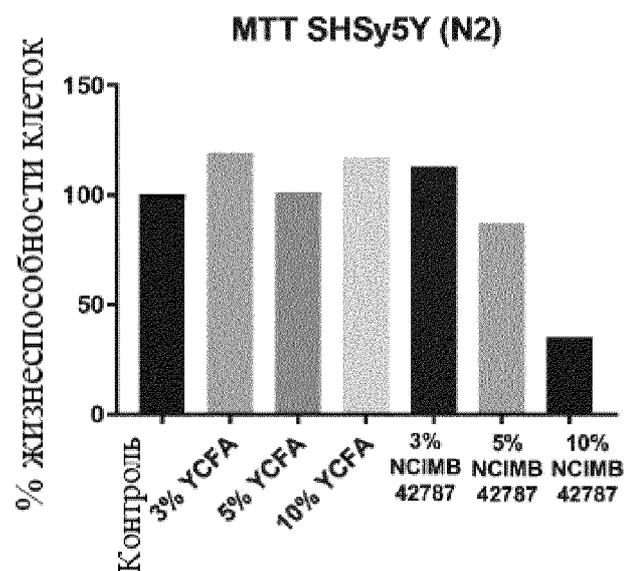
Фигура 3: Изменение экспрессии DRD2



Фигура 4: Изменение экспрессии Casp3

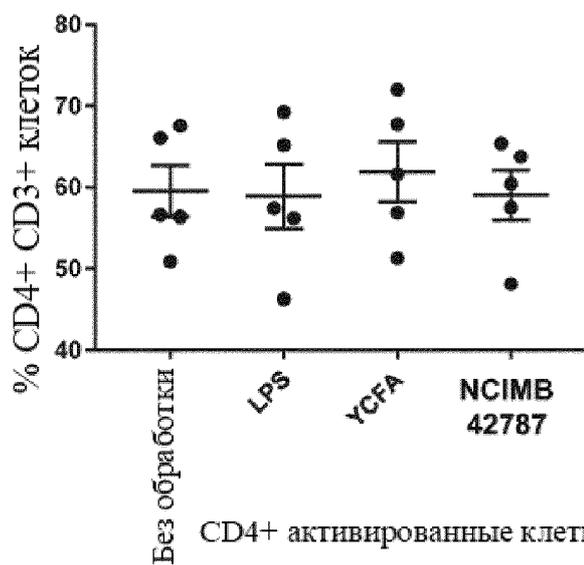


Фигура 5: Изменение жизнеспособности клеток

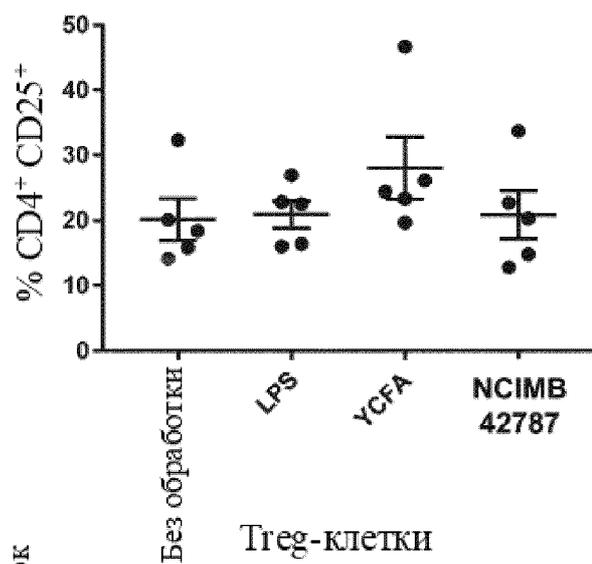


Фигура 6: Фенотипирование клеток

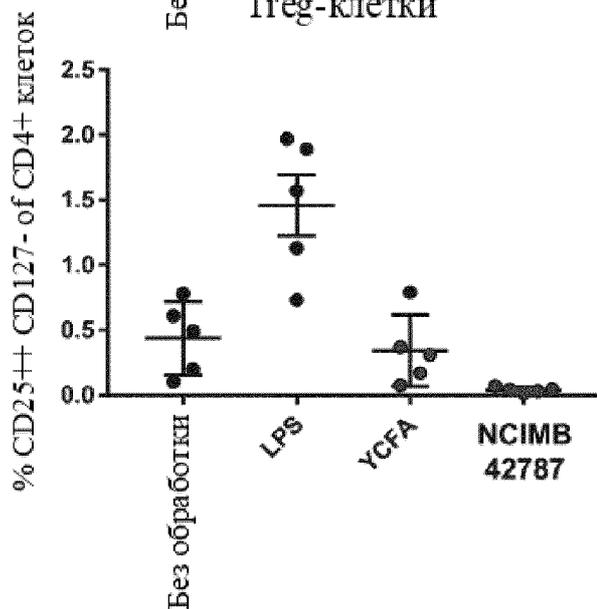
CD4 T-клетки-хелперы



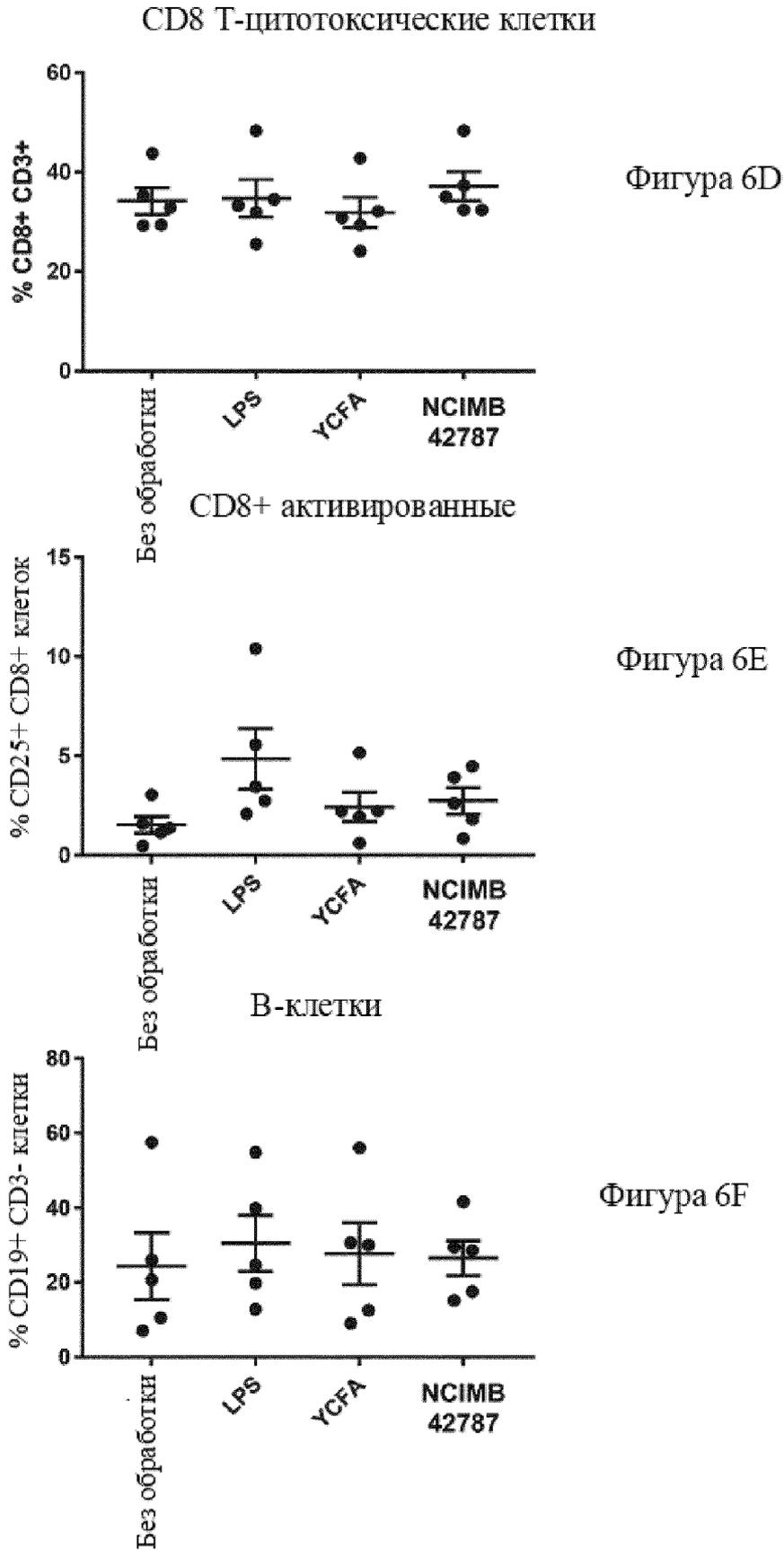
CD4+ активированные клетки



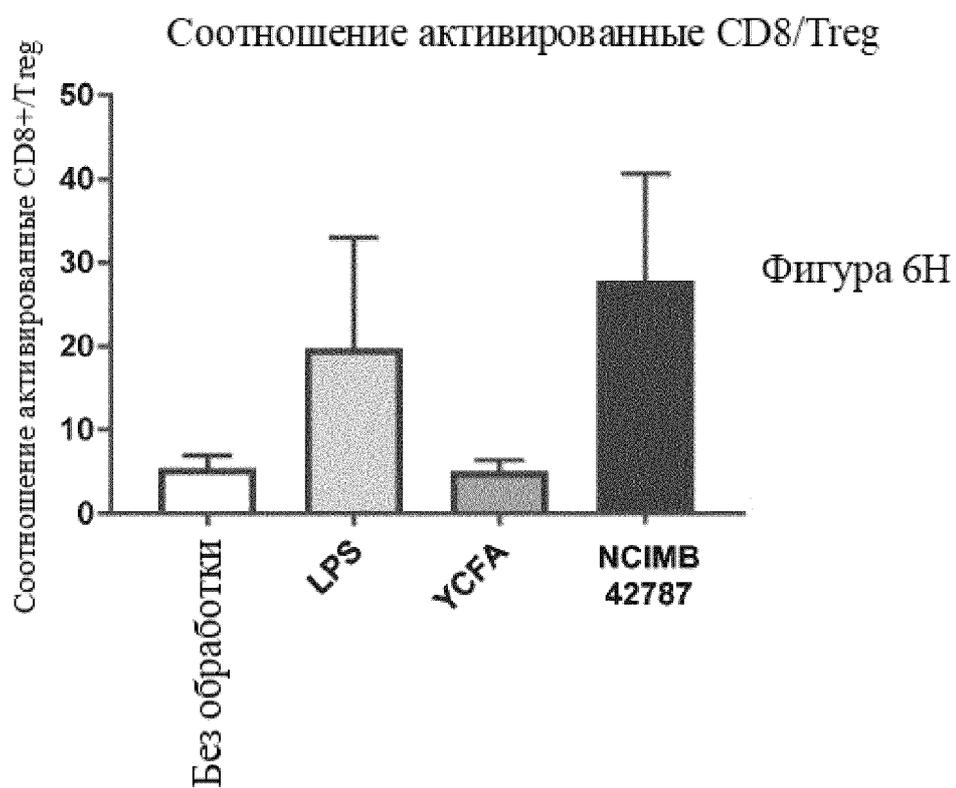
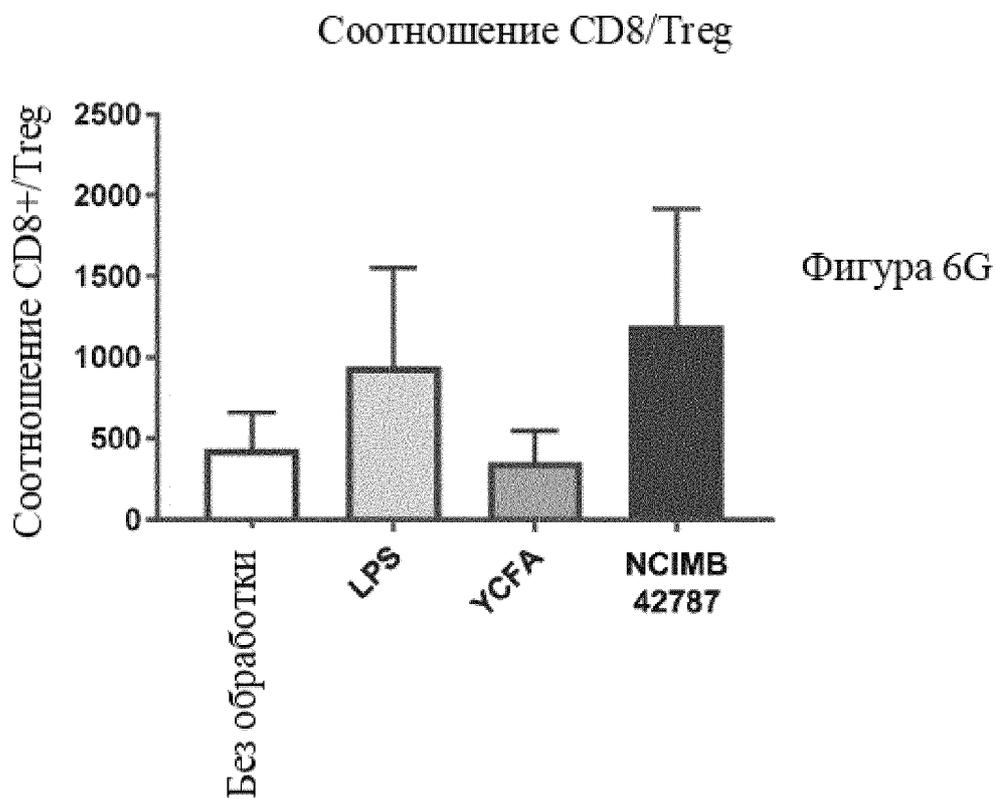
Treg-клетки



Фигура 6: Фенотипирование клеток

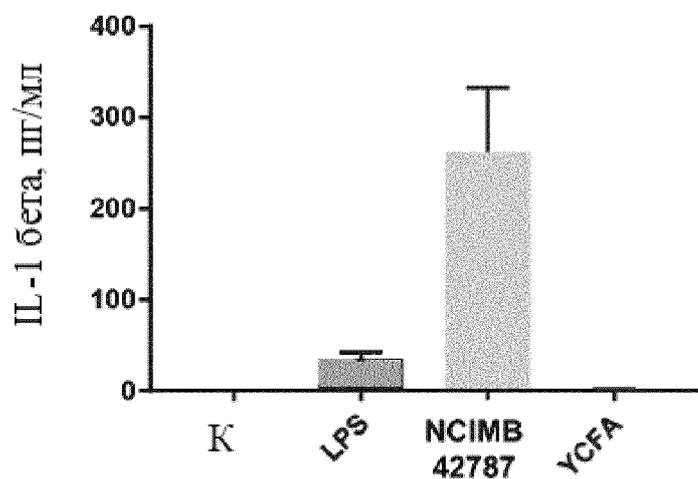


Фигура 6: Фенотипирование клеток



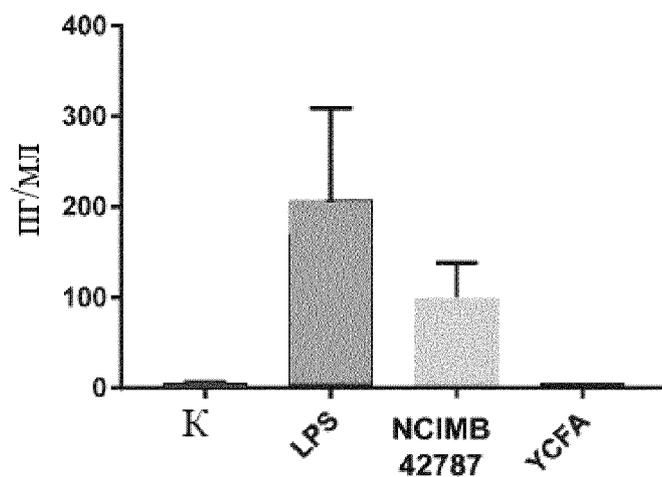
Фигура 7: Анализ цитокинов

IL-1 бета



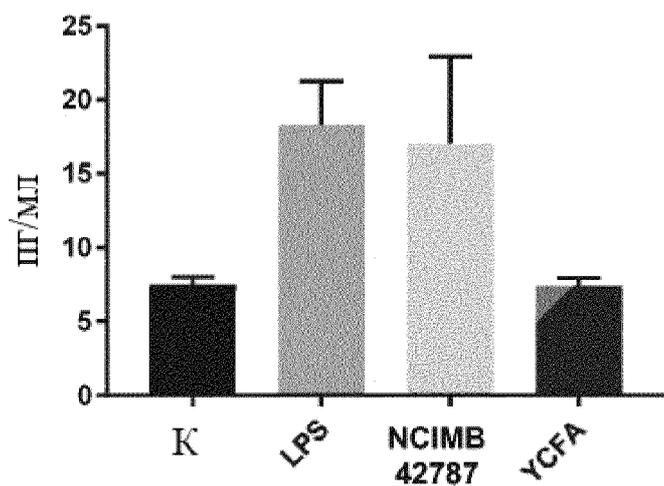
Фигура 7А

TNF-a



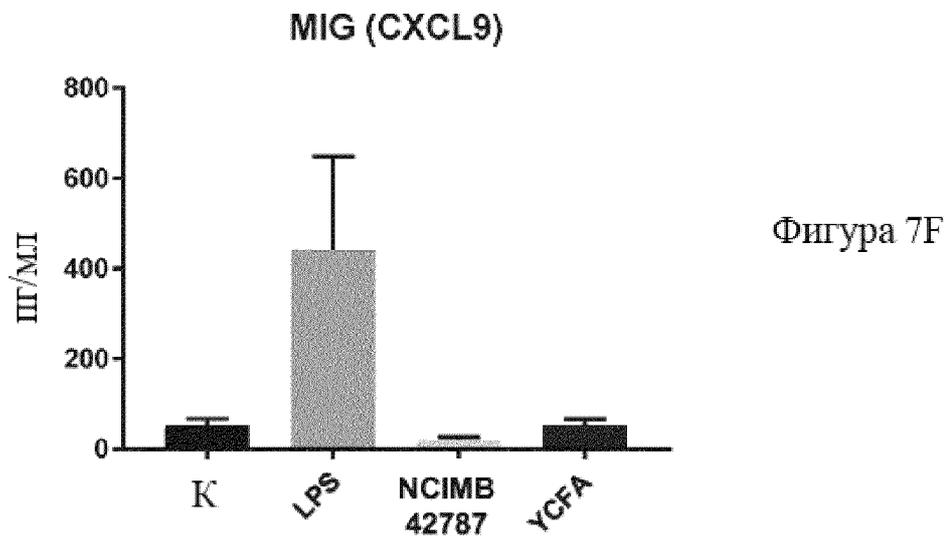
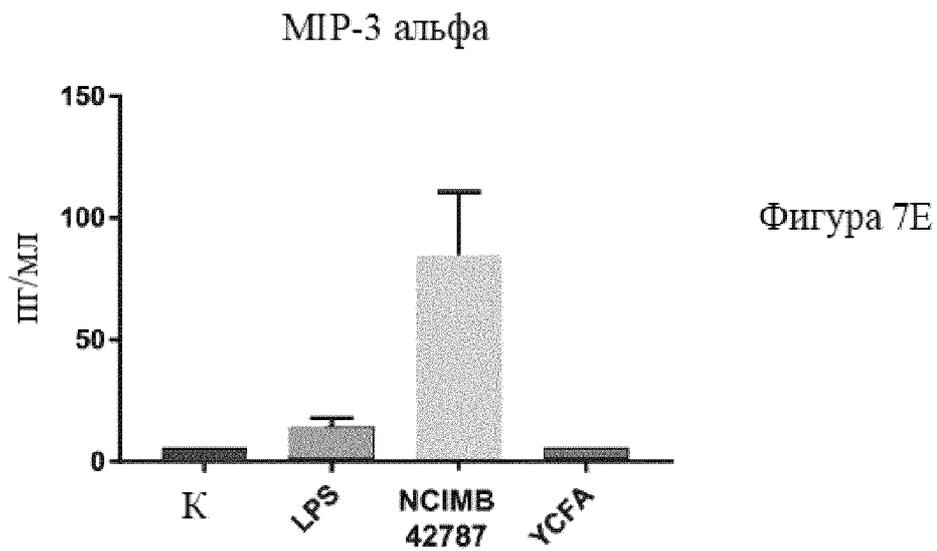
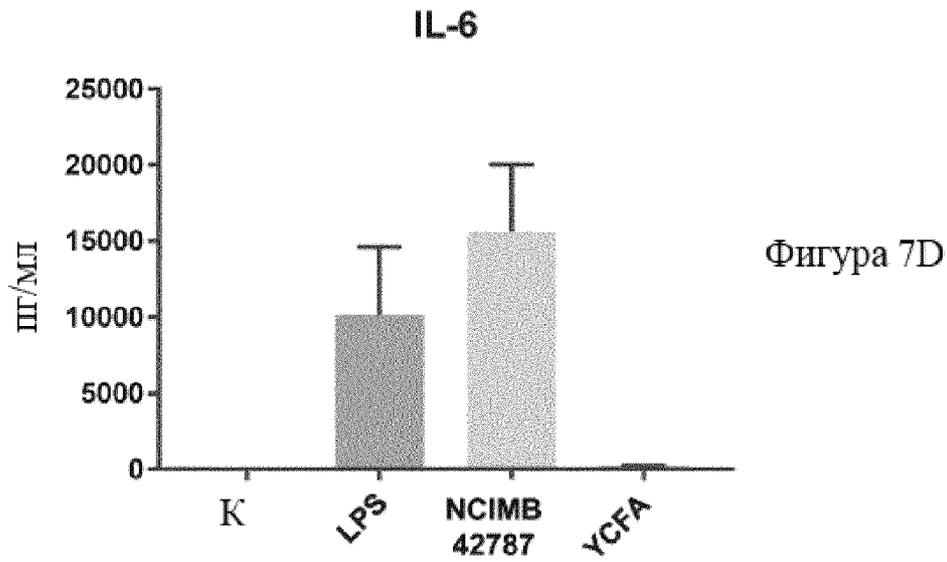
Фигура 7В

IL-23

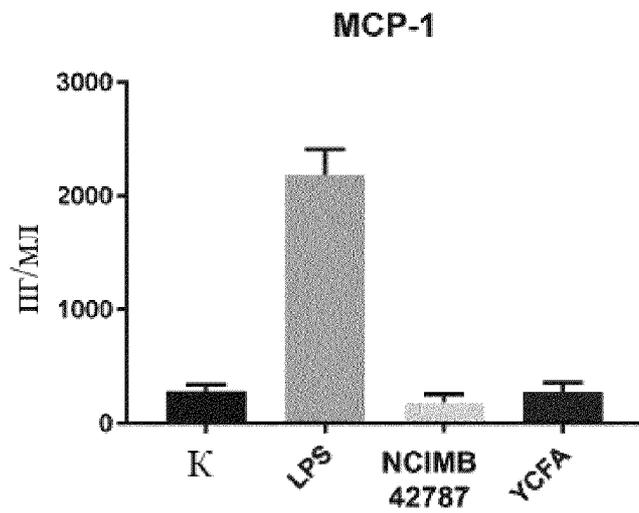


Фигура 7С

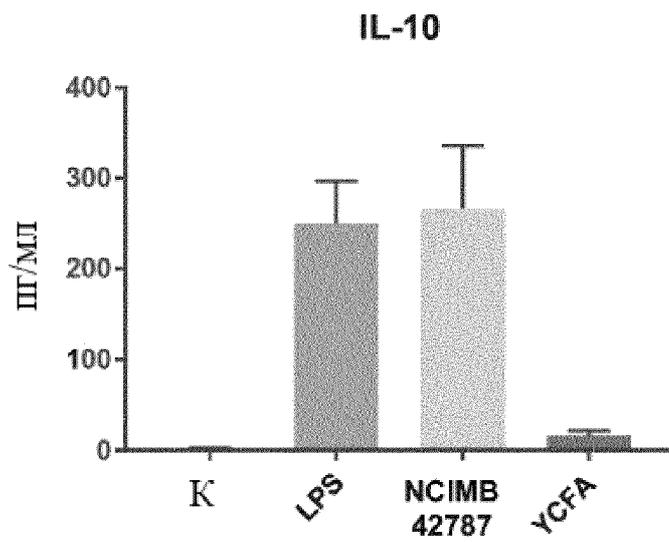
Фигура 7: Анализ цитокинов



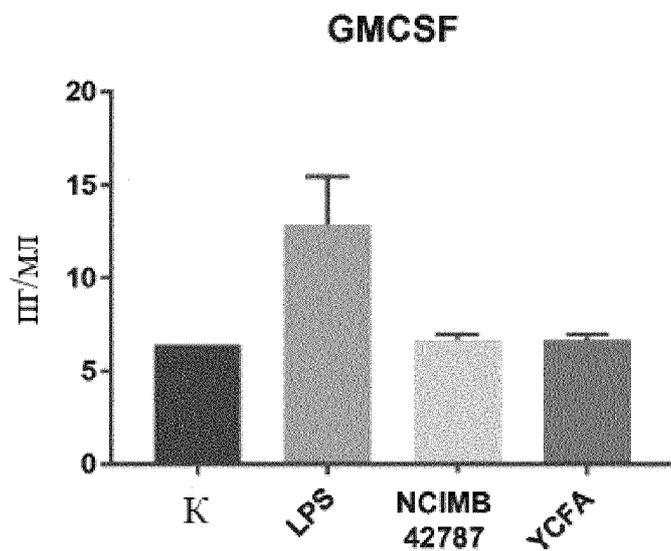
Фигура 7: Анализ цитокинов



Фигура 7G



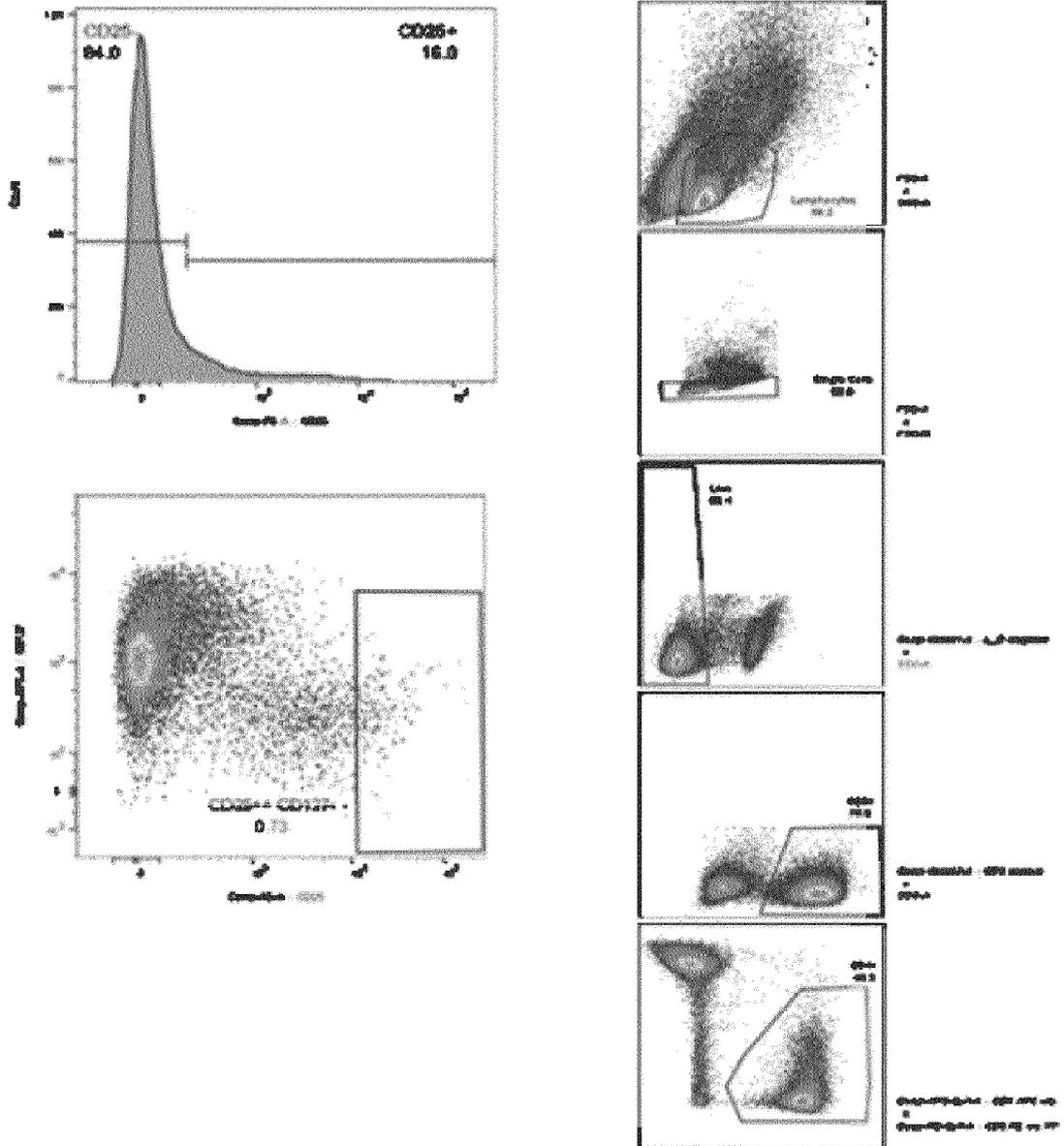
Фигура 7H



Фигура 7I

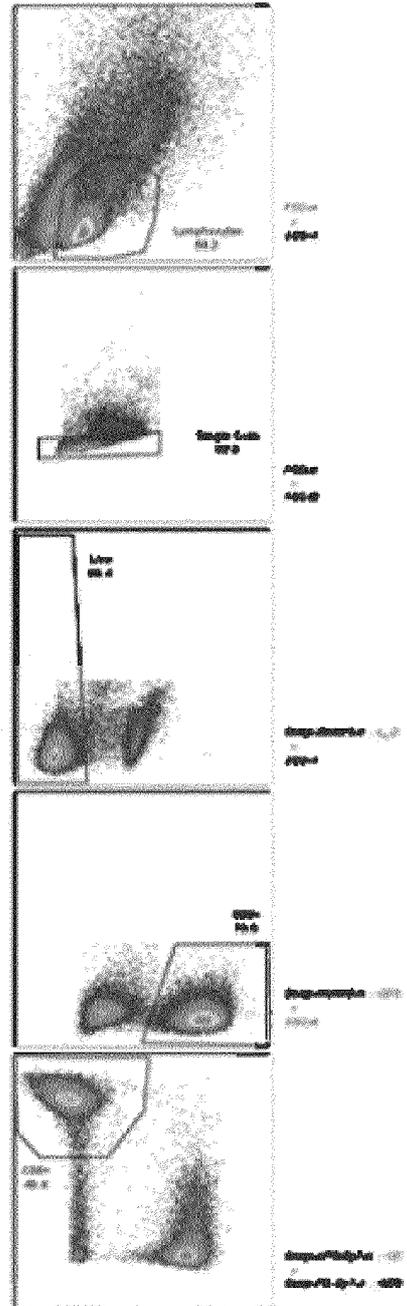
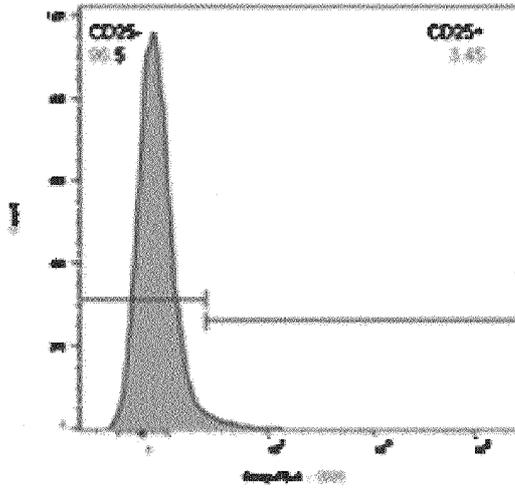
Фигура 8: Проточно-цитометрический анализ

Фигура 8А



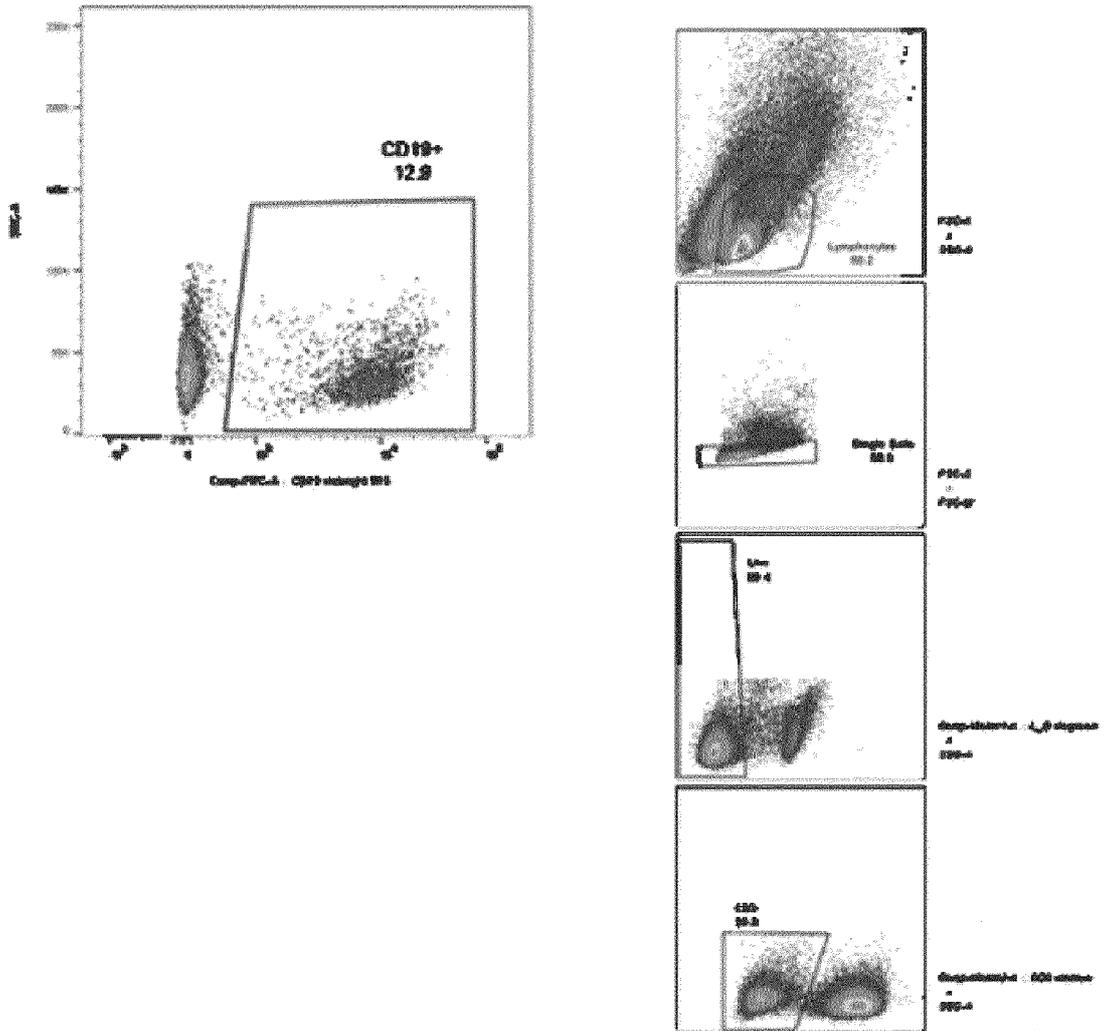
Фигура 8: Проточно-цитометрический анализ

Фигура 8В

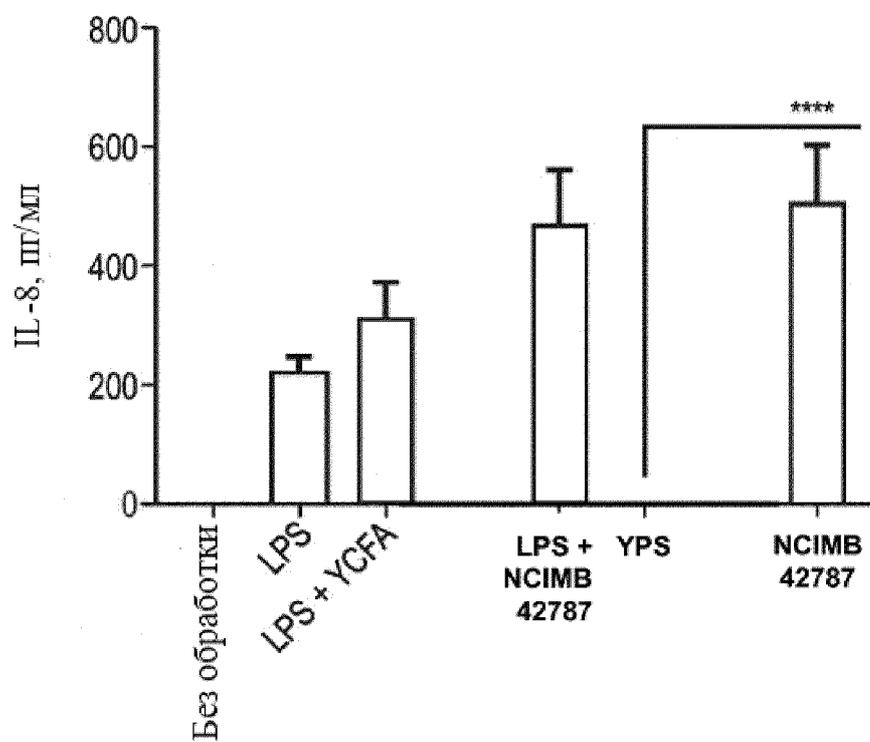


Фигура 8: Проточно-цитометрический анализ

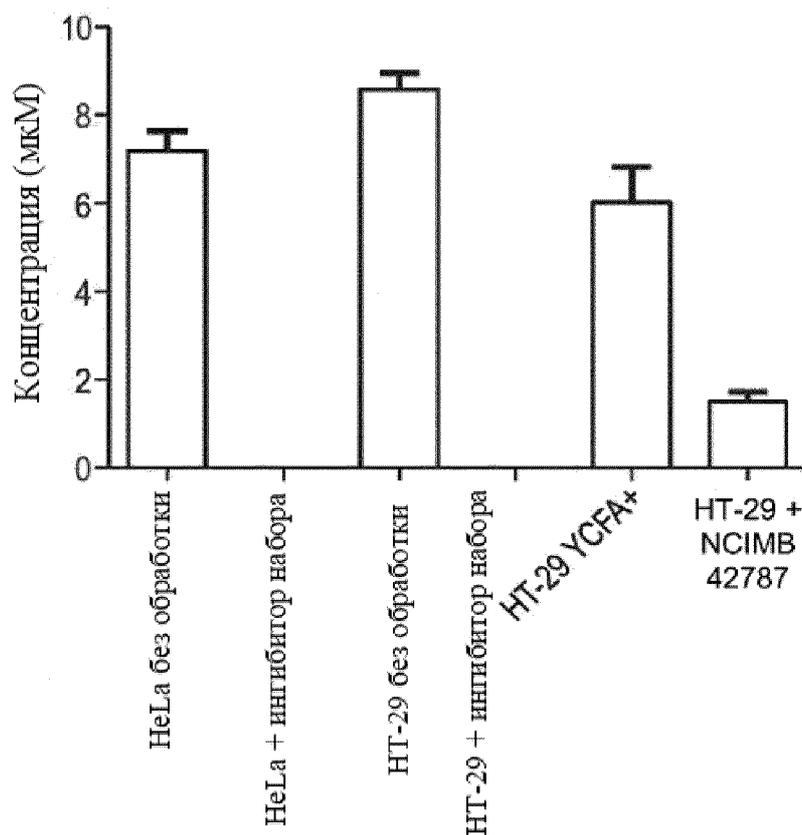
Фигура 8С



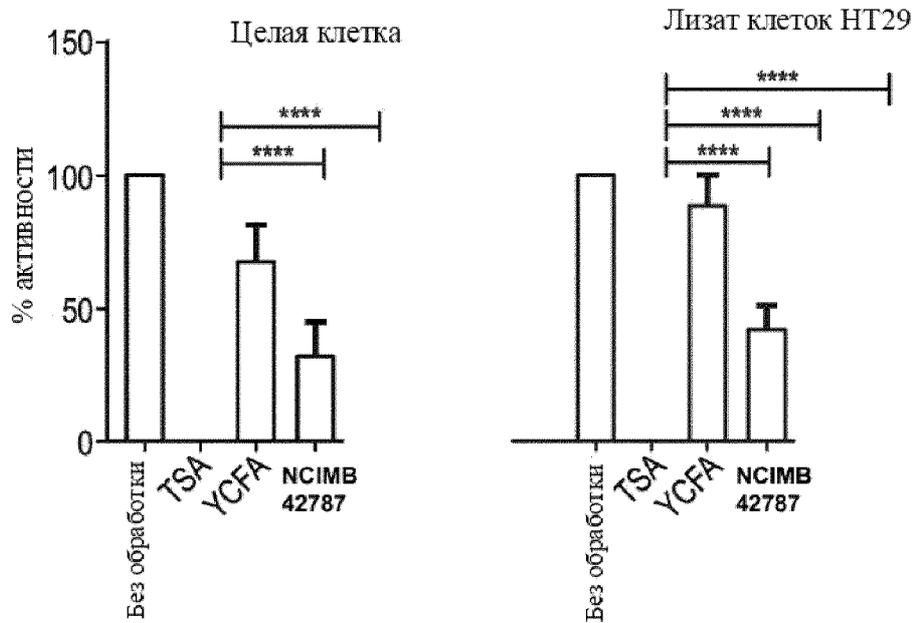
Фигура 9: Секреция IL-8 из U373



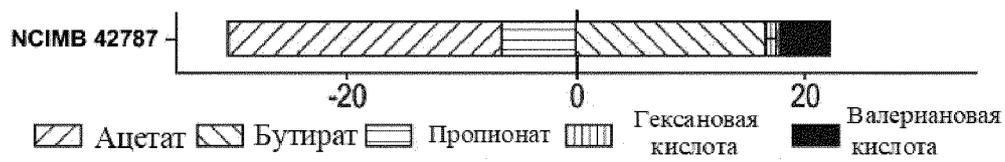
Фигура 10: Анализ активности HDAC



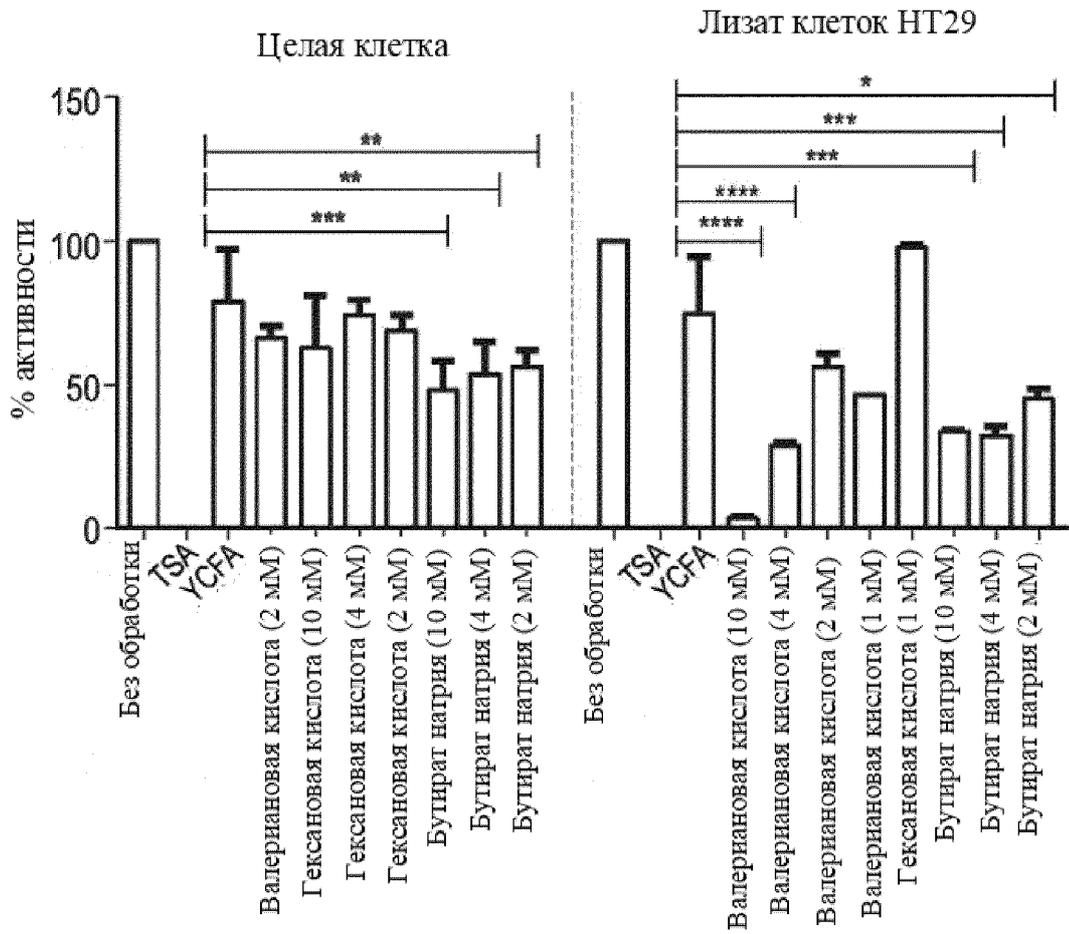
Фигура 11А: Индуцированные штаммом изменения активности HDAC в целой клетке и клеточном лизате

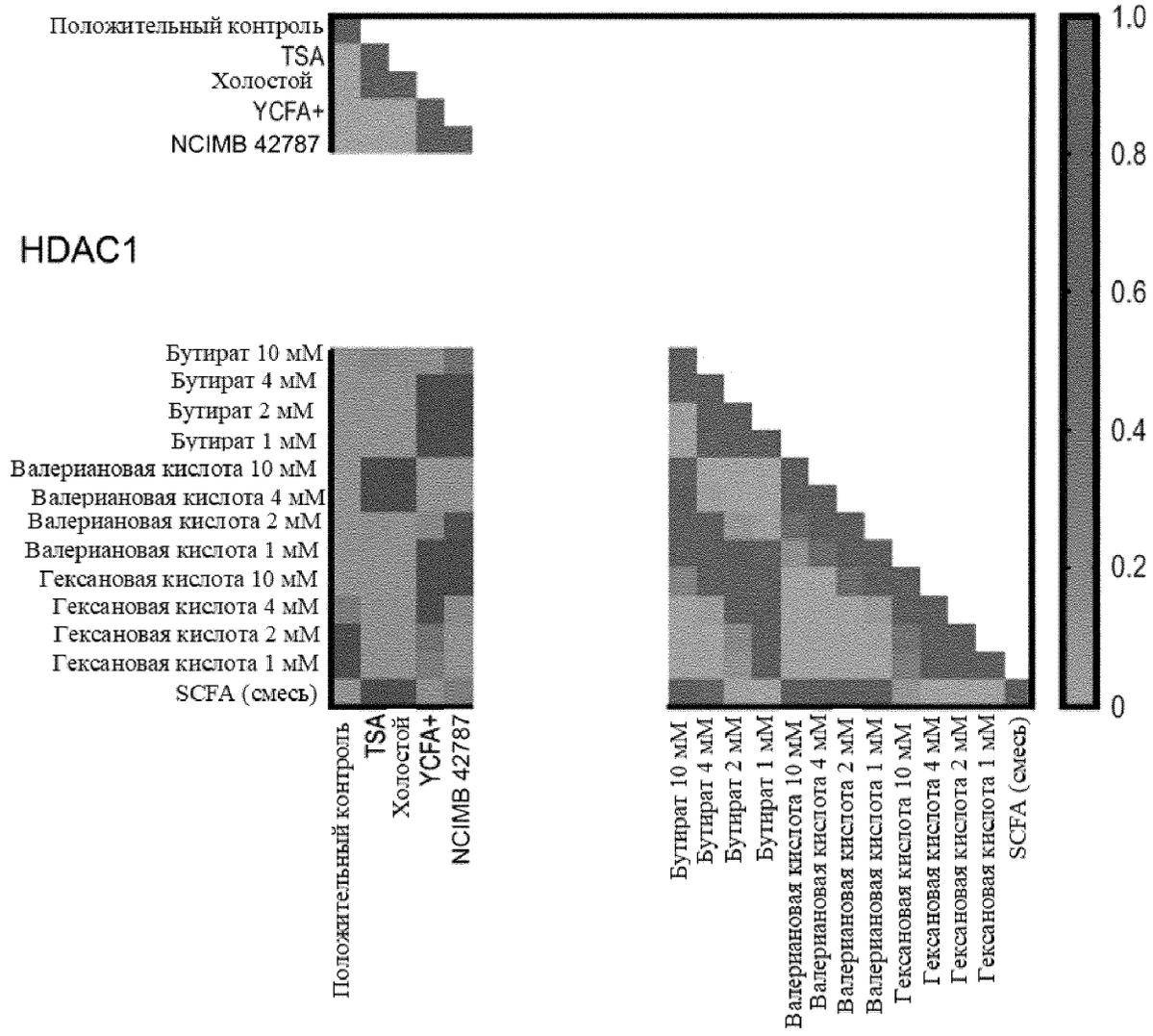


Фигура 11В: Продуцирование метаболитов штаммами

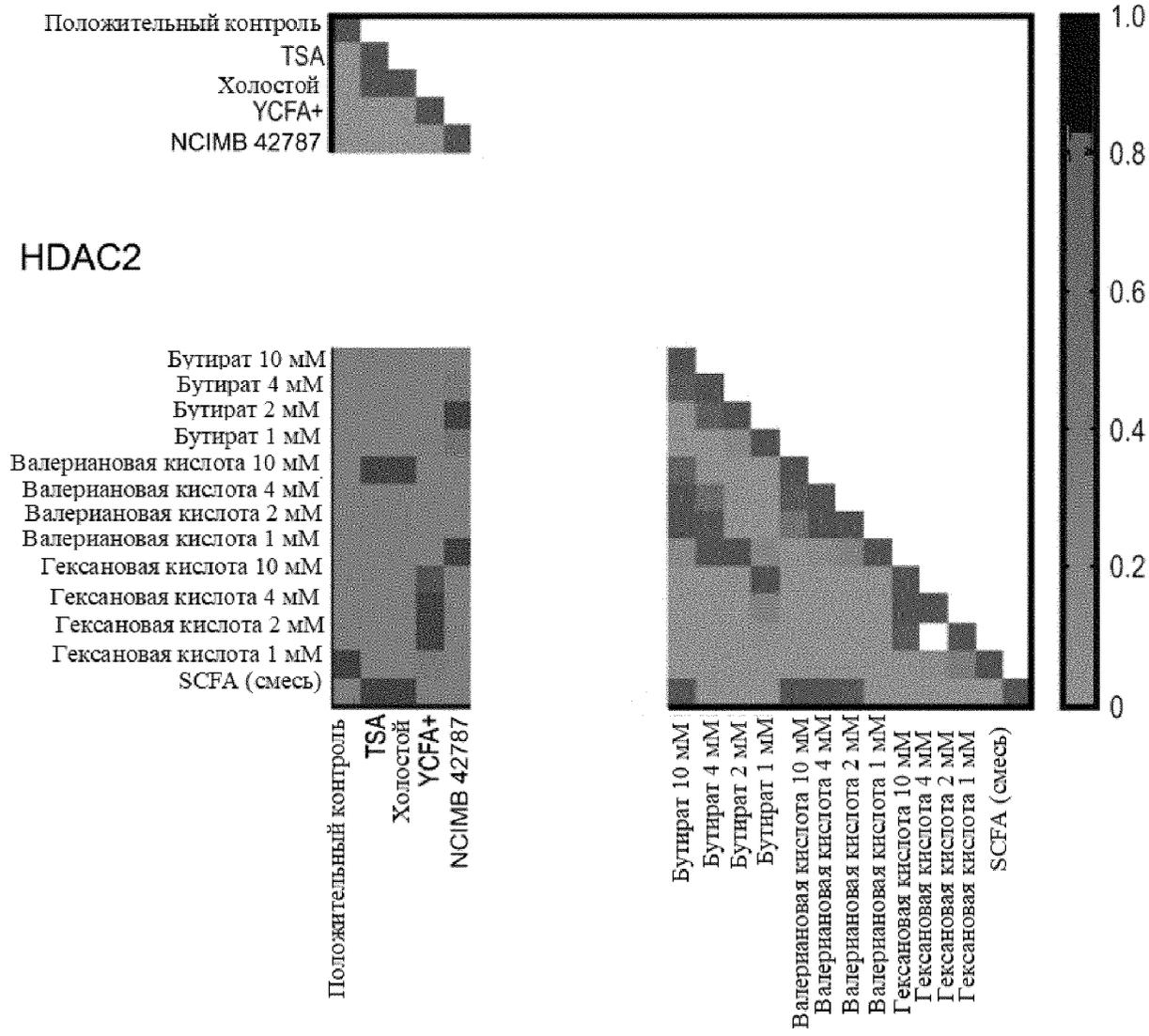


Фигура 11С: Индуцированные кислотами изменения активности гистондеацетилазы

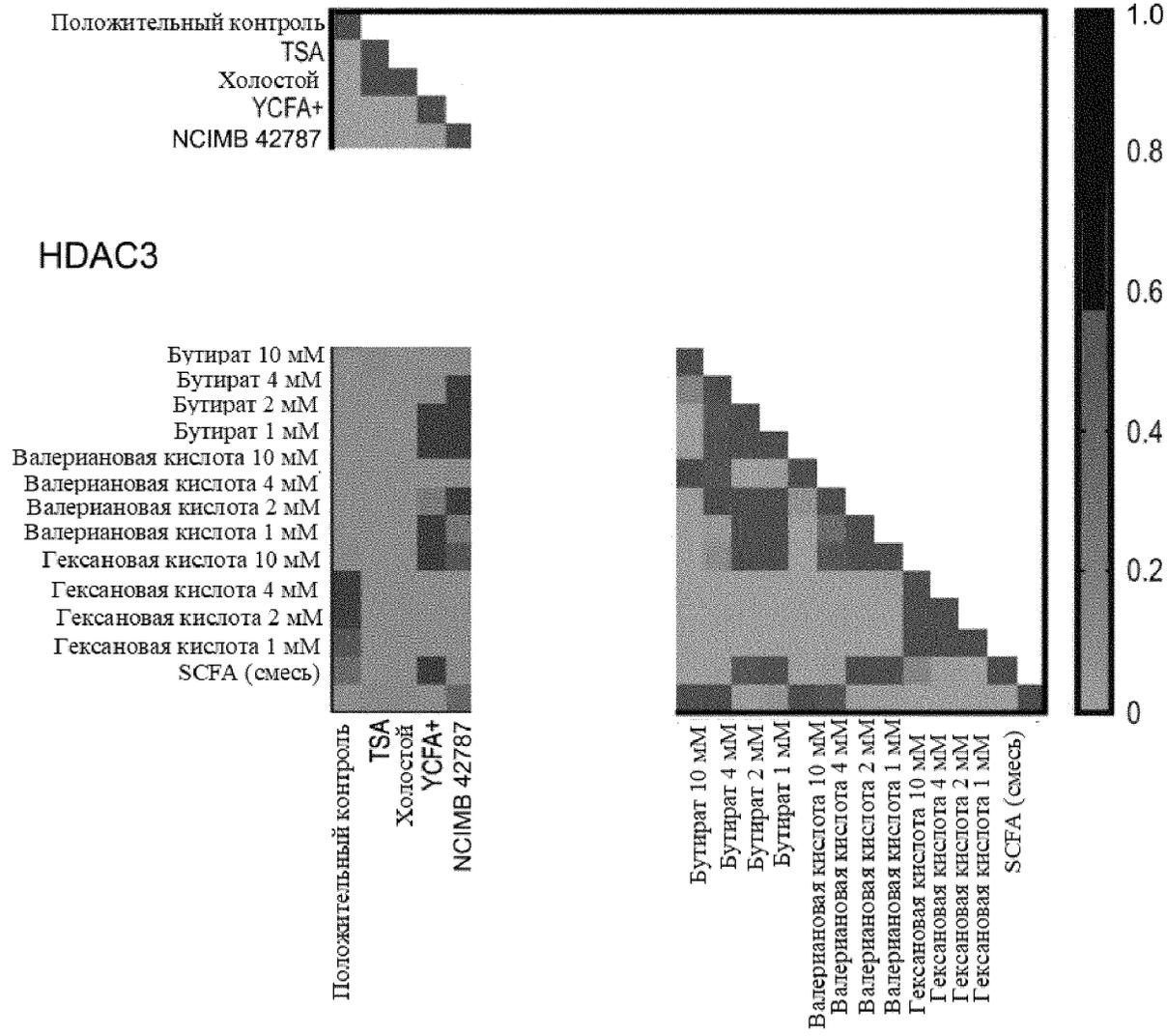




Фигура 12А: Ингибирование HDAC1

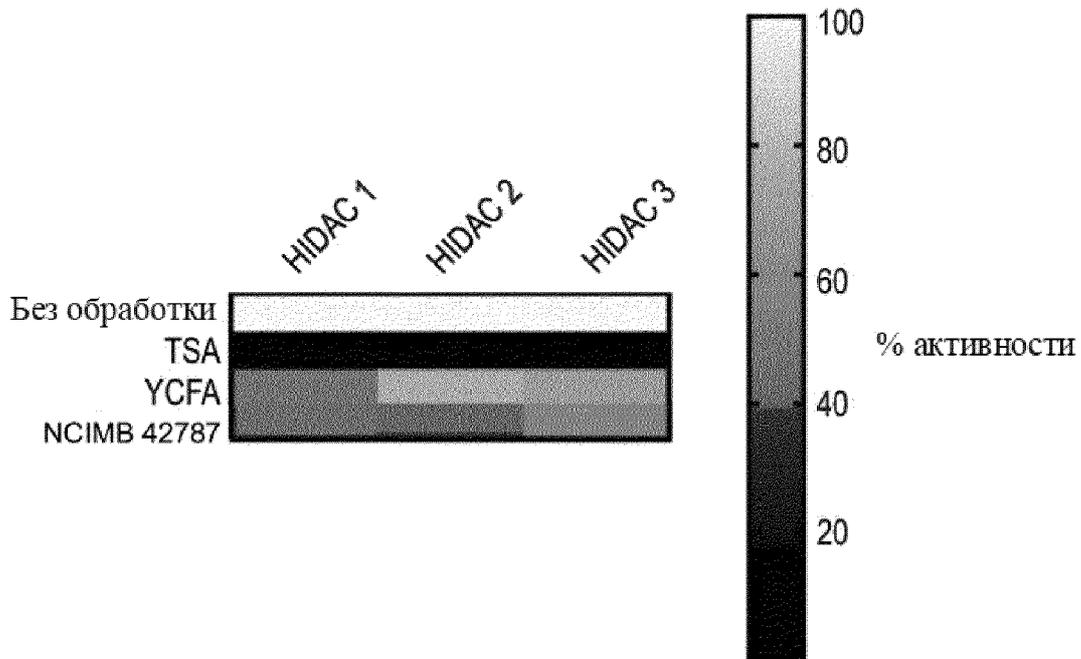


Фигура 12В: Ингибирование HDAC2

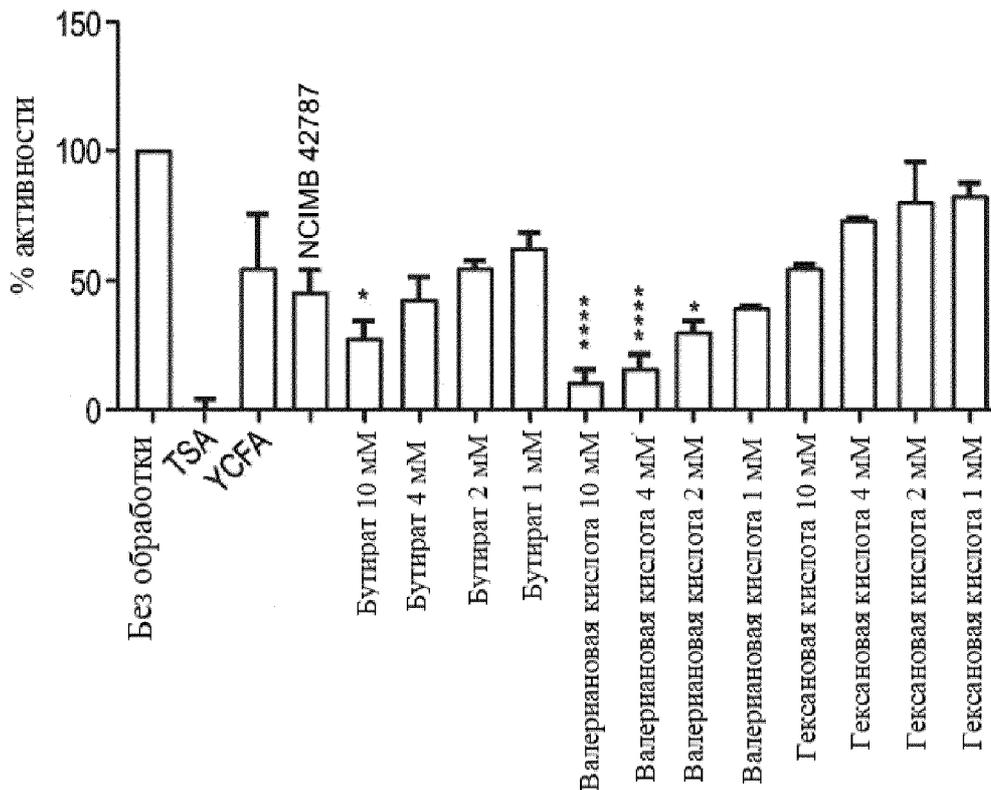


Фигура 12С: Ингибирование HDAC3

Фигура 13А: Ингибирование HDAC класса I



Фигура 13В: Ингибирование HDAC1



Фигура 13С: Ингибирование HDAC2

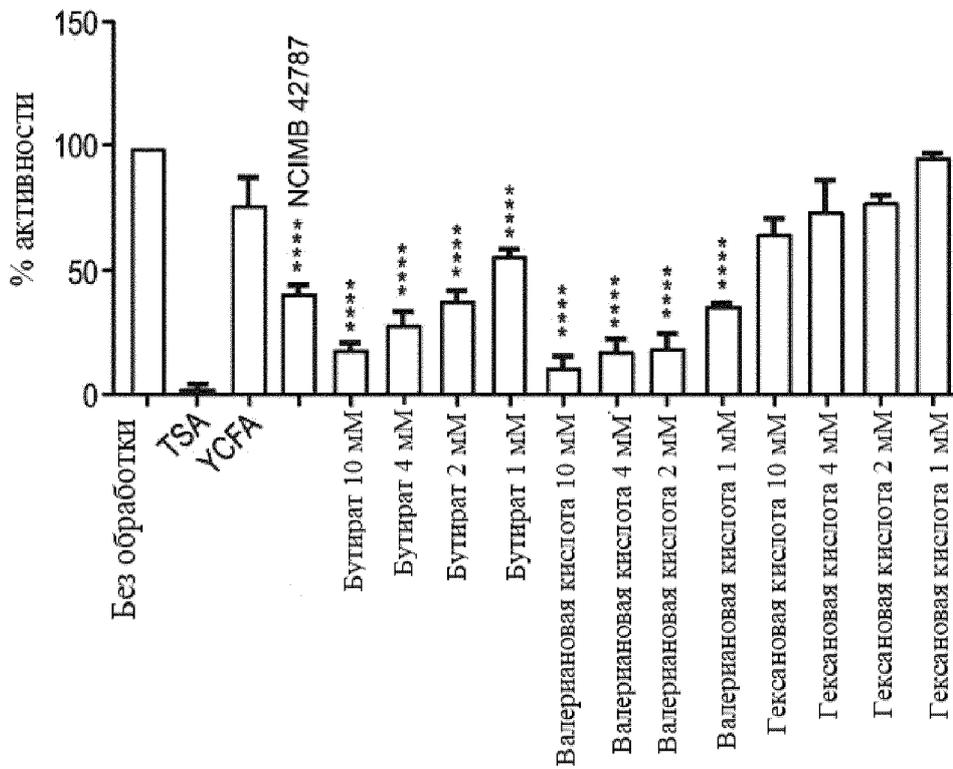
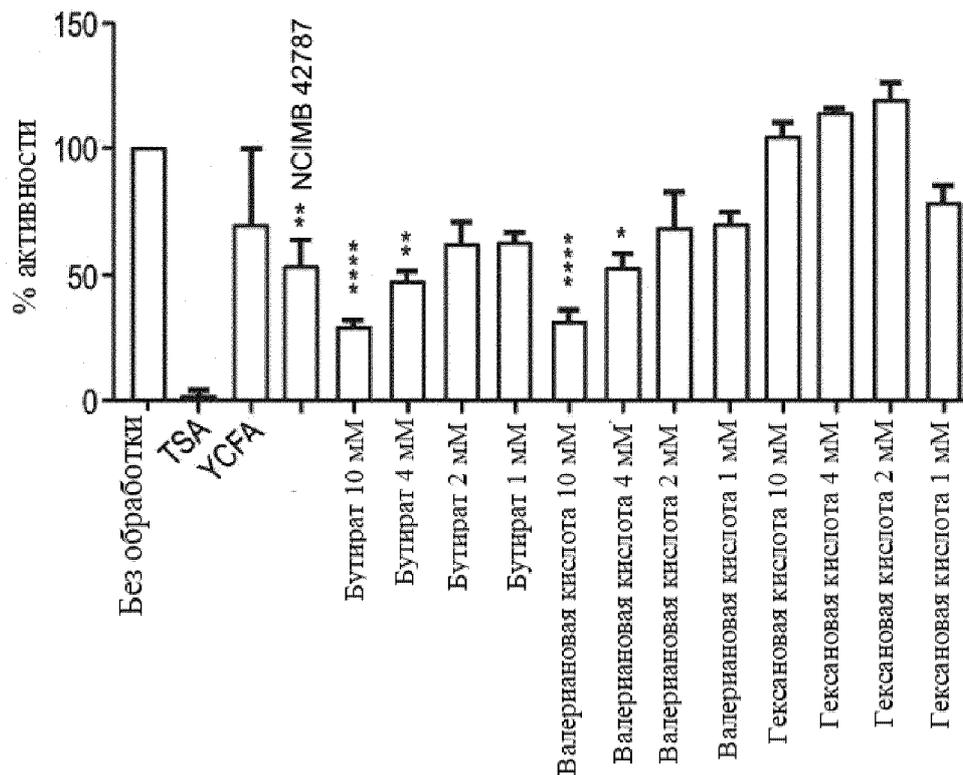
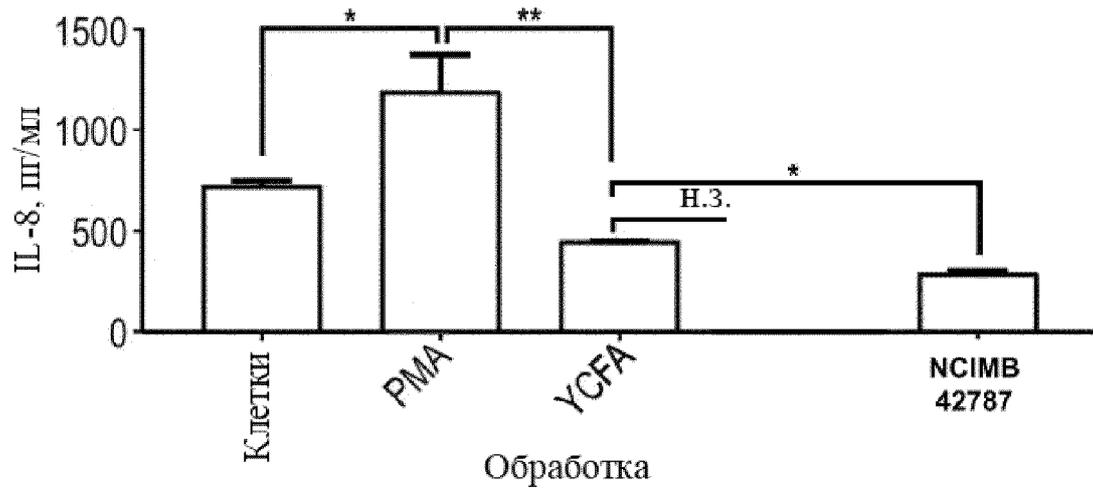


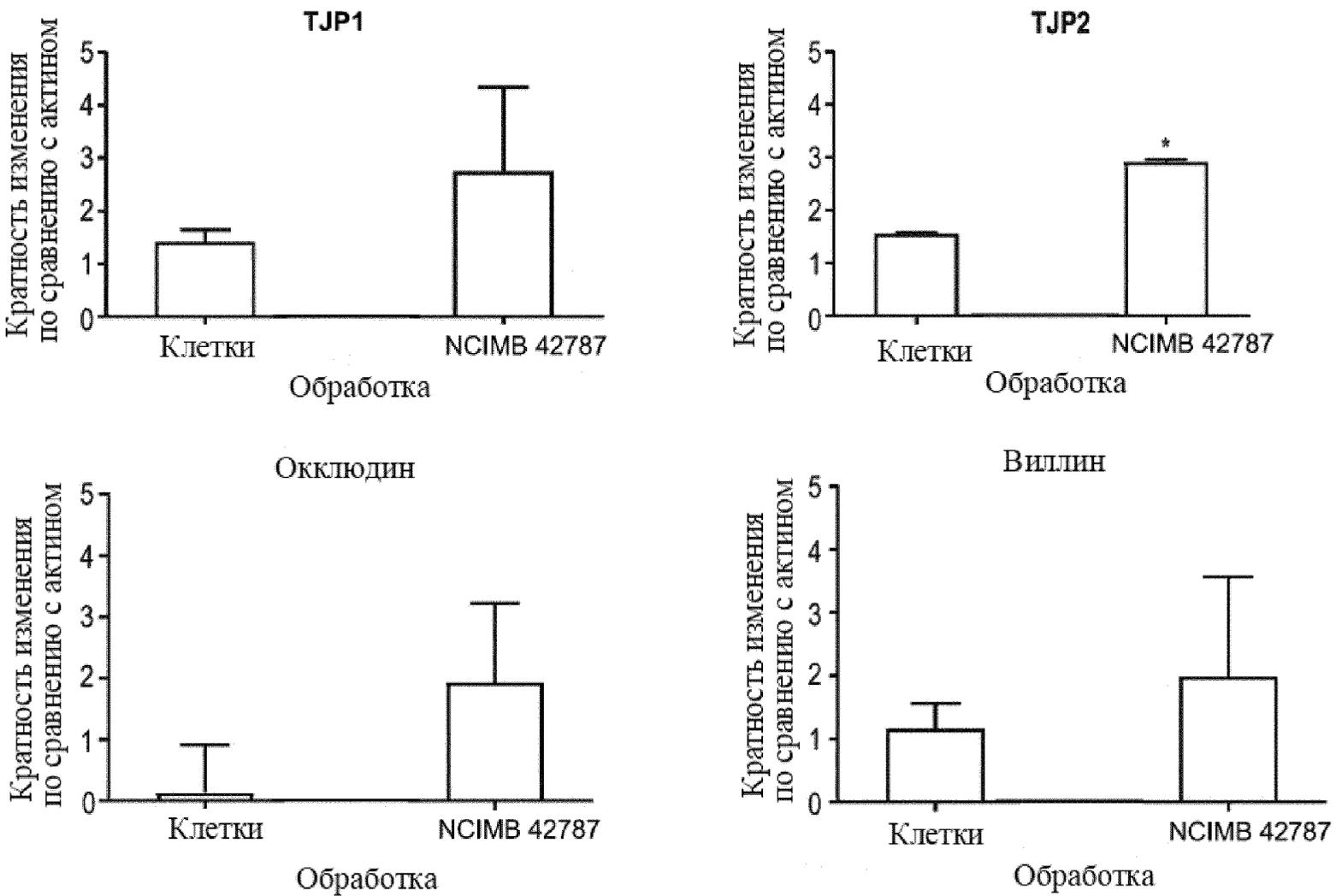
Figure 13D: HDAC3 inhibition



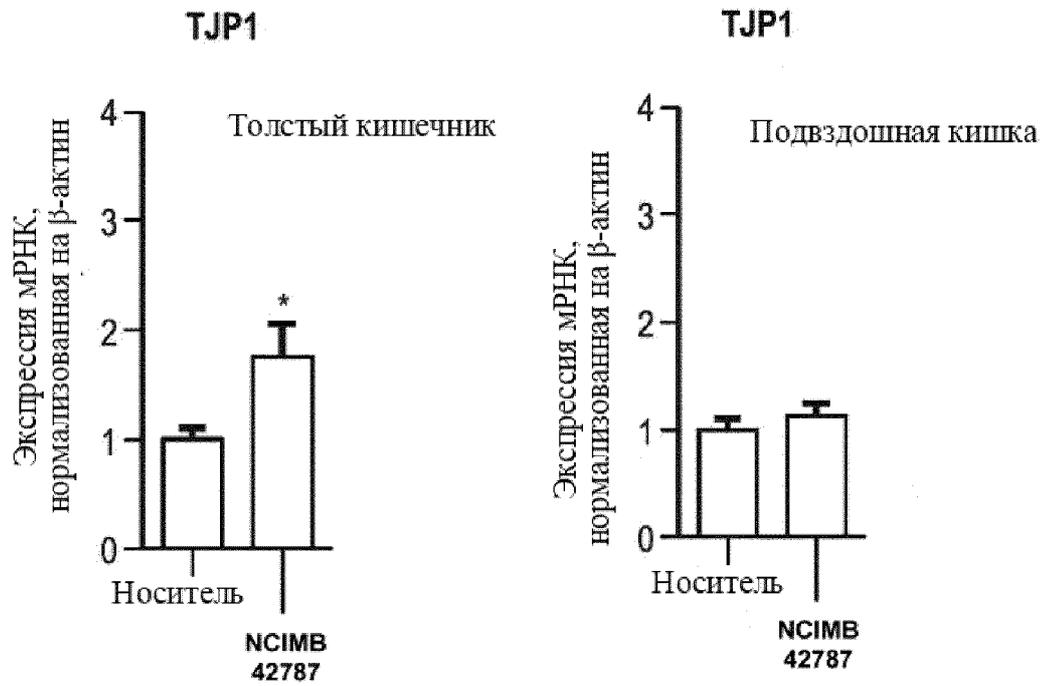
Фигура 14А: Секреция IL-8



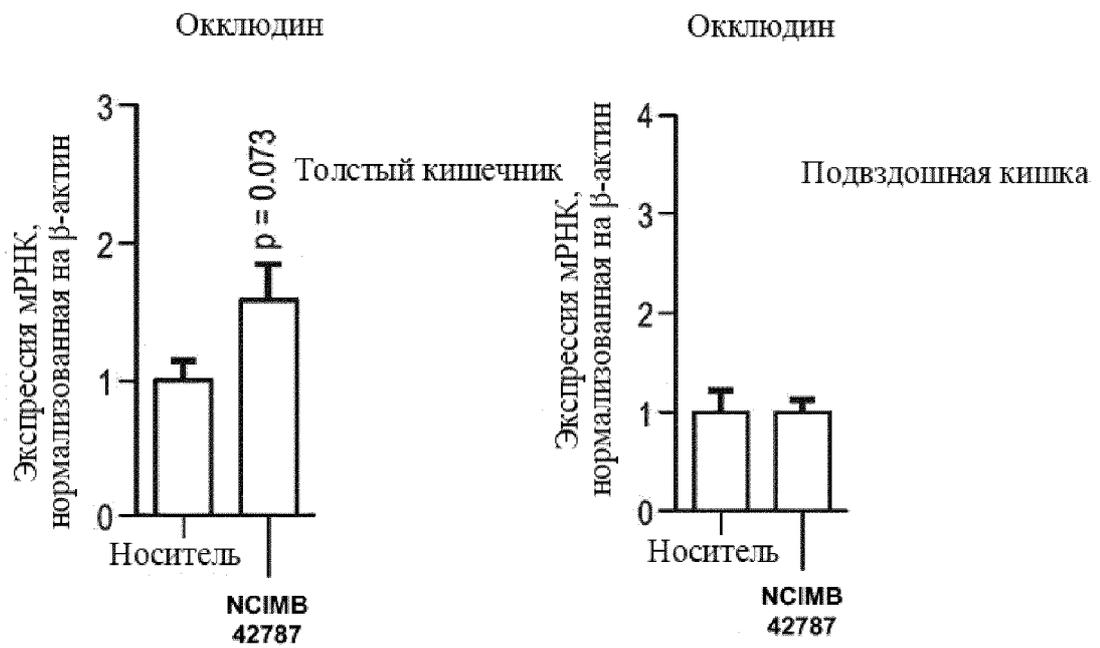
Фигура 14В: Экспрессия мРНК окклюдина, виллина, TJP1 и TJP2



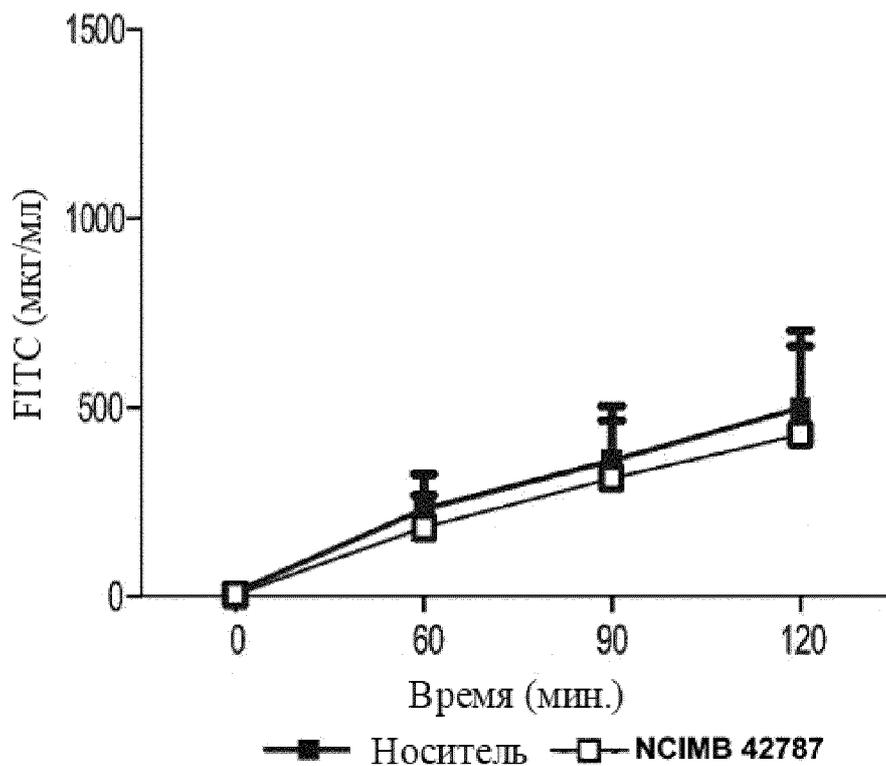
Фигура 14С: Экспрессия мРНК TJP1



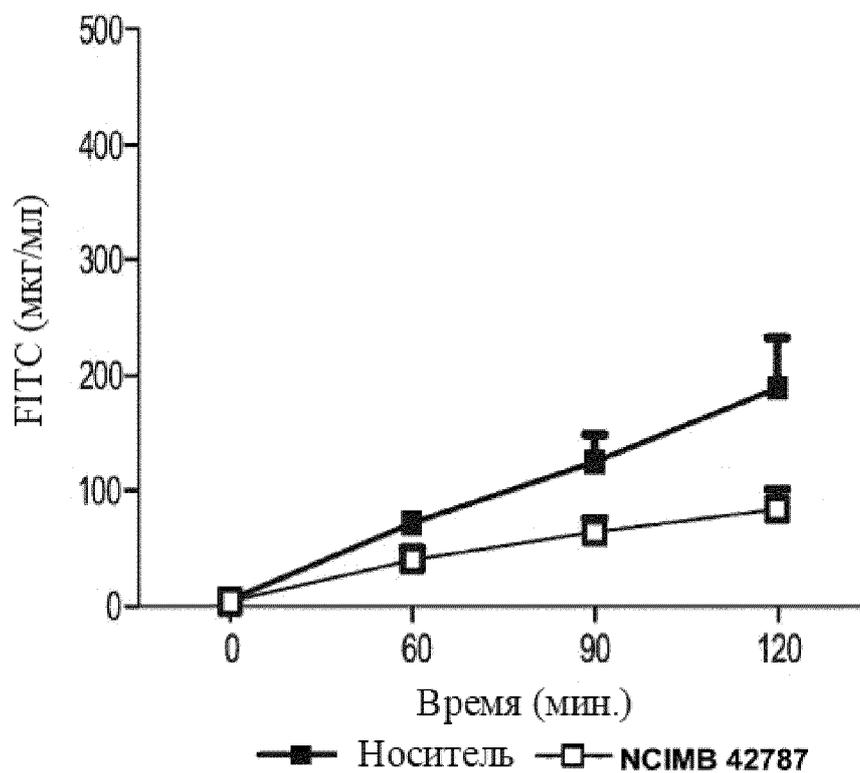
Фигура 14D: Экспрессия мРНК окклюдина



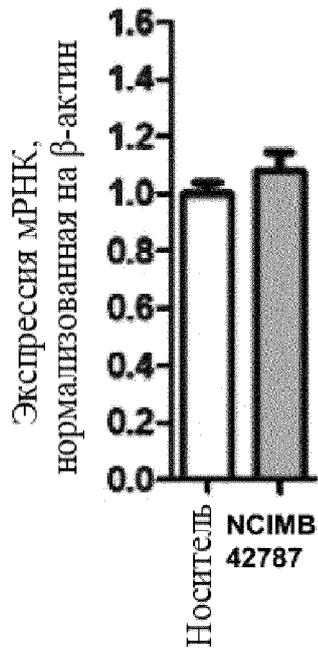
Фигура 14Е: Проницаемость в подвздошной кишке



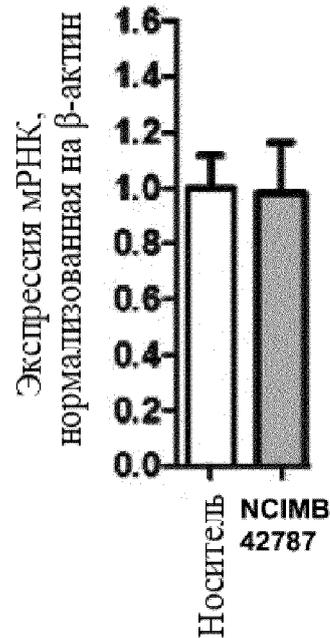
Фигура 14F: Проницаемость в толстом кишечнике



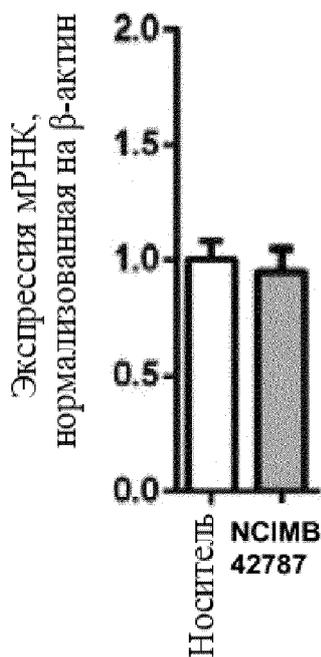
Фигура 15: Изменения экспрессии TLR-4 в гиппокампе



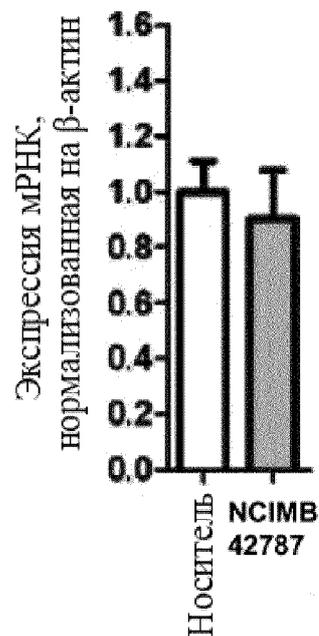
Фигура 16: Изменения экспрессии TNF-α в гиппокампе



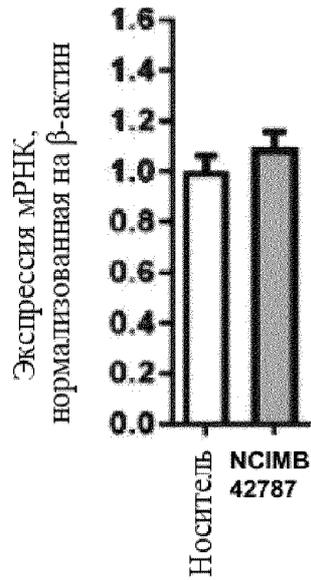
Фигура 17: Изменения экспрессии IL-1β в гиппокампе



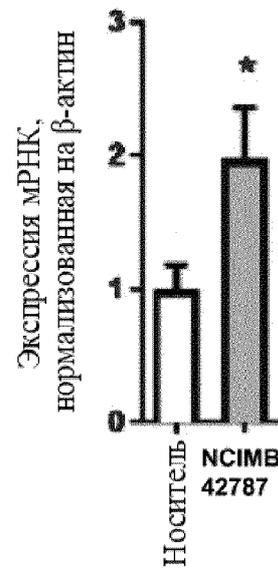
Фигура 18: Изменения экспрессии IL-6 в гиппокампе



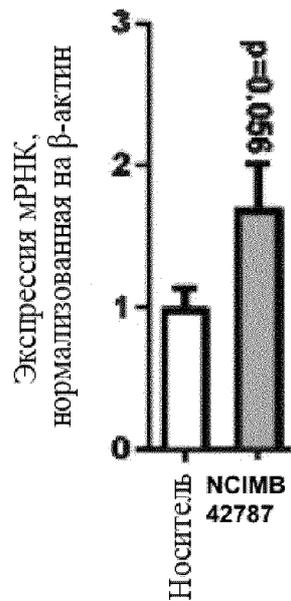
Фигура 19: Изменения экспрессии CD11b в гиппокампе



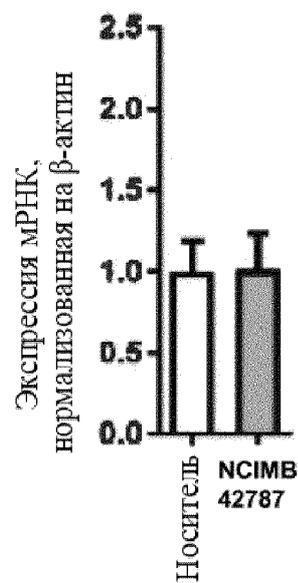
Фигура 20: Изменения экспрессии TLR-4 в миндалевидном теле



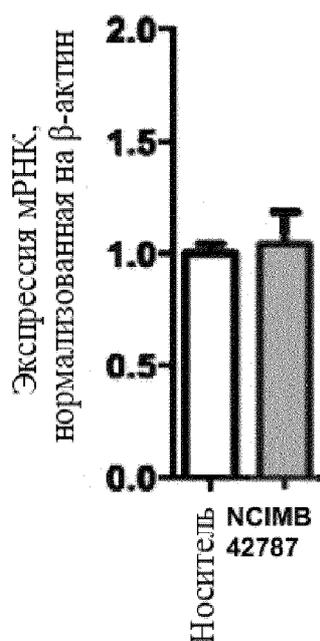
Фигура 21: Изменения экспрессии CD11b в миндалевидном теле



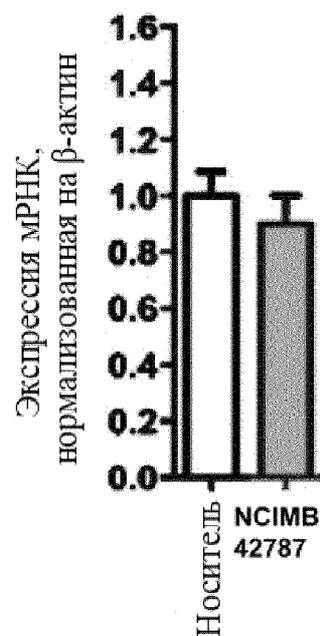
Фигура 22: Изменения экспрессии IL-6 в миндалевидном теле



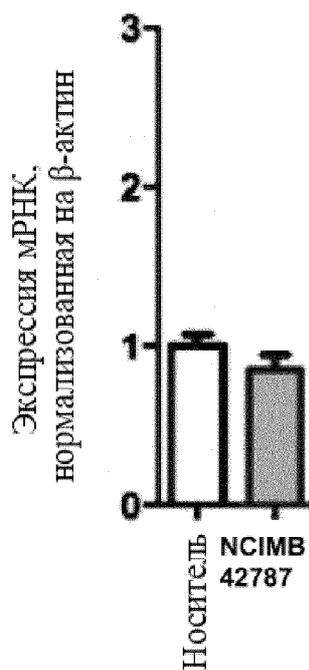
Фигура 23: Изменения экспрессии TLR-4 в префронтальной коре

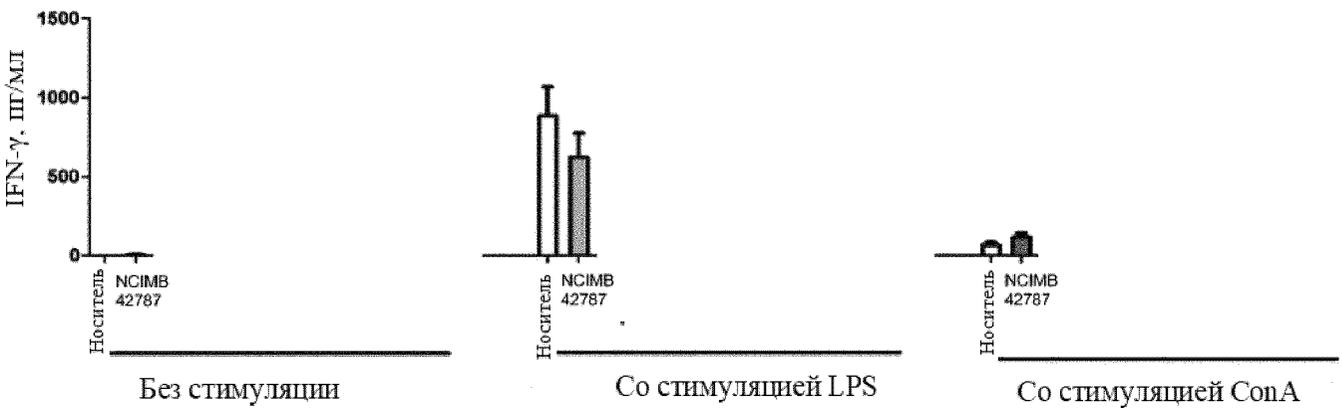
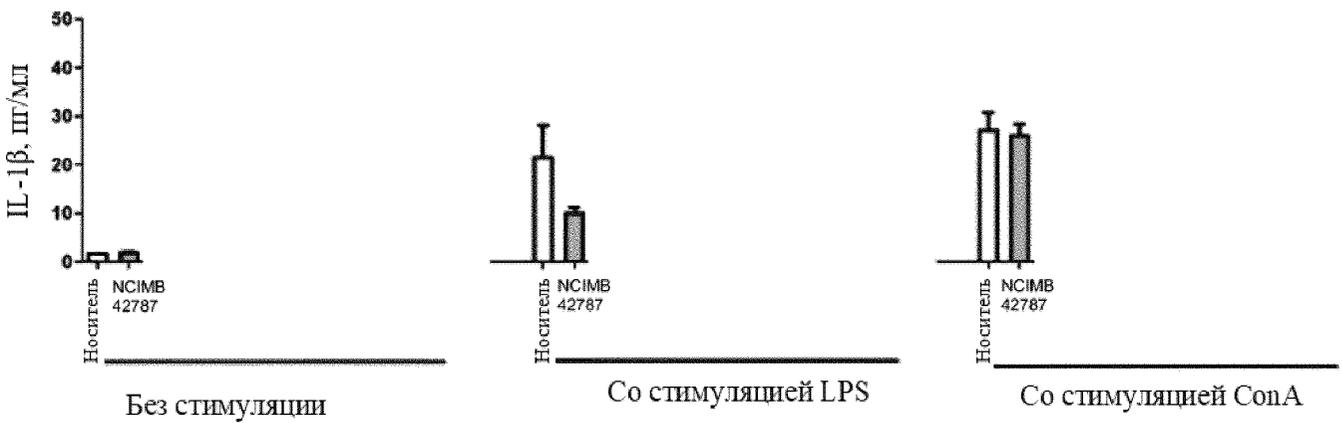


Фигура 24: Изменения экспрессии CD11b в префронтальной коре

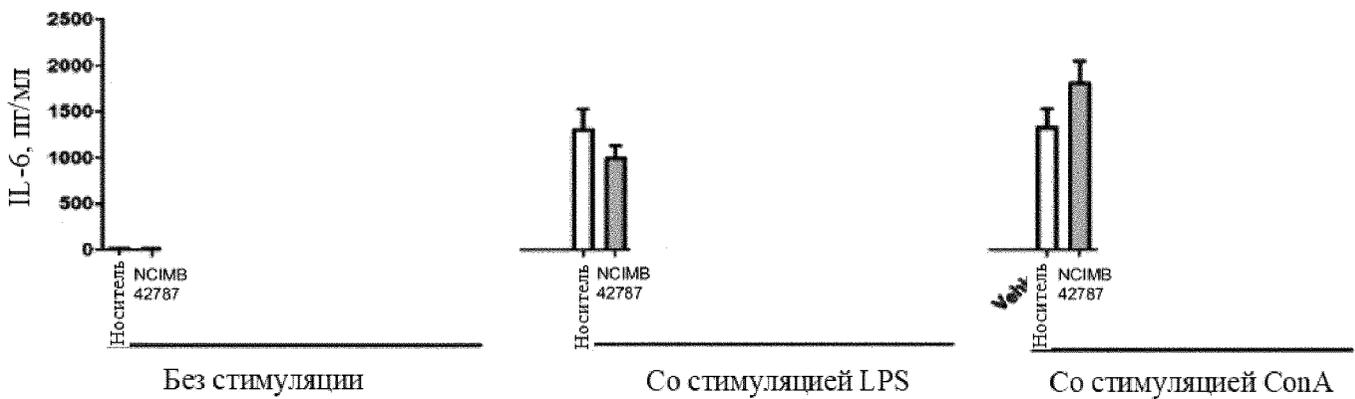


Фигура 25: Изменения экспрессии IL6 в префронтальной коре

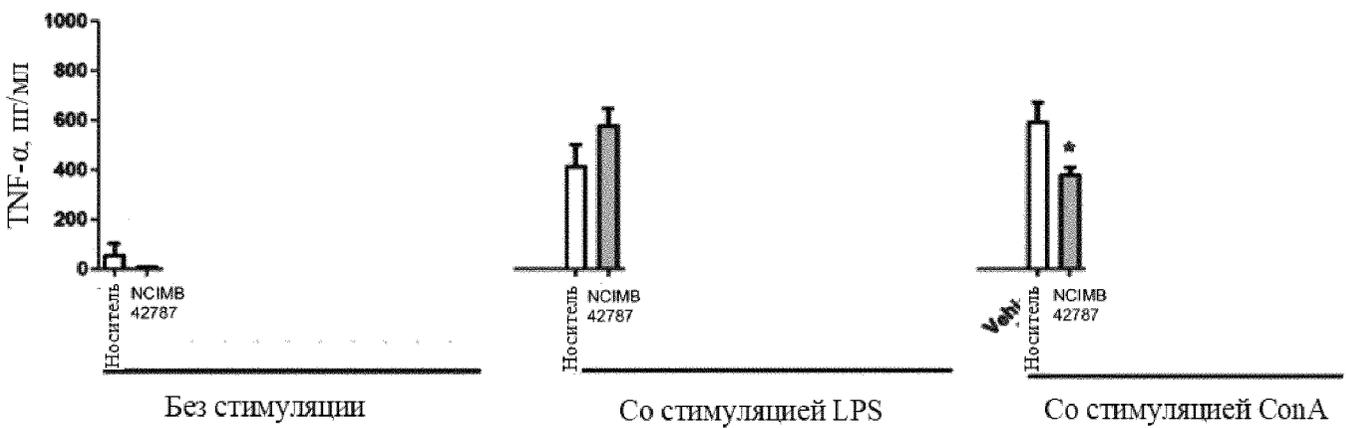


Фигура 26: Влияние на продуцирование интерферона- γ из спленоцитовФигура 27: Влияние на продуцирование IL-1 β из спленоцитов

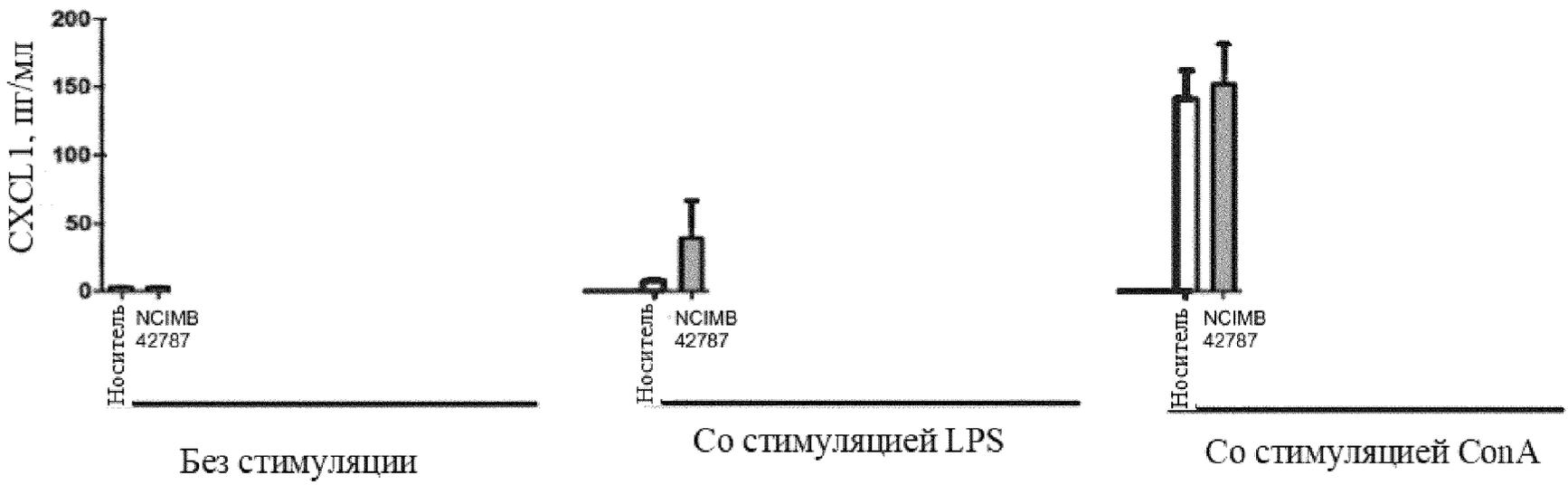
Фигура 28: Влияние на продуцирование IL-6 из спленоцитов



Фигура 29: Влияние на продуцирование TNF- α из спленоцитов

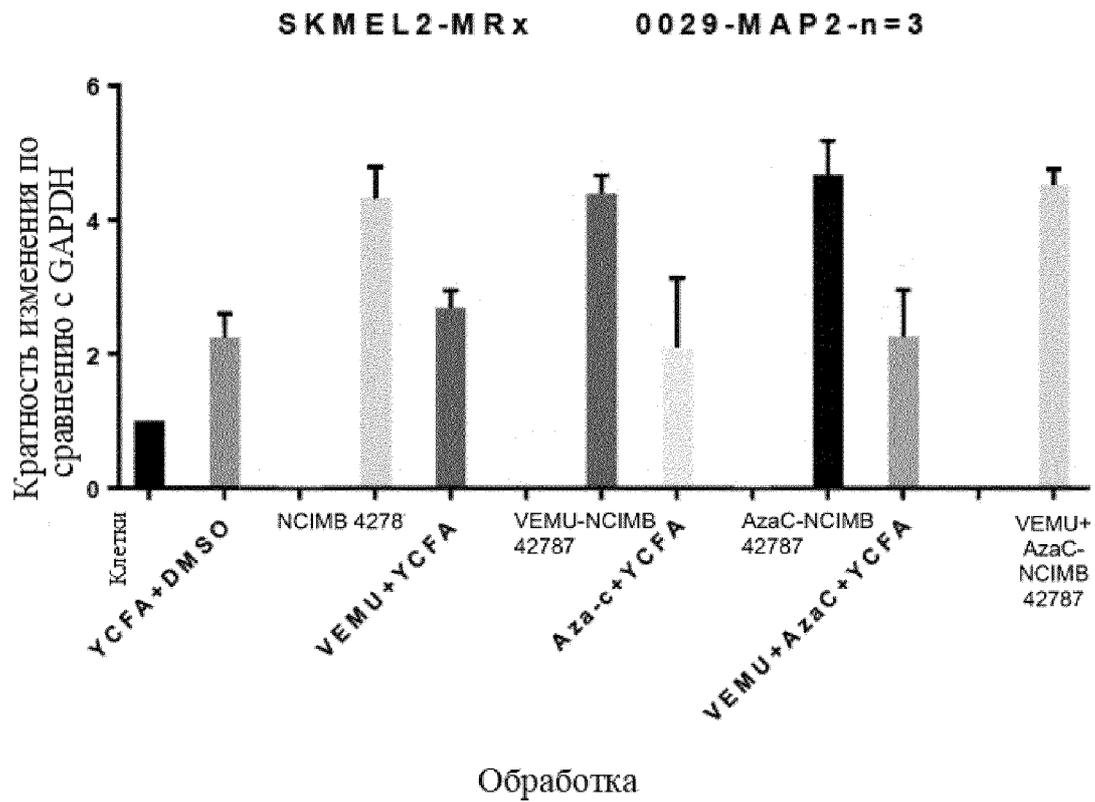


Фигура 30: Влияние на продуцирование CXCL1 из спленоцитов



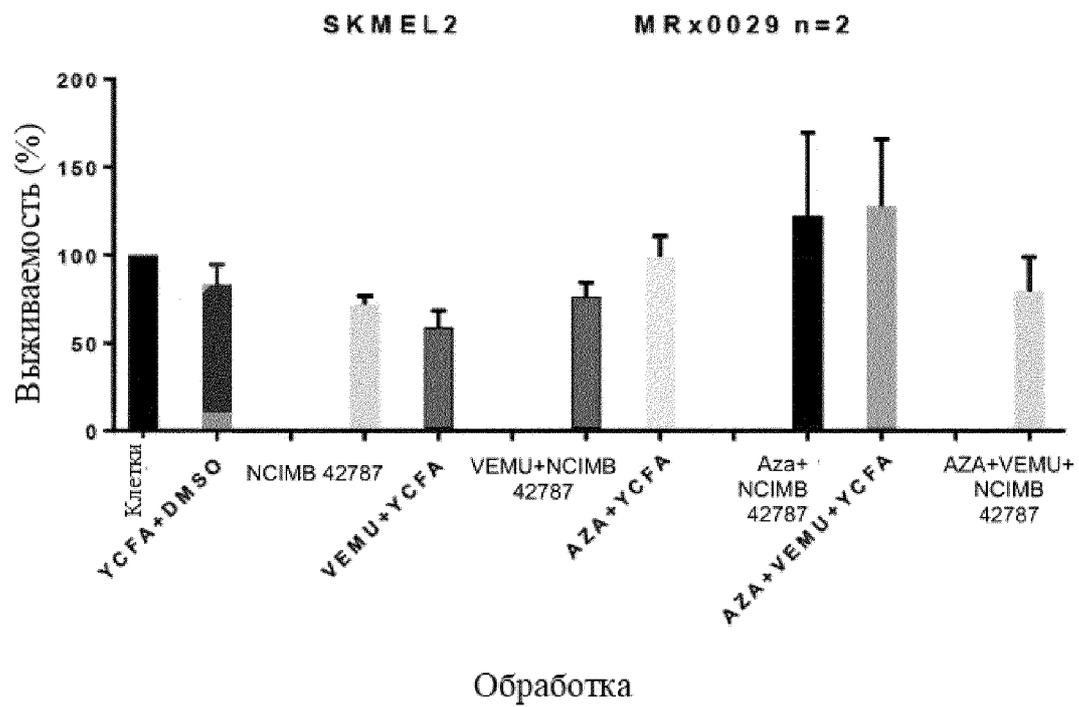
Фигура 31

Клеточная линия SKMEL2 – экспрессия гена MAP2



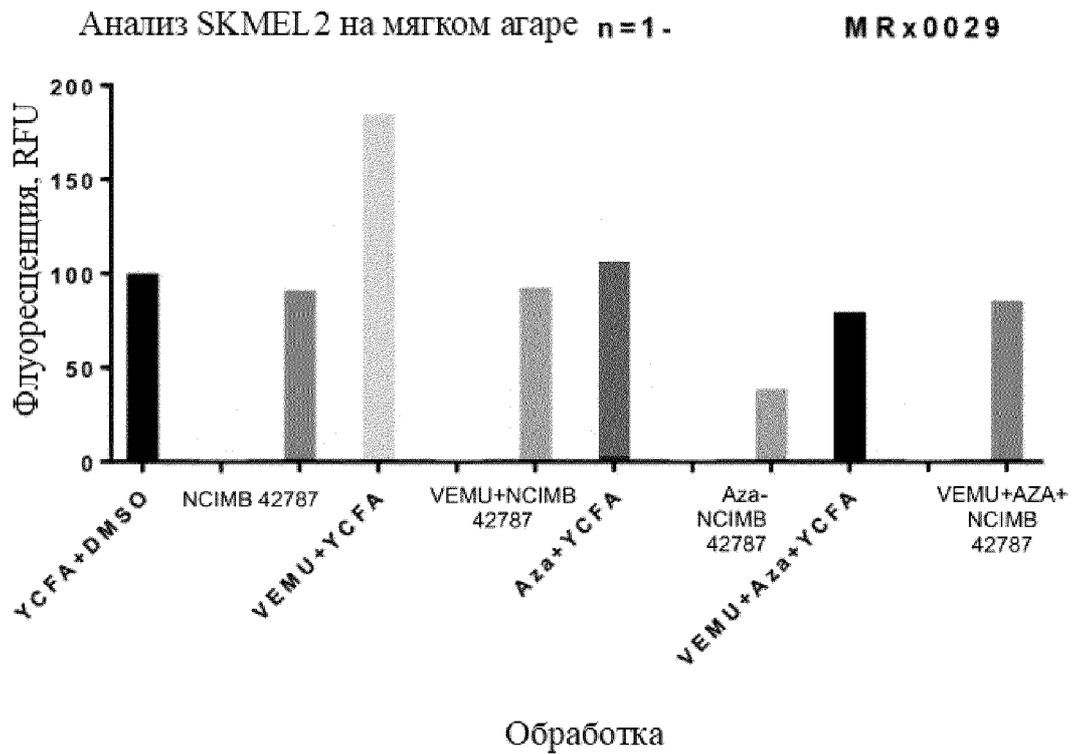
Фигура 32

Клеточная линия SKMEL2 – клоногенная выживаемость



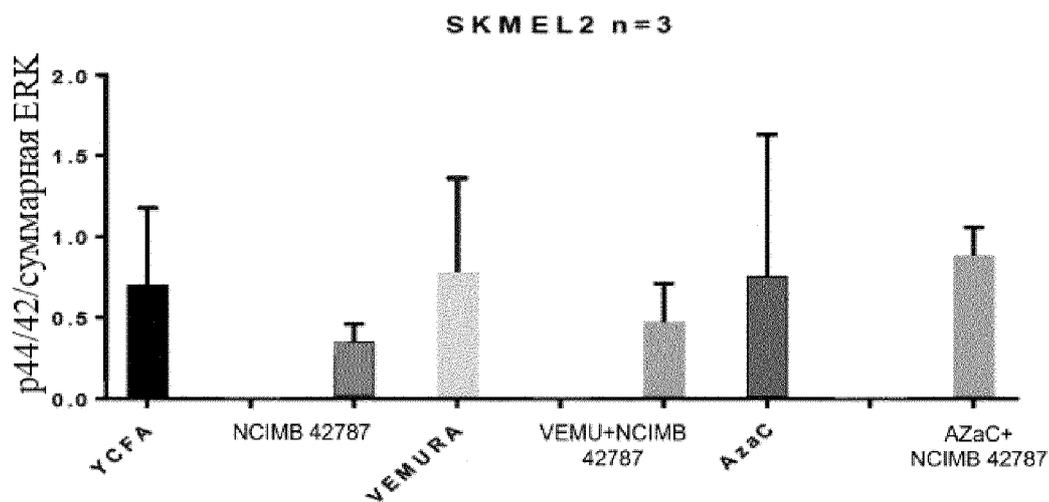
Фигура 33

Клеточная линия SKMEL2 – рост на мягком агаре

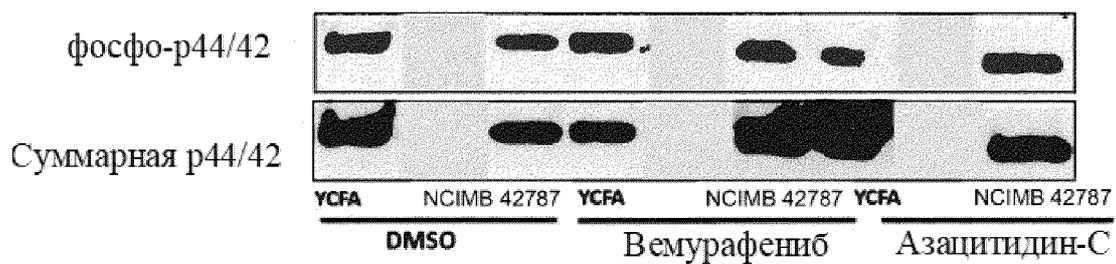


Фигура 34

Клеточная линия SKMEL2 – передача сигнала с участием ERK

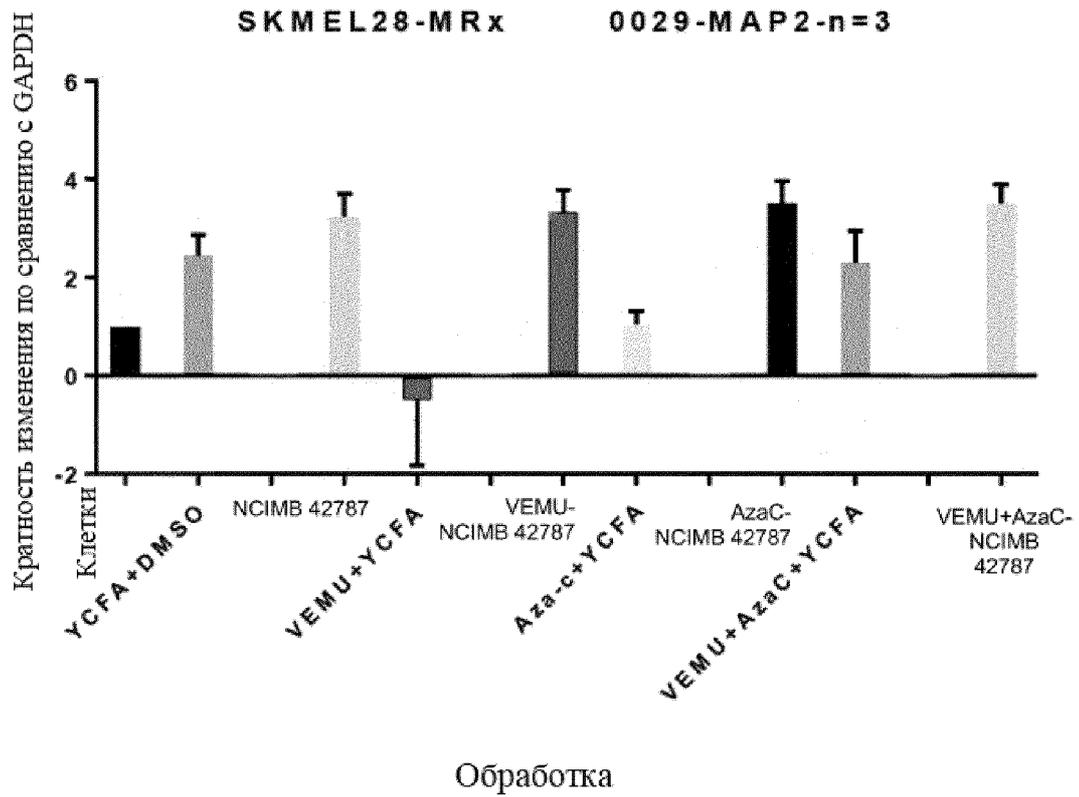


Обработка



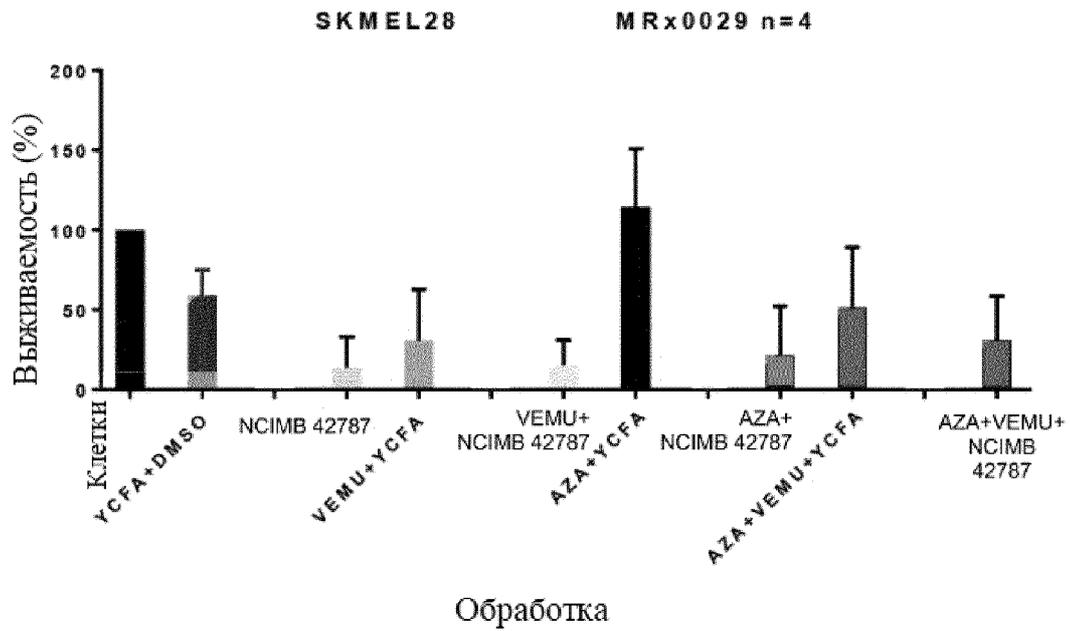
Фигура 35

Клеточная линия SKMEL28 – экспрессия гена MAP2



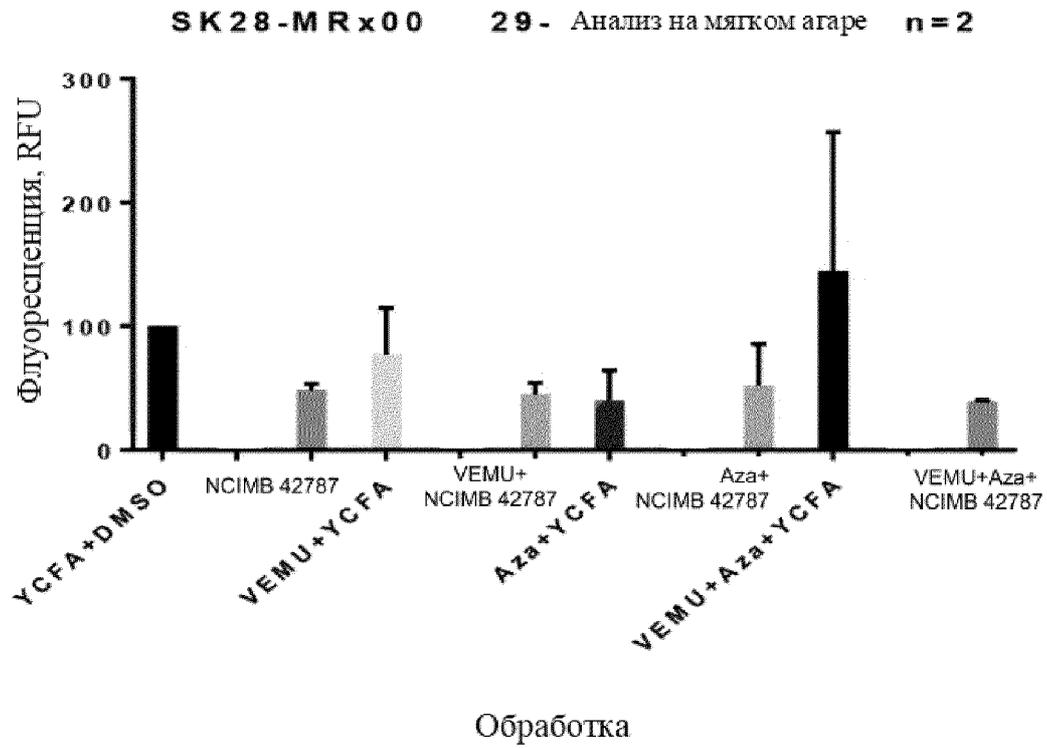
Фигура 36

Клеточная линия SKMEL28 – клоногенная выживаемость



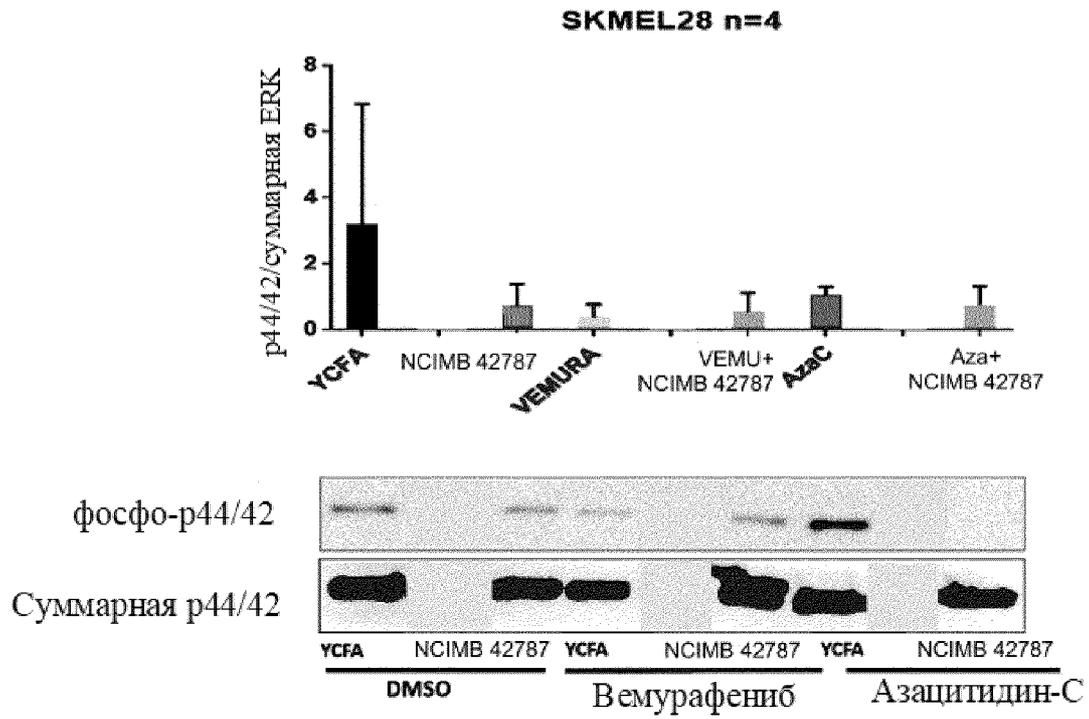
Фигура 37

Клеточная линия SKMEL28 – рост на мягком агаре



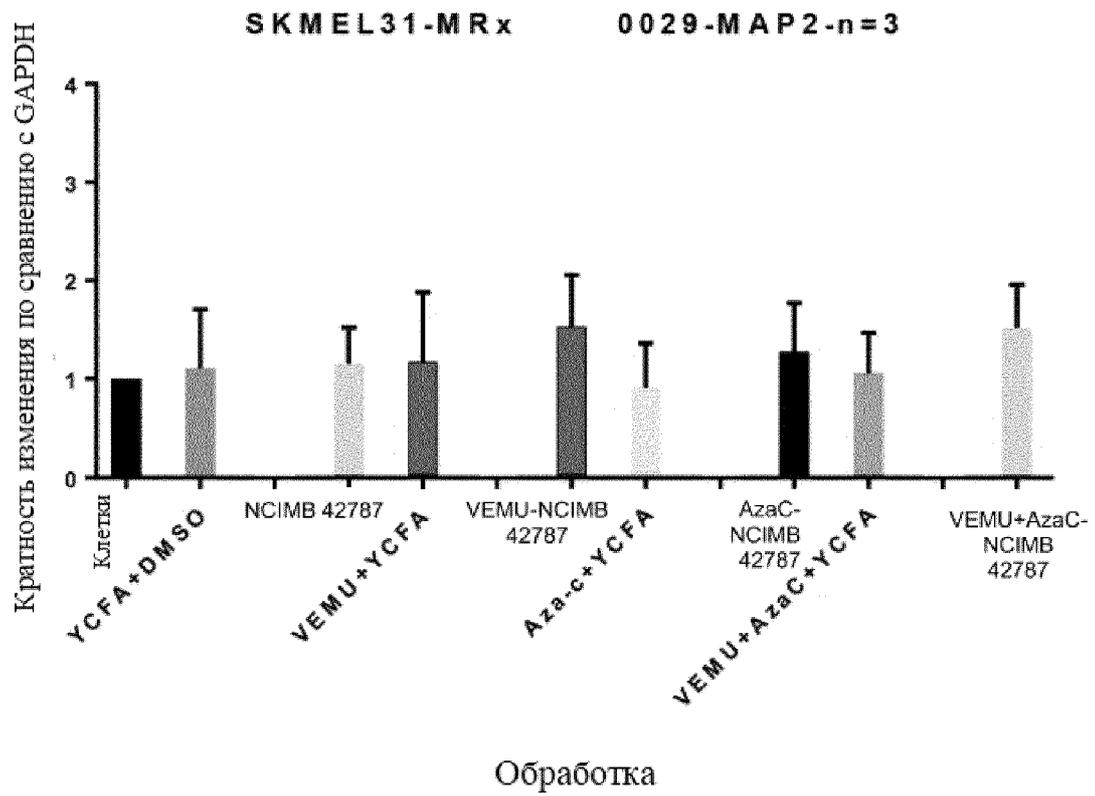
Фигура 38

Клеточная линия SKMEL28 – передача сигнала с участием ERK



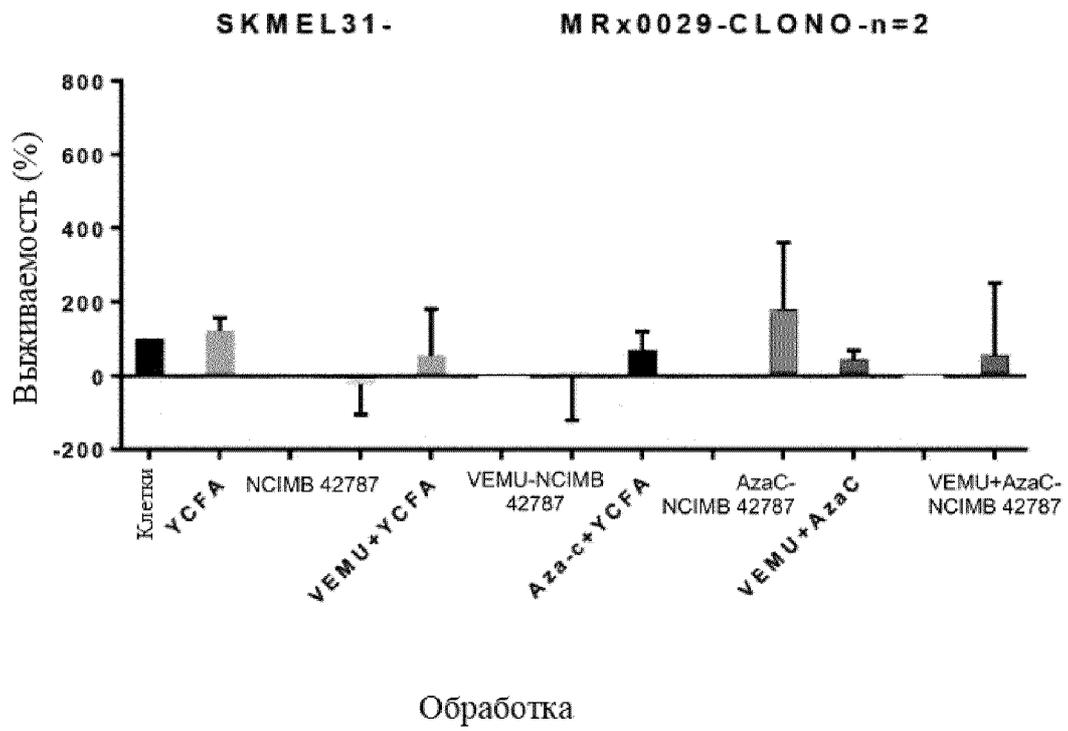
Фигура 39

Клеточная линия SKMEL31 – экспрессия гена MAP2

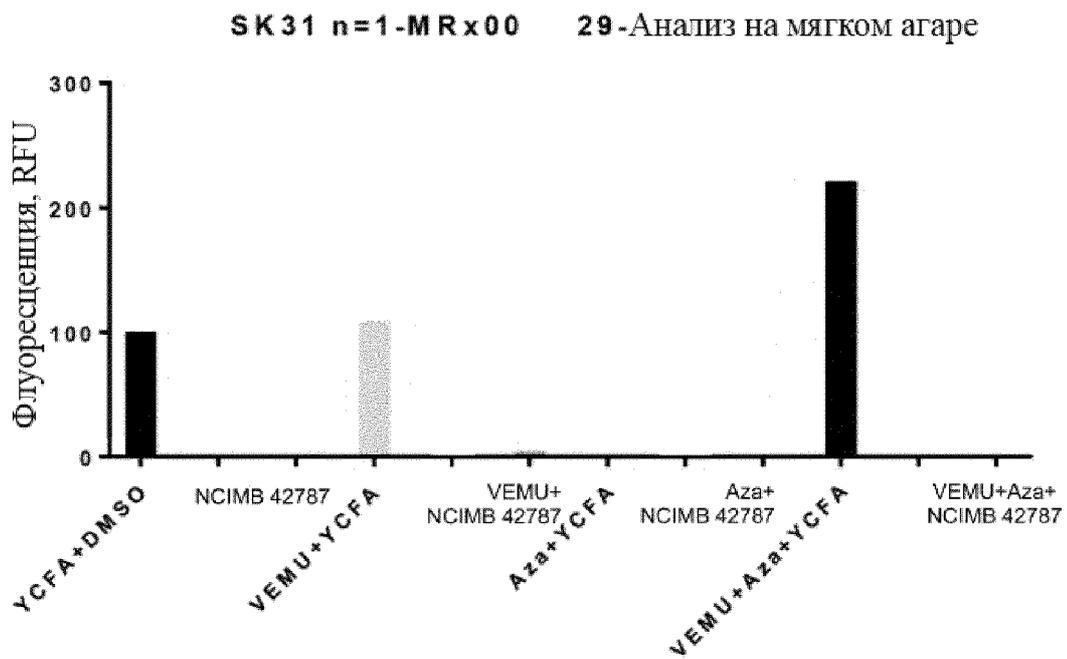


Фигура 40

Клеточная линия SKMEL31 – клоногенная выживаемость



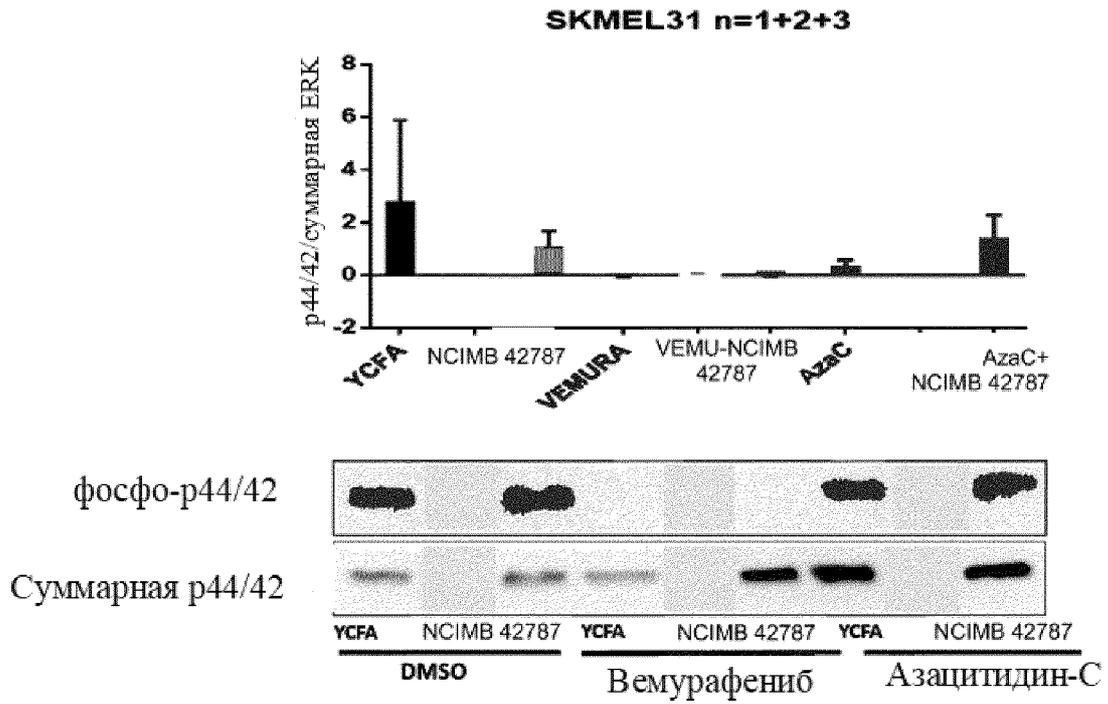
Фигура 41
Клеточная линия SKMEL31 – рост на мягком агаре



Обработка

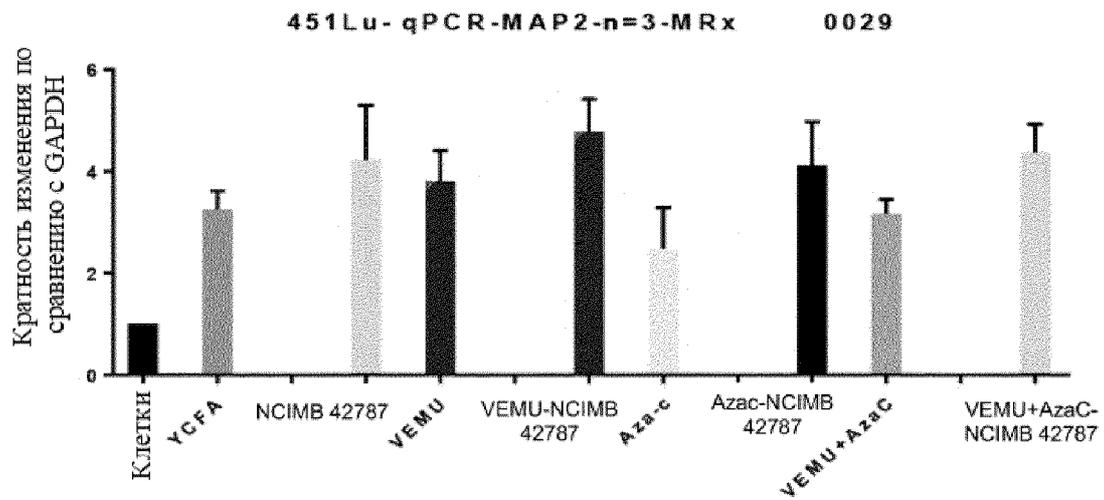
Фигура 42

Клеточная линия SKMEL31 – передача сигнала с участием ERK



Фигура 43

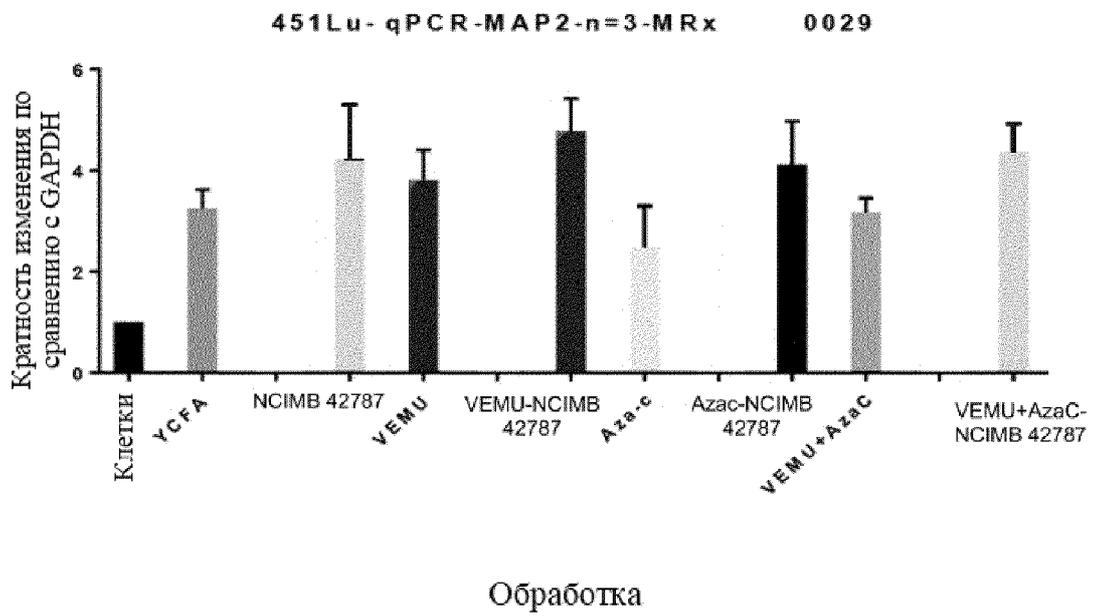
Клеточная линия 451Lu – экспрессия гена MAP2



Обработка

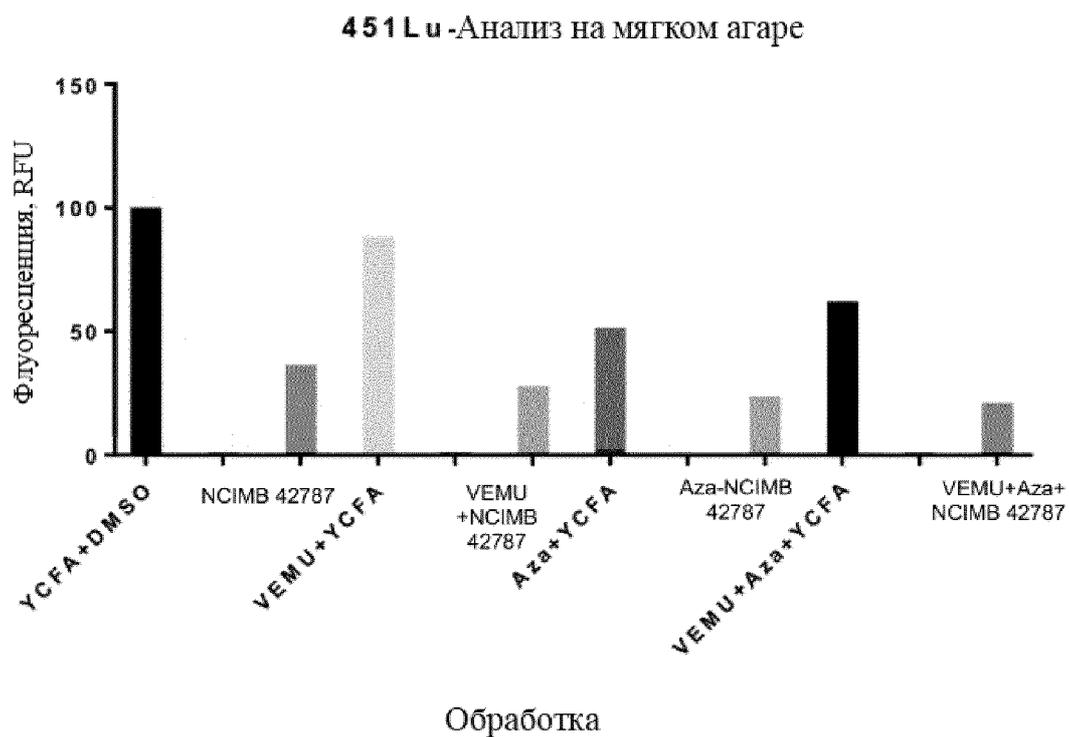
Фигура 44

Клеточная линия 451Lu – клоногенная выживаемость



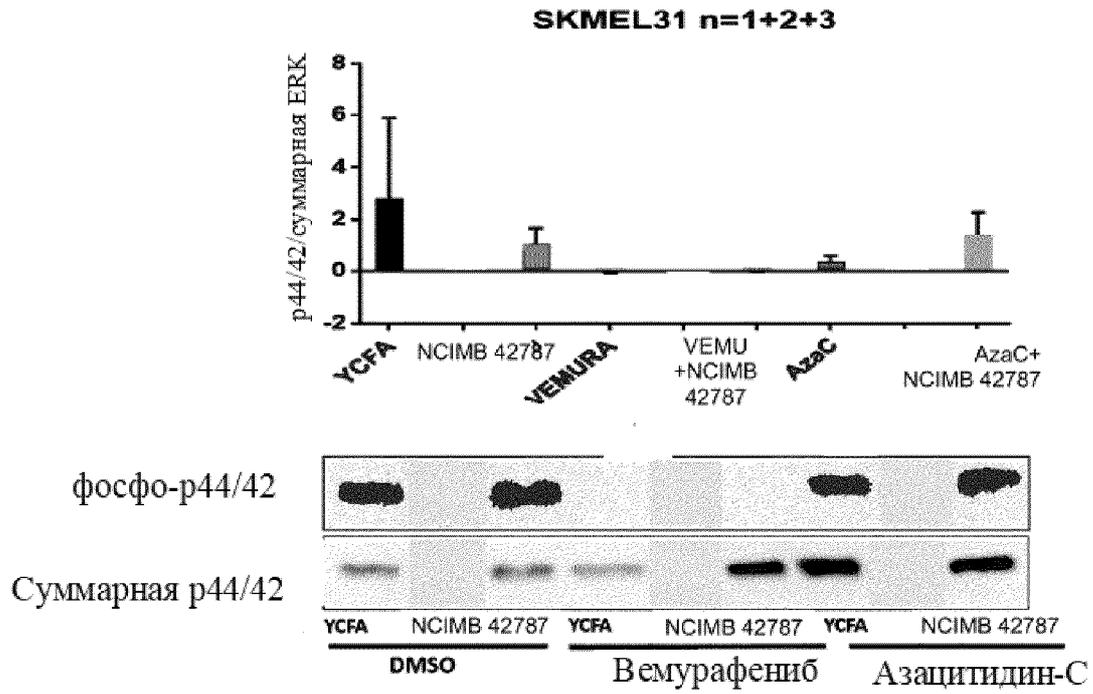
Фигура 45

Клеточная линия 451Lu – рост на мягком агаре



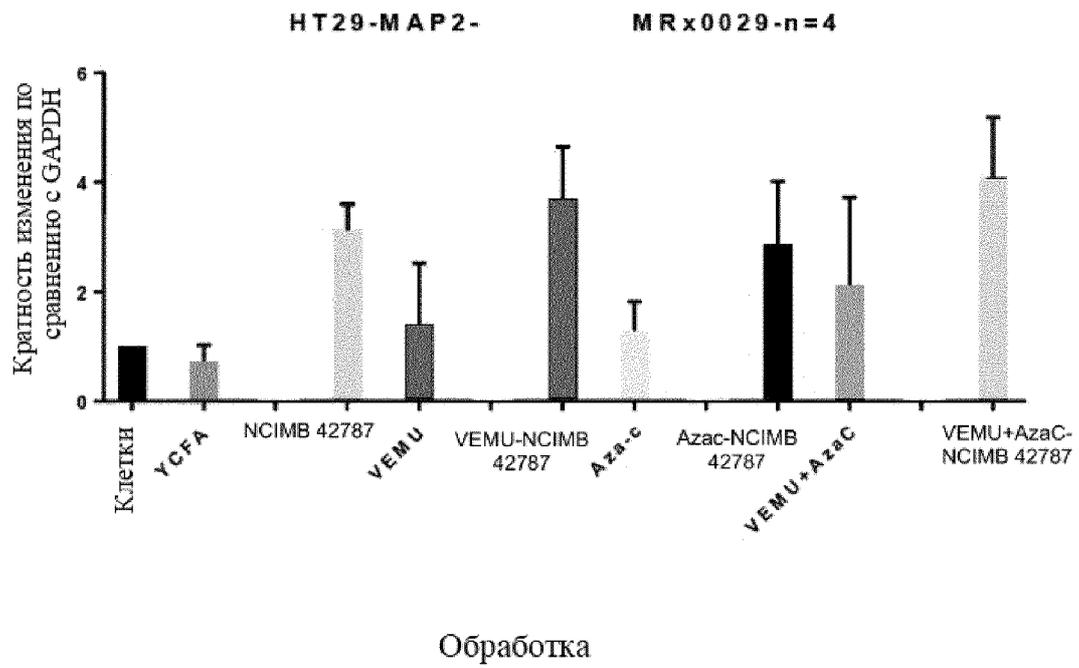
Фигура 46

Клеточная линия 451Lu – передача сигнала с участием ERK



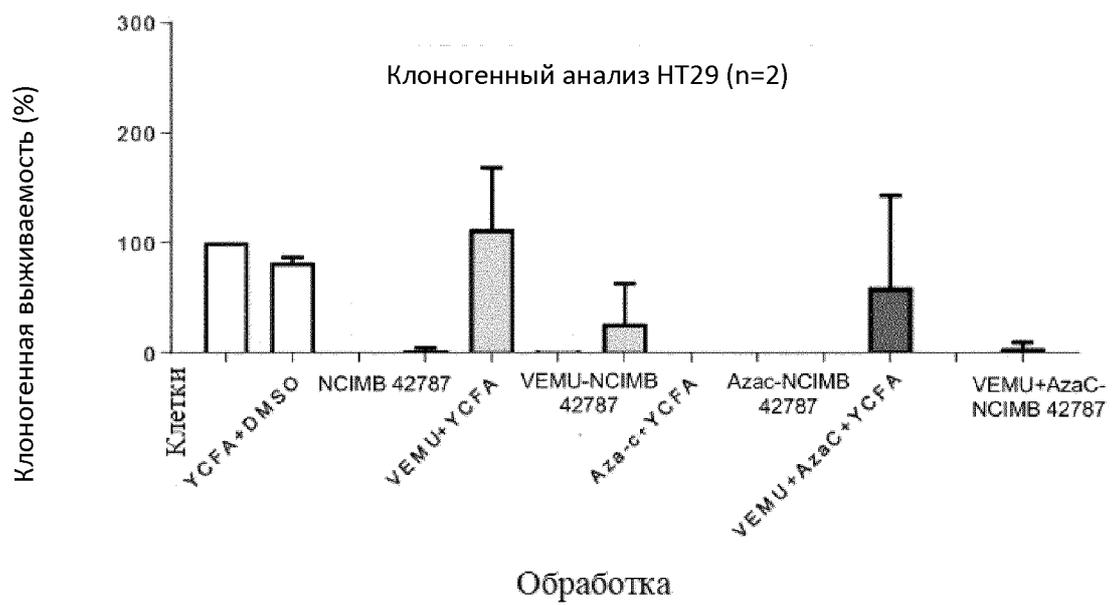
Фигура 47

Клеточная линия HN-29 – экспрессия гена MAP2



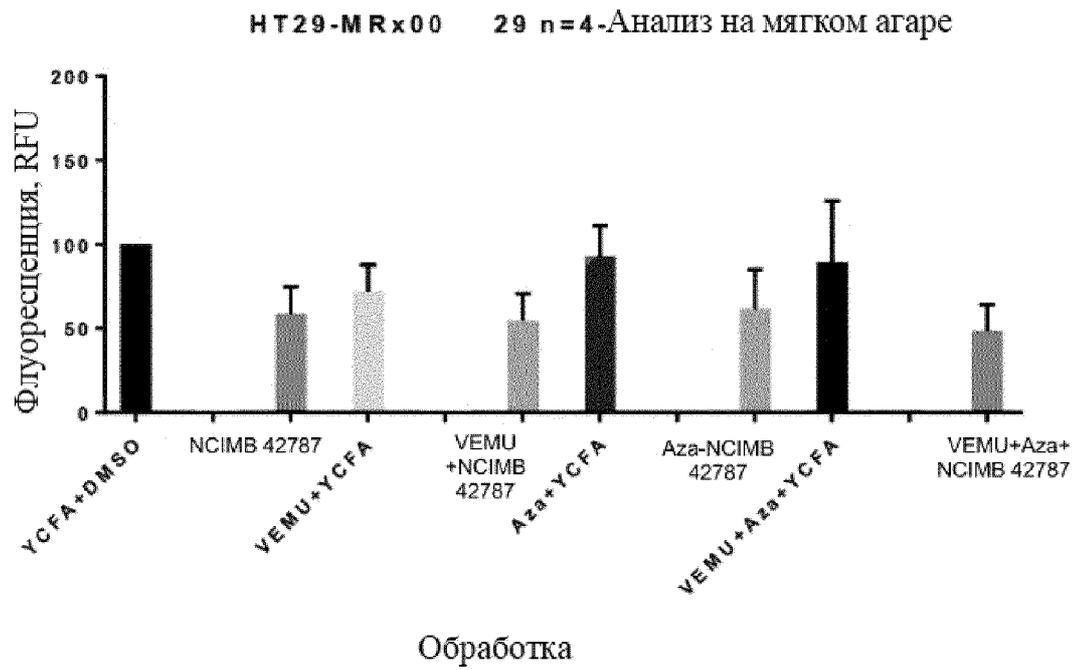
Фигура 48

Клеточная линия HT-29 – клоногенная выживаемость



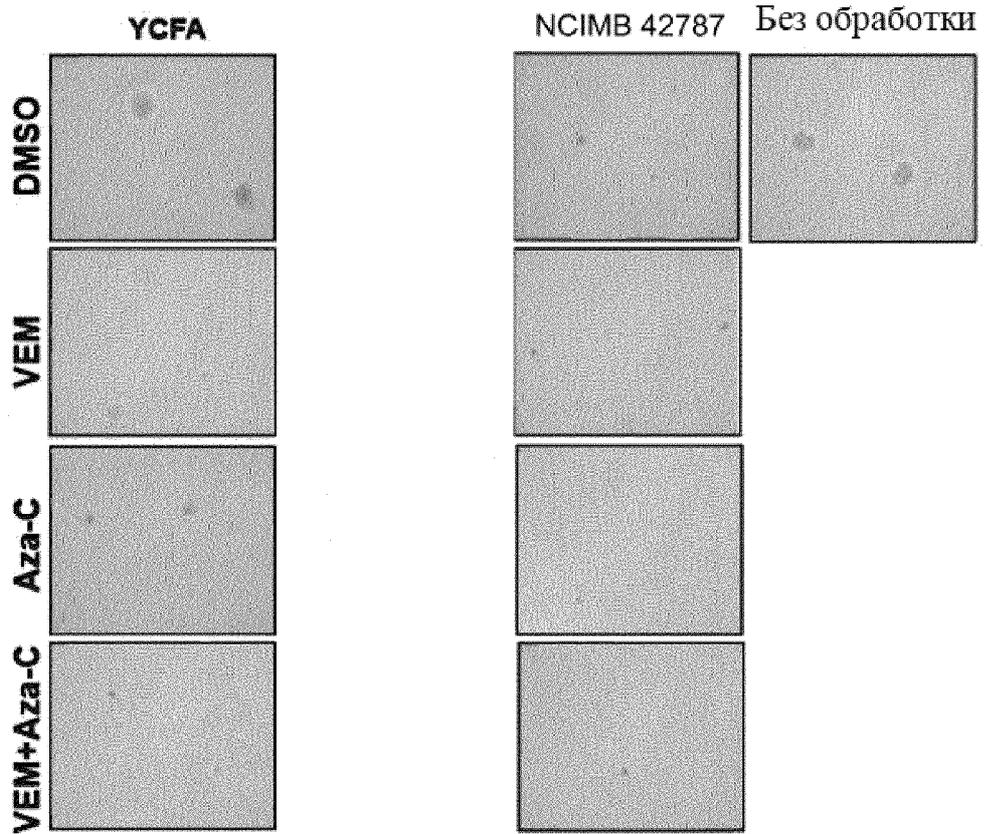
Фигура 49А

Клеточная линия HT-29 – рост на мягком агаре



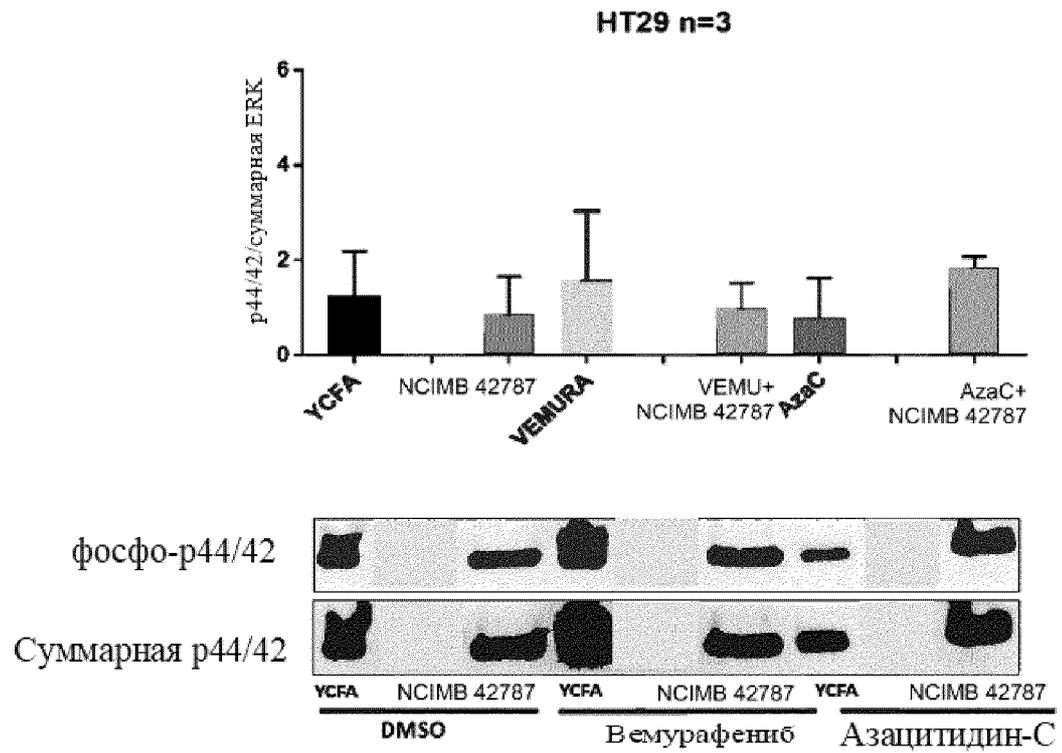
Фигура 49В

Клеточная линия HT-29 – рост на мягком агаре (колонии после обработок)

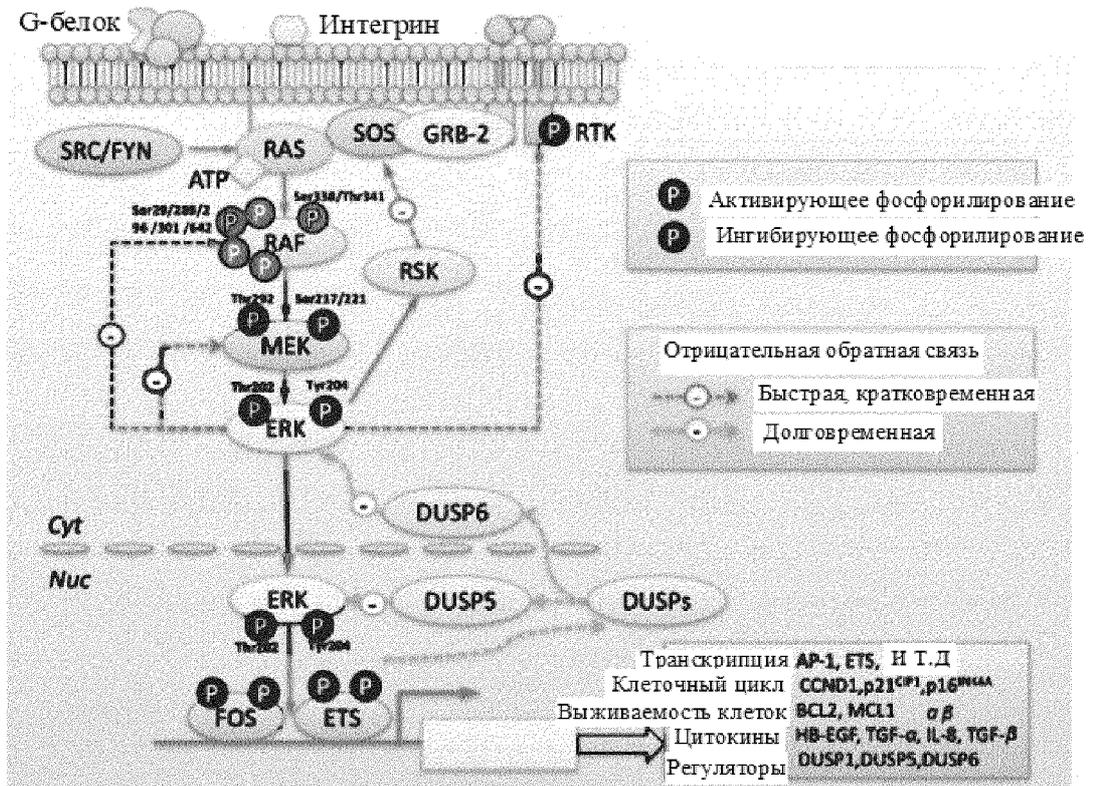


Фигура 50

Клеточная линия HT-29 – передача сигнала с участием ERK



Фигура 51

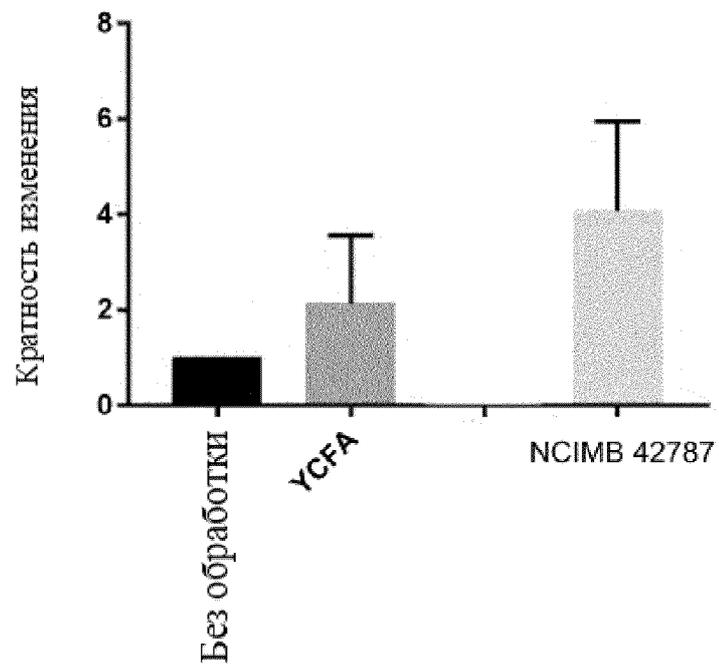


Фигура 52

Клетки Caco2 – экспрессия GPR109a

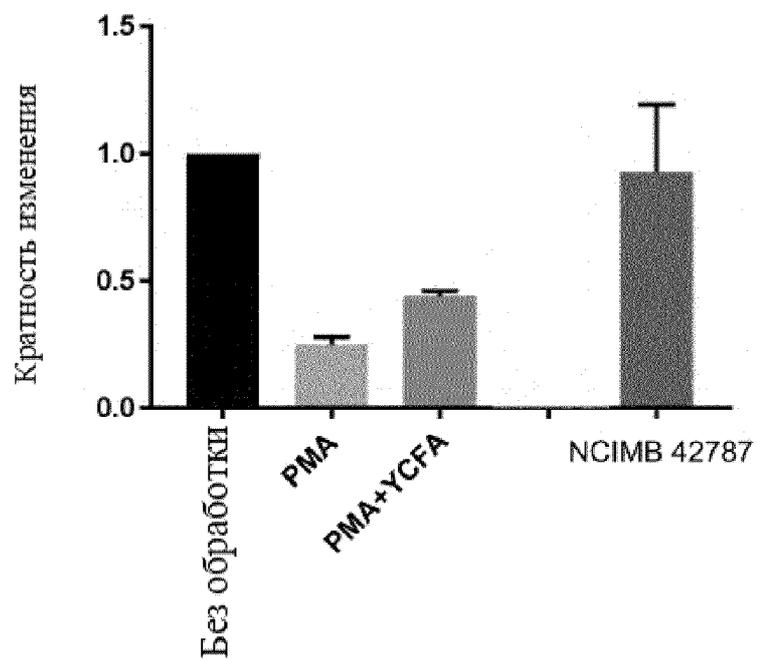
(A)

Экспрессия GPR109a в клетках Caco2



(B)

Экспрессия GPR109a в клетках Caco2

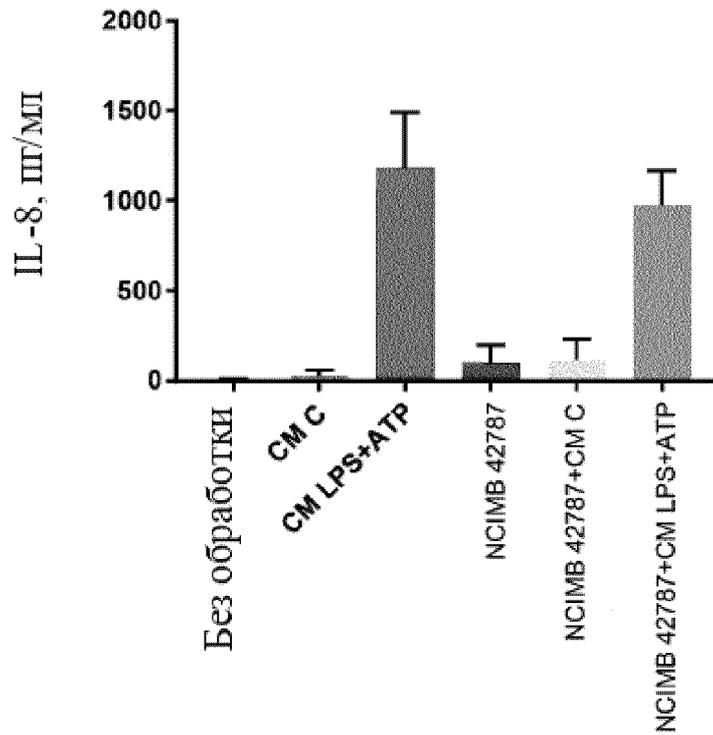


56/72

Фигура 53

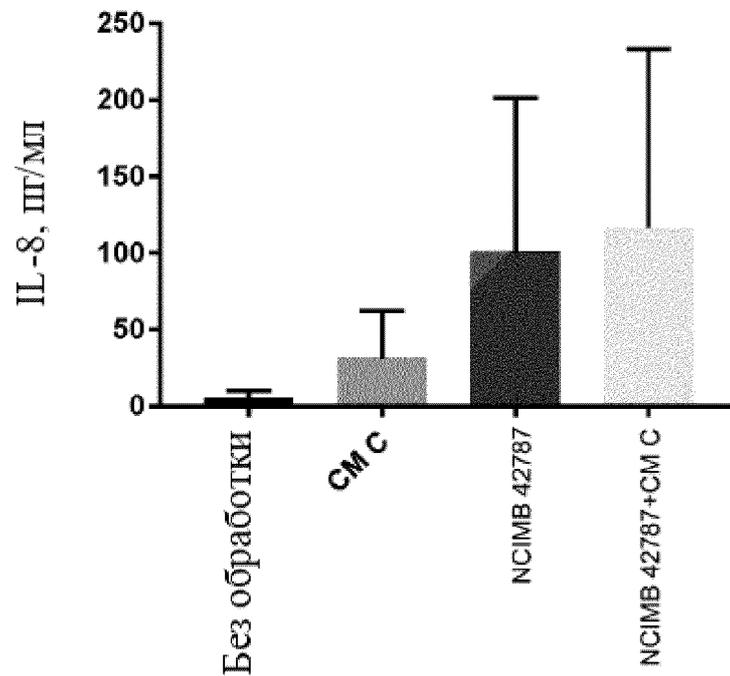
(A)

Секреция IL-8 в HT29 N=2

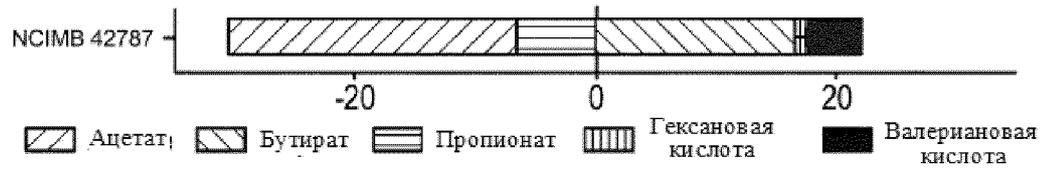


(B)

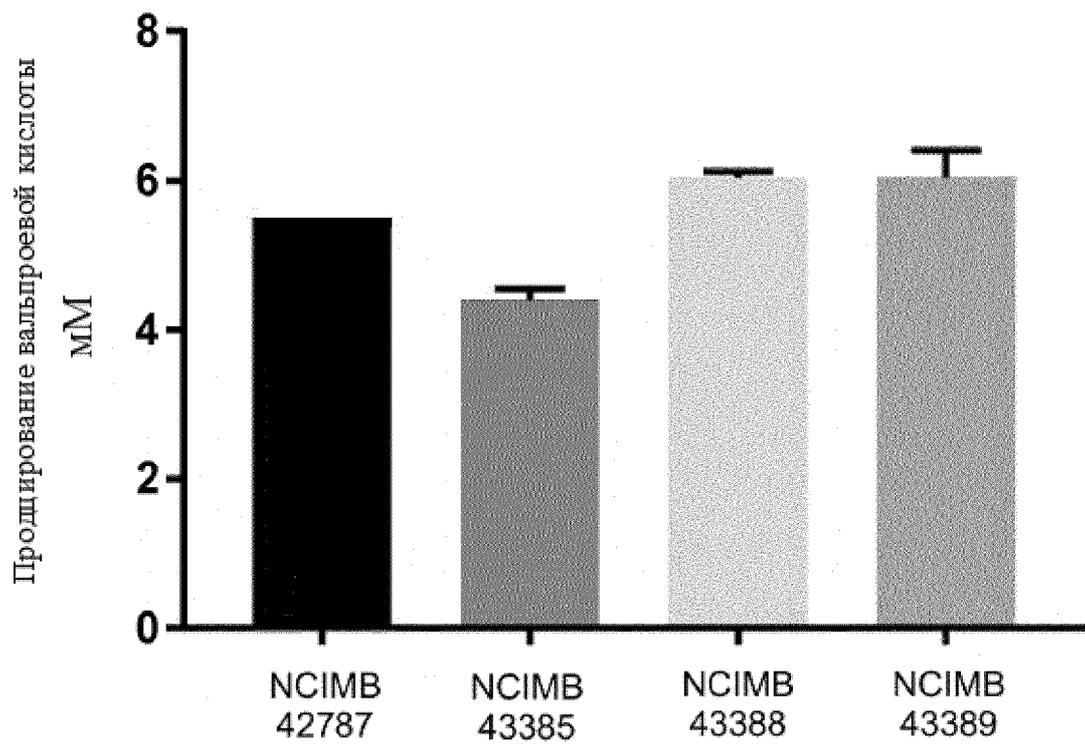
Секреция IL-8 в HT29 N=2



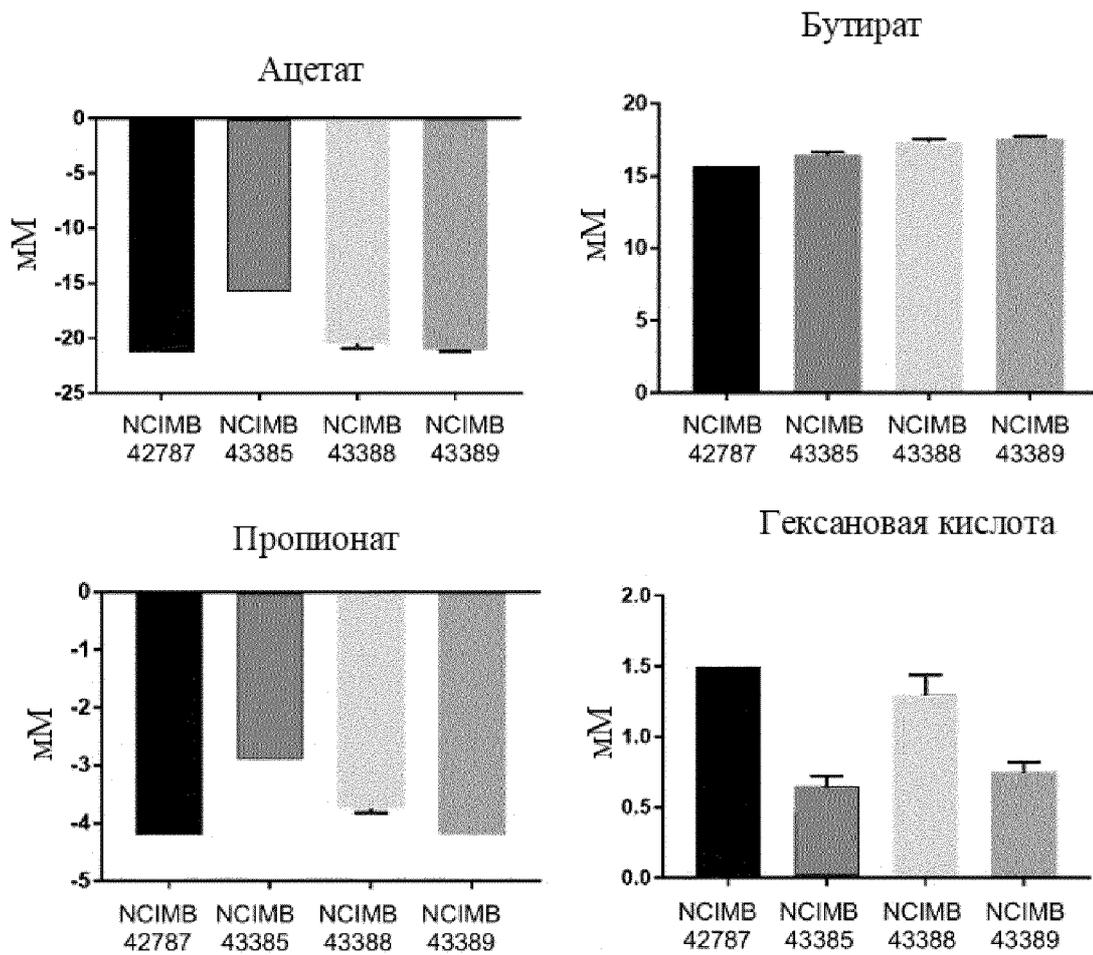
Фигура 54



Фигура 55

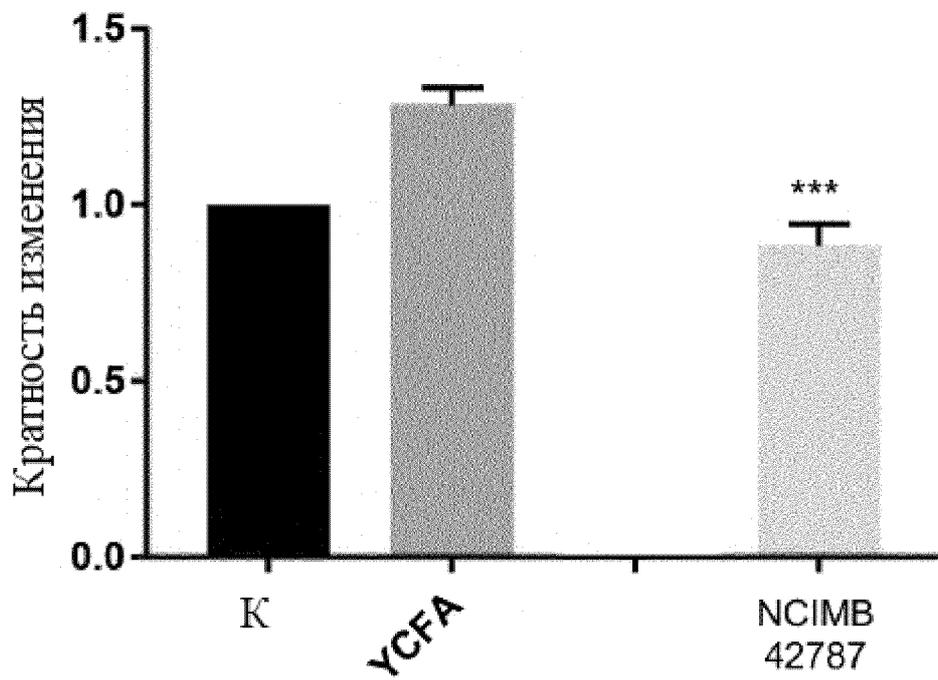


Фигура 56

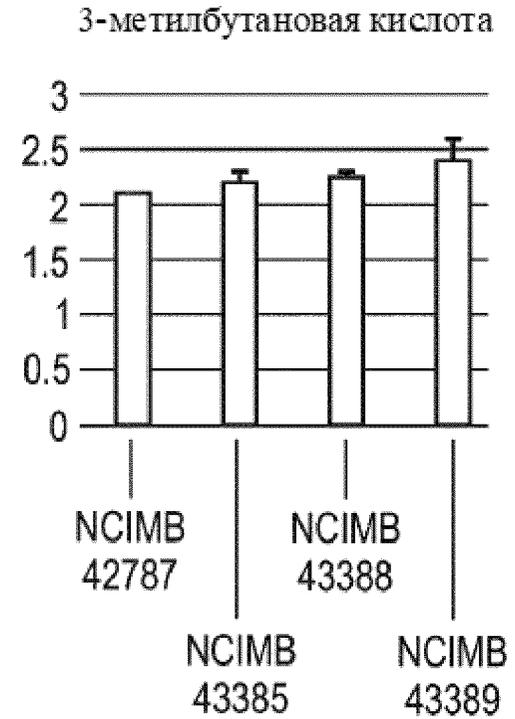
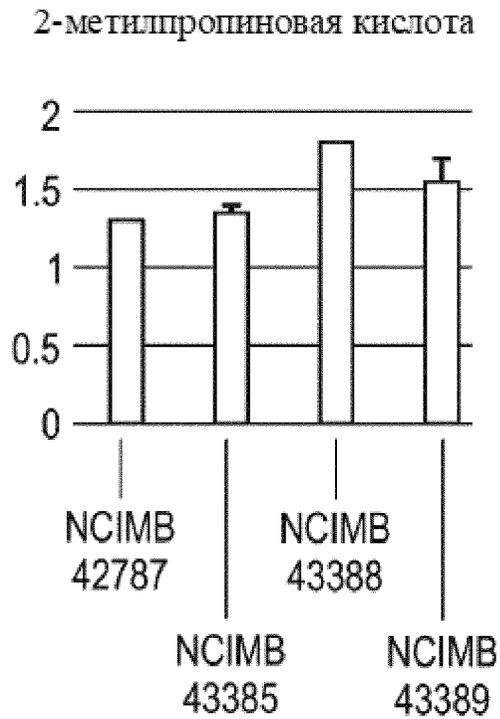
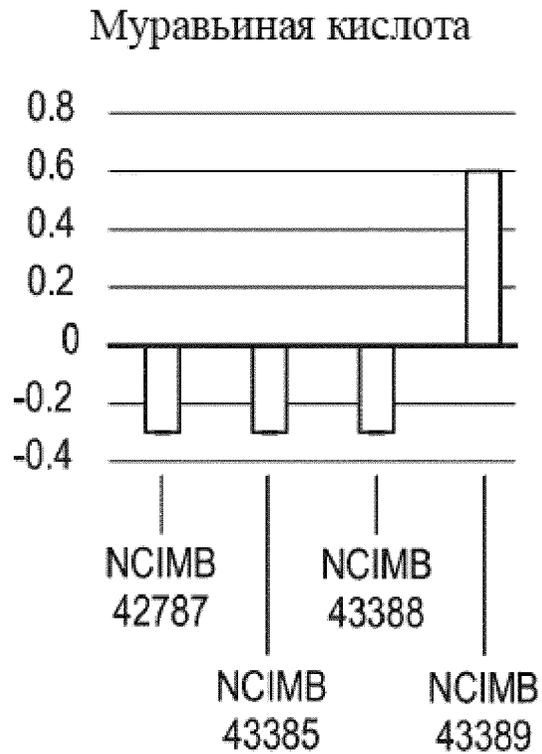


Фигура 57

NSE/енолаза 2 **n=3**



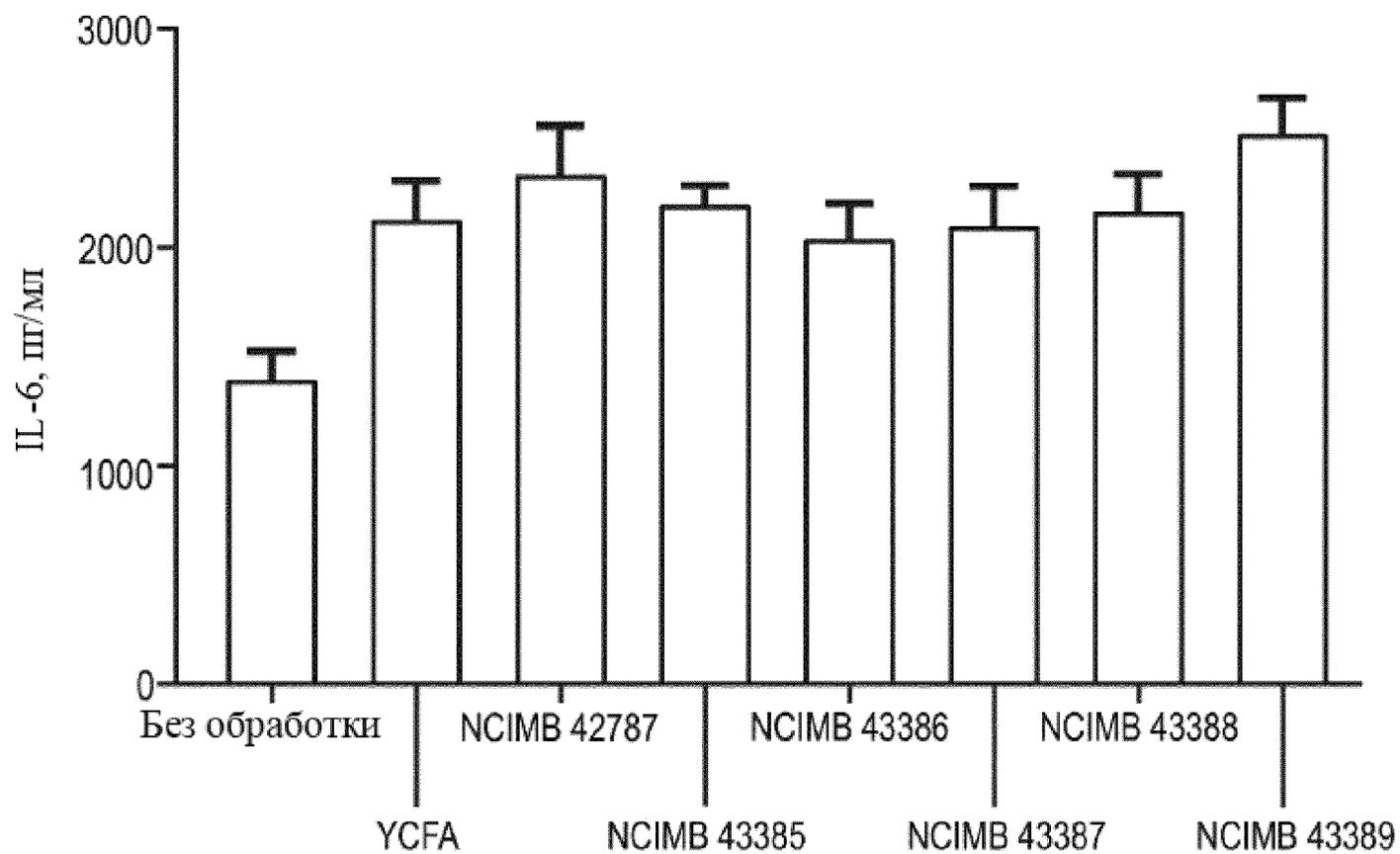
Фигура 58



61/72

Фигура 59

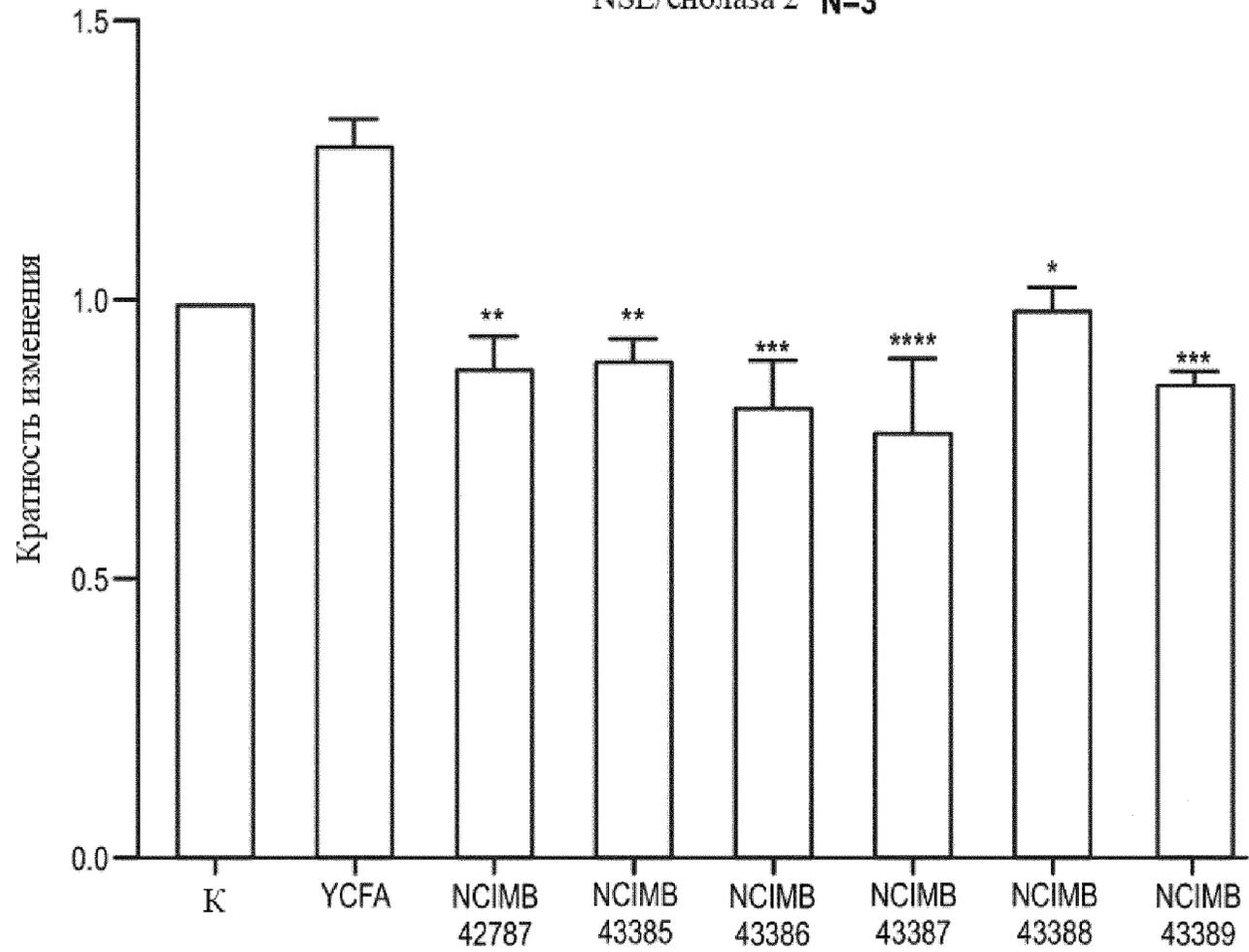
Секреция IL-6 в клетках U373 N=3



62/72

Фигура 60

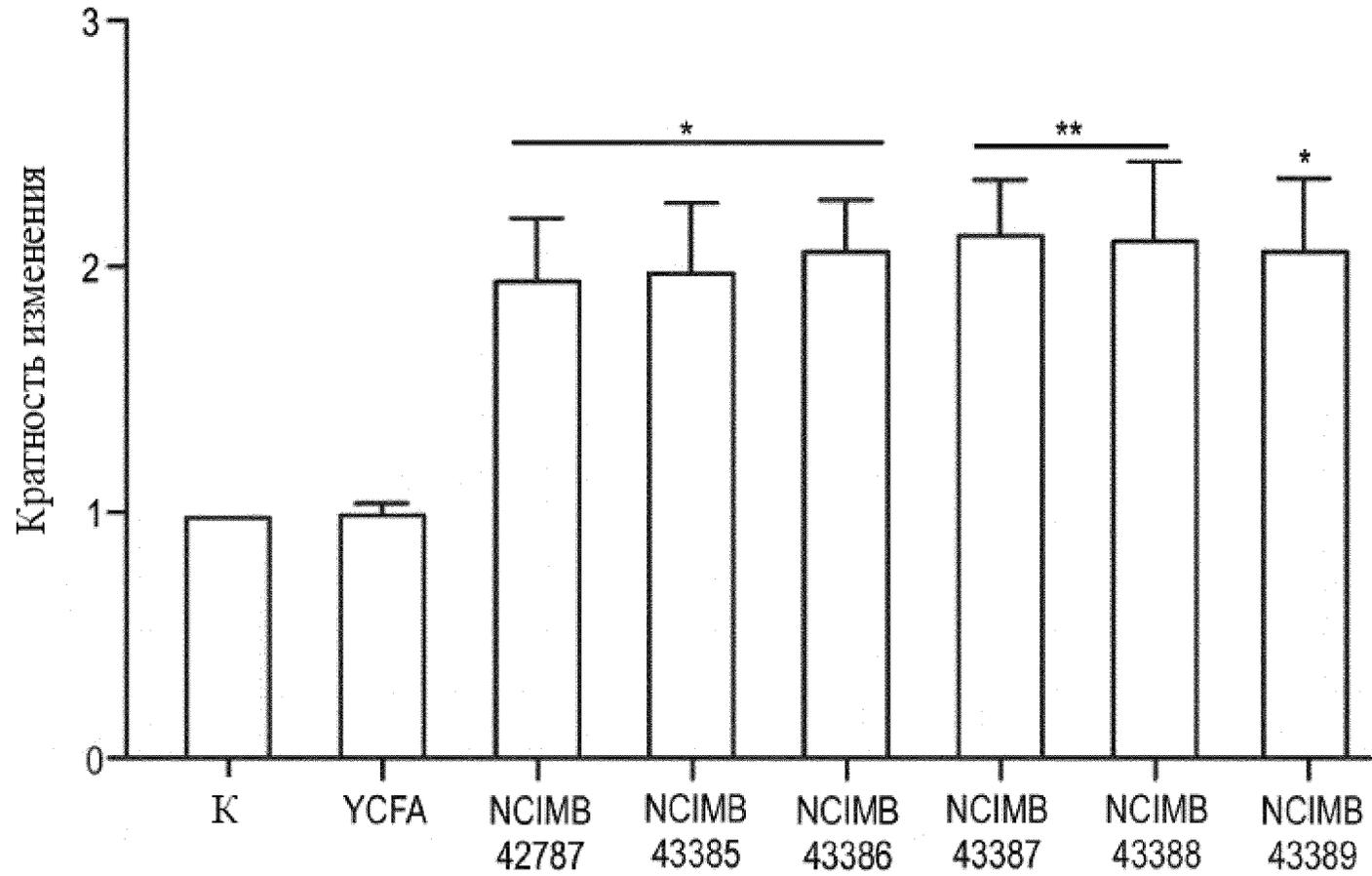
NSE/енолаза 2 N=3



63/72

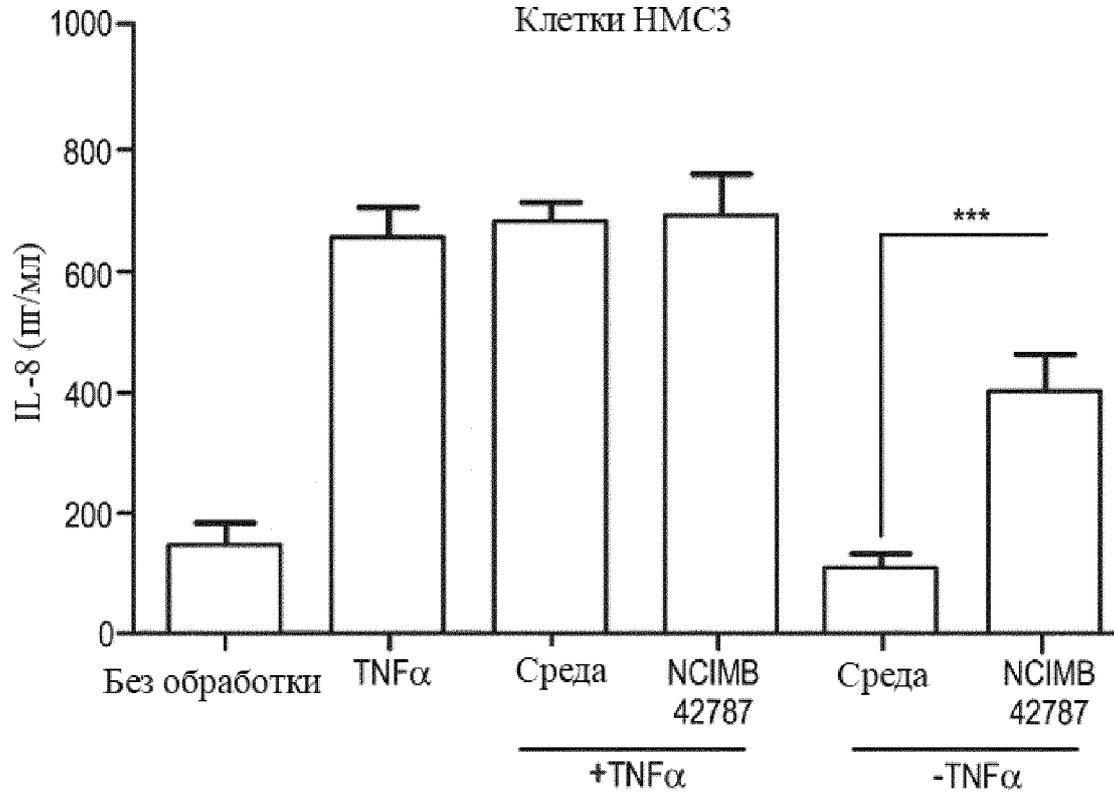
Фигура 61А

MAP2 (N=3)

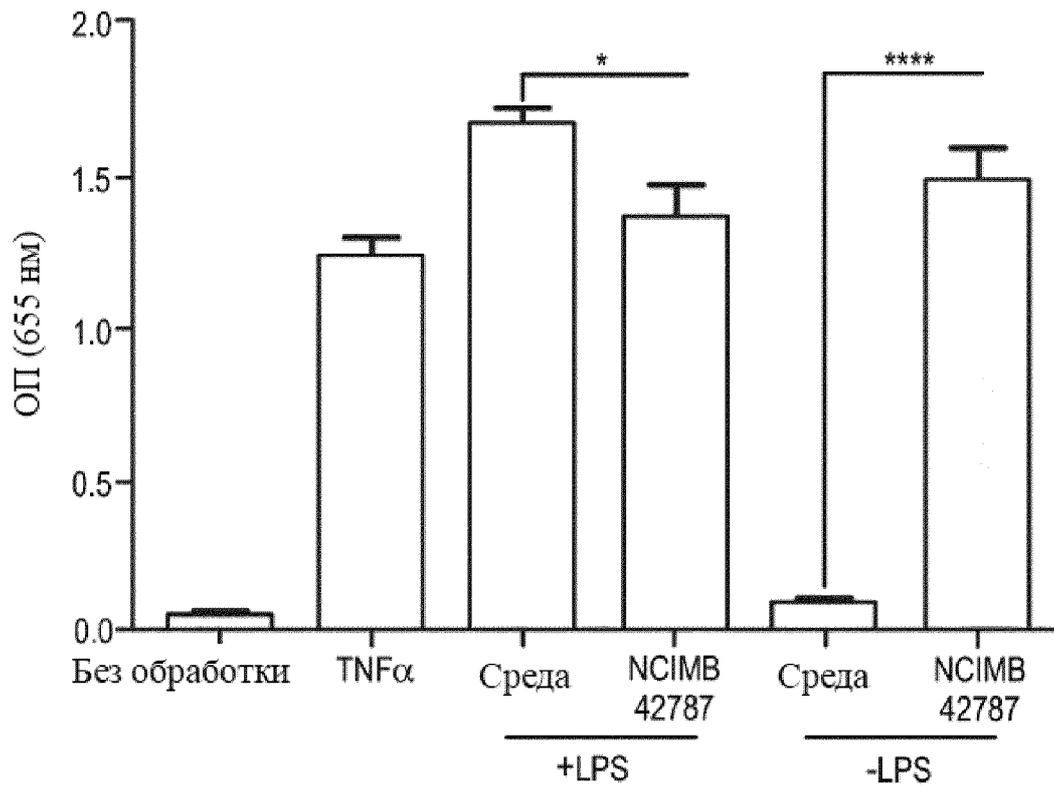


64/72

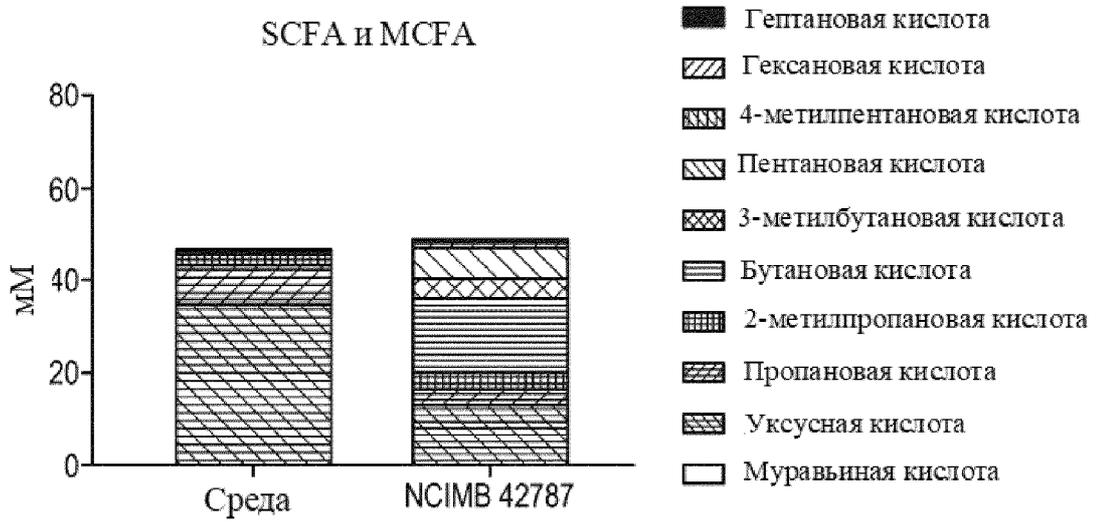
Фигура 61В
Клетки НМС3



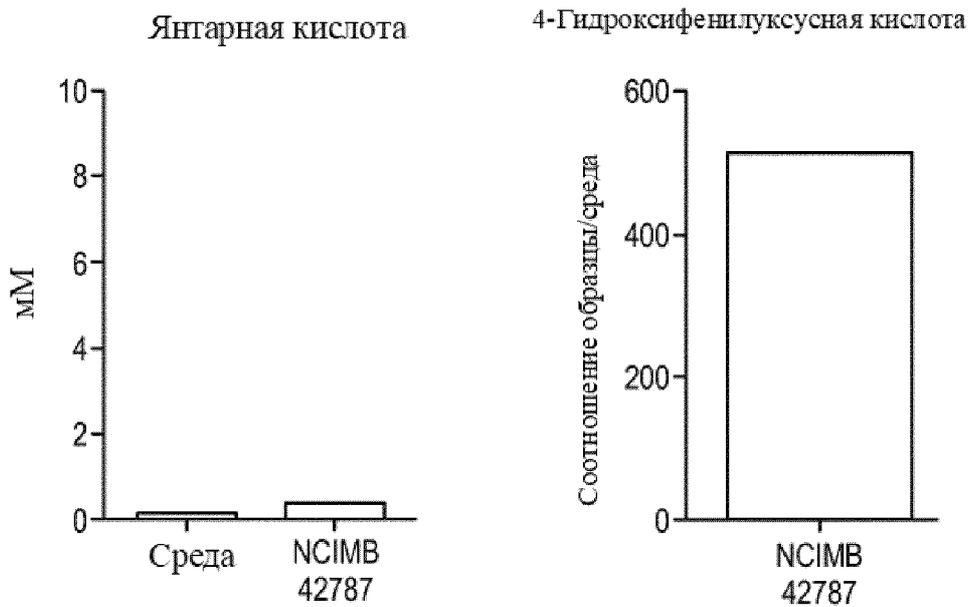
Фигура 61С
Клетки НЕК-TLR4



Фигура 62А

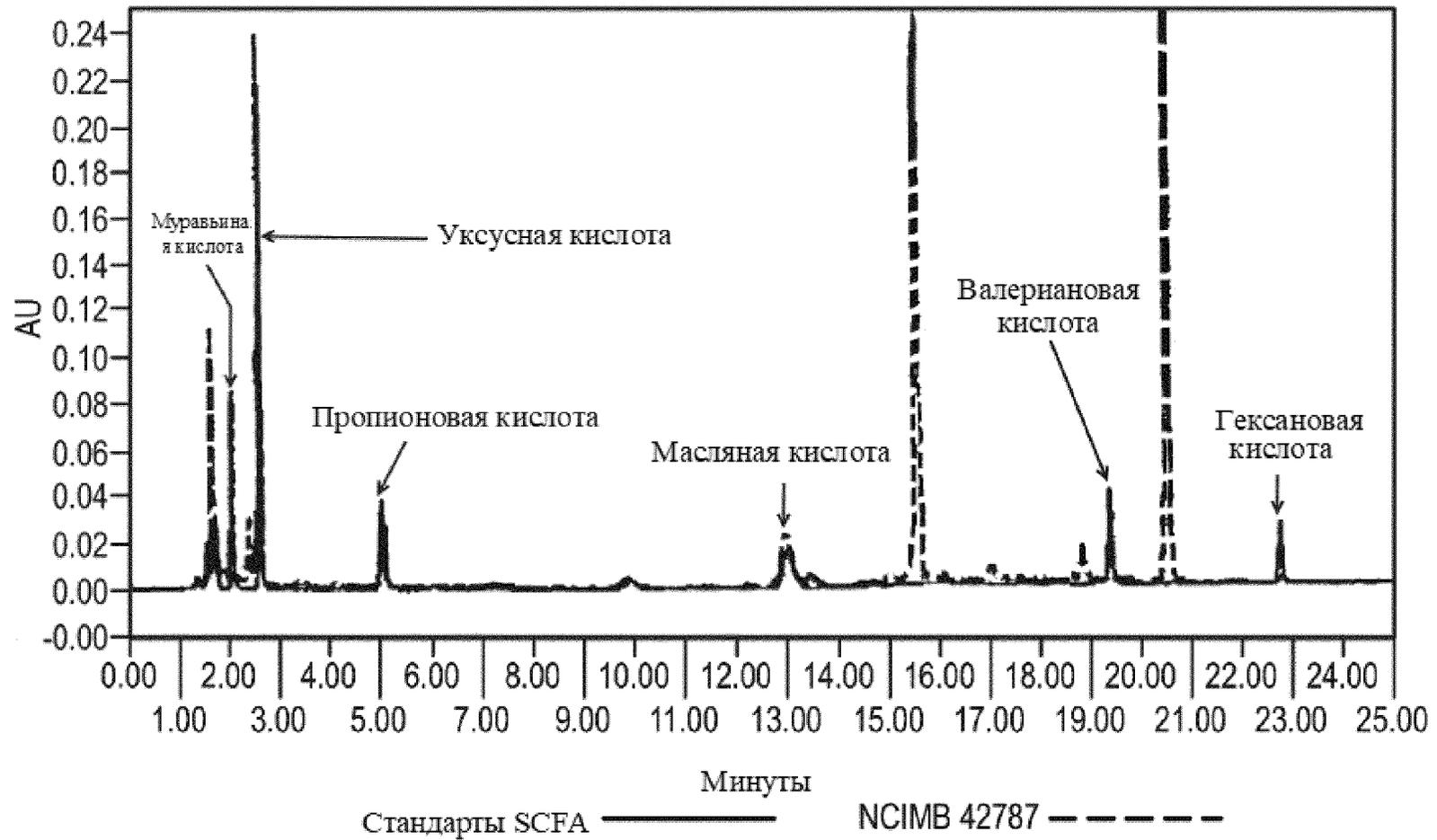


Фигура 62В



Фигура 62С

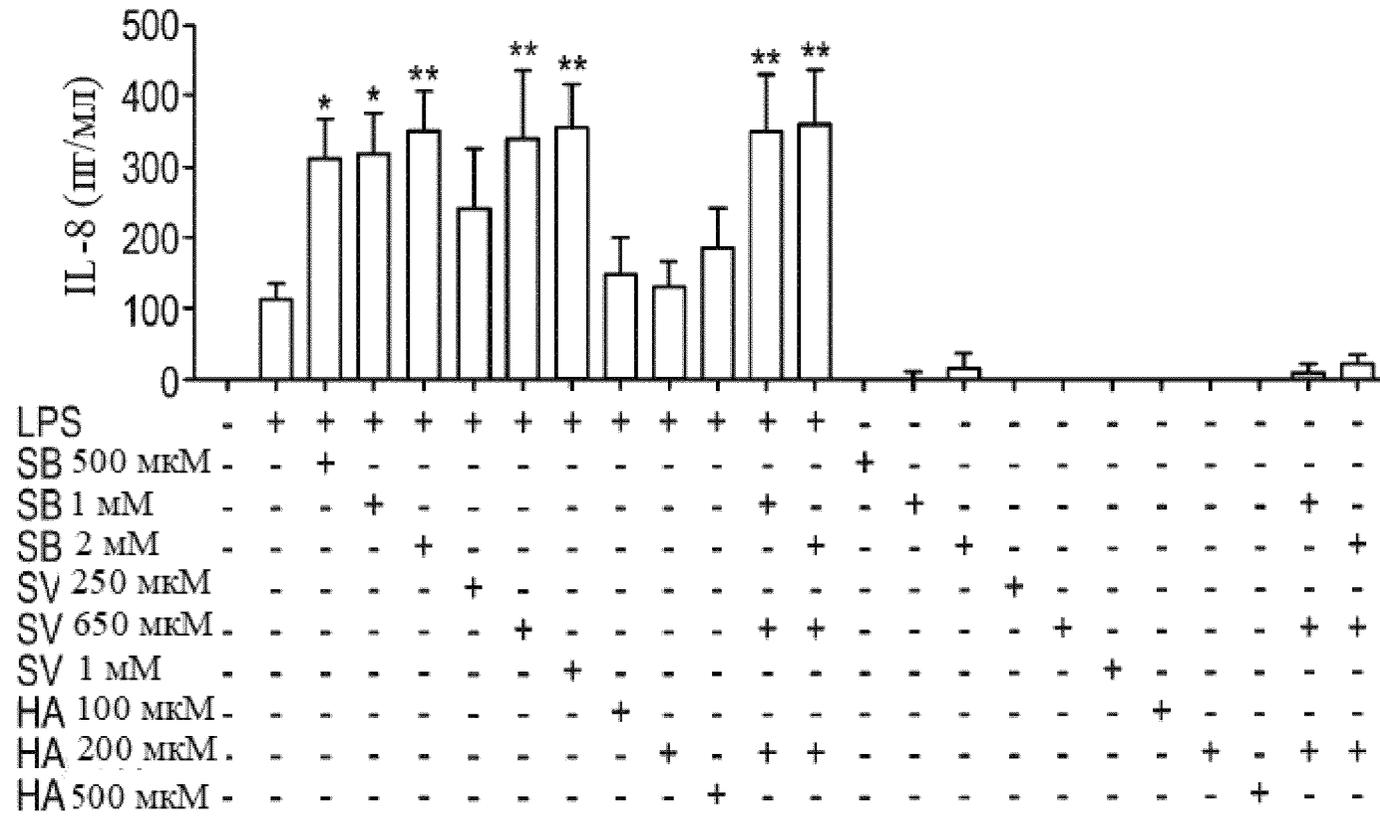
Стандарты SCFA и NCIMB 42787



67172

Фигура 63

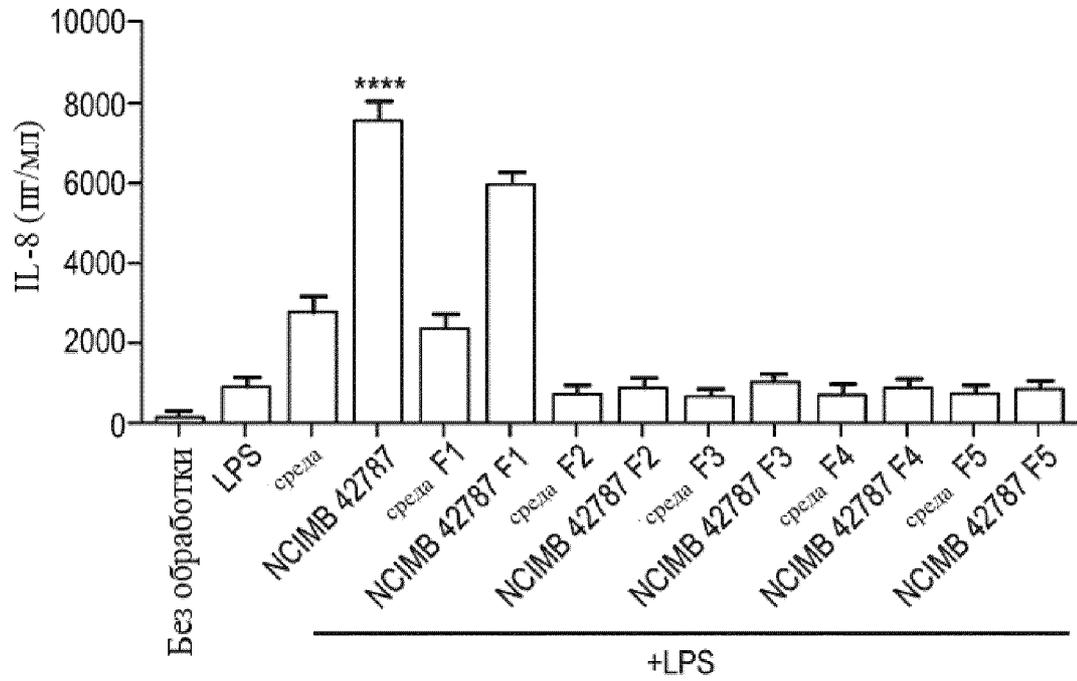
Клетки U373



69/72

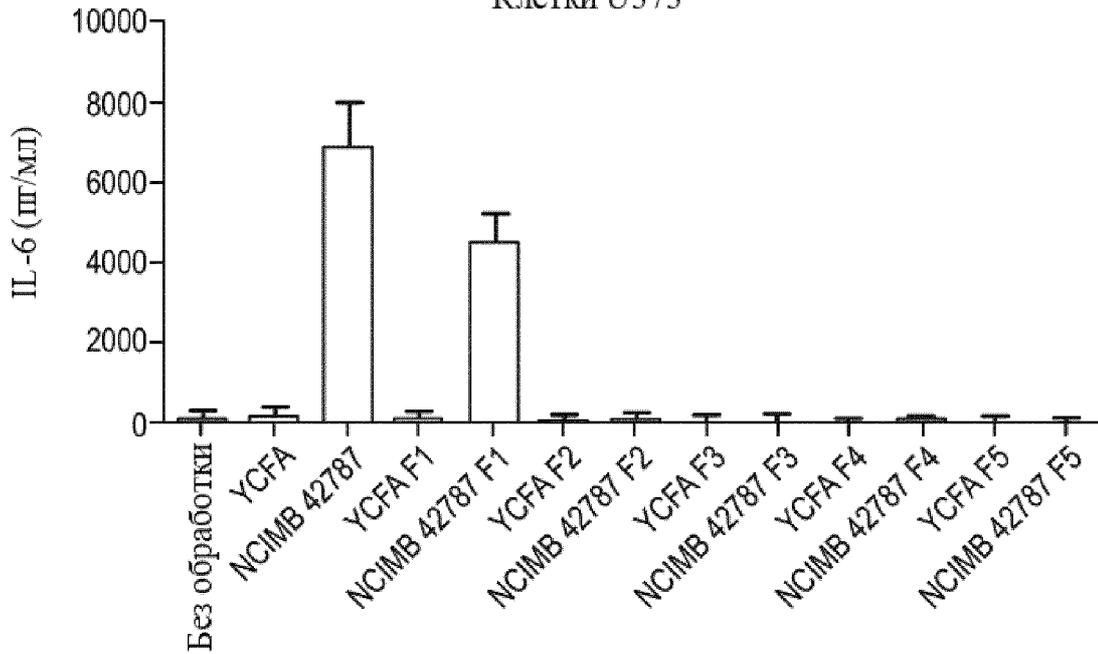
Фигура 64А

Клетки U373



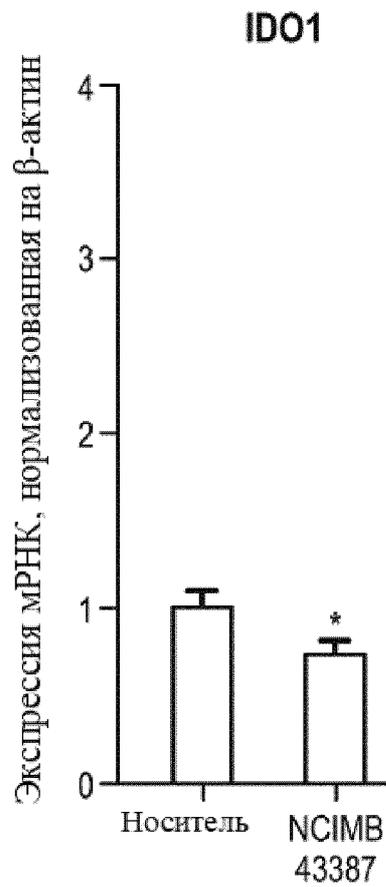
Фигура 64В

Клетки U373

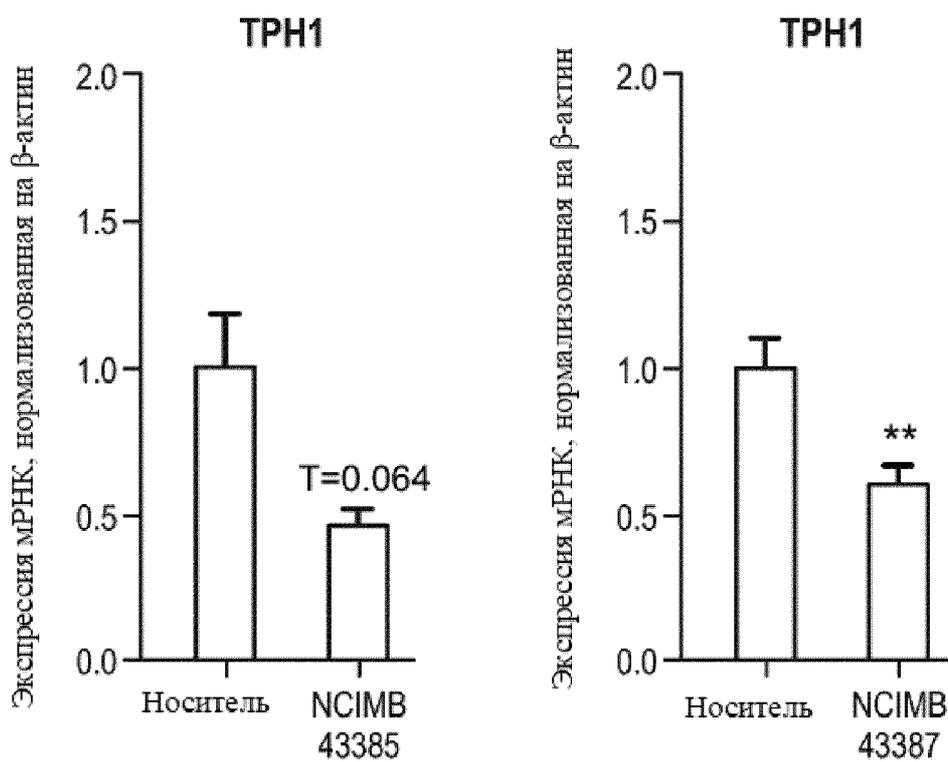


70/72

Фигура 65



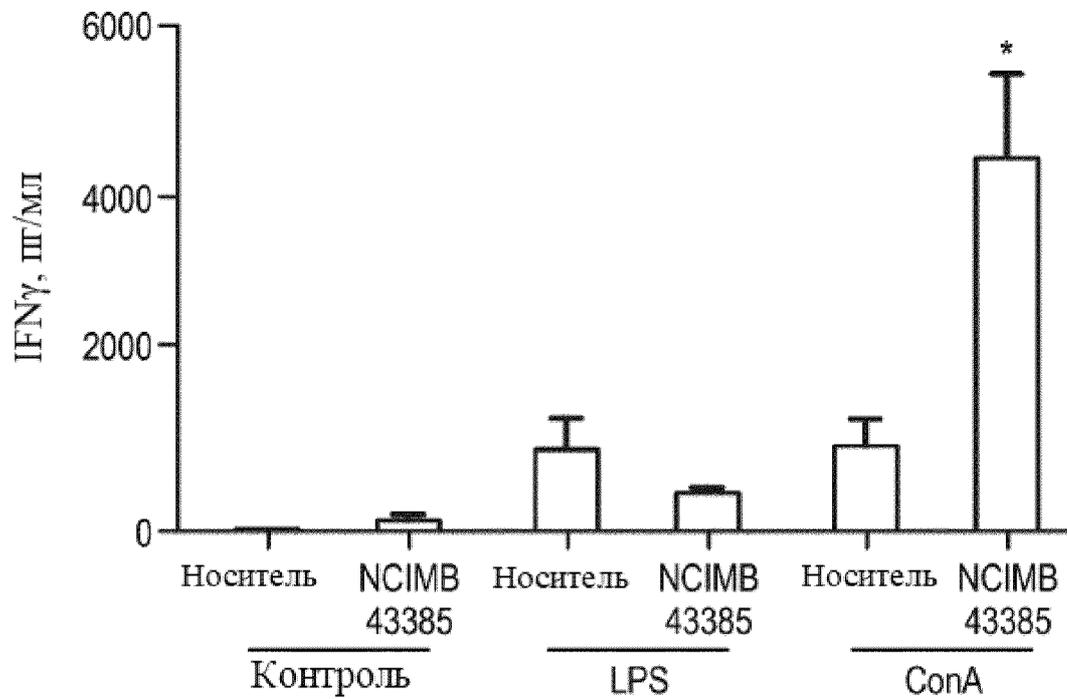
Фигура 66



71/72

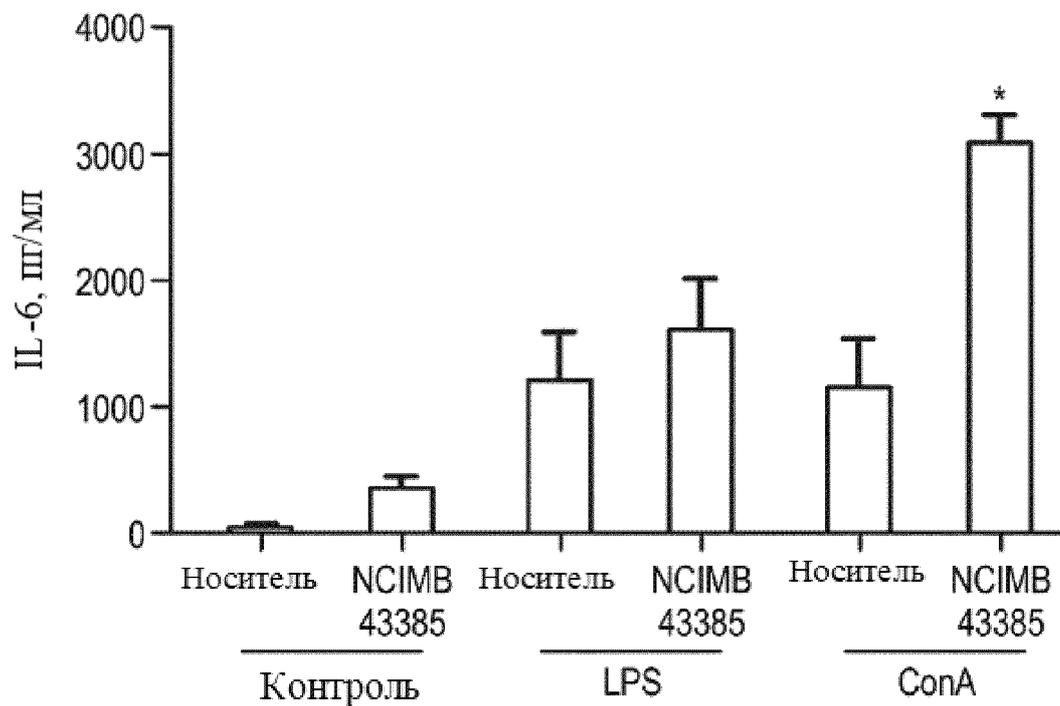
Фигура 67А

Интерферон- γ

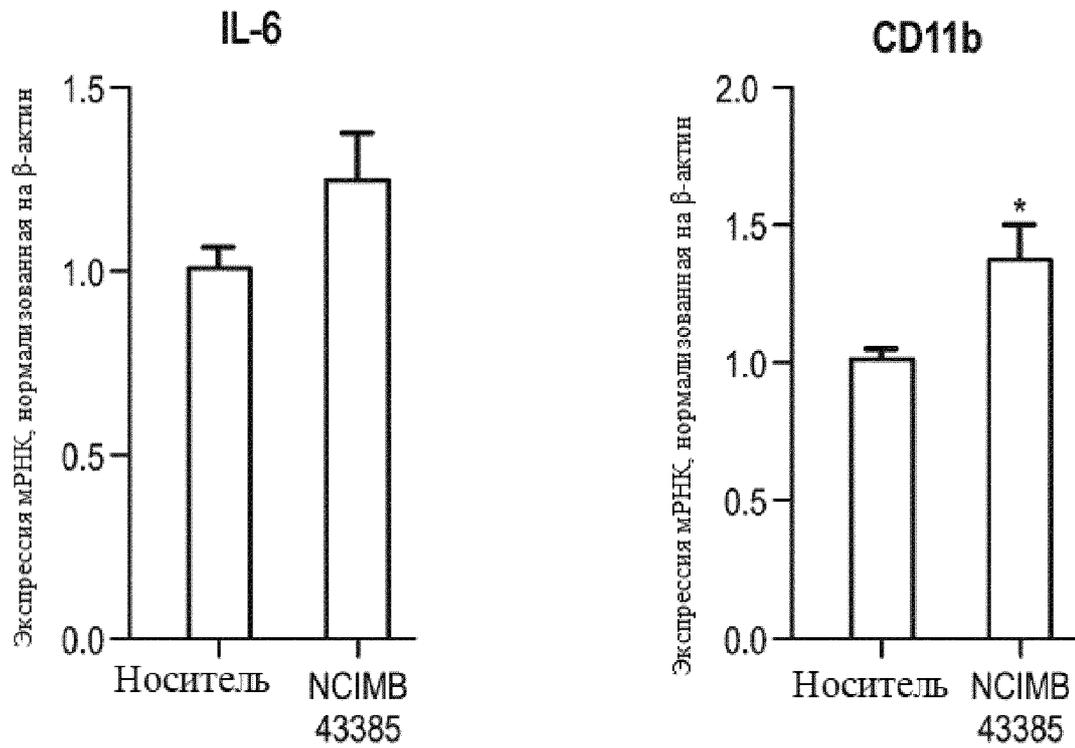


Фигура 67В

Интерлейкин-6



Фигура 68



Фигура 69

