

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241568**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **436821**

(22) Data zgłoszenia: **01.02.2021**

(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)
A61K 35/744 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Nowe szczepy Lactococcus lactis, kompozycje je obejmujące oraz ich zastosowanie
w zapobieganiu i leczeniu nowotworu raka jelita**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
08.08.2022 BUP 32/22

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.10.2022 WUP 44/22

(73) Uprawniony z patentu:
**INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI POLSKIEJ
AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:
PRZEMYSŁAW SAŁAŃSKI, Dębinki, PL
JACEK BARDOWSKI, Warszawa, PL
**AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA,
Bielawa, PL**
JOANNA BOGUSŁAWSKA, Ząbki, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Grzelak

PL 241568 B1

Opis wynalazku

DZIEDZINA TECHNIKI

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy bakterii: *Lactococcus lactis* IBB109, zdeponowany jako B/00311, oraz *Lactococcus lactis* IBB417, zdeponowany jako B/00312 o właściwościach probiotycznych, kompozycja, suplement diety, preparat probiotyczny, preparat bakteryjny je obejmujący oraz ich zastosowania, szczególnie do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita, korzystnie nowotworu jelita grubego.

STAN TECHNIKI

Bakterie kwasu mlekowego (BM) to zróżnicowana grupa mikroorganizmów wykorzystywana w przemyśle spożywczym, szczególnie w przemyśle mleczarskim, ale także w farmacji. Spośród tej grupy bakterii, część szczepów charakteryzuje się właściwościami probiotycznymi. Badania wielokrotnie potwierdziły korzystny wpływ szczepów BM o cechach probiotycznych na organizm człowieka czy zwierząt. Opiswane są wyniki prac nad próbami wykorzystywania BM w terapii przeciwnowotworowej (Liu i wsp. 2011, Banna i wsp. 2017).

Rak jelita grubego (CRC) jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych. Na świecie co trzeci przypadek wystąpienia nowotworu u mężczyzn i co drugi u kobiet jest rakiem tego typu. Dane statystyczne wskazują, że w roku 2011 niemalże 6 tys. mężczyzn oraz 5 tys. kobiet w Polsce zmarło w wyniku tej choroby. Szacuje się, że w roku 2025 liczba zgonów może wzrosnąć nawet 2–3 krotnie. CRC wykrywany późno charakteryzuje się wysoką śmiertelnością. Szacuje się, że około 1/3 zgonów z powodu chorób nowotworowych związana jest ze złymi nawykami żywieniowymi czy stylem życia, m.in. niskim spożyciem owoców i warzyw, brakiem aktywności fizycznej, a także używaniem tytoniu i alkoholu (Brenner i wsp. 2014). Wyżej wymienione czynniki powiązane są z dysbiozą normalnej mikrobioty jelitowej. Zaburzenia składu mikroorganizmów bytujących w jelicie prowadzą, w konsekwencji, do ekspansji bakterii chorobotwórczych, które w wyniku swej aktywności, np. produkcji toksyn, wywołują procesy zapalne i kancerogenezę. Według danych doświadczalnych przywrócenie równowagi mikrobioty jelitowej jest często skutecznie wspierane przez szczepy BM (Skrzydło-Radomańska i Wronecki 2018).

Drobnoustroje należące do grupy BM znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, gdzie wykorzystywane są jako szczepy starterowe w produkcji fermentowanych produktów mlecznych, tj. sery, jogurty, maślanki. Badania pokazują, że w krajach, w których mieszkańcy spożywają dużą ilość fermentowanych produktów spożywczych (kiszonki, produkty mleczne) zawierających BM, występuje niższa zachorowalność na CRC (Górska i wsp. 2019). Rola dobroczynnego wpływu BM na zdrowie ludzi i zwierząt jest historycznie udokumentowana i przyczyniła się do nadania im statusu bakterii GRAS (generally regarded as safe) (Wasilewska i wsp. 2013, Collado i wsp. 2009).

Niektóre szczepy BM posiadają właściwości probiotyczne, wpływające korzystnie na organizm gospodarza, m.in. poprzez produkcję substancji hamujących wzrost bakterii patogennych, konkutowanie z nimi o substancje odżywcze i niszę ekologiczną, hamowanie działania substancji toksycznych, a także stymulację układu odpornościowego gospodarza (Markowiak i wsp. 2017). Wyniki badań doświadczalnych wskazują na korzystny wpływ wybranych szczepów BM na przebieg i złagodzenie objawów niektórych stanów chorobowych takich jak, cukrzyca, otyłość, czy przewlekłe stany zapalne jelit (Markowiak i wsp. 2017).

Sugeruje się również możliwość zastosowania BM jako czynników antynowotworowych w terapii CRC (Mego i wsp. 2013). Przesłanki ku temu dostarczają zarówno testy *in vitro*, z wykorzystaniem modelowych komórek nowotworowych ludzkiego raka jelita grubego, jak i w eksperymentach *in vivo* na zwierzętach modelowych, pokazujące zdolność szczepów BM do hamowania wzrostu komórek raka, czy poprawy odpowiedzi immunologicznej, w tym indukcji cytokin prozapalnych oraz regulatorowych (Zhong i wsp. 2014, Jacouton i wsp. 2017, Górska i wsp. 2019). Antyproliferacyjna czy proapoptyczna aktywność BM w stosunku do komórek raka jelita grubego jest cechą szczepozależną i potwierdzona została dla wybranych szczepów m.in. z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* czy *Pediococcus* (Yu i Li 2016). Jednak jak dotąd podobny efekt nie był obserwowany u BM rodzaju *Lactococcus*. W terapii i prewencji rozwoju choroby u pacjentów z CRC wykazano także efekt preparatów probiotycznych skomponowanych z udziałem bakterii mlekowych (Yu i Li 2016). Inne badania pokazały, że spożycie kefiru, zawierającego 6 szczepów BM, zwiększa cytotoksyczność komórek NK linii KHYG-1 wobec komórek

HCT116 guza jelita grubego (Yamane i wsp. 2018). Efekt ten był widoczny zarówno przy zastosowaniu żywych szczepów jak i po ich termicznej inaktywacji.

Wyniki dotychczasowo przeprowadzonych eksperymentów pokazują, że karcenogeneza ma wpływ nie tylko na komórki układu odpornościowego, lecz wiąże się również z zaburzeniami w ekspresji niekodujących cząsteczek mikroRNA (miRNA) (Deepak i wsp. 2016). Stąd uważa się, że miRNA wytwarzane przez komórki eukariotyczne mogą być odpowiednimi biomarkerami do diagnostyki, prognozowania i przewidywania wyników leczenia raka. Istnieją przykłady opisujące wpływ miRNA na ekspresję kluczowych genów zaangażowanych w proliferację, inwazję i apoptozę, bezpośrednio przyczyniających się do procesu rakotwórczego w okrężnicy (Wu i wsp. 2011). Badania sugerują, że przeciwnowotworowe działanie preparatów probiotycznych zawierających szczepy bakterii mlekowych może wiązać się z ich wpływem na ekspresję cząsteczek miRNA związanych bezpośrednio z regulacją genów zaangażowanych w procesy nowotworzenia (Kreuzer-Redmer i wsp. 2016, Heydari i wsp. 2019). Pokazano, że unikatowe szczepy bakterii mlekowych gatunku *Lactobacillus acidophilus* oraz *Bifidobacterium bifidum* wpływają na podwyższenie ekspresji miRNA supresorowych raka jelita grubego (Heydari i wsp. 2019). Opisano również szczepy *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp. mające wpływ na regulację poziomu cząsteczek miR-122a i miR-146a, mających odpowiednio wpływ na ekspresję genu okludyny (białka uszczelniające połączenia komórek nabłonka jelita) oraz genów TRAF6 and GSK-3 β (zaangażowanych w wrodzoną odpowiedź immunologiczną i stany zapalne) (Zhao i wsp. 2015, Zhou i wsp. 2015). W badaniach wskazuje się, że wpływ bakterii mlekowych na komórki rakowe jest złożony i wyłącznie specyficzny dla określonych szczepów.

Dopuszczenie do powszechnego stosowania BM o nieznannej sekwencji genomu prowadzić może, w szczególności u pacjentów o obniżonej odporności, do rozwoju BM o charakterze oportunistycznym i wywoływania przez nie chorób, dlatego ważne jest określenie biobezpieczeństwa szczepów zarówno na poziomie genetycznym jak i fizjologicznym.

Znane ze stanu techniki rozwiązania, dotyczą grupy BM, która posiada bardzo wysoki stopień zróżnicowania. Wpływ BM na CRC jest właściwością szczepozależną, dlatego też nie cała grupa bakterii BM ma właściwości prozdrowotne, jak również nie da się określić wpływu wszystkich szczepów BM na ewentualny przebieg terapii chorób. Z tego powodu wciąż poszukuje się unikatowych szczepów BM wykazujących efekt terapeutyczny. Poszukiwania koncentrują się na szczepach wykazujących silniejszy, stabilniejszy i ukierunkowany na konkretne jednostki chorobowe efekt terapeutyczny niż wykazują szczepy znane ze stanu techniki.

ISTOTA WYNAŁAZKU

Istnieje ciągła potrzeba dostarczenia nowych, unikatowych, stabilnych i bezpiecznych szczepów BM, które ze względu na swoje szczepozależne właściwości fizjologiczne będą działały w przewodzie pokarmowym w sposób specyficzny, zapobiegając rozwojowi, ograniczając rozwój i/lub będą stosowane w terapii nowotworu jelita, szczególnie będą wykazywały terapeutyczny wpływ na komórki raka jelita grubego. Istotne w potencjalnym zastosowaniu szczepów bakteryjnych w terapii/prewencji nowotworu, jest szerokie spektrum działania hamującego komórki nowotworowe przy jednoczesnych braku takiego efektu wobec komórek zdrowych. Nieoczekiwanie okazało się, że nowe szczepy bakterii mlekowych: *Lactococcus lactis* IBB109 (zdeponowany jako **B/00311**) oraz szczep *Lactococcus lactis* LBB417 (zdeponowany jako **B/00312**), według wynalazku spełniają takie oczekiwania, wpływają hamująco na wzrost i rozwój komórek nowotworowych jelita grubego, a ich obecność w przewodzie pokarmowym będzie w dużym stopniu wpływać na prewencję i ograniczenie rozwoju nowotworów jelita, szczególnie raka jelita grubego.

Niniejszy wynalazek dostarcza więc nowych szczepów bakterii mlekowych: *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417, o szczególnych właściwościach probiotycznych i przeciwnowotworowych, zwłaszcza wobec komórek linii nowotworu jelita grubego. Szczepy zostały zdeponowane w dniu 24.09.2020 w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) we Wrocławiu pod numerami depozytowymi: **B/00311** – *Lactococcus lactis* IBB109 oraz **B/00312** – *Lactococcus lactis* IBB417. Niniejszy wynalazek dostarcza/określa również kompozycję farmaceutyczną zawierającą ww. szczepy do zastosowania w zapobieganiu i leczeniu nowotworów jelita, szczególnie nowotworu jelita grubego.

UJAWNIENIE WYNAŁAZKU

W świetle opisanego stanu techniki celem niniejszego wynalazku jest przezwyciężenie wskazanych niedogodności i dostarczenie nowych, unikatowych szczepów *Lactococcus lactis*, **B/00311**

i **B/00312**, oraz kompozycji farmaceutycznej do zastosowania w zapobieganiu i leczeniu nowotworów jelita, szczególnie raka jelita grubego.

Cel ten został osiągnięty poprzez analizę kilkuset szczepów bakterii mlekowych, wyizolowanych z naturalnych środowisk ich bytowania, z których z spośród ponad 50 przebadanych szczepów bakterii gatunków *Lactococcus lactis* pochodzących ze źródeł naturalnych, jedynie dwa szczepy według wynalazku posiadają właściwości istotnie hamujące proliferację komórek gruczolaka jelita grubego, tzn. komórki linii nowotworowych Caco-2 i HT-29 (kolekcja ATCC – nr ATCC HTB-37 i nr ATCC HTB-38, odpowiednio) *in vitro*, a jednocześnie nie wpływają na rozwój zdrowych komórek nabłonkowych, komórek nabłonka nerek (HEK293; nr ATCC CRL-1573), co umożliwia ich wykorzystanie w zapobieganiu i leczeniu nowotworów jelita, szczególnie raka jelita grubego.

Należy podkreślić, że szczep *Lactococcus lactis* IBB109 (B/00311) oraz szczep *Lactococcus lactis* IBB417 (B/00312) według wynalazku zostały zbadane pod kątem ich bezpieczeństwa biologicznego, a ich genomy zostały w pełni zsekwencjonowane. Okazało się, że wykazują one, zdolność do przeżywania w warunkach niskiego pH i w obecności soli żółciowych na poziomie zgodnym z dostępną literaturą (Olszewska i wsp. 2013, Takanashi i wsp. 2014, Jatmiko i wsp. 2017), czyli mają cechy istotne do pomyślnego przejścia przez górny odcinek dróg pokarmowych i dłuższego przetrwania w przewodzie pokarmowym. Ponadto szczep IBB417 charakteryzuje się silną adhezją do komórek linii Caco2, co wzmacnia jego potencjał dłuższego utrzymania się w przewodzie pokarmowym.

Właściwości *Lactococcus lactis* IBB109 (B/00311) oraz *Lactococcus lactis* IBB417 (B/00312) wpływają hamująco na rozwój komórek raka jelita grubego (*in vitro*); oczekuje się, że obecność szczepów według wynalazku w przewodzie pokarmowym (*in vivo*) w dużym stopniu wpłynie na prewencję i ograniczenie rozwoju nowotworów jelita, szczególnie raka jelita grubego. Szczepy według wynalazku istotnie hamują proliferację komórek gruczolaka jelita grubego *in vitro* (co wykazano na liniach komórkowych Caco-2 i HT-29), a jednocześnie nie wpływają i nie zaburzają prawidłowego rozwoju zdrowych nienowotworowych komórek (co wykazano na komórkach nabłonka nerek HEK293).

Nieoczekiwanie okazało się, że nowe szczepy *Lactococcus lactis* IBB109 (B/00311) oraz *Lactococcus lactis* IBB417 (B/00312) nie tylko hamują wzrost komórek nowotworowych jelita w szczególności komórek gruczolaka jelita grubego, ale wpływają również na ekspresję niekodujących, regulatorowych cząsteczek RNA (mikroRNA) powiązanych z procesem proliferacji komórek nowotworowych (tzw. onkomir-ów).

Komórki raka jelita mają niski poziom lub wykazują brak ekspresji interleukiny 18 (IL-18), co utrudnia ich rozpoznanie przez system immunologiczny gospodarza. Nieoczekiwanie okazało się, że nowe szczepy *L. lactis* IBB109 (B/00311) oraz *L. lactis* IBB417 (B/00312) wywierają działanie immunomodulacyjne poprzez indukcję sekrecji cytokiny IL-18 w komórkach linii gruczolaka jelita grubego Caco-2.

Jednocześnie *L. lactis* IBB109 (B/00311) oraz *L. lactis* IBB417 (B/00312) wykazują pełne biobezpieczeństwo pod względem braku w ich genomach genów oporności na antybiotyki oraz braku zdolności hemolitycznych.

Wynalazek dotyczy nowego szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 zdeponowanego w PCM pod nr depozytu B/00311.

Wynalazek dotyczy nowego szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 zdeponowanego w PCM pod nr depozytu B/00312.

Wynalazek dotyczy kompozycji zawierającej nowe szczepy bakterii – *Lactococcus lactis* IBB109, zdeponowanego w PCM pod nr depozytu B/00311, oraz *Lactococcus lactis* IBB417, zdeponowanego w PCM pod nr depozytu B/00312.

Korzystna kompozycja jest kompozycją farmaceutyczną zawierającą ponadto dopuszczalny farmaceutycznie nośnik, przy czym korzystniej kompozycja jest w postaci płynnej, stałej np. proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego, itd.

Wynalazek również dotyczy kompozycji farmaceutycznej zawierającej szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 według wynalazku i/lub szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 według wynalazku i/lub kompozycję według wynalazku oraz dopuszczalny farmaceutycznie nośnik do zastosowania jako lek, korzystnie do zastosowania jako lek do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita, korzystnie do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita grubego.

Korzystnie kompozycja farmaceutyczna jest w postaci płynnej, stałej np. proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego, itd.

Wynalazek dotyczy również suplementu diety zawierającego unikatowy szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 według wynalazku i/lub unikatowy szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 według

wynalazku i/lub kompozycję według wynalazku, przy czym suplement diety korzystnie jest w postaci płynnej, stałej np. proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego, itd.

Wynalazek dotyczy również preparatu bakteryjnego zawierającego szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 według wynalazku i/lub szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 według wynalazku i/lub kompozycję według wynalazku do zastosowania jako składnik czynny w preparacie terapeutycznym, żywności funkcjonalnej, suplementie diety, do zastosowania jako składnik aktywny leku przeznaczonego do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita, korzystnie nowotworu jelita grubego.

Zastosowanie szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 według wynalazku i/lub szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 według wynalazku i/lub kompozycji według wynalazku jako dodatku funkcjonalnego w żywności funkcjonalnej, dodatku funkcjonalnego do napoju spożywczego, jako składnika aktywnego preparatu probiotycznego, jako składnika aktywnego w suplementie diety, jako składnika aktywnego w kompozycji farmaceutycznej.

Zastosowanie szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 według wynalazku i/lub szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 według wynalazku i/lub kompozycji według wynalazku do indukcji poziomu cytokiny IL-18 w komórkach nowotworowych jelita, korzystnie w komórkach nowotworowych jelita grubego.

W korzystnych wykonaniach wynalazku preparaty zawierające szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 według wynalazku i/lub szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 według wynalazku i/lub kompozycję według wynalazku, zawierają tych bakterii co najmniej 10^4 jednostek tworzących kolonie (jtk)/mL, korzystnie 10^7 jtk/mL, jeszcze korzystniej 10^8 jtk/mL.

W korzystnych wykonaniach wynalazku jest on stosowany w sposobach terapii oraz prewencji raka jelita grubego.

Preparaty zawierające szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 według wynalazku i/lub szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 według wynalazku i/lub kompozycję je obejmujące według wynalazku, hamują selektywnie proliferację komórek raka jelita grubego, przy czym nie wpływają negatywnie na proliferację komórek zdrowych (nienowotworowych).

Preparaty zawierające szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 według wynalazku i/lub szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 według wynalazku i/lub kompozycję je obejmujące według wynalazku, powodują obniżenie poziomów cząsteczek mikroRNA (onkomir-ów) w mikrośrodkowisku nowotworu raka jelita grubego, szczególnie cząsteczek takich, jak: let-7a, miR-21-5p, miR-221-3p, miR-18a-5p, miR-31-5p, miR-16-5, oraz posiadają właściwości immunomodulujące, powodując wzrost poziomu IL-18, istotnej w regulacji odpowiedzi systemu odpornościowego.

Zarówno szczep bakterii *L. lactis* IBB109 oraz *L. lactis* IBB417 według wynalazku są wrażliwe na ampicylinę, wankomycynę, gentamycynę, kanamycynę, streptomycynę, erytromycynę, klindamycynę, tetramycynę, chloramfenikol oraz nie posiadają właściwości hemolitycznych – wykazują więc bezpieczeństwo biologiczne przy ich stosowaniu dojelitowym.

Zarówno szczep bakterii *L. lactis* IBB109 jak i *L. lactis* IBB417 są odporne na niskie pH (pH 4), co zwiększa zdolność ich przetrwania w górnym odcinku układu pokarmowego i dotarcie do docelowego miejsca ich działania (jelito grube), co nie jest cechą występującą u wszystkich bakterii z rodzaju *Lactococcus*, czy ogólnie bakterii mlekowych.

Szczep bakterii *L. lactis* IBB109 wykazuje dobrą oporność na 0,1% (w/w) sole żółciowe, co zwiększa zdolność przetrwania w górnym odcinku układu pokarmowego i dotarcie do docelowego miejsca ich działania (jelito grube). Nie jest to cechą występującą u wszystkich bakterii z rodzaju *Lactococcus*, czy ogólnie bakterii mlekowych.

Szczep bakterii *L. lactis* IBB417 ma bardzo dobre zdolności adherujące do komórek Caco-2 i dobre do mucyn, co jest szczególną cechą i nie występuje u wszystkich bakterii z rodzaju *Lactococcus*, czy ogólnie bakterii mlekowych.

W stanie techniki nie są więc znane rozwiązania dotyczące preparatów opartych o bakterie *L. lactis* o tak udokumentowanym wpływie *in vitro* na komórki nowotworu jelita, szczególnie na komórki gruczolakoraka jelita grubego, stąd rozwiązania według wynalazku stanowią istotny postęp i wypełniają istotną potrzebę dostarczenia nowych naturalnych i bezpiecznych metod do zapobiegania i leczenia nowotworów, szczególnie nowotworów jelita, w tym jelita grubego.

OPIS FIGUR

Przykładowe realizacje wynalazku zobrazowano na figurach rysunków, na których:

Fig. 1. przedstawia wyniki eksperymentu przesiewowego proliferacji komórek linii Caco-2 w obecności bakterii z rodzaju *Lactococcus*.

Fig. 2. przedstawia wyniki badania przeżywalności szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 w różnych stężeniach soli żółciowych [0,1% (w/w) i 0,3% (w/w)] po inkubacji przez 1,5 i 3 godziny.

Fig. 3. przedstawia wyniki badania przeżywalności szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 w niskich warunkach pH (2,5 i 4) względem pH kontrolnego (7) po 2-godzinnej inkubacji.

Fig. 4. przedstawia wyniki badania zdolności adhezji szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 do czynników abiotycznych (polistyren) i biotycznych (mucyny i komórki Caco-2) w stosunku do szczepów dobrze adherujących (kontrola pozytywna: *L. lactis* IBB477 w teście adhezji do powierzchni abiotycznych, *L. lactis* TIL488 w teście adhezji do mucyn i linii Caco-2).

Fig. 5. przedstawia wyniki badania wpływu żywych szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 na stopień zahamowania proliferacji komórek linii Caco-2 w stosunku do szczepu kontrolnego (*L. lactis* IL6288) i linii komórkowej nieinkubowanej z bakteriami. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy. Wyniki prezentowane na wykresie wskazują na istotne statystycznie zmiany.

Fig. 6. przedstawia wyniki badania wpływu żywych szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 na stopień zahamowania proliferacji komórek linii HT-29 w stosunku do szczepu kontrolnego (*L. lactis* IL6288) i linii komórkowej nieinkubowanej z bakteriami. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy. Wyniki prezentowane na wykresie wskazują na istotne statystycznie zmiany.

Fig. 7. przedstawia wyniki badania wpływu żywych szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 na stopień zahamowania proliferacji nienowotworowych, zdrowych komórek nabłonka nerki linii HEK293 w stosunku do szczepu kontrolnego (*L. lactis* IL6288) i linii komórkowej nieinkubowanej z bakteriami. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

Fig. 8. przedstawia wyniki badania ekspresji wybranych mikroRNA w komórkach linii raka jelita grubego Caco-2, pod wpływem szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 oraz szczepu kontrolnego (*L. lactis* IL6288). Poziomą ekspresję badano metodą PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Wyniki prezentowane na wykresie wskazują na istotne statystycznie zmiany.

Fig. 9. przedstawia wyniki badania ekspresji wybranych mikroRNA w komórkach linii raka jelita grubego HT-29, pod wpływem szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 oraz szczepu kontrolnego (*L. lactis* IL6288). Poziomą ekspresję badano z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy. Istotnie statystycznie wyniki zaznaczono odpowiednio na wykresie.

Fig. 10. przedstawia wyniki badania ekspresji genu interleukiny 18 w komórkach linii raka jelita grubego Caco-2 pod wpływem szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 oraz szczepu kontrolnego (*L. lactis* IL6288). Poziomą ekspresję badano z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

Fig. 11. przedstawia wyniki badania wpływu żywych szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 osobno jak i razem na komórki linii raka jelita grubego Caco-2 w stosunku do szczepu kontrolnego (*L. lactis* IL6288) i linii komórkowej nieinkubowanej z bakteriami. Słupki błędów przedstawiają błąd standardowy.

Cytowane w opisie publikacje oraz podane w nich odniesienia są w całości niniejszym włączone, jako referencje. Poniższe przykłady ilustrują wynalazek, nie ograniczając go w żaden sposób.

SPOSOBY WYKONANIA WYNALAZKU

Poniższe przykłady umieszczono jedynie w celu zilustrowania wynalazku oraz wyjaśnienia poszczególnych jego aspektów, a nie w celu jego ograniczenia i nie powinny być utożsamiane z całym jego zakresem, który zdefiniowano w załączonych zastrzeżeniach. W poniższych przykładach, jeśli nie wskazano inaczej, stosowano standardowe materiały i metody stosowane w dziedzinie lub postępowano zgodnie z zaleceniami producentów dla określonych materiałów i metod.

PRZYKŁADY

Przykład 1. Selekcja szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417

W kolekcji szczepów IBB PAN „COLIBB”, obejmującej szczepy drożdży, bakteryjne, bakteriofagowe i plazmidy, znajduje się kilkaset szczepów bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych ze źródeł naturalnych, takich jak mleko krowie, kefiry, regionalne sery, bryndza. Do badań przesiewowych na linii komórkowej Caco-2 (ATCC HTB-37) wybrano z kolekcji 50 szczepów bakterii z rodzaju *Lactococcus*, dla których uprzednio wykonana została analiza RAPD-DNA ich genomu z użyciem pary starterów B06: 5'-TGCTCTGCCC-3' (SEQ ID. NO. 15) i B08: 5'-GTCCACACGG-3' (SEQ ID. NO. 16). Wyniki przeprowadzonego badania wykazały odmienny układ sygnałów, sugerujących różnice genetyczne poszcze-

gólnych szczepów, a co za tym idzie prawdopodobne różnice we właściwościach fizjologicznych. Wybrane szczepy, w tym szczepy IBB109 oraz IBB471, hodowano w 30°C, w warunkach tlenowych lub mikroaerofilnych, na podłożach stałych lub płynnych M17 + 0,5% glukoza (GM17) i przechowywano w formie stoków w 15% (v/v) glicerolu w -80°C. Na tak wyselekcjonowanej puli 50 szczepów prowadzono dalej opisane badania. Ze względu na szczególne właściwości wykazane dla dwóch szczepów według wynalazku, zostały one zdeponowane w dniu 24.09.2020 w PCM (kolekcji uznawanej dla celów patentowych) pod numerami depozytowymi: **B/00311** – szczep *Lactococcus lactis* IBB109; **B/00312** – szczep *Lactococcus lactis* IBB417.

Szczep *L. lactis* IBB109 wyizolowano z mleka krowiego po udoju poprzez posiew na podłoże stałe GM17. Szczep *L. lactis* IBB417 wyizolowano z tradycyjnie wyprodukowanego sera typu bryndza poprzez posiew na podłoże GM17.

Przykład 2. Wpływ szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 na proliferację komórek raka jelita grubego

Pięćdziesiąt wyselekcjonowanych szczepów *Lactococcus* (patrz **Przykład 1**) zbadano pod kątem ich wpływu na proliferację komórek linii nowotworowej raka jelita grubego Caco-2.

W tym celu linię komórkową Caco-2 hodowano w warunkach optymalnych, zalecanych przez ATCC, tj. w 37°C, 5% CO₂, wilgotność 95%, w podłożu (dalej zwanym podłożem dla Caco-2) składającym się z MEM (Minimal Essential Medium; Gibco) z 10% bydlęcą surowicą płodową, roztworu aminokwasów (NEAA – non-essential amino acid solution) (1X), 1 mM pirogromianu sodu, dodatku penicyliny (100 U/mL) i streptomycyny (100 µg/mL). Następnie w komorze Thoma określano liczbę komórek Caco-2, rozcieńczano je w w/w podłożu dla Caco-2 do uzyskania 10⁵ komórek/mL i наносzono na płytkę 96-dołkową po 100 µl zawiesiny komórek na dołek i inkubowano przez 24 godz.

Komórki bakteryjne szczepów *Lactococcus* przygotowywano hodując je w podłożu płynnym GM17 (16 godz., 30°C) a po odwirowaniu przemywano dwukrotnie buforowanym fosforanem roztworem soli fizjologicznej (pH 7,4) – PBS. Następnie przygotowywano zawiesinę bakterii, w podłożu dla Caco-2 (bez dodatku antybiotyków), odpowiadającą 10⁸ jtk/mL.

Tak przygotowane komórki bakteryjne nakładano na płytki 96-dołkowe (100 µl na dołek), zawierające komórki Caco-2 po 24-godzinnej hodowli jw. znad których uprzednio zebrano pożywkę. Płytki inkubowano 72 godziny w 37°C, 5% CO₂, wilgotność 95%, a następnie oceniano żywotność komórek linii komórkowych metodą kolorymetryczną przy użyciu komercyjnie dostępnego testu proliferacji Cell Proliferation Kit, BrdU (Roche). Doświadczenie wykonywano w 10 powtórzeniach technicznych. Kontrolę stanowiły hodowle komórek Caco-2 bez bakterii.

Spośród 50 szczepów przebadanych tą metodą, szczepy *L. lactis* IBB109 i IBB417 wykazywały najsilniejsze działanie antyproliferacyjne wobec komórek linii Caco-2 i zostały wybrane do dalszych badań (**Fig. 1**).

Przykład 3. Ocena poziomu biobezpieczeństwa szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417

Wymagane jest, aby szczepy/preparaty bakteryjne do zastosowania w terapii/prewencji rozwoju raka miały udokumentowane właściwości bio-beezpieczeństwa. Stąd też przeprowadzono badania oceniające bezpieczeństwo biologiczne szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417 pod kątem ich zdolności do indukcji rozpadu krwinek czerwonych (hemoliza) oraz wrażliwości na antybiotyki wymienione w dokumencie Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA; EFSA Journal 2012; 10(6):2740). Brak zdolności do hemolizy potwierdzono poprzez wysiew szczepów metodą posiewu redukcijnego na podłoże MacConkey'a wzbogacone 5% krwią baranią. Szalki inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C warunkach tlenowych. Brak przejaśnień w strefie posiewu po 24 jak i 48 godzinach potwierdził, że zarówno szczep IBB109 jak i IBB417 nie posiadają właściwości hemolitycznych (Tabela 1). Ocenę oporności szczepów na antybiotyki przeprowadzono metodą mikrodylucji zgodnie z normą ISO10932 wobec szczepu kontrolnego *L. lactis* ATCC 19435. Otrzymane wyniki wskazują na podobny poziom wrażliwości obu badanych szczepów (Tabela 1), który był poniżej lub równy wartości najmniejszego stężenia hamującego – MIC (minimal inhibitory concentration) dla każdego z 9 antybiotyków. Ze względu na fakt, że otrzymane wartości najmniejszego stężenia hamującego są poniżej punktu odcięcia podanego przez EFSA, szczepy *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 uznane zostały za wrażliwe na badane antybiotyki.

Tabela 1. Wyniki badań oporności szczepów *L. lactis* IBB109 (B/00311) oraz *L. lactis* IBB417 (B/00312) na wybrane antybiotyki i zdolności do hemolizy.

Antybiotyk	Minimalne stężenia hamujące (MIC) (mg/L)			Punkt odcięcia według EFSA (mg/L)
	IBB109	IBB417	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435 EFSA (referencyjny szczep kontrolny)	
Gentamycyna	1	1-2	0,5-4	32
Kanamycyna	8-16	8	2-8	64
Streptomycyna	8	8-16	2-16	32
Tetracyklina	0,5	0,25-0,5	0,5-2	4
Erytromycyna	0,063	0,032-0,063	0,12-0,5	1
Klindamycyna	0,032-0,063	0,032	0,25-0,5	1
Chloramfenikol	4	4	4-16	8
Ampicylina	0,25-0,5	0,5	0,5-1	2
Wankomycyna	0,25	0,25	0,25-1	4
Hemoliza	--	--		

Brak genów oporności na antybiotyki potwierdzono również poprzez sekwencjonowanie genomowego DNA szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 przeprowadzone przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN (Illumina, MiSeq oraz MinION, NanoPore). Analiza kompletnych sekwencji DNA (chromosomalnego i plazmidowego) wykazała, że oba szczepy nie niosą żadnych genów oporności, co jest niezwykle istotne do planów ich wykorzystania w przemyśle spożywczym, i dla bezpieczeństwa stosowania w preparatach stanowiących suplementy diety, nutraceutyki oraz w preparatach i kompozycjach farmaceutycznych.

Przykład 4. Ocena cech probiotycznych unikatowych szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417

Badanie szczepów pod względem właściwości probiotycznych obejmowało sprawdzenie oporności komórek bakteryjnych na sole żółciowe i niskie pH oraz ich adhezję do czynników abiotycznych (polistyrenu) i biotycznych (mucyn i komórek linii Caco-2). Bakterie do testów otrzymywano poprzez ich nocną hodowlę w podłożu płynnym GM17 (30°C, warunki tlenowe), a następnie odwirowanie i zawieszenie osadów komórek w soli fizjologicznej do otrzymania końcowej gęstości optycznej (OD₆₀₀) równej 1.

Oporność szczepów na sole żółciowe badano poprzez dodanie 1 ml zawiesiny bakterii (OD₆₀₀ 1) do 9 ml roztworów soli żółciowych (bile salts; Sigma cat. no. B8756) o końcowym stężeniu 0,1% (w/w) lub 0,3% (w/w) i inkubację przez 1,5 lub 3 godziny w 37°C. Po inkubacji, seryjne rozcieńczenia komórek bakterii wysiewano na podłoże stałe GM17 i po 48-godzinnej hodowli w 30°C zliczano liczbę uzyskanych kolonii celem określenia jtk/mL (**Fig. 2**). Uzyskane wyniki wskazywały na lepszą przeżywalność a tym samym wyższą oporność szczepu IBB109 na 0,1% stężenie soli żółciowych w stosunku do IBB417; zarówno po 1,5 jak i 3 godzinach inkubacji w wyżej wymienionych warunkach nie obserwowano spadku liczebności komórek szczepu IBB109. Wyższe stężenie soli żółciowych (0,3%) powodowało spadek przeżywalności obu szczepów po 1,5-godzinnej inkubacji. Oporność szczepów na niskie pH badano poprzez dodanie 1 ml zawiesiny bakterii (OD₆₀₀ 1) do 9 ml roztworu soli fizjologicznej o pH 4 lub pH 2,5 i inkubację przez 2 godziny w 37°C. Po inkubacji, seryjne rozcieńczenia komórek bakterii wysiewano na podłoże stałe GM17 i po 48-godzinnej hodowli w 30°C zliczano liczbę uzyskanych kolonii celem określenia jtk/mL, względem tych samych szczepów inkubowanych w roztworze soli fizjologicznej o pH 7. Uzyskane wyniki świadczą o braku wpływu 2-godzinnej inkubacji w pH 4,0 na żywotność obu szczepów, natomiast pH 2,5 okazało się letalne dla komórek badanych bakterii (**Fig. 3**).

Zdolność bakterii do adhezji do polistyrenu lub mucyn i badano według znanej metodologii (Radziwiłł-Bieńkowska i wsp. 2016) na płytkach 96-dołkowych, odpowiednio nieopłaszczonych lub opłaszczonych mucynami z żołądka świni. W tym celu, nakładano po 100 μ l zawiesiny bakterii (OD_{600} 1) na dołek i inkubowano 3 godziny w 30°C w warunkach tlenowych. Po tym czasie płytki przemywano trzykrotnie buforem PBS, wybarwiano przez 10 minut fioletem krystalicznym, przemywano trzykrotnie wodą dejonizowaną, zalewano 96% etanolem i pozostawiano na godzinę do odparowania a następnie wykonywano pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 583 nm. Kontrolę stanowiły szczepy uznane jako dobrze adherujące w badanych warunkach – *L. lactis* IBB477 (test adhezji do powierzchni abiotycznych) (Radziwiłł-Bieńkowska i wsp. 2016) i *L. lactis* TIL488 (testy adhezji do mucyn) (Le i wsp. 2013).

Adhezję do komórek ssaczych wykonywano na zróżnicowanych komórkach linii Caco-2. W tym celu, komórki pasażowano w podłożu dla Caco-2 na 12-dołkowych płytkach przez 14 dni w 37°C, 5% CO₂, wilgotność 95%, zmieniając podłoże hodowlane co 3 dni. Bakterie hodowano w podłożu płynnym GM17 przez 16 godzin, a następnie odwirowywano komórki, przemywano dwukrotnie zimnym buforem PBS i zawieszano w pożywce dla Caco-2 bez antybiotyków (streptomycyny i ampicyliny) w ilości odpowiadającej 10 jtk bakterii na jedną komórkę linii Caco-2. Tak przygotowane bakterie dodawano do każdego dołka zawierającego zróżnicowane (2-tygodniowe) komórki Caco-2, po uprzednim zebraniu znad nich pożywki i inkubowano przez 3 godziny w warunkach optymalnych dla linii Caco-2. Kontrolę stanowiły zróżnicowane komórki Caco-2 inkubowane z szczepem *L. lactis* TIL448 uznanym jako dobrze adherujący (Le i wsp. 2013). Następnie hodowle tkankowe przemywano buforem PBS, zbierano nadsącz i zliczano niezaadsorbowane komórki bakteryjne. W celu określenia liczby zaadsorbowanych komórek bakterii, komórki Caco-2 poddawano łagodnej lizie w buforze PBS z dodatkiem TRITON X100 o końcowym stężeniu 0,1%. Następnie, wysiewano seryjne rozcieńczenia komórek bakterii na podłoże stałe GM17 i po 48-godzinnej hodowli w 30°C zliczano liczbę uzyskanych kolonii celem określenia jtk/mL. Na podstawie uzyskanych wyników, szczep IBB417 wykazywał wyższy stopień adhezji do polistyrenu i mucyn, w stosunku do szczepu kontrolnego (nieadherujący szczep *L. lactis* IL1403), jednak był on na poziomie niższym niż dla szczepów kontrolnych uznanych za dobrze adherujące w tych warunkach (odpowiednio szczepy *L. lactis* IBB477 i TIL488) (**Fig. 4**). Natomiast, w badaniach z komórkami linii Caco-2, obserwowano porównywalny poziom adhezji szczepu IBB417 do kontroli pozytywnej (szczep *L. lactis* TIL488) (**Fig. 4**). Jest to cecha korzystna, pozwalająca na dłuższe przetrwanie/utrzymanie się tego szczepu w układzie pokarmowym, a przez to umożliwia wydłużone oddziaływanie na organizm gospodarza. Z kolei szczep IBB109 nie wykazywał równie silnych właściwości adhezyjnych w badanych warunkach.

Przykład 5. Test zahamowania proliferacji komórek linii raka jelita grubego przez szczepy *L. lactis* IBB109 i IBB417

Wpływ szczepów IBB109 i IBB417 na stopień zahamowania proliferacji komórek dwóch linii raka jelita grubego (Caco-2, HT-29) oraz zdrowej, nienowotworowej linii komórek nabłonka nerki (HEK293) badano w porównaniu do linii komórkowej nietraktowanej bakteriami oraz linii – inkubowanej ze szczepem kontrolnym *L. lactis* IL6288 (Bolotin i wsp. 2019), nieoddziałujący na komórki raka jelita grubego Caco-2 i HT-29, stanowiącym kontrolę negatywną. Test zahamowania proliferacji wykonano z wykorzystaniem zestawu Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche). Analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem testów Shapiro-Wilka, wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Wpływ szczepów na proliferację komórek raka jelita grubego oceniano poprzez 72-godzinną inkubację komórek linii Caco-2, HT-29 i HEK293 z żywymi komórkami bakteryjnymi z fazy stacjonarnej. Hodowle linii komórkowych oraz bakterii prowadzono analogicznie jak w **Przykładzie 2**. Szczepy *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 wykazywały bardzo silne zahamowanie proliferacji komórek gruczolakoraka jelita grubego linii komórkowych Caco-2 i HT-29 *in vitro* (**Fig. 5**, **Fig. 6**). Takiego efektu nie obserwowano dla zdrowej, nienowotworowej linii komórkowej wyprowadzonej z nabłonka nerki HEK293 (**Fig. 7**) a wszelkie różnice nie były istotne statystycznie. Wskazuje to, że szczepy *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 nie będą wpływać na proliferację prawidłowych komórek nabłonkowych, co jest niezwykle istotne w użyciu w przemyśle spożywczym i w zastosowaniach szczepów jako suplementy diety, nutraceutyki i w preparatach farmaceutycznych.

Przykład 6. Wpływ szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417 na ekspresję miRNA zaangażowanych w proliferację komórek raka jelita grubego

Badano poziomy ekspresji sześciu cząsteczek mikroRNA (miR-16-5p, miR-18a-5p, miR-21-5p, miR-31-5p, miR-221-3p oraz let-7a), wytypowanych na podstawie wcześniejszych analiz literaturowych

jako powiązane z regulacją procesu proliferacji w komórkach raka jelita grubego. W tym celu, linie komórkowe Caco-2 i HT-29 hodowano analogicznie jak w **Przykładzie 2**, a następnie izolowano z nich całkowite RNA i metodą RT-qPCR, przy użyciu specyficznych par starterów (**Tabela 2**), oznaczano poziom ekspresji poszczególnych miRNA. Jako genu referencyjnego użyto gen U48.

Tabela 2. Sekwencje par starterów (R – reverse, F – forward) użyte to analizy poziomów wybranych miRNA.

SEQ ID. NO.	miRNA	Nazwa startera	Sekwencja startera 5' – 3'
1	let-7a	let-7a_F	gcagtgaggttaggttg
2		let-7a_R	gtccagttttttttttaactatac
3	miR-21-5p	miR_21_F	gcagtagcttatcagactgatg
4		miR_21_R	gggccagttttttttttcaac
5	U48	U48_F	acccaggttaactcttgagtgtgcgtgatgcc atcacgcagcgctct
6		U48_R	gtccagtttttttttttggtc
7	miR-221-3p	miR_221_F	gcagagctacattgtctgct
8		miR_221_R	gagtttttttttttgaaaccca
9	miR-18a-5p	miR_18a_F	gtaagggtgcatctagtgcag
10		miR_18a_R	gggccagttttttttttctatc
11	miR-31-5p	miR_31_F	gcagaggcaagatgctg,
12		miR_31_R	gtccagtttttttttttagctatg
13	miR-16-5p	miR_16_F	cgcagtagcagcacgta
14		miR_16_R	cagtttttttttttcgcca

Wyniki dla komórek Caco-2 po inkubacji ze szczepami *L. lactis* IBB109 i IBB417, pokazują istotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji wszystkich badanych miRNA względem poziomu miRNA w komórkach inkubowanych ze szczepem kontrolnym (*L. lactis* IL6288), nie wykazującym właściwości antyproliferacyjnych względem komórek Caco-2 (**Fig. 8**). Wyniki uzyskane dla komórek HT-29 po inkubacji ze szczepami *L. lactis* IBB109 i IBB417 pokazują dla czterech spośród sześciu analizowanych cząsteczek miRNA, tj. miR-16-5p, miR-18a-5p, miR-21-5p, miR-221-3p, obniżenie poziomu ekspresji względem poziomu miRNA w komórkach inkubowanych analogicznie z tym samym szczepem kontrolnym (**Fig. 9**). Nieoczekiwanie okazało się, że szczepy *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417, według wyników, są w stanie modulować poziom ekspresji cząsteczek miRNA w nowotworowych liniach komórkowych, w tym w liniach komórkowych raka jelita grubego.

Przykład 7. Wpływ szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417 na poziom IL-18 w komórkach ssaczyc

Wpływ szczepów na poziom produkcji IL-18 w komórkach raka jelita grubego oceniano poprzez inkubację 24-godzinnych hodowli komórek linii Caco-2 z żywymi komórkami bakteryjnymi z fazy stacjonarnej. Hodowle linii komórkowych oraz bakterii prowadzono w identyczny sposób jak w **Przykładzie 2**. Następnie izolowano całkowite RNA z komórek linii Caco-2 i metodą RT-qPCR oznaczano poziom ekspresji IL-18 przy użyciu specyficznych starterów: IL-18F (SEQ ID. NO. 17; 5'-atcgcttcctctcgcaaca-3'), IL-18R (SEQ ID. NO. 18; 5'-cttctactggttcagcagccatct-3'). Wyniki analiz pokazały, że obecność szczepów *L. lactis* IBB109 i *L. lactis* IBB417 wpływa na wzrost produkcji interleukiny 18 w komórkach linii Caco-2 w stosunku do szczepu kontrolnego (*L. lactis* IL6288) (**Fig. 10**). Stąd zastosowanie tych szczepów może się przyczynić do stymulacji układu odpornościowego i wcześniejszego rozpoznania komórek rakowych przez organizm gospodarza a przez to nie dopuszczać do rozwoju choroby nowotworowej.

Przykład 8. Inkubacja linii komórkowych gruczolaka jelita grubego przy jednoczesnej obecności szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417

Jednoczesny wpływ obu szczepów na proliferację komórek raka jelita grubego oceniano poprzez 72-godzinną inkubację komórek linii Caco-2, z żywymi komórkami bakteryjnymi z fazy stacjonarnej obu szczepów (IBB109 i IBB417). Hodowle linii komórkowych oraz bakterii prowadzono w identyczny sposób jak w **Przykładzie 2**. Szczepy *L. lactis* IBB109 i IBB417 inkubowano z linią komórkową w dwóch wariantach stężeń: w ilości po 5×10^6 jtk lub 10^7 jtk każdego szczepu na dołek. Otrzymane wyniki wskazują, że przy jednoczesnym podaniu szczepów IBB109 i IBB417, nie zależnie od badanego stężenia, poziom zahamowania proliferacji komórek gruczolaka jelita grubego linii Caco-2 był podobny jak przy podaniu każdego ze szczepów osobno (**Fig. 11**). Oznacza to, że szczepy nie wykazują wzajemnych efektów antagonistycznych i mogą być podawane jednocześnie. Ze względu na odmienne właściwości probiotyczne obu szczepów, nie można również wykluczyć, że ich wzajemne podawanie może wpływać korzystnie i prowadzić do synergistycznego wzmocnienia ich działania. Wariant jednoczesnego podawania obu szczepów jest korzystny ze względu na odmienne/uzupełniające się właściwości probiotyczne obu szczepów.

Podsumowanie i wnioski:

Nowe szczepy bakterii *L. lactis* IBB109 i IBB417, według wynalazku, wyizolowano ze źródeł naturalnych (mleko krowie, regionalny ser bryndza) i na podstawie badań przesiewowych scharakteryzowano jako szczepy z rodzaju *Lactococcus* o różnym profilu genetycznym (**Przykład 1**). Wyselekcjonowane szczepy *Lactococcus lactis*, pochodzące z różnych źródeł naturalnych, zbadano pod kątem ich wpływu na proliferację komórek linii nowotworowej raka jelita grubego Caco-2 (**Przykład 2**). Jedynie dwa spośród wielu analizowanych szczepów rodzaju *Lactococcus*, tj. *Lactococcus lactis* IBB109, zdeponowany jako B/00311, oraz *Lactococcus lactis* IBB417, zdeponowany jako B/00312, wykazywały silne działanie antyproliferacyjne wobec komórek linii Caco-2 (**Fig. 1**). W dalszych badaniach wykazano istotnie silny wpływ szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417 na stopień zahamowania proliferacji komórek różnych linii raka jelita grubego (**Caco-2**, **HT-29**) oraz brak podobnego efektu względem zdrowych, nienowotworowych komórek nabłonka, tj. komórek linii nabłonka nerki (**HEK293**), w porównaniu do linii komórkowych nie inkubowanych z bakteriami oraz linii inkubowanych z innym szczepem *L. lactis* stanowiącym kontrolę negatywną (**Przykład 5**). Wyniki wskazują na istotnie statystycznie zahamowanie proliferacji komórek nowotworu jelita grubego Caco-2 oraz HT29 pod wpływem badanych szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417 w stosunku do kontroli, co pokazuje, że obserwowane zmiany są szczepozależne (**Fig. 5**, **Fig. 6**). Jednocześnie szczepy *L. lactis* IBB109 i IBB417 nie wykazywały efektu antyproliferacyjnego wobec linii zdrowych, nienowotworowych komórek nabłonka wyprowadzonej z nabłonka nerki HEK293 (**Fig. 7**). Wykazano, że możliwa jest inkubacja komórek linii Caco-2 z kulturą bakteryjną, będącą mieszaniną obu szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417, co również prowadzi do silnego zahamowania proliferacji (**Przykład 8**, **Fig. 11**). Jednocześnie stosowanie obu szczepów będzie korzystne dla uzyskiwanych efektów terapeutycznych, ze względu na różniące je właściwości probiotyczne i cechy genetyczne, sugerujące potencjalne różnice w mechanizmach działania *L. lactis* IBB109 i IBB417 (**Przykład 4**). Podawanie więc obu szczepów jednocześnie lub sekwencyjnie możliwie wzmocni efekt ich działania zapobiegającego i/lub leczniczego względem nowotworów jelita, szczególnie jelita grubego.

Kultury bakteryjne badanych szczepów analizowano również pod kątem ich wpływu na poziom ekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA, będących regulatorami procesu nowotworzenia (**Przykład 6**). Wykazano, że inkubacja kultur bakteryjnych szczepu *L. lactis* IBB109 jak i IBB417 (według wynalazku) z linią komórkową Caco-2 powodowała istotnie statystyczne obniżenie poziomów badanych cząsteczek mikroRNA, przy czym nie obserwowano takich zmian w obecności szczepu kontrolnego, cechującego się brakiem efektu antyproliferacyjnego względem Caco-2 (**Fig. 8**). W przypadku inkubacji szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417 (według wynalazku) z linią komórkową HT-29 zaobserwowano zmiany poziomu ekspresji wybranych mikroRNA oraz brak podobnych zmian w obecności szczepu kontrolnego (**Fig. 9**). Wykazano, że szczepy *L. lactis* IBB109 i IBB417 według wynalazku wpływają na regulację ekspresji cząsteczek mikroRNA (onkomir-ów), powiązanych z rozwojem nowotworów, w tym raka jelita grubego. Oba szczepy *L. lactis* IBB109 i IBB417 według wynalazku mogą być więc wykorzystane w terapii i prewencji chorób nowotworowych jelita, szczególnie raka jelita grubego.

Komórki nabłonka jelit naturalnie produkują interleukinę 18 (IL-18) na mniej więcej stałym poziomie. W komórkach raka jelita grubego obserwuje się spadek poziomu tej interleukiny lub jej całkowity brak. Postuluje się, że jest to rodzaj ucieczki komórek rakowych przed systemem immunologicznym

gospodarza. Wykazano pozytywny wpływ kultur bakteryjnych szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417 według wynalazku na indukcję cytokiny IL-18 w badanych komórkach linii nowotworowych (**Przykład 7**). Wykazano, że inkubacja linii komórkowych Caco-2 z komórkami szczepów *L. lactis* IBB109 i IBB417 według wynalazku wpływa na podwyższenie poziomu prozapalnej IL-18, inicjując w ten sposób odpowiedź immunologiczną (**Fig. 10**). Efektu stymulacji IL-18 nie obserwowano dla zastosowanego szczepu kontrolnego, cechującego się brakiem wpływu na proliferacji badanych linii nowotworowych. Wymagane jest, aby szczepy/preparaty bakteryjne do zastosowania w terapii/prewencji rozwoju nowotworu miały udokumentowane właściwości bio-bezpieczeństwa (brak odporności na antybiotyki zgodny z EFSA i normą ISO10932, brak właściwości hemolitycznych). Oba szczepy *L. lactis* IBB109 i IBB417 według wynalazku spełniają warunki bio-bezpieczeństwa i będą mogły być stosowane w preparatach podawanych ludziom, przykładowo w postaci suplementów diety, nutraceutyków, żywności funkcjonalnej wzbogaconej o te szczepy czy też leczniczych kompozycji farmaceutycznych.

Szczepy bakteryjne do zastosowania jako preparaty bakteryjne powinny wykazywać szereg cech istotnych dla ich przeżycia i utrzymania się w przewodzie pokarmowym organizmu gospodarza. Do kluczowych właściwości w tym zakresie należą m.in. przeżywalność w niskim pH oraz w obecności soli żółciowych a także zdolność do adhezji do komórek nabłonka. Szczepy *L. lactis* IBB109 i IBB417 według wynalazku zbadano pod kątem wyżej wymienionych parametrów (**Przykład 4**). Szczep IBB417 wykazywał adhezję do powierzchni abiotycznych i mucyn na poziomie wyższym niż szczep kontrolny uznany jako nieadherujący i dobrą adhezję do powierzchni biotycznych (komórki ssacze), szczególnie do komórek linii nowotworowej jelita grubego Caco-2 – porównywalną z adhezją szczepu kontrolnego uznanego za dobrze adherujący (**Fig. 4**). Szczep IBB109 nie wykazywał równie silnych właściwości adhezyjnych w badanych warunkach.

Podsumowując, w przeprowadzonych badaniach wykazano, że oba szczepy charakteryzują się wysoką opornością na niskie pH, szczep IBB109 jest mniej wrażliwy na sole żółciowe w porównaniu do szczepu IBB417, natomiast szczep IBB417 ma lepsze właściwości adhezyjne. Wykazano, że przy jednoczesnym podawaniu szczepów IBB109 i IBB417 nie wykazują one wzajemnych efektów antagonistycznych, mogą być podawane jednocześnie, a ich wzajemne podawanie, ze względu na różniące je cechy probiotyczne jak i genetyczne, może wpływać korzystnie, prowadząc do potencjalnego wzmocnienia ich działania.

Szczepy *L. lactis* IBB109 i IBB417 według wynalazku podawane zarówno osobno jak i razem wykazują właściwości antyproliferacyjne względem komórek linii nowotworowych jelita grubego *in vitro*, co może być wykorzystanie w zapobieganiu i leczeniu stanów nowotworowych, zwłaszcza nowotworów jelita, w szczególności nowotworów jelita grubego. Szczepy mogą więc stanowić składnik kompozycji farmaceutycznych, suplementów diety, nutraceutyków i żywności funkcjonalnej o właściwościach wzmacniających, prewencyjnych i leczniczych względem nowotworów, szczególnie nowotworów jelita.

LITERATURA

- (1) Markowiak P, Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017 Sep 15; 9(9): 1021.
- (2) Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J, Jiang Y, Zhang H, Yang Z, Wang Y, Zheng Q. Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery – a double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Jan; 33(1):50–63.
- (3) Banna GL, Torino F, Marietta F, Santagati M, Salemi R, Cannarozzo E, Falzone L, Ferraù F, Libra M. *Lactobacillus rhamnosus* GG: An overview to explore the rationale of its use in cancer. *Front Pharmacol*. 2017 Sep 1; 8:603.
- (4) Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014 Apr 26; 383(9927): 1490–1502.
- (5) Zhao H, Zhao C, Dong Y, Zhang M, Wang Y, Li F, Li X, McClain C, Yang S, Feng W. Inhibition of miR122a by *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant increases intestinal occludin expression and protects mice from alcoholic liver disease. *Toxicol Lett*. May 5; 234(3): 194–200.
- (6) Zhou W, Yuan Y, Li J, Yuan WM, Huang LG, Zheng SW. Effect of *Bifidobacterium* on the mRNA expression levels of TRAF6, GSK-3 β , and microRNA-146a in LPS-stimulated rat intestinal epithelial cells. *Genet Mol Res*. 2015 Aug 21; 14(3):10050–10056.

- (7) Deepak V, Ramachandran S, Balahmar RM, Pandian SR, Sivasubramaniam SD, Nel-laiah H, Sundar K. *In vitro* evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from *Lactobacillus acidophilus* in colon cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2016 Feb; 52(2): 163–73.
- (8) Wasilewska E, Złotkowska D, Pijagin ME. The role of intestinal microflora and probiotic bacteria in prophylactic and development of colorectal cancer. *Postepy Hig. Med. Dosw*. 2013 Aug 9; 67:837–847.
- (9) Collado MC, Isolauri E, Salminen S, Sanz Y. The impact of probiotic on gut health. *Curr Drug Metab*. 2009 Jan; 10(1):68–78.
- (10) Mego M, Holec V, Drgona L, Hainova K, Ciemikova S, Zajac Y. Probiotic bacteria in cancer patients undergoing chemotherapy and radiation therapy. *Complement Ther Med*. 2013 Dec; 21(6):712–723.
- (11) Górska A, Przystupski D, Niemczura MJ, Kulbacka J. Probiotic Bacteria: A Promising Tool in Cancer Prevention and Therapy. *Curr Microbiol*. 2019 Aug; 76(8):939–949.
- (12) Jacouton E, Chain F, Sokol H, Langelia P, Bermúdez-Humarán LG. Probiotic strain *Lactobacillus casei* BL23 prevents colitis-associated colorectal cancer. *Front Immunol*. 2017 Nov 17; 8:1553.
- (13) Zhong L, Zhang X, Covasa M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 28; 20(24):7878–7886.
- (14) Yu AQ, Li L. The potential role of probiotics in cancer prevention and treatment. *Nutr Cancer*. 2016 May-Jun; 68(4):535–44.
- (15) Yamane T, Sakamoto T, Nakagaki T, Nakano Y. Lactic acid bacteria from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells. *Foods*. 2018 Mar 27; 7(4):48.
- (16) Wu WK, Law PT, Lee CW, Cho CH, Fan D, Wu K, Yu J, Sung JJ. MicroRNA in colorectal cancer: from benchtop to bedside. *Carcinogenesis*. 2011 Mar; 32(3):247–53.
- (17) Kreuzer-Redmer S, Bekurtz JC, Arends D, Bortfeldt R, Kutz-Lohroff B, Sharbati S, Einspanier R, Brockmann GA. Feeding of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 leads to intestinal miRNA-423-5p-induced regulation of immune-relevant genes. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Apr 4; 82(8):2263–2269.
- (18) Heydari Z, Rahaie M, Alizadeh AM, Agah S, Khalighfard S, Bahmani S. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* probiotics on the expression of microRNAs 135b, 26b, 18a and 155, and their involving genes in mice colon cancer. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019 Dec; 11(4):1155–1162.
- (19) Le DT, Tran TL, Duviau MP, Meyrand M, Guérardel Y, Castelain M, Loubière P, Chaptot-Chartier MP, Dague E, Mercier-Bonin M. Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in muco-adhesion of *Lactococcus lactis*. *PLoS One*. 2013 Nov 18; 8(11):e79850.
- (20) Radziwiłł-Bieńkowska JM, Le DT, Szczesny P, Duviau MP, Aleksandrak-Piekarczyk T, Loubière P, Mercier-Bonin M, Bardowski JK, Kowalczyk M. Adhesion of the genome-sequenced *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IBB477 strain is mediated by specific molecular determinants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Nov; 100(22):9605–9617.
- (21) Skrzydło-Radomańska B, Wronecki J. Czy mikrobiotę jelitową można skutecznie modyfikować? *Gastroenterologia Kliniczna*, 2018, 10(4), 123–134.
- (22) Olszewska M, Łaniewska-Trokenheim Ł. Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej na stres – Stadium Vbnc. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, 5 (90), 15–28.
- (23) Takanashi S, Miura A, Abe K, Uchida J, Itoi S, Sugita H. Variations in bile tolerance among *Lactococcus lactis* strains derived from different sources. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2014 Jul; 59(4): 289–93.
- (24) Jatmiko YD, Howarth GS, Barton MD. Assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Indonesian naturally fermented milk. *AIP Conference Proceedings* 1908, 050008 (2017); <https://doi.org/10.1063/L5012732>.
- (25) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 2012; 10(6): 2740.
- (26) Bolotin A, Aucouturier A, Sorokin A, Bidnenko E.. Genomic sequence of the prophage-free *Lactococcus lactis* strain IL6288. *Microbiol Resour Announc*. 2019, 8:e01545-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01545-18>.

Wykaz sekwencji

Lista sekwencji **SEQ ID. NO. 1–18** przedstawiona jest w treści opisu oraz w przesłanej wraz ze zgłoszeniem wersji elektronicznej listy sekwencji.

SEQUENCE LISTING

<110> IBB

<120> Nowe szczepy *Lactococcus lactis*, kompozycje je obejmujące oraz ich zastosowanie w zapobieganiu i leczeniu nowotworu raka jelita

<130> PPL1120AGR

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 1
gcagtgaggt agtaggttg 19

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 2
gggccagttt tttttttttt ttaactatac 30

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 3
gcagtagctt atcagactga tg 22

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 4
gggccagttt tttttttttt ttcaac 26

<210> 5
<211> 50
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 5
accccaggtg actcttgagt gtgtcgctga tgccatcacc gcagcgctct 50

<210> 6

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 gtccagtttt tttttttttt tggtc 25

 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 gcagagctac attgtctgct 20

 <210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 cagttttttt ttttttttga aaccca 26

 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 gtaaggtgca tctagtgcag 20

 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 ggtccagttt tttttttttt ttctatc 27

 <210> 11
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 gcagaggcaa gatgctg 17

 <210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 12

gtccagtttt tttttttttt tagctatg 28

<210> 13
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
gcagaggcaa gatgctg 17

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
cagttttttt ttttttttcg ccaa 24

<210> 15
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
tgctctgccc 10

<210> 16
<211> 10
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
gtccacacgg 10

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
atcgcttcct ctcgcaacaa 20

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
cttctactgg ttcagcagcc atct 24

Zastrzeżenia patentowe

1. Nowy szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 zdeponowany w PCM pod nr depozytu B/00311.
2. Nowy szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 zdeponowany w PCM pod nr depozytu B/00312.
3. Kompozycja zawierająca nowy szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 zdeponowany w PCM pod nr depozytu B/00311 oraz nowy szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 zdeponowany w PCM pod nr depozytu B/00312.
4. Kompozycja według zastrz. 3, **znamienna tym**, że jest kompozycją farmaceutyczną zawierającą ponadto dopuszczalny farmaceutycznie nośnik.
5. Kompozycja według zastrz. 3–4, **znamienna tym**, że jest w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.
6. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 jak określony w zastrz. 1 i/lub szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 jak określony w zastrz. 2 i/lub kompozycję jak określoną w zastrz. 3 oraz dopuszczalny farmaceutycznie nośnik do zastosowania jako lek.
7. Kompozycja farmaceutyczna według zastrzeżenia 6, **znamienna tym**, że jest do zastosowania jako lek do zapobieganiu i/lub leczenia nowotworu jelita, korzystnie do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita grubego.
8. Kompozycja farmaceutyczna według zastrzeżenia 6–7, **znamienna tym**, że jest w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.
9. Suplement diety zawierający szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 jak określony w zastrz. 1 i/lub szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 jak określony w zastrz. 2 i/lub kompozycję jak określoną w zastrz. 3, przy czym suplement diety korzystnie jest w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.
10. Preparat probiotyczny zawierający szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 jak określony w zastrz. 1 i/lub szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 jak określony w zastrz. 2 i/lub kompozycję jak określoną w zastrz. 3, przy czym preparat probiotyczny korzystnie ponadto zawiera substancje prebiotyczne, korzystnie wybrane z oligosacharydów, polisacharydów, fruktooligosacharydów, laktulozy, inuliny, skrobi odpornej, celulozy, hemicelulozy i pektyn, przy czym preparat korzystnie ponadto zawiera postbiotyki, korzystnie postbiotyki wybrane są z krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, enzymów, lipopolisacharydów, kwasów tejchojowych, witamin, kwasu masłowego, octanu, propionianu, dipeptydu muramilu, indlu, kwasu teichowego, laktocepin.
11. Preparat probiotyczny według zastrz. 10, **znamienny tym**, że jest w postaci w postaci płynnej, stałej, proszku, tabletki, kapsułki przeznaczonej do podawania doustnego.
12. Preparat bakteryjny zawierający szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 jak określony w zastrz. 1 i/lub szczep bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 jak określony w zastrz. 2 i/lub kompozycję jak określoną w zastrz. 3 do zastosowania jako składnik czynny w probiotyku, preparacie terapeutycznym, żywności funkcjonalnej, suplemente diety, do zastosowania jako składnik aktywny leku przeznaczonego do zapobiegania i/lub leczenia nowotworu jelita, korzystnie nowotworu jelita grubego.
13. Preparat bakteryjny według zastrz. 12, **znamienny tym**, że ponadto zawiera substancje prebiotyczne, korzystnie wybrane z oligosacharydów, polisacharydów, fruktooligosacharydów, laktulozy, inuliny, skrobi odpornej, celulozy, hemicelulozy i pektyn, przy czym preparat korzystnie ponadto zawiera postbiotyki, korzystnie postbiotyki wybrane są z krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, enzymów, lipopolisacharydów, kwasów tejchojowych, witamin, kwasu masłowego, octanu, propionianu, dipeptydu muramilu, indlu, kwasu teichowego, laktocepin.
14. Zastosowanie szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 jak określonego w zastrz. 1 i/lub szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 jak określonego w zastrz. 2 i/lub kompozycji jak określonej w zastrz. 3 jako dodatku funkcjonalnego w żywności funkcjonalnej, dodatku funkcjonalnego do napoju spożywczego, jako składnika aktywnego preparatu probiotycznego, preparatu bakteryjnego, suplementu diety, kompozycji farmaceutycznej.
15. Zastosowanie szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB109 jak określonego w zastrz. 1 i/lub szczepu bakterii *Lactococcus lactis* IBB417 jak określonego w zastrz. 2 i/lub kompozycji jak określonej w zastrz. 3 do indukcji poziomu cytokiny IL-18 w komórkach nowotworowych jelita, korzystnie w komórkach nowotworowych jelita grubego.

Rysunki

FIG. 1

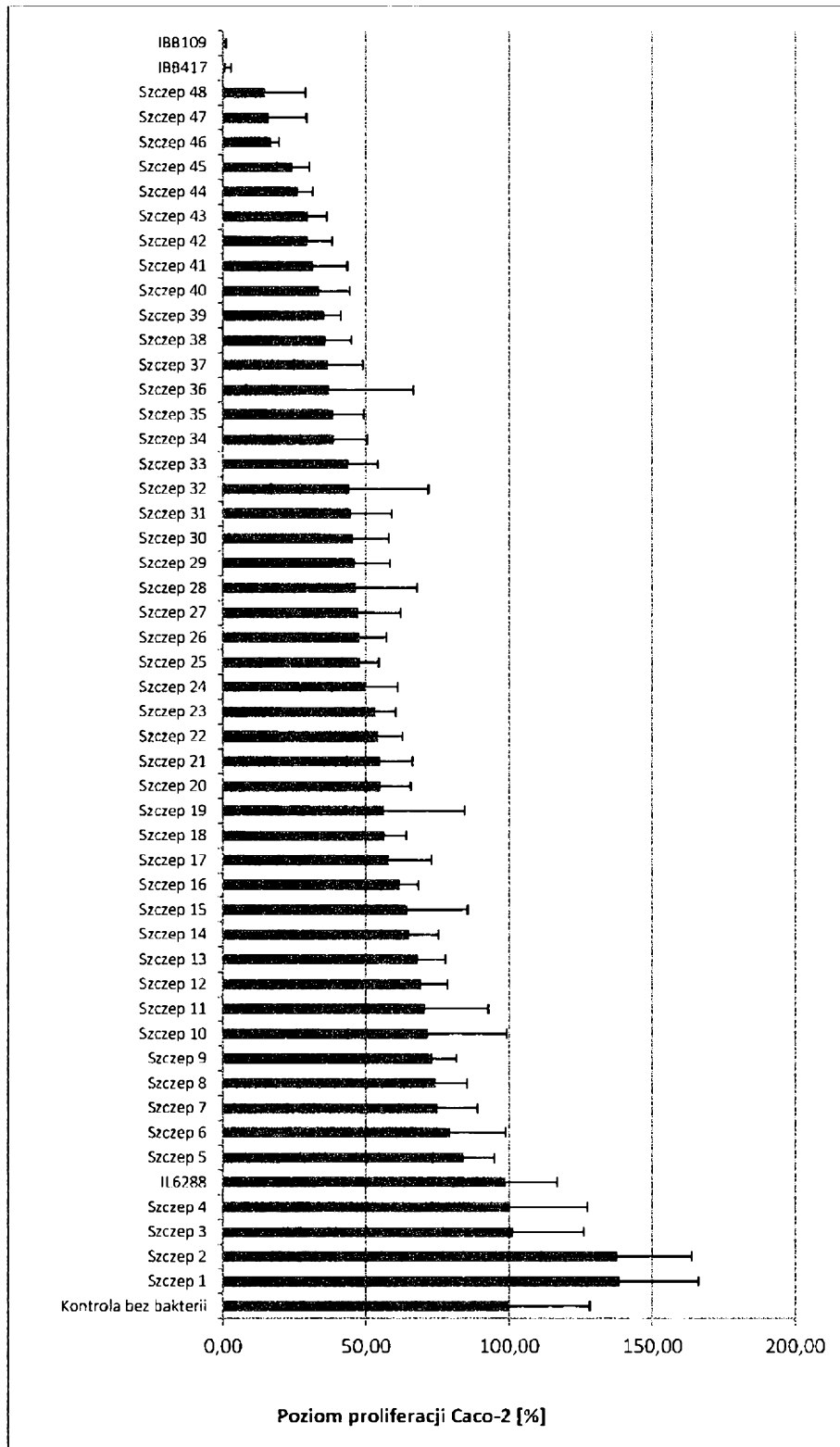


Fig. 2

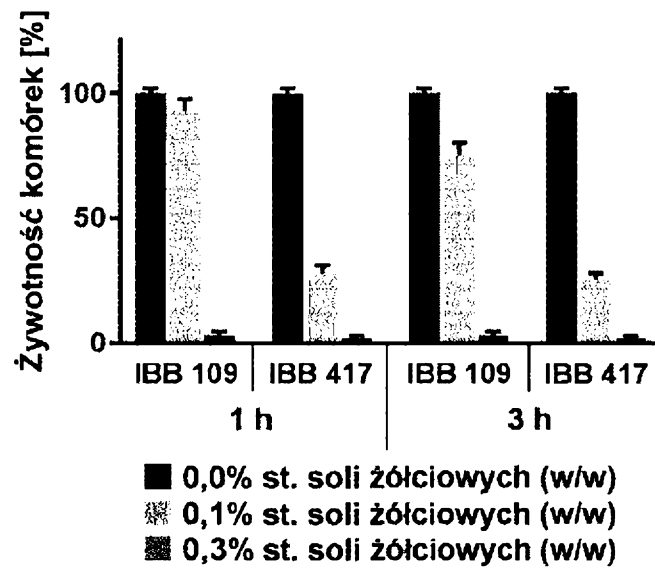


Fig. 3

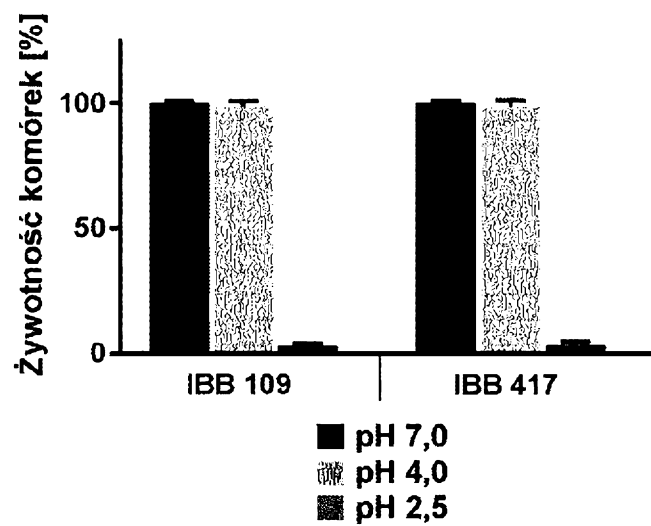


Fig. 4

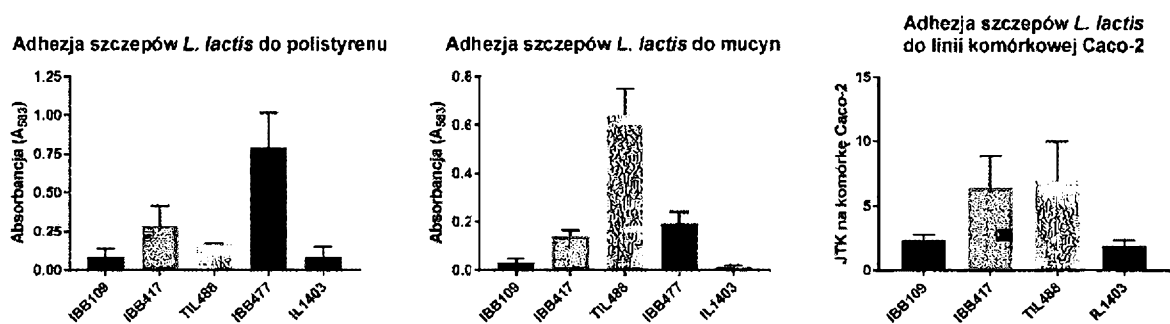


Fig. 5

Caco-2

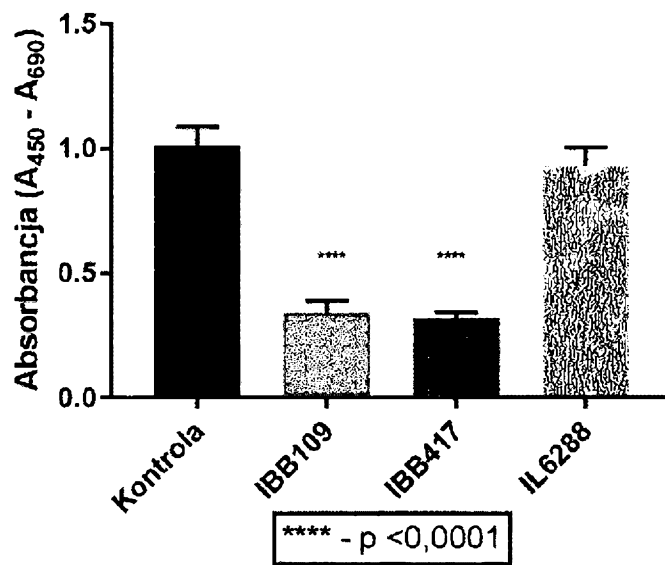


Fig. 6

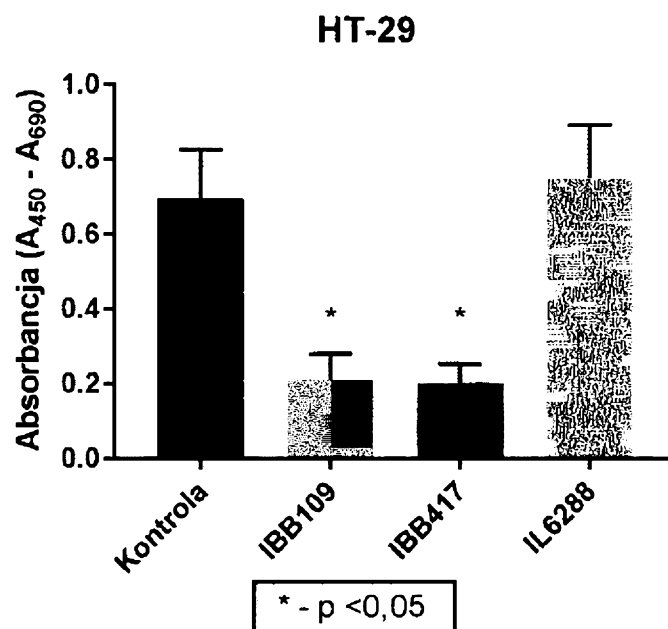


Fig. 7

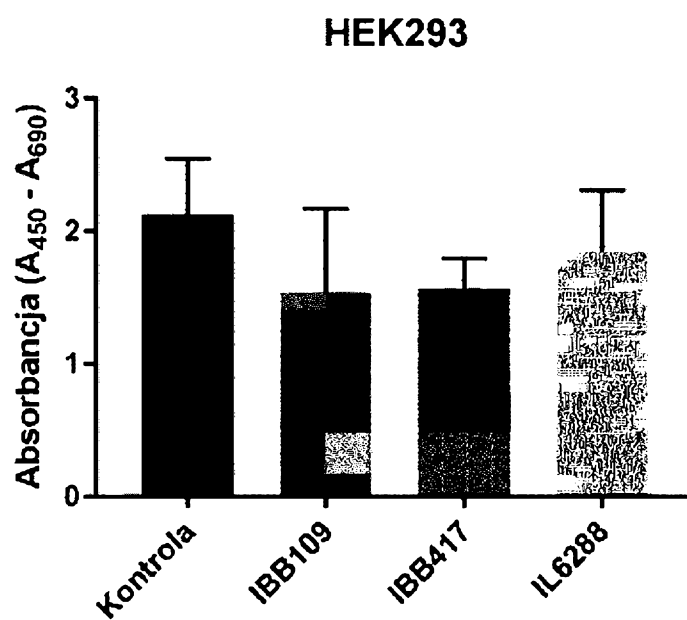


Fig. 8

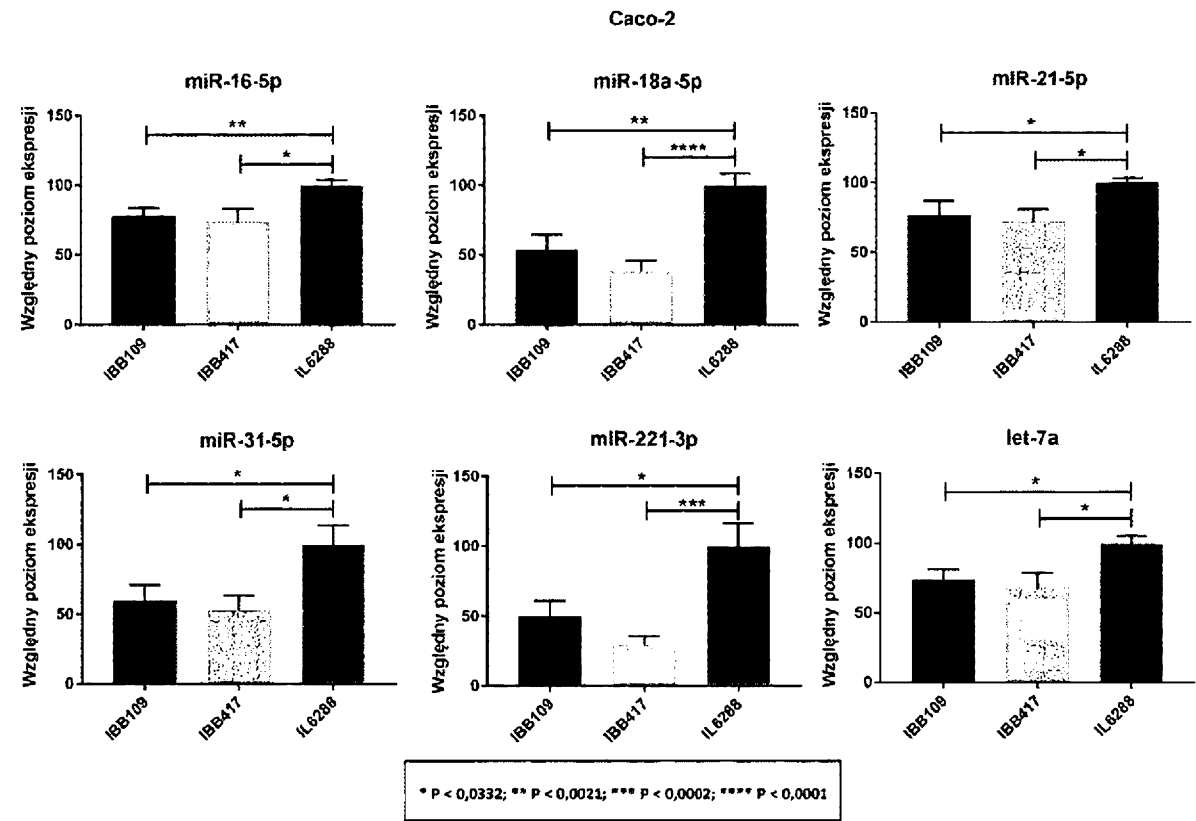


Fig. 9

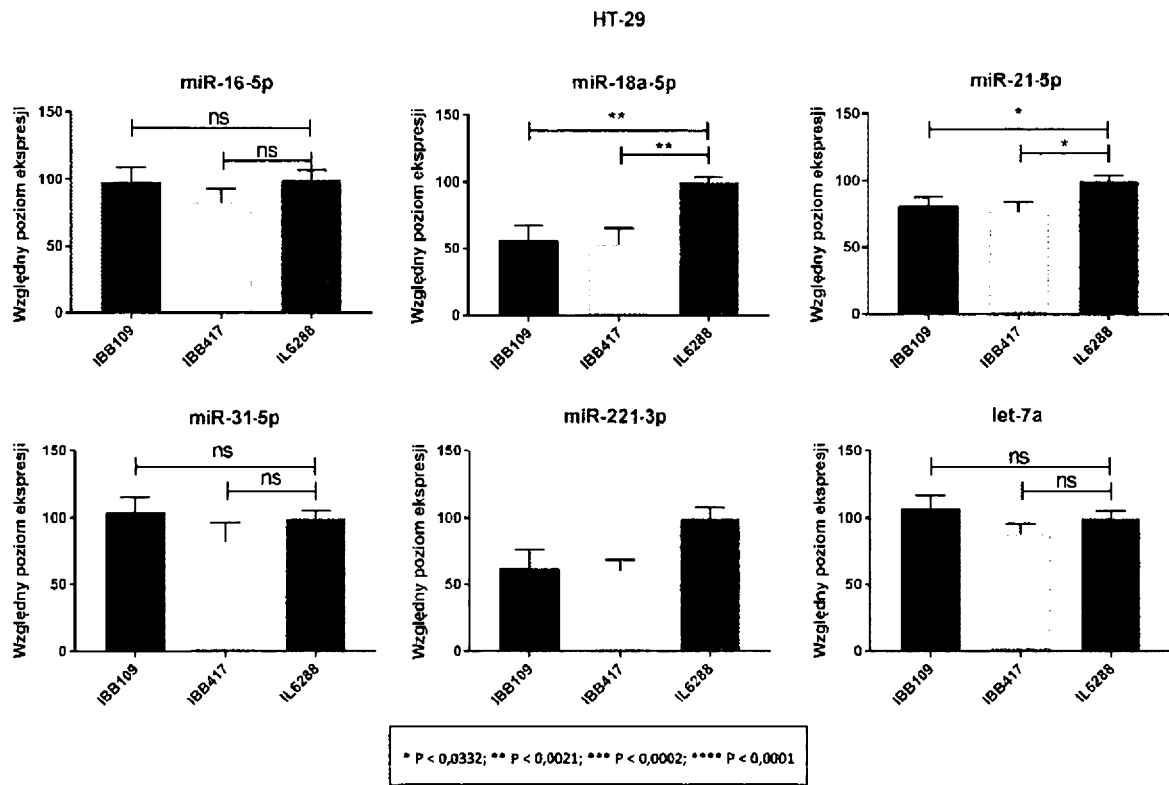


Fig. 10

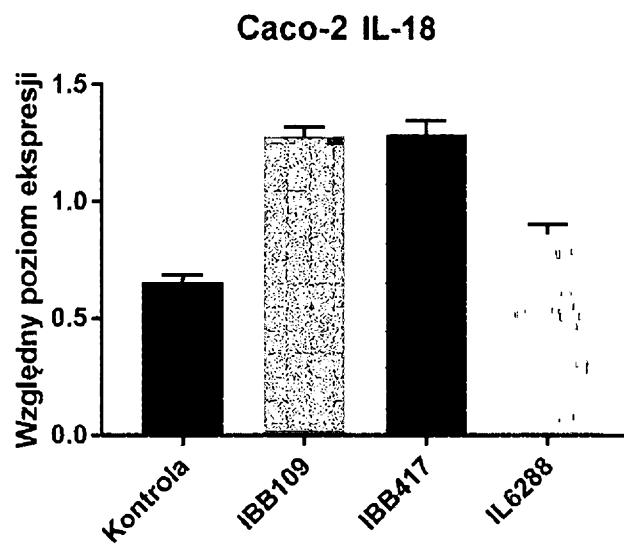


Fig. 11

