



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 112601534 A

(43) 申请公布日 2021.04.02

(21) 申请号 201980031147.8

(22) 申请日 2019.05.13

(30) 优先权数据

18171893.3 2018.05.11 EP

18178136.0 2018.06.15 EP

1810386.1 2018.06.25 GB

1813460.1 2018.08.17 GB

1817642.0 2018.10.29 GB

1820264.8 2018.12.12 GB

1820256.4 2018.12.12 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/062238 2019.05.13

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/215346 EN 2019.11.14

(83) 生物保藏信息

NCIMB 42787 2017.07.13

NCIMB 43385 2019.05.06

NCIMB 43386 2019.05.06

NCIMB 43387 2019.05.06

NCIMB 43388 2019.05.06

NCIMB 43389 2019.05.06

(72) 发明人 伊姆克·伊丽莎白·马尔德

帕提娜·福提斗

艾米·贝丝·霍尔特

苏阿德·艾哈迈德 安娜·埃托尔

萨曼莎·尤伊勒 特德·迪南

约翰·克赖恩

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 39/39 (2006.01)

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)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

(71) 申请人 4D制药研究有限公司

地址 英国阿伯丁郡

权利要求书2页 说明书80页

序列表7页 附图71页

(54) 发明名称

包含细菌菌株的组合物

(57) 摘要

本发明提供了包含巨球菌属(Megasphaera)细菌菌株的组合物,所述组合物用于刺激受试者的免疫系统。

1. 一种包含巨球菌属 (*Megasphaera*) 细菌菌株的组合物, 所述组合物用于刺激受试者的免疫系统。

2. 如权利要求1所述的组合物, 所述组合物用于治疗或预防癌症, 例如转移性黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、胃癌、结直肠癌和/或血液系统恶性肿瘤。

3. 根据权利要求2所述使用的组合物, 其中所述组合物具有组蛋白脱乙酰酶抑制活性。

4. 根据权利要求2或权利要求3所述使用的组合物, 其中所述组合物上调促炎性细胞因子。

5. 根据权利要求2-4中任一项所述的组合物, 所述组合物用于降低肠屏障通透性。

6. 如权利要求1所述的组合物, 所述组合物用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

7. 如权利要求1所述的组合物, 所述组合物用作疫苗佐剂。

8. 如权利要求1所述的组合物, 所述组合物用于增强细胞疗法, 例如CAR-T。

9. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 所述组合物用于增加半胱天冬酶3、MAP2、IL-1 β 、IL-23和/或TNF- α 的表达水平和/或活性。

10. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 所述组合物用于选择性降低细胞群体中Treg的数量和/或百分比的方法中。

11. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株具有与所述巨球菌属的细菌菌株的16S rRNA序列具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。

12. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:8、9、10、11或12中的任一者具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16s rRNA基因序列, 或者其中所述细菌菌株具有由SEQ ID NO:8、9、10、11或12中的任一者表示的16s rRNA基因序列。

13. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株是马氏巨球菌 (*Megasphaera massiliensis*)。

14. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:1具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16s rRNA基因序列, 或者其中所述细菌菌株具有由SEQ ID NO:1表示的16s rRNA基因序列。

15. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株是以登录号42787保藏在NCIMB的菌株。

16. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述组合物用于口服施用。

17. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。

18. 如前述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株是冻干的。

19. 一种包含如前述权利要求中任一项所述的组合物的食物产品, 所述食物产品用于如前述权利要求中任一项所述的用途。

20. 一种治疗或预防与免疫刺激降低相关的疾病或疾患的方法, 所述方法包括向有需要的患者施用包含巨球菌属细菌菌株的组合物。

21. 一种组合物, 所述组合物包含如权利要求1至16中任一项所述的细菌菌株的细胞,

其中所述细胞表达一种或多种异源抗原。

22. 根据权利要求21所述的组合物,其中所述细胞呈递所述一种或多种异源抗原。

23. 根据权利要求21或权利要求22所述的组合物,所述组合物用作疫苗。

24. 一种如权利要求1至18中任一项所述的细菌菌株的细胞,其中所述细胞表达一种或多种异源抗原。

25. 根据权利要求24所述的细胞,其中所述细胞呈递所述一种或多种异源抗原。

26. 根据权利要求24或权利要求25所述的细胞,所述细胞用作疫苗。

27. 一种用于治疗细菌菌株,其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:8、9、10、11或12中的任一者具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。

28. 一种细菌菌株,所述细菌菌株具有由SEQ ID NO:8、9、10、11或12中的任一者表示的16S rRNA序列,所述细菌菌株用于疗法中。

包含细菌菌株的组合物

技术领域

[0001] 本发明属于以下领域：包含从哺乳动物消化道分离的细菌菌株的组合物以及所述组合物用于治疗疾病，特别是癌症，并且特别是在治疗疾病时用于刺激免疫系统的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 人类肠道被认为在子宫中是无菌的，但是在出生之后它立即暴露于各种各样的母体和环境微生物。此后，发生动态时间段的微生物定殖和演替，这受到例如以下因素的影响：分娩方式、环境、饮食和宿主基因型，全部这些都影响肠道微生物群的组成，在早期生命期间尤其如此。随后，微生物群稳定化并且变得类似成人[1]。人类肠道微生物群含有超过500-1000种不同的种系型，它们基本上属于两种主要的细菌分类：拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)[2]。由人类肠道的细菌定殖引起的成功的共生关系已产生各种各样的代谢、结构、保护性和其它有益的功能。所定殖肠道的增强的代谢活动确保以其它方式难以消化的膳食组分被降解并释放副产物，从而为宿主提供重要的营养物质来源。类似地，肠道微生物群的免疫学重要性是公认的并且在无菌动物中示例，所述无菌动物具有在引入共生细菌后在功能上重构的受损免疫系统[3-5]。

[0004] 微生物群组成的巨大变化在例如炎症性肠病(IBD)的胃肠病症中已有文献记载。举例来说，梭菌(*Clostridium*)集群XIVa细菌的水平在IBD患者中降低，而大肠杆菌(*E.coli*)的数量增加，从而表明肠道内共生生物与病原生物的平衡的变化[6-9]。有趣的是，这种微生物生态失调也与T效应细胞群体中的不平衡相关联。

[0005] 在认识到某些细菌菌株对于动物肠道可能具有的潜在积极作用之后，已提出多种菌株用于治疗各种疾病(参见例如[10-13])。此外，已提出主要包括乳杆菌(*Lactobacillus*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)菌株的某些菌株用于治疗与肠无直接关联的各种炎症性和自身免疫性疾病(关于综述，参见[14]和[15])。然而，不同疾病与不同细菌菌株之间的关系和特定细菌菌株对于肠道和在全身水平下以及对任何特定类型的疾病的确切作用并未被良好地表征。

[0006] W02015038731讨论了通过施用抗微生物剂或益生菌剂破坏结肠生物膜来治疗结肠癌的方法。该申请列出了可用于益生菌中的大量细菌，但未提供任何细菌在结肠癌治疗中的功效的证明。相反，该申请专注于生物膜在结直肠癌中的诊断潜力。

[0007] EMBL数据库登录号XP002787383提供了所提出的巨球菌属某种的16S rRNA基因序列，而EMBL数据库登录号XP002787384提供了马氏巨球菌(*Megasphaera massiliensis*)菌株的16S rRNA基因。这些文献详述了分离菌株的基因组分析，而未提供对于巨球菌治疗益处的指导。

[0008] Ahmed等(提交给Frontiers Cellular Neuroscience)考虑了肠道微生物群衍生的细菌菌株的体外表征。

[0009] 本领域中需要治疗疾病的新方法。还需要表征肠道细菌的潜在作用，以便可开发使用肠道细菌的新疗法。

发明内容

[0010] 本发明人已开发了包含巨球菌属细菌菌株的新组合物,所述组合物可用于刺激免疫系统以及治疗和预防疾病,特别是癌症。

[0011] 因此,本发明提供了一种包含巨球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用于刺激受试者的免疫系统。优选地,所述细菌菌株是马氏巨球菌种。

[0012] 在其它方面,本发明提供了包含巨球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防癌症,例如转移性黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤和/或胃癌。在其它方面,本发明提供了包含巨球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防癌症,例如结直肠癌和/或血液系统恶性肿瘤。

[0013] 在其它方面,本发明提供了包含巨球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

[0014] 在其它方面,本发明提供了包含巨球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用作疫苗佐剂。

[0015] 在其它方面,本发明提供了包含巨球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用于增强细胞疗法,例如CAR-T。

[0016] 优选地,用于本发明的细菌是以登录号42787保藏在NCIMB的菌株。

[0017] 下面提供本发明的其它编号的实施方案:

[0018] 1.一种包含巨球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用于刺激受试者的免疫系统。

[0019] 2.如实施方案1所述的组合物,所述组合物用于治疗或预防癌症,例如转移性黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、胃癌、结直肠癌和/或血液系统恶性肿瘤。

[0020] 3.根据实施方案2所述使用的组合物,其中所述组合物具有组蛋白脱乙酰酶抑制活性。

[0021] 4.根据实施方案2或实施方案3所述使用的组合物,其中所述组合物上调促炎性细胞因子。

[0022] 5.根据实施方案2-4中任一项所述使用的组合物,所述组合物用于降低肠屏障通透性。

[0023] 6.如实施方案1所述的组合物,所述组合物用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

[0024] 7.如实施方案1所述的组合物,所述组合物用作疫苗佐剂。

[0025] 8.如实施方案1所述的组合物,所述组合物用于增强细胞疗法,例如CAR-T。

[0026] 9.如前述实施方案中任一项所述的组合物,所述组合物用于增加半胱天冬酶3、MAP2、IL-1 β 、IL-23和/或TNF- α 的表达水平和/或活性。

[0027] 10.如前述实施方案中任一项所述的组合物,所述组合物用于选择性降低细胞群体中Treg的数量和/或百分比的方法中。

[0028] 11.如前述实施方案中任一项所述的组合物,其中所述细菌菌株具有与所述巨球菌属细菌菌株的16S rRNA序列具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。

[0029] 12. 如前述实施方案中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:8、9、10、11或12中的任一者具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16s rRNA基因序列, 或者其中所述细菌菌株具有由SEQ ID NO:8、9、10、11或12中的任一者表示的16s rRNA基因序列。

[0030] 13. 如前述实施方案中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株是马氏巨球菌。

[0031] 14. 如前述实施方案中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:1具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16s rRNA基因序列, 或者其中所述细菌菌株具有由SEQ ID NO:1表示的16s rRNA基因序列。

[0032] 15. 如前述实施方案中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株是以登录号42787保藏在NCIMB的菌株。

[0033] 16. 如前述实施方案中任一项所述的组合物, 其中所述组合物用于口服施用。

[0034] 17. 如前述实施方案中任一项所述的组合物, 其中所述组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。

[0035] 18. 如前述实施方案中任一项所述的组合物, 其中所述细菌菌株是冻干的。

[0036] 19. 一种包含如前述实施方案中任一项所述的组合物的食物产品, 所述食物产品用于如前述实施方案中任一项所述的用途。

[0037] 20. 一种治疗或预防与免疫刺激降低相关的疾病或疾患的方法, 所述方法包括向有需要的患者施用包含巨球菌属细菌菌株的组合物。

[0038] 21. 一种组合物, 所述组合物包含如实施方案1至16中任一项所述的细菌菌株的细胞, 其中所述细胞表达一种或多种异源抗原。

[0039] 22. 根据实施方案21所述的组合物, 其中所述细胞呈递所述一种或多种异源抗原。

[0040] 23. 根据实施方案21或实施方案22所述的组合物, 所述组合物用作疫苗。

[0041] 24. 一种如实施方案1至18中任一项所述的细菌菌株的细胞, 其中所述细胞表达一种或多种异源抗原。

[0042] 25. 根据实施方案24所述的细胞, 其中所述细胞呈递所述一种或多种异源抗原。

[0043] 26. 根据实施方案24或实施方案25所述的细胞, 所述细胞用作疫苗。

[0044] 27. 一种用于疗法中的细菌菌株, 其中所述细菌菌株的16S rRNA序列与SEQ ID NO:8、9、10、11或12中的任一者具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性。

[0045] 28. 一种细菌菌株, 所述细菌菌株具有由SEQ ID NO:8、9、10、11或12中的任一者表示的16S rRNA序列, 所述细菌菌株用于疗法中。

附图说明

[0046] 图1 β 3微管蛋白表达水平: 免疫染色和细胞成像 (图1A); 免疫印迹 (图1B)

[0047] 图2 MAP2表达水平: 免疫染色和细胞成像 (图2A); 免疫印迹 (图2B); 表达倍数变化 (图2C)

[0048] 图3: DRD2表达的变化

[0049] 图4: Casp3表达的变化

[0050] 图5: 细胞活力的变化

[0051] 图6:细胞表型分析:CD4⁺T辅助细胞(图6A);CD4⁺活化细胞(图6B);Treg细胞(图6C);CD8细胞毒性T细胞(图6D);CD8⁺活化细胞(图6E);B细胞(图6F);CD8/Treg比率(图6G);活化CD8/Treg比率(图6H)。

[0052] 图7:细胞因子分析:IL-1 β (图7A);TNF- α (图7B);IL-23(图7C);IL-6(图7D);MIP-3 α (图7E);CXCL9(图7F);MCP-1(图7G);IL-10(图7H);GM-CSF(图7I)。

[0053] 图8:对于图6中提供的数据,用于通过流式细胞术分析不同免疫细胞(CD4、CD8和CD19⁺细胞)群体的选通策略。

[0054] 图9白介素8(IL-8)的分泌。

[0055] 图10:组蛋白脱乙酰酶(HDAC)活性的变化

[0056] 图11A:菌株诱导的全细胞和细胞裂解物组蛋白脱乙酰酶活性变化;图11B:菌株的代谢物产生;图11C:酸诱导的组蛋白脱乙酰酶活性变化。

[0057] 图12A:HDAC1抑制;图12B:HDAC2抑制;图12C:HDAC3抑制。

[0058] 图13A:I类HDAC抑制;图13B:HDAC1抑制;图13C:HDAC2抑制;图13D:HDAC3抑制。

[0059] 图14:对肠屏障功能的影响。

[0060] 图15:To11样受体4(TLR-4)的海马表达的变化。

[0061] 图16:TNF- α 的海马表达的变化。

[0062] 图17:白介素-1 β (IL-1 β)的海马表达的变化。

[0063] 图18:白介素-6(IL-6)的海马表达的变化。

[0064] 图19:CD11b的海马表达的变化。

[0065] 图20:TLR-4的杏仁核表达的变化。

[0066] 图21:CD11b的杏仁核表达的变化。

[0067] 图22:IL-6的杏仁核表达的变化。

[0068] 图23:TLR-4的前额叶皮层表达的变化。

[0069] 图24:CD11b的前额叶皮层表达的变化。

[0070] 图25:IL-6的前额叶皮层表达的变化。

[0071] 图26:对来自施用MRx0029的小鼠的小鼠脾细胞的干扰素- γ 产生的影响。

[0072] 图27:对来自施用MRx0029的小鼠的小鼠脾细胞的IL-1 β 产生的影响。

[0073] 图28:对来自施用MRx0029的小鼠的小鼠脾细胞的IL-6产生的影响。

[0074] 图29:对来自施用MRx0029的小鼠的脾细胞的TNF- α 产生的影响。

[0075] 图30:对来自施用MRx0029的小鼠的脾细胞的CXCL1产生的影响。

[0076] 图31:相对于GAPDH,在各种处理后SKMEL2细胞系中MAP2的基因表达。“YCFA”=YCFA+

[0077] 图32:在各种处理后SKMEL2细胞系的克隆源性存活。“YCFA”=YCFA+

[0078] 图33:在各种处理后SKMEL2细胞系的软琼脂生长。“YCFA”=YCFA+

[0079] 图34:在各种处理后SKMEL2细胞系中的ERK信号传导(磷酸化的ERK1和ERK2(p44和p42)/总ERK)。“YCFA”=YCFA+

[0080] 图35:相对于GAPDH,在各种处理后SKMEL28细胞系中MAP2的基因表达。“YCFA”=YCFA+

[0081] 图36:在各种处理后SKMEL28细胞系的克隆源性存活。“YCFA”=YCFA+

- [0082] 图37:在各种处理后SKMEL28细胞系的软琼脂生长。“YCFA”=YCFA+
- [0083] 图38:在各种处理后SKMEL28细胞系中的ERK信号传导(磷酸化的ERK1和ERK2 (p44和p42)/总ERK)。“YCFA”=YCFA+
- [0084] 图39:相对于GAPDH,在各种处理后SKMEL31细胞系中MAP2的基因表达。“YCFA”=YCFA+
- [0085] 图40:在各种处理后SKMEL31细胞系的克隆源性存活。“YCFA”=YCFA+
- [0086] 图41:在各种处理后SKMEL31细胞系的软琼脂生长。“YCFA”=YCFA+
- [0087] 图42:在各种处理后SKMEL31细胞系中的ERK信号传导(磷酸化的ERK1和ERK2 (p44和p42)/总ERK)。“YCFA”=YCFA+
- [0088] 图43:相对于GAPDH,在各种处理后451Lu细胞系中MAP2的基因表达。“YCFA”=YCFA+
- [0089] 图44:在各种处理后451Lu细胞系的克隆源性存活。“YCFA”=YCFA+
- [0090] 图45:在各种处理后451Lu细胞系的软琼脂生长。“YCFA”=YCFA+
- [0091] 图46:在各种处理后451Lu细胞系中的ERK信号传导(磷酸化的ERK1和ERK2 (p44和p42)/总ERK)。“YCFA”=YCFA+
- [0092] 图47:相对于GAPDH,在各种处理后HT-29细胞系中MAP2的基因表达。“YCFA”=YCFA+
- [0093] 图48:在各种处理后HT-29细胞系的克隆源性存活。“YCFA”=YCFA+
- [0094] 图49A:在各种处理后HT-29细胞系的软琼脂生长。“YCFA”=YCFA+
- [0095] 图49B:在各种处理后HT-29细胞系的软琼脂生长(琼脂板照片)。“YCFA”=YCFA+
- [0096] 图50:在各种处理后HT29细胞系中的ERK信号传导(磷酸化的ERK1和ERK2 (p44和p42)/总ERK)。“YCFA”=YCFA+
- [0097] 图51:MAP激酶途径概述(来自[72])。
- [0098] 图52:除MRx0029以外,(A)未用佛波醇肉豆蔻酸酯处理和(B)用佛波醇肉豆蔻酸酯处理的分化的Caco-2细胞中的GPR109a RNA表达。“YCFA”=YCFA+
- [0099] 图53:(A)MRx0029与条件培养基和(B)仅MRx0029诱导的HT29细胞的IL-8分泌。
- [0100] 图54:马氏巨球菌菌株NCIMB 42787的代谢物分析。
- [0101] 图55:在MRx0029和参考马氏巨球菌菌株的上清液中的戊酸产生。
- [0102] 图56:MRx0029和参考马氏巨球菌菌株的有机酸产生和消耗。
- [0103] 图57:MRX029对NSE/烯醇酶2的抑制。“YCFA”=YCFA+。
- [0104] 图58:NCIMB 42787、NCIMB 43385、NCIMB 43388和NCIMB 43389的有机酸产生和消耗。
- [0105] 图59:NCIMB 42787和其它保藏菌株(n=3)对U373细胞中IL-6分泌的上调。
- [0106] 图60:NCIMB 42787、NCIMB 43385、NCIMB 43388、NCIMB 43389、NCIMB 43386和NCIMB 43387对烯醇酶2的抑制。
- [0107] 图61A:NCIMB 42787和其它保藏物增加MAP2表达;图61B和图61C:NCIMB 42787对细胞因子水平和NF κ B-AP1启动子的调节。
- [0108] 图62:NCIMB 42787产生丁酸、戊酸和己酸
- [0109] 图63:NCIMB 42787产生的代谢物的免疫刺激活性。

- [0110] 图64:代谢物在NCIMB 42787的免疫刺激活性中的作用的分析。
- [0111] 图65:巨球菌菌株NCIMB 43387影响BALB/c小鼠中的结肠IDO-1mRNA表达。
- [0112] 图66:巨球菌菌株NCIMB 43385和NCIMB 43387影响BALB/c小鼠中结肠Tph1 mRNA表达。
- [0113] 图67:巨球菌菌株NCIMB 43385在ConA刺激BALB/c小鼠脾细胞后调节IFN γ 和IL-6的产生。
- [0114] 图68:巨球菌菌株NCIMB 43385调节BALB/c小鼠脑中IL-6和CD11b的表达。
- [0115] 图69:NCIMB 42787调节BALB/c小鼠杏仁核中的TLR4表达。

具体实施方式

[0116] 细菌菌株

[0117] 本发明的组合物包含巨球菌属的细菌菌株。实施例表明,该属细菌可用于刺激免疫系统和用于治疗疾病,特别是癌症。优选的细菌菌株是马氏巨球菌种。

[0118] 用于本发明的巨球菌菌种的实例包括埃氏巨球菌 (*Megasphaera elsdenii*)、酿酒巨球菌 (*Megasphaera cerevisiae*)、马氏巨球菌、印度巨球菌 (*Megasphaera indica*)、寡食巨球菌 (*Megasphaera paucivorans*)、瑞典巨球菌 (*Megasphaera sueciensis*) 和微核巨球菌 (*Megasphaera micronuciformis*)。用于本发明的巨球菌菌种的另一个实例是六角巨球菌 (*Megasphaera hexanoica*)。巨球菌是反刍和非反刍哺乳动物(包括人)的专性厌氧的乳酸发酵的胃肠道微生物。

[0119] 马氏巨球菌的典型菌株为NP3(=CSUR P245=DSM 26228) [16]。马氏巨球菌菌株NP3的16S rRNA基因序列的GenBank登录号为JX424772.1。

[0120] 在实施例中测试的马氏巨球菌细菌在本文中称为菌株MRx0029。所测试的MRx0029菌株的16S rRNA序列以SEQ ID NO:1提供。

[0121] 菌株MRx0029在2017年7月13日以“马氏巨球菌MRx0029”由4D Pharma Research有限公司(Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road, Aberdeen, AB25 2ZS, 苏格兰)保藏于国际保藏机构NCIMB有限公司(Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, 苏格兰)并指定登录号NCIMB 42787。

[0122] 与实施例中测试的菌株密切相关的细菌菌株也预期可有效刺激免疫系统以及治疗和预防疾病,特别是癌症。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:1具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:1表示的16S rRNA序列。

[0123] 菌株MRx0029的生物型细菌菌株也预期可有效刺激免疫系统以及治疗和预防疾病,特别是癌症。生物型是具有相同或非常相似的生理和生化特征的密切相关的菌株。

[0124] 可通过对菌株MRx0029的其它核苷酸序列进行测序来鉴定作为菌株MRx0029的生物型并且适用于本发明的菌株。例如,可对基本上整个基因组进行测序,并且用于本发明的生物型菌株可在其整个基因组的至少80%上(例如在至少85%、90%、95%或99%上,或在其整个基因组上)具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性。用于鉴定生物型菌株的其它合适的序列可包括hsp60或重复序列,例如BOX、ERIC、(GTG)₅或REP或[17]。生物型菌株可具有与菌株MRx0029的相应序列具至少95%、96%、97%、98%、99%、

99.5%或99.9%序列同一性的序列。

[0125] 或者,可通过使用菌株MRx0029和限制性片段分析和/或PCR分析,例如通过使用荧光扩增片段长度多态性 (FAFLP) 和重复DNA元件 (rep) -PCR指纹图谱或蛋白质谱分析或部分16S或23S rDNA测序,来鉴定作为菌株MRx0029的生物型并适用于本发明的菌株。在优选的实施方案中,这样的技术可用于鉴定其它马氏巨球菌菌株。

[0126] 在某些实施方案中,作为菌株MRx0029的生物型并适用于本发明的菌株是当通过扩增核糖体DNA限制性分析 (ARDRA),例如当使用Sau3AI限制性酶分析时(关于示例性方法和指南,参见例如[18]),提供与菌株MRx0029相同模式的菌株。或者,将生物型菌株鉴定为具有与菌株MRx0029相同的碳水化合物发酵模式的菌株。

[0127] 可使用任何适当的方法或策略,包括实施例中描述的测定法,鉴定可用于本发明的组合物和方法中的其它巨球菌菌株,例如菌株MRx0029的生物型。例如,可通过添加至细胞裂解物或全细胞并测试MAP2表达、DRD2表达、细胞因子水平或细胞存活来鉴定用于本发明的菌株。特别地,与菌株MRx0029具有相似生长模式、代谢类型和/或表面抗原的细菌菌株可用于本发明。有用的菌株将具有与菌株MRx0029相当的免疫调节活性。特别地,如实施例中所示,生物型菌株将对MAP2表达、DRD2表达、细胞因子水平或细胞存活引起相当的作用,其可通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴定。如实施例中所示,生物型菌株可对组蛋白脱乙酰酶抑制活性引起相当的作用,其可通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴定。

[0128] 在一些实施方案中,可通过常规分析细菌菌株的代谢物的产生和消耗来鉴定可用于本发明的细菌菌株。本发明人已发现,在实施例中使用的细菌菌株产生丁酸盐、戊酸和己酸并消耗乙酸盐和丙酸盐(参见图54-56)。还发现马氏巨球菌菌株Ref 1、Ref 2和Ref 3消耗并产生了这些代谢物(参见图54-56)。因此,在一些实施方案中,本发明的细菌菌株产生代谢物丁酸盐、戊酸和己酸中的一种或多种。在一些实施方案中,本发明的细菌菌株消耗乙酸盐和丙酸盐中的一种或两种。在优选的实施方案中,本发明的细菌菌株产生丁酸盐、戊酸和己酸并消耗乙酸盐和丙酸盐。

[0129] 本发明的特别优选的菌株是马氏巨球菌MRx0029菌株。这是在实施例中测试并显示出可有效治疗疾病的示例性菌株。因此,本发明提供了马氏巨球菌菌株MRx0029或其衍生物的细胞,例如分离的细胞。本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含马氏巨球菌菌株MRx0029或其衍生物的细胞。本发明还提供了马氏巨球菌菌株MRx0029的生物学纯培养物。本发明还提供了马氏巨球菌菌株MRx0029或其衍生物的细胞,其用于疗法中,特别是用于本文所述疾病。

[0130] 本发明的特别优选的菌株是以登录号NCIMB 42787保藏的马氏巨球菌菌株。这是在实施例中测试并显示可有效刺激免疫系统以及用于治疗 and 预防疾病、特别是癌症的示例性MRx0029菌株。因此,本发明提供了以登录号NCIMB 42787保藏的马氏巨球菌菌株或其衍生物的细胞,例如分离的细胞。本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 42787保藏的马氏巨球菌菌株或其衍生物的细胞。本发明还提供了以登录号NCIMB 42787保藏的马氏巨球菌菌株的生物学纯培养物。本发明还提供了以登录号NCIMB 42787保藏的马氏巨球菌菌株或其衍生物的细胞,其用于疗法中,特别是用于本文所述的疾病。

[0131] 本发明菌株的衍生物可以是子代菌株(后代)或从原始菌株培养(亚克隆)的菌株。

本发明的菌株的衍生物可例如在遗传水平上被修饰,而不破坏其生物学活性。特别地,本发明的衍生菌株具有治疗活性。衍生菌株将具有与MRx0029菌株相当的治疗活性。特别地,如实施例中所示,衍生菌株将对MAP2表达、DRD2表达、细胞因子水平或细胞存活引起相当的作用,其可通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴定。如实施例中所示,衍生菌株可对组蛋白脱乙酰酶抑制活性引起相当的作用,这可通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴定。MRx0029菌株的衍生物通常将是MRx0029菌株的生物型。

[0132] 对马氏巨球菌MRx0029菌株的细胞的提及涵盖具有与菌株MRx0029相同的安全性和治疗功效特征的任何细胞,并且此类细胞由本发明所涵盖。

[0133] 在优选的实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是有活力的,并且能够部分或全部定植于肠道。

[0134] 本发明人已发现马氏巨球菌菌株增加炎性细胞因子例如IL-1 β 、TNF- α 、MIP-3 α 、IL-23、IL-8和/或IL-6的活化。

[0135] 本发明人已发现马氏巨球菌菌株增加免疫细胞的活化并增强细胞因子例如IL-1 β 、TNF- α 、MIP-3 α 、IL-23、IL-8和/或IL-6的分泌。

[0136] 在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 42787保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,所述组合物优选用于刺激免疫系统以及用于治疗 and 预防疾病,特别是癌症,最优选脑癌,例如神经母细胞瘤。在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 42787保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,所述组合物优选用于治疗或预防转移性黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、胃癌、结直肠癌和/或血液系统恶性肿瘤。

[0137] 在优选的实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是有活力的,并且能够部分或全部定植于肠道。

[0138] 在某些实施方案中,本发明的组合物不包含马氏巨球菌菌株42787的细胞。

[0139] 在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是巨球菌属的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 42787保藏的菌株。

[0140] 在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是马氏巨球菌菌种的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 42787保藏的菌株。

[0141] 这些细菌菌株在2019年5月6日以马氏巨球菌(在登录号NCIMB 43388和NCIMB 43389下)和巨球菌属(登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386和NCIMB 43387)由4D Pharma Research有限公司(Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road, Aberdeen, AB25 2ZS, 苏格兰)保藏于国际保藏机构NCIMB有限公司(Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, 苏格兰)。因此,在一个替代的实施方案中,本发明的组合物包含这些细菌菌株或其生物型或衍生物中的一种或多种。为避免疑问,上文提及的Ref 1是以登录号NCIMB 43385保藏的菌株,上文提及的Ref 2是以登录号NCIMB 43388保藏的菌株,并且上文提及的Ref 3是以登录号NCIMB 43389保藏的菌株。

[0142] 与实施例中测试的菌株密切相关的细菌菌株也预期可有效刺激免疫系统以及治疗和预防疾病,特别是癌症。

[0143] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株是以登录号NCIMB 43388保藏的马氏

巨球菌菌株。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43388保藏的菌株或其衍生物的细胞,其用于疗法中。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43388保藏的菌株或其衍生物的细胞,其用于刺激免疫系统以及用于治疗 and 预防疾病,特别是癌症。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43388保藏的菌株的细胞,其用于本文所述的任何一种疾病。

[0144] 在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43388保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,其优选用于刺激免疫系统以及用于治疗 and 预防疾病,特别是癌症,最优选脑癌,例如神经母细胞瘤。在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43388保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,其优选用于治疗或预防转移性黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、胃癌、结直肠癌和/或血液系统恶性肿瘤。

[0145] 在某些实施方案中,本发明的组合物不包含以登录号NCIMB 43388保藏的马氏巨球菌菌株的细胞。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是巨球菌属的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43388保藏的菌株。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是马氏巨球菌菌种的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43388保藏的菌株。

[0146] 因此,在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株是以登录号NCIMB 43389保藏的马氏巨球菌。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43389保藏的菌株的细胞或其衍生物的细胞,其用于疗法中。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43389保藏的菌株或其衍生物的细胞,其用于刺激免疫系统并用于治疗 and 预防疾病,特别是癌症。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43389保藏的菌株的细胞,其用于本文所述的任何一种疾病。

[0147] 在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43389保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,其优选用于刺激免疫系统以及用于治疗 and 预防疾病,特别是癌症,最优选脑癌,例如神经母细胞瘤。在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43389保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,其优选用于治疗或预防转移性黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、胃癌、结直肠癌和/或血液系统恶性肿瘤。

[0148] 在某些实施方案中,本发明的组合物不包含以登录号NCIMB 43389保藏的马氏巨球菌菌株的细胞。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是巨球菌属的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43389保藏的菌株。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是马氏巨球菌菌种的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43389保藏的菌株。

[0149] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:9具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:9表示的16S rRNA序列。在某些实施方案中,本发明提供了具有16S rRNA序列的细菌菌株,所述16S rRNA序列与SEQ ID NO:9具有至少95%、

96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性,所述细菌菌株用于疗法中。在某些实施方案中,本发明提供了具有由SEQ ID NO:9表示的16S rRNA序列的细菌菌株,其用于疗法中。

[0150] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:10具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:10表示的16S rRNA序列。在某些实施方案中,本发明提供了具有与SEQ ID NO:10具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列的细菌菌株,其用于疗法中。在某些实施方案中,本发明提供了具有由SEQ ID NO:10表示的16S rRNA序列的细菌菌株,其用于疗法中。

[0151] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与巨球菌属的细菌菌株的16S rRNA序列具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株是巨球菌属。

[0152] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株是以登录号NCIMB 43385保藏的巨球菌菌株。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43385保藏的菌株或其衍生物的细胞,其用于疗法中。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43385保藏的菌株或其衍生物的细胞,其用于刺激免疫系统以及用于治疗 and 预防疾病,特别是癌症。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43385保藏的菌株的细胞,其用于本文所述的任何一种疾病。

[0153] 在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43385保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,其优选用于刺激免疫系统以及用于治疗 and 预防疾病,特别是癌症,最优选脑癌,例如神经母细胞瘤。在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43385保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,其优选用于治疗或预防转移性黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、胃癌、结直肠癌和/或血液系统恶性肿瘤。

[0154] 在某些实施方案中,本发明的组合物不包含以登录号NCIMB 43385保藏的马氏巨球菌菌株的细胞。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是巨球菌属的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43385保藏的菌株。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是马氏巨球菌菌种的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43385保藏的菌株。

[0155] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株是以登录号NCIMB 43386保藏的巨球菌菌株。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43386保藏的菌株或其衍生物的细胞,其用于疗法中。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43386保藏的菌株或其衍生物的细胞,其用于刺激免疫系统以及用于治疗 and 预防疾病,特别是癌症。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43386保藏的菌株细胞,其用于本文所述的任何一种疾病。

[0156] 在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43386保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,其优选用于刺激免疫系统以及用于治疗 and 预防疾病,特别是癌症,最优选脑癌,例如神经母细胞瘤。在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43386保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物

或生物型,其优选用于治疗或预防转移性黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、胃癌、结直肠癌和/或血液系统恶性肿瘤。

[0157] 在某些实施方案中,本发明的组合物不包含以登录号NCIMB 43386保藏的马氏巨球菌菌株的细胞。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是巨球菌属的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43386保藏的菌株。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是马氏巨球菌菌种的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43386保藏的菌株。

[0158] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株是以登录号NCIMB 43387保藏的巨球菌菌株。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43387保藏的菌株或其衍生物的细胞,其用于疗法中。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43387保藏的菌株或其衍生物的细胞,其用于刺激免疫系统以及用于治疗和预防疾病,特别是癌症。在某些实施方案中,本发明提供了以登录号NCIMB 43387保藏的菌株的细胞,其用于本文所述的任何一种疾病。

[0159] 在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43387保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,其优选用于刺激免疫系统以及用于治疗和预防疾病,特别是癌症,最优选脑癌,例如神经母细胞瘤。在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43387保藏在NCIMB的菌株,或其衍生物或生物型,其优选用于治疗或预防转移性黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、胃癌、结直肠癌和/或血液系统恶性肿瘤。

[0160] 在某些实施方案中,本发明的组合物不包含以登录号NCIMB 43387保藏的马氏巨球菌菌株的细胞。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是巨球菌属的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43387保藏的菌株。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是马氏巨球菌菌种的细菌菌株,其中所述细菌菌株不是以登录号NCIMB 43387保藏的菌株。

[0161] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:8具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:11具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:12具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:8、11或12具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列。在某些实施方案中,本发明提供了具有与SEQ ID NO:8、11或12具至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的16S rRNA序列的细菌菌株,其用于疗法中。

[0162] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:8表示的16S rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:11表示的16S rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:12表示的16S rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:8、11或12表示的16S rRNA序

列。在某些实施方案中,本发明提供了具有由SEQ ID NO:8、11或12表示的16S rRNA序列的细菌菌株,其用于疗法中。

[0163] 作为以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株的生物型的细菌菌株也预期可有效刺激免疫系统以及治疗和预防疾病,特别是癌症。生物型是具有相同或非常相似的生理和生化特征的密切相关的菌株。

[0164] 在某些实施方案中,本发明提供以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的细菌菌株,或其生物型,其用于疗法中。

[0165] 可通过对以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株的其它核苷酸序列进行测序来鉴定以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏并适用于本发明的一种或多种菌株的生物型的菌株。例如,可对基本上整个基因组进行测序,并且用于本发明的生物型菌株可在其整个基因组的至少80%上(例如在至少85%、90%、95%或99%上,或在其整个基因组上)具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性。用于鉴定生物型菌株的其它合适的序列可包括hsp60或重复序列,例如BOX、ERIC、(GTG)₅或REP。生物型菌株可具有与以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株的相应序列具至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列。

[0166] 或者,可通过使用以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株和限制性片段分析和/或PCR分析,例如通过使用荧光扩增片段长度多态性(FAFLP)和重复DNA元件(rep)-PCR指纹图谱或蛋白质谱分析或部分16S或23S rDNA测序,来鉴定作为以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株的生物型并适用于本发明的菌株。在优选的实施方案中,这样的技术可用于鉴定其它马氏巨球菌菌株。

[0167] 在某些实施方案中,作为以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株的生物型并适用于本发明的菌株是当通过扩增核糖体DNA限制性分析(ARDRA)分析时,例如当使用Sau3AI限制性酶时,提供与以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株相同模式的菌株。或者,将生物型菌株鉴定为具有与以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株相同的碳水化合物发酵模式的菌株。

[0168] 可使用任何适当的方法或策略,包括实施例中所所述的测定法,来鉴定可用于本发明的组合物和方法中的其它菌株,例如以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株的生物型。例如,可通过添加至细胞裂解物或全细胞并测试MAP2表达、DRD2表达、细胞因子水平或细胞存活来鉴定用于本发明的菌株。特别地,与以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株具有相似的生长模式、代谢类型和/或表面抗原的细菌菌株可用于本发明。有用的菌株将具有与以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株相当的免疫调节活性。特别

地,如实施例所示,生物型菌株将对MAP2表达、DRD2表达、细胞因子水平或细胞存活引起相当的作用,其可通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴定。如实施例所示,生物型菌株可对组蛋白脱乙酰酶抑制活性引起相当的作用,其可通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴定。

[0169] 在某些实施方案中,本发明的优选菌株是以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的菌株。这些是在实施例中测试并显示可有效治疗疾病的示例性菌株。因此,本发明提供了以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株或其衍生物的细胞,例如分离的细胞。本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株或其衍生物的细胞。本发明还提供了以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株的生物学纯培养物。本发明还提供了以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株或其衍生物的细胞,其用于疗法中,特别是用于本文所述的疾病。

[0170] 本发明菌株的衍生物可以是子代菌株(后代)或从原始菌株培养(亚克隆)的菌株。本发明的菌株的衍生物可例如在遗传水平上被修饰,而不破坏生物学活性。特别地,本发明的衍生菌株具有治疗活性。衍生菌株将具有与以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株相当的治疗活性。特别地,如实施例所示,衍生菌株将对MAP2表达、DRD2表达、细胞因子水平或细胞存活引起相当的作用,其可通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴定。如实施例所示,衍生菌株可对组蛋白脱乙酰酶抑制活性引起相当的作用,其可通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴定。以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株的衍生物通常将分别是以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43386、NCIMB 43387、NCIMB 43388和/或NCIMB 43389保藏的一种或多种菌株的生物型。

[0171] 本发明人已发现,在实施例中使用的细菌菌株产生2-甲基-丙酸和3-甲基-丙酸并消耗甲酸(参见图58)。还发现以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43388和NCIMB 43389保藏的菌株可产生2-甲基丙酸和3-甲基丙酸。另外,还发现以登录号NCIMB 43385和NCIMB 43388保藏的菌株消耗甲酸。因此,在一些实施方案中,本发明的细菌菌株产生代谢物2-甲基-丙酸和3-甲基-丙酸中的一者或多者。在一些实施方案中,本发明的细菌菌株消耗甲酸。在一些实施方案中,本发明的细菌菌株产生2-甲基-丙酸和3-甲基-丙酸并消耗甲酸。在优选的实施方案中,本发明的细菌菌株产生丁酸盐、戊酸、己酸、2-甲基-丙酸和3-甲基-丙酸,并消耗乙酸盐、丙酸盐和甲酸。

[0172] 在某些实施方案中,丁酸盐和/或戊酸的产生可产生IL-8分泌。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物可通过产生丁酸盐和/或戊酸来刺激免疫系统。

[0173] 在某些实施方案中,本发明的组合物不包含埃氏巨球菌。在某些实施方案中,可用于本发明的组合物和方法中的细菌菌株不是埃氏巨球菌。

[0174] 治疗用途

[0175] 刺激免疫系统

[0176] 实施例表明,施用本发明的组合物可导致人外周血单核细胞(PBMC)的免疫刺激。

由于显示出施用本发明的组合物对PBMC具有免疫刺激作用,因此本发明的组合物可用于治疗疾病,特别是以免疫活化降低为特征的和可通过增加的免疫应答治疗的疾病。在某些实施方案中,本发明的组合物用于刺激免疫系统。在某些实施方案中,本发明的组合物用于通过刺激免疫系统来治疗疾病。在某些实施方案中,本发明的组合物用于促进免疫应答。

[0177] 实施例表明,施用本发明的组合物可导致PBMC中Treg的百分比降低(图6C)。Treg,也称为抑制性T细胞,是用于抑制免疫应答的T细胞群体。Treg以细胞表面标志物CD25的高表达和CD127的低表达为特征[19]。由于显示出本发明组合物的施用选择性地减少了Treg群体(图6C),因此本发明的组合物可用于治疗以细胞群体中Treg百分比增加为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物可用于治疗或预防以细胞群体中Treg百分比增加为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物可用于治疗或预防以细胞群体中CD4+CD25+CD127-细胞百分比增加为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过降低细胞群体中的Treg百分比来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于减少Treg对免疫应答的抑制。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过选择性降低Treg来刺激免疫应答。在一个实施方案中,本发明的组合物用于免疫刺激,其中本发明的组合物降低Treg的数量或百分比。

[0178] 实施例表明,本发明的组合物可能能够选择性地靶向Treg,而不会显著影响细胞,例如B细胞、CD4 T细胞或CD8 T细胞。因此,本发明的组合物可选择性地减少PBMC中的Treg,而不会显著影响所测试的其它细胞类型的百分比。在一个实施方案中,本发明的组合物用于选择性地减少Treg的数量或百分比,其中CD4 T细胞的数量或百分比没有显著变化。在一个实施方案中,本发明的组合物用于选择性地减少Treg的数量或百分比,其中CD8 T细胞的数量或百分比没有显著变化。在一个实施方案中,本发明的组合物用于选择性地减少Treg的数量或百分比,其中B细胞的数量或百分比没有显著变化。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于选择性地减少Treg的数量或百分比,其中B细胞、CD4 T细胞和/或CD8 T细胞的数量或百分比没有显著变化。

[0179] Treg百分比的降低特别令人惊讶,因为马氏巨球菌MRx0029菌株会产生丁酸盐,并且丁酸盐与血液中Treg细胞水平的升高和Treg活性的增加相关联[20]。因此,出乎意料的是,本发明的组合物将导致PBMC中Treg的百分比降低。

[0180] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致CD8细胞与Treg细胞的比率增加。CD8+T细胞(CD8细胞)是细胞毒性T细胞,并且在针对细胞内病原体的免疫防御中起关键作用。由于显示出施用本发明的组合物可增加CD8/Treg细胞和活化CD8/Treg细胞的比率(图6G和图6H),因此本发明的组合物可用于治疗以CD8/Treg和/或活化CD8/Treg细胞的比率降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以CD8/Treg细胞比率降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以活化CD8/Treg细胞比率降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过降低细胞群体中Treg的百分比,从而增加CD8/Treg细胞的比率来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过降低细胞群体中Treg的百分比,从而增加CD8/Treg细胞的比率来治疗或预防疾病,其中CD8/Treg细胞比率的增加导致免疫刺激。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于通过降低细胞群体中Treg的百分比,从而增加活化CD8/Treg细胞的比率来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过降低细胞群体中Treg的百分比,

从而增加CD8/Treg细胞的比率来治疗或预防疾病,其中活化CD8/Treg细胞的比率增加导致免疫刺激。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加CD8/Treg细胞的比率来刺激免疫应答。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加活化CD8/Treg细胞的比率来刺激免疫应答。

[0181] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致PBMC中CD19+CD3-细胞的百分比增加(图6F)。因此,施用本发明的组合物可导致细胞群体中B细胞的百分比增加。由于显示出施用本发明的组合物可增加B细胞的百分比,因此本发明的组合物可用于治疗以B细胞的数量或百分比减少为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以B细胞的数量或百分比减少为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以CD19+CD3-细胞的数量或百分比减少为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加细胞群体中B细胞的数量或百分比来治疗或预防疾病,其中B细胞数量或百分比的增加导致免疫刺激。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加B细胞的数量或百分比来刺激免疫应答。

[0182] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致PBMC中CD8⁺ T细胞毒性细胞的百分比增加(图6D)。因此,施用本发明的组合物可导致细胞群体中CD8⁺ T细胞的百分比增加。由于显示出施用本发明的组合物增加了CD8⁺ T细胞毒性细胞的百分比,因此本发明的组合物可用于治疗以CD8⁺ T细胞毒性细胞的数量或百分比减少为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以CD8⁺ T细胞毒性细胞的数量或百分比减少为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加细胞群体中CD8⁺ T细胞毒性细胞的数量或百分比来治疗或预防疾病,其中CD8⁺ T细胞毒性细胞的数量或百分比的增加导致免疫刺激。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加CD8⁺ T细胞毒性细胞的数量或百分比来刺激免疫应答。

[0183] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致PBMC中CD8+活化细胞的百分比增加(图6E)。因此,施用本发明的组合物可导致细胞群体中CD8+活化细胞的百分比增加。由于显示出施用本发明的组合物增加了CD8+活化细胞的百分比,因此本发明的组合物可用于治疗以CD8+活化细胞的数量或百分比减少为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以CD8+活化细胞的数量或百分比减少为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加细胞群体中CD8+活化细胞的数量或百分比来治疗或预防疾病,其中CD8+活化细胞的数量或百分比的增加导致免疫刺激。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加CD8+活化细胞的数量或百分比来刺激免疫应答。

[0184] 实施例表明,施用本发明的组合物可导致PBMC中促炎性分子例如促炎性细胞因子的表达增加(图7和图9)。在施用本发明的组合物后显示表达水平增加的免疫刺激性(例如促炎性)分子的实例包括IL-23、TNF- α 、IL-1 β 、MIP-3 α 、IL-8和IL-6。由于显示出施用本发明的组合物可增加免疫刺激性(例如促炎性)分子的表达,因此本发明的组合物可用于治疗以促炎性分子例如促炎性细胞因子表达降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以促炎性分子的表达和/或活性降低为特征的疾病,特别是以促炎性细胞因子的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以IL-23、TNF- α 、IL-1 β 、MIP-3 α 和/或IL-6的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以IL-8的表达和/或活性

降低为特征的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以CD11b的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-23、TNF- α 、IL-1 β 、MIP-3 α 和/或IL-6的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-8的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加CD11b的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-23、TNF- α 、IL-1 β 、MIP-3 α 和/或IL-6的表达和/或活性来促进免疫应答。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-8的表达和/或活性来促进免疫应答。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加CD11b的表达和/或活性来促进免疫应答。

[0185] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致PBMC中IL-1 β 表达的增加。IL-1 β 是一种促炎性细胞因子[21]。IL-1 β 的产生和分泌受炎性小体调节,炎性小体是一种与炎症反应的激活相关的蛋白质复合物[22]。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-1 β 的表达,因此本发明的组合物可用于治疗以IL-1 β 的表达降低为特征的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以IL-1 β 的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-1 β 的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-1 β 的表达和/或活性来促进免疫应答。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗以IL-1 β 的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加IL-1 β 的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加IL-1 β 的表达和/或活性来促进免疫应答。

[0186] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致IL-23表达的增加。IL-23与炎症有关[23,24]。所提出的IL-23在免疫应答中的功能包括促进CD4⁺记忆T细胞的增殖和促进树突状细胞(DC)的IFN- γ 分泌[25]。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-23的表达,因此本发明的组合物可用于治疗以IL-23表达降低为特征的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以IL-23的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-23的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-23的表达和/或活性来促进免疫应答。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗以IL-23的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加IL-23的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加IL-23的表达和/或活性来促进免疫应答。

[0187] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致PBMC中巨噬细胞炎性蛋白3(MIP3- α)或CCL20的表达增加。MIP3- α 是一种炎性趋化因子,其与CCR6受体结合并用作DC和记忆T细胞的化学引诱物。MIP3- α 与通过将未成熟的DC募集到炎症部位来触发适应性免疫应答相关联[26]。MIP3- α 的表达失调与例如炎症性肠病的疾病相关[27]。由于显示出施用本发明的组合物可增加MIP3- α 的表达,因此本发明的组合物可用于治疗以MIP3- α 的表达降低为特征的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以MIP3- α 的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加MIP3- α 的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加MIP3- α 的

表达和/或活性来促进免疫应答。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗以MIP3- α 的表达和/或活性降低为特征性疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加MIP3- α 的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加MIP3- α 的表达和/或活性来促进免疫应答。

[0188] 实施例表明,施用本发明的组合物可导致肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达增加。TNF- α 是一种促炎性细胞因子,已知其参与多种信号通路来促进细胞死亡。TNF- α 通过与其同源受体TNFR-1结合来启动细胞凋亡,从而导致凋亡途径中的裂解事件级联[28]。TNF- α 还可通过RIP激酶依赖性机制触发坏死[29]。由于施用本发明的组合物显示TNF- α 表达增加,因此本发明的组合物可用于治疗疾病,特别是用于治疗或预防以TNF- α 表达降低为特征性疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗以TNF- α 表达降低为特征性疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以TNF- α 的表达和/或活性降低为特征性疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物可通过增加TNF- α 的表达和/或活性而用于治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加TNF- α 的表达和/或活性来促进免疫应答。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗以TNF- α 的表达和/或活性降低为特征性疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加TNF- α 的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加TNF- α 的表达和/或活性来促进免疫应答。

[0189] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致PBMC中IL-6表达的增加。IL-6是一种在炎症过程中产生的促炎性细胞因子,并且促进未成熟CD4⁺ T细胞的分化以及CD8⁺ T细胞分化为细胞毒性T细胞[30]。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-6的表达,因此本发明的组合物可用于治疗以IL-6表达降低为特征性疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以IL-6的表达和/或活性降低为特征性疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-6的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-6的表达和/或活性来促进免疫应答。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗以IL-6的表达和/或活性降低为特征性疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加IL-6的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加IL-6的表达和/或活性来促进免疫应答。

[0190] Bettelli等[31]报道IL-6抑制Treg的产生。由于实施例表明本发明的组合物增加了IL-6的表达,因此本发明的组合物可通过增加IL-6的表达来选择性地减少Treg的数量或百分比。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-6的表达而用于免疫刺激。在另一个实施方案中,本发明的组合物通过减少Treg的数量或百分比而用于免疫刺激。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株通过增加IL-6的表达而用于免疫刺激。在另一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株通过减少Treg的数量或百分比而用于免疫刺激。

[0191] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致IL-8表达的增加(参见实施例8)。IL-8是一种主要由巨噬细胞分泌的促炎性细胞因子,其具有免疫刺激作用。它诱导靶细胞(主要是嗜中性粒细胞,但也包括其它粒细胞)的趋化性,导致它们向感染部位迁移。IL-8还刺激吞噬作用。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-8的表达,因此本发明的组合物可用于治疗以IL-8的表达降低为特征性疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于

治疗或预防以IL-8的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-8的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-8的表达和/或活性来促进免疫应答。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗以IL-8表达降低和/或IL-8活性降低为特征的疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加IL-8的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加IL-8的表达和/或活性来促进免疫应答。

[0192] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致CD11b表达的增加(参见实施例12)。CD11b是一种具有免疫刺激作用的促炎性细胞因子。CD11b在涉及先天免疫系统的许多白细胞表面表达,并通过调节白细胞粘附和迁移来介导炎症。CD11b已参与若干免疫过程,例如吞噬作用,细胞介导的细胞毒性,趋化性和细胞活化。由于显示出施用本发明的组合物可增加CD11b的表达,因此本发明的组合物可用于治疗以CD11b的表达降低为特征的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以CD11b的表达和/或活性降低为特征的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加CD11b的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加CD11b的表达和/或活性来促进免疫应答。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗以CD11b表达和/或CD11b活性的降低为特征的疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加CD11b的表达和/或活性来治疗或预防疾病。在一个实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加CD11b的表达和/或活性来促进免疫应答。

[0193] 实施例表明,本发明的组合物可诱导NF- κ B-Ap1启动子活化(参见图61)。NF- κ B特别是通过刺激炎症介体和免疫应答中涉及的细胞因子例如IL-6的表达来参与免疫应答的激活。如上文所概述,IL-6表达的增加有助于刺激免疫系统,因此NF- κ B途径的激活具有免疫刺激活性。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物激活NF- κ B信号传导并因此刺激免疫系统。在某些实施方案中,本发明的组合物通过增加NF- κ B启动子的激活来刺激炎症介体和免疫刺激细胞因子的表达。

[0194] 癌症

[0195] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防癌症。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防脑癌,特别是神经母细胞瘤。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防黑素瘤,特别是转移性黑素瘤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防脑癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防神经母细胞瘤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防黑素瘤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防转移性黑素瘤。在一个最优选的实施方案中,本发明的组合物包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株,并且用于治疗或预防脑癌,特别是神经母细胞瘤。在另一个最优选的实施方案中,本发明的组合物包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株,并且用于治疗或预防黑素瘤,特别是转移性黑素瘤。

[0196] 实施例(实施例1)表明,施用本发明的组合物可导致未分化的神经母细胞瘤细胞中III类 β 微管蛋白(β 3微管蛋白)表达的增加。 β 3微管蛋白被广泛称为神经元标志物[32]。实施例还表明,施用本发明的组合物可导致未分化的神经母细胞瘤细胞中微管相关蛋白2(MAP2)表达的增加。MAP2主要在神经元中表达,并用于稳定微管,促进树突发育和神经突生

长[33]。MAP2被称为分化神经元的标志物。

[0197] 导致细胞分化的药剂已与癌症治疗剂相关联,因为细胞分化药剂的施用与肿瘤生长的抑制有关[34]。因此,本发明的组合物可用于治疗癌症。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于通过诱导细胞分化,特别是神经元分化来治疗癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过诱导神经元分化来治疗脑癌,特别是神经母细胞瘤的治疗。

[0198] 此外,已发现MAP2在原发性皮肤黑素瘤中高表达,但在转移性黑素瘤中表达降低[35]。已提出微管稳定蛋白的表达增加或用微管稳定蛋白例如MAP2处理可能会干扰细胞分裂期间所需的微管的动态不稳定性。因此,认为MAP2的上调会阻碍细胞分裂并延迟癌症中的肿瘤生长[35]。因此,本发明的组合物可用于治疗癌症,特别是转移性癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗癌症的方法中。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防由降低的MAP2表达介导的癌症。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以MAP2表达降低或缺失为特征的癌症。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在癌症治疗中增加MAP2表达。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防黑素瘤。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防转移性黑素瘤。

[0199] 在某些实施方案中,本发明的治疗组合用于治疗或预防黑素瘤。根据一些实施方案,本发明的治疗组合对黑素细胞具有作用并且可以有效地治疗黑素瘤。在某些实施方案中,本发明的治疗组合用于在黑素瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。

[0200] 特别地,实施例表明,施用本发明的组合物可导致未分化的神经母细胞瘤细胞中MAP2表达的增加。由于MAP2被公知为分化的神经元的标志物,并且已显示其表达对癌症有影响,因此本发明的组合物对于治疗脑癌例如神经母细胞瘤可能特别有用。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗脑癌的方法中。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗神经母细胞瘤的方法中。

[0201] 此外,实施例还表明,施用本发明的组合物可导致多巴胺受体D2 (DRD2) 表达显著降低(参见实施例2和图3)。DRD2是一种G蛋白偶联受体(GPCR),并且它是多巴胺受体家族的一部分。DRD2参与促进细胞存活的信号通路,因此与癌症相关联。DRD2的过表达或上调与若干类型的癌症有关,因为与正常细胞相比,恶性细胞显示DRD2的表达增加[36]。已显示出通过DRD2特异性拮抗剂抑制DRD2具有抗肿瘤作用。已显示DRD2拮抗剂在许多癌症中均具有抗肿瘤功效,包括乳腺癌[37][38]、胶质母细胞瘤[39][40][41]、神经母细胞瘤[42]、肝细胞癌[43]、肺癌、前列腺癌[44]、宫颈癌[45]、卵巢癌[46]、淋巴瘤[47]和胃癌[48]。因此,降低DRD2表达水平的组合物可用于治疗癌症。由于显示出施用本发明的组合物降低DRD2表达,因此本发明的组合物可用于治疗癌症,特别是用于治疗或预防以DRD2表达增加为特征的癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物可用于治疗或预防以DRD2的表达和/或活性增加为特征的癌症。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在癌症治疗中降低DRD2表达和/或活性。在一个实施方案中,本发明的组合物可用于治疗癌症,特别是乳腺癌,卵巢癌,宫颈癌,脑癌,特别是胶质母细胞瘤和神经母细胞瘤,癌瘤,特别是肝细胞癌,肺癌,前列腺癌淋巴瘤和/或胃癌。在一个实施方案中,本发明的组合物可通过降低DRD2的水平和/或活性用于治疗或预防癌症。

[0202] Prabhu等报道,DRD2的拮抗剂ONC201在胶质母细胞瘤模型中显示出缩小肿瘤的功效。在胶质母细胞瘤肿瘤中,DRD2的表达上调,因此DRD2是癌症治疗剂的有吸引力的靶标

[49]。在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防胶质母细胞瘤。

[0203] 实施例还表明，施用本发明的组合物可导致SH-SY5Y细胞中的半胱天冬酶3 (Casp3) 表达的增加。半胱天冬酶是半胱氨酸蛋白酶家族的一部分，并且已知其促进细胞凋亡。Casp3被称为“刽子手半胱天冬酶”，其在凋亡途径的细胞蛋白裂解级联中起重要作用。先前已在乳腺、卵巢和宫颈肿瘤组织的癌症中显示出Casp3表达的下调，并且据认为Casp3表达的下降促进了癌组织中的细胞存活[50]。因此，增加刽子手半胱天冬酶、特别是Casp3的表达水平的组合物可用于治疗癌症。由于显示出施用本发明的组合物可增加Casp3表达，因此本发明的组合物可用于治疗癌症，特别是用于治疗或预防由Casp3表达介导的癌症。在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防以Casp3表达降低或缺失为特征的癌症。在一个实施方案中，本发明的组合物可用于治疗以刽子手半胱天冬酶表达降低或缺失为特征的癌症。在一个特定的实施方案中，本发明的组合物可用于治疗或预防以Casp3表达减少或缺失为特征的癌症。在某些实施方案中，本发明的组合物用于在癌症治疗中增加Casp3表达。在一个实施方案中，本发明的组合物可用于治疗癌症，特别是乳腺癌、卵巢癌和/或宫颈癌。在一个实施方案中，本发明的组合物可用于通过增加Casp3的水平和/或活性来治疗癌症。

[0204] 此外，据报道，半胱天冬酶参与除细胞凋亡以外的过程，例如细胞分化[51]。实施例(实施例1和实施例3)表明，施用本发明的组合物可导致神经元标志物β3微管蛋白和MAP2的表达增加，并且还增加未分化的神经母细胞瘤细胞中的Casp3表达。由于本发明的组合物可导致已知在细胞分化中起作用的神经元标志物和蛋白质的表达增加，因此本发明的组合物可用于从未分化的细胞分化神经元。

[0205] 实施例还表明，施用本发明的组合物可导致未分化的神经母细胞瘤细胞的细胞活力降低(图5)。特别地，实施例显示以5%或10%的浓度施用MRx0029引起细胞活力的显著的、剂量依赖性的降低(图5)。

[0206] 众所周知，癌细胞的细胞活力降低或细胞死亡增加是癌症治疗的目标[52]。因此，降低癌细胞系例如神经母细胞瘤细胞系中细胞活力的组合物可用于治疗癌症。在一个实施方案中，本发明的组合物用于通过降低细胞活力来治疗癌症。在另一个实施方案中，本发明的组合物用于通过增加细胞死亡来治疗癌症。

[0207] 此外，由于实施例表明本发明的组合物既增加了Casp3表达又降低了细胞活力(图4和图5)，因此提出本发明的组合物通过上调细胞凋亡来降低细胞活力。在一个实施方案中，本发明的组合物用于上调细胞凋亡。在另一个实施方案中，本发明的组合物用于通过增加细胞死亡，特别是通过增加细胞凋亡来治疗癌症。在一个实施方案中，本发明的组合物用于通过降低细胞活力来治疗癌症。在一个实施方案中，本发明的组合物用于通过降低细胞活力来治疗癌症。在一个实施方案中，本发明的组合物用于通过上调细胞凋亡来治疗癌症。在一个特定的实施方案中，本发明的组合物用于通过上调细胞凋亡来治疗癌症。在一个特定的实施方案中，本发明的组合物用于通过上调细胞凋亡来治疗以Casp3表达降低或缺失为特征的癌症。在某些实施方案中，本发明的组合物用于增加癌症治疗中的细胞凋亡。在某些实施方案中，本发明的组合物用于降低癌症治疗中的细胞活力。

[0208] 实施例表明，本发明的组合物增加了Casp3和MAP2的表达。因此，Casp3上调和MAP2上调可能相关。

[0209] 组蛋白乙酰化和脱乙酰化是基因表达的重要表观遗传调控因子。表观遗传调控是调控细胞功能的所有方面的有力工具。组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 通过从组蛋白上的 ϵ -N-乙酰基赖氨酸氨基酸中去除乙酰基来抑制基因表达,从而使组蛋白更紧密地包裹DNA并通过核小体不可及性导致转录抑制。HDAC有18个同工型,分为四个类别:I类、II类、III类和IV类。在许多疾病类型中已观察到HDAC水平的变化,所述疾病类型包括例如癌症、感染性疾病、炎症性疾病和神经退行性疾病[53,54,55]。

[0210] HDAC抑制剂 (HDACi) 是一类新兴的有前途的抗癌药物,已显示其在多种癌细胞系中引起生长停滞,分化,细胞凋亡,血管生成减少和免疫应答调节[56,57,58,59]。尽管尚不清楚介导这些药剂的临床活性的确切机制,但目前正在研究广泛的HDACi作为潜在的抗癌剂。此外,由于在体外和体内研究中均具有明显的抗癌活性,因此许多HDACi作为单一疗法或与其它抗癌剂组合已通过临床开发迅速发展[60]。其中,伏立诺他 (ZolinzaTM)、罗米地辛 (IstodaxTM) 和贝利司他 (BeleodaqTM) 已获得美国FDA批准用于淋巴瘤的治疗。淋巴瘤和其它血液癌症 (也称为血液系统癌症或血液系统恶性肿瘤) 对HDACi特别敏感。肠道微生物群因其巨大的多样性和代谢能力而代表了用于产生对HDAC活性具有潜在影响的各种分子的庞大的代谢库。很少有研究评估除丁酸盐以外的微生物衍生代谢物的HDAC抑制活性,所述代谢物已显示出抑制HDAC并且与亨廷顿氏病 (Huntington's disease) 的运动功能改善相关[61]。

[0211] 实施例表明,本发明的组合物抑制HDAC活性,特别是I类HDAC,例如HDAC2 (实施例9和10)。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物调节HDAC活性。在某些实施方案中,本发明的组合物降低HDAC活性。在某些实施方案中,本发明的组合物抑制HDAC。在某些实施方案中,本发明的组合物是HDACi。在优选的实施方案中,本发明的组合物降低I类HDAC活性。在某些实施方案中,本发明的组合物降低II类HDAC活性。在某些实施方案中,本发明的组合物降低III类HDAC活性。在某些实施方案中,本发明的组合物降低IV类HDAC活性。在某些实施方案中,本发明的组合物降低HDAC1活性。在优选的实施方案中,本发明的组合物降低HDAC2活性。在某些实施方案中,本发明的组合物降低HDAC3活性。在某些实施方案中,本发明的组合物通过产生戊酸来降低HDAC活性。在某些实施方案中,本发明的组合物通过产生丁酸钠来降低HDAC活性。在优选的实施方案中,本发明的组合物用于通过降低HDAC活性来治疗或预防癌症。在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防与HDAC相关的癌症。在某些实施方案中,本发明的组合物用于通过降低HDAC活性来治疗或预防转移性黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、结直肠癌、血液系统恶性肿瘤和/或胃癌。在优选的实施方案中,本发明的组合物用于通过降低HDAC活性来治疗或预防血液系统恶性肿瘤。

[0212] 在某些实施方案中,本发明的组合物的HDAC抑制活性导致生长停滞。在某些实施方案中,本发明的组合物的HDAC抑制活性导致细胞周期停滞。在某些实施方案中,本发明的组合物的HDAC抑制活性导致细胞分化。在某些实施方案中,本发明的组合物的HDAC抑制活性导致细胞凋亡。在某些实施方案中,本发明的组合物的HDAC抑制活性导致血管生成的减少。在某些实施方案中,本发明的组合物的HDAC抑制活性导致免疫应答的调节。在某些实施方案中,本发明的组合物作为单一疗法用于降低HDAC活性。在某些实施方案中,本发明的组合物作为组合疗法用于降低HDAC活性。在某些实施方案中,本发明的组合物与另一种抗癌

剂组合使用。在某些实施方案中，本发明的组合物与一种以上其它抗癌剂组合使用。在某些实施方案中，本发明的组合物与化学治疗剂组合使用。在某些实施方案中，本发明的组合物与蛋白酶体抑制剂组合使用。在其它方面，本发明的组合物是表观遗传调控剂。在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防以表观遗传畸变为特征的疾病。

[0213] 在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株调节HDAC活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株降低HDAC活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株抑制HDAC。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株是HDACi。在优选的实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株降低I类HDAC活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株降低II类HDAC活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株降低III类HDAC活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株降低IV类HDAC活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株降低HDAC1活性。在优选的实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株降低HDAC2活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株降低HDAC3活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株通过产生戊酸来降低HDAC活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株通过产生丁酸钠来降低HDAC活性。在优选的实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过降低HDAC活性来治疗或预防癌症。在优选的实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防与HDAC相关的癌症。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过降低HDAC活性来治疗或预防转移性黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤、癌瘤、肺癌、慢性淋巴细胞白血病、前列腺癌、淋巴瘤、结直肠癌、血液系统恶性肿瘤和/或胃癌。在优选的实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过降低HDAC活性来治疗或预防血液系统恶性肿瘤。

[0214] 在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株的HDAC抑制活性导致生长停滞。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株的HDAC抑制活性导致细胞周期停滞。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株的HDAC抑制活性导致细胞分化。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株的HDAC抑制活性导致细胞凋亡。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株导致血管生成减少。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株的HDAC抑制活性导致免疫应答的调节。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株作为单一疗法用于降低HDAC活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株作为组合疗法用于降低HDAC活性。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株与另一种抗癌剂组合使用。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株与一种以上其它抗癌剂组合使用。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株与化学治疗剂组合使用。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株与蛋白酶体抑制剂组合使用。在其它方面，马氏巨球菌菌种的细菌菌株是表观遗传调控剂。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防以表观遗传畸变为特征的疾病。

[0215] 本发明的组合物能够通过修饰参与肠屏障功能的蛋白质的表达和定位所涉及的细胞内信号转导来调节上皮通透性。特别地，本发明的组合物增强了闭合蛋白(Occludin)、绒毛蛋白(Villin)、紧密连接蛋白1(TJP1)和紧密连接蛋白2(TJP2)mRNA表达。因此，本发明的组合物用于增强肠屏障功能并降低肠通透性(实施例11)。在某些实施方案中，本发明的组合物用于增加肠屏障功能。在某些实施方案中，本发明的组合物用于降低肠通透性。在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防肠屏障功能降低。在某些实施方案中，本发

明的组合物用于治疗或预防肠通透性增加。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以肠屏障功能降低为特征的疾病或疾患。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以肠通透性增加为特征的疾病或疾患。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防由放射疗法或化学疗法引起的肠屏障功能的降低。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防由放射疗法或化学疗法引起的肠通透性增加。在某些实施方案中,本发明的组合物用于通过增加肠屏障功能来治疗或预防恶病质。在某些实施方案中,本发明的组合物用于通过降低肠通透性来治疗或预防恶病质。在某些实施方案中,恶病质是癌症恶病质。

[0216] 在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于增加肠屏障功能。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于降低肠通透性。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防肠屏障功能的降低。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防肠通透性增加。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防以肠屏障功能降低为特征的疾病或疾患。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防以肠通透性增加为特征的疾病或疾患。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防由放射疗法或化学疗法引起的肠屏障功能的降低。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防由放射疗法或化学疗法引起的肠通透性增加。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过增加肠屏障功能来治疗或预防恶病质。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于通过降低肠通透性来治疗或预防恶病质。在某些实施方案中,恶病质是癌症恶病质。

[0217] 在优选的实施方案中,所述组合物用于治疗正在接受放射疗法或化学疗法的患者中的癌症。在这样的实施方案中,所述组合物可在放射疗法或化学疗法之前、期间或之后施用。接受放射疗法或化学疗法的患者不应被施用任何诱导肠漏的药物,但马氏巨球菌可促进肠屏障功能[62],因此本发明的组合物特别适合于治疗接受放射疗法或化学疗法的患者。已显示TLR-5的活化可改善体内辐射诱发的上皮损伤[63]。本发明的组合物还激活免疫系统。在一些实施方案中,本发明的组合物用于治疗放射疗法引起的损伤。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗放射疗法引起的损伤。

[0218] 在一些实施方案中,本发明的组合物可导致肿瘤生长的减少。

[0219] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗导致肿瘤大小减小或肿瘤生长减少。在某些实施方案中,本发明的组合物用于减小肿瘤大小或减少肿瘤生长。本发明的组合物可有效减小肿瘤大小或生长。在某些实施方案中,本发明的组合物用于患有实体瘤的患者。在某些实施方案中,本发明的组合物用于减少或预防癌症治疗中的血管生成。本发明的组合物可对免疫或炎性系统有作用,其在血管生成中具有重要作用。本发明的组合物可具有抗转移活性。马氏巨球菌菌种的细菌菌株可具有抗转移活性。在某些实施方案中,本发明的组合物用于预防转移。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于预防转移。

[0220] 实施例表明,施用本发明的组合物可导致PBMC中Treg的百分比降低(图6C)。Treg与癌症有关,并且Treg在肿瘤组织中的浸润与不良预后有关[64]。由于显示出施用本发明的组合物选择性地减少了Treg群体(图6C),因此本发明的组合物可用于治疗癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以细胞群体中Treg百分比增加为特征的癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物可用于治疗或预防以细胞群体中CD4+CD25+CD127-

细胞百分比增加为特征的癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过减少Treg的数量或百分比来治疗或预防癌症,特别是在癌性组织中。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过选择性减少Treg来治疗癌症。

[0221] 已提出,选择性减少Treg的数量并激活效应T细胞如CD8⁺ T细胞将是一种有效的癌症疗法[64]。实施例还表明,施用本发明的组合物可导致CD8细胞与Treg细胞的比率增加。由于显示出施用本发明的组合物可增加CD8/Treg细胞和活化CD8/Treg细胞的比率(图6G和图6H),因此本发明的组合物可用于治疗癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以CD8/Treg和/或活化CD8/Treg细胞的比率降低为特征的癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以CD8/Treg细胞比率降低为特征的癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以活化CD8/Treg细胞的比率降低为特征的癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过降低细胞群体中Treg的百分比,从而增加CD8/Treg细胞的比率来治疗或预防癌症。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于通过降低细胞群体中Treg的百分比,从而增加活化CD8/Treg细胞的比率来治疗或预防癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加CD8/Treg细胞的比率来治疗癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加活化CD8/Treg细胞的比率来治疗癌症。

[0222] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致IL-1 β 表达的增加。在结肠炎相关的癌症中,IL-1 β 在肿瘤部位的表达降低与例如疾病结果和发病率增加的症状相关[65]。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-1 β 的表达,因此本发明的组合物可用于治疗癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防以IL-1 β 表达降低或缺乏为特征的癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加IL-1 β 的表达来治疗或预防癌症。

[0223] 实施例表明,施用本发明的组合物可导致肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达增加。TNF- α 是一种促炎性细胞因子,已知其参与多种信号通路来促进细胞死亡。TNF- α 通过与其同源受体TNFR-1结合来启动凋亡,从而导致凋亡途径中的裂解事件级联。TNF- α 还可通过RIP激酶依赖性机制触发坏死。由于许多类型的癌症具有缺陷性凋亡和坏死途径,并且已知TNF- α 介导这些细胞死亡途径,因此TNF- α 是癌症治疗的潜在靶标。由于显示出施用本发明的组合物可增加TNF- α 表达,因此本发明的组合物可用于治疗癌症,特别是用于治疗或预防由TNF- α 表达介导的癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物可用于治疗由TNF- α 表达介导的癌症,特别是具有降低的TNF- α 表达和/或活性的癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物可用于治疗癌症。在一个实施方案中,本发明的组合物可通过增加TNF- α 的水平和/或活性用于治疗癌症。

[0224] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防乳腺癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在乳腺癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防乳腺癌。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在乳腺癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,癌症是乳腺癌。在优选的实施方案中,癌症是IV期乳腺癌。

[0225] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防肺癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在肺癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防肺癌。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在肺癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优

选的实施方案中,癌症是肺癌。

[0226] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防肝癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在肝癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防肝癌。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在肝癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,癌症是肝细胞瘤(肝细胞癌)。

[0227] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防黑素瘤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在黑素瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防黑素瘤。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在黑素瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,黑素瘤是转移性黑素瘤。

[0228] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防卵巢癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在卵巢癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防卵巢癌。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在卵巢癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。

[0229] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防宫颈癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在宫颈癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防宫颈癌。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在宫颈癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。

[0230] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防神经母细胞瘤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在神经母细胞瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防神经母细胞瘤。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在神经母细胞瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。

[0231] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防胶质母细胞瘤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在胶质母细胞瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防胶质母细胞瘤。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在胶质母细胞瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。

[0232] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防前列腺癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在前列腺癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防前列腺癌。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在前列腺癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。

[0233] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防血液系统恶性肿瘤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在血液系统恶性肿瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防

血液系统恶性肿瘤。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在血液系统恶性肿瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是急性白血病。在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是慢性白血病。在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是急性髓细胞白血病。在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是慢性髓细胞白血病。在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是急性淋巴细胞性白血病。在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是慢性淋巴细胞性白血病。在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是淋巴瘤。在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在某些实施方案中,血液系统恶性肿瘤是骨髓增生异常综合征。

[0234] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防慢性淋巴细胞白血病。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在慢性淋巴细胞白血病治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防慢性淋巴细胞白血病。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在慢性淋巴细胞白血病治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。

[0235] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防淋巴瘤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在淋巴瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防淋巴瘤。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在淋巴瘤治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在某些实施方案中,淋巴瘤是霍奇金淋巴瘤。在某些实施方案中,淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤。

[0236] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防胃癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在胃癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防胃癌。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在胃癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。

[0237] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防结肠癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防结直肠癌。本发明的组合物可对结肠癌细胞具有作用并且可有效地治疗结肠癌。本发明的组合物可对结直肠癌细胞具有作用并且可有效地治疗结直肠癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在结肠癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在结直肠癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防结肠癌。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防结直肠癌。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在结肠癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在结直肠癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在优选的实施方案中,癌症是结直肠癌。

[0238] 在某些实施方案中,本发明的治疗组合用于治疗或预防肾脏癌(本文也称为肾癌)。在某些实施方案中,本发明的治疗组合用于在肾癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防肾脏癌(在本文中也称为肾癌)。在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于在肾癌治疗中减小肿瘤大小,减少肿瘤生长或减少血管生成。实施例表明,本发明的治疗组合对肾癌

细胞具有作用并且可有效治疗肾癌。在优选的实施方案中，癌症是肾细胞癌或移行细胞癌。在一些实施方案中，癌症是肠癌。在一些实施方案中，癌症是身体中非肠部分的癌症。在一些实施方案中，癌症不是肠癌。在一些实施方案中，癌症不是结直肠癌。在一些实施方案中，癌症不是小肠癌。在一些实施方案中，治疗或预防发生在肠以外的部位。在一些实施方案中，治疗或预防发生在肠以及肠以外的部位。

[0239] 在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防癌瘤。本发明的组合物可有效治疗多种类型的癌瘤。在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防非免疫原性癌症。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防癌瘤。马氏巨球菌菌种的细菌菌株可有效治疗多种类型的癌瘤。在某些实施方案中，马氏巨球菌菌种的细菌菌株用于治疗或预防非免疫原性癌症。实施例表明，本发明的组合物可有效治疗非免疫原性癌症。

[0240] 本发明的组合物对癌症的治疗作用可由促炎机制介导。施用MRx0029后，多种促炎性细胞因子的表达可能会增加。炎症可能具有抑制癌症的作用[66]，并且例如TNF- α 的促炎性细胞因子正在作为癌症疗法进行研究[67]。实施例中显示的基因例如TNF- α 的上调可表明本发明的组合物可通过相似的机制用于治疗癌症。CXCR3配体(例如CXCL9)的上调可表明本发明的组合物引发IFN γ 型应答。IFN γ 是一种有效的巨噬细胞激活因子，其可刺激杀肿瘤活性[68]，并且CXCL9例如也具有抗癌作用[69-71]。实施例表明，在施用MRx0029后，多种促炎性细胞因子的表达可增加。因此，在某些实施方案中，本发明的组合物用于促进癌症治疗中的炎症。在优选的实施方案中，本发明的组合物用于在癌症治疗中促进Th1炎症。Th1细胞产生IFN γ 并具有有效的抗癌作用[66]。在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗早期癌症，例如尚未转移的癌症，或0期或1期癌症。促进炎症可能更有效地抵抗早期癌症[66]。在某些实施方案中，本发明的组合物用于增强第二抗癌剂的作用。在某些实施方案中，本发明的组合物用于促进炎症以增强第二抗癌剂的作用。在某些实施方案中，癌症的治疗或预防包括增加一种或多种细胞因子的表达水平。在某些实施方案中，癌症的治疗或预防包括增加一种或多种促炎性细胞因子的表达水平。例如，在某些实施方案中，癌症的治疗或预防包括增加IL-1 β 、IL-6、MIP-3 α 、CXCL9、IL-23、MCP-1、GM-CSF和TNF- α 中的一者或多者的表达水平。在某些实施方案中，癌症的治疗或预防包括增加IL-1 β 和MIP-3 α 中的一者或多者的表达水平。已知IL-1 β 、IL-6和TNF- α 中任何一者的表达水平的增加指示了治疗癌症的功效。

[0241] 当如本文所述的细菌菌株与脂多糖(LPS)组合使用时，IL-1 β 可能会协同增加。已知LPS引起促炎作用。因此，在某些实施方案中，治疗或预防包括将如本文所述的细菌菌株与上调IL-1 β 的试剂组合使用。在某些实施方案中，治疗或预防包括将如本文所述的细菌菌株与LPS组合使用。因此，本发明的组合物可另外包含上调IL-1 β 的试剂。因此，本发明的组合物可另外包含LPS。

[0242] 在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗先前已接受化学疗法的患者。在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗尚未耐受化学疗法治疗的患者。本发明的组合物可能特别适合于此类患者。

[0243] 在某些实施方案中，本发明的组合物用于预防复发。本发明的组合物可适合于长期施用。在某些实施方案中，本发明的组合物用于预防癌症的进展。

[0244] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗非小细胞肺癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗小细胞肺癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗鳞状细胞癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗腺癌。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗腺瘤、类癌瘤或未分化癌瘤。

[0245] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗由病毒感染引起的肝母细胞瘤、胆管癌、胆管细胞性囊腺癌或肝癌。

[0246] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗浸润性导管癌、原位导管癌或浸润性小叶癌。

[0247] 在其它实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓系白血病、肾上腺皮质癌、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨肿瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、脑干神经胶质瘤、脑瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、类癌瘤、宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞白血病、慢性骨髓增生性病症、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、眼内黑素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤、儿童期视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、黑素瘤、胰岛细胞癌、卡波西肉瘤(Kaposi sarcoma)、肾细胞癌、喉癌、白血病、淋巴瘤、间皮瘤、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺癌、咽癌、垂体腺癌、浆细胞瘤、前列腺癌、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、肉瘤、睾丸癌、甲状腺癌或子宫癌。在其它实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防血液系统恶性肿瘤、多发性骨髓瘤或骨髓增生异常综合征。

[0248] 当与其它治疗剂组合使用时,本发明的组合物可能特别有效。当与更直接的抗癌剂组合时,本发明的组合物的免疫调节作用可能是有效的。因此,在某些实施方案中,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株和抗癌剂。在某些实施方案中,包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的本发明的组合物用于刺激癌症以增强其对第二抗癌剂治疗的敏感性。在某些实施方案中,包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的本发明的组合物通过增强其对第二抗癌剂治疗的敏感性而用于治疗癌症,例如脑癌。所述第二抗癌剂可同时施用,或者可在包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的组合物之后,例如至少一天、一周或一个月后施用。

[0249] 在优选的实施方案中,抗癌剂是免疫检查点抑制剂、靶向抗体免疫疗法、CAR-T细胞疗法、溶瘤病毒或细胞生长抑制药物。在优选的实施方案中,所述组合物包含选自以下组成的组的抗癌剂:Yervoy(伊匹单抗(ipilimumab),BMS);Keytruda(派姆单抗(pembrolizumab),Merck);Opdivo(尼武单抗(nivolumab),BMS);MEDI4736(AZ/MedImmune);MPDL3280A(Roche/Genentech);曲美单抗(Tremelimumab)(AZ/MedImmune);CT-011(匹地珠单抗(pidilizumab),CureTech);BMS-986015(丽利单抗(lirilumab),BMS);MEDI0680(AZ/MedImmune);MSB-0010718C(Merck);PF-05082566(Pfizer);MEDI6469(AZ/MedImmune);BMS-986016(BMS);BMS-663513(乌瑞鲁单抗(urelumab),BMS);IMP321(Prima Biomed);LAG525(Novartis);ARGX-110(arGEN-X);PF-05082466(Pfizer);CDX-1127(瓦利鲁单抗(varlilumab);CellDex Therapeutics);TRX-518(GITR Inc.);MK-4166(Merck);

JTX-2011 (Jounce Therapeutics); ARGX-115 (arGEN-X); NLG-9189 (吡哆莫德 (indoximod), NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH2201 (Innate Immotherapeutics/AZ); NLG-919 (NewLink Genetics); 抗VISTA (JnJ); 依帕卡司他 (Epacadostat) (INCB24360, Incyte); F001287 (Flexus/BMS); CP 870893 (宾夕法尼亚大学); MGA271 (Macrogenix); 艾马妥珠单抗 (Emactuzumab) (Roche/Genentech); 加尼西替尼 (Galunisertib) (Eli Lilly); 乌洛鲁单抗 (Ulocuplumab) (BMS); BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics); 巴维昔单抗 (Bavituximab) (Peregrine Pharmaceuticals); CC 90002 (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals); IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals); LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (韩国梨花女子大学 (Ewha Women's University, Korea)); 维拉非尼 (Vemurafenib) (Plexxikon); 达拉非尼 (Dabrafenib) (Genentech/GSK); BMS-777607 (BMS); BLZ945 (纪念斯隆-凯特琳癌症中心 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre)); Unituxin (地那昔单抗 (dinutuximab), United Therapeutics Corporation); Blincyto (博纳吐单抗 (blinatumomab), Amgen); Cyramza (雷莫芦单抗 (ramucirumab), Eli Lilly); Gazyva (奥比妥单抗 (obinutuzumab), Roche/Biogen); Kadcyla (曲妥珠单抗-美坦新偶联物 (ado-trastuzumab emtansine), Roche/Genentech); Perjeta (帕妥珠单抗 (pertuzumab), Roche/Genentech); Adcetris (维布妥昔单抗 (brentuximab vedotin), Takeda/Millennium); Arzerra (奥法木单抗 (ofatumumab), GSK); Vectibix (帕尼单抗 (panitumumab), Amgen); Avastin (贝伐珠单抗 (bevacizumab), Roche/Genentech); Erbitux (西妥昔单抗 (cetuximab), BMS/Merck); Bexxar (托西莫单抗 (tositumomab)-I131, GSK); Zevalin (替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan), Biogen); Campath (阿仑单抗 (alemtuzumab), Bayer); Mylotarg (吉妥珠单抗奥唑米星 (gemtuzumab ozogamicin), Pfizer); Herceptin (曲妥珠单抗 (trastuzumab), Roche/Genentech); Rituxan (利妥昔单抗 (rituximab), Genentech/Biogen); 伏洛昔单抗 (volociximab) (Abbvie); 依那妥单抗 (Enavatuzumab) (Abbvie); ABT-414 (Abbvie); 依洛珠单抗 (Elotuzumab) (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Ablinx); 奥扎利珠单抗 (Ozaralizumab) (Ablinx); Actimab-C (Actinium); Actimab-P (Actinium); 米拉珠单抗 (Milatuzumab) -dox (Actinium); Emab-SN-38 (Actinium); 他那莫单抗 (Naptumonmab estafenatox) (Active Biotech); AFM13 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (萨马珠单抗 (samalizumab), 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 (阿德木单抗 (adecatumumab), Amgen); AMG211 (Amgen/MedImmune); BAY20-10112 (Amgen/Bayer); 利洛木单抗 (Rilotumumab) (Amgen); 地诺单抗 (Denosumab) (Amgen); AMP-514 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/MedImmune); MEDI6383 (AZ/MedImmune); MEDI551 (AZ/MedImmune); 莫妥昔单抗假单胞菌外毒素 (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); 安替单抗瑞伐坦 (Anetumab ravtansine) (Bayer); 万替妥单抗 (vantictumab) (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); 西罗珠单

抗(Sibrotuzumab)(Boehringer Ingelheim);BI-836845(Boehringer Ingelheim);B-701(BioClin);BIIB015(Biogen);阿托珠单抗(Obinutuzumab)(Biogen/Genentech);BI-505(Bioinvent);BI-1206(Bioinvent);TB-403(Bioinvent);BT-062(Biotest)BIL-010t(Biosceptre);MDX-1203(BMS);MDX-1204(BMS);耐昔妥珠单抗(Necitumumab)(BMS);CAN-4(Cantargia AB);CDX-011(Celldex);CDX1401(Celldex);CDX301(Celldex);U3-1565(Daiichi Sankyo);帕曲图单抗(patritumab)(Daiichi Sankyo);替加珠单抗(tigatuzumab)(Daiichi Sankyo);尼妥珠单抗(nimotuzumab)(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);西妥木单抗(cixutumumab)(Eli Lilly);弗拉伏妥单抗(Flanvotumab)(Eli Lilly);IMC-TR1(Eli Lilly);雷莫卢单抗(Ramucirumab)(Eli Lilly);塔巴单抗(Tabalumab)(Eli Lilly);扎诺莫单抗(Zanolimumab)(Emergent Biosolution);FG-3019(FibroGen);FPA008(Five Prime Therapeutics);FP-1039(Five Prime Therapeutics);FPA144(Five Prime Therapeutics);卡妥索单抗(catumaxomab)(Fresenius Biotech);IMAB362(Ganymed);IMAB027(Ganymed);HuMax-CD74(Genmab);HuMax-TFADC(Genmab);GS-5745(Gilead);GS-6624(Gilead);OMP-21M18(demcizumab,GSK);马帕木单抗(mapatumumab)(GSK);IMGN289(ImmunoGen);IMGN901(ImmunoGen);IMGN853(ImmunoGen);IMGN529(ImmunoGen);IMMU-130(Immunomedics);米拉珠单抗(milatuzumab)-dox(Immunomedics);IMMU-115(Immunomedics);IMMU-132(Immunomedics);IMMU-106(Immunomedics);IMMU-102(Immunomedics);依帕珠单抗(Epratuzumab)(Immunomedics);克里托珠单抗(Clivatuzumab)(Immunomedics);IPH41(Innate Immunotherapeutics);达雷木单抗(Daratumumab)(Janssen/Genmab);CNT0-95(因特木单抗(Intetumumab),Janssen);CNT0-328(司妥昔单抗(siltuximab),Janssen);KB004(KaloBios);莫加珠单抗(mogamulizumab)(Kyowa Hakko Kirin);KW-2871(依克罗希单抗(ecromeximab),Life Science);索耐珠单抗(Sonepcizumab)(Lpath);马格妥昔单抗(Margetuximab)(Macrogenics);恩诺珠单抗(Enoblituzumab)(Macrogenics);MGD006(Macrogenics);MGF007(Macrogenics);MK-0646(达妥珠单抗(dalotuzumab),Merck);MK-3475(Merck);Sym004(Symphogen/Merck Serono);DI17E6(Merck Serono);MOR208(Morphosys);MOR202(Morphosys);Xmab5574(Morphosys);BPC-1C(恩司昔单抗(ensituximab),Precision Biologics);TAS266(Novartis);LFA102(Novartis);BHQ880(Novartis/Morphosys);QGE031(Novartis);HCD122(鲁卡木单抗(lucatumumab),Novartis);LJM716(Novartis);AT355(Novartis);OMP-21M18(登西珠单抗(Demcizumab),OncoMed);OMP52M51(Oncomed/GSK);OMP-59R5(Oncomed/GSK);凡替图单抗(vantictumab)(Oncomed/Bayer);CMC-544(奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin),Pfizer);PF-03446962(Pfizer);PF-04856884(Pfizer);PSMA-ADC(Progenics);REGN1400(Regeneron);REGN910(奈伐单抗(nesvacumab),Regeneron/Sanofi);REGN421(恩诺替单抗(enoticumab),Regeneron/Sanofi);RG7221,RG7356,RG7155,RG7444,RG7116,RG7458,RG7598,RG7599,RG7600,

RG7636, RG7450, RG7593, RG7596, DCDS3410A, RG7414 (帕萨妥珠单抗 (parsatuzumab)), RG7160 (英加妥珠单抗 (imgatuzumab)), RG7159 (奥比妥珠单抗 (obintuzumab)), RG7686, RG3638 (奥纳妥珠单抗 (onartuzumab)), RG7597 (Roche/Genentech); SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi); SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi), SGN-LIV1A (林妥珠单抗 (lintuzumab), Seattle Genetics); SGN-CD33A (Seattle Genetics); SGN-75 (伐妥珠单抗马弗多星 (vorsetuzumab mafodotin), Seattle Genetics); SGN-19A (Seattle Genetics) SGN-CD70A (Seattle Genetics); SEA-CD40 (Seattle Genetics); 替伊莫单抗 (Spectrum); MLN0264 (Takeda); 盖尼塔单抗 (ganitumab) (Takeda/Amgen); CEP-37250 (Teva); TB-403 (Thrombogenic); VB4-845 (Viventia); Xmab2512 (Xencor); Xmab5574 (Xencor); 尼妥珠单抗 (nimotuzumab) (YM Biosciences); 卡鲁单抗 (Carlumab) (Janssen); NY-ESO TCR (Adaptimmune); MAGE-A-10TCR (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics); KTE-C19 CAR (Kite Pharma); UCART19 (Cellestis); BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); ATTCK20 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); Onyx-015 (Onyx Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunwaybio); DNX-2401 (DNAtrix); VCN-01 (VCN Biosciences); Colo-Ad1 (PsiOxus Therapeutics); ProstAtak (Advantagene); Oncos-102 (Oncos Therapeutics); CG0070 (Cold Genesys); Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics); GL-ONC1 (Genelux); T-VEC (Amgen); G207 (Medigene); HF10 (Takara Bio); SEPREHVIR (HSV1716, Virttu Biologics); OrienX010 (OrienGene Biotechnology); Reolysin (Oncolytics Biotech); SVV-001 (Neotropix); Cacatak (CVA21, Viralytics); Alimta (Eli Lilly), 顺铂, 奥沙利铂 (oxaliplatin), 伊立替康 (irinotecan), 亚叶酸, 甲氨蝶呤, 环磷酰胺, 5-氟尿嘧啶, Zykadia (Novartis), Tafinlar (GSK), Xalkori (Pfizer), Iressa (AZ), Gilotrif (Boehringer Ingelheim), Tarceva (Astellas Pharma), Halaven (Eisai Pharma), 维利帕尼 (Veliparib) (Abbvie), AZD9291 (AZ), 阿来替尼 (Alectinib) (Chugai), LDK378 (Novartis), Genetespib (Synta Pharma), Tergenpumatucel-L (NewLink Genetics), GV1001 (Kael-GemVax), 替万替尼 (Tivantinib) (ArQule); 癌得星 (Cytoxan) (BMS); Oncovin (Eli Lilly); 阿霉素 (Adriamycin) (Pfizer); Gemzar (Eli Lilly); Xeloda (Roche); Ixempra (BMS); Abraxane (Celgene); Trelstar (Debiopharm); Taxotere (Sanofi); Nexavar (Bayer); IMMU-132 (Immunomedics); E7449 (Eisai); Thermodox (Celsion); Cometriq (Exellxis); Lonsurf (Taiho Pharmaceuticals); Camptosar (Pfizer); UFT (Taiho Pharmaceuticals); 和 TS-1 (Taiho Pharmaceuticals)。

[0250] 在一些实施方案中, 以登录号 NCIMB 42761 保藏的马氏巨球菌细菌菌株是本发明组合物中的唯一治疗活性剂。

[0251] 本发明人已鉴定, 来自巨球菌属的细菌菌株可特别有效地用于治疗或预防包括癌细胞外信号相关激酶 (ERK) 信号传导的癌症。细胞外信号相关激酶 (ERK) 是丝裂原激活蛋白 (MAP) 激酶途径中的下游效应子, 该途径是在所有真核生物中都高度保守的信号转导途径 [72]。MAP 激酶途径调节例如细胞增殖、分化、存活和凋亡的过程, 并且所述途径的异常激活与癌症发病机制密切相关。如在实施例所述, 施用包含巨球菌菌株的组合物可抑制癌细胞系中的 ERK 信号传导; 也就是说, 相对于总 ERK 蛋白, 降低磷酸化 ERK 的细胞水平。本发明

人还已鉴定,用巨球菌菌株进行处理可降低包括致癌ERK信号传导的癌细胞系的克隆源性存活,特别是在黑素瘤和结直肠癌细胞系中。本发明人还已鉴定,用巨球菌菌株进行处理可诱导微管相关蛋白2 (MAP2) 的基因表达,表明在治疗转移性癌症中具有特定效用。

[0252] 因此,在某些实施方案中,本发明提供了包含巨球菌属细菌菌株的组合物,其用于治疗或预防癌症的方法中,其中所述癌症包含致癌ERK信号传导。

[0253] 如本文所用,“致癌ERK信号传导”是指包括失调的细胞信号传导的癌症,例如经由MAP激酶途径的刺激非依赖性信号传导,其结果是ERK的过度活跃的信号传导 (ERK1或ERK2同工型,或两者),这会驱动增加的癌细胞增殖和/或存活。当在位置Thr202和Tyr204处磷酸化时,ERK1是有活性的 (即信号传导)。当在位置Thr173和Tyr185处磷酸化时,ERK 2是有活性的 (即信号传导)。因此,“致癌ERK信号传导”可能是由于存在 (功能突变获得) 中的致癌突变或MAP激酶途径的正调控因子的过表达,或 (功能突变丧失) 中的致癌突变或MAP激酶途径的负调控因子的表达下调引起的。

[0254] 包含致癌ERK信号传导的癌症可替代地定义为“展现”或“特征为”致癌ERK信号传导的癌症。包含致癌ERK信号传导的癌症可替代地定义为其中通过ERK信号传导“刺激”、“诱导”或“上调”恶性细胞的增殖和/或存活的癌症。包含致癌ERK的癌症可替代地定义为包含、展现或特征为“刺激非依赖性”ERK信号传导的癌症。

[0255] 相对于野生型蛋白质,“致癌突变”涵盖蛋白质中任何可促进癌细胞增殖和/或存活的氨基酸变异,包括但不限于取代 (包括单个氨基酸取代)、插入和/或缺失。如上所述,致癌突变可能是功能丧失或功能获得突变,这取决于MAP激酶途径中的蛋白质及其功能。“过表达”或“下调的表达”分别是指相对于非癌细胞,在癌细胞中蛋白质的表达增加或减少。

[0256] 因此,包含致癌ERK信号传导的癌症包括那些包含以下各者中的致癌突变或其过表达的癌症: BRAF、NRAS、ARAF、CRAF、EGFR、GRB2、SOS、HRAS、KRAS4A、KRAS4B、MEK1、MEK2、ERK1或ERK2; 例如BRAF、ARAF、CRAF、EGFR、GRB2、SOS、HRAS、MEK1、MEK2、ERK1或ERK2。这些蛋白质是MAP激酶途径的正调控因子 (即致癌蛋白) [72]。例如,癌症可在BRAF、NRAS、ARAF、CRAF、EGFR、GRB2、SOS、HRAS、MEK1、MEK2、ERK1或ERK2中包含致癌突变。

[0257] 包含致癌ERK信号传导的癌症还包括那些包含RSK、DUSP1、DUSP5、DUSP6或SPRY的致癌突变或表达下调 (上述致癌突变/过表达的替代或补充) 的癌症。这些蛋白质是MAP激酶途径的负调控因子 (即肿瘤抑制蛋白) [72]。

[0258] 可使用本发明的组合物治疗或预防任何包含致癌ERK信号传导的癌症,例如实体瘤或血液系统恶性肿瘤。此类癌症包括但不限于结直肠癌、黑素瘤、急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性髓系白血病、肾上腺皮质癌、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨肿瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、伯基特氏淋巴瘤、类癌肿瘤、宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞白血病、慢性骨髓增生性病症、皮肤T细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤因氏肉瘤、眼内黑素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤 (GIST)、生殖细胞瘤、儿童期视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、胰岛细胞癌、卡波西肉瘤、肾细胞癌、喉癌、白血病、淋巴瘤、间皮瘤、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺癌、咽癌、垂体腺瘤、浆细胞瘤、前列腺癌、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、肉瘤、睾丸癌、甲状

腺癌或子宫癌。

[0259] 包含致癌ERK信号传导的任何癌症都可通过包含巨球菌属细菌菌株的组合物进行治疗或预防,并且优选是结直肠癌、黑素瘤、前列腺癌、肺腺癌如非小细胞肺腺癌、胰腺癌、膀胱癌、白血病如毛细胞白血病或急性髓系白血病、神经胶质瘤、毛细胞星形细胞瘤、卵巢癌、乳头状或滤泡性甲状腺癌、精原细胞瘤、肝癌、骨髓增生异常综合征、肾癌或霍奇金病。

[0260] 在优选的实施方案中,本发明提供了包含巨球菌属细菌菌株的组合物,其用于治疗或预防在BRAF中包含致癌突变的癌症的方法,任选地其中所述癌症还包括BRAF的过表达。本发明人已鉴定,在包含致癌BRAF突变的癌细胞系中,特别是在结直肠癌和黑素瘤细胞系中的致癌BRAF V600E突变中,用巨球菌菌株处理可抑制克隆源性存活,抑制ERK信号传导并上调MAP2基因表达。因此,在优选的实施方案中,本发明还提供了包含巨球菌属细菌菌株的组合物,其用于治疗或预防在BRAF的600位上包含致癌突变、优选BRAF V600E的癌症的方法。在尤其优选的实施方案中,癌症是结直肠癌或黑素瘤。

[0261] 除了或代替BRAF的600位的致癌突变(例如V600E),所述癌症可包含选自BRAF K601E、G469A、G469V、L597R、K601N、G464V、N581S、L597Q、A598V、G464R、G466A或G469E的致癌突变;任选地其中所述癌症是结直肠癌。在另一个实施方案中,除了或代替V600E突变,所述癌症可包含选自BRAF V600K、V600R或V600D的致癌突变;任选地其中所述癌症是黑素瘤。

[0262] 在另一方面,本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株,其用于治疗结直肠癌如转移性结直肠癌的方法中。如实施例所示,本发明人已发现马氏巨球菌菌株可抑制结直肠癌细胞系中的克隆源性存活和ERK信号传导。

[0263] 在另一方面,本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株,其用于治疗黑素瘤如转移性黑素瘤的方法中。如实施例所示,本发明人已发现马氏巨球菌菌株可抑制黑素瘤细胞系中的克隆源性存活和ERK信号传导。此外,马氏巨球菌菌株在黑素瘤细胞系中诱导MAP2基因表达的能力表明了对转移性黑素瘤的特定功效。

[0264] 在优选的实施方案中,相对于包含巨球菌属细菌菌株的组合物的施用,同时、分别或依序施用BRAF抑制剂。优选地,BRAF抑制剂是BRAF^{V600E}的选择性抑制剂,其优选地选自维拉非尼、达拉非尼(Dabrafenib)或恩考芬尼(Encorafenib)。更优选地,BRAF抑制剂是维拉非尼。

[0265] 在另一方面,本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含巨球菌属的细菌菌株和BRAF抑制剂,优选以上定义的那些,其用于同时、分别或依序使用以治疗或预防癌症。

[0266] 在其它优选的实施方案中,相对于包含巨球菌属细菌菌株的组合物的施用,同时、分别或依序施用胞苷类似物。优选地,胞苷类似物选自氮杂胞苷-c、地西他滨或泽布拉林(Zebularine)。更优选地,胞苷类似物是氮杂胞苷-c。

[0267] 在另一方面,本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含巨球菌属的细菌菌株和胞苷类似物,优选以上定义的那些,其用于同时、分别或依序使用以治疗或预防癌症。

[0268] 在其它优选的实施方案中,相对于包含巨球菌属细菌菌株的组合物的施用,同时、分别或依序施用微管蛋白聚合抑制剂或微管蛋白解聚抑制剂。优选地,微管蛋白聚合抑制剂或微管蛋白解聚抑制剂选自太平洋紫杉醇(Paclitaxel)、阿伯沙星(Abraxane)、多西紫杉醇(Docetaxel)、埃博霉素(Epothilone)、(+)-海绵多羟基内酯((+)-Discodermolide)、秋水仙碱、康普瑞汀(Combretastatin)、2-甲氧基雌二醇、E7010、长春新碱、长春碱、长春瑞

滨(Vinorelbine)或长春氟宁(Vinflunine);更优选太平洋紫杉醇。

[0269] 在另一方面,本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含巨球菌属的细菌菌株和微管蛋白聚合抑制剂或微管蛋白解聚抑制剂,优选以上定义的那些,其用于同时、分别或依序使用以治疗或预防癌症。在另一方面,本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含巨球菌属的细菌菌株,其用于通过增加癌症对微管蛋白聚合或解聚抑制剂(优选以上定义的那些)的敏感性而用于癌症疗法中。

[0270] 在其它这样的实施方案中,本发明提供:

[0271] 1.一种包含巨球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防癌症的方法中,特别地,其中所述癌症包含致癌ERK信号传导。

[0272] 2.根据实施方案1所述使用的组合物,其中所述癌症包含BRAF、NRAS、ARAF、CRAF、EGFR、GRB2、SOS、HRAS、KRAS4A、KRAS4B、MEK1、MEK2、ERK1或ERK2中的致癌突变或其过表达。

[0273] 3.根据任何前述实施方案所述使用的组合物,其中所述癌症包含RSK、DUSP1、DUSP5、DUSP6或SPRY中的致癌突变或其表达下调。

[0274] 4.根据实施方案2所述使用的组合物,其中所述癌症包含BRAF、ARAF、CRAF、EGFR、GRB2、SOS、HRAS、MEK1、MEK2、ERK1或ERK2中的致癌突变或其过表达。

[0275] 5.根据实施方案2所述使用的组合物,其中所述癌症包含BRAF、NRAS、ARAF、CRAF、EGFR、GRB2、SOS、HRAS、MEK1、MEK2、ERK1或ERK2中的致癌突变。

[0276] 6.根据任何前述实施方案所述使用的组合物,其中所述癌症包含BRAF或NRAS中的致癌突变,任选地其中所述癌症还包括BRAF或NRAS的过表达。

[0277] 7.根据实施方案6所述使用的组合物,其中所述癌症包含BRAF中的致癌突变,任选地其中所述癌症还包括BRAF的过表达。

[0278] 8.根据实施方案7所述使用的组合物,其中所述癌症包含在BRAF的600位的致癌突变。

[0279] 9.根据实施方案6-8中任一项所述使用的组合物,其中所述癌症包含选自BRAF V600E、K601E、G469A、G469V、L597R、K601N、G464V、N581S、L597Q、A598V、G464R、G466A或G469E的致癌突变;任选地其中所述癌症是结直肠癌。

[0280] 10.根据实施方案6-8中任一项所述使用的组合物,其中所述癌症包含选自BRAF V600E、V600K、V600R或V600D的致癌突变;任选地其中所述癌症是黑素瘤。

[0281] 11.根据实施方案6-10中任一项所述使用的组合物,其中所述癌症包含致癌突变BRAF V600E。

[0282] 12.根据实施方案6-11中任一项所述使用的组合物,其中所述癌症包含致癌突变NRAS Q61R,任选地其中所述癌症是黑素瘤。

[0283] 13.根据任何前述实施方案所述使用的组合物,其中所述癌症选自结直肠癌,黑素瘤,前列腺癌,肺腺癌如非小细胞肺腺癌,胰腺癌,膀胱癌,白血病如毛细胞白血病或急性髓系白血病,神经胶质瘤,毛细胞星形细胞瘤,卵巢癌,乳头状或滤泡性甲状腺癌,精原细胞瘤,肝癌,骨髓增生异常综合征,肾癌或霍奇金病。

[0284] 14.根据任何前述实施方案所述使用的组合物,其中所述癌症是结直肠癌。

[0285] 15.根据实施方案1-13中任一项所述使用的组合物,其中所述癌症是黑素瘤。

[0286] 16.根据任何前述实施方案所述使用的组合物,其中所述细菌菌株是马氏巨球菌

菌种。

[0287] 17. 根据任何前述实施方案所述使用的组合物,所述组合物用于在癌症的治疗或预防中抑制ERK1和/或ERK2信号传导的方法中。

[0288] 18. 根据任何前述实施方案所述使用的组合物,所述组合物用于在癌症的治疗或预防中抑制ERK1和/或ERK2磷酸化的方法中。

[0289] 19. 根据任何前述实施方案所述使用的组合物,所述组合物用于在癌症的治疗或预防中诱导MAP2基因表达的方法中。

[0290] 20. 根据任何前述实施方案所述使用的组合物,所述组合物用于在癌症的治疗或预防中减小肿瘤大小、肿瘤生长,预防或抑制转移,或预防血管生成的方法中。

[0291] 21. 根据任何前述实施方案所述使用的组合物,所述组合物用于在癌症治疗中抑制转移的方法中。

[0292] 22. 根据任何前述实施方案所述使用的组合物,其中相对于所述组合物的施用,所述方法包括同时、分别或依序施用BRAF抑制剂。

[0293] 23. 根据实施方案22所述使用的组合物,其中所述BRAF选择性地抑制BRAF^{V600E},优选地其中所述BRAF抑制剂选自维拉非尼、达布拉非尼或恩考芬尼。

[0294] 24. 根据实施方案23所述使用的组合物,其中所述BRAF抑制剂是维拉非尼。

[0295] 25. 根据任何前述实施方案所述使用的组合物,其中相对于所述组合物的施用,所述方法包括同时、分别或依序施用胞苷类似物。

[0296] 26. 根据实施方案25所述使用的组合物,其中所述胞苷类似物选自氮杂胞苷-c、地西他滨或泽布拉林。

[0297] 27. 根据实施方案26所述使用的组合物,其中所述胞苷类似物是氮杂胞苷-c。

[0298] 28. 根据任何前述实施方案所述使用的组合物,其中相对于所述组合物的施用,所述方法包括同时、分别或依序施用微管蛋白聚合抑制剂或微管蛋白解聚抑制剂。

[0299] 29. 根据实施方案28所述使用的组合物,其中所述微管蛋白聚合抑制剂或微管蛋白解聚抑制剂选自太平洋紫杉醇、阿伯沙星、多西紫杉醇、埃博霉素、(+)-海绵多羟基内酯、秋水仙碱、康普瑞汀、2-甲氧基雌二醇、E7010、长春新碱、长春碱、长春瑞滨或长春氟宁。

[0300] 优选地,可以使用本发明的组合物(特别是那些包括马氏巨球菌菌种的细菌菌株的组合物)治疗或预防的包含致癌ERK信号传导的癌症包括但不限于结直肠癌,黑素瘤,前列腺癌,肺腺癌如非小细胞肺腺癌,胰腺癌,膀胱癌,白血病如毛细胞白血病或急性髓系白血病,神经胶质瘤,毛细胞性星形细胞瘤,卵巢癌,乳头状或滤泡性甲状腺癌,精原细胞瘤,肝癌,骨髓增生异常综合征,肾癌和霍奇金病。据报道,此类癌症包含过度活跃的MAP激酶途径(即致癌ERK信号传导)[72]。

[0301] 在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防包含BRAF或NRAS中的致癌突变的癌症,任选地其中所述癌症还包含BRAF或NRAS的过表达。优选地,本发明的组合物(特别是那些包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的组合物)用于治疗或预防包含BRAF中的致癌突变和任选的BRAF过表达的癌症。

[0302] BRAF中的致癌突变包括已在结直肠癌中鉴定的V600E、K601E、G469A、G469V、L597R、K601N、G464V、N581S、L597Q、A598V、G464R、G466A或G469E[73],并且本发明的组合物(特别是那些包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的组合物)可用于治疗或预防此类癌症。BRAF

中的其它致癌突变包括已在黑素瘤中鉴定的V600E、V600K、V600R或V600D[74]，并且本发明的组合物(特别是那些包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的组合物)可用于治疗或预防此类癌症。BRAF中的氨基酸根据UniProt条目P15056[75]进行编号(野生型BRAF)。

[0303] 在一个尤其优选的实施方案中，本发明的组合物(特别是那些包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的组合物)用于治疗或预防包含突变BRAF V600E的癌症。癌细胞系SKMEL28、451Lu和HT29在BRAF中包含此突变，并且在实施例中发现巨球菌菌株在此类细胞系中抑制克隆源性存活，抑制ERK信号传导并诱导MAP2基因表达。癌症还可包含致癌突变NRAS Q61R。癌细胞系SKMEL2在NRAS中包含该突变，并且在实施例中发现巨球菌菌株在该细胞系中诱导MAP2基因表达。

[0304] 实施例中使用的HT29细胞系是结直肠癌细胞系，并且发现巨球菌菌株在该细胞系中抑制克隆源性存活并抑制ERK信号传导。因此，在尤其优选的实施方案中，本发明的组合物(特别是那些包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的组合物)用于治疗或预防结直肠癌，例如包含突变BRAF V600E的结直肠癌。

[0305] 实施例中使用的SKMEL2和SKMEL28和451Lu细胞系是黑素瘤细胞系，并且发现巨球菌菌株在此类细胞系中抑制克隆源性存活，抑制ERK信号传导并诱导MAP2基因表达。因此，在尤其优选的实施方案中，本发明的组合物(特别是包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的组合物)用于治疗或预防黑素瘤，例如包含突变BRAF V600E的黑素瘤。

[0306] 在另一方面，本发明的组合物包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株，其用于治疗结直肠癌的方法中。在另一方面，本发明的组合物包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株，其用于治疗黑素瘤的方法中。

[0307] 在以上详述的任何方面和实施方案中，本发明的组合物(特别是包含马氏巨球菌菌种的细菌菌株的组合物)优选用于治疗转移性癌症。如在实施例中所报道，发现巨球菌菌株上调了MAP2基因表达。已发现MAP2在原发性皮肤黑素瘤中高表达，但在转移性黑素瘤中表达降低[76]。已提出增加微管稳定蛋白的表达或用微管稳定蛋白如MAP2处理可能会干扰细胞分裂过程中所需的微管的动态不稳定性。因此，据认为MAP2的上调阻碍了癌症中的细胞分裂并延迟了肿瘤生长[76]，表明本发明的组合物在治疗转移性癌症中可能具有特定用途。

[0308] 如实施例中所证实，包含巨球菌菌株的本发明组合物具有在黑素瘤和结直肠癌细胞系中诱导MAP2基因表达和抑制ERK信号传导的作用。因此，本发明的组合物可用于抑制ERK信号传导例如ERK1和/或ERK2信号传导的方法中，以治疗或预防如上文所定义的包含致癌ERK信号传导的癌症。本发明的组合物还可用于抑制ERK磷酸化例如ERK1和/或ERK2磷酸化的方法中，以治疗或预防此类癌症。本发明的组合物也可用于诱导MAP2基因表达的方法中以治疗或预防此类癌症。MAP2基因表达与提高对微管靶向化合物如太平洋紫杉醇的癌症敏感性有关[77]。因此，本发明的组合物可用于增加此类癌症对微管蛋白聚合或解聚抑制剂，特别是太平洋紫杉醇的敏感性。本发明的组合物还可用于在包含致癌ERK信号传导的癌症的治疗或预防中减小肿瘤大小，减少肿瘤生长，预防或抑制转移或预防血管生成的方法中。由于实施例中证实的对MAP2基因表达的作用，本发明的组合物优选用于在此类癌症的治疗中抑制转移的方法中。

[0309] 在另一方面，包含巨球菌属细菌菌株的组合物用于在癌症的治疗或预防中抑制

ERK1和/或ERK2信号传导的方法中。在另一方面,包含巨球菌属细菌菌株的组合物用于在癌症的治疗或预防中抑制ERK1和/或ERK2磷酸化的方法中。在另一方面,包含巨球菌属细菌菌株的组合物用于在癌症的治疗或预防中诱导MAP2基因表达的方法中。在所述其它方面,优选地,癌症的特征如上所述(“癌症及其特征”)。

[0310] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗小肠癌,例如小肠腺癌。实施例中所使用的甲氨蝶呤处理的HT29细胞系具有类似于小肠上皮细胞的表型,并且显示本发明的组合物对此类细胞具有有用的作用。在某些实施方案中,本发明的组合物用于促进细胞凋亡,以治疗或预防癌症,特别是小肠癌。

[0311] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于在癌症的治疗或预防中诱导GPR109a基因表达的方法中。

[0312] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于在癌症的治疗或预防中增加IL-8水平的方法中。

[0313] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗结直肠癌,例如结直肠腺癌。实施例中所使用的Caco-2细胞系是结直肠腺癌细胞系,并且显示本发明的组合物对此类细胞具有有用的作用。

[0314] 在某些实施方案中,所述组合物用于治疗或预防转移性黑素瘤、小细胞肺癌或腺鳞肺癌。实施例中所显示的对NSE的作用表明,本发明的组合物可能对这些癌症特别有效。

[0315] 在某些实施方案中,本发明的组合物不用于治疗癌症。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗并非癌症的疾病或病症。

[0316] 用作疫苗佐剂

[0317] 实施例表明,施用本发明的组合物可导致肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达增加。已知TNF- α 对于疫苗应答很重要。例如,已证实在老年群体的流感疫苗接种中,TNF- α 是有效疫苗应答所必需的[78]。由于显示出施用本发明的组合物可增加TNF- α 表达,因此本发明的组合物可用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加TNF- α 的水平和/或活性而用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作流感治疗中的疫苗佐剂。在某些实施方案中,本发明的组合物用于增强针对抗原的免疫应答。在某些实施方案中,本发明提供了与抗原组合施用的组合物。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在疫苗接种之前或之后不久施用于患者。

[0318] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致IL-6表达的增加。IL-6表达增加与许多疾病的疫苗应答相关。例如,在成人被施用流感疫苗后,CD14+CD16- 炎性单核细胞产生IL-6[79],并且更高水平的IL-6与实现对流感疫苗的疫苗应答相关[80]。此外,在注射AS03佐剂系统后产生IL-6[81],并且显示在施用结核病疫苗后小鼠中IL-6的下调可降低辅助T细胞反应[82]。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-6表达,因此本发明的组合物可用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,通过增加IL-6的水平和/或活性,本发明的组合物用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作结核病治疗中的疫苗佐剂。

[0319] 此外,已表明IL-6和TNF- α 表达与治疗性HIV疫苗[Huang等]、结核病疫苗和衣原体疫苗的功效相关[83]。Su等[84]显示与FMDV DNA疫苗一起接种IL-6或TNF- α 会导致CD4+和CD8+ T细胞的IFN- γ 表达增加,CD4+ T细胞中IL-4的表达更高以及抗原特异性细胞毒性反

应更高。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-6和TNF- α 的表达,因此本发明的组合物可用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加TNF- α 的水平和/或活性可用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-6的水平和/或活性可用作疫苗佐剂。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物可通过增加TNF- α 和IL-6的水平和/或活性而用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作HIV治疗中的疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作衣原体治疗中的疫苗佐剂。

[0320] 实施例表明,施用本发明的组合物可导致MIP-3 α 表达的增加。MIP-3 α 已显示出可增加对HIV疫苗的应答[85]。由于显示出施用本发明的组合物可增加MIP-3 α 表达,因此本发明的组合物可用作疫苗佐剂。

[0321] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致IL-1 β 表达的增加。Li等[86]显示佐剂氢氧化铝激活了IL-1 β 的分泌,并表明IL- β 本身可用作佐剂。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-1 β 表达,因此本发明的组合物可用作疫苗佐剂。实施例表明,施用本发明的组合物可增加CD8 $^{+}$ T细胞与Treg的比率。已显示出佐剂可刺激CD8 $^{+}$ T细胞[87],并且由于显示出施用本发明的组合物可增加CD8 $^{+}$ T细胞与Treg的比率,因此本发明的组合物可用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加CD8 $^{+}$ T细胞与Treg的比率而用作疫苗佐剂。

[0322] 实施例还表明,施用本发明的组合物可导致IL-8表达的增加。IL-8表达的增加与许多疾病的疫苗应答相关。例如,更高水平的IL-8与实现对禽流感疫苗的疫苗应答相关[88]。此外,IL-8在DNA疫苗接种模型中充当分子佐剂[89]。因此,IL-8可用作免疫刺激剂以增强例如禽流感疫苗的免疫效率。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-8表达,因此本发明的组合物可用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-8的水平和/或活性而用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作流感治疗中的疫苗佐剂。在一些实施方案中,当用作疫苗佐剂时,本发明的组合物将独立施用以提供对已单独施用于患者的抗原的佐剂作用。在某些实施方案中,本发明的组合物是经口施用的,而抗原是肠胃外注射的。

[0323] 本发明的组合物可用于增强对任何有用抗原的免疫应答。用于本发明的示例性抗原包括:病毒抗原,例如病毒表面蛋白;细菌抗原,例如蛋白质和/或糖抗原;真菌抗原;寄生虫抗原;和肿瘤抗原。本发明特别适用于针对以下的疫苗:流感病毒,HIV,钩虫,乙型肝炎病毒,单纯疱疹病毒,狂犬病,呼吸道合胞病毒,巨细胞病毒,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),衣原体,SARS冠状病毒,水痘带状疱疹病毒,肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*),脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*),结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*),炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*),爱泼斯坦巴尔病毒(Epstein Barr virus),人乳头瘤病毒等。用于本发明的其它抗原包括糖蛋白和脂聚糖抗原,古细菌抗原,黑素瘤抗原E (MAGE),癌胚抗原(CEA),MUC-1,HER2,唾液酸-Tn (STn),人端粒酶逆转录酶(hTERT),威尔姆斯瘤(Wilms tumour)基因(WT1),CA-125,前列腺特异性抗原(PSA),爱泼斯坦-巴尔病毒抗原,新抗原,致癌蛋白, β 淀粉样蛋白,Tau,PCSK9和习惯形成物质,例如尼古丁、酒精或鸦片。

[0324] 用于本发明的优选抗原包括病原体抗原和肿瘤抗原。抗原将引发对该抗原具有特异性的免疫应答,该免疫应答可有效防止病原体感染或攻击肿瘤。抗原可以是例如肽或多

糖。

[0325] 本发明还提供以下用途：(i) 抗原的水性制剂；和(ii) 包含巨球菌属(优选马氏巨球菌菌种)的细菌菌株的组合物，其用于制造用于提高患者的免疫应答的药物。

[0326] 通过这些方法和用途引起的免疫应答通常包括抗体应答，优选是保护性抗体应答。

[0327] 在一些实施方案中，巨球菌属的细菌菌株被工程改造以呈递抗原。在本发明的细菌菌株上呈递抗原可最大化免疫刺激活性并进一步增强针对抗原产生的保护性免疫应答。另外，与分别制造和施用各抗原和包含细菌菌株的组合物时相比，以这种方式制造和递送包含本发明的抗原和细菌的治疗剂可能更高效和有效。因此，在一些实施方案中，本发明提供了包含巨球菌属细菌菌株的组合物，该细菌菌株例如在其细胞表面上呈递抗原。在一些实施方案中，包含呈递抗原的细菌菌株的组合物用作疫苗抗原。在一些实施方案中，抗原衍生自HIV、钩虫、乙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒、狂犬病、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒、金黄色葡萄球菌、衣原体、SARS冠状病毒、水痘带状疱疹病毒、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌、炭疽芽孢杆菌、爱泼斯坦巴尔病毒或人乳头瘤病毒。在一些实施方案中，抗原是糖蛋白抗原、脂聚糖抗原、古细菌抗原、黑素瘤抗原E (MAGE)、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、HER2、唾液酸-Tn (STn)、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、威尔姆斯瘤基因(WT1)、CA-125、前列腺特异性抗原(PSA)、爱泼斯坦-巴尔病毒抗原、新抗原、致癌蛋白、β淀粉样蛋白、Tau、PCSK9或习惯形成物质，例如酒精、鸦片等。

[0328] 在一些实施方案中，本发明的细菌表达一种或多种抗原。通常，抗原将重组表达并将与本发明的细菌异源。因此，本发明提供了表达异源抗原的巨球菌属细菌菌株。抗原可以是融合多肽的一部分，该融合多肽用一种或多种与细菌同源的多肽表达。在一些实施方案中，细菌将抗原表达为非融合多肽。在一些实施方案中，本发明提供了一种包含巨球菌属细菌菌株的细胞的组合物，其中所述细胞表达异源抗原。在一些实施方案中，所述组合物用作疫苗。在一些实施方案中，本发明提供了巨球菌属细菌菌株的细胞，其中所述细胞表达异源抗原。在一些实施方案中，所述细胞用作疫苗。

[0329] 用于本发明的示例性抗原包括：病毒抗原，例如病毒表面蛋白；细菌抗原，例如蛋白质和/或糖抗原；真菌抗原；寄生虫抗原；和肿瘤抗原。在巨球菌属细菌菌株中表达的其它抗原包括糖蛋白和脂聚糖抗原、古细菌抗原、黑素瘤抗原E (MAGE)、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、HER2、唾液酸-Tn (STn)、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、威尔姆斯瘤基因(WT1)、CA-125、前列腺特异性抗原(PSA)、爱泼斯坦-巴尔病毒抗原、新抗原、致癌蛋白、β淀粉样蛋白、Tau、PCSK9和习惯形成物质，例如尼古丁、酒精、鸦片等。

[0330] 本发明还可用于增强针对非传染性疾病如阿尔茨海默病和其它神经退行性病症的疫苗的应答，在这种情况下，用于本发明的抗原可以是β淀粉样蛋白或Tau。用于非传染性疾病的其它此类抗原包括PCSK9(用于治疗胆固醇升高)。

[0331] 本发明还可用于增强针对习惯形成物质例如尼古丁、酒精或鸦片的疫苗的应答。

[0332] 细胞疗法

[0333] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)疗法

[0334] 实施例还表明，施用本发明的组合物可导致IL-6表达的增加。IL-6表达的增加与慢性淋巴细胞白血病的CD19 CAR-T疗法的反应相关。血清IL-6的增加与CAR-T细胞扩张相

关,而IL-6的抑制与CAR-T细胞增殖相关[90]。由于显示出施用本发明的组合物可增加IL-6表达,因此本发明的组合物可用于细胞疗法,特别是CAR-T细胞疗法。在一个实施方案中,本发明的组合物用于细胞疗法。在一个实施方案中,本发明的组合物用于CAR-T细胞疗法。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗慢性淋巴细胞白血病。

[0335] 令人惊讶的是,实施例还表明,施用本发明的组合物选择性地减少了PBMC群体中Treg的百分比(图6C)。已表明,选择性消耗Treg可增强细胞毒性淋巴细胞的功效[91]。CAR-T细胞是细胞毒性淋巴细胞的子集,因此,认为Treg的选择性消耗在CAR-T细胞疗法中有效。由于显示出本发明组合物的施用消耗了Treg,因此本发明的组合物可用于细胞疗法,特别是CAR-T细胞疗法。

[0336] 因此,本发明的组合物可用于细胞疗法,特别是用于增强对细胞疗法的反应。

[0337] 间充质干细胞(MSC)疗法

[0338] 据报道,间充质干细胞(MSC)疗法具有免疫刺激特性。当用LPS处理MSC时,它们会上调促炎性细胞因子IL-6和IL-8,从而导致B细胞增殖增加[92]。因此,由于显示出本发明的组合物增加IL-6的表达,因此它们可与MSC细胞疗法组合使用。

[0339] 干细胞移植疗法

[0340] 据报道,并非在干细胞移植疗法中使用未分化的干细胞,在移植前一定程度上分化干细胞可能是有益的。例如,Heng等[93]报道,通过具有更高的植入效率、增强的心肌细胞再生和增加的心脏功能恢复,干细胞的心肌向分化可能是有益的。由于本发明的组合物的施用在未分化的神经母细胞瘤细胞中启动了神经元分化,因此本发明的组合物可用于干细胞移植疗法中的干细胞分化。

[0341] 免疫衰老

[0342] 实施例还表明,施用本发明的组合物可选择性地消耗Treg并增加B细胞数量(图6C和图6F)。Fulop等[94]鉴定出Treg细胞数量的增加和B细胞数量的减少与适应性免疫系统的衰老相关。因此,本发明的组合物可用于预防或延迟免疫衰老。在一个实施方案中,本发明的组合物用于预防免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于延迟以Treg细胞数量增加为特征的免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于延迟以B细胞数量减少为特征的免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于延迟以Treg细胞数量增加和B细胞数量减少为特征的免疫衰老。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过减少Treg细胞数量来延迟免疫衰老。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过增加B细胞数量来延迟免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于通过减少Treg细胞数量和增加B细胞数量来延迟免疫衰老。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗由免疫衰老引起的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于通过延迟和/或预防免疫衰老来治疗与衰老相关的疾病。

[0343] 此外,已提出疫苗佐剂可克服免疫衰老[95]。由于本发明的组合物适合用作疫苗佐剂,因此本发明的组合物可用于预防或延迟免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物作为疫苗佐剂用于延迟和/或预防免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物用作疫苗佐剂,其中所述组合物延迟和/或预防免疫衰老。

[0344] 与免疫衰老相关的疾病包括心血管疾病、神经退行性疾病如阿尔茨海默病和帕金森病、癌症、2型糖尿病[96]和自身免疫性病症[97]。在一个实施方案中,本发明的组合物用

于治疗心血管疾病。在一个实施方案中，本发明的组合物用于通过延迟和/或预防免疫衰老来治疗心血管疾病。在一个实施方案中，本发明的组合物用于治疗神经退行性疾病。在一个实施方案中，本发明的组合物用于通过延迟和/或预防免疫衰老来治疗神经退行性疾病，特别是阿尔茨海默病和帕金森病。在一个实施方案中，本发明的组合物用于通过延迟和/或预防免疫衰老来治疗癌症。在一个实施方案中，本发明的组合物用于治疗2型糖尿病。在一个实施方案中，本发明的组合物用于通过延迟和/或预防免疫衰老来治疗2型糖尿病。在一个实施方案中，本发明的组合物用于治疗自身免疫性病症。在一个实施方案中，本发明的组合物用于通过延迟和/或预防免疫衰老来治疗自身免疫性病症。

[0345] 施用模式

[0346] 优选地，将本发明的组合物施用于胃肠道，以便能够用本发明的细菌菌株递送至肠道和/或部分或全部定殖于肠道。通常，本发明的组合物是经口施用的，但是它们可经直肠、鼻内或经颊或舌下途径施用。

[0347] 在某些实施方案中，本发明的组合物可以泡沫、喷雾剂或凝胶剂的形式施用。

[0348] 在某些实施方案中，本发明的组合物可以作为栓剂例如直肠栓剂，例如呈可可油（可可脂）、合成硬脂（例如suppocire、witepsol）、甘油-明胶、聚乙二醇或皂甘油组合物的形式施用。

[0349] 在某些实施方案中，本发明的组合物通过管（例如鼻胃管、口胃管、胃管、空肠造瘘管（J管）、经皮内窥镜胃造口术（PEG）或端口（例如提供到胃的路径的胸壁端口、空肠或其它合适的路径端口）来施用到胃肠道。

[0350] 本发明的组合物可以一次施用，或者它们可作为治疗方案的一部分依序施用。在某些实施方案中，本发明的组合物有待每天施用。

[0351] 在本发明的某些实施方案中，根据本发明的治疗伴随着对患者肠道微生物群的评估。如果未能实现本发明菌株的递送和/或部分或全部定殖而使得未观察到功效，则可重复治疗；或者如果递送和/或部分或全部定殖成功并且观察到功效，则可停止治疗。

[0352] 在某些实施方案中，可将本发明的组合物施用于怀孕的动物，例如哺乳动物，例如人，以降低子宫内和/或出生后孩子体内发生癌症的可能性。

[0353] 本发明的组合物可施用于已被诊断出患有疾病或疾患介导的免疫活性降低的患者，或者已被鉴定为处于存在由免疫活性降低介导的疾病或疾患的风险中的患者。所述组合物也可作为预防措施来施用，以预防健康患者中由免疫活性降低介导的疾病或疾患的发展。

[0354] 本发明的组合物可施用于已被诊断出患有癌症或已被鉴定为具有癌症风险的患者。例如，患者可能具有降低或不存在的巨球菌并且特别是马氏巨球菌的定殖。

[0355] 本发明的组合物可作为食物产品例如营养补充剂施用。

[0356] 通常，本发明的组合物用于治疗人类，但它们可用于治疗动物，包括单胃哺乳动物，例如家禽、猪、猫、狗、马或兔子。本发明的组合物可用于增强动物的生长和性能。如果施用于动物，则可使用管饲法。

[0357] 组合物

[0358] 通常，本发明的组合物包含细菌。在本发明的优选实施方案中，将组合物配制成冷冻干燥形式。例如，本发明的组合物可包含颗粒或明胶胶囊，例如硬明胶胶囊，其包含本发

明的细菌菌株。

[0359] 优选地,本发明的组合物包含冻干细菌。细菌的冻干是一种公认程序,并且相关指南可在例如参考文献[98, ,100]中获得。

[0360] 或者,本发明的组合物可包含活的活性细菌培养物。

[0361] 在优选的实施方案中,将本发明的组合物封装以使细菌菌株能够递送至肠。封装可保护组合物免于降解,直至例如通过用化学或物理刺激(例如压力、酶活性或可通过pH变化触发的物理崩解)而破裂来递送在目标位置。可使用任何适当的封装方法。示例性的封装技术包括捕集在多孔基质内,附着或吸附在固体载体表面上,通过絮凝自聚集或与交联剂聚集,以及在微孔膜或微胶囊后的机械容纳。关于可用于制备本发明组合物的封装的指导可在例如参考文献[101]和[102]中获得。

[0362] 所述组合物可经口施用,并且可以是片剂、胶囊剂或散剂的形式。封装产品是优选的,因为巨球菌是厌氧菌。可包括其它成分(例如维生素C)作为除氧剂和益生元底物,以改善体内的递送和/或部分或全部定殖和存活。或者,本发明的益生菌组合物可作为食物或营养产品例如基于乳或乳清的发酵乳制品或作为药物产品经口施用。

[0363] 所述组合物可配制成益生菌。

[0364] 本发明的组合物包括治疗有效量的本发明的细菌菌株。治疗有效量的细菌菌株足以对患者发挥有益作用。治疗有效量的细菌菌株可能足以导致向患者肠道的递送和/或部分或全部定殖。

[0365] 例如,对于成年人,细菌的合适的日剂量可为约 1×10^3 至约 1×10^{11} 个菌落形成单位(CFU);例如,约 1×10^7 至约 1×10^{10} 个CFU;在另一个实例中约 1×10^6 至约 1×10^{10} 个CFU;在另一个实例中约 1×10^7 至约 1×10^{11} 个CFU;在另一个实例中约 1×10^8 至约 1×10^{10} 个CFU;在另一个实例中约 1×10^8 至约 1×10^{11} 个CFU。

[0366] 在某些实施方案中,细菌的剂量为每天至少 10^9 个细胞,例如每天至少 10^{10} 个、至少 10^{11} 个或至少 10^{12} 个细胞。

[0367] 在某些实施方案中,相对于组合物的重量,所述组合物包含的细菌菌株的量为约 1×10^6 至约 1×10^{11} CFU/g;例如,约 1×10^8 至约 1×10^{10} CFU/g。剂量可以是例如1g、3g、5g和10g。

[0368] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中细菌菌株的量相对于组合物的重量为每克约 1×10^3 至约 1×10^{11} 个菌落形成单位。

[0369] 在某些实施方案中,本发明提供上述药物组合物,其中所述组合物以500mg至1000mg、600mg至900mg、700mg至800mg、500mg至750mg或750mg至1000mg的剂量施用。在某些实施方案中,本发明提供上述药物组合物,其中所述药物组合物中的冻干细菌以500mg至1000mg、600mg至900mg、700mg至800mg、500mg至750mg或750mg至1000mg的剂量施用。

[0370] 通常,益生菌,例如本发明的组合物,任选地与至少一种合适的益生元化合物组合。益生元化合物通常是不可消化的碳水化合物,例如寡糖或多糖或糖醇,其在上消化道中不会降解或吸收。已知的益生元包括商业产品,例如菊粉和反式半乳糖寡糖。

[0371] 在某些实施方案中,本发明的益生菌组合物包含益生元化合物,其量相对于组合物总重量为约1至约30重量%(例如5至20重量%)。碳水化合物可选自由以下组成的组:低聚果糖(或FOS),短链低聚果糖,菊粉,异麦芽寡糖,果胶,木寡糖(或XOS),壳聚糖寡糖(或

COS), β -葡聚糖, 阿拉伯树胶改性和抗性淀粉, 聚右旋糖, D-塔格糖, 阿拉伯胶纤维, 角豆, 燕麦和柑桔纤维。在一个方面, 益生元是短链果糖寡糖(为简单起见, 在下文中显示为FOSs-c.c.); 所述FOSs-c.c.是不可消化的碳水化合物, 通常通过甜菜糖的转化而获得, 并且包括与三个葡萄糖分子结合的蔗糖分子。

[0372] 本发明的组合物可包含药学上可接受的赋形剂或载体。此类合适的赋形剂的实例可见于参考文献[103]中。用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂在制药领域是众所周知的, 并且例如描述于参考文献[104]中。合适的载体的实例包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇、山梨糖醇等。合适的稀释剂的实例包括乙醇、甘油和水。可关于预期的施用途和标准药学实践选择药物载体、赋形剂或稀释剂。药物组合物可包含任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂作为载体、赋形剂或稀释剂, 或除载体、赋形剂或稀释剂外还包含任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂。合适的粘合剂的实例包括淀粉, 明胶, 天然糖例如葡萄糖、无水乳糖、自由流动乳糖、 β -乳糖, 玉米甜味剂, 天然和合成树胶例如阿拉伯胶、黄蓍胶或藻酸钠, 羧甲基纤维素和聚乙二醇。合适的润滑剂的实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。可在药物组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可以使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0373] 本发明的组合物可配制成食物产品。例如, 除了本发明的治疗效果外, 食物产品还可提供营养益处, 例如呈营养补充剂的形式。类似地, 可配制食物产品来增强本发明组合物的味道或通过与普通食物而不是药物组合物更相似来使组合物更具消费吸引力。在某些实施方案中, 本发明的组合物被配制成乳基产品。术语“乳基产品”是指具有变化的脂肪含量的任何基于液体或半固体的乳或乳清基产品。乳基产品可以是例如牛奶, 山羊奶, 绵羊奶, 脱脂奶, 全脂奶, 由奶粉和乳清复合而成的未经任何加工的奶, 或经过加工的产品, 例如酸乳酪、凝固乳、凝乳、酸奶、酸味全脂奶、酪乳和其它酸奶产品。另一重要组包括乳饮料, 例如乳清饮料、发酵乳、炼乳、婴儿或幼儿乳; 调味乳, 冰淇淋; 含乳食物, 例如糖果。

[0374] 在某些实施方案中, 本发明的组合物包含单个细菌菌株或菌种, 并且不包含任何其它细菌菌株或菌种。这样的组合物可仅包含极少量或生物学上不相关量的其它细菌菌株或菌种。这样的组合物可以是基本上不含其它生物物种的培养物。

[0375] 根据本发明使用的组合物可能需要或可能不需要市场批准。

[0376] 在一些情况下, 在施用前将冻干的细菌菌株重构。在一些情况下, 通过使用本文所述的稀释剂进行重构。

[0377] 本发明的组合物可包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0378] 在某些实施方案中, 本发明提供了一种药物组合物, 所述药物组合物包含: 本发明的细菌菌株; 和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂; 其中所述细菌菌株的量为当施用于有需要的受试者时足以治疗病症; 并且其中所述病症是癌症, 例如神经母细胞瘤、脑癌、黑色素瘤、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌或胃癌。在另一个实施方案中, 所述癌症是卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤或血液系统恶性肿瘤。

[0379] 在某些实施方案中, 本发明提供了药物组合物, 所述药物组合物包含: 本发明的细菌菌株; 和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂; 其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由MAP2介导的疾病或疾患。在优选的实施方案中, 所述疾病或疾患是癌症, 例如神经母细胞

瘤、脑癌、黑素瘤、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌或胃癌。在另一个实施方案中,所述癌症是卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤或血液系统恶性肿瘤。

[0380] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由B3微管蛋白介导的疾病或疾患。在优选的实施方案中,所述疾病或疾患是癌症,例如神经母细胞瘤、脑癌、黑素瘤、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌或胃癌。在另一个实施方案中,所述癌症是卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤或血液系统恶性肿瘤。

[0381] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由DRD2介导的疾病或疾患。在优选的实施方案中,所述疾病或疾患是癌症,例如神经母细胞瘤、脑癌、黑素瘤、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌或胃癌。在另一个实施方案中,所述癌症是卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤或血液系统恶性肿瘤。

[0382] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由HDAC介导的疾病或疾患。在优选的实施方案中,所述疾病或疾患是癌症,例如神经母细胞瘤、脑癌、黑素瘤、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌或胃癌、卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤或血液系统恶性肿瘤。

[0383] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由促炎性细胞因子例如IL-1 β 、TNF- α 、MIP-3 α 、IL-23或IL-6介导的疾病或疾患。在一个优选的实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由TNF- α 介导的疾病或疾患。在一个优选的实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由IL-8介导的疾病或疾患。在一个优选的实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由CD11b介导的疾病或疾患。在优选的实施方案中,所述疾病或疾患是癌症,例如神经母细胞瘤、脑癌、黑素瘤、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌或胃癌。在另一个实施方案中,所述癌症是卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤或血液系统恶性肿瘤。

[0384] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由Casp3介导的疾病或疾患。在优选的实施方案中,所述疾病或疾患是癌症,例如神经母细胞瘤、脑癌、黑素瘤、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌或胃癌。在另一个实施方案中,所述癌症是卵巢癌、宫颈癌、胶质母细胞瘤、癌瘤、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤或血液系统恶性肿瘤。

[0385] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中细菌菌株的量相对于组合物的重量为每克约 1×10^3 至约 1×10^{11} 个菌落形成单位。

[0386] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述组合物以1g、3g、5g或10g的剂量施用。

[0387] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述组合物通过选自由口服、直肠、皮下、经鼻、经颊和舌下组成的组的方法施用。

[0388] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,所述药物组合物包含选自由乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇和山梨糖醇组成的组的载体。

[0389] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,所述药物组合物包含选自由乙醇、甘油和水组成的组的稀释剂。

[0390] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,所述药物组合物包含选自由以下组成的组的赋形剂:淀粉、明胶、葡萄糖、无水乳糖、自由流动乳糖、 β -乳糖、玉米甜味剂、阿拉伯胶、黄蓍胶、藻酸钠、羧甲基纤维素、聚乙二醇、油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠和氯化钠。

[0391] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,所述药物组合物还包含防腐剂、抗氧化剂和稳定剂中的至少一种。

[0392] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,所述药物组合物包含选自由苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯组成的组的防腐剂。

[0393] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述细菌菌株是冻干的。

[0394] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中当将所述组合物在约4℃或约25℃下储存在密封容器中并且将所述容器放置在具有50%相对湿度的气氛中时,至少80%的细菌菌株(如以菌落形成单位计量)在至少约1个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年的时期后仍然存在。

[0395] 培养方法

[0396] 用于本发明的细菌菌株可使用例如参考文献[105,107]中详述的标准微生物学技术来培养。

[0397] 用于培养的固体或液体培养基可以是YCFA琼脂或YCFA培养基。YCFA培养基可包括(每100ml,近似值):酪胨(1.0g)、酵母提取物(0.25g)、 NaHCO_3 (0.4g)、半胱氨酸(0.1g)、 K_2HPO_4 (0.045g)、 KH_2PO_4 (0.045g)、 NaCl (0.09g)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.09g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.009g)、 CaCl_2 (0.009g)、刃天青(0.1mg)、血红素(1mg)、生物素(1 μg)、钴胺素(1 μg)、对氨基苯甲酸(3 μg)、叶酸(5 μg)和吡多胺(15 μg)。

[0398] 用于疫苗组合物中的细菌菌株

[0399] 本发明人已鉴定,本发明的细菌菌株可用于治疗或预防与免疫活性降低相关的疾病或疾患。这可能是本发明的细菌菌株对宿主免疫系统产生作用的结果。因此,当作为疫苗组合物施用时,本发明的组合物还可用于预防疾病或疾患例如癌症。在某些这样的实施方案中,本发明的细菌菌株可被杀死、灭活或减毒。在某些这样的实施方案中,所述组合物可包含疫苗佐剂。在某些实施方案中,所述组合物用于通过注射,例如通过皮下注射施用。

[0400] 在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株降低了甲酸的水平。甲酸是甲酸盐的共轭碱,其与通过抑制细胞色素氧化酶活性(电子传递链的末端电子受体)破坏线粒体

电子传递和能量产生相关。因此,甲酸和从而甲酸盐的减少将通过任何一种细胞色素氧化酶抑制活性氧的积累而降低细胞死亡的发生率。因此,在某些实施方案中,马氏巨球菌菌种的细菌菌株通过降低甲酸的水平而在疾病治疗中刺激免疫系统。

[0401] 总则

[0402] 除非另有说明,否则本发明的实施将采用本领域技术范围内的常规化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药理学方法。文献中对这些技术进行了充分的解释。参见例如参考文献[108]和[109,115]等。

[0403] 术语“包含”涵盖“包括”以及“组成”,例如“包含”X的组合物可仅由X组成或者可包括额外的事物,例如X+Y。

[0404] 关于数值x的术语“约”是任选的并且是指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0405] 词语“基本上”不排除“完全”,例如“基本上不含”Y的组合物可完全不含Y。必要时,词语“基本上”可从本发明的定义中省略。

[0406] 对两个核苷酸序列之间的序列同一性百分比的引用意指当比对时,所述百分比的核苷酸在比较两个序列时是相同的。这种比对和同源性或序列同一性百分比可使用本领域中已知的软件程序,例如参考文献[116]的章节7.7.18中所述的那些来确定。优选的比对是通过Smith-Waterman同源性搜寻算法使用空位开放罚分12和空位扩展罚分2、BLOSUM矩阵62进行仿射空位搜寻来确定。Smith-Waterman同源性搜寻算法在参考文献[117]中公开。

[0407] 除非另有规定,否则包括众多步骤的工艺或方法可在方法开始或结束时包括额外步骤,或者可包括额外中间步骤。此外,适当时,步骤可组合、省略或以替代性次序进行。

[0408] 本文描述本发明的各种实施方案。应了解,每个实施方案中指定的特征可与其它指定特征组合,以提供另外的实施方案。特别是,本文中突出强调为合适、典型或优选的实施方案可彼此组合(除非它们相互排斥)。

[0409] 本发明的实施方式

[0410] 实施例1-MRx0029在SH-SY5Y细胞中诱导成熟表型

[0411] 引言

[0412] 本发明人试图鉴定MRx0029对神经母细胞瘤细胞中神经分化标志物 $\beta 3$ 微管蛋白和MAP2表达的影响。 $\beta 3$ 微管蛋白是神经元预分化的标志物并且MAP2是成熟(分化)神经元的标志物。

[0413] 细菌菌株

[0414] 马氏巨球菌MRx0029

[0415] 细胞系

[0416] SH-SY5Y细胞

[0417] 方法

[0418] qPCR

[0419] 将SH-SY5Y铺在10cm培养皿中,密度为 2×10^6 个细胞。24小时后,将细胞在含有10%细菌上清液或YCFA+、10uM RA、200uM己酸或200uM丙戊酸的分化培养基(含有1%FBS的无RA的生长培养基)中处理17小时。其后,使用相差EVOS XL核心显微镜以40X/0.65的放大倍率拍摄代表性图像。收集细胞,并根据RNeasy微型试剂盒方案(Qiagen)分离总RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)制备cDNA。使用qPCR测量基因表达。GAPDH用作

内部对照。根据 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 方法计算倍数变化。

[0420] 免疫标记和细胞成像

[0421] 将细胞以 5×10^4 个细胞/孔的密度接种到8孔室载玻片(Marienfeld Laboratory Glassware)上过夜,并用10%细菌上清液处理24小时。为了分化,将细胞用10nM RA处理5天,然后用无细胞细菌上清液处理24小时。

[0422] 然后,将细胞在室温(RT)下用PBS中的4%多聚甲醛固定20分钟。固定的细胞用PBS洗涤,并用PBS中的1%Triton X-100渗透10分钟。用PBS洗涤后,将载玻片与封闭缓冲液(4%BSA/PBS)在室温下温育1小时,然后添加在1%BSA/PBS中稀释的抗MAP2抗体或 β 3-微管蛋白(分别为sc-74421和sc-80005,Santa Cruz Biotechnology Inc),在4℃下持续12小时。然后将它们用PBS洗涤两次,接着与Alexa Flour 488偶联的抗小鼠(Molecular Probes Inc)和Alexa Flour 594偶联的鬼笔环肽(ab176757,Abcam)在室温下温育1小时。用PBS洗涤3次后,将载玻片用DAPI染色并用Vectashield®(Vector Laboratories)固定。使用配备有63x/1.2W Korr物镜的Axioskop 50显微镜(Zeiss)和适合检测所用荧光染料的滤光片组观察载玻片。数字获取用MAP-2免疫标记的图像的手动曝光时间保持恒定,从而允许比较不同的孔和处理。鬼笔环肽(F-肌动蛋白)和DAPI曝光时间改变以适合视野。使用由Image Pro Plus软件控制的QImaging相机获取随机化视野。图像保存为TIFF文件,并在Adobe Photoshop CC 2015.1.2中打开。然后将MAP-2、DAPI和鬼笔环肽图像叠加并合并。选择代表性图像以说明所检查蛋白质的丰度和位置的差异。

[0423] 免疫印迹

[0424] SH-SY5Y细胞在上述指示条件下培养,用MRx0029处理24小时,然后在含有蛋白酶抑制剂混合液(Roche Diagnostics,英国)的RIPA缓冲液中裂解。使用BCA蛋白测定试剂盒(Pierce Biotechnology,伊利诺伊州罗克福德)估算蛋白质浓度,通过SDS-PAGE分离并转移至PVDF膜上。然后将膜用5%脱脂奶粉或5%BSA封闭,并在4℃与初级抗体(分别为MAP2和 β 3-微管蛋白)一起温育过夜。然后将印迹与适当的辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二级抗体温育,并通过化学发光检测试剂盒(Pierce Biotechnology,伊利诺伊州罗克福德)检测蛋白质。对于MAP2和 β 3-微管蛋白, β -肌动蛋白用作对照来监测样品中蛋白质的负载变化。

[0425] 结果

[0426] MRx0029诱导未分化的神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞中 β 3微管蛋白的表达。图1显示,与未处理的SH-SY5Y细胞相比,用MRx0029处理可增加 β 3微管蛋白的表达。

[0427] MRx0029诱导未分化的神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞中MAP2的表达。图2显示,与未处理的SH-SY5Y细胞相比,用MRx0029处理显著增加了MAP2的表达。

[0428] 讨论

[0429] 结果表明,MRx0029可能是促进分化,特别是神经元分化的有效成分。此外,结果表明,MRx0029可能是治疗脑癌,特别是神经母细胞瘤,和黑素瘤,特别是转移性黑素瘤的有效成分。

[0430] 实施例2-MRx0029降低SH-SY5Y细胞中的DRD2表达

[0431] 引言

[0432] 本发明人试图鉴定MRx0029对神经母细胞瘤细胞中的DRD2表达的影响。

[0433] 细菌菌株

[0434] 马氏巨球菌MRx0029

[0435] 细胞系

[0436] SH-SY5Y细胞

[0437] 方法

[0438] 本发明人使用与实施例1中所述相同的方法测量了神经母细胞瘤细胞中DRD2表达的变化。

[0439] 结果

[0440] MRx0029降低神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞中DRD2的表达。图3显示,与未处理的SH-SY5Y细胞相比,用MRx0029处理显著降低了DRD2的表达。

[0441] 讨论

[0442] 这表明MRx0029可能是癌症治疗中的有效成分。

[0443] 实施例3-MRx0029诱导SH-SY5Y细胞中半胱天冬酶3的上调

[0444] 引言

[0445] 本发明人试图鉴定MRx0029对神经母细胞瘤细胞中半胱天冬酶3 (Casp3) 表达的影响。

[0446] 细菌菌株

[0447] 马氏巨球菌MRx0029

[0448] 细胞系

[0449] SH-SY5Y细胞

[0450] 方法

[0451] 本发明人测量了神经母细胞瘤细胞中Casp3表达的变化。

[0452] 结果

[0453] MRx0029诱导未分化的神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞中Casp3的上调。图4显示与未处理的SH-SY5Y细胞相比,用MRx0029处理增加了Casp3的表达。特别地,图4显示,与对照相比,MRx0029的施用使Casp3的表达增加了三倍。

[0454] 讨论

[0455] 在未分化的SH-SY5Y细胞中,MRx0029对Casp3基因表达的增加可能与细胞分化和程序性细胞死亡(例如细胞凋亡)的诱导有关。

[0456] 半胱天冬酶3是刽子手半胱天冬酶,因此与细胞凋亡相关。失调的细胞凋亡与癌症有关,因此,结果表明,MRx0029可能是癌症治疗中的有效成分。

[0457] 已显示,半胱天冬酶在细胞分化中起作用。因此,用MRx0029处理后Casp3表达的增加表明MRx0029可能是增加细胞分化的有效成分。

[0458] 实施例4-SH-SY5Y细胞中的MTT测定:

[0459] 引言

[0460] 本发明人试图使用MTT测定来鉴定MRx0029对神经母细胞瘤细胞活力的影响,所述MTT测定是广泛用于评估反映活细胞数的细胞代谢活性的方法。

[0461] 细菌菌株

[0462] 马氏巨球菌MRx0029

[0463] 细胞系

[0464] SH-SY5Y细胞

[0465] 方法

[0466] MTT测定

[0467] SH-SY5Y细胞以10,000个细胞/孔的接种密度铺板,24小时后,将细胞在100 μ l的1%FBS生长培养基中处理22小时,该培养基具有不同浓度(以v/v百分比表示)的来自固定相培养物的无细胞细菌上清液。其后,加入10 μ l MTT溶液,并且将细胞在CO₂温育箱中温育4小时,在这段时间结束时向每个孔中加入100 μ l含0.04HCL的异丙醇。在560nm波长和655nm参考波长下测量吸光度。MTT测定试剂盒购自Merck Millipore(目录号CT01)。

[0468] 结果

[0469] MRx0029显示出对神经母细胞瘤细胞活力的剂量依赖性作用,其中10%MRx0029与对照相比,活力降低了约70%。用10%的MRx0029无细胞细菌上清液处理显示细胞活力降低。实验结果示于图5中。

[0470] 讨论

[0471] 这表明MRx0029可能是增加细胞死亡的有效成分,因此MRx0029可能是用于治疗癌症的有效成分。

[0472] 实施例5-来自健康供体的PBMC的基本细胞表型分析

[0473] 细菌菌株

[0474] 马氏巨球菌MRx0029

[0475] 方法

[0476] PBMC处理

[0477] 冷冻的健康人PBMC购自Stem Cells Technologies(英国剑桥)。短暂地将细胞解冻,并使其在37℃的CO₂温育箱中的完全生长培养基(含10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、55 μ M 2-巯基乙醇和100U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素的RPMI 1640)中静置过夜。对于实验,将细胞以750,000个细胞/孔的密度铺在48孔板中,并在存在或不存在1ng/ml LPS的情况下在具有10%细菌上清液的完全生长培养基中进行处理。将细胞培养基添加至未处理的孔中。将细胞静置72小时,其后收集无细胞的上清液,并在4℃下以10,000g快速离心3分钟。将样品储存在-80℃以进行细胞因子分析。

[0478] 免疫表型分析

[0479] 每个样品 1.5×10^6 个细胞在室温下用活力固定染料(Miltenyi)染色以区分活细胞和死细胞持续10分钟。其后将细胞用下面列出的抗体混合液(Miltenyi)染色以进行基本的免疫表型分析(CD3/CD4/CD8/CD25/CD127和CD19),并在室温下温育10分钟。

[0480] 进行实验以测量以下细胞群体的百分比:

[0481] • CD4+CD3+细胞(CD4 T辅助细胞的标志物)

[0482] • CD4+CD25+细胞(CD4+活化细胞的标志物)

[0483] • CD4+细胞群体中的CD25++CD17-细胞(Treg细胞的标志物)

[0484] • CD8+CD3+细胞(细胞毒性T细胞的标志物)

[0485] • CD25+CD8+细胞(CD8+活化细胞的标志物)

[0486] • CD19+CD3-细胞(B细胞的标志物)。

[0487] 测定CD8+/Treg的比率和活化CD8/Treg细胞的比率。

[0488] 抗体

[0489]	Aria	AB- 荧光染料
	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

[0490] 结果

[0491] 实验结果示于图6中。

[0492] 最令人惊讶的结果是MRx0029处理对代表Treg细胞的CD25++CD17-细胞百分比的影响(参见图6C)。MRx0029选择性降低PBMC群体中Treg的百分比。MRx0029处理并未显著改变CD4⁺T辅助细胞、CD4⁺活化细胞、细胞毒性T细胞、CD8⁺活化细胞或B细胞的百分比。

[0493] 与未处理的细胞相比,用MRx0029进行处理可增加CD8⁺/Treg的比率和活化CD8⁺/Treg细胞的比率(参见图6G和图6H)。

[0494] 讨论

[0495] 观察到用MRx0029处理选择性降低了Treg的百分比,从而令人惊讶地增加了CD8⁺/Treg和活化CD8⁺/Treg的比率,因为MRx0029产生丁酸盐,并且丁酸盐的产生与Treg群体的增加相关。

[0496] 来自健康供体的PBMC中MRx0029的基本免疫表型分析概况表明,用MRx0029进行处理可降低淋巴细胞群体中Treg的相对百分比,这反映在CD8⁺/Treg细胞之间的比率增加。

[0497] 这表明MRx0029可能是刺激免疫应答和减少Treg免疫抑制的有效成分。结果还表明,MRx0029可能是用于治疗癌症的有效成分。

[0498] 实施例6-来自健康供体的PBMC的细胞因子分析

[0499] 引言

[0500] 本发明人试图进一步分析与MRx0029一起温育后的PBMC。本发明人分析了用MRx0029处理后来自PBMC的特定细胞因子(包括促炎性细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-23)的表达。

[0501] 细菌菌株

[0502] 马氏巨球菌MRx0029

[0503] 方法

[0504] PBMC处理

[0505] PBMC如实施例5中所述进行处理。

[0506] 细胞因子定量

[0507] 根据制造商的建议(Thermo Fischer Scientific),使用ProcartaPlex多重免疫测定法进行细胞因子定量。简言之,使用带有xPONENT软件(Luminex,美国德克萨斯州奥斯汀)的MAGPIX® MILLIPLEX®系统(Merck),将50 μ l无细胞共培养上清液用于细胞因子定量。使用MILLIPLEX®分析师软件(Merck)使用5参数逻辑曲线和背景减法分析数据,以将平均荧光强度转换为pg/ml值。

[0508] 结果

[0509] 来自健康供体的PBMC培养物中MRx0029的细胞因子分析结果表明MRx0029的免疫刺激特征。特别地,MRx0029处理增加了TNF- α 、IL-1 β 和IL-23的表达。

[0510] 结果还表明,用MRx0029处理可增加MIP-3 α 、IL-6和IL-10的表达。MCP-1、CXCL9和GM-CSF的表达水平与对照相似。

[0511] 讨论

[0512] 这表明MRx0029具有免疫刺激特性,并且可能是用于免疫刺激的有效成分。结果还表明,MRx0029可能是治疗癌症的有效成分。

[0513] 实施例7-不同细胞群体的流式细胞术分析

[0514] 引言

[0515] 本发明人试图进一步分析与MRx0029一起温育后的PBMC。流式细胞术分析用于确定CD4细胞(CD4+CD3⁺)、Treg(CD25⁺⁺CD127⁻) CD8细胞(CD8+CD3⁺)和B细胞(CD19+CD3⁻)的百分比。

[0516] 方法

[0517] PBMC处理

[0518] PBMC如实施例5中所述进行处理。

[0519] 不同细胞群体的流式细胞术分析

[0520] 每个样品 1.5×10^6 个细胞在室温下用活力固定染料(Miltenyi)染色以区分活细胞和死细胞持续10分钟。其后,将细胞用下面列出的抗体混合液(Miltenyi)染色以进行基本的免疫表型分析(CD3/CD4/CD8/CD25/CD127和CD19),并在室温下温育10分钟。然后洗涤细胞并将其重悬于PBS中,并立即使用配备有蓝色(488nm)、红色(633nm)和紫色(405nm)激光的FACS Aria II进行分析。在所有实验中都包括了FM0。为了进行分析,使用了FlowJo 10.4.2版软件(FlowJo, LLC)。

[0521] 结果

[0522] 流式细胞术实验的结果示于图8中。

[0523] 图8A显示0.73%的PBMC是Treg(CD25⁺⁺CD127⁻)。

[0524] 讨论

[0525] 结果表明,MRx0029可用于下调Treg。此外,结果表明,MRx0029可能是刺激免疫应答和减少Treg免疫抑制的有效成分。结果还表明,MRx0029可能是用于癌症治疗的有效成分。

[0526] 实施例8-MRx0029增加MG U373细胞中的IL-8分泌

[0527] 引言

[0528] 本发明人试图鉴定MRx0029对神经母细胞瘤细胞中IL-8分泌的影响。用包含MRx0029与LPS的组合物处理人胶质母细胞瘤星形细胞瘤细胞,以观察其调节IL-8水平的能力。IL-8是一种主要由巨噬细胞分泌的促炎性细胞因子,具有免疫刺激作用。

[0529] 细菌菌株

[0530] 马氏巨球菌MRx0029

[0531] 细胞系

[0532] MG U373是源自恶性肿瘤的人胶质母细胞瘤星形细胞瘤并且购自Sigma-Aldrich

(目录号08061901-1VL)。MG U373人胶质母细胞瘤星形细胞瘤细胞在补充有10%FBS、1%青霉素链霉素、4mM L-谷氨酰胺、1X MEM非必需氨基酸溶液和1X丙酮酸钠的MEM (Sigma Aldrich, 目录号M-2279) 中生长。

[0533] 方法

[0534] 一旦生长,将MG U373细胞以100,000个细胞/孔铺在24孔板上。将细胞用单独LPS (1ug/mL) 处理或用来自MRx0029的10%细菌上清液处理24小时。LPS是促炎性细胞因子(例如IL-8)的已知刺激物。然后,收集无细胞的上清液,在4℃下以10,000g离心3分钟。使用来自Peprotech的人IL-8ELISA试剂盒(目录号#900-K18)根据制造商的说明书测量IL-8。

[0535] 结果

[0536] 这些实验的结果示于图9中。用细菌菌株处理细胞导致IL-8分泌的增加,而与LPS的存在无关。

[0537] 讨论

[0538] 结果表明,MRx0029可用于增加IL-8分泌。因此,本发明的组合物可用于治疗疾病,特别是以免疫活化降低为特征的疾病和可通过增加的免疫应答治疗的疾病。

[0539] 实施例9-MRx0029降低HT-29细胞中组蛋白脱乙酰酶活性的水平

[0540] 引言

[0541] 研究了包含MRx0029的组合物改变组蛋白脱乙酰酶活性的能力。已经显示出HDACi在多种癌细胞系中引起生长停滞,分化,细胞凋亡,血管生成减少和免疫应答调节。

[0542] 细菌菌株

[0543] 马氏巨球菌MRx0029

[0544] 细胞系

[0545] 使用细胞系HT-29,因为存在组蛋白脱乙酰酶。

[0546] 方法

[0547] 固定相细菌培养物的无细胞上清液通过离心分离并在0.22uM过滤器中过滤。汇合后3天使用HT-29细胞,并在实验开始前24小时在1mL DTS中逐步下降。用在DTS中稀释的10%无细胞上清液攻击HT-29细胞,并将其温育48小时。然后使用Sigma Aldrich核酸酶提取试剂盒提取核酸酶蛋白,并在HDAC活性测量之前将样品速冻。使用Sigma Aldrich(英国)试剂盒通过荧光分析评估HDAC活性。

[0548] 结果

[0549] 实验结果示于图10中。图109显示,MRx0029能够降低组蛋白脱乙酰酶活性的水平。

[0550] 讨论

[0551] 结果表明,MRx0029通过抑制HDAC活性,是有望用于治疗或预防以表观遗传畸变为特征的疾病的候选物。癌症是以表观遗传畸变为特征的疾病。此外,HDAC抑制剂(HDACi)是一类新兴的有前途的抗癌药物,已显示其在多种癌细胞系中引起生长停滞,分化,细胞凋亡,血管生成减少和免疫应答调节。因此,结果表明本发明的组合物可有效用于治疗或预防癌症。

[0552] 实施例10-组蛋白脱乙酰化抑制的机制的进一步分析

[0553] 引言

[0554] 肠道微生物群因其巨大的多样性和代谢能力而代表了用于产生对HDAC活性具有

潜在影响的各种分子的庞大的代谢库。因此,本发明人试图确定哪些代谢物负责HDAC抑制,并进一步阐明实现抑制的机制。

[0555] 细菌菌株

[0556] 马氏巨球菌MRx0029

[0557] 方法

[0558] 细菌培养和无细胞上清液收集

[0559] 纯细菌培养物在YCFA+肉汤中厌氧生长,直至它们达到稳定的生长阶段。将培养物以5,000x g离心5分钟,并且使用0.2μm过滤器 (Millipore,英国) 过滤无细胞上清液 (CFS)。将1mL CFS等分试样储存在-80℃下直至使用。丁酸钠、己酸和戊酸获自Sigma Aldrich(英国),并在YCFA+肉汤中制备了悬浮液。

[0560] 细菌上清液的SCFA和MCFA定量

[0561] 来自细菌上清液的短链脂肪酸 (SCFA) 和中链脂肪酸 (MCFA) 如下通过MS Omics APS分析和定量。使用盐酸将样品酸化,并添加氘标记的内标。所有样品均按随机顺序进行分析。使用与四极杆检测器 (59977B,Agilent) 耦合的GC (7890B,Agilent) 中安装的高极性色谱柱 (Zebtron™ ZB-FFAP,GC毛细管色谱柱30m x 0.25mm x 0.25μm) 进行分析。所述系统由ChemStation (Agilent) 控制。使用Chemstation (Agilent) 将原始数据转换为netCDF格式,然后使用[118]中所述的PARADISE软件在Matlab R2014b (Mathworks公司) 中将数据导入并处理。

[0562] 特定的HDAC活性分析

[0563] 对于每种类型的HDAC (BPS Bioscience,CA),使用荧光测定试剂盒对HDAC1、2、3、4、5、6、9的特定HDAC抑制活性进行分析。根据制造商的说明书进行测定,并且每个样品均重复进行。将无细胞的上清液以1:10的比率稀释,并暴露于试剂盒中提供的特定HDAC蛋白中,以保持方法之间的一致性。

[0564] 结果

[0565] 抑制组蛋白脱乙酰酶的肠道共生微生物代谢物是丁酸盐和戊酸

[0566] MRx0029的上清液在HT29全细胞和HT29细胞裂解物中均表现出强烈的HDAC抑制作用(参见图11A),MRx0029产生的戊酸和己酸的平均浓度分别为5.08mM和1.60mM(参见图11B)。

[0567] 为了研究哪些代谢物引起菌株诱导的HDAC抑制,测量了不同浓度的己酸、戊酸和丁酸钠对整个HT-29细胞和HT-29细胞裂解物的HDAC抑制作用。图11C中的结果显示丁酸钠对全细胞以及细胞裂解物均具有显著 ($P<0.05$) 的HDAC活性抑制作用,而己酸则未显示显著的抑制活性。戊酸还抑制了HDAC在全细胞以及细胞裂解物中的活性 ($^*(p<0.05)$, $^{**}(p<0.005)$, $^{***}(P<0.001)$, $^{****}(p<0.0001)$)。

[0568] 有效的总HDAC抑制剂研究了目标I类HDAC。

[0569] 研究了测试细菌菌株的特异性HDAC抑制概况。针对I类和II类HDAC进行了特定的HDAC抑制测定 (BPS Bioscience,CA)。将细菌菌株抑制HDAC酶的能力与丁酸盐、己酸和戊酸进行比较。我们的结果证实MRx0029是I类HDAC酶 (HDAC1、2和3) 的非常有效的抑制剂。II类HDAC的抑制作用不那么显著(数据未示出)。

[0570] 讨论

[0571] 具有HDAC抑制活性的菌株产生了大量的戊酸和己酸,以及大量的丁酸钠(图11B)。当作为纯物质进行测试时,戊酸和丁酸钠导致显著的HDAC抑制作用($p < 0.0001$)。

[0572] 有趣的是,特定HDAC活性的结果表明,所测试的菌株是I类HDAC并且特别是HDAC2的有效抑制剂(图12和图13)。I类HDAC (HDAC1、2、3和8) 位于细胞核中,并且在若干人类细胞类型中普遍表达。HDAC 1-3具有超过50%的同源性,但具有独特的结构和细胞功能[119]。它们主要参与细胞存活、增殖和分化,因此它们的抑制作用可能对多种疾病有用[120]; [121]; [122]; [123]; [124]。因此,本发明的组合物可特别用于治疗其中I类HDAC活性被上调的疾病。特别地,本发明的组合物可特别用于治疗其中I类HDAC活性被上调的癌症。例如,本发明的组合物可特别用于治疗其中HDAC2活性被上调的癌症。

[0573] 实施例11-通过MRx0029调节肠屏障功能和肠通透性

[0574] 引言

[0575] 研究了MRx0029引起任何肠屏障功能障碍的能力。HT29-mtx上皮产生粘蛋白的细胞单层[125]用作体外模型,以评价用MRx0029处理后的肠屏障破坏和免疫刺激。

[0576] 细菌菌株

[0577] 马氏巨球菌MRx0029

[0578] 方法

[0579] RNA提取和qPCR分析

[0580] 使用RNeasy微型试剂盒(Qiagen,英国曼彻斯特)根据制造商的说明书提取总RNA,并且使用分光光度计(nano-Drop ND-1000;Thermo Scientific,特拉华州威尔明顿)通过260/280nm下的吸光度确定RNA浓度。对于mRNA表达分析,使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems,英国)根据制造商的说明书从总RNA中制备cDNA。逆转录反应在热循环仪(Biometra,德国)中在25℃下进行10分钟,在37℃下进行120分钟,并且在85℃下进行5分钟,在4℃下保持。通过SYBR-Green PCR测定法一式两份地扩增所得cDNA,并在QuantStudio 6flex实时PCR机器(Applied Biosystems,英国)上使用标准化配置文件(95℃初始变性10分钟,接着是在95℃下变性15秒和在60/65℃下退火/延伸60秒的40个循环,取决于引物)检测产物。在40个循环后添加解离阶段,以生成熔解曲线。使用Applied Biosystems QuantStudio实时PCR软件v1.2进行分析。

[0581] 结果

[0582] 暴露于佛波醇12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA)的分化的HT29-mtx细胞分泌了大量的IL-8;与用MRx0029细菌上清液处理24小时相比,相比于未处理和YCFA+处理的细胞,诱导的IL-8分泌甚至更低(图14A)。

[0583] 然后研究了MRx0029通过修饰参与肠屏障形成的蛋白质的表达和定位所涉及的细胞内信号转导来调节上皮通透性的能力。

[0584] 分离RNA,并进行定量RT-PCR(qRT-PCR)分析,以表征与MRx0029温育期间紧密连接蛋白的基因表达变化。温育2小时后,MRx0029的施用增强了闭合蛋白、绒毛蛋白、紧密连接蛋白1和2(分别为TJP1和TJP2)mRNA的表达(图14B)。

[0585] 将体外结果与来自饲喂MRx0029的小鼠肠道的离体平行分析的数据进行比较。TJP1和闭合蛋白的基因表达在结肠和回肠中进行定量。由于MRx0029能够显著上调鼠肠的结肠区域中的TJP1和闭合蛋白($p = 0.073$),因此离体数据完全反映了体外数据(图14C+

14D)。MRx0029还能够降低相同小鼠结肠中的通透性功能(图14F)。

[0586] 讨论

[0587] 结果表明,MRx0029能够通过修饰参与肠屏障功能的蛋白质(例如闭合蛋白、绒毛蛋白、TJP1和TJP2)的表达和定位所涉及的细胞内信号转导,来调节上皮通透性。因此,结果表明,MRx0029具有增加肠屏障功能和降低肠通透性的功能。因此,本发明的组合物可有效用于治疗或预防以肠屏障功能降低或肠通透性增加为特征的疾病或疾患。

[0588] 实施例12

[0589] 引言

[0590] 本发明人试图分析来自饲喂MRx0029的小鼠的海马、杏仁核和前额叶皮层的脑组织中炎性标志物的基因的表达。本发明人还探索了在施用MRx0029的相同小鼠中对脾脏细胞因子产生的影响。

[0591] 细菌菌株

[0592] 马氏巨球菌MRx0029

[0593] 方法

[0594] 动物

[0595] 将BALBc (Envigo,英国)成年雄性小鼠在12小时的明暗循环下分组饲养;随意提供标准的啮齿动物饲料和水。经过科克大学学院动物伦理实验委员会(University College Cork Animal Ethics Experimentation Committee)批准,所有实验均按照欧洲指南进行。在实验开始时,动物为8周龄。

[0596] 研究设计

[0597] 到达动物单位后,允许动物在其饲养室适应一周。连续6天在15:00至17:00之间,它们以 1×10^9 个CFU的剂量接受活生物疗法的经口管饲(200 μ L剂量)。在第7天,将动物断头,并收集组织进行实验。

[0598] 组织收集

[0599] 关于治疗和测试条件,以随机方式处死动物;采样发生在9.00a.m.至2:30p.m.之间。将躯干血收集在EDTA钾(乙二胺四乙酸)试管中并以4000g离心15分钟。分离血浆并将其储存在-80 $^{\circ}$ C用于进一步分析。快速切除大脑,解剖,并且将每个大脑区域在干冰上速冻,并储存在-80 $^{\circ}$ C用于进一步分析。取出脾脏,收集在5mL RPMI培养基(含L-谷氨酰胺和碳酸氢钠,R8758 Sigma+10%FBS(F7524,Sigma)+1%青霉素/链霉素(P4333,Sigma))中,并且在剔除后立即处理,用于离体免疫刺激。将肠组织(切除最靠近盲肠的2-3cm回肠和结肠段,并使用距盲肠最远的1cm-2cm组织)装入Ussing室进行肠通透性测定。取出盲肠,称重并储存在-80 $^{\circ}$ C用于SCFA分析。

[0600] 脾细胞因子测定

[0601] 处死后立即在5mL RPMI培养基中收集脾脏并立即培养。首先将脾细胞在该RPMI培养基中匀浆化,接着与1mL RBC裂解缓冲液(11814389001 ROCHE,Sigma)温育5分钟。加入另外的10mL RPMI培养基,接着200G离心5分钟。然后通过40 μ m滤器过滤上清液。对细胞计数并接种(4,000,000/mL培养基)。适应2.5小时后,用脂多糖(LPS-2 μ g/mL)或伴刀豆球蛋白A(ConA-2.5 μ g/mL)刺激细胞24小时。刺激后,使用促炎性小鼠1(小鼠)V-PLEX试剂盒(Meso Scale Discovery,美国马里兰州)收集上清液,以对于TNF- α 、IL-10、IL-1 β 、干扰素 γ 、

CXCL2和IL6评估细胞因子释放。使用MESO QuickPlex SQ 120、SECTOR成像仪2400、SECTOR成像仪6000、SECTOR S 600进行分析。

[0602] 基因表达分析

[0603] 根据制造商的建议,使用mirVana™ miRNA分离试剂盒(Ambion/Llfe technologies,英国佩斯利)提取总RNA,并用DNA酶(不含Turbo DNA,Ambion/life technologies)处理。使用NanoDrop™分光光度计(Thermo Fisher Scientific公司,美国特拉华州威尔明顿)根据制造商的说明书对RNA进行定量。根据制造商的程序使用Agilent生物分析仪(Agilent,英国斯托克波特)评估RNA质量,并计算RNA完整值(RIN)。RIN值>7的RNA用于后续实验。使用Applied Biosystems高容量cDNA试剂盒(Applied Biosystems,英国沃灵顿)根据制造商的说明书将RNA逆转录为cDNA。简言之,作为RT母混合物的一部分添加Multiscribe逆转录酶(50U/μL)(1)(2)(1)(10),在25℃温育10分钟,在37℃温育2小时,在85℃温育5分钟并储存在4℃下。使用Applied Biosystems设计的探针(6-羧基荧光素-FAM)对小鼠特异性靶向基因进行定量PCR,同时使用β-肌动蛋白作为内源对照。扩增反应包含1μl cDNA、5μl 2X PCR母混合物(Roche)、900nM每个引物,并通过添加无RNA酶的水达到总计10μl。所有反应均在LightCycler®480系统上使用96孔板一式三份地进行。根据制造商(Roche)的建议,热循环条件为55个循环。为了检查扩增子污染,对于使用的每个探针,每次操作均不含一式三份的模板对照。记录循环阈值(Ct)。使用β-肌动蛋白对数据进行归一化,并使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行转换,并显示为相对于对照组的倍数变化。

[0604] 统计分析

[0605] 正态分布数据表示为平均值±SEM;非参数数据集表示为四分位数范围的中位数。使用非配对的两尾t检验来分析参数数据,并且将Mann-Whitney检验用于非参数。将Spearman秩相关系数用于合并数据集中的相关分析。在所有情况下,p值均<0.05被认为具有显著性。

[0606] 结果-基因表达

[0607] 在海马、杏仁核和前额叶皮层的脑组织中分析了炎性标志物[IL-1β、IL6、CD11b、TNF-α和TLR-4]的基因表达。图15-25显示了MRx0029处理后海马、杏仁核和前额叶皮层中基因表达的变化。用MRx0029处理可显著增加杏仁核中TLR-4的表达(图20)。用MRx0029处理还可增加杏仁核中CD11b的表达(图21)。

[0608] 结果-对脾细胞中细胞因子表达的影响

[0609] 离体脾细胞测定涉及用细菌或病毒模拟攻击对脾细胞(从脾脏分离的细胞,一种参与免疫防御的主要器官)进行攻击。

[0610] 用LPS攻击后,用MRx0029进行治疗可导致干扰素-γ、白介素1β和白介素6减少(分别为图26、图27和图28)。

[0611] 用MRx0029处理导致化学引诱物CXCL1的水平增加(图30)。

[0612] 讨论

[0613] 用MRx0029处理显著增加了杏仁核中促炎性细胞因子TLR-4和CD11b的表达。因此,本发明的组合物可用于治疗疾病,特别是以免疫活化降低为特征的疾病和可通过增加的免疫应答治疗的疾病。

[0614] 实施例13-稳定性测试

[0615] 将包含至少一种本文所述的细菌菌株的本文所述的组合物存储在25℃或4℃的密封容器中,并将所述容器置于具有30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或95%相对湿度的气氛中。在1个月、2个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年后,至少50%、60%、70%、80%或90%的细菌菌株将仍然存在,如通过标准方案确定的菌落形成单位所测量。

[0616] 实施例14-分析马氏巨球菌对ERK信号传导途径的影响

[0617] 材料和方法

[0618] RNA提取和MAP2 qPCR分析

[0619] 将细胞以 2×10^5 个细胞/孔的密度铺在12孔板中。24小时后,在10%细菌上清液存在或不存在(YCFA+)的情况下,细胞用DMSO或维拉非尼(662005;EMD Millipore;VEMU;SKMEL28、SKMEL31、451Lu、HT29 (1 μ M) SKMEL2 (10 μ M) 或氮杂胞苷-C (A3656;Sigma Aldrich;AzaC;5 μ g/ml) 或两种药物(VEMU+Aza) 一起处理。使用RNeasy微型试剂盒(Qiagen,英国曼彻斯特)根据制造商的说明书提取总RNA,并且通过分光光度计在260/280nm下(NanoDrop ND-1000;Thermo Fisher Scientific,拉夫堡)测定RNA浓度。对于mRNA表达分析,使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Thermo Fisher,拉夫堡)根据制造商的说明书从2000ng总RNA中制备cDNA。在热循环仪(Biometra,德国)中进行逆转录反应,在25℃下持续10分钟,在37℃下持续120分钟和在85℃下持续5分钟。通过SYBR-Green PCR测定法一式两份地扩增所得cDNA,并在QuantStudio 6flex实时PCR机器(Applied Biosystems,英国)上使用标准化配置文件(95℃初始变性10分钟,接着是在95℃变性10秒和在65℃退火/延伸30秒的40个循环)检测产物。在40个循环后添加解离阶段以产生溶解曲线。使用Applied Biosystems QuantStudio实时PCR软件v1.2进行分析。GAPDH和MAP2的引物序列如下所示。

[0620] 蛋白质印迹分析

[0621] 在10%细菌上清液存在或不存在(YCFA+)的情况下,用适当的药物处理24小时后,通过在补充有蛋白酶抑制剂(cOmplete蛋白酶抑制剂混合液片剂;Roche,瑞士)和1mM/L原钒酸钠、0.5mM/L PMSF的RIPA缓冲液(R0278;Sigma Aldrich)中裂解细胞来获得蛋白质提取物。通过BCA蛋白质测定法进行蛋白质定量。然后在4-15%的梯度凝胶(BioRad)上通过SDS-PAGE分离等量的总蛋白(20 μ g/泳道),并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Thermo Fisher Scientific,拉夫堡)上。在TBST(10mM Tris,pH 7.5,150mM NaCl,0.5%Tween 20)中用5%BSA或脱脂奶粉封闭60分钟后,用抗磷酸化ERK的初级抗体(9101S,1:1000,细胞信号传导;New England Biolabs(英国))或抗总ERK的初级抗体(4696S,1:1000,细胞信号传导;New England Biolabs(英国))检测膜。

[0622] 目标蛋白用适当的HRP偶联二级抗体(1:10,000,Thermo Fisher Scientific,拉夫堡)检测,用ECL Western blotting Super Signal PicoPlus底物(34577;Thermo Fisher Scientific,拉夫堡)显影,并在Chemidoc XRS成像仪(BioRad)中可视化。

[0623] 96孔板中不依赖于锚定的生长(软琼脂生长测定)

[0624] 将含有20%FBS、4mM L-谷氨酰胺、2x NEAA、0.6%碳酸氢钠、200U/mL青霉素/链霉素(Invitrogen)的25 μ L预热(37℃)2x适当生长培养基(用于黑素瘤细胞系的EMEM;用于HT29的DMEM高葡萄糖)的混合物和25 μ L预热(47℃)的1.2%Noble琼脂(A5431;Sigma Aldrich)铺在96孔微孔板的每个孔上,作为测定的前层。在96孔圆底聚丙烯微孔板中,将10

微升含有 $0-2 \times 10^3$ 个细胞的细胞悬液与25 μ L 2x生长培养基和35 μ L 0.8% Noble琼脂混合,并转移至含有固化前层的96孔微孔板。使细胞生长2天,然后每三天在存在10%细菌上清液或YCFA+的情况下馈入含有药物的培养基。使它们在含5%CO₂的潮湿的37℃温育箱中生长1-2周,然后使用CytoSelect 96孔细胞转化测定法(CBA-130;Cell Biolabs)根据制造商的方案对软琼脂生长进行评分。使用Tecan Infinite F200 Pro系列多孔板读数器(Tecan Biosystems)测量细胞生长,其中激发在485nm下并且发射在530nm下。

[0625] 在32mm板中不依赖于锚定的生长(软琼脂生长测定)

[0626] 将每板1mL预热(37℃) 2x适当生长培养基(用于黑素瘤细胞系的EMEM;用于HT29的DMEM高葡萄糖)和1mL预热(47℃)的0.8% Noble琼脂(0.4%最终琼脂)的混合物与1mL细胞悬液混合,并接种在6孔板中的0.6%琼脂/细胞生长前层(2mL)上。使细胞在含5%CO₂的潮湿的37℃温育箱中生长21-28天。每三天向它们饲喂不存在(YCFA+)或存在10%细菌上清液的药物。使用Evos XL核心显微镜(Thermo Fisher Scientific,拉夫堡)拍摄菌落。

[0627] 克隆源性测定

[0628] 用胰蛋白酶消化细胞,并将200个细胞/孔接种在12孔板中。48小时后,在不存在(YCFA+)或存在10%细菌上清液的情况下用适当的药物处理细胞,并且每三天再饲喂一次。接种后第21天,将细胞固定在冰冷的甲醇中并用结晶紫蓝色染色。对菌落计数(.50个细胞),并以菌落数除以处理的接种细胞数(接种效率)除以对照的接种效率来计算存活分数。

[0629] 实施例14A-SKMEL2黑素瘤细胞系

[0630] 评估以下处理对SKMEL2黑素瘤细胞系(WT BRAF;Nras中的N61R致癌突变)的作用:(1)MRX0029;(2)在YCFA+培养基中的维拉非尼(VEMU);(3)VEMU和MRX0029;(4)在YCFA+培养基中的氮杂胞苷-C(Aza-c);(5)Aza-c和MRX0029;(6)VEMU、Aza-c和MRX0029。

[0631] 使用材料和方法中的方案评估了SKMEL2细胞系中的MAP2基因表达,并且结果示于图31中。相对于两个阴性对照(仅细胞系,和YCFA+),所有MRX0029处理(单独或与VEMU和/或Aza-c组合)均可提高MAP2基因表达。使用材料和方法中的方案评估了SKMEL2细胞系的克隆源性存活,并且结果示于图32中。使用材料和方法中的方案评估了SKMEL2细胞系的软琼脂生长,并且结果示于图33中。VEMU+Aza-c改善了MRX0029对软琼脂生长的抑制作用。使用材料和方法中的方案评估了SKMEL2细胞系中的ERK信号传导,并且结果示于图34中(未评估VEMU、Aza-c和MRX0029)。

[0632] 这些结果表明,单独或与维拉非尼和/或氮杂胞苷-C组合的MRX0029可能具有诱导黑素瘤细胞系(SKMEL2)中MAP2基因表达的作用。此外,维拉非尼+氮杂胞苷-C增强了MRX0029对软琼脂生长的抑制作用。在此基础上,预期本发明的组合物可用于治疗或预防各种癌症,特别是转移性癌症,特别是转移性黑素瘤。

[0633] 实施例14B-SKMEL28黑素瘤细胞系

[0634] 评估以下处理对SKMEL28黑素瘤细胞系(BRAF中的V600E致癌突变)的作用:(1)MRx0029;(2)在YCFA+培养基中的维拉非尼(VEMU);(3)VEMU和MRx0029;(4)在YCFA+培养基中的氮杂胞苷-C(Aza-c);(5)Aza-c和MRX0029;(6)VEMU、Aza-c和MRx0029。

[0635] 使用材料和方法中的方案评估了SKMEL28细胞系中的MAP2基因表达,并且结果示于图35中。使用材料和方法中的方案评估了SKMEL28细胞系的克隆源性存活,并且结果示于图36中。相对于两个阴性对照(YCFA+和仅细胞系),MRx0029与VEMU和/或Aza-c组合可降低

克隆源性存活。使用材料和方法中的方案评估了SKMEL28细胞系的软琼脂生长,并且结果示于图37中。使用材料和方法中的方案评估了SKMEL28细胞系中的ERK信号传导,并且结果示于图38中(未评估VEMU、Aza-c和MRx0029)。相对于阴性对照(YFCA+),所有MRx0029处理(单独或与VEMU或Aza-c组合)均可减少ERK信号传导。

[0636] 这些结果表明,单独或与维拉非尼和/或氮杂胞苷C组合的MRx0029可具有抑制ERK信号传导和降低包含BRAF V600E突变的黑素瘤细胞系(SKME28)的克隆源性存活的作用。在此基础上,预期本发明的组合物可用于治疗或预防癌症,特别是包含致癌ERK信号传导的癌症,尤其是黑素瘤。特别地,预期本发明的组合物可用于治疗或预防这样的癌症,所述癌症包含BRAF中的致癌突变,特别是在位置600处,并且尤其是突变BRAF V600E。

[0637] 实施例14C-SKMEL31黑素瘤细胞系

[0638] 评估以下处理对SKMEL31黑素瘤细胞系(BRAF V600E杂合)的作用:(1) MRx0029;(2) 在YFCA+培养基中的维拉非尼(VEMU);(3) VEMU和MRx0029;(4) 在YFCA+培养基中的氮杂胞苷-C(Aza-c);(5) Aza-c和MRx0029;(6) VEMU、Aza-c和MRx0029。

[0639] 使用材料和方法中的方案评估了SKMEL31细胞系中的MAP2基因表达,并且结果示于图39中。使用材料和方法中的方案评估了SKMEL31细胞系的克隆源性存活,并且结果示于图40中。使用材料和方法中的方案评估了SKMEL31细胞系的软琼脂生长,并且结果示于图41中。VEMU、Aza-c和VEMU+Aza-c改善了软琼脂生长和MRx0029对克隆源性存活的抑制作用。使用材料和方法中的方案评估了SKMEL31细胞系中的ERK信号传导,并且结果示于图42中(未评估VEMU、Aza-c和MRx0029的组合)。相对于阴性对照(YFCA+),所有MRx0029处理(单独或与VEMU或Aza-c组合)均可减少ERK信号传导。

[0640] 实施例14D-451Lu黑素瘤细胞系

[0641] 评估以下处理对451Lu黑素瘤细胞系(BRAF中的V600E致癌突变)的作用:(1) MRx0029;(2) 在YFCA+培养基中的维拉非尼(VEMU);(3) VEMU和MRx0029;(4) 在YFCA+培养基中的氮杂胞苷-C(Aza-c);(5) Aza-c和MRx0029;(6) VEMU、Aza-c和MRx0029。

[0642] 使用材料和方法中的方案评估了451Lu细胞系中的MAP2基因表达,并且结果示于图43中。相对于仅细胞系的阴性对照,所有MRx0029处理(单独或与VEMU和/或Aza-c组合)均可提高MAP2基因表达。使用材料和方法中的方案评估了451Lu细胞系的克隆源性存活,并且结果示于图44中。相对于两个阴性对照(仅细胞系,和YFCA++DMSO),所有MRx0029处理(单独或与VEMU和/或Aza-c组合)均降低了克隆源性存活。使用材料和方法中的方案评估了451Lu细胞系的软琼脂生长,并且结果示于图45中。氮杂胞苷C增强了MRx0029对软琼脂生长的抑制作用。使用材料和方法中的方案评估了451Lu细胞系中的ERK信号传导,并且结果示于图46中(未评估VEMU、Aza-c和MRx0029的组合)。相对于阴性对照(YFCA++DMSO),MRx0029与VEMU或Aza-c组合可减少ERK信号传导。

[0643] 这些结果表明,单独或与维拉非尼和/或氮杂胞苷-C组合的MRx0029具有诱导MAP2基因表达以及降低带有BRAF V600E致癌突变的黑素瘤细胞系(451Lu)的克隆源性存活和生长的作用。在此基础上,预期本发明的组合物可用于治疗或预防癌症,特别是包含致癌ERK信号传导的癌症,尤其是黑素瘤例如转移性黑素瘤。特别地,预期本发明的组合物可用于治疗或预防这样的癌症,所述癌症包含BRAF中的致癌突变,特别是在位置600处,并且尤其是突变BRAF V600E。

[0644] 实施例14E-HT29结直肠癌细胞系

[0645] 评估以下处理对HT29结直肠癌细胞系(BRAF中的V600E致癌突变)的作用:(1) MRx0029;(2) 在YFCA+培养基中的维拉非尼(VEMU);(3) VEMU和MRx0029;(4) 在YCFA+培养基中的氮杂胞苷-C(Aza-c);(5) Aza-c和MRx0029;(6) VEMU、Aza-c和MRx0029。

[0646] 使用材料和方法中的方案评估了HT29细胞系中的MAP2基因表达,并且结果示于图47中。相对于两个阴性对照(仅细胞系和YCFA+),MRx0029与VEMU和/或Aza-c组合均可提高MAP2基因表达。使用材料和方法中的方案评估了HT29细胞系的克隆源性存活,并且结果示于图48中。相对于两个阴性对照(仅细胞系和YCFA++DMSO),所有MRx0029处理(单独或与VEMU和/或Aza-c组合)均降低了克隆源性存活。Aza-c改善了MRx0029在抑制克隆源性存活中的作用。使用材料和方法中的方案评估了HT29细胞系的软琼脂生长,并且结果示于图49a和图49b中。使用材料和方法中的方案评估了HT29细胞系中的ERK信号传导,并且结果示于图50中(未评估VEMU、Aza-c和MRx0029的组合)。相对于阴性对照(YFCA++DMSO),仅MRx0029减少ERK信号传导。

[0647] 这些结果表明,在带有V600E致癌突变的细胞系(HT29)中,单独或与维拉非尼和/或氮杂胞苷-C组合的MRx0029具有诱导MAP2基因表达,降低克隆源性存活和抑制ERK信号传导的作用。在此基础上,预期本发明的组合物可用于治疗或预防癌症,特别是那些包含致癌ERK信号传导的癌症,尤其是结直肠癌,例如转移性结直肠癌。特别地,预期本发明的组合物可用于治疗或预防这样的癌症,所述癌症包含BRAF中的致癌突变,特别是在位置600处,并且尤其是突变BRAF V600E。

[0648] 实施例15-GPR109a RNA在分化的Caco-2细胞中的表达

[0649] GPR109a是在结肠和肠上皮细胞的面向腔的顶膜中表达的G蛋白偶联受体。在结肠癌细胞系中发现GPR109a表达沉默,并且据报道在细菌发酵产物如丁酸盐的存在下诱导其表达可诱导肿瘤细胞凋亡[126]。

[0650] HT29mtx细胞接种在12孔板上并分化10天;然后将其血清饥饿12小时,随后将其暴露于源自固定相细菌的10%上清液持续24小时。收集细胞,并根据RNeasy微型试剂盒方案(Qiagen)分离总RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)制备cDNA。通过qPCR测量基因表达。 β 肌动蛋白用作内部对照。根据 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 方法[127]计算倍数变化。所使用的正向和反向引物的序列分别以SEQ ID NO:6和7提供。

[0651] 分化的Caco-2形成极化的顶膜/粘膜和基底外侧/浆膜,这些膜是不可渗透的并且在结构和功能上类似于小肠的上皮细胞。用MRx0029处理Caco-2细胞会引起GPR109a表达增加(图52A)。此外,与仅用PMA(或YCFA+培养基中的PMA)处理相比,用佛波醇-12-肉豆蔻酸13-乙酸酯(PMA)上清液处理的Caco-2表现出更大的GPR109a RNA表达,参见图52B。因此,这些数据表明,本发明的组合物可用于治疗癌症,尤其是转移性癌症,特别是转移性结直肠癌或小肠癌,例如小肠腺癌,并且特别是那些包含致癌ERK信号传导的癌症。这些数据还表明,作为GPR109a表达的结果,本发明的组合物可通过诱导细胞凋亡的机制来实现这种治疗。

[0652] 实施例16-MRx0029对HT29细胞系分泌IL-8的影响

[0653] 分化的HT29细胞形成极化的顶膜/粘膜和基底外侧/浆膜,这些膜不可渗透并且在结构和功能上与小肠上皮细胞相似。

[0654] 将HT29细胞以200,000个细胞/孔的密度铺在12孔板中。使细胞分化10天(每2天更

换培养基)。实验当天将细胞置于厌氧罩中,并用厌氧平衡的HANKs溶液洗涤。然后将900u1生长培养基(不含FBS和抗生素)添加到细胞中。将细菌细胞重悬于生长培养基(不含FBS和抗生素)中,然后以100u1中 10^7 CFU的总量添加。在厌氧罩中将细胞与细菌共温育2小时。其后,在不含FBS但含有抗生素的生长培养基中洗涤细胞。将细胞在1ml THP1条件培养基中静置24小时。温育24小时后,收集上清液并在4℃下以10,000g快速离心3分钟。将样品在-80℃下冷冻直至进一步使用。

[0655] THP1条件培养基:THp1以 4×10^6 个/烧瓶的密度接种在T25烧瓶中。在含有1ug/ml LPS或LPS+5mM ATP(LPS后3小时添加ATP)的RPMI培养基(包含2mM L-谷氨酰胺,不含FBS)中处理细胞。使细胞静置24小时。其后,通过在室温下以250g快速离心细胞5分钟来收集条件培养基(CM)。不同的CM用于处理HT29细胞。将一小份等分试样在80℃下冷冻用于ELISA。

[0656] 收集不同样品的上清液,并使用来自Peprotech的人IL-8ELISA试剂盒根据制造商的说明书进行细胞因子分析。GraphPad Prism7用于绘制和分析数据。

[0657] MRx0029增加了IL-8分泌,这是一种有效的免疫刺激细胞因子(图53)。这些数据证实了MRx0029的免疫刺激活性。

[0658] 如上所述,IL-8的分泌增加了B细胞的增殖。B细胞与调节对肿瘤的免疫应答有关。实际上,B细胞分泌的抗肿瘤抗体是肿瘤控制的有效机制。众所周知,肿瘤特异性抗体的产生可触发自然杀伤细胞与抗体的恒定域结合,从而通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)导致肿瘤细胞裂解。因此,本发明的组合物可通过适当调节B细胞应答以确保增加的抗肿瘤免疫应答来实现癌症的治疗。

[0659] 基于大多数癌症的病理机制涉及逃避宿主免疫系统监视的事实,任何涉及刺激免疫应答的机制都会产生在治疗上有益的影响。因此,预期本发明的组合物可用于治疗或预防各种癌症。

[0660] 实施例17-代谢物分析

[0661] 引言

[0662] 肠道微生物群因其巨大的多样性和代谢能力而代表了用于产生各种分子的庞大的代谢库。本发明人试图确定由马氏巨球菌菌株NCIMB 42787和本文中鉴定为Ref 1、Ref 2和Ref 3的其它马氏巨球菌菌株产生和消耗了哪些短链脂肪酸和中链脂肪酸。

[0663] 材料和方法

[0664] 细菌培养和无细胞上清液收集

[0665] 纯细菌培养物在YCFA+肉汤中厌氧生长,直至它们达到稳定的生长阶段。将培养物以5,000x g离心5分钟,并且使用0.2μm过滤器(Millipore,英国)过滤无细胞上清液(CFS)。将1mL CFS的等分试样储存在-80℃下直至使用。丁酸钠、己酸和戊酸获自Sigma Aldrich(英国),并在YCFA+肉汤中制备悬浮液。

[0666] 细菌上清液的SCFA和MCFA定量

[0667] 来自细菌上清液的短链脂肪酸(SCFA)和中链脂肪酸(MCFA)如下通过MS Omics APS分析和定量。使用盐酸来酸化样品,并添加氘标记的内标。所有样品均按随机顺序进行分析。使用与四极杆检测器(59977B,Agilent)耦合的GC(7890B,Agilent)中安装的高极性色谱柱(Zebron™ ZB-FFAP,GC毛细管色谱柱30m x 0.25mm x 0.25μm)进行分析。所述系统由ChemStation(Agilent)控制。使用Chemstation(Agilent)将原始数据转换为netCDF格

式,然后使用[128]中所述的PARADISE软件在Matlab R2014b (Mathworks公司) 中将数据导入并处理。

[0668] 结果

[0669] 如图54-56中所示,菌株42787产生戊酸、丁酸盐和己酸,并消耗丙酸盐和乙酸盐。本发明人还发现了马氏巨球菌菌种的其它菌株,它们产生相当水平的戊酸、己酸和丁酸盐,并消耗相似量的乙酸盐和丙酸盐。

[0670] 实施例18-烯醇酶2的抑制

[0671] 图57表明,MRx0029具有抑制神经元特异性烯醇酶 (NSE) /烯醇酶2的统计学显著作用。NSE被认为可支持增加的肿瘤细胞代谢需求,保护肿瘤细胞免受压力条件并促进其侵袭和迁移[129]。它还涉及转移性黑素瘤的进展[130],小细胞肺癌的存活和进展[131],以及腺鳞肺癌的预后[132]。因此,预期本发明的组合物可有效治疗和预防癌症,特别是转移性黑素瘤、小细胞肺癌和腺鳞肺癌。

[0672] 实施例19-代谢物分析

[0673] 除实施例17中提供的数据外,图58显示了马氏巨球菌菌株NCIMB 42787和以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43388和NCIMB 43389保藏的其它菌株产生和消耗了哪些其它短链脂肪酸。

[0674] 马氏巨球菌菌株NCIMB 42787减少了甲酸,同时增加了2-甲基丙酸和3-甲基丙酸的水平(图58)。因此,菌株NCIMB 42787产生2-甲基-丙酸和3-甲基-丙酸并消耗甲酸。本发明人还发现,其它保藏菌株产生相当水平的2-甲基-丙酸和3-甲基-丙酸并消耗相似量的甲酸。

[0675] 实施例20-IL-6的上调

[0676] 引言

[0677] 研究了细菌菌株对星形细胞瘤细胞系U373触发IL-6分泌增加的能力。

[0678] 材料和方法

[0679] 将人胶质母细胞瘤星形细胞瘤细胞系 (U373) 维持在补充有10%热灭活的FBS、4mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素和5μg/ml纤溶酶、1%非必需氨基酸、1%丙酮酸钠的25ml MEME 4.5g/L D-葡萄糖(称为完全生长培养基)中。

[0680] 将细胞以100,000个细胞/孔的密度接种在24孔板中的1ml完全生长培养基中,并在37℃/5%CO₂下静置72小时。在处理当天,从每个孔中除去培养基,用0.5ml洗涤培养基(无血清MEME)、0.9ml刺激培养基(含有2%FBS的MEME培养基)冲洗细胞。预温育1小时后,将细胞从CO₂温育箱中取出并用100μl细菌上清液处理。将YCFA+培养基用作对照。然后将细胞在37℃/5%CO₂下再温育24小时,然后收集无细胞上清液,并在4℃下以10,000g快速离心3分钟。将样品等分在1.5ml微管中并储存在-80℃以用于hIL-6 ELISA。

[0681] 结果与结论

[0682] 图59表明,与未处理的和YCFA+对照相比,马氏巨球菌菌株NCIMB 42787上调了U373细胞中的IL-6分泌。其它保藏菌株,特别是NCIMB 43389,也增加了IL-6的分泌。另外的保藏菌株是NCIMB 43385、NCIMB 43388、NCIMB 43386和NCIMB 43387。

[0683] IL-6分泌会增加B细胞增殖。如上所述,增加的B细胞增殖可作为改善针对癌症的免疫应答的有效机制(例如,通过产生抗体并触发ADCC)。

[0684] 实际上,不仅通过保藏菌株,而且通过相关的保藏菌株证明了免疫刺激活性。因此,预期包含巨球菌属菌株或其生物型的本发明组合物可用于治疗或预防各种癌症。

[0685] 实施例21-烯醇酶2的抑制

[0686] 材料和方法

[0687] 将神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y在补充有2mM L-谷氨酰胺、10%热灭活的FBS、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的50%MEM和50%营养混合物F-12Ham培养基中生长。将SH-SY5Y以 0.5×10^6 个细胞的密度铺在6孔板中。24小时后,将细胞在含有10%细菌上清液或YCFA+的分化培养基(含有1%FBS的生长培养基)中处理17小时。收集细胞,并根据RNeasy微型试剂盒方案(Qiagen)分离总RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)制备cDNA。通过qPCR测量基因表达。GAPDH用作内部对照。根据 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 方法计算倍数变化。所使用的引物组以SEQ ID NO:2、3、13和14列出。

[0688] 结果

[0689] 图60显示马氏巨球菌菌株NCIMB 42787具有抑制神经元特异性烯醇酶(NSE)/烯醇酶2的统计学显著作用。此外,本发明人还发现,与YCFA+培养对照相比,保藏的参考菌株触发了烯醇酶2的统计学显著降低。特别地,以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43388、NCIMB 43389、NCIMB 43386和NCIMB 43387保藏的菌株引起烯醇酶2的显著抑制。

[0690] 结论

[0691] 因此,与以上实施例18中的评论一致,在某些实施方案中,包含示例性参考菌株的本发明组合物预期可有效治疗和预防癌症,特别是转移性黑素瘤、小细胞肺癌和腺鳞肺癌。

[0692] 实施例22-MAP2的上调

[0693] 材料和方法

[0694] 将神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y在补充有2mM L-谷氨酰胺、10%热灭活的FBS、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的50%MEM和50%营养混合物F-12Ham培养基中生长。将SH-SY5Y以 0.5×10^6 个细胞的密度铺在6孔板中。24小时后,将细胞在含有10%细菌上清液或YCFA+的分化培养基(含有1%FBS的生长培养基)中处理17小时。收集细胞,并根据RNeasy微型试剂盒方案(Qiagen)分离总RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)制备cDNA。通过qPCR测量基因表达。GAPDH用作内部对照。根据 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 方法计算倍数变化。所用引物组以SEQ ID NO:2、3、4和5列出。

[0695] 结果

[0696] 图61A显示,与对照(即阴性对照和培养基对照)相比,马氏巨球菌菌株NCIMB 42787和其它保藏菌株触发了MAP2表达的统计学显著增加。特别地,以登录号NCIMB 43385、NCIMB 43388、NCIMB 43389、NCIMB 43386和NCIMB 43387保藏的菌株引起MAP2表达的显著增加。在此基础上,预期本发明的组合物可用于治疗或预防各种癌症,特别是转移性癌症,特别是转移性黑素瘤。

[0697] 实施例23-用马氏巨球菌菌株NCIMB 42787处理后,暴露于TNFα的HMC3细胞中细胞因子分泌的调节

[0698] 引言

[0699] 用TNFα处理HMC3细胞,并在用NCIMB 42787固定相培养物的无细胞上清液处理后测量IL-8的分泌。

[0700] 材料和方法

[0701] 使人类小神经胶质HMC3细胞在含有15%热灭活的FBS和100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的补充有谷氨酰胺的EMEM培养基中生长。将HMC3细胞以50,000个细胞/孔的密度铺在24孔板中。使细胞在CO₂温育箱中静置48小时。然后将细胞在空白EMEM中洗涤并在含有10ng/ml TNF-α的2%FBS生长培养基中预处理1小时。其后,将NCIMB 42787固定生长培养物的10%无细胞细菌上清液(如上所述分离)添加至TNF-α处理和未处理的孔中,并在37℃的CO₂温育箱中温育24小时。收集无细胞的上清液,并在4℃下以10,000xg离心3分钟。将样品等分在1.5ml微管中并储存在-80℃以用于hIL-8ELISA。

[0702] 在如上所述处理的HMC3细胞的无细胞上清液中,使用hIL-8标准ELISA试剂盒根据制造商的方案分析IL-8的分泌。在405nm下测量样品,在酶标仪(iMark,Bio-Rad)上校正波长设置为655nm。绘制原始数据并使用GraphPad Prism 7软件进行分析。

[0703] 统计分析

[0704] 正态分布数据呈现为平均值±SEM;单因素Anova (Sidak的多重比较检验)用于分析本文中提供的数据。在所有情况下,p值<0.05被认为是显著的。

[0705] 结果

[0706] NCIMB 42787在不存在刺激的情况下诱导IL-8分泌(图61B)。如上所述,IL-8特别是通过刺激B细胞增殖而参与免疫系统的活化。

[0707] 实施例24-马氏巨球菌NCIMB 42787对HEK-TLR4细胞中NF-κB启动子的活化

[0708] 引言

[0709] 为了验证用NCIMB 42787处理是否会诱导由TLR4接合诱导的NF-κB-Ap1启动子活性,用单独或与LPS组合的NCIMB 42787的无细胞细菌上清液处理HEK-TLR4细胞。

[0710] 材料和方法

[0711] 根据制造商的说明书培养稳定表达人TLR4 (HEK-TLR4) 的HEK293-Blue报告细胞。简言之,将HEK-TLR4细胞保存在补充有10% (v/v) 热灭活的FBS、4mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、100μg/ml normocin、1X HEK-Blue选择培养基的DMEM 4.5g/L D-葡萄糖中。

[0712] 简言之,将细胞用PBS洗涤,在PBS中解离并收集在生长培养基中。将细胞以25,000个细胞/孔的密度铺在96孔板中。为了评价细菌菌株对LPS诱导NF-κB启动子活化的影响,在存在或不存在10%上清液(如上所述分离)的情况下用10ng/ml LPS处理细胞,并在CO₂温育箱中进行温育。在37℃和5%CO₂下进行处理22小时,然后使用QUANTI-blue溶液根据制造商的说明书从细胞培养上清液中检测分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)的活性。简言之,收集20μl无细胞上清液,并通过与200μl无菌过滤的QUANTI-Blue检测培养基混合,分析SEAP的存在。在37℃下温育2小时后,在酶标仪(iMark microplate,Bio-Rad)上于655nm下测量光密度。

[0713] 统计分析

[0714] 正态分布数据呈现为平均值±SEM;单因素Anova (Sidak的多重比较检验)用于分析本文中提供的数据。在所有情况下,p值<0.05被认为是显著的。

[0715] 结果

[0716] NCIMB 42787独立地诱导NF-κB-Ap1启动子活化(图61C)。

[0717] NF- κ B特别是通过刺激炎症介体和免疫应答中涉及的细胞因子例如IL-6的表达来参与免疫应答的激活。如上所述,IL-6表达的增加有助于刺激免疫系统,因此NF- κ B途径的激活具有免疫刺激活性。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物激活NF- κ B信号传导并因此刺激免疫系统。

[0718] 实施例25-马氏巨球菌菌株产生丁酸、戊酸和己酸

[0719] 材料和方法

[0720] 根据De Baere等的方法¹³³,从YCFA+、掺有SCFA标准混合物(40mM乙酸和20mM甲酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸)的YCFA+中提取SCFA。

[0721] SCFA的HPLC分析

[0722] HPLC检测和SCFA定量是根据De Baere等¹³³的方法进行的,其中只稍作修改。简言之,使用配备有Waters光电二极管阵列(PDA)检测器2998(Waters Limited,英国埃尔斯特里)的Waters e2695 HPLC系统进行HPLC分析。使用Xselect®HSS T3 3.5 μ m 4.6x150mm LC柱(Waters Limited,英国埃尔斯特里)进行SCFA标准物,从MRx0005和MRx0029 BCFS以及MRx0005和MRx0029己烷、二乙醚、乙酸乙酯、乙腈和甲醇提取物中提取的SCFA的HPLC分析。使用光电二极管阵列检测器(PDA)进行LC分析,该检测器设置为分析200-800nm的波长。在210nm下进行SCFA检测和定量。流动相由25mM磷酸钠缓冲液在HPLC水(使用磷酸(A)和乙腈(B)将pH调节至3.0)中组成。用于SCFA检测和定量的LC方法使用具有以下梯度的溶剂系统进行: t_0 'A=95%,B=5%; t_{10}' A=95%,B=5%; t_{30}' A=30%,B=70%; t_{31}' A=0%,B=100%; t_{36}' A=0%,B=100%; t_{38}' A=5%,B=95%; t_{60}' A=5%,B=95%;流速=1ml/min。

[0723] 通过注入20 μ l SCFA的两倍连续稀释液(40mM乙酸和20mM甲酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸),对于每个SCFA绘制七点校准曲线。使用下式计算定量提取效率:

[0724] $\frac{[\text{掺入和提取的YCFA+中的SCFA}]}{[\text{未提取的掺入的YCFA+中的SCFA}]}$

[0725] 提取效率用于确定每个样品中单个SCFA的浓度。通过减去未掺料的培养基对照中存在的相应SCFA的量来计算特定SCFA的产生。

[0726] 靶向代谢组学:细菌代谢物和脂肪酸分析

[0727] 样品分析由MS-Omics(丹麦哥本哈根)进行。通过从每个样品中取等分试样来创建混合的汇合样品(QC样品)。在整个序列中以定期间隔对该样品进行分析。通过以最低两个水平掺入QC样品,对定量化合物的基质效应进行测试。

[0728] 对于GC代谢物分析,使用Smart等¹³⁴描述的方案的略微修改版本,用氯甲酸甲酯衍生化样品。所有样品均按随机顺序进行分析。使用与四极杆检测器(59977B,Agilent)耦合的GC(7890B,Agilent)进行分析。使用Chemstation(Agilent)将原始数据转换为netCDF格式,然后使用Johnsen等¹³⁵描述的PARADISE软件在Matlab R2014b(Mathworks公司)中将数据导入并处理。

[0729] 对于SCFA分析,使用盐酸来酸化样品,并添加氘标记的内标。使用与四极杆检测器(59977B,Agilent)耦合的GC(7890B,Agilent)中安装的高极性色谱柱(Zebron™ ZB-FFAP,GC毛细管色谱柱30mX0.25mmX0.25 μ m)进行分析。使用Chemstation(Agilent)将原始数据转换为netCDF格式,然后使用Johnsen等¹³⁵描述的PARADISE软件在Matlab R2014b(Mathworks公司)中将数据导入并处理。

[0730] 结果

[0731] 使用靶向代谢组学进行的脂肪酸分析表明,NCIMB 42787产生线性和支链形式(C4-C6)的丁酸(butanoic/butyric acid)、戊酸(pentanoic/valeric acid)和己酸(hexanoic/caproic acid)(图62A)。此外,在NCIMB 42787无细胞上清液中,4-羟基-苯基乙酸:培养基的比率增加。使用无细胞上清液的HPLC分析来监测NCIMB 42787的甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸的产生(基于相关SCFA的保留时间和吸收光谱)。与为SCFA提取的NCIMB 42787无细胞上清液叠加的SCFA标准物的代表性色谱图报告于图62C中。HPLC分析证实NCIMB 42787可产生丁酸、戊酸和己酸。

[0732] 实施例26-含有丁酸盐和戊酸盐的马氏巨球菌甲醇级分在U373细胞中显示免疫刺激活性

[0733] 为了研究SCFA在减少IL-8分泌中的作用,用增加浓度的丁酸钠(SB)、戊酸钠(SV)和己酸(HA)处理U373细胞。

[0734] 方法

[0735] 如上所述制备U373细胞。将细胞用上述1 μ g/ml LPS预处理1小时并在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下温育。预温育1小时后,将细胞从CO₂温育箱中移出,并用递增浓度的新鲜制备的丁酸钠(SB)、戊酸钠(SV)和己酸(HA)处理。

[0736] 统计分析

[0737] 正态分布数据呈现为平均值 $\pm$ SEM;单因素Anova(Sidak的多重比较检验)用于分析本文中提供的数据。在所有情况下,p值<0.05被认为是显著的。

[0738] 结果与结论

[0739] 所测试的浓度涵盖了在无细胞上清液中测量的不同脂肪酸的浓度范围,并考虑到在基于细胞的测定法中使用仅10%的上述上清液。SB和SV均增加了LPS诱导的同一细胞中的IL-8分泌(图63),表明当将NCIMB 42787添加到培养物中时,两种SCFA的存在都可能有助于IL-8诱导。用LPS攻击后,HA不会抑制IL-8分泌。所测试的SCFA均未能诱导IL-8本身分泌超过基础水平(未经处理的细胞对照)。在存在和不存在LPS的情况下,三种SCFA的重构混合物再现NCIMB 42787无细胞上清液的生物活性。

[0740] 因此,在某些实施方案中,丁酸和/或戊酸参与IL-8的产生,因此对于例如通过B细胞增殖来刺激免疫系统是重要的。因此,在某些实施方案中,本发明的细菌菌株通过产生丁酸和/或戊酸来刺激免疫系统。

[0741] 实施例27-NCIMB 42787产生的SCFA至少部分负责免疫刺激活性

[0742] 引言

[0743] 为了进一步确认NCIMB 42787的活性是否至少部分是由于SCFA,将无细胞细菌上清液用极性增加的不同溶剂进行分级。对该菌株上清液的脱蛋白粗提取物(己烷,F5;二乙醚,F4;乙酸乙酯,F3;乙腈,F4;甲醇,F1)进行HPLC分析,以分析NCIMB 42787的固定相无细胞上清液的生化复杂性,以及基于极性和溶解性的亚分级化合物。

[0744] 方法

[0745] 依序溶剂提取-粗提取物的制备

[0746] 依序用HPLC级己烷(HEX)、二乙醚(DE)、乙酸乙酯(EtOAc)、乙腈(ACN)和甲醇(MeOH)提取NCIMB 42787菌株BCFS和YCFA+(培养基对照)的三个生物学重复样品。简言之,

将20ml BCFS置于玻璃小瓶中,并在室温(RT)下在20ml HEX中于旋转摇床(70rpm)上提取30分钟。在每个BCFS和YCFA+培养基对照上总共进行了三次提取。然后将剩余的水层在RT下于MX-RD-Pro旋转摇床(70rpm)上于20ml DE、EtOAc中提取30分钟,共提取三次。在不超过30℃的温度下,在配备有V-300真空泵(Büchi,瑞士弗拉维尔)的R-300旋转蒸发仪中,在减压下干燥每个样品的合并提取物。将所得提取物重新溶解在2ml相应溶剂中,并在四个1.5ml Eppendorf管中等分(各500μl,对应于5ml原始样品)。然后将剩余的水层在RT下于MX-RD-Pro旋转振荡器(70rpm)上的20ml DE、EtOAc中提取30分钟,共提取三次。在配备有V-300真空泵(Büchi,瑞士弗拉维尔)的R-300旋转蒸发仪中,在不超过30℃的温度下,在减压下干燥每个样品的合并提取物。将所得提取物重新溶解在2ml相应溶剂中,并在四个1.5ml Eppendorf管中等分(各500μl,对应于5ml原始样品)。

[0747] 使用R-300旋转蒸发仪将剩余的水层蒸发至干。将所得的干燥提取物在20ml ACN中提取30分钟,共提取3次。合并ACN提取物,使用旋转蒸发仪蒸发至干,再溶解在2ml ACN中,并在四个1.5ml Eppendorf管中等分(各500μl)。然后将剩余的干燥提取物(提取物的ACN不溶部分)在20ml MeOH中提取30分钟,共提取三次。合并MeOH提取物,使用R-300旋转蒸发仪蒸发至干,再溶解于2ml MeOH中,并等分在四个1.5ml Eppendorf管(各500μl)中。

[0748] 将粗提取物的等分试样在-20℃下保持过夜,诱导蛋白质成分的沉淀。过夜沉淀后,将每个等分试样以10,000xg离心6分钟并转移至新的2ml管中。重复过夜沉淀三次,然后将提取物在RVC 2-18CDPlus speedvac(Christ,德国哈茨山麓奥斯特罗德)中干燥并称重。将每个提取物的所有干燥等分试样储存在-80℃下直至进一步使用。

[0749] 处理

[0750] 如上所述制备U373细胞。如上所述,将细胞用1μg/ml LPS预处理1小时。然后,将细胞从CO₂温育箱中取出,并用100μl不同级分处理。来自培养基的级分用作对照。处理后24小时收集无细胞上清液,并通过ELISA分析IL-8分泌(如上所述)。

[0751] 统计分析

[0752] 正态分布数据呈现为平均值±SEM;单因素Anova(Sidak的多重比较检验)用于分析本文中提供的数据。在所有情况下,p值<0.05被认为是显著的。

[0753] 结果

[0754] HPLC分析证实了脱蛋白上清液中存在的化合物的选择性提取和粗分级。在存在和不存在LPS的情况下,未分级的NCIMB 42787均可诱导U373细胞中的IL-8分泌,并且甲醇级分F1产生相同的活性,因此重申了丁酸和戊酸在这些细胞类型的IL-8产生中的重要作用(图64A和图64B)。

[0755] 因此,如上所述,在某些实施方案中,丁酸和/或戊酸的产生刺激了免疫系统。因此,在某些实施方案中,本发明的细菌菌株通过丁酸和/或戊酸的产生来刺激免疫系统。

[0756] 实施例28-巨球菌属参考菌株NCIMB 43387显著降低BALB/c小鼠中的结肠IDO-1mRNA表达

[0757] 图65表明,与媒介物对照相比,NCIMB 43387引起BALB/c小鼠结肠中IDO-1mRNA表达的显著降低(通过qPCR归一化为β-肌动蛋白来定量)。

[0758] IDO-1涉及响应于炎症或感染而促进免疫抑制。因此,驱动IDO-1表达的降低与免疫刺激相关。此外,IDO-1的减少会降低癌细胞的增殖和迁移能力,并改善针对肿瘤的免疫

监测。因此,在某些实施方案中,本发明的细菌菌株用于降低IDO-1表达。在某些实施方案中,免疫刺激与IDO-1表达的减少相关。另外,在某些实施方案中,本发明的组合物防止转移性癌症生长。在某些实施方案中,本发明的组合物鉴于其抗转移活性而可有效地治疗和预防癌症,特别是转移性黑素瘤、小细胞肺癌和腺鳞肺癌。

[0759] 实施例29-以登录号NCIMB 43385和NCIMB 43387保藏的巨球菌菌株降低了BALB/c小鼠中的结肠Tph-1mRNA表达

[0760] 对BALB/c小鼠施用活生物治疗剂,并使用qPCR分离组织以用于分析基因表达。

[0761] 图66证明了与媒介物对照相比,本发明的组合物降低Tph-1mRNA表达的能力(使用通过归一化为 β -肌动蛋白的qPCR进行定量)。

[0762] 已知Tph-1的减少与增加的抗癌性和减少的癌细胞生长相关。此外,Tph-1活性的降低会通过为肥大细胞提供足够水平的必需氨基酸色氨酸来驱动抗肿瘤免疫力,从而刺激免疫系统。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物降低了Tph-1表达的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物通过降低Tph-1的水平而触发免疫刺激和治疗和/或预防本文公开的疾病。

[0763] 实施例30-在ConA刺激来自BALB/c小鼠的脾细胞后,以登录号NCIMB 43385保藏的巨球菌菌株增加IFN γ 和IL-6的产生

[0764] 从BALB/c小鼠分离并用ConA刺激的脾细胞中,针对活生物治疗菌株离体筛选免疫标志物产生的功效。

[0765] 图67显示了本发明的组合物显著增加促炎性细胞因子IFN γ 和IL-6的产生的能力。如上所述,这两种细胞因子都参与免疫应答的刺激。此外,IFN γ 具有显著的杀肿瘤活性。

[0766] 因此,如上所述,在某些实施方案中,本发明的组合物增加了IFN γ 和/或IL-6的产生,因此驱动了免疫应答的刺激。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物的治疗益处与IFN γ 和/或IL-6产生的增加有关。

[0767] 实施例30-以登录号NCIMB 43385保藏的巨球菌参考菌株显著增加IL-6和CD11b表达

[0768] 对BALB/c小鼠施用活生物治疗剂,并使用qPCR分离组织以用于基因表达分析。

[0769] 图68证实了与媒介物对照相比,NCIMB 43385能够显著提高BALB/c小鼠海马中的IL-6和CD11b表达。

[0770] 因此,如上所述,在某些实施方案中,本发明的组合物增加了与刺激免疫应答有关的促炎性细胞因子、特别是IL-6和CD11b的表达。在某些实施方案中,鉴于IL-6和CD11b表达的增加,本发明的组合物在治疗上有效。

[0771] 实施例31-NCIMB 42787增加TLR4表达

[0772] 对BALB/c小鼠施用活生物治疗剂,并使用qPCR分离组织用于基因表达分析。

[0773] 图69证实了与媒介物对照相比,NCIMB 42787能够显著提高BALB/c小鼠杏仁核中的TLR4表达。

[0774] TLR4与激活免疫应答相关。因此,增加TLR4表达将提高免疫刺激。在某些实施方案中,本发明的组合物增加TLR4的表达。在某些实施方案中,TLR4表达的增加提高了免疫应答。在某些实施方案中,本发明的组合物提高免疫应答,并通过增加TLR4表达而在治疗本文

公开的疾病中具有治疗效果。

[0775] 序列

[0776] SEQ ID NO:1 (马氏巨球菌菌株MRx0029的共同16S rRNA序列)

TGAGAAGCTTGCTTCTTATCGATTCTAGTGGCAAACGGGTGAGTAACGCGTAAGCAACC
TGCCCTTCAGATGGGGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGAATACGTTCTTTCC
GCCGCATGACGGGAAGAAGAAAGGGAGGCCTTCGGGCTTTCGCTGGAGGAGGGGCTTG
CGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAAACGGCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGTC

TGAGAGGATGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGA
TGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTGTTATATGGGACGAACAGGACATCGGTTAATAC
CCGGTGTCTTTGACGGTACCGTAAGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGC
GGCATCGCAAGTCGGTCTTAAAAGTGCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGACCGAAACTGT
GAAGCTCGAGTGTGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
[0777] TATTAGGAGGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGCTTCTGACGACAACCTGACGCTGAGGC
GCGAAAGCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGAT
GGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACTCCTTCTGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATC
CCGCCGTTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCAC
AAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGCCTTGAC
ATTGATTGCTACGGAAGAGATTTCCGGTCTTCTTCGGAAGACAAGAAAACAGGTGGT
GCACGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCCTATCTTCTGTTGCCAGCACCTCGGGTGGGGACTCAGAAGAGACTGCCGCAGACAA
TGCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGGCTTGGGCTACACA
CGTACTACAATGGCTCTTAATAGAGGGAAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCCAA
AAACAGAGTCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCAGGAATCGCT
AGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCACACCACGAAAGTCATTACACCCGAAGCCGGTGAGGCAACCGCAAG

[0778] 用于qPCR的引物

名称	正向序列	反向序列
<i>GAPDH</i>	GGTATCGTGGAAGGACTCATG (SEQ ID NO:2)	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC (SEQ ID NO:3)
<i>MAP2</i>	CTCAGCACCGCTAACAGAGG (SEQ ID NO:4)	CATTGGCGCTTCTCTCCTC (SEQ ID NO:5)
<i>GPR109a</i>	ATGTTGGCTATGAACCGCCAG (SEQ ID NO:6)	GCTGCTGTCCGATTGGAGA (SEQ ID NO:7)

[0780] SEQ ID NO:8 (以登录号NCIMB 43385保藏的巨球菌菌株的共同16S rRNA序列)

GGCTGGTTCCCTTGCGGTTGCCCTACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTTTCGTGGTGTGACG
GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCAGTATGCTGACCTGCGATTACTA
[0781] GCGATTCTTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGGGACTCTGTTTTT
GGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCCTTCGCTTCCCTCTATTAAAGAGCCATTGTAGTACGTGTG
TAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGCATTGTC

TGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCCTTAGTGCTGGCAACAGAAGATAGGGGTTGCG
CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCGTGCACCAC
CTGTTTTCTTGTCTTCCGAAGAAGAACCGGAAATCTCTTTCCGTAGCAATCAATGTCAAG
GCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTAT
TGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGAGTCGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACG
GCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTTGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGCGTCA
GTTGTCGTCCAGAAAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTAC
CGCTACACTAGGAATTCCGCTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTCACAGTTTCGGTCCCCT
[0782] CACGGGGTTAAGCCCCGCACCTTTTAAGACCGACTTGCGATGCCGCCTGCGCGCCCTTTAC
GCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG
TTAGCCGTGGCTTTCTCTTACGGTACCGTCAGGGATAACGGGTATTGACCGCTATCCTGT
TCGTCCCATATAACAGAACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTC
CGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC
CGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTCATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTCGCCTTG
GTGGGCCGTTACCCCTCCAAGTACTAATCAGACGCAAGCCCCCTCCTCCAGCGAAAGCC
CGAAGGCCTCCCTTTCTTCATCCCGTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTCGGTATTAGCA
GCCGTTTCCAGCTGTTGTCCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCGTTACTCACCCGTT
TGCCACTCGAATTGATAAGAAGCAAGCTTCTCATC

[0783] SEQ ID NO:9 (以登录号NCIMB 43388保藏的马氏巨球菌菌株的共同16S rRNA序
列)

GGCTGGTTCCCTTGCGGTTGCCCTACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTTTCGTGGTGTGACG
GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCAGTATGCTGACCTGCGATTACTA
GCGATTCCCTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGGGACTCTGTTTTT
GGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCCTTCGCTTCCCTCTATTAAGAGCCATTGTAGTACGTGTG
TAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGCATTGTC
TGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCGAGGTGCTGGCAACAGAAGATAGGGGTTGCG
CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCGTGCACCAC
CTGTTTTCTTGTCTTCCGAAGAAGAACCGGAAATCTCTTTCCGTAGCAATCAATGTCAAG
GCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGATACTTAT
TGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGAGTCGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCGTTTACG
GCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTTGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGCGTCA
GTTGTCGTCCAGAAAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTAC
CGCTACACTAGGAATTCCGCTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTCACAGTTTCGGTCCCCT
CACGGGGTTAAGCCCCGCACCTTTTAAGACCGACTTGCGATGCCGCCTGCGCGCCCTTTAC
GCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG

[0784] TTAGCCGTGGCTTTCTCTTACGGTACCGTCAAAGACACCGGGTATTAAACCGATGTCCTGT
TCGTCCCATATAACAGAACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTC
CGTCAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC
CGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTCATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTCGCCTTG
GTGGGCCGTTACCCCTCCAAGTACTAATCAGACGCAAGCCCCCTCCTCCAGCGAAAGCC
CGAAGGCCTCCCTTTCTTCTTCCCGTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTCGGTATTAGCAG
CCGTTTCCAGCTGTTGTCCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCGTTACTCACCCGTTT

[0785] SEQ ID NO:10 (以登录号NCIMB 43389保藏的马氏巨球菌菌株的共同16S rRNA序
列)

[0786]

CGACGGCTGGTTCCTTGCGGTTGCCTCACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTTTCGTGGTGT
GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCAGTATGCTGACCTGCGATT
ACTAGCGATTCTTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAC TGGGACTCTG
TTTTTGGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCTTCGCTTCCCTCTATTAAGAGCCATTGTAGTACG
TGTGTAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGCAT
TGTCTGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCGAGGTGCTGGCAACAGAAGATAGGGGT
TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCGTGCA
CCACCTGTTTTCTTGCTTCCGAAGAAGAACCGGAAATCTCTTTCCGTAGCAATCAATGT
CAAGGCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTTCGAATTAAACCACATACTCCACCGCTTGTG
CGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGATAC
TTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGAGTCGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCGTT
TACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTTGCTCCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGC
GTCAGTTGTCGTCCAGAAAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATT
TCACCGCTACACTAGGAATTCGCTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTCACAGTTTCGGTC
CCCTCACGGGGTTAAGCCCCGCACCTTTAAGACCGACTTGCGATGCCGCCTGCGCGCCCT
TTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGCAC
GTAGTTAGCCGTGGCTTTCTCTTACGGTACCGTCAAAGACACCGGGTATTAACCGATGCC
CTGTTTCGTCCCATATAACAGAACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTACGCGGGCGTT
GCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCTTCCCGTAGGAGTCT
GGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTCATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTTCGC
CTTGGTGGGCCGTTACCCCTCCAACCAGCTAATCAGACGCAAGCCCCCTCTCCAGCGAA
AGCCCGAAGGCCCTCCCTTTCCTTCTCCCGTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTCGGTATTA
GCAGCCGTTTCAGCTGTTGTCCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCGTTACTCACCC
GTTTGCCACTAGAATCGATAAGAAGCAAGCTTCTCATGTCTTCTCGTTTCGACTTGCAT

[0787] SEQ ID NO:11 (以登录号NCIMB 43386保藏的巨球菌菌株的共同16S rRNA序列)

[0788]

CGACGGCTGGTTCCTTGCGGTTGCCTACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTTTCGTGGTGT
GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGTATGCTGACCTGCGATT
ACTAGCGATTCCCTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAC TGGGACTCTG
TTTTTGGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCTTCGCTTCCCTCTATTAAGAGCCATTGTAGTACG
TGTGTAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCGCC TCCCTCCGCAT
TGTCTGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCTTAGTGCTGGCAACAGAAGATAGGGGTT
GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCGTGCAC
CACCTGTTTTCTTGCTTCCGAAGAAGAACCGGAAATCTCTTTCCGTAGCAATCAATGTC
AAGGCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGC
GGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGATACT
TATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGAGTCGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCGTTT
ACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTTGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGCG
TCAGTTGTCGTCCAGAAAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTT
CACCGCTACACTAGGAATTCCGCTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTCACAGTTTCGGTCC
CCTCACGGGGTTAAGCCCCGCATTTTAAGACCGACTTGCGATGCCGCTGCGCGCCCTT
TACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG
TAGTTAGCCGTGGCTTTCTCTTACGGTACCGTCAGGGATAACGGGTATTGACCGCTATCC
TGTTCTGTCATATAACAGAACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTACGCGGCGGTTG
CTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG
GGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTCATCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTCGCC
TTGGTGGGCGGTTACCCCTCCAAGTAGCTAATCAGACGCAAGCCCCCTCTCCAGCGAAA
GCCCGAAGGCCTCCCTTTCTTCATCCCGTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTCGGTATTAG
CAGCCGTTTCCAGCTGTTGTCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCGTTACTACCCCG
TTTGCCACTCGAATTGATAAGAAGCAAGCTTCTCATCTCTTCTCGTTTCGACTGCA

[0789] SEQ ID NO:12 (以登录号NCIMB 43387保藏的巨球菌菌株的共同16S rRNA序列)

TCGAACGGCTGGTTCCTTGCGGTTGCCTACCGGCTTCGGGTGTGAATGACTTTCGTGGT
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGTATGCTGACCTGCGA
TTACTAGCGATTCCCTGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAC TGGGACTCT
GTTTTTGGGGTTTGCTCCGGATCGCTCCTTCGCTTCCCTCTATTAAGAGCCATTGTAGTAC
GTGTGTAGCCCAAGCCATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCGCC TCCCTCCGC
ATTGCTGCGGCAGTCTCTTCTGAGTCCCCACCCTTAGTGCTGGCAACAGAAGATAGGG
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCGTG
CACCACTGTTTTCTTGCTTCCGAAGAAGAACCGGAAATCTCTTTCCGTAGCAATCAAT
GTCAAGGCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTG
TGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGAT
ACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGAGTCGATACCTCCTACACCTAGTATCCATCG

[0790]

TTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTTGCTCCCTGGCTTTCGCGCCTCA
 GCGTCAGTTGTCGTCCAGAAAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCTCTAATATCTACGCA
 TTTACCGCTACACTAGGAATTCGCTTTCCTCTCCGACACTCGAGCTTCACAGTTTCGG
 TCCCTCACGGGGTTAAGCCCCGCACTTTAAAGACCGACTTGCGATGCCGCTGCGCGCC
 CTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
 CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCCTTACGGTACCGTCAGGGATAACGGGTATTGACCGCTAT
 CCTGTTTCGTCCCATATAACAGAACTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCGTTCACGCGGCGT
 TGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTC
 TGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTCATCTCTCAGACCGGCTACTGATCGTCG
 CCTTGGTGGGCCGTTACCCCTCCAAGTAACTAGCTAATCAGACGCAAGCCCTCCTCCAGCGA
 AAGCCCGAAGGCCTCCCTTTCATCCCGTCATGCGGCGGAAAGAACGTATTCGGTATT
 AGCAGCCGTTTCAGCTGTTGTCCCATCTGAAGGGCAGGTTGCTTACGCGTTACTCACC
 CGTTTGCCACTCGAATTGATAAGAAGCAAGCTTCTCATCTCTTCTCGTTCGACTTGCA

[0792] 用于烯醇酶的qPCR的引物

名称	正向序列	反向序列
[0793] NSE	CCCTGTATCGTAAGAACGGT (SEQ ID NO:13)	GCCACCATTGATCACGTTGA (SEQ ID NO:14)

[0794] 参考文献

- [0795] [1]Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol.9 (4) :279-90.
- [0796] [2]Eckburg et al. (2005) Sience.10:308 (5728) :1635-8.
- [0797] [3]Macpherson et al. (2001) Microbes Infect,3 (12) :1021-35
- [0798] [4]Macpherson er al. (2002) Cell Mol Life Sci,59 (12) :2088-96.
- [0799] [5]Mazmanian et al. (2005) Cell 15;122 (1) :107-18.
- [0800] [6]Frank et al. (2007) PNA5 104 (34) :13780-5.
- [0801] [7]SCanlan et al. (2006) J Clin Microbiol.44 (11) :3980-8.
- [0802] [8]Kang et al. (2010) Inflanun Bowel Dis.16 (12) :2034-42.
- [0803] [9]Machiels et al. (2013) Gut.63 (8) :1275-83.
- [0804] [10]WO 2013/050792
- [0805] [11]WO 03/046580
- [0806] [12]WO 2013/008039
- [0807] [13]WO 2014/167338
- [0808] [14]Goldin and Gorbach (2008) Clin Infect Dis.46 Suppl 2:S96-100.
- [0809] [15]Azad et al. (2013) BMJ.347:f6471.
- [0810] [16]Padmanabhan et al. (2013) Standards in Genomic Sciences 8:525-538
- [0811] [17]Masco et al. (2003) Systematic and Applied Microbiology.26:557-563.
- [0812] [18]Srútková et al. (2011) J.Microbiol.Methods,87 (1) :10-6.
- [0813] [19]Kondělková et al. (2010) Acta Medica (Hradec Kralove) .;53 (2) :73-7.
- [0814] [20]Zhang et al. (2016) BMC Gastroenlerol.;16:84.
- [0815] [21]Ren and Torres (2009) Brain Res Rev.;60 (1) :57-64
- [0816] [22]Martinon et al. (2002) Mol Cell.;10 (2) :417-26.
- [0817] [23]Murphy et al. (2003) J Exp Med.2003;198 (12) :1951-1957.

- [0818] [24]Chan et al.(2006) J Exp Med.;203(12):2577-2587.
- [0819] [25]The Immune Response Basic and Clinical Principles,1st Edition (2006)
- [0820] [26]Hoover et al.(2002) J Biol Chem.277(40):37647-54.
- [0821] [27]Kaser et al,(2004) J Clin Immunol.;24(1):74-85.
- [0822] [28]Gaur and Aggarwal (2003) Biochem Pharmacol.;6(8):1403-8.
- [0823] [29]Wang and Lin(2008) Acta PharmacolSin.;29(11):1275-1288.
- [0824] [30]Tanaka et al.(2014) Cold Spring Harb Perspect Biol.;6(10):a016295.
- [0825] [31]Bettelli et al.(2006) Nature 441:235-238
- [0826] [32]Menezes and Luskin(1990) Journal of Neuroscience,14(9) 5399-5416:
- [0827] [33]Bhat et al.(2006) Nucleic Acids Res.;34(13):3819-32.
- [0828] [34]Andreeff et al.(2003),Holland-Frei Cancer Medicine.6th edition.
- [0829] [35]Soltani MH et al,(2005) Am J Pathol:166:1841-50
- [0830] [36]Jandaghi et al.(2016) Gastroenterology;151(6):1218-1231.
- [0831] [37]Pomour et al.(2015) Recent Pat Anticancer Drug Discov.;10(2):214-23.
- [0832] [38]Sachlos et al.(2012) Cell.;149(6):1284-97
- [0833] [39]Li et al.(2014), OncoTarget.;5(4):882-93.
- [0834] [40]Visnyei et al.(2011) Mol Cancer Ther.;10(10):1818-28.
- [0835] [41]Cheng et al.(2015) Cell Death Dis.;6:e1753
- [0836] [42]Shin et al.(2012) Biol Pharm Bull.;35(7):1069-75.
- [0837] [43]Chen et al.(2011) PLoS One.;6(11):e27186
- [0838] [44]Arvigo et al.(2010) J Endocrinol.;207(3):309-17.
- [0839] [45]Mao et al.(2015) J Obstet Gynaecol Res.;41(8):1240-5
- [0840] [46]Park et al.(2014) Oncotarget.;5(13):4929-34.
- [0841] [47]Spengler et al.(2011) Anticancer Res.;31(12):4201-5.
- [0842] [48]Mu et al.(2014) Oncol Rep.;31(5):2107-14.
- [0843] [49]Prabhu et al.(2017) Neuro-Oncology,19(6) vi60
- [0844] [50]Devarajan et al.(2002) Oncogene.12:21(57):8843-51.
- [0845] [51]Bell and Megeney (2017) Cell Death Differ.;24(8):1359-1368.
- [0846] [52]Gerl and Vanx (2005) Carcinogenesis.2005 Feb;26(2):263-70.
- [0847] [53]Barnes et al.(2005) Eur Respir J.25:552-563.
- [0848] [54]Gray SG,Dangond F.(2006) Epigenetics.1:67-75.
- [0849] [55]Grabiec et al.(2008) Arthritis Res Ther.10:226.
- [0850] [56]Saito et al.(1999) Proc Natl Acad Sci USA.96:4592-4597.
- [0851] [57]Butler et al.(2000) Cancer Res.60:5165-5170.
- [0852] [58]Mwakwari et al.(2010) Curr Top Med Chem.10(14):1423-40.
- [0853] [59]Monneret C.(2007) Anti-Cancer Drugs.18(4):363-70.
- [0854] [60]Chun.(2015) Arch Pharm Res.38(6):933-49.

- [0855] [61]Abel and Zukin(2008)Curr Opin Pharmacol,2008.8(1):57-64.
- [0856] [62]PCT/EP2018/065858
- [0857] [63]Toshkov et al,(2017)Radiat Res.187(5):570-580
- [0858] [64]Tanaka and Sakaguchi (2017)Cell Res.:27(1):109-118.
- [0859] [65]Allen et al.(2010)J Exp Med.;207(5):1045-56.
- [0860] [66]Haabeth et al.(2012)Oncolnumunology 1(1):1146-1152.
- [0861] [67]Lejeune et al.(2006)Cancer Immun.6:6
- [0862] [68]Pace et al.(1983)PNAS.80:8782-6.
- [0863] [69]Sgadari et al.(1996)PNAS.93:13791-6.
- [0864] [70]Arenberget al.(1996)J.Exp.Med.184:981-92.
- [0865] [71]Sgadari et al.(1997)Blood.89:2635-43.
- [0866] [72]Liuet al.,(2018)Acta Phannaceutica Sinica B;8,4:552-562
- [0867] [73]Jones et al.(2017)J Clin Oncol.2017 Aug 10;35(23):2624-2630
- [0868] [74]Ascierto et al.(2012)Journal of Translational Medicine.10,85
- [0869] [75]<https://www.uniprot.org/uniprot/P15056>
- [0870] [76]Soltani MH et al.(2005)Am J Pathol;166:1841-50
- [0871] [77]Xie(2016);Med Res Rev;36,2:300-312
- [0872] [78]Bloch et al.(2016)Eur Cytokine Netw.:27(3):63-67
- [0873] [79]Mohanty et al.(2015)J Infect Dis.211(7)1174-1184.
- [0874] [80]Fernandez-Ruiz et al.,(2015)Vaccine 2015 33(51)
- [0875] [81]Morel et al.,(2011)Vaccine.29(13)2461-2473.
- [0876] [82]Leal et al.,(2001)Immunol 103(3)375-381
- [0877] [83]Knudsen et al.(2016),Sci Reps,6(19570).
- [0878] [84]Su et al.,(2008)Vaccine 26(40).5111-22
- [0879] [85]Song,Mol Ther 2007
- [0880] [86]Li et al,(2007)J Immunol,178(8),5271-5276
- [0881] [87]Coffman et al.,(2012)Immunity 33(4)492-503
- [0882] [88]Ruan et al.(2014)Acta Virol.58(4):356-8
- [0883] [89]Wang et al.(2016)Oncotarget.20:7(51)
- [0884] [90]Fraietta.Nat Med 2018
- [0885] [91]Zhou,Blood 2010
- [0886] [92]Glenn and Whartenby(2014)World J Stem Cells.;6(5):526-539.
- [0887] [93]Heng et al.(2004)Cardiovasc Res.2004 Apr 1;62(1):34-42.
- [0888] [94]Fulop et al
- [0889] [95]Bektas et al.(2017)J LeukocBiol.;102(4):977-988.
- [0890] [96]Fulop et al(2016)Rev Invest Clin.;68(2):84-91.
- [0891] [97]Fulop et al.(2018)Front Immunol.;8:1960.
- [0892] [98]Miyamoto-Shinohara et al.(2008)J.Gen.Appl.Microbiol.,54,9-24.
- [0893] [99]Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.ed.by Day and

McLellan, Humana Press.

[0894] [100] Leslie et al. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592-3597.

[0895] [101] Mitroponlou et al. (2013) J Nutr Metab. (2013) 716861.

[0896] [102] Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intesr Microbiol. 3 (2) :39-48.

[0897] [103] Handbook of Pharmaccutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller

[0898] [104] Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985)

[0899] [105] Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.

[0900] [106] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press

[0901] [107] Strobel (2009) Methods Mol Biol. 581:247-61.

[0902] [108] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.

[0903] [109] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).

[0904] [110] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press. Inc.)

[0905] [111] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)

[0906] [112] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0907] [113] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Prdss. 1997)

[0908] [114] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols).

[0909] [115] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)

[0910] [116] Current Prolocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30

[0911] [117] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Matg. 2:482-489

[0912] [118] Johnsen et al (2017) Journal of Chromatography A. 1503:57-64

[0913] [119] West and Johnstone (2014) J Clin Invest. 124, 30-39

[0914] [120] Glauben et al. (2006) J Immunol, 176:5015-5022

[0915] [121] Angiolilli et al. (2017) Ann Rheum Dis, 76:277-285

[0916] [122] Gonneaud et al. (2014) J Inflamm, 11:43

[0917] [123] Alenghat et al. (2013) Nature, 504:153-157

- [0918] [124]Felice et al.(2015)Ailment Pharmacol Ther,41:26-38
- [0919] [125]Gagnon et al(2013)J Microbiological Methods.94:274-279
- [0920] [126]Thangaraju et al.(2009).Cancer Res.67,9:2826-2832
- [0921] [127]Livak&Schmittgen(2001).Methods.25,4:402-8
- [0922] [128]Johnsen et al(2017)Journal of Chromatography A.1503:57-64
- [0923] [129]Vizin and Kos(2015)Radiol Oncol.49(3):217226
- [0924] [130]Selvan et al.(2008)AACR Annual Meeting Apr 12-16,2008
- [0925] [131]Bonner et al.(2000)Clinical Cancer Research 6:597-601
- [0926] [132]Zhi et al.(2016)Oncotarget.7(40):64798-64809
- [0927] [133]De Baere et al.(2013)J Pharm Biomed Anal,80:107-115
- [0928] [134]Smart et al.(2010)Nat Protoc,5(10),1709-1729
- [0929] [135]Johnsen et al.(2017)J Chromatogr A,1503,57-64
- [0930] PCT
- [0931] (电子版原件)
- [0932] (此页不是也不算为国际申请的页)

	0-1	表 PCT/RO/134 关于微生物保藏或其它生物材 料的说明 (PCT 细则 13 之二)	
	0-1-1	准备使用	PCT 在线提交 版本 3.51.000.262e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
	0-2	国际申请号	
	0-3	申请人或代理人档案号	P073343WO
[0933]	1	对下述说明书中所述的已保藏 的微生物或其它生物材料的说 明:	
	1-1	页数	9
	1-2	行数	9-12
	1-3	保藏证明	
	1-3-1	保藏单位名称	NCIMB 国家工业、食品和海洋细菌保藏中心 (NCIMB)
	1-3-2	保藏单位地址	NCIMB 有限公司, 弗格森大厦, 克莱伯斯通庄园, 巴克斯伯恩, 亚伯丁, AB21 9YA, 英国
	1-3-3	保藏日期	2017 年 7 月 13 日 (13.07.2017)
	1-3-4	保藏号	NCIMB 42787
	1-5	为哪个指定国而作	所有指定国
	2	对下述说明书中所述的已保藏 的微生物或其它生物材料的说 明:	
	2-1	页数	12
	2-2	行数	13-17
	2-3	保藏证明	
	2-3-1	保藏单位名称	NCIMB 国家工业、食品和海洋细菌保藏中心 (NCIMB)
	2-3-2	保藏单位地址	NCIMB 有限公司, 弗格森大厦, 克莱伯斯通庄园, 巴克斯伯恩, 亚伯丁, AB21 9YA, 英国
	2-3-3	保藏日期	2019 年 5 月 6 日 (06.05.2019)
	2-3-4	保藏号	NCIMB 43385
	2-5	为哪个指定国而作	所有指定国

[0934]

3	对下述说明书中所述的已保藏的微生物或其它生物材料的说明:	
3-1	页数	12
3-2	行数	13-17
3-3	保藏证明	
3-3-1	保藏单位名称	NCIMB 国家工业、食品和海洋细菌保藏中心 (NCIMB)
3-3-2	保藏单位地址	NCIMB 有限公司, 弗格森大厦, 克莱伯斯通庄园, 巴克斯伯恩, 亚伯丁, AB21 9YA, 英国
3-3-3	保藏日期	2019 年 5 月 6 日 (06.05.2019)
3-3-4	保藏号	NCIMB 43386
3-5	为哪个指定国而作	所有指定国
4	对下述说明书中所述的已保藏的微生物或其它生物材料的说明:	
4-1	页数	12
4-2	行数	13-17
4-3	保藏证明	
4-3-1	保藏单位名称	NCIMB 国家工业、食品和海洋细菌保藏中心 (NCIMB)
4-3-2	保藏单位地址	NCIMB 有限公司, 弗格森大厦, 克莱伯斯通庄园, 巴克斯伯恩, 亚伯丁, AB21 9YA, 英国
4-3-3	保藏日期	2019 年 5 月 6 日 (06.05.2019)
4-3-4	保藏号	NCIMB 43387
4-5	为哪个指定国而作	所有指定国
5	对下述说明书中所述的已保藏的微生物或其它生物材料的说明:	
5-1	页数	12
5-2	行数	13-17
5-3	保藏证明	
5-3-1	保藏单位名称	NCIMB 国家工业、食品和海洋细菌保藏中心 (NCIMB)
5-3-2	保藏单位地址	NCIMB 有限公司, 弗格森大厦, 克莱伯斯通庄园, 巴克斯伯恩, 亚伯丁, AB21 9YA, 英国
5-3-3	保藏日期	2019 年 5 月 6 日 (06.05.2019)
5-3-4	保藏号	NCIMB 43388
5-5	为哪个指定国而作	所有指定国

[0935]	6	对下述说明书中所述的已保藏的微生物或其它生物材料的说明:	
	6-1	页数	12
	6-2	行数	13-17
	6-3	保藏证明	
	6-3-1	保藏单位名称	NCIMB 国家工业、食品和海洋细菌保藏中心 (NCIMB)
	6-3-2	保藏单位地址	NCIMB 有限公司, 弗格森大厦, 克莱伯斯通庄园, 巴克斯伯恩, 亚伯丁, AB21 9YA, 英国
	6-3-3	保藏日期	2019 年 5 月 6 日 (06.05.2019)
	6-3-4	保藏号	NCIMB 43389
	6-5	为哪个指定国而作	所有指定国
[0936]	由受理局填写		
[0937]	0-4	本表已经和国际申请一起收到: (是或否)	是
	0-4-1	授权官员	Brell, Eva
[0938]	由国际局填写		
[0939]	0-5	国际局收到本表日期:	
	0-5-1	授权官员	

序列表

<110> 4D药学研究有限公司(4D PHARMA RESEARCH LIMITED)

<120> 包含细菌菌株的组合物

<130> P073343W0

<141> 2019-05-13

<150> 18171893.3

<151> 2018-05-11

<150> 18178136

<151> 2018-06-15

<150> 1810386.1

<151> 2018-06-25

<150> 1813460.1

<151> 2018-08-17

<150> 1817642.0

<151> 2018-10-29

<150> 1820264.8

<151> 2018-12-12

<150> 1820256.4

<151> 2018-12-12

<160> 14

<170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1

<211> 1398

<212> DNA

<213> 马氏巨球菌菌株MRx0029的共同16S rRNA序列(consensus 16S rRNA sequence for *Megasphaera massiliensis* strain MRx0029)

<400> 1

```
tgagaagctt gcttcttata gattctagt gcaaacgggt gagtaacgcg taagcaacct 60
gcccttcaga tggggacaac agctggaaac ggctgctaata accgaatacg ttctttccgc 120
cgcatgacgg gaagaagaaa gggaggcctt cgggctttcg ctggaggagg ggcttgcgctc 180
tgattagcta gttggagggg taacggccca ccaaggcgac gatcagtagc cggcttgaga 240
ggatgaacgg ccacattggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtg 300
ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgaacg atgacggcct 360
tcgggttgta aagttctgtt atatgggacg aacaggacat cgggttaatac ccggtgtctt 420
tgacggtacc gtaagagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta 480
ggatggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaaggcg cgcaggcggc atcgcaagtc 540
ggctcttaaaa gtgcggggct taaccccggt aggggaccga aactgtgaag ctcgagtgtc 600
ggagaggaaa gcggaattcc tagttagcgt gtgaaatgcg tagatattag gaggaacacc 660
```

agtggcgaaa gcggttttct ggacgacaac tgacgctgag gcgcgaaagc caggggagca 720
aacgggatta gataccccgg tagtcctggc cgtaaagcat ggatactagg tgtaggaggt 780
atcgactcct tctgtgccgg agttaacgca ataagtatcc cgcctgggga gtacggccgc 840
aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagta tgtggtttta 900
ttcgacgcaa cgcgaagaac cttaccaagc cttgacattg attgctacgg aaagagattt 960
ccggttcttc ttcggaagac aagaaaacag gtggtgcacg gctgtcgtca gctcgtgtcg 1020
tgagatgttg ggtaagtcc cgcaacgagc gcaacccta tcttctgttg ccagcacctc 1080
gggtggggac tcagaagaga ctgccgcaga caatgcggag gaaggcgggg atgacgtcaa 1140
gtcatcatgc cccttatggc ttgggctaca cacgtactac aatggctctt aatagaggga 1200
agcgaaggag cgatccggag caaaccccaa aaacagagtc ccagttcgga ttgcaggctg 1260
caactcgcct gcatgaagca ggaatcgcta gtaatcgag gtcagcatac tgcggtgaat 1320
acgttccccg gccttgata caccgcccgt cacaccagc aagtcattca caccgaagc 1380
cggtgaggca accgcaag 1398

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> GAPDH正向引物 (GAPDH forward primer)

<400> 2

ggtatcgtgg aaggactcat g 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> GAPDH反向引物 (GAPDH reverse primer)

<400> 3

atgccagtga gcttcccgtt c 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> MAP2正向引物 (MAP2 forward primer)

<400> 4

ctcagaccg ctaacagagg 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> MAP2反向引物 (MAP2 reverse primer)

<400> 5

cattggcgct tctctcctc 19

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> GPR109a正向引物 (GPR109a forward primer)

<400> 6

atgttggcta tgaaccgcca g 21

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> GPR109a反向引物 (GPR109a reverse primer)

<400> 7

gctgctgtcc gattggaga 19

<210> 8

<211> 1409

<212> DNA

<213> 以登录号NCIMB 43385保藏的巨球菌菌株的共同16S rRNA序列 (consensus 16S rRNA sequence for the Megasphaera strain deposited under accession number NCIMB 43385)

<400> 8

```

ggctggttcc ttgcggttgc ctcaccggct tcgggtgtga atgactttcg tgggtgtgacg 60
ggcgggtgtgt acaaggcccg ggaacgtatt caccgcagta tgctgacctg cgattactag 120
cgattcctgc ttcatgcagg cgagttgcag cctgcaatcc gaactgggac tctgtttttg 180
gggttttgctc cggatcgctc cttcgcttcc ctctattaag agccattgta gtacgtgtgt 240
agcccaagcc ataaggggca tgatgacttg acgtcatccc cgccttcctc cgcattgtct 300
gcggcagtcct cttctgagtc cccaccctta gtgctggcaa cagaagatag gggttgcgct 360
cgttgcggga cttaacccaa catctcacga cagagctga cgacagccgt gcaccacctg 420
ttttcttgctc ttccgaagaa gaaccggaaa tctctttccg tagcaatcaa tgtcaaggct 480
tggttaagggt cttcgcgttg cgtcgaatta aaccacatac tccaccgctt gtgcggggccc 540
ccgtcaattc ctttgagttt cagccttgcg gccgtactcc ccaggcggga tacttattgc 600
gttaactccg gcacagaagg agtcgatacc tcctacacct agtatccatc gtttacggcc 660
aggactaccg gggatatctaa tcccgtttgc tcccctgget ttgcgcctc agcgtcagtt 720
gtcgtccaga aagccgcttt cgccactggg gttcctccta atatctacgc atttcaccgc 780
tacactagga attccgcttt cctctccgac actcgagctt cacagtttcg gtcccctcac 840
ggggttaagc cccgcacttt taagaccgac ttgcgatgcc gcctgcgcgc cttttacgcc 900
caataattcc ggacaacgct tgccacctac gtattaccgc ggctgctggc acgtagttag 960
ccgtggcttt ctcttacggt accgtcaggg ataacgggta ttgaccgcta tcctgttcgt 1020
cccatataac agaactttac aacccgaagg ccgtcatcgt tcacgcggcg ttgctccgctc 1080
agactttcgt ccattgcgga agattcccca ctgctgcctc ccgtaggagt ctggggccgtg 1140
tctcagtccc aatgtggccg ttcatcctct cagaccggct actgatcgtc gccttggtgg 1200
gccgttacct ctccaactag ctaatcagac gcaagccct cctccagcga aagcccgaag 1260
gcctcccttt cttcatcccg tcatgcggcg gaaagaacgt attcggtatt agcagccgtt 1320

```

tccagctggt gtcccatct gaagggcagg ttgcttacgc gttactcacc cgtttgccac 1380
tcgaattgat aagaagcaag cttctcatc 1409

<210> 9

<211> 1415

<212> DNA

<213> 以登录号NCIMB 43388保藏的马氏巨球菌菌株的共同16S rRNA序列(consensus 16S rRNA sequence for the *Megasphaera massilliensis* strain deposited under accession number NCIMB 43388)

<400> 9

ggctggttcc ttgcggttgc ctcaccggct tcgggtgtga atgactttcg tgggtgtgacg 60
ggcgtgtgtg acaaggcccc ggaacgtatt caccgcagta tgctgacctg cgattactag 120
cgattcctgc ttcatgcagg cgagttgcag cctgcaatcc gaactgggac tctgtttttg 180
gggtttgctc cggatcgctc cttcgttcc ctctattaag agccattgta gtacgtgtgt 240
agcccaagcc ataaggggca tgatgacttg acgtcatccc cgccttctc cgcattgtct 300
gcggcagtct cttctgagtc cccacccgag gtgctggcaa cagaagatag gggttgcgct 360
cgttgcggga cttaacccaa catctcacga cagagctga cgacagccgt gcaccacctg 420
ttttcttgct ttcgaagaa gaaccggaaa tctctttccg tagcaatcaa tgtcaaggct 480
tggttaagggt cttcgcgttg cgtcgaatta aaccacatac tccaccgctt gtgcgggccc 540
ccgtcaattc ctttgagttt cagccttgcg gccgtactcc ccaggcggga tacttattgc 600
gttaactccg gcacagaagg agtcgatacc tcctacacct agtatccatc gtttacggcc 660
aggactaccg gggatatctaa tcccgtttgc tcccctgget ttcgcgcctc agcgtcagtt 720
gtcgtccaga aagccgcttt cgccactggt gttcctccta atatctacgc atttcaccgc 780
tacactagga attccgcttt cctctccgac actcgagctt cacagtttcg gtcccctcac 840
gggggttaagc cccgcacttt taagaccgac ttgcgatgcc gcctgcgcgc cttttacgcc 900
caataattcc ggacaacgct tgccacctac gtattaccgc ggctgctggc acgtagttag 960
ccgtggcttt ctcttacggt accgtcaaag acaccgggta ttaaccgatg tcctgttcgt 1020
cccatataac agaactttac aaccggaagg ccgtcatcgt tcacgcggcg ttgctccgctc 1080
agactttcgt ccattgcgga agattcccca ctgctgcctc ccgtaggagt ctgggccgtg 1140
tctcagtcct aatgtggccg ttcactctct cagaccgget actgatcgtc gccttggtgg 1200
gccgttacct ctccaactag ctaatcagac gcaagccct cctccagcga aagccgaag 1260
gcctcccttt cttcttcccg tcatgcggcg gaaagaacgt attcggtatt agcagccgtt 1320
tccagctggt gtcccatct gaagggcagg ttgcttacgc gttactcacc cgtttgccac 1380
tagaatcgat aagaagcaag cttctcatgt cttct 1415

<210> 10

<211> 1433

<212> DNA

<213> 以登录号NCIMB 43389保藏的马氏巨球菌菌株的共同16S rRNA序列(consensus 16S rRNA sequence for the *Megasphaera massilliensis* strain deposited under accession number NCIMB 43389)

<400> 10

cgacggctgg ttccttgagg ttgcctcacc ggcttcgggt gtgaatgact ttcgtggtgt 60
 gacgggagggt gtgtacaagg cccgggaacg tattcaccgc agtatgctga cctgcgatta 120
 ctagcgattc ctgcttcatt caggcgagtt gcagcctgca atccgaactg ggactctgtt 180
 tttgggggttt gctccggatc gctccttcgc ttccctctat taagagccat tgtagtacgt 240
 gtgtagccca agccataagg ggcatgatga cttgacgtca tccccgcctt cctccgcatt 300
 gtctgcggca gtctcttctg agtccccacc cgagggtgctg gcaacagaag ataggggttg 360
 cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacag ccgtgcacca 420
 cctgtttttct tgtcttccga agaagaaccg gaaatctctt tccgtagcaa tcaatgtcaa 480
 ggcttggttaa ggttcttcgc gttgcgtcga attaaaccac atactccacc gcttgtgcgg 540
 gccccgtca attcctttga gtttcagcct tgccggcgta ctccccaggc gggatactta 600
 ttgcgttaac tccggcacag aaggagtcga tacctctac acctagtatc catcgtttac 660
 ggccaggact accgggggtat ctaatcccgt ttgtccctt ggcttttcgc cctcagcgtc 720
 agttgtcgtc cagaaagccg ctttcgccac tgggtgttct cctaatactt acgcatttca 780
 ccgtacact aggaattccg ctttcctctc cgacactcga gcttcacagt ttcgggtccc 840
 tcacgggggt aagccccgca cttttaagac cgacttgca tgccgcctgc gcgcccttta 900
 cgcccaataa ttccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggctgc tggcacgtag 960
 ttagccgtgg ctttctctta cggtagcgtc aaagacaccg ggtattaacc gatgccctgt 1020
 tcgtcccata taacagaact ttacaaccg aaggccgtca tcgttcacgc ggcgttgctc 1080
 cgtcagactt tcgtccattg cggaagattc cccactgctg cctcccgtag gagtctgggc 1140
 cgtgtctcag tcccaatgtg gccgttcatt ctctcagacc ggctactgat cgtcgccttg 1200
 gtgggcccgt acccctccaa ccagctaatt agacgcaagc ccctcctcca gcgaaagccc 1260
 gaaggcctcc ctttcttctt cccgtcatgc ggcggaaga acgtattcgg tattagcagc 1320
 cgtttccagc tgttgtcccc atctgaaggg caggttgctt acgcgttact caccggtttg 1380
 ccactagaat cgataagaag caagcttctc atgtcttctc gttcgacttg cat 1433

<210> 11

<211> 1431

<212> DNA

<213> 以登录号NCIMB 43386保藏的巨球菌菌株的共同16S rRNA序列(consensus 16S rRNA sequence for the Megasphaera strain deposited under accession number NCIMB 43386)

<400> 11

cgacggctgg ttccttgagg ttgcctcacc ggcttcgggt gtgaatgact ttcgtggtgt 60
 gacgggagggt gtgtacaagg cccgggaacg tattcaccgc agtatgctga cctgcgatta 120
 ctagcgattc ctgcttcatt caggcgagtt gcagcctgca atccgaactg ggactctgtt 180
 tttgggggttt gctccggatc gctccttcgc ttccctctat taagagccat tgtagtacgt 240
 gtgtagccca agccataagg ggcatgatga cttgacgtca tccccgcctt cctccgcatt 300
 gtctgcggca gtctcttctg agtccccacc cttagtgctg gcaacagaag ataggggttg 360
 cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacag ccgtgcacca 420

```

cctgttttct tgtcttccga agaagaaccg gaaatctctt tccgtagcaa tcaatgtcaa 480
ggcttggttaa ggttcttcgc gttgcgtcga attaaaccac atactccacc gcttgtgcgg 540
gcccccgta attcctttga gtttcagcct tgcggccgta ctccccaggc gggatactta 600
ttgcgttaac tccggcacag aaggagtcca tacctcctac acctagtatc catcgtttac 660
ggccaggact accgggggtat ctaatcccgt ttgctcccct ggctttcgcg cctcagcgtc 720
agttgtcgtc cagaaagccg ctttcgccac tgggtgttct cctaatatct acgcatttca 780
ccgctacact aggaattccg ctttcctctc cgacactcga gcttcacagt ttcgggtccc 840
tcacgggggtt aagccccgca cttttaagac cgacttgcca tgccgcctgc gcgcccttta 900
cgcccaataa ttccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggtgc tggcacgtag 960
ttagccgtgg ctttctctta cggtagcgtc agggataacg ggtattgacc gctatcctgt 1020
tcgtcccata taacagaact ttacaaccgc aaggccgtca tcgttcacgc ggcgttgctc 1080
cgtcagactt tcgtccattg cggaagattc cccactgctg cctcccgtag gagtctgggc 1140
cgtgtctcag tcccaatgtg gccgttcac ctctcagacc ggctactgat cgtcgccttg 1200
gtgggcccgtt acccctccaa ctagctaate agacgcaagc ccctcctcca gcgaaagccc 1260
gaaggcctcc ctttcttcat cccgtcatgc ggcggaagaa acgtattcgg tattagcagc 1320
cgtttccagc tgttgtcccc atctgaaggg caggttgctt acgcgttact caccggtttg 1380
ccactcgaat tgataagaag caagcttctc atctcttctc gttcgactgc a 1431

```

<210> 12

<211> 1434

<212> DNA

<213> 以登录号NCIMB 43387保藏的巨球菌菌株的共同16S rRNA序列(consensus 16S rRNA sequence for the *Megasphaera* strain deposited under accession number NCIMB 43387)

<400> 12

```

tcgaacggct ggttccttgc gttgcctca ccggcttcgg gtgtgaatga ctttcgtggt 60
gtgacgggcg gtgtgtacaa ggcccgggaa cgtattcacc gcagtatgct gacctgcgat 120
tactagcgat tcctgcttca tgcaggcgag ttgcagcctg caatccgaac tgggactctg 180
tttttgggggt ttgctccgga tcgctccttc gttccctct attagagcc attgtagtac 240
gtgtgtagcc caagccataa ggggcatgat gacttgacgt catccccgcc ttctcgcga 300
ttgtctgcgg cagtctcttc tgagtcccca cccttagtgc tggcaacaga agataggggt 360
tgcgctcggt gcgggactta acccaacatc tcacgacacg agctgacgac agccgtgcac 420
cacctgtttt cttgtcttcc gaagaagaac cggaatctc tttccgtagc aatcaatgtc 480
aaggcttggt aaggttcttc gcgttgctgc gaattaaacc acatactcca ccgcttgtgc 540
gggccccgt caattccttt gagtttcagc cttgcggccg tactccccag gcgggatact 600
tattgcgtta actccggcac agaaggagtc gatactcct acacctagta tccatcgttt 660
acggccagga ctaccggggt atctaatecc gtttgcctcc ctggctttcg cgcctcagcg 720
tcagttgtcg tccagaaagc cgctttcgcc actggtgttc ctctaatat ctacgcattt 780
caccgtaca ctaggaattc cgctttctc tccgacactc gagcttcaca gtttcgggtc 840
cctcacgggg ttaagccccg cacttttaag accgacttgc gatgccgcct gcgcgccctt 900

```

tacgccaat aattccggac aacgcttgcc acctacgtat taccgcggt gctggcacgt 960
agttagccgt ggctttctct tacggtaccg tcaggataa cgggtattga ccgctatcct 1020
gttcgtccca tataacagaa ctttacaacc cgaaggccgt catcggtcac gcggcggtgc 1080
tccgtcagac tttcgtccat tgcggaagat tccccactgc tgcctcccgt aggagtctgg 1140
gccgtgtctc agtcccaatg tggccgttca tcctctcaga ccggctactg atcgctgcct 1200
tggtggggccg ttaccctcc aactagctaa tcagacgcaa gcccctctc cagcgaaagc 1260
ccgaaggcct ccctttcttc atcccgtcat gcggcggaag gaacgtattc ggtattagca 1320
gccgtttcca gctgtgtcc ccactgaag ggcaggtgc ttacggtta ctcaccgtt 1380
tgccactcga attgataaga agcaagcttc tcactcttc tcgttcgact tgca 1434

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 烯醇酶qPCR正向引物 (Enolase qPCR forward primer)

<400> 13

ccctgtatcg taagaacggt 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 烯醇酶qPCR反向引物 (Enolase qPCR reverse primer)

<400> 14

gccaccattg atcacgttga 20

$\beta 3$ 微管蛋白的表达水平

图 1A:免疫标记和细胞成像

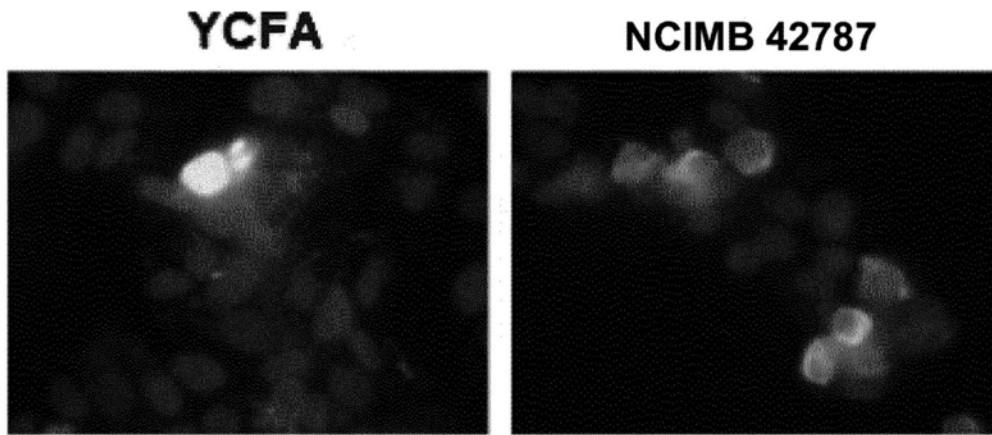


图 1B:免疫印迹

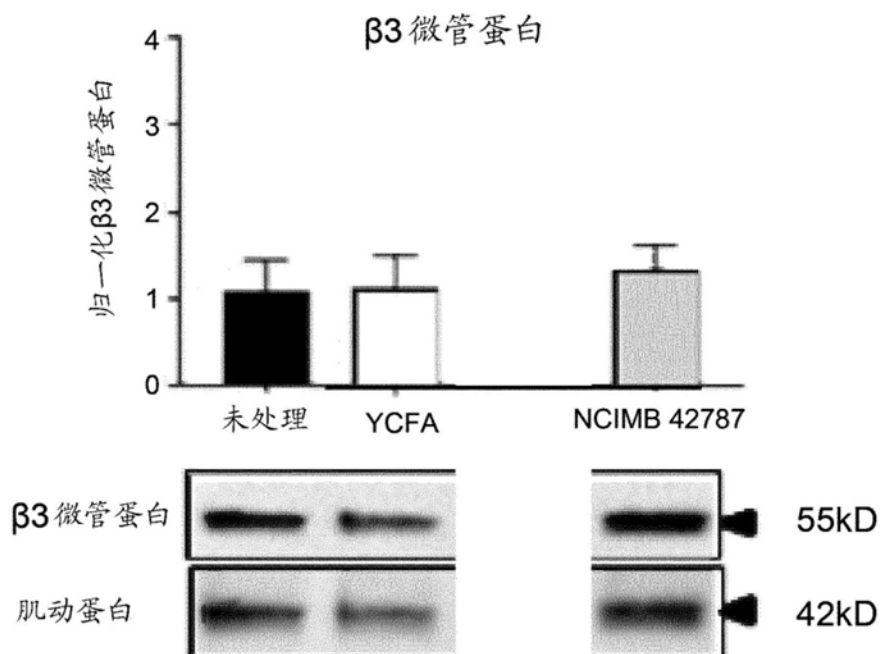


图1

MAP2的表达水平

图 2A: 免疫标记和细胞成像

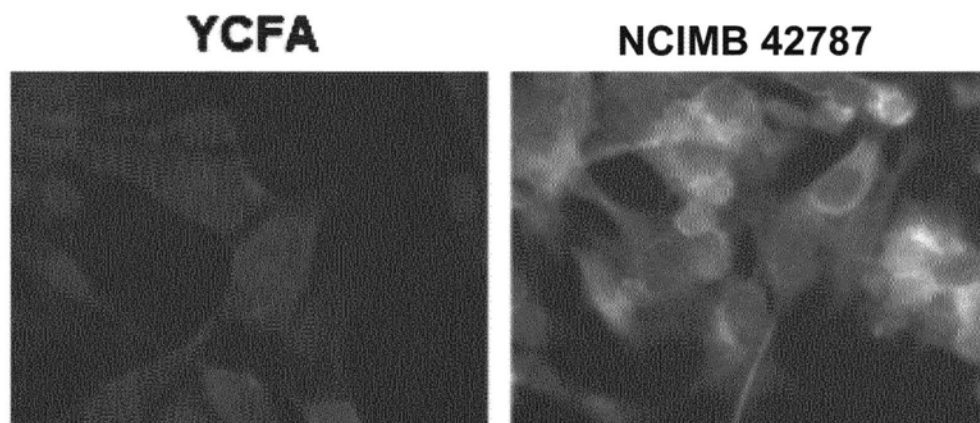


图 2B: 免疫印迹

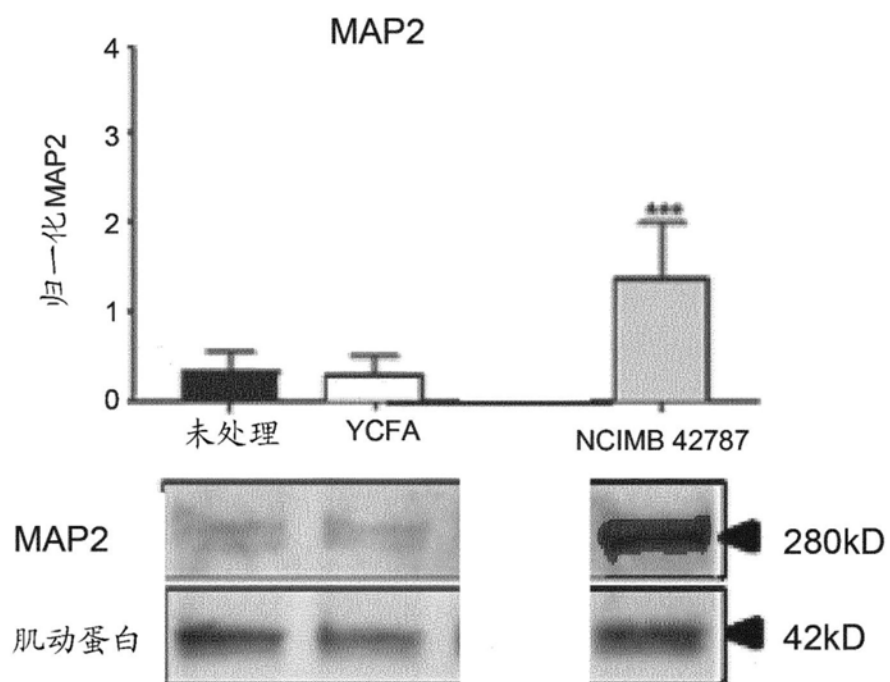


图 2C: 表达倍数变化

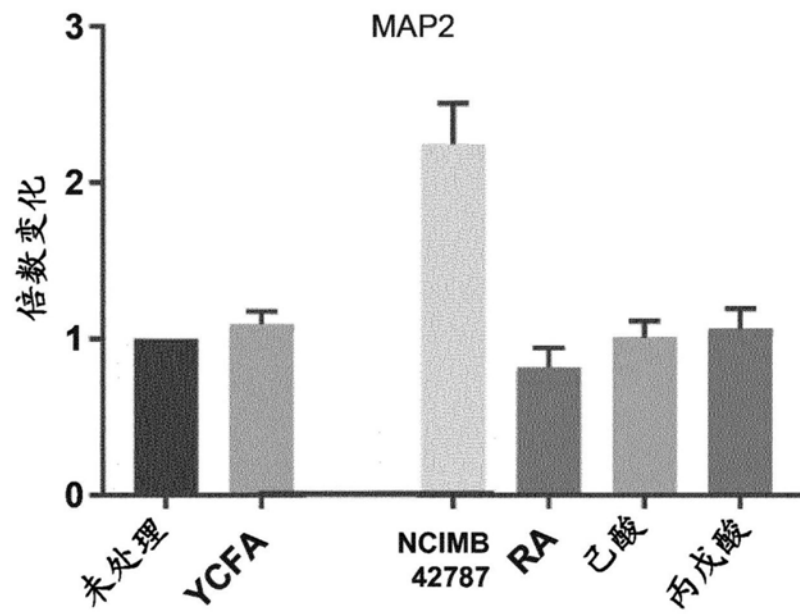


图2

DRD2表达的变化

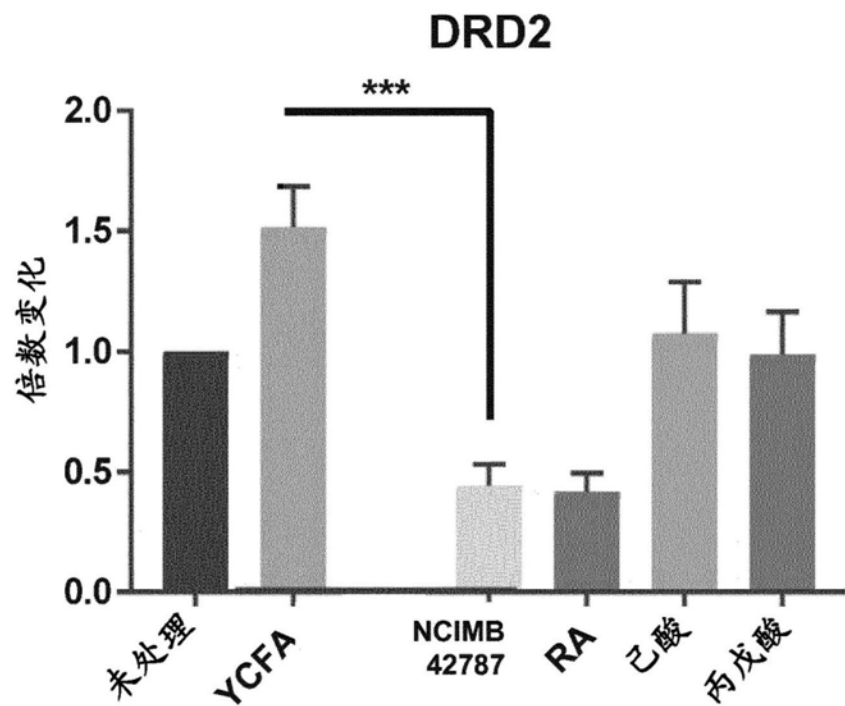


图3

Casp3表达的变化

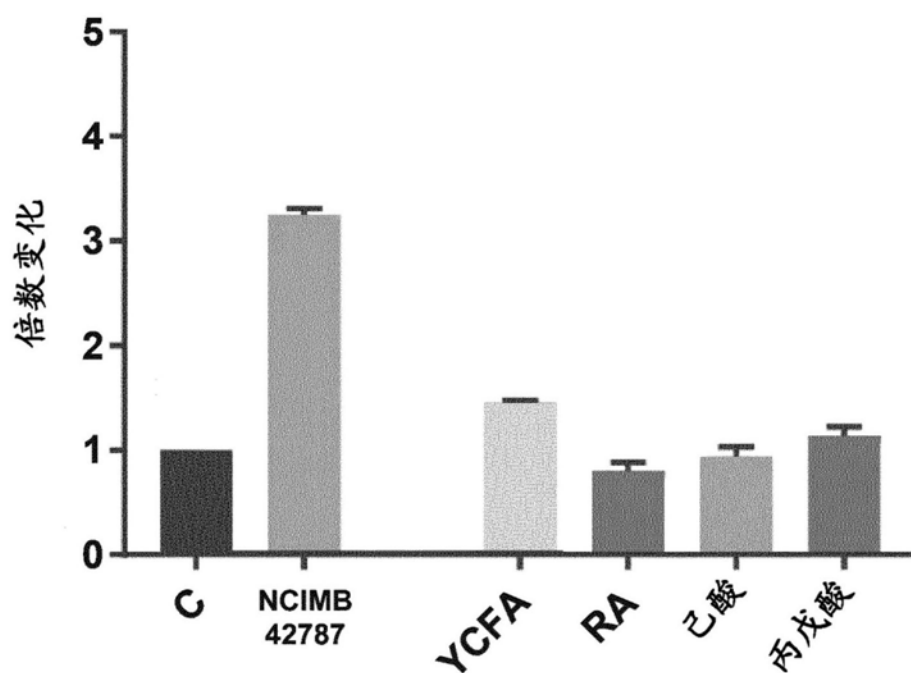
Casp3

图4

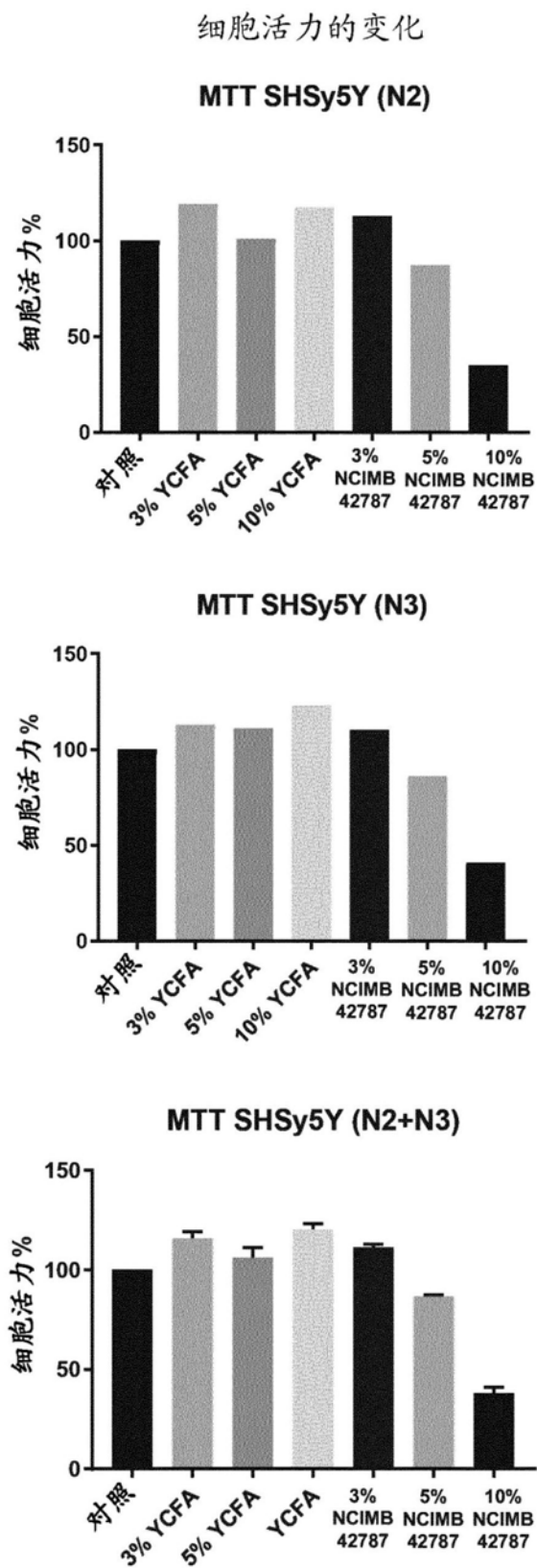


图5

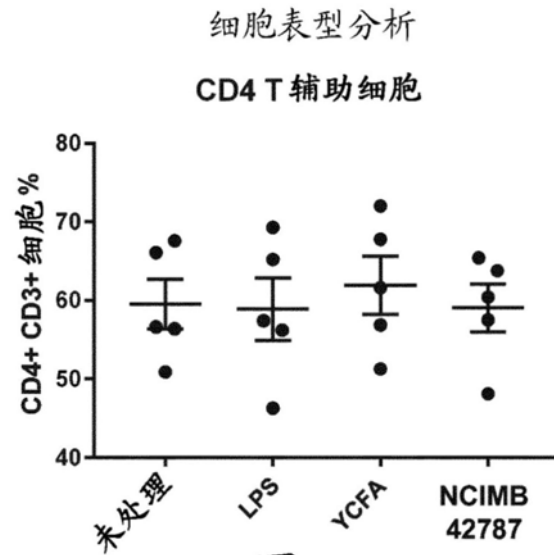


图 6A

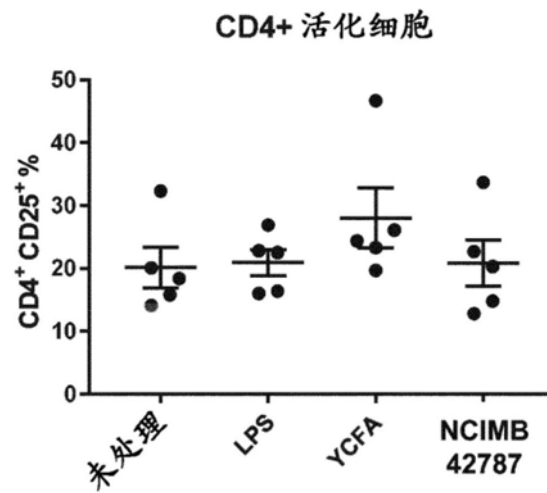


图 6B

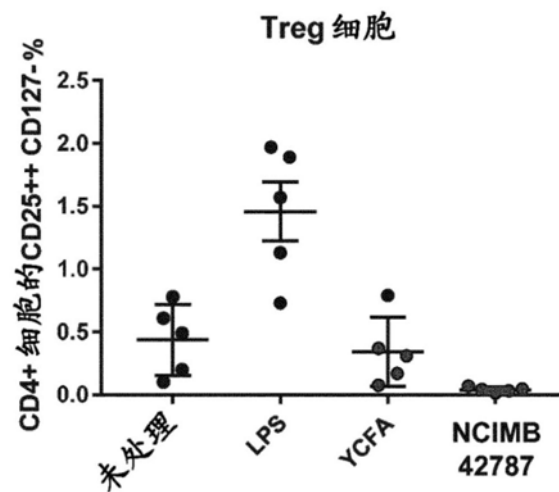


图 6C

图6

细胞表型分析

CD8 T细胞毒性细胞

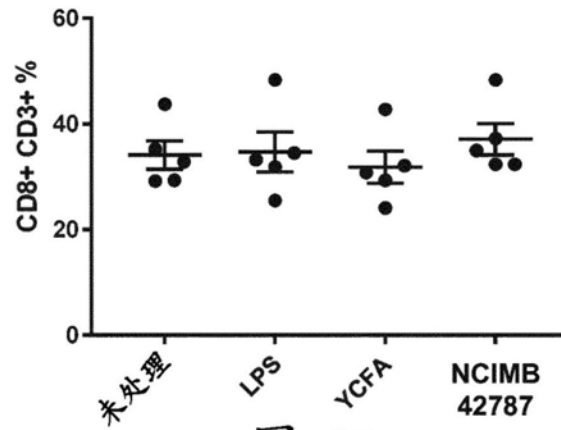


图 6D

CD8+ 活化细胞

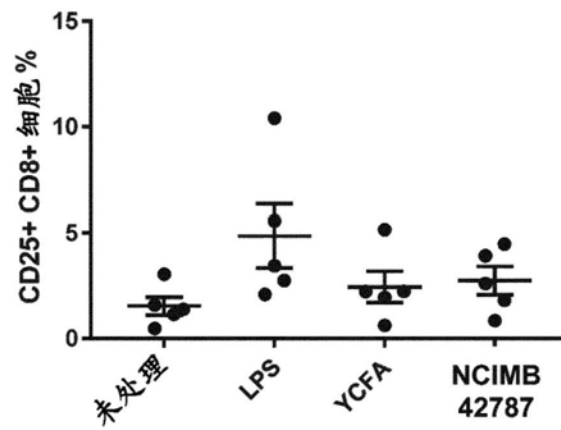


图 6E

B细胞

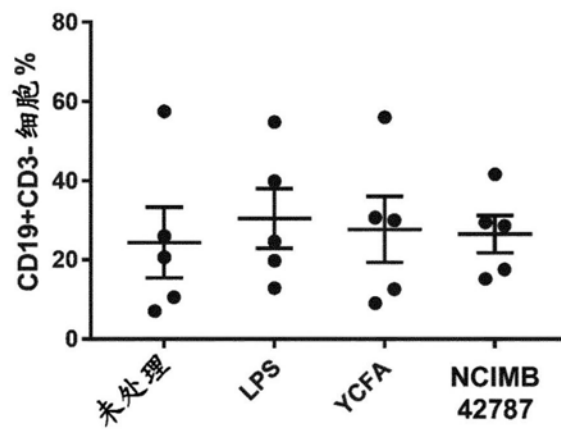


图 6F

图6

细胞表型分析

CD8/Treg 比率

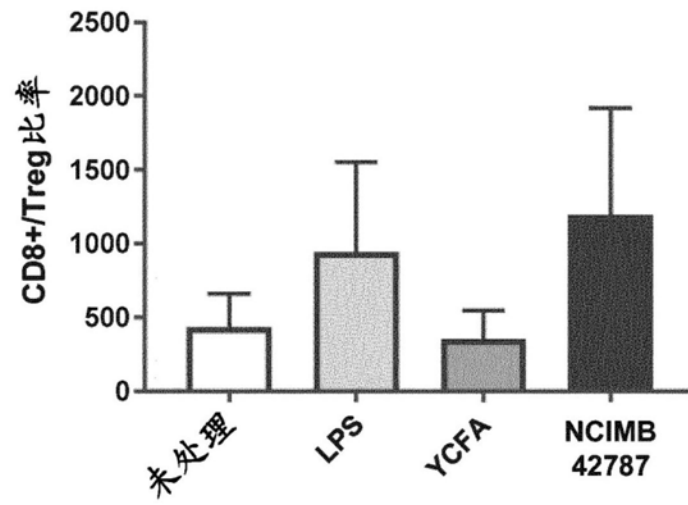


图 6G

活化 CD8/Treg 比率

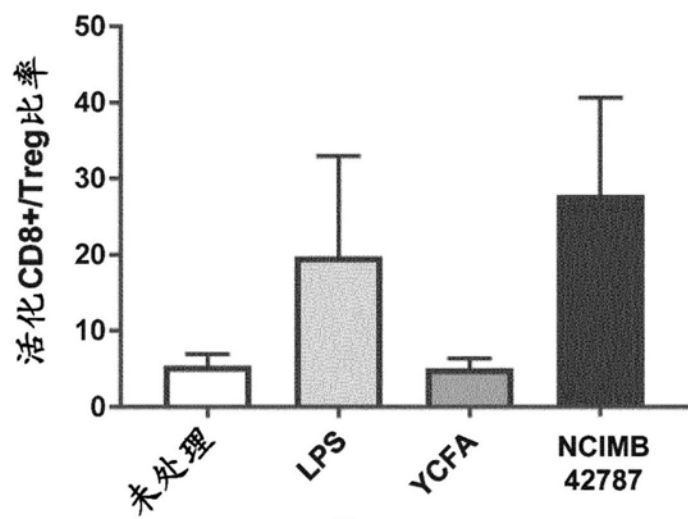


图 6H

图6

细胞因子分析

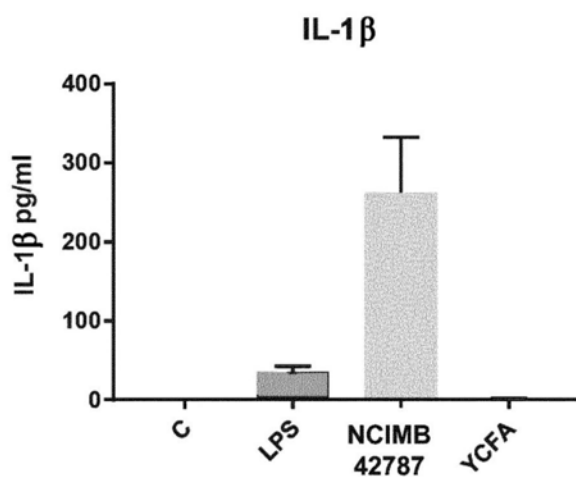


图 7A

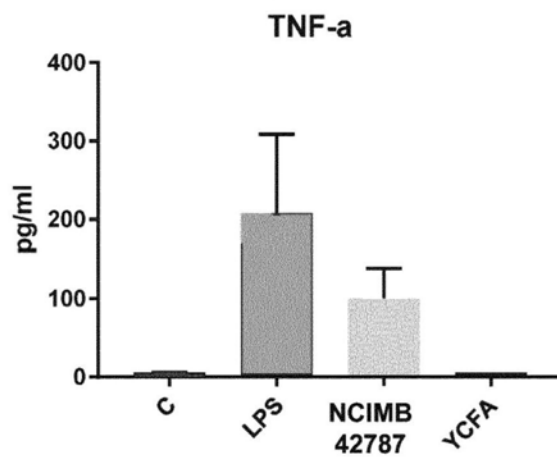


图 7B

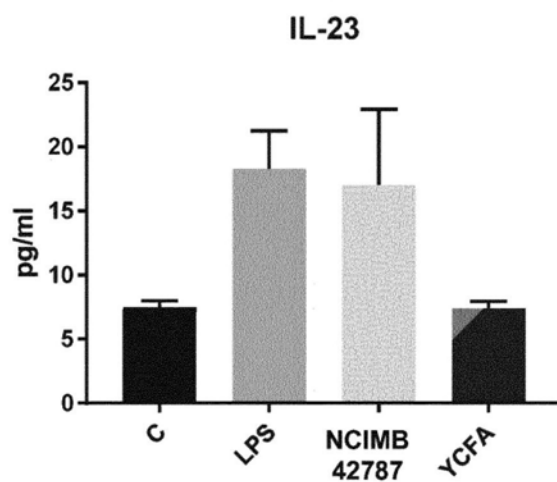


图 7C

图7

细胞因子分析

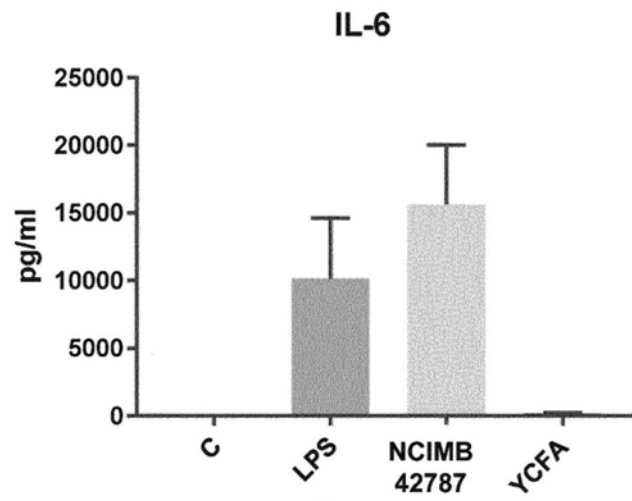


图 7D

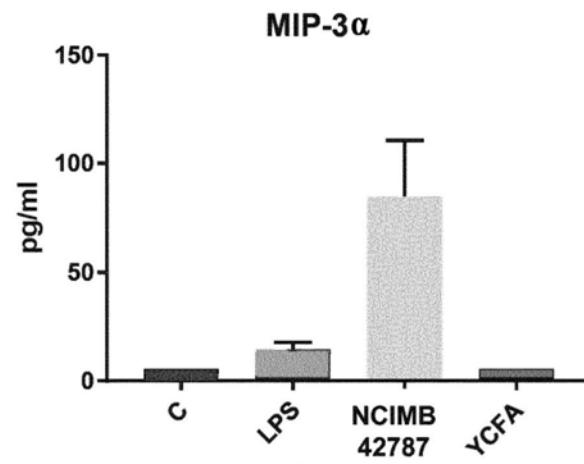


图 7E

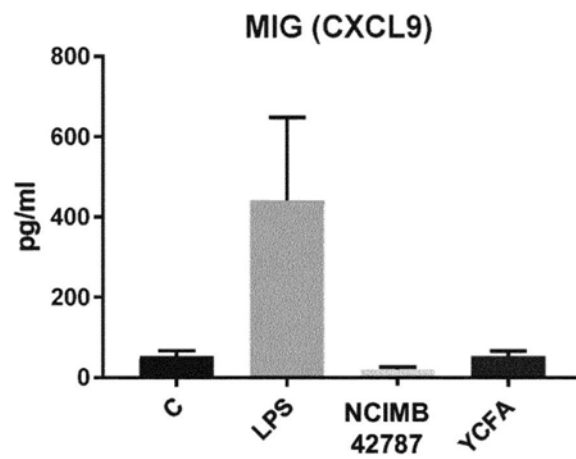


图 7F

图7

细胞因子分析

MCP-1

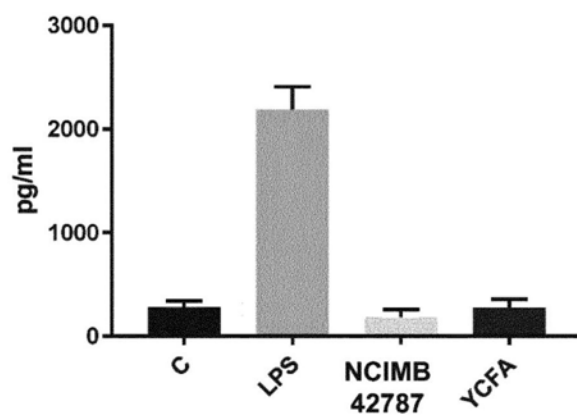


图 7G

IL-10

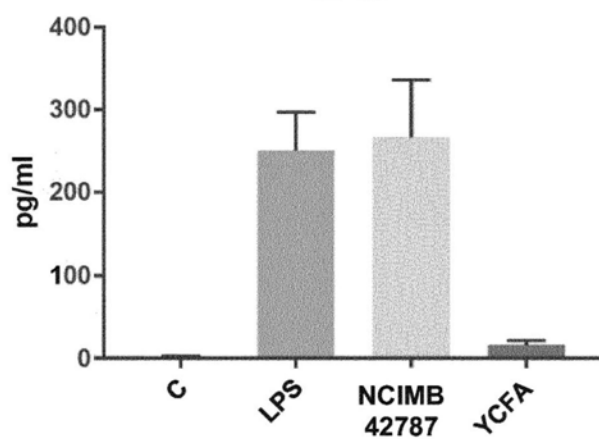


图 7H

GMCSF

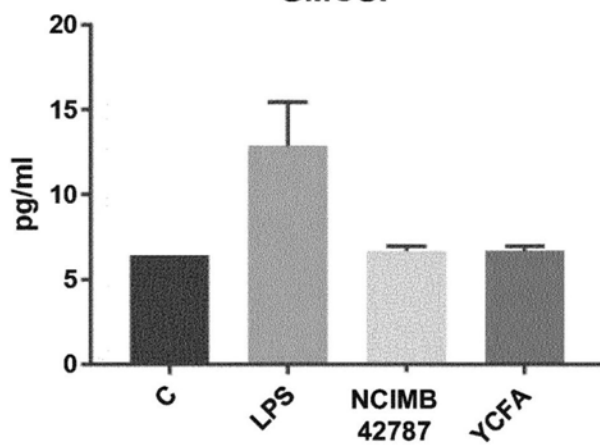


图 7I

图7

流式细胞术分析

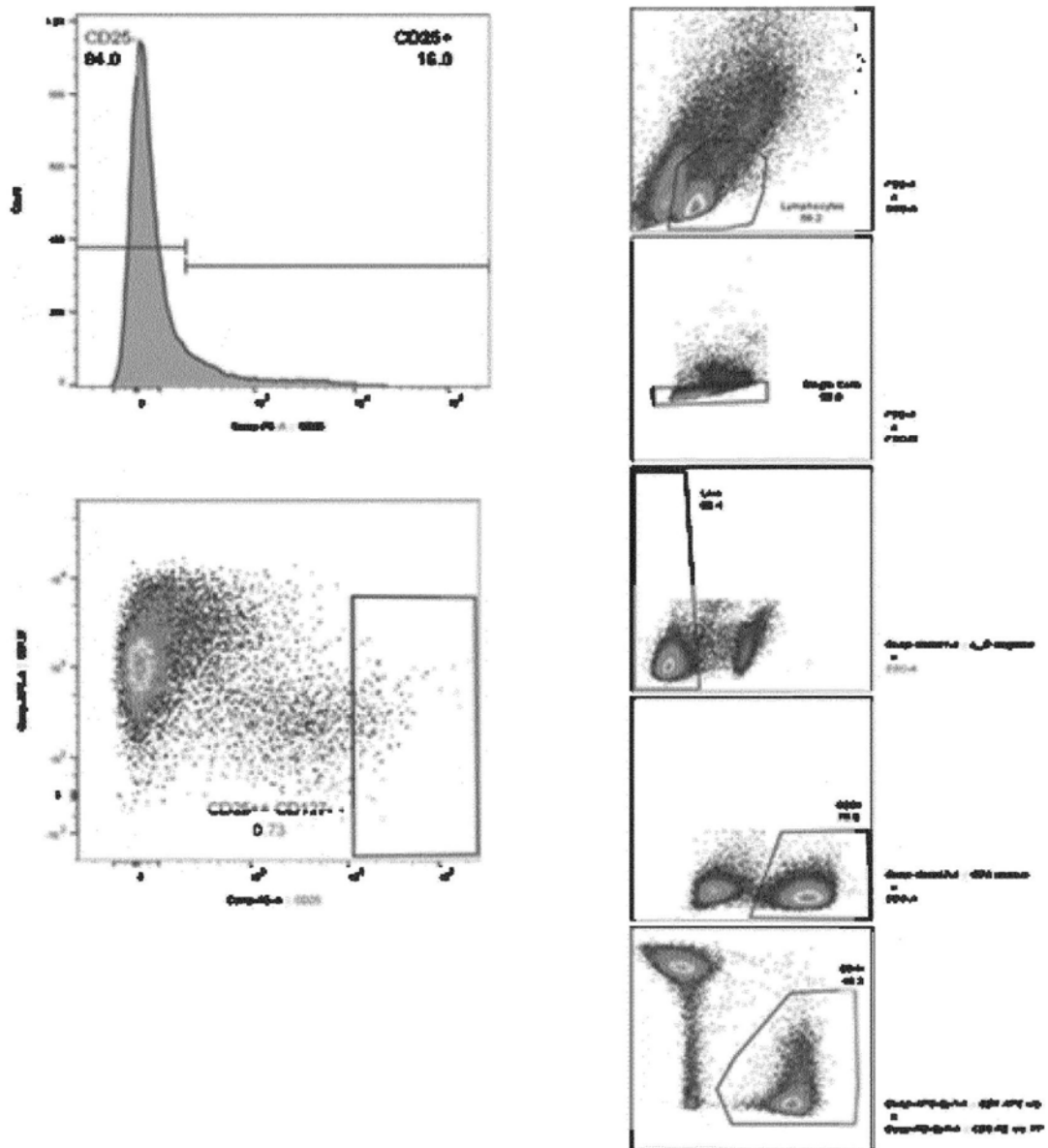


图 8A

图8

流式细胞术分析

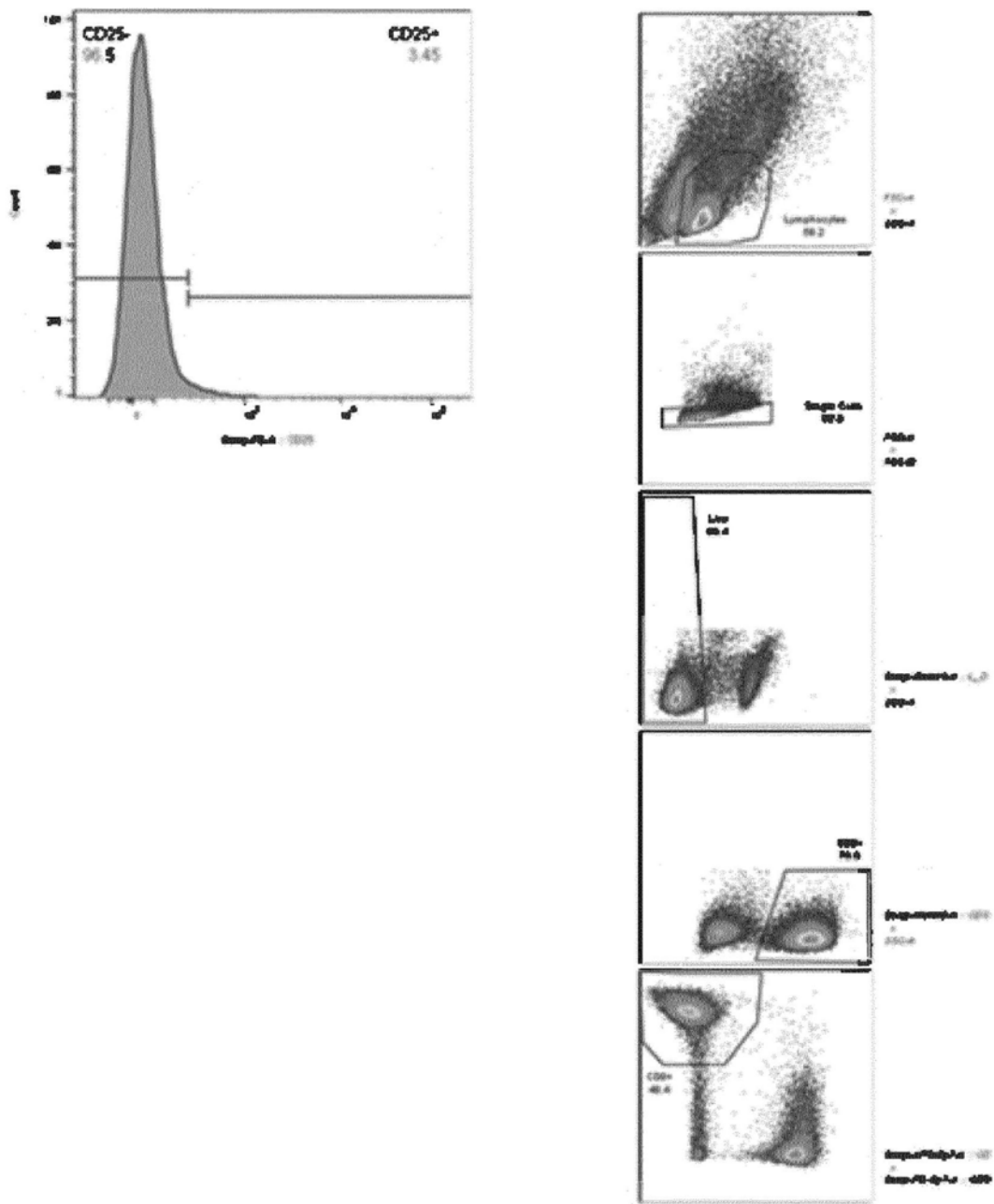


图 8B

图8

流式细胞术分析

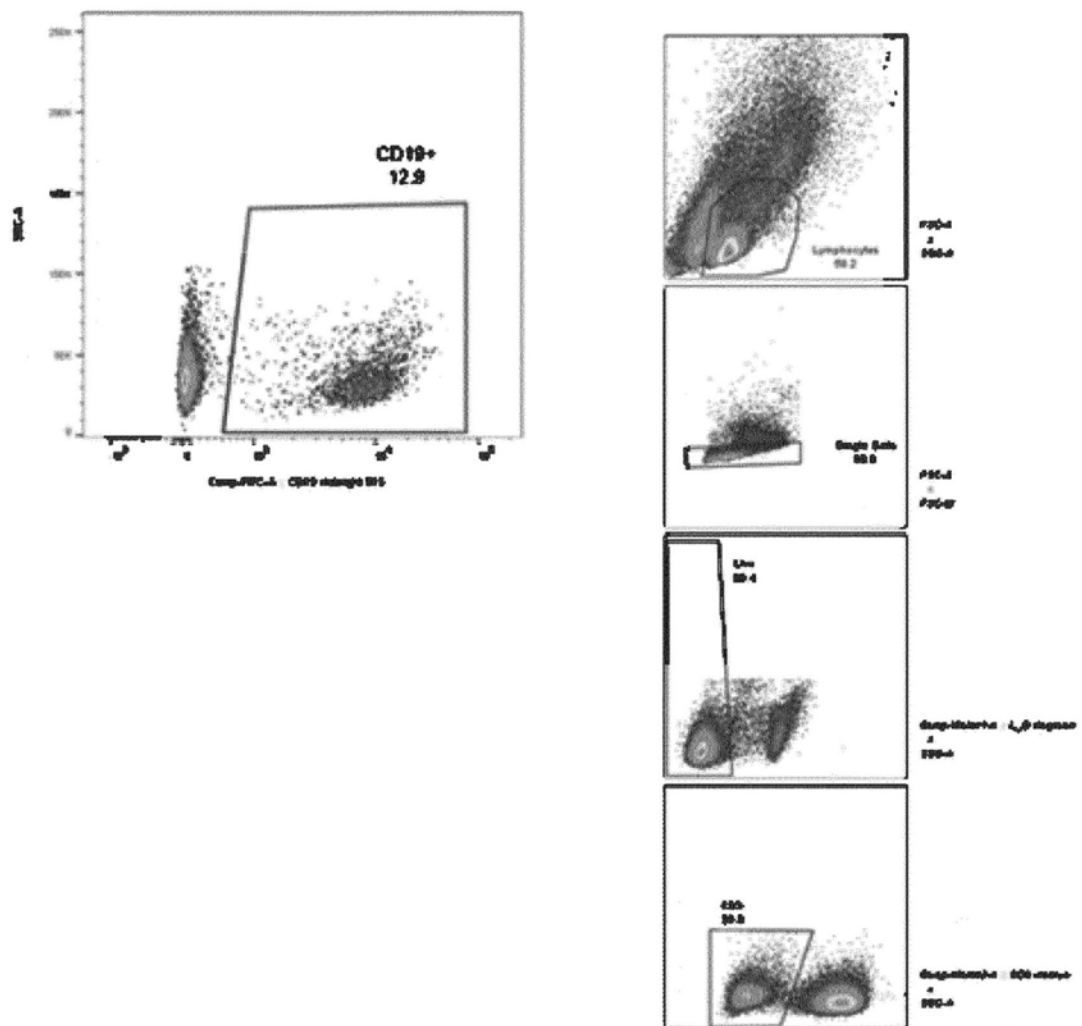


图 8C

图8

来自U373的IL-8分泌

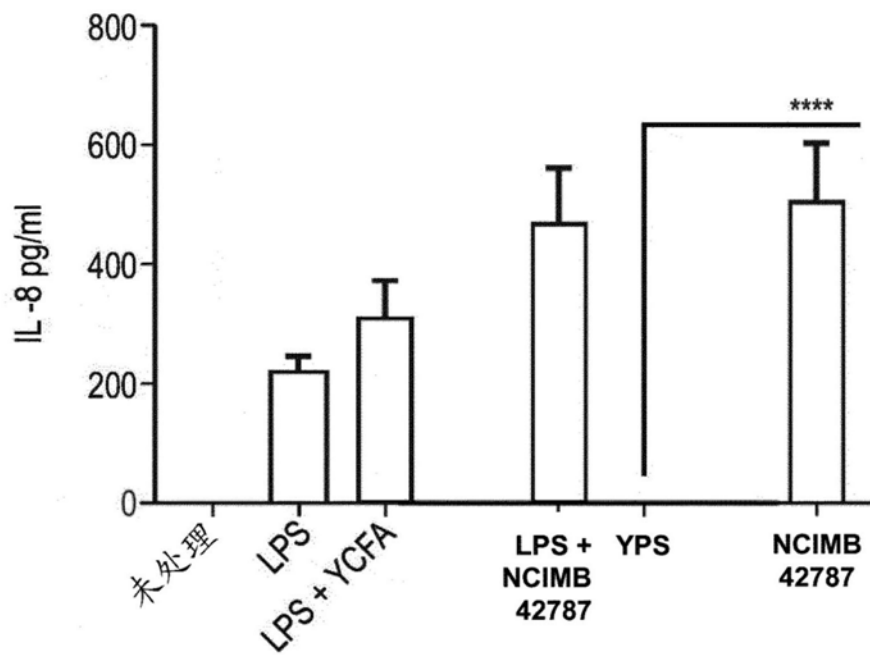


图9

HDAC活性测定

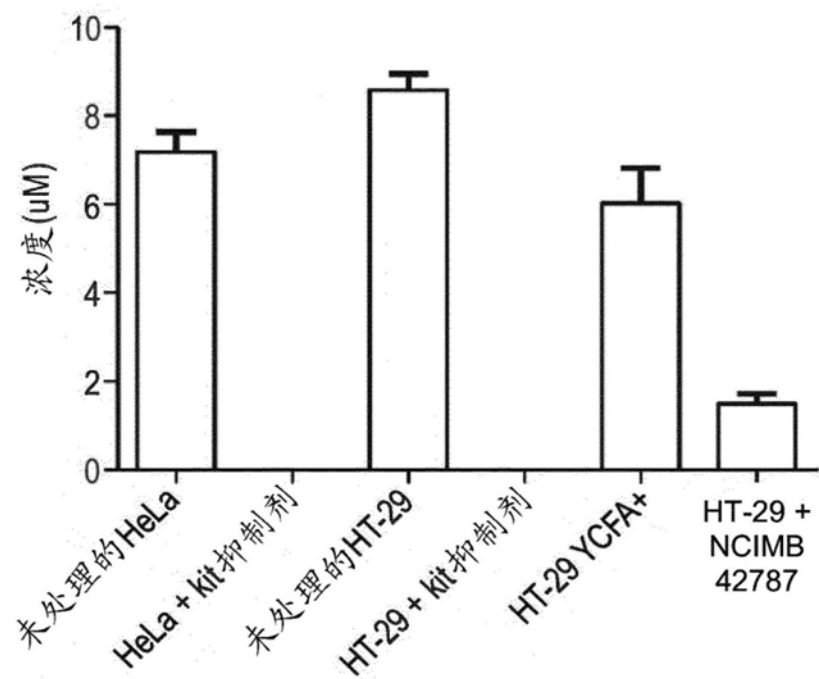


图10

菌株诱导的全细胞和细胞裂解物HDAC活性的变化

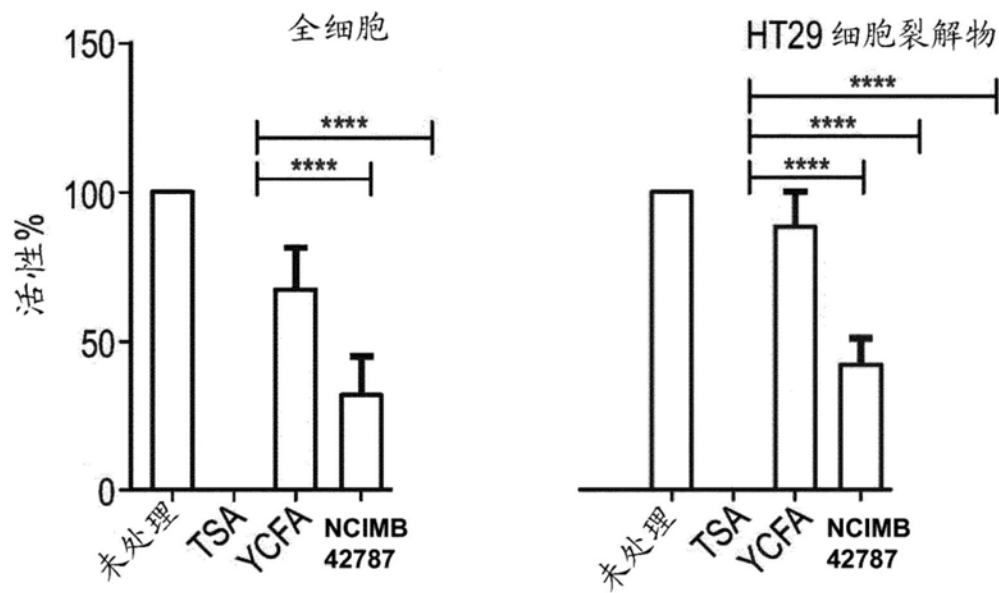


图11A

菌株的代谢物产生

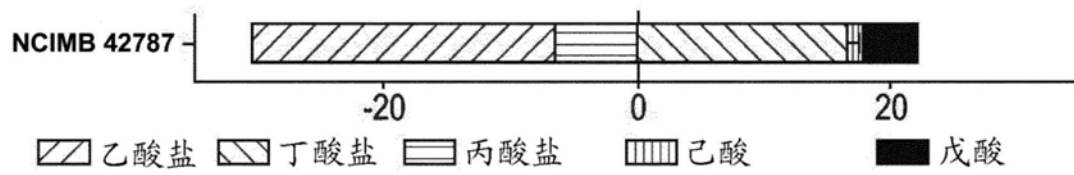


图11B

酸诱导的组蛋白脱乙酰酶活性的变化

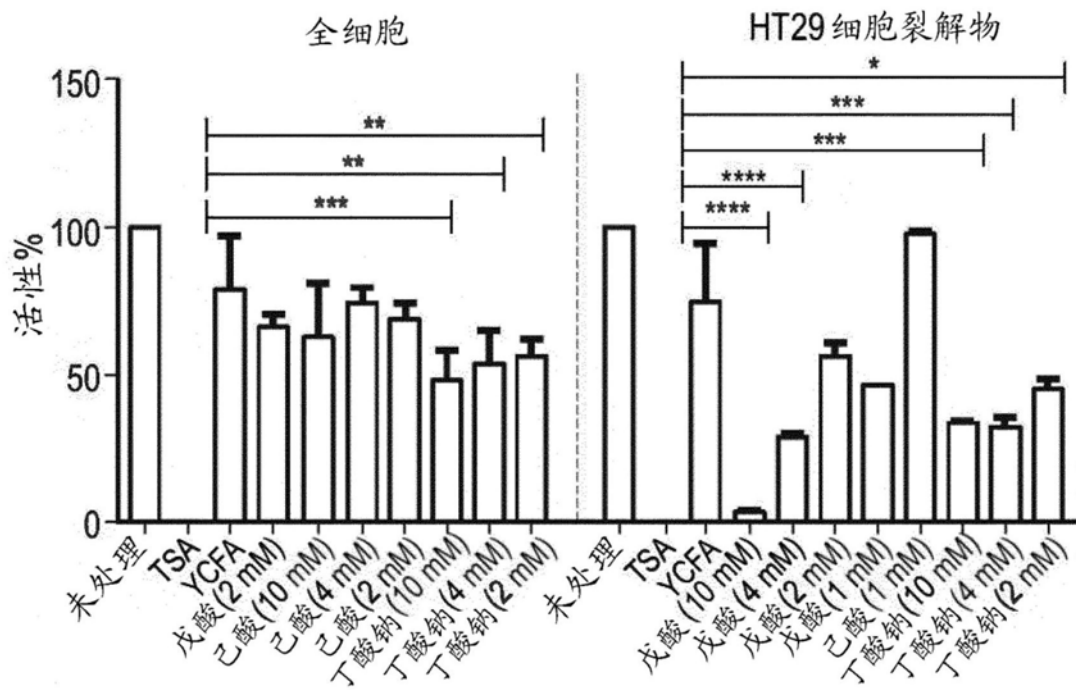


图11C

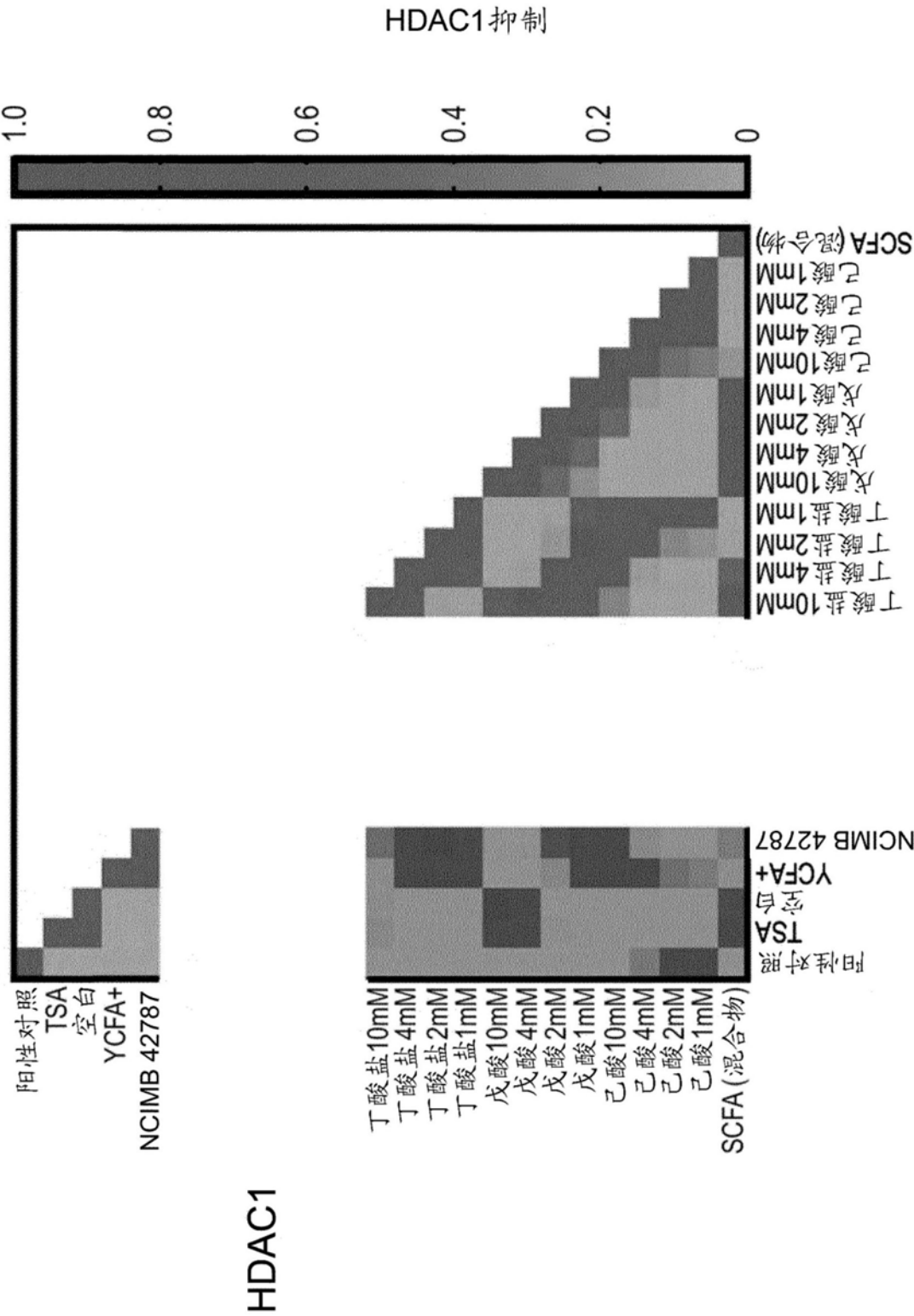


图12A

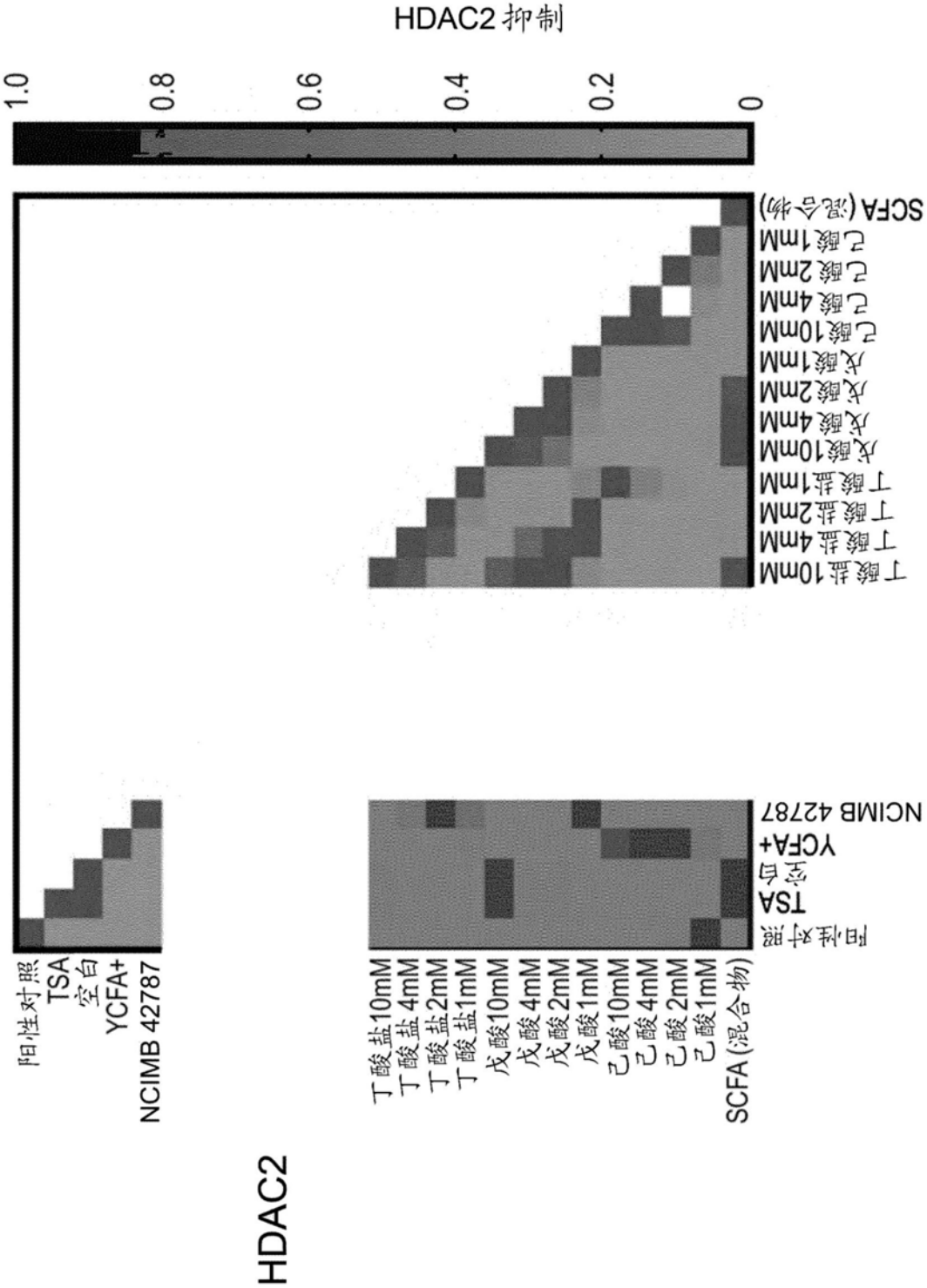


图12B

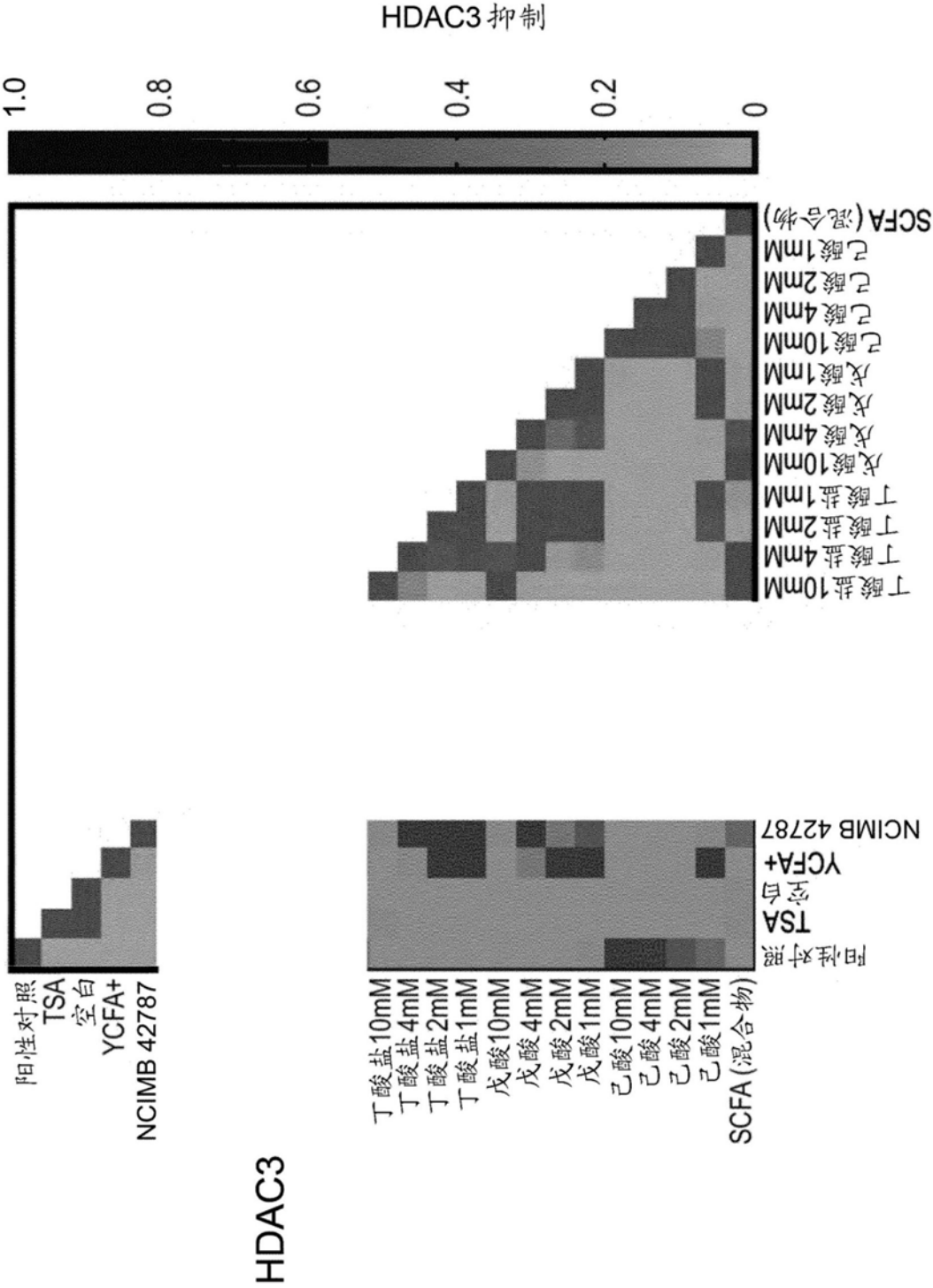


图12C

I类HDAC的抑制

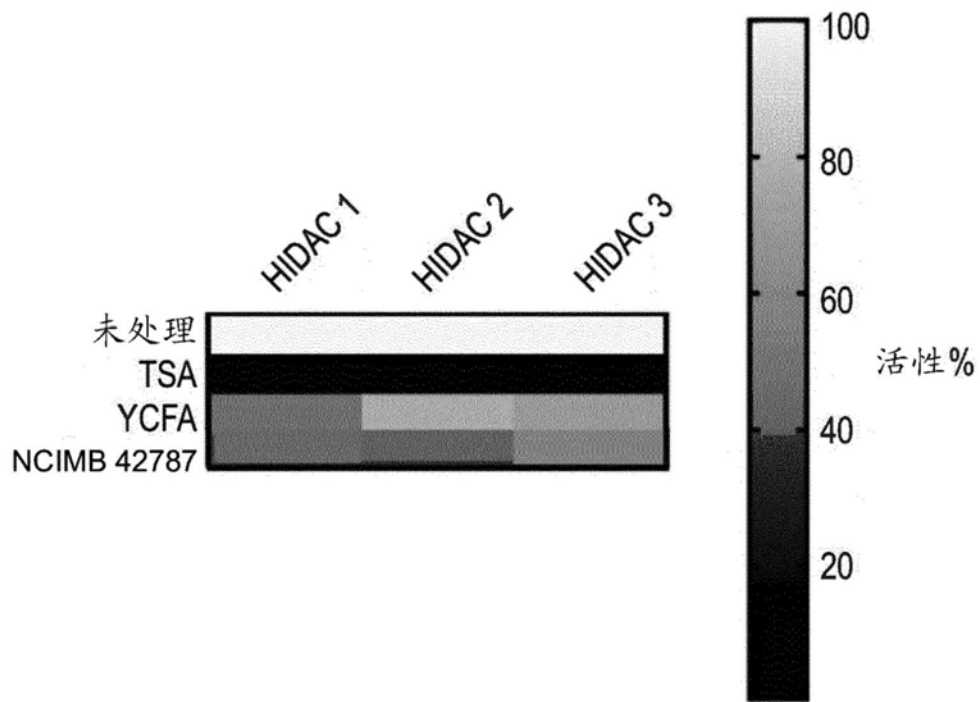


图13A

HDAC1抑制

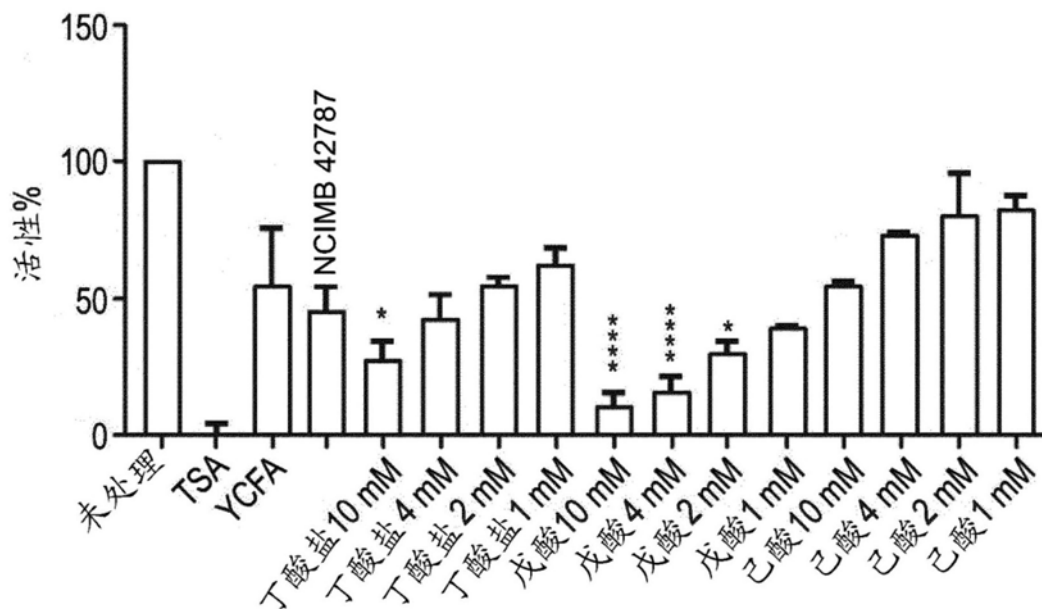


图13B

HDAC2 抑制

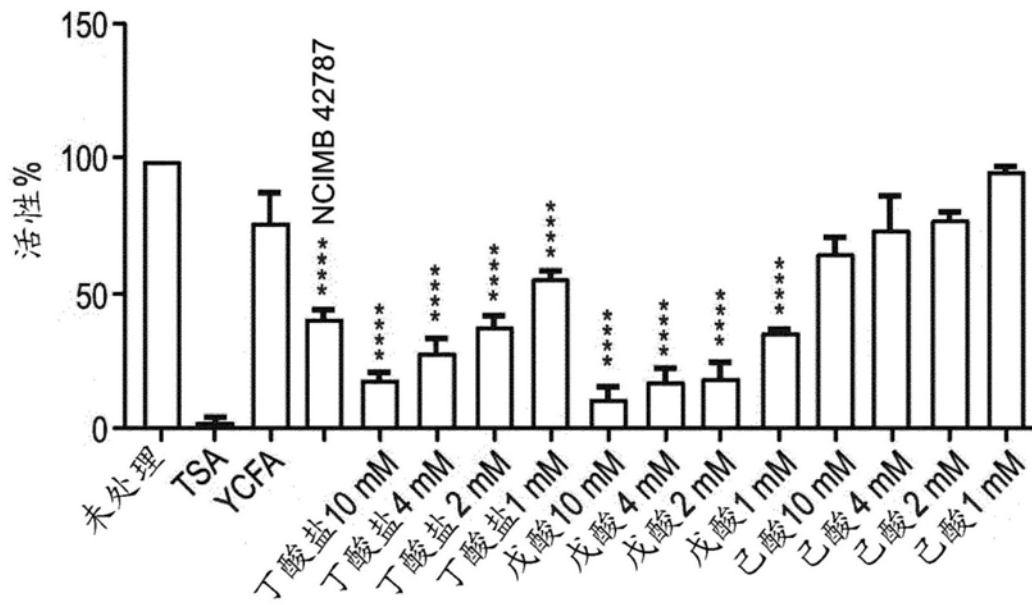


图13C

HDAC3 抑制

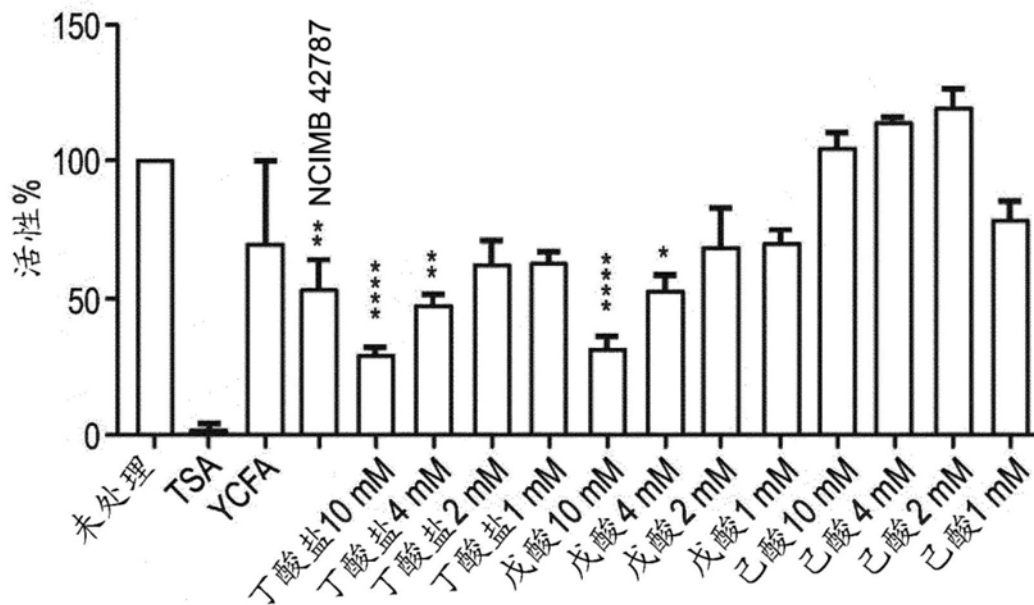


图13D

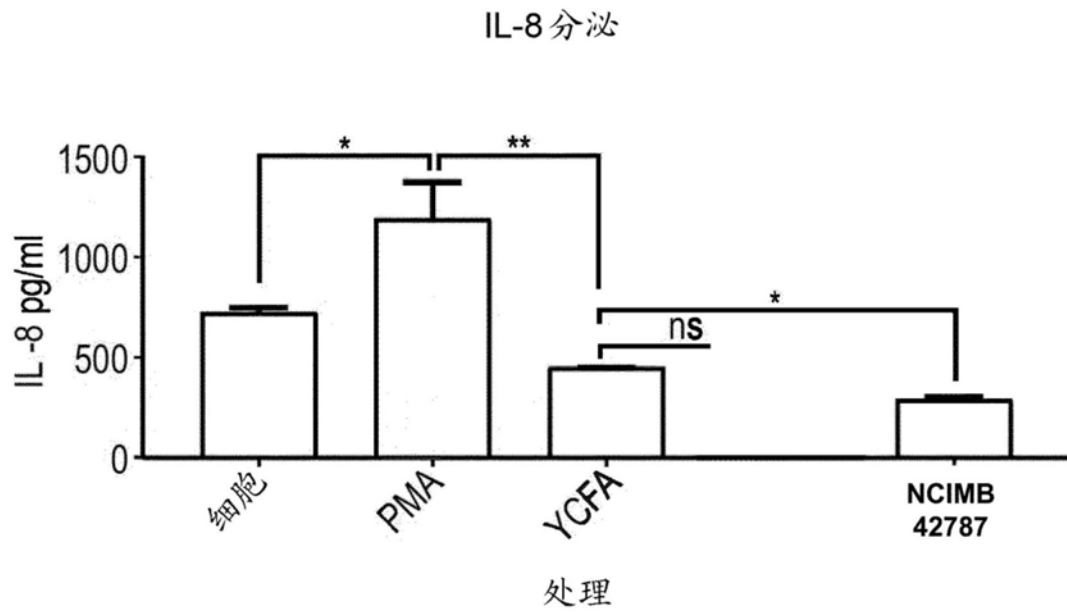


图14A

闭合蛋白、绒毛蛋白、TJP1和TJP2 mRNA表达

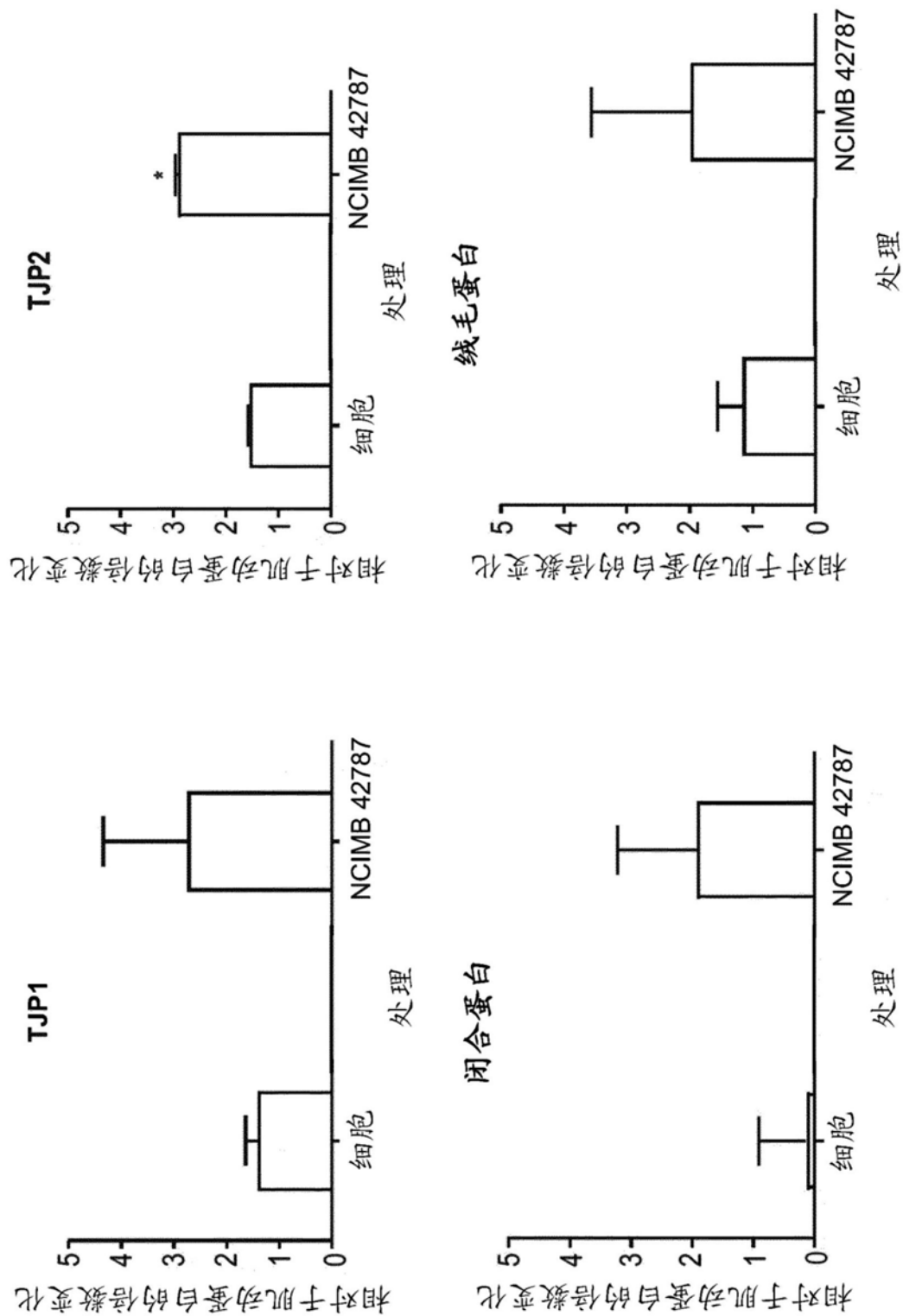


图14B

TJP1 mRNA 表达

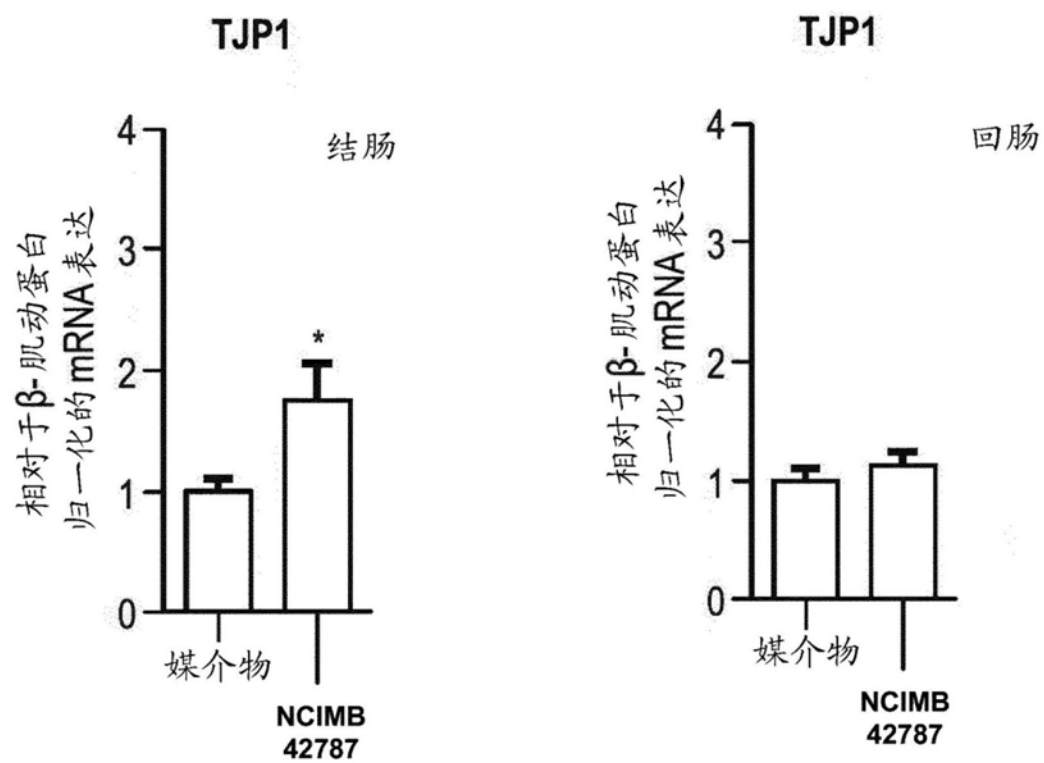


图14C

闭合蛋白mRNA表达

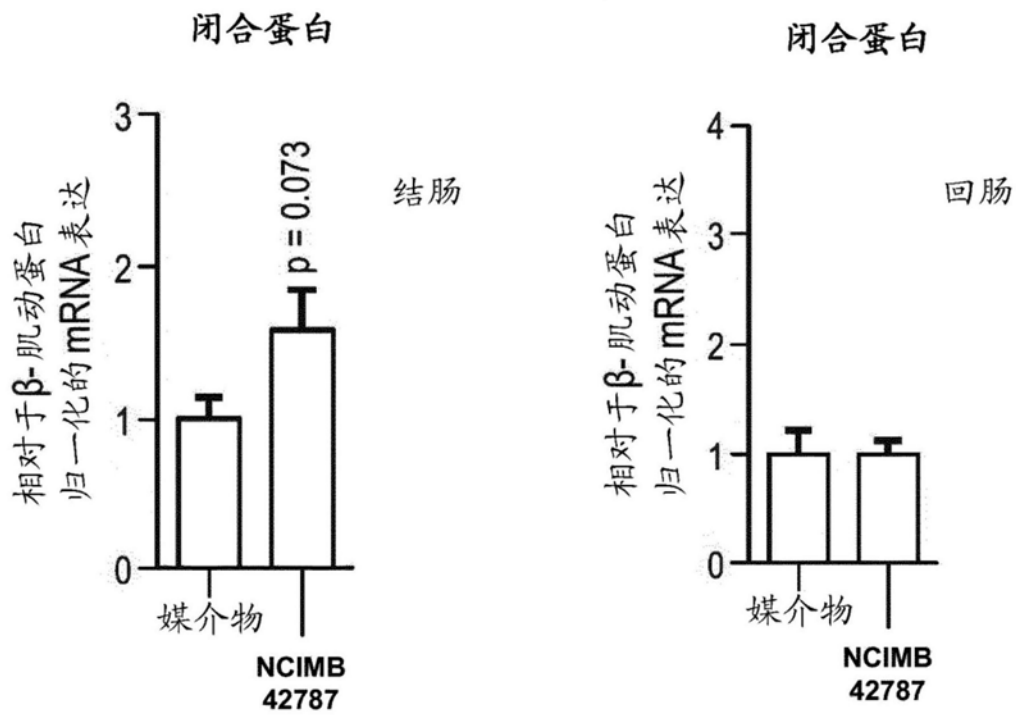


图14D

回肠中的通透性

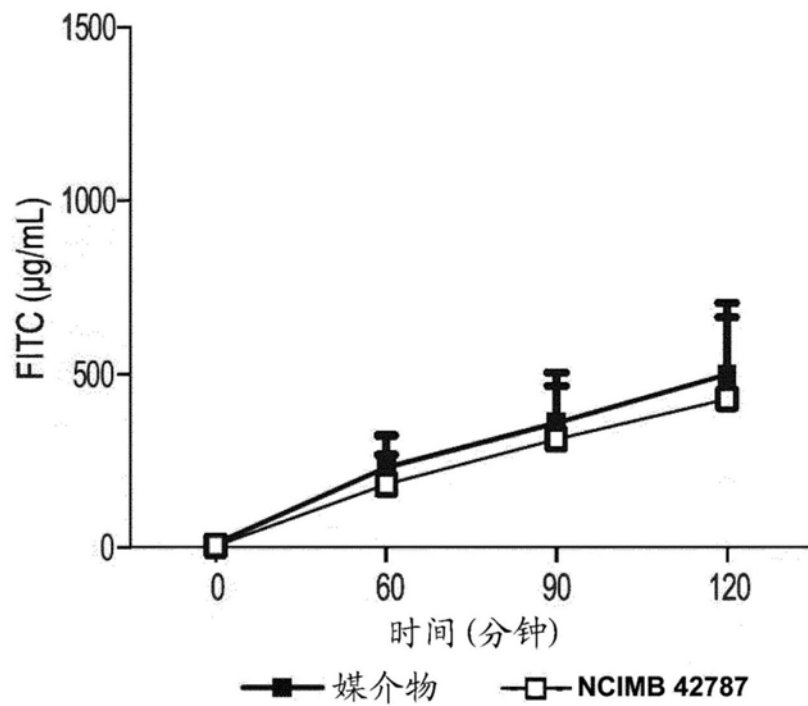


图14E

结肠中的通透性

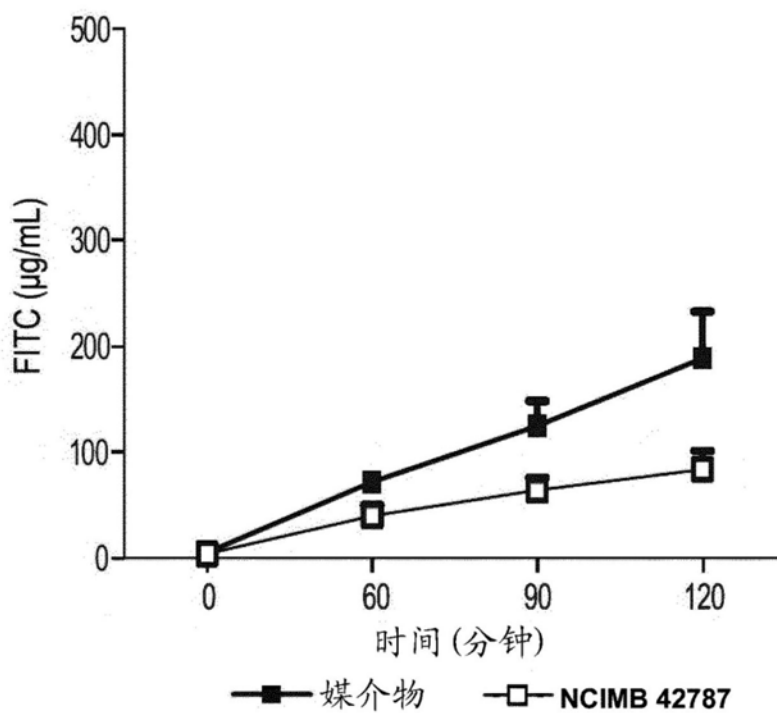


图14F

TLR-4的海马表达的变化

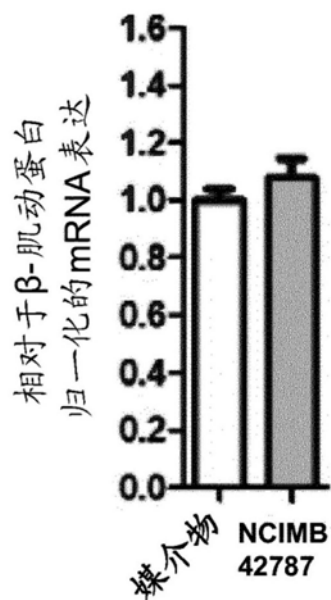


图15

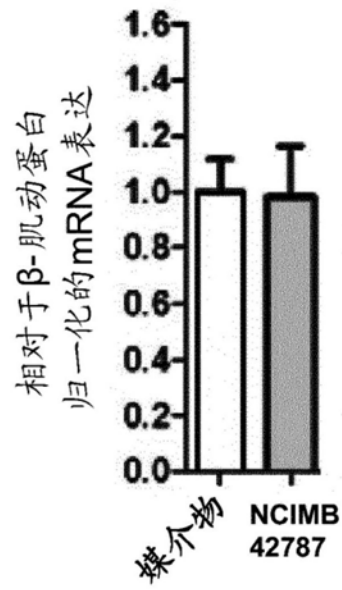
TNF- α 的海马表达的变化

图16

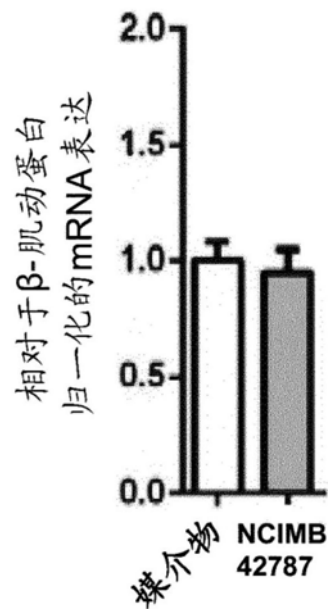
IL-1 β 的海马表达的变化

图17

IL-6的海马表达的变化

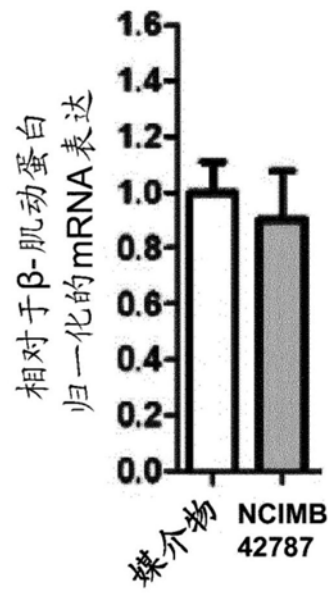


图18

CD11b的海马表达的变化

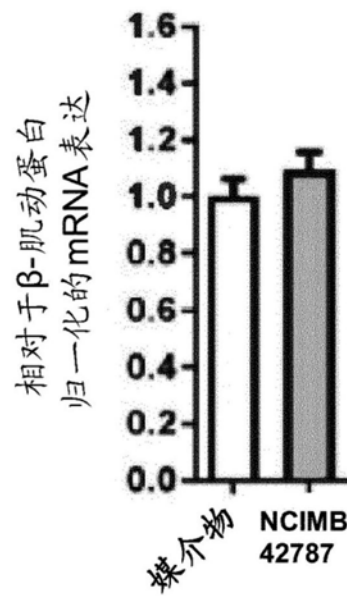


图19

TLR-4的杏仁核表达的变化

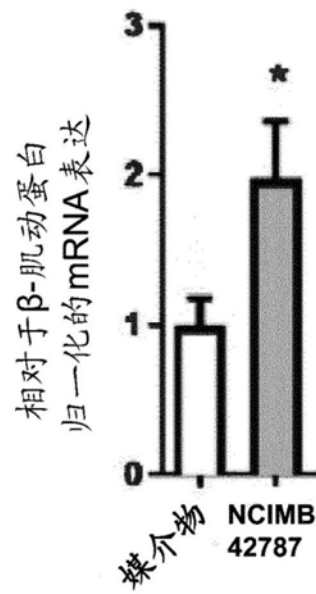


图20

CD11b的杏仁核表达的变化

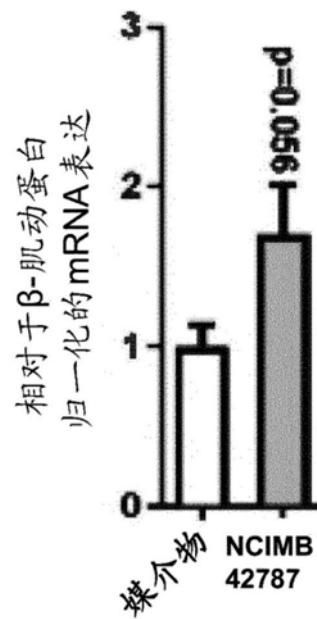


图21

IL-6的杏仁核表达的变化

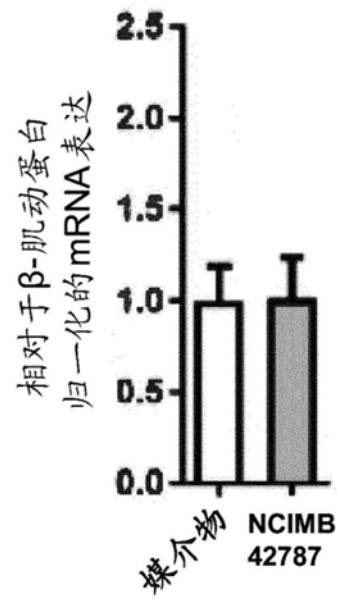


图22

TLR-4的前额叶皮层表达的变化

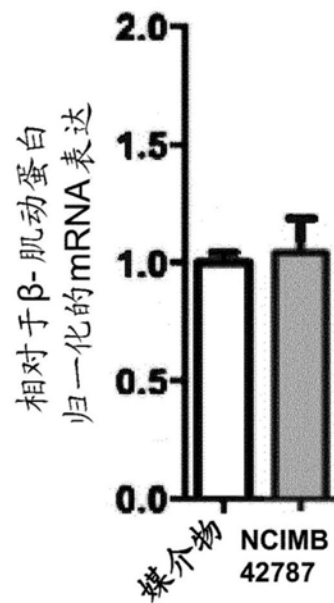


图23

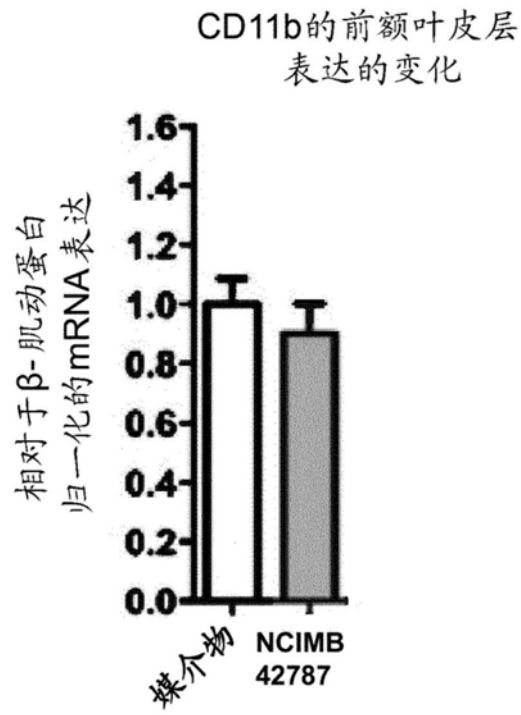


图24

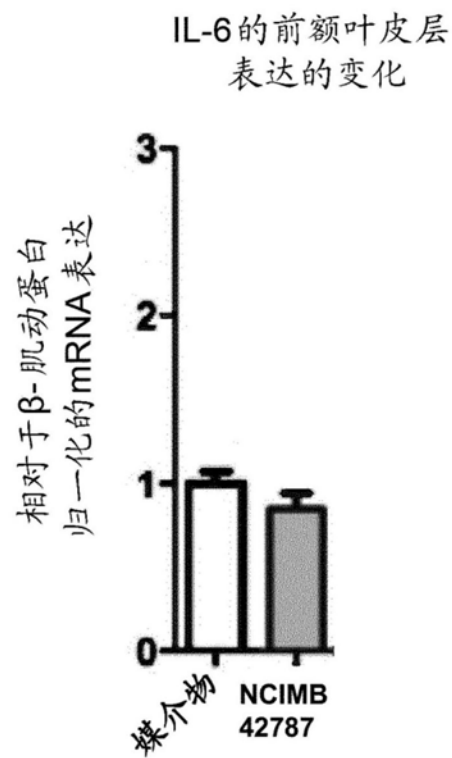


图25

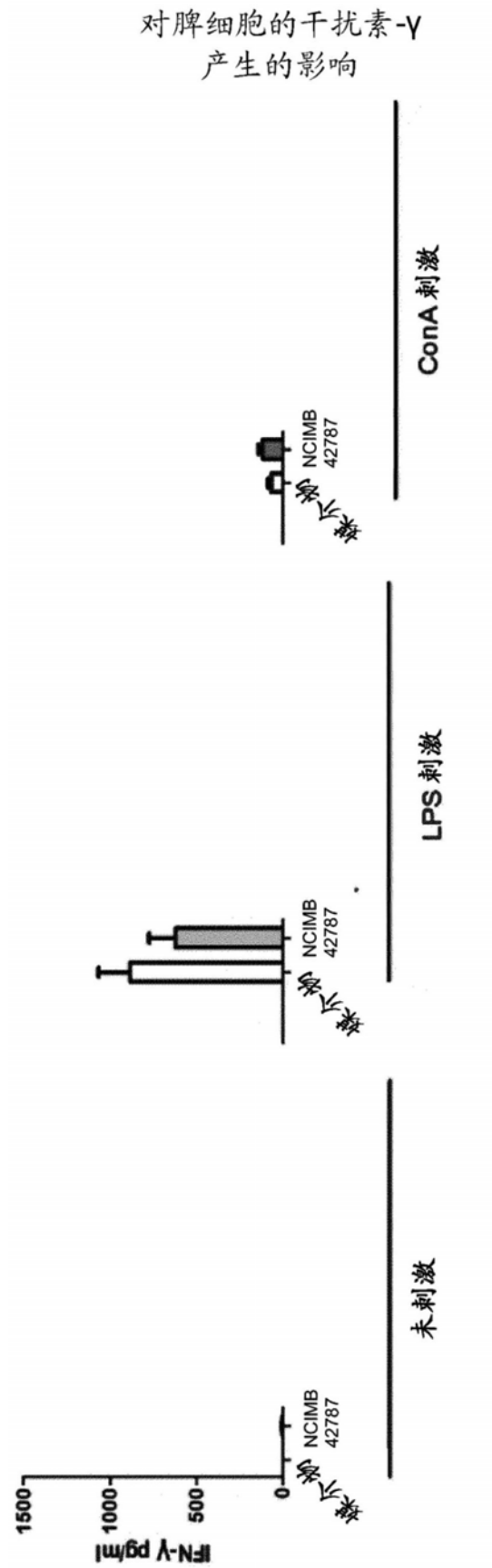


图26

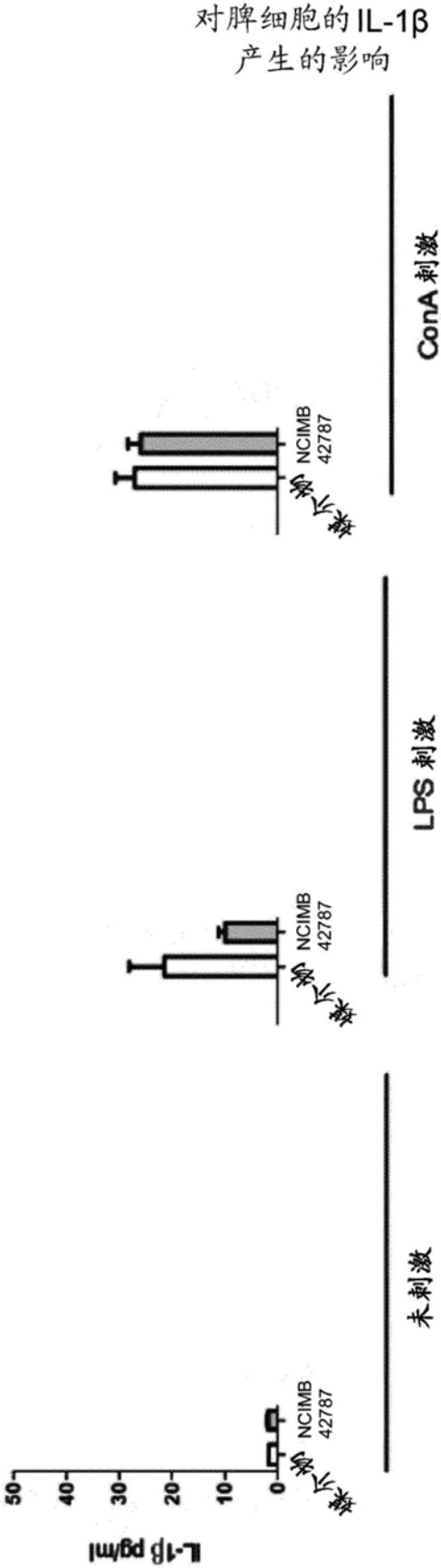


图27

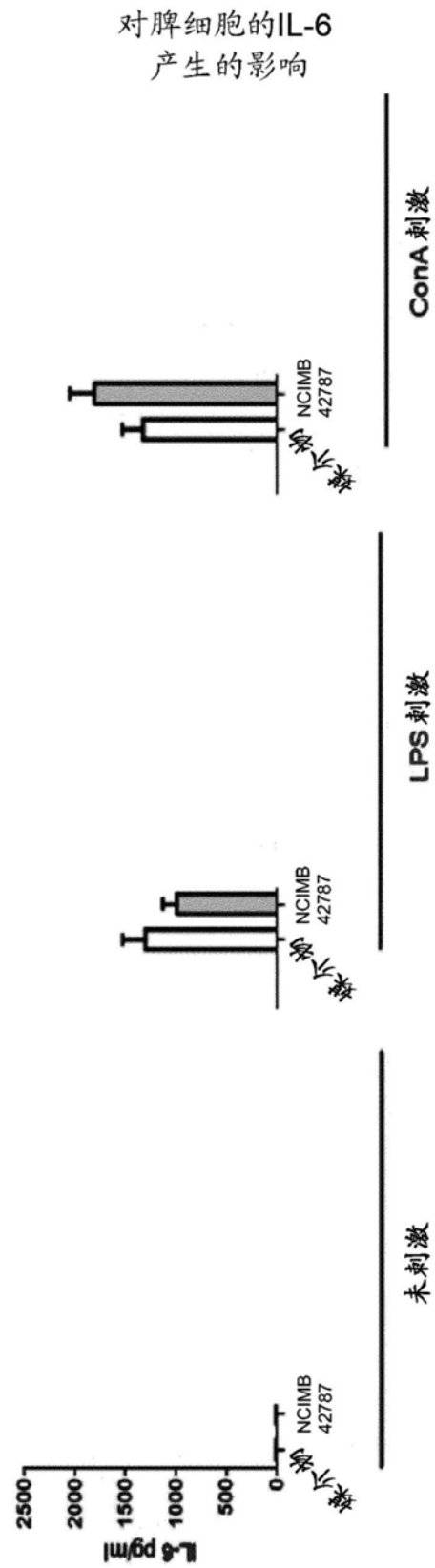


图28

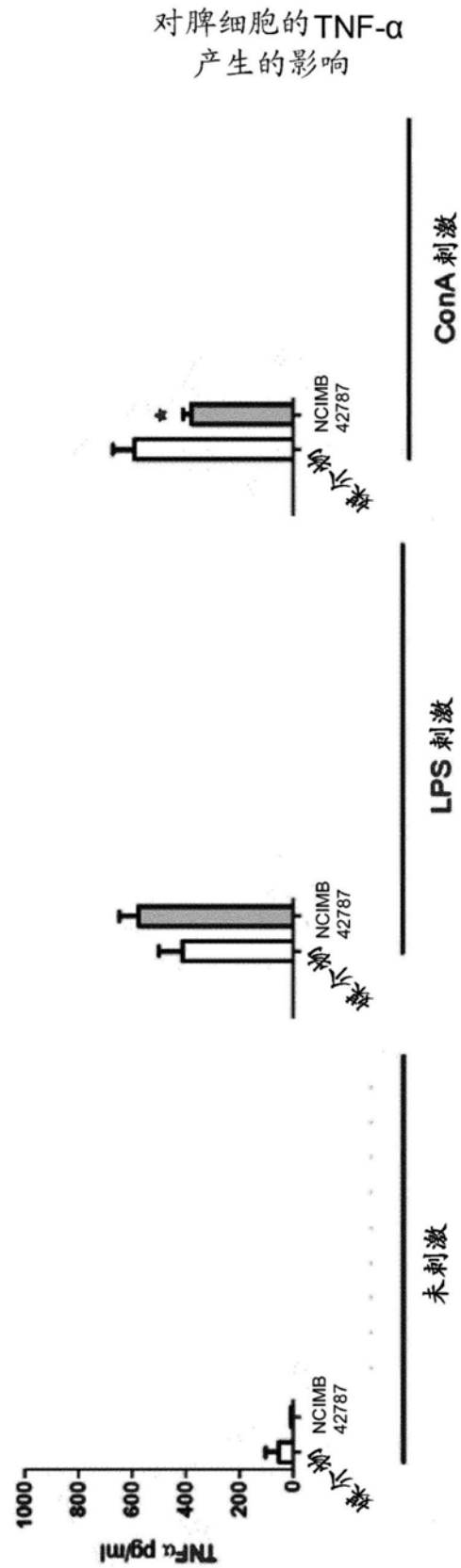


图29

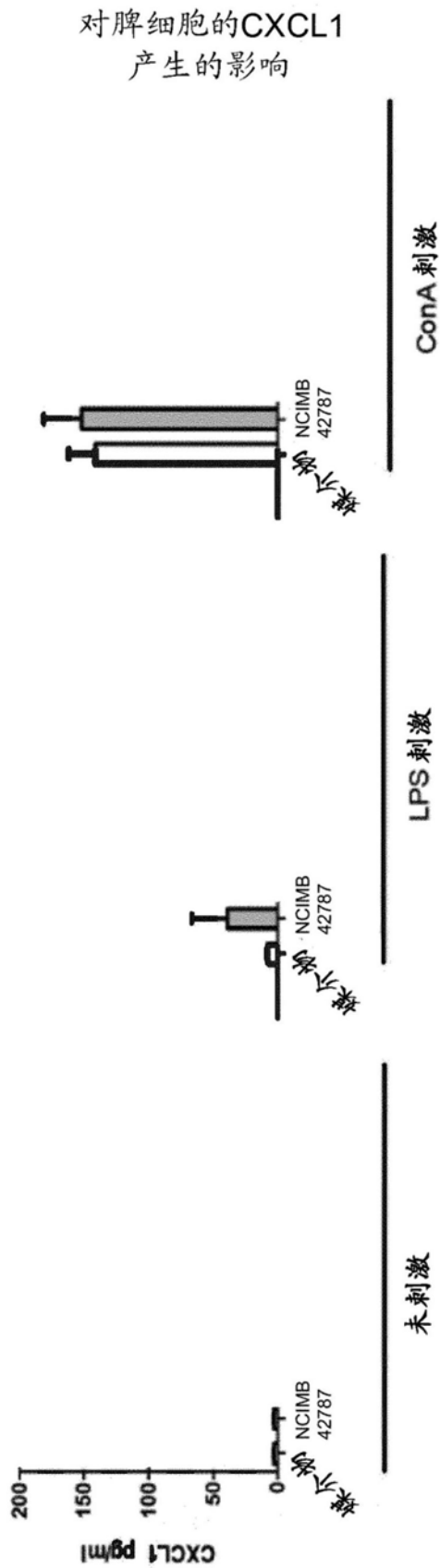


图30

SKMEL2 细胞系 - MAP2 基因表达

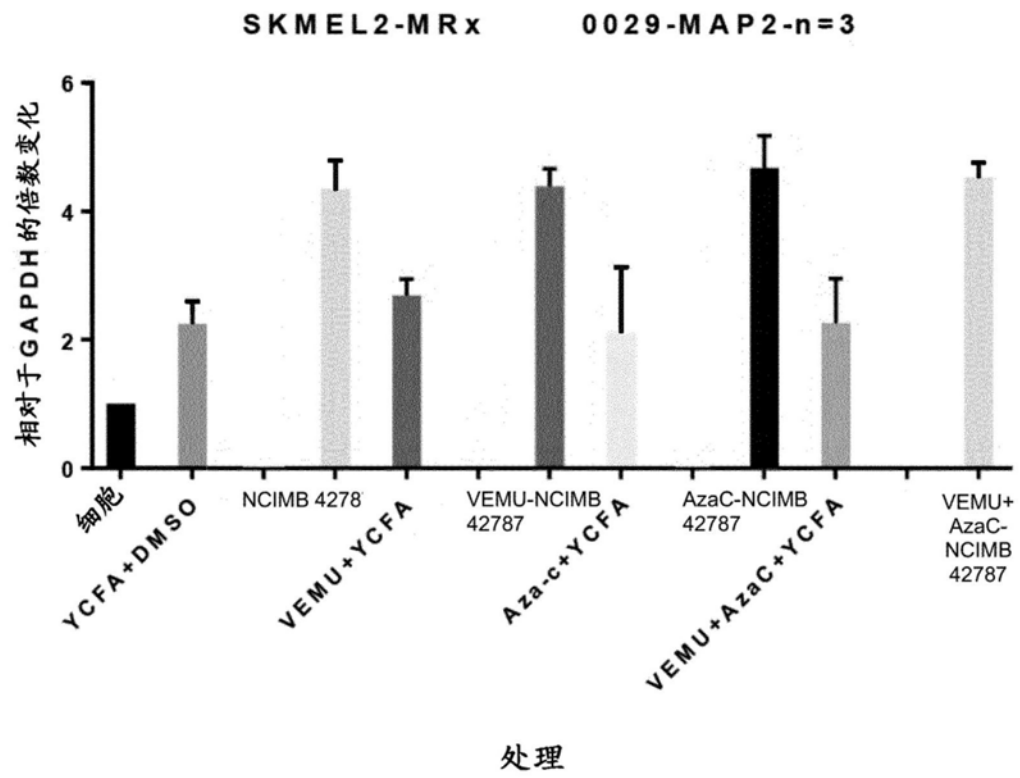


图31

SKMEL2 细胞系-克隆源性存活

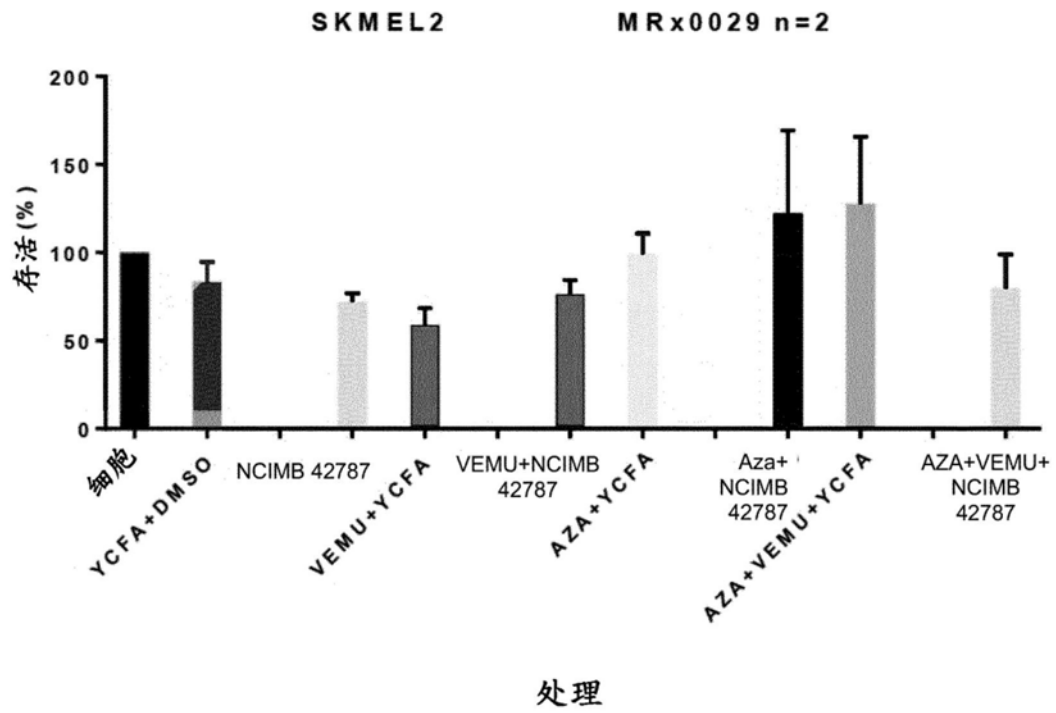


图32

SKMEL2 细胞系-软琼脂生长

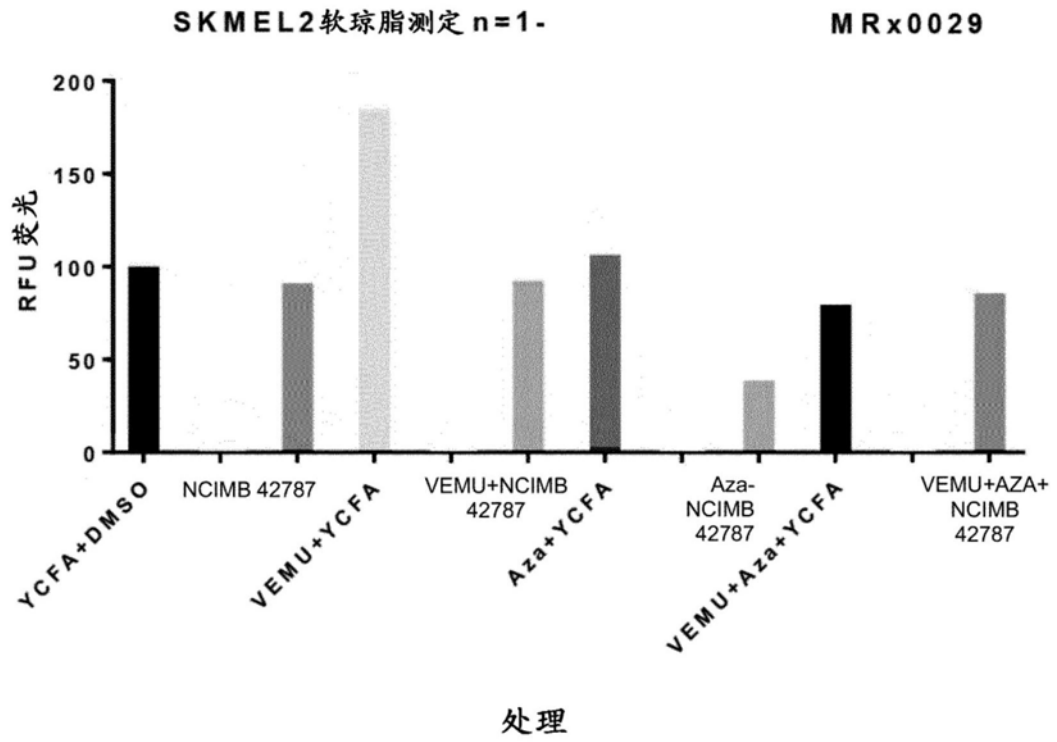


图33

SKMEL2细胞系-ERK信号传导

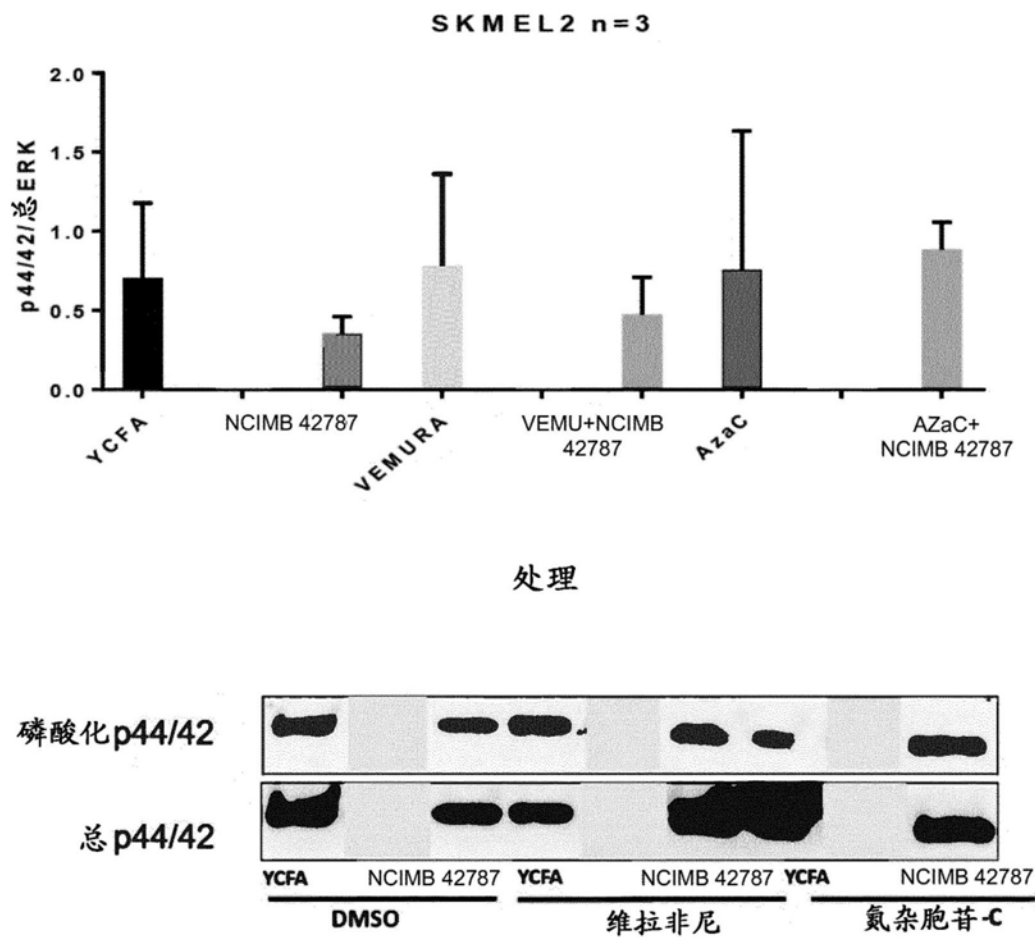


图34

SKMEL28 细胞系-MAP2 基因表达

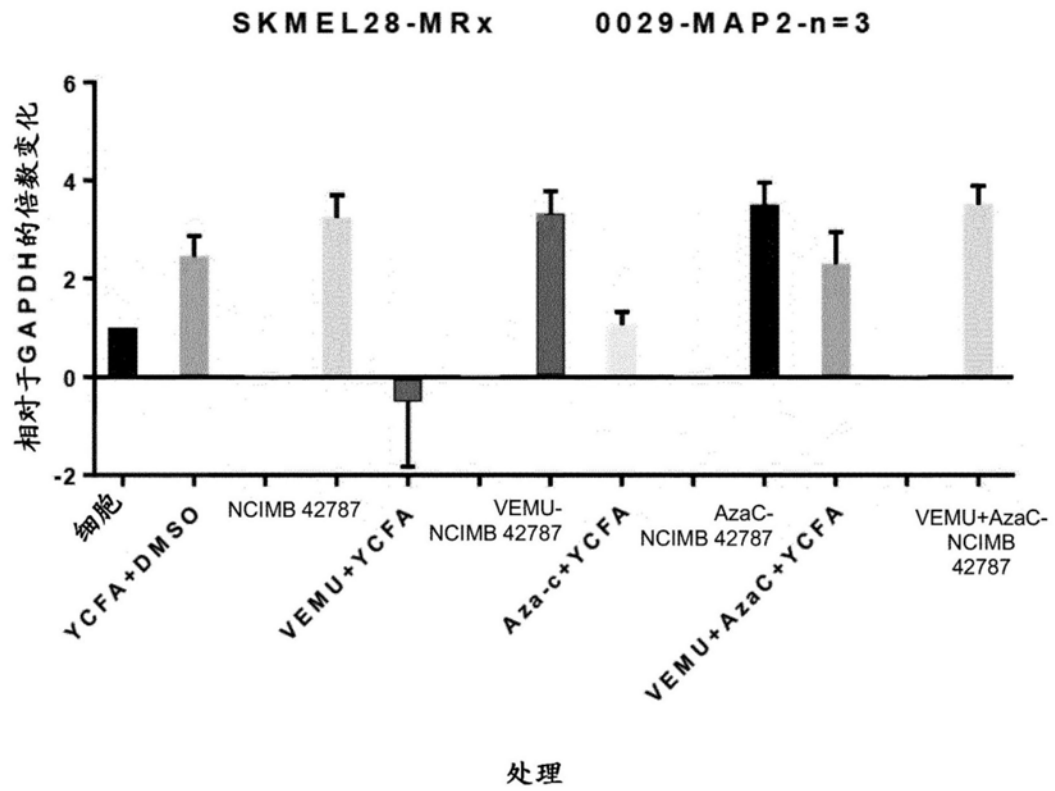


图35

SKMEL28细胞系-克隆源性存活

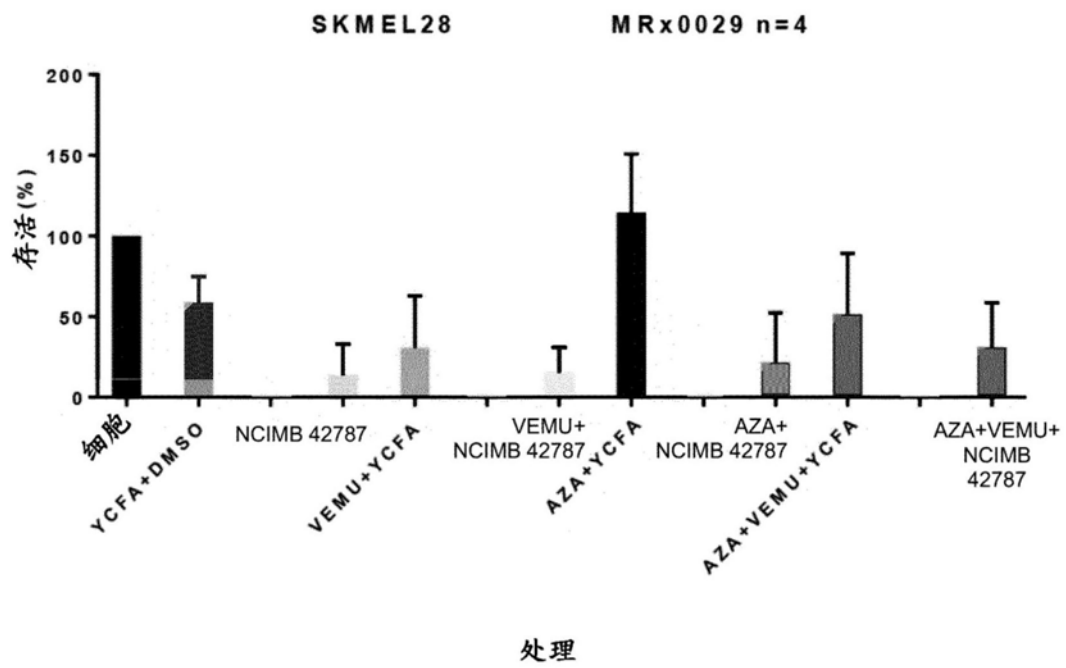


图36

SKMEL28细胞系-软琼脂生长

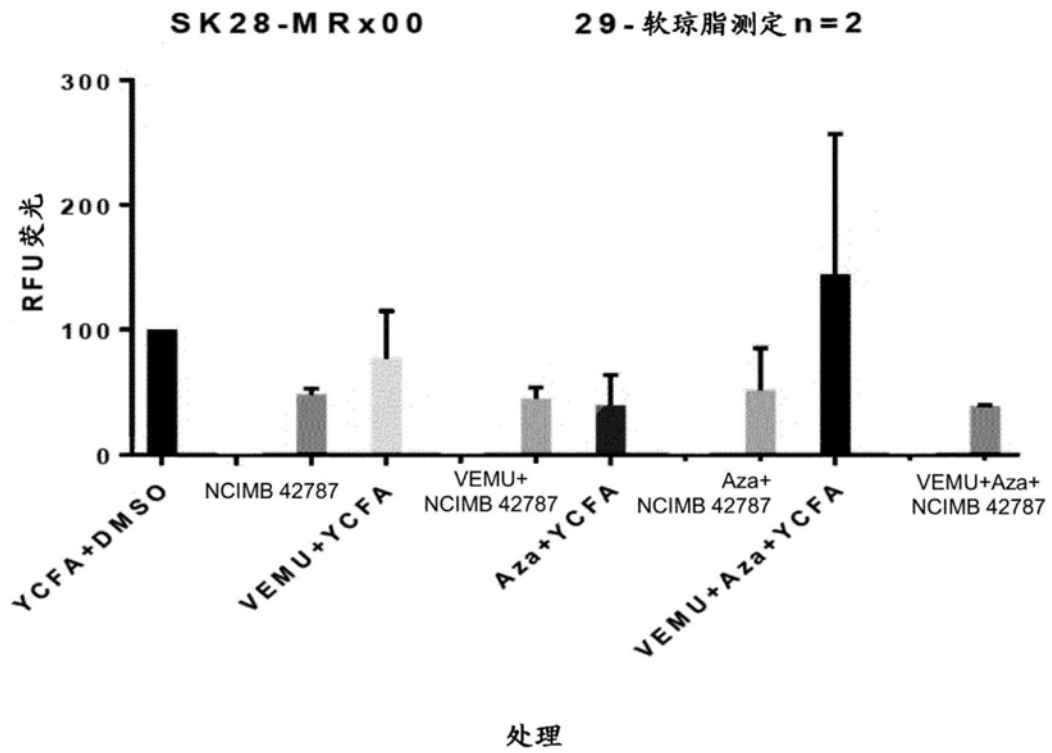


图37

SKMEL28 细胞系-ERK 信号传导

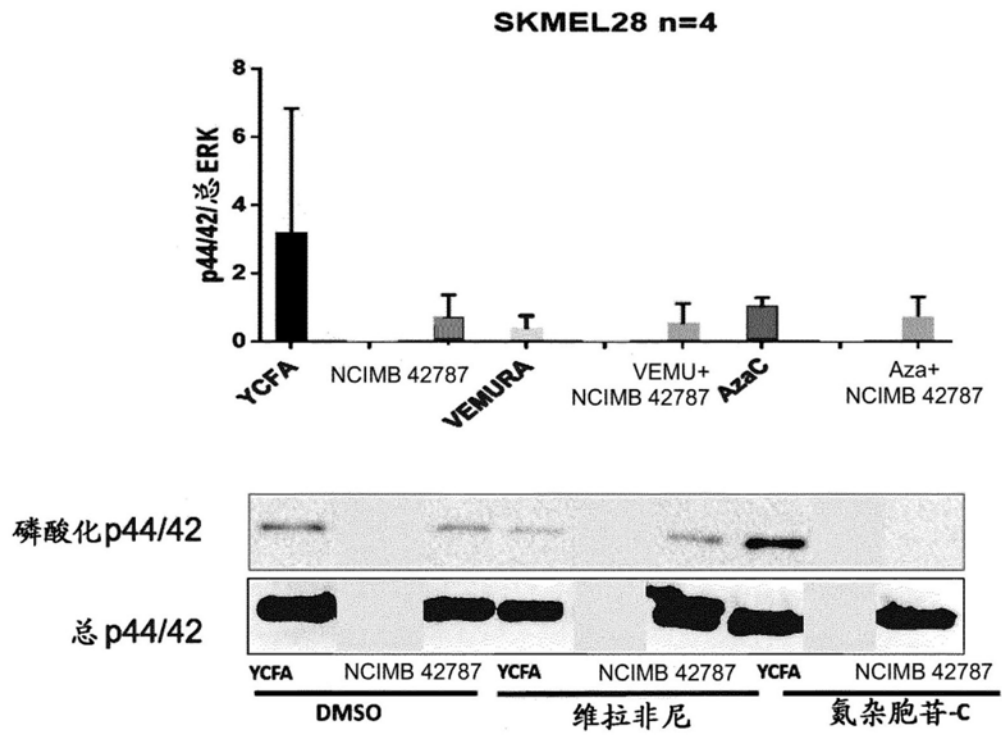


图38

SKMEL31细胞系-MAP2基因表达

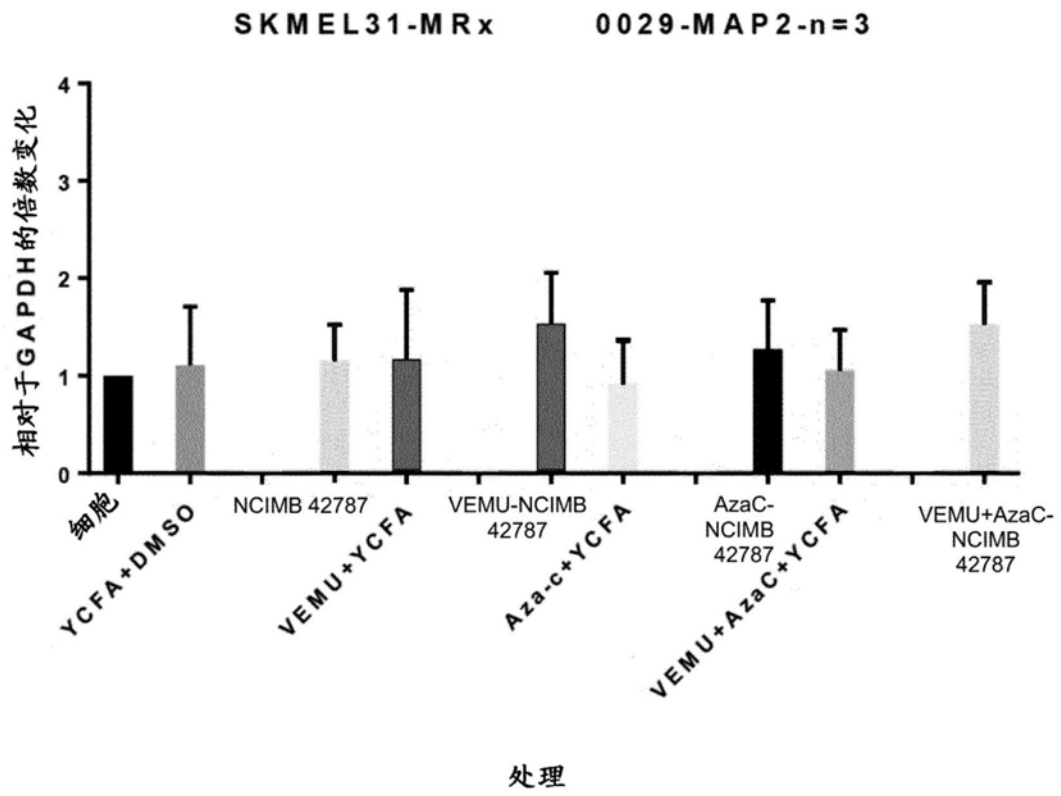


图39

SKMEL31细胞系-克隆源性存活

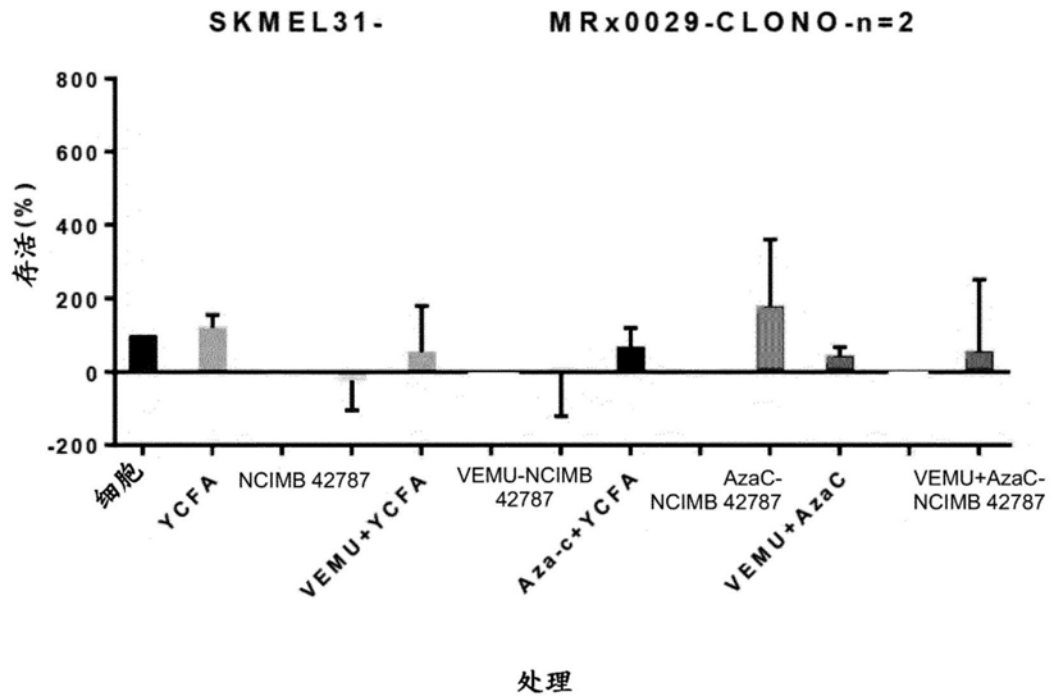


图40

SKMEL31 细胞系-软琼脂生长

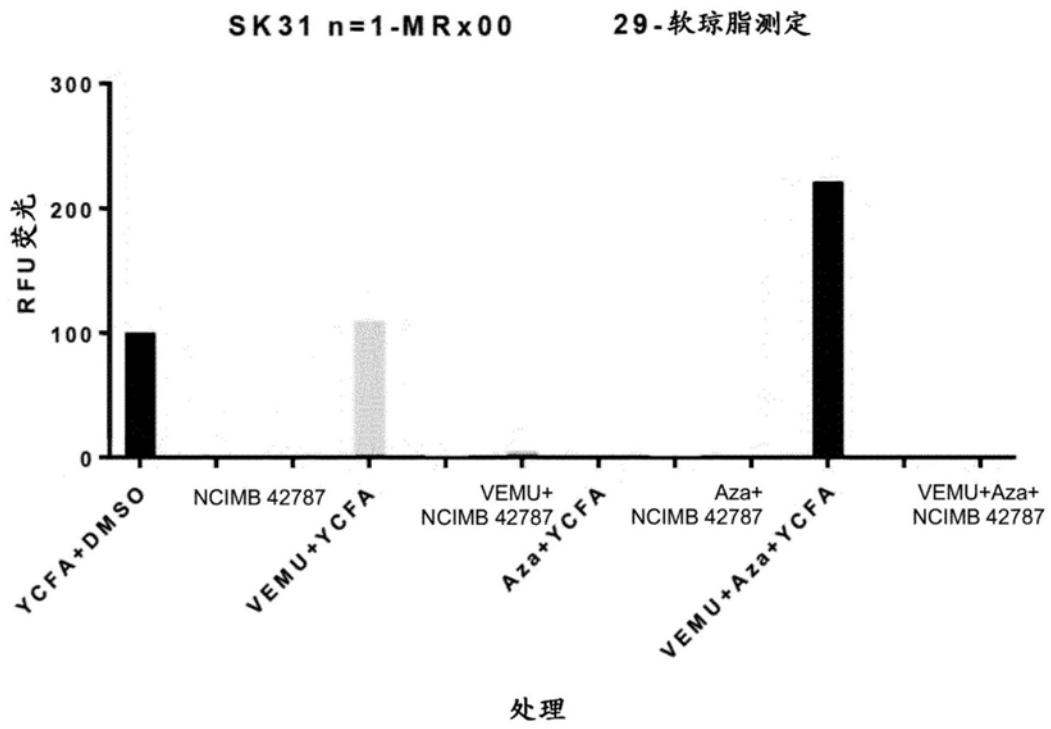


图41

SKMEL31 细胞系-ERK信号传导

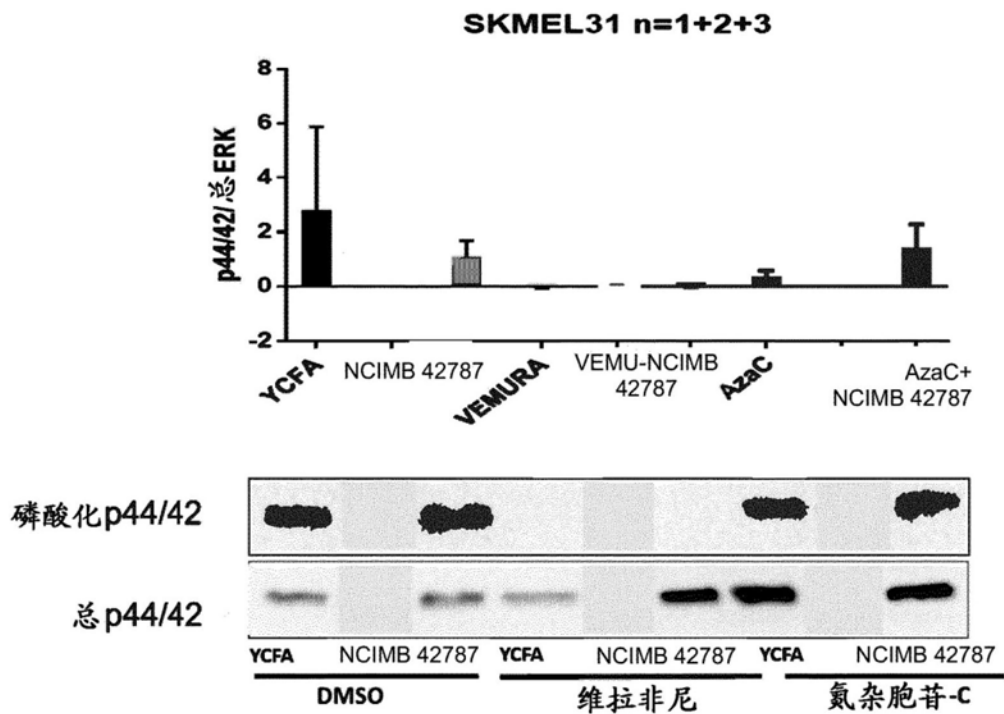


图42

451Lu 细胞系-MAP2 基因表达

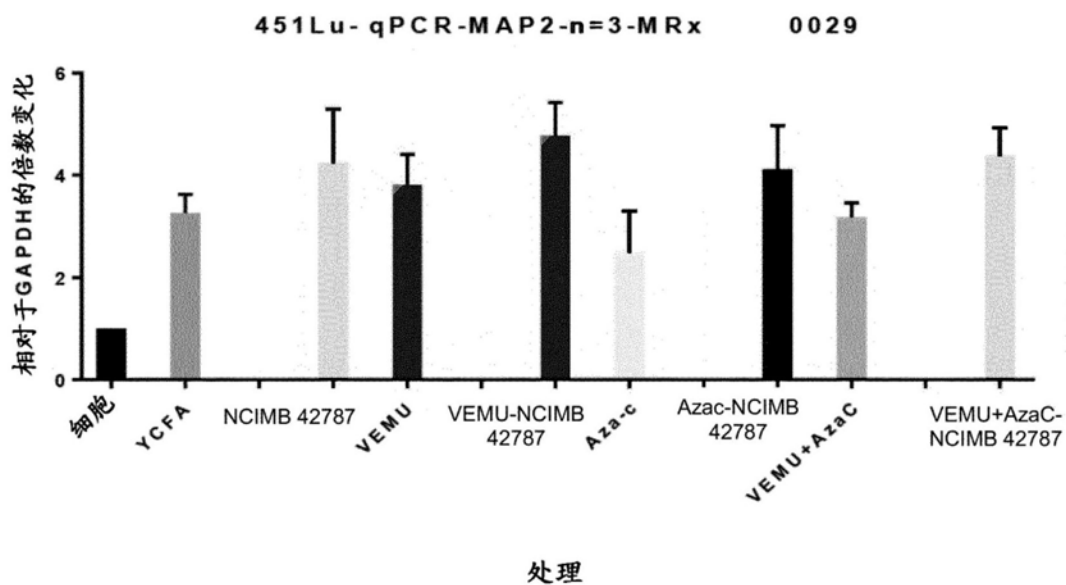


图43

451Lu 细胞系-克隆源性存活

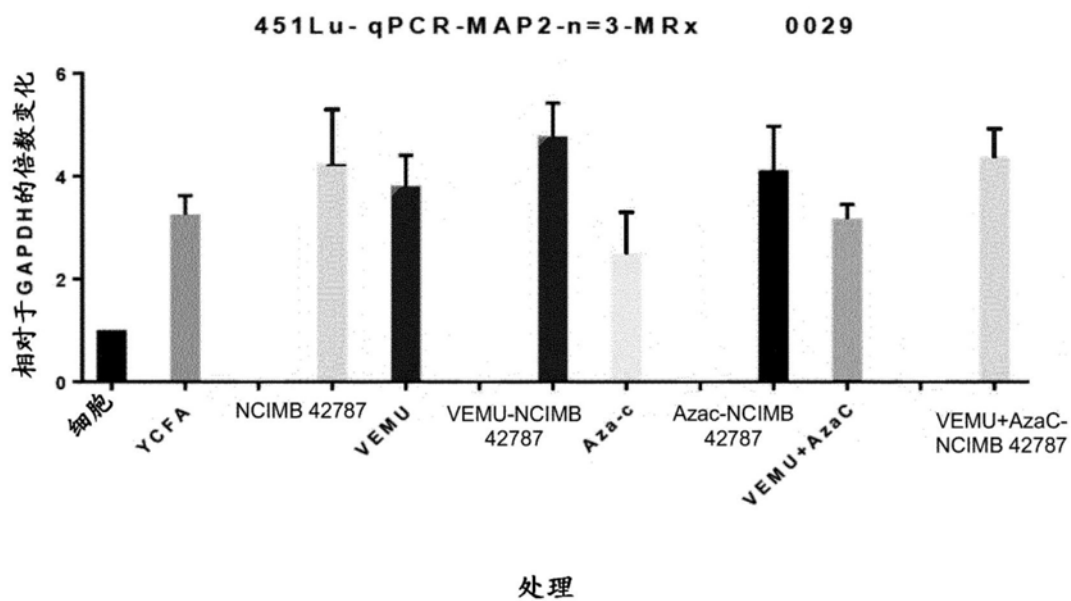


图44

451Lu 细胞系-软琼脂生长

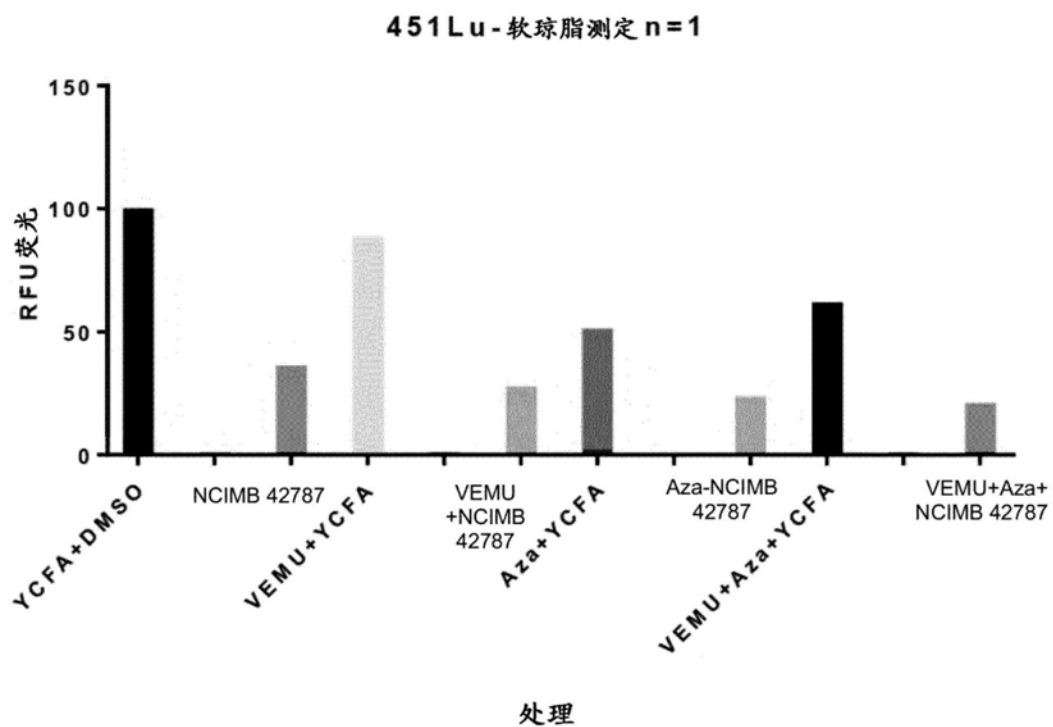


图45

451Lu 细胞系-ERK 信号传导

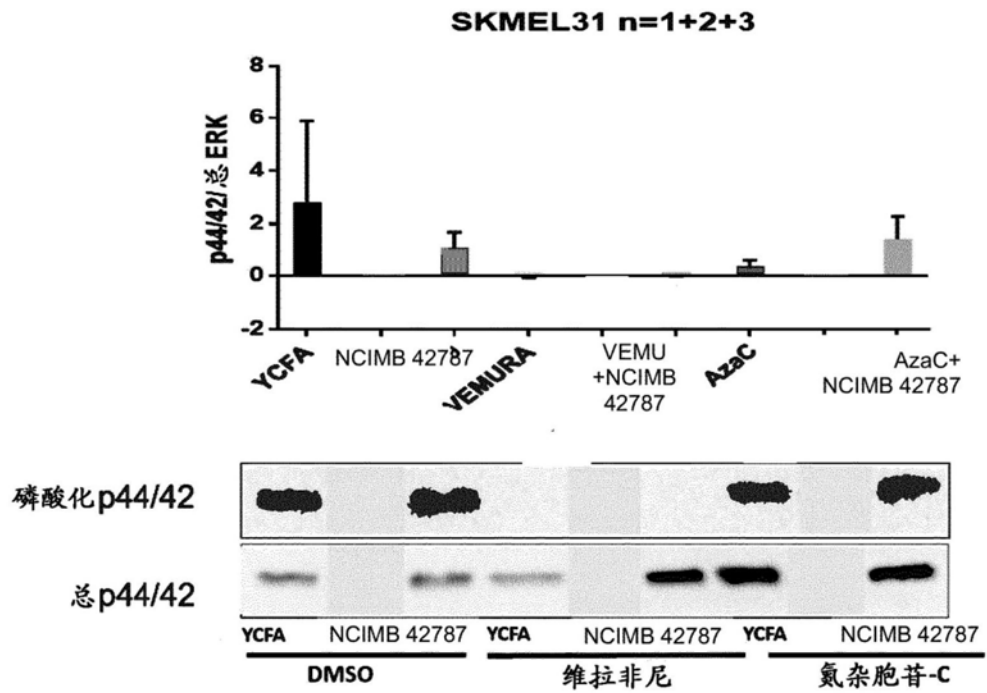


图46

HT-29 细胞系- MAP2 基因表达

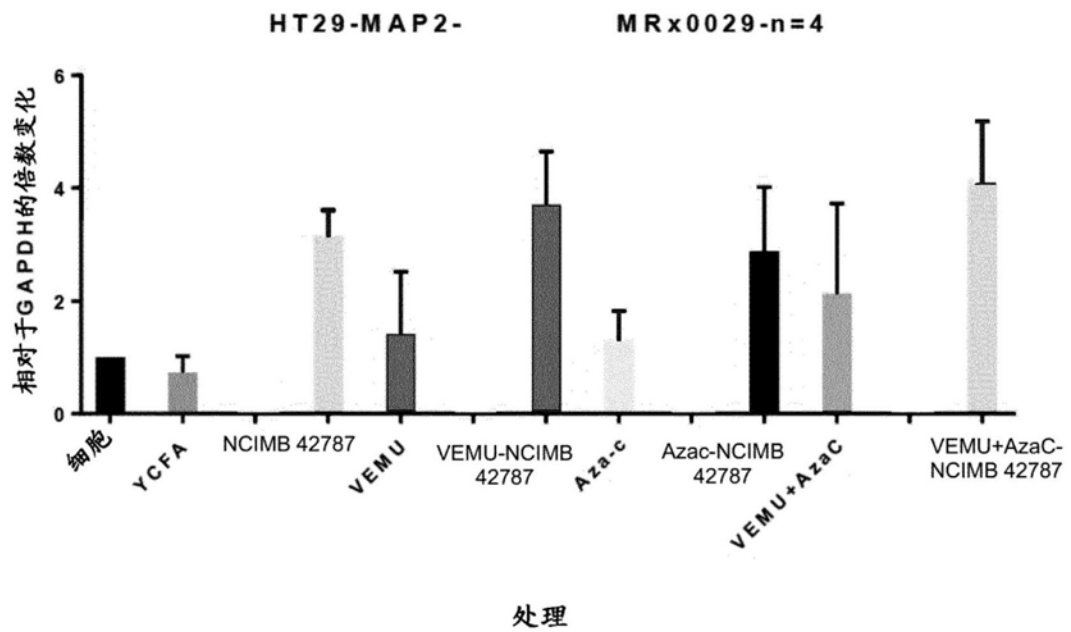


图47

HT-29 细胞系-克隆源性存活

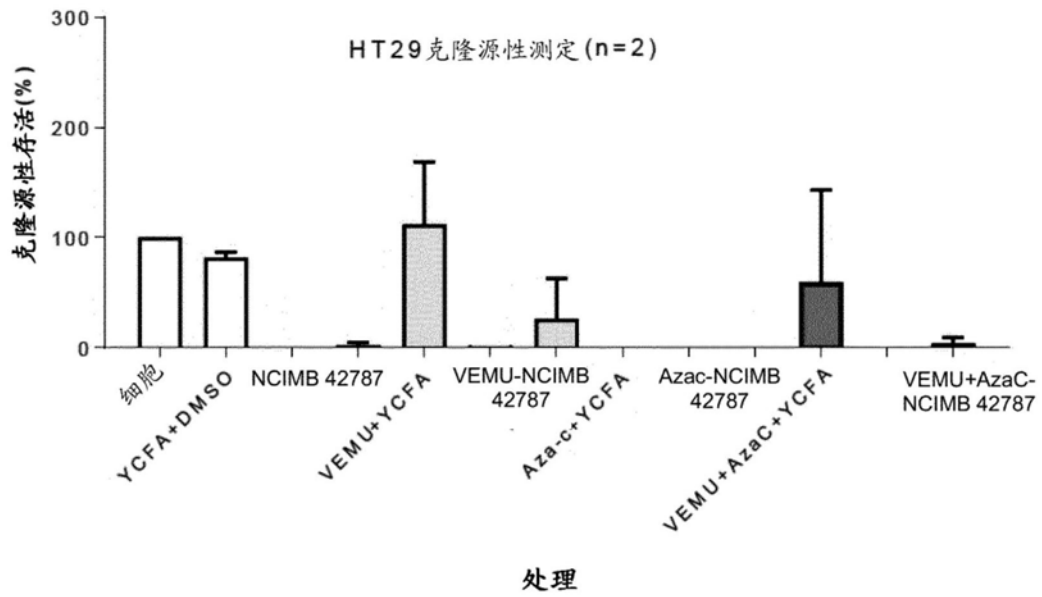


图48

HT-29 细胞系-软琼脂生长

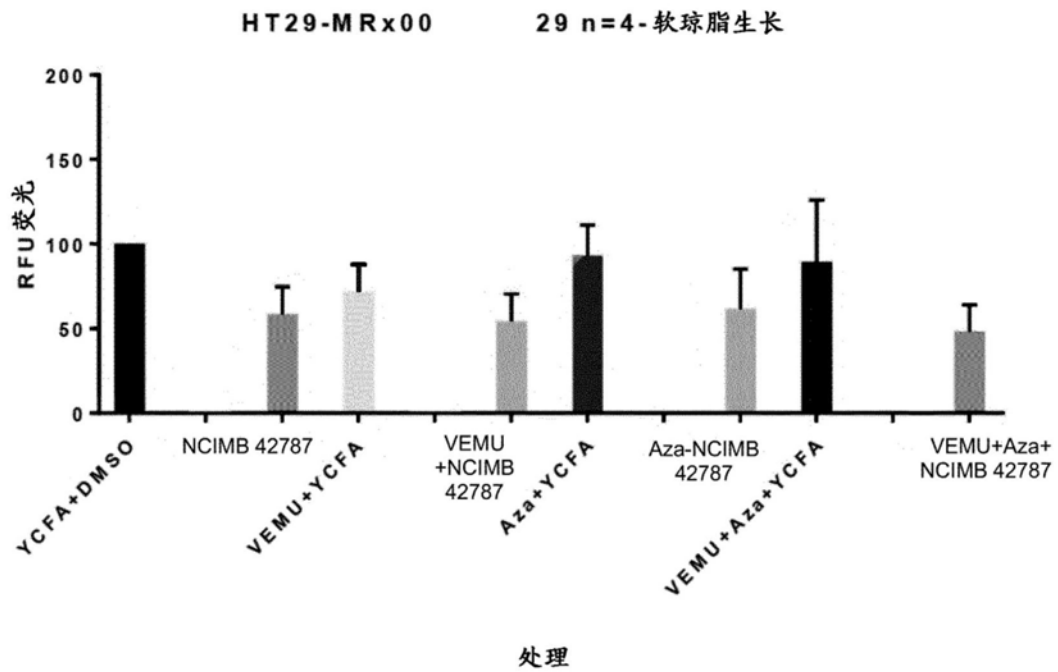


图49A

HT-29 细胞系-软琼脂生长(处理后的菌落)

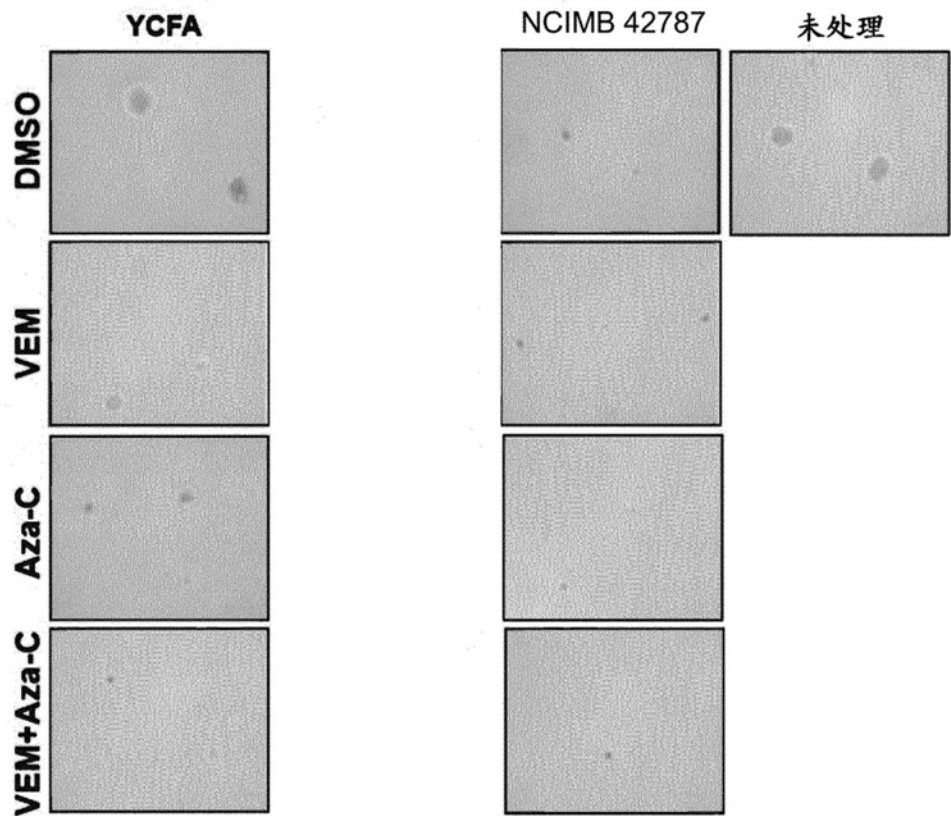


图49B

HT-29细胞系-ERK信号传导

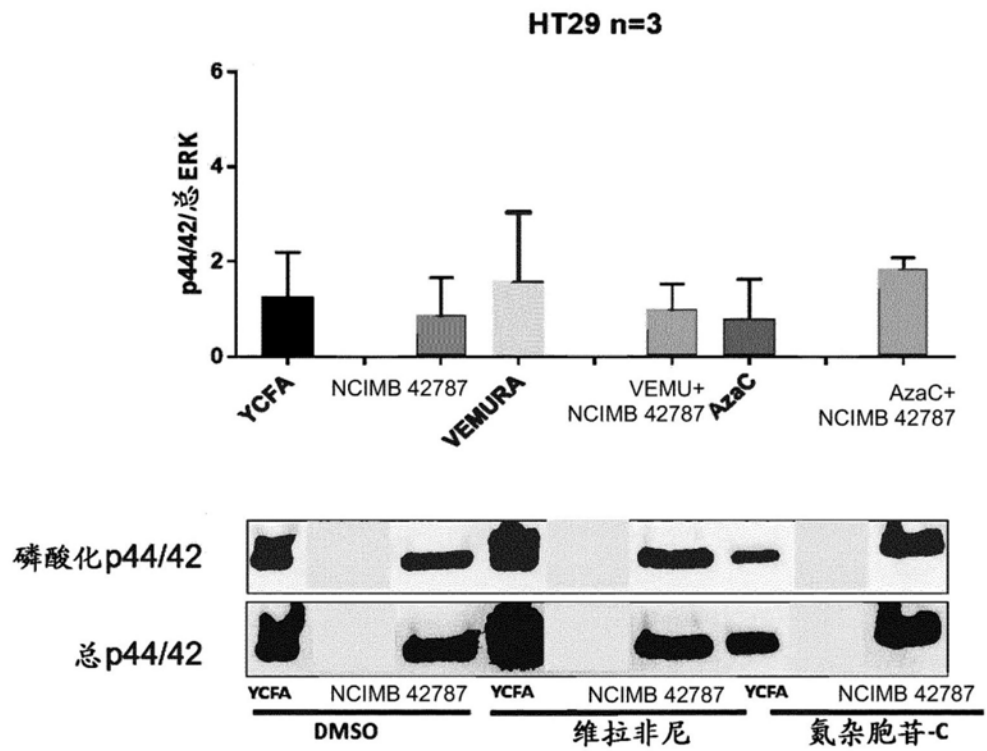


图50

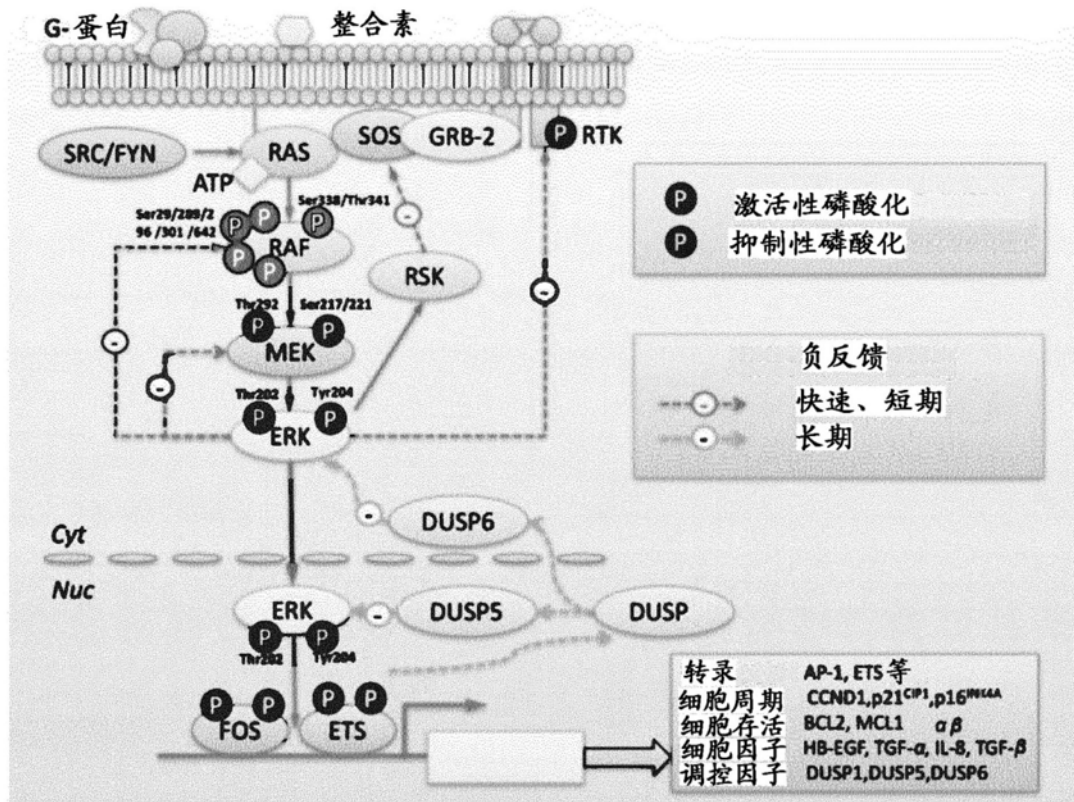
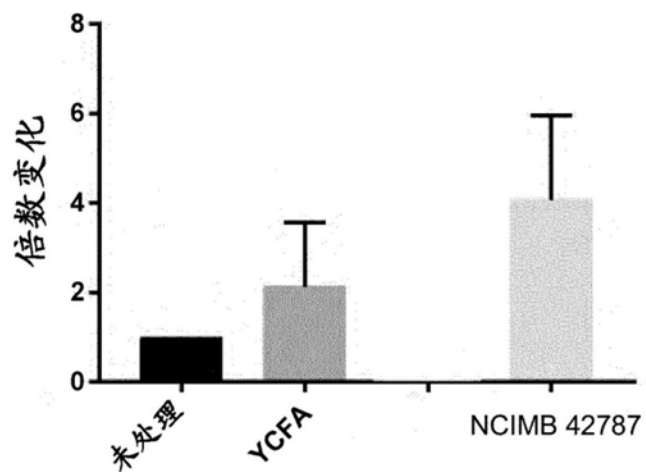


图51

Caco2 细胞-GPR109a 表达

(A)

Caco2 细胞中的 GPR109a 表达 (N=3)



(B)

Caco2 细胞中的 GPR109a 表达 (N=2)

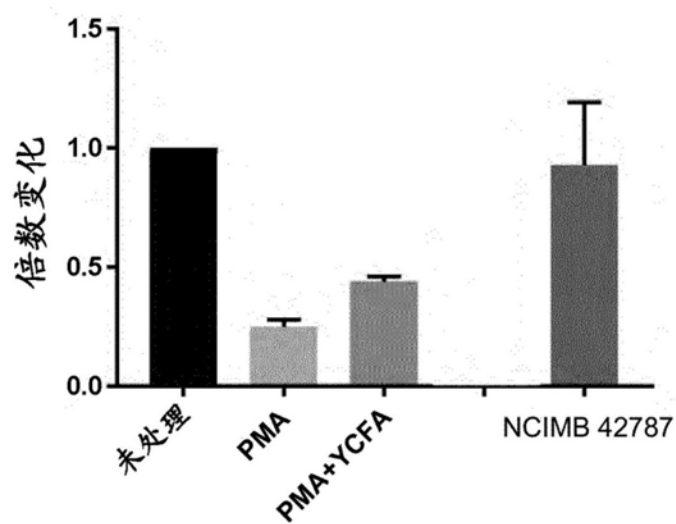
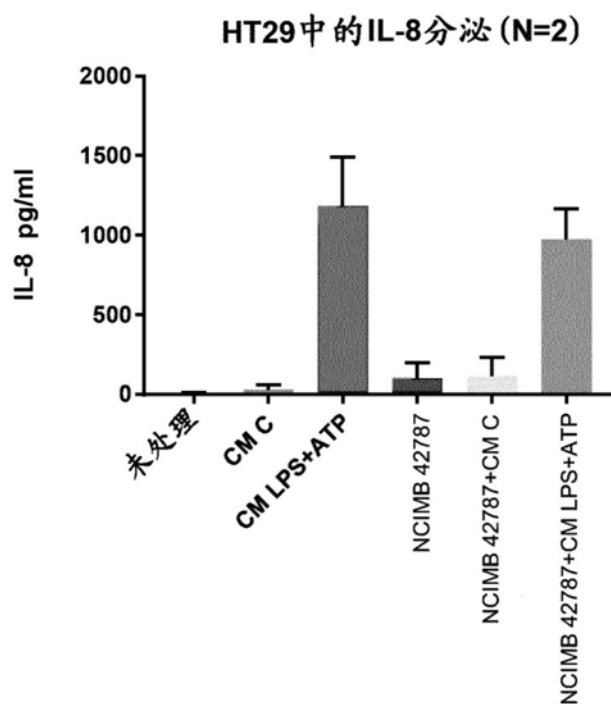


图52

(A)



(B)

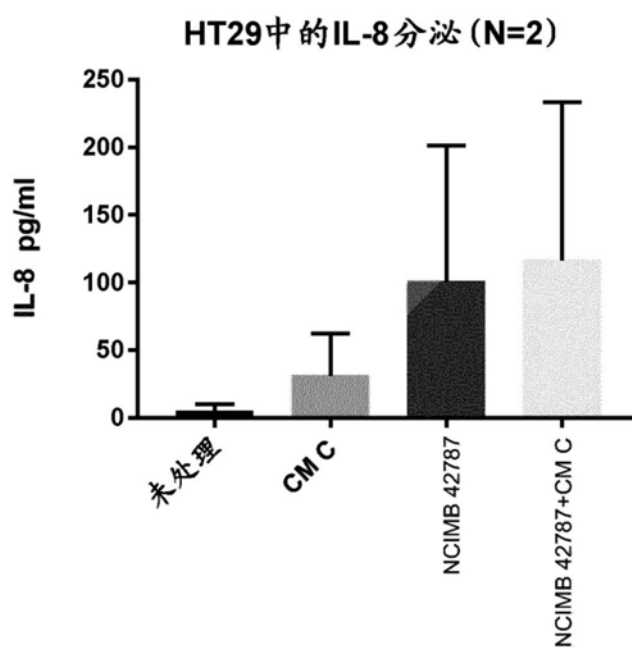


图53

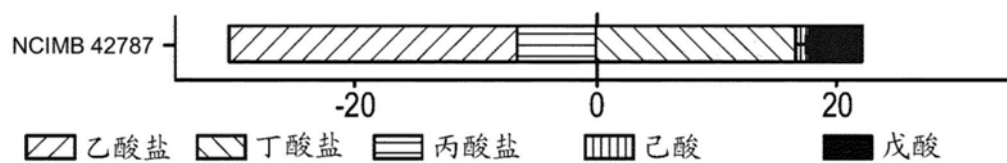


图54

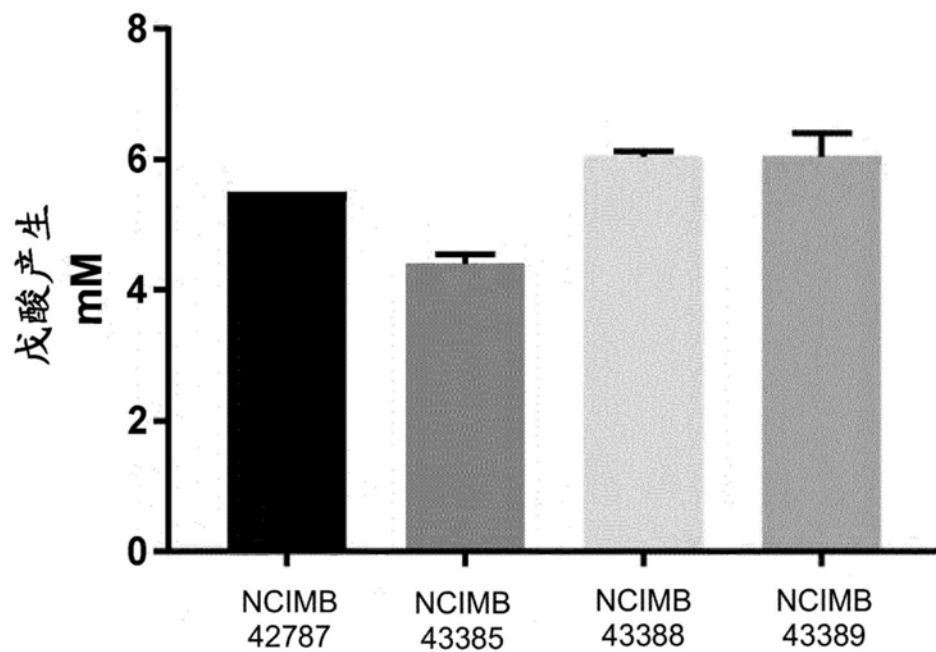


图55

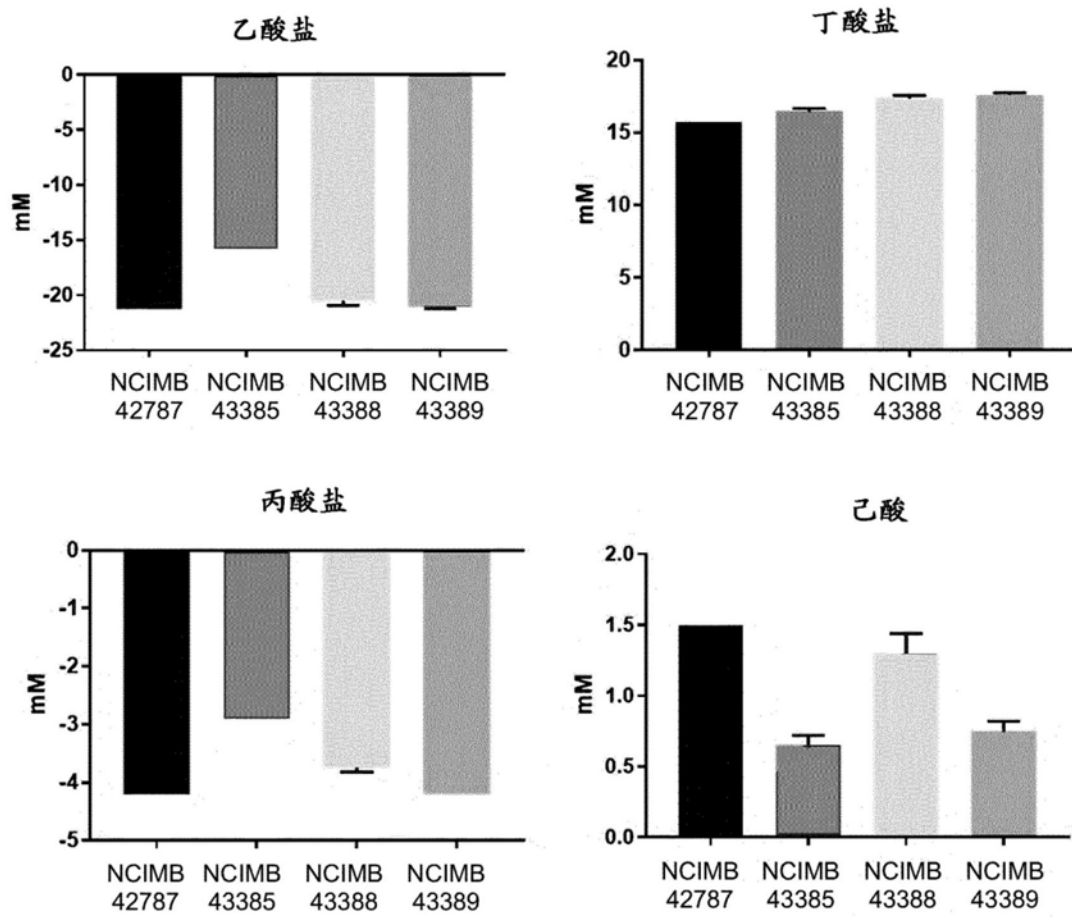


图56

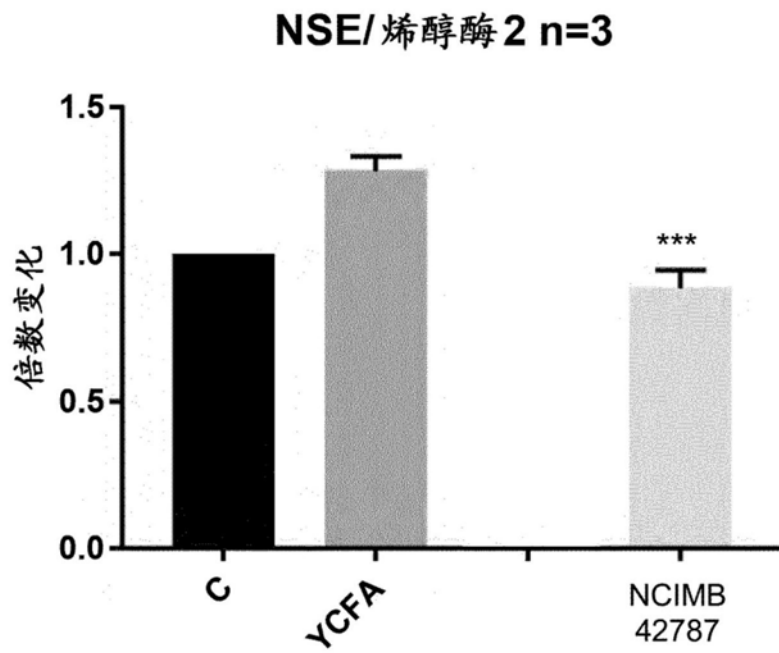


图57

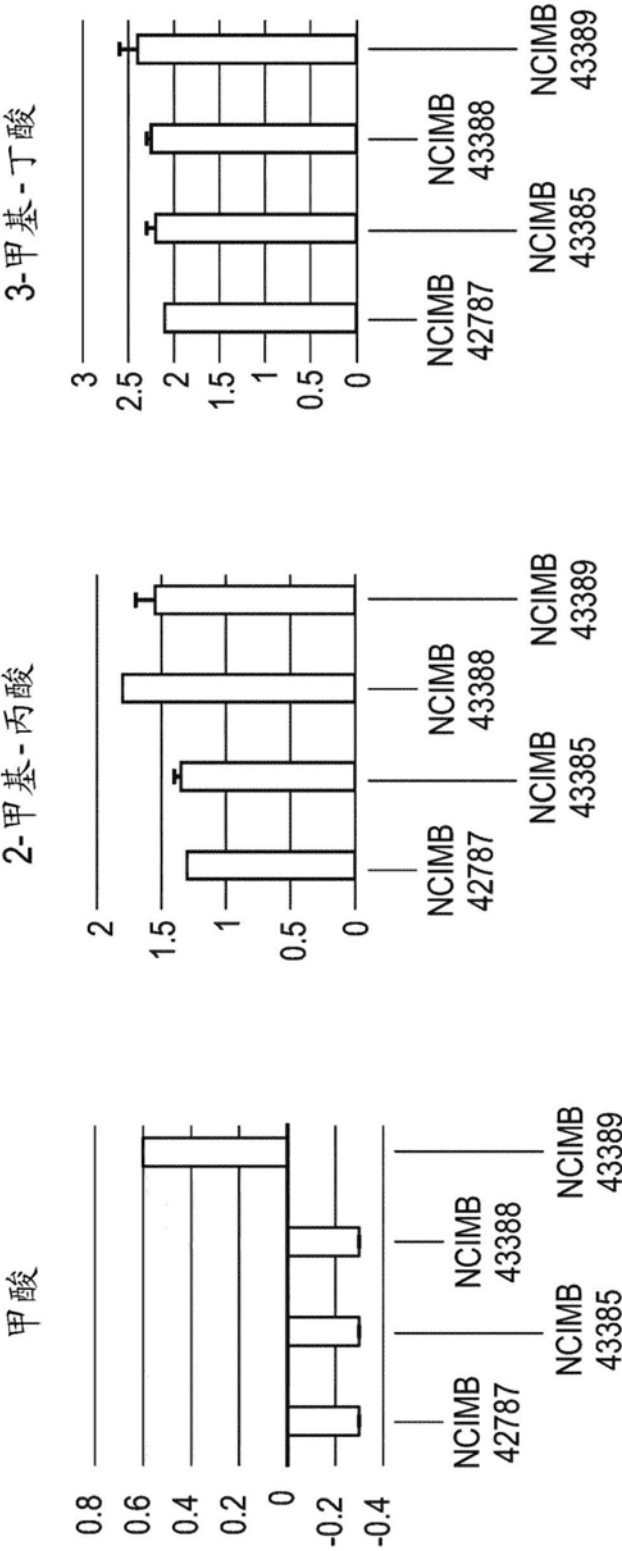


图58

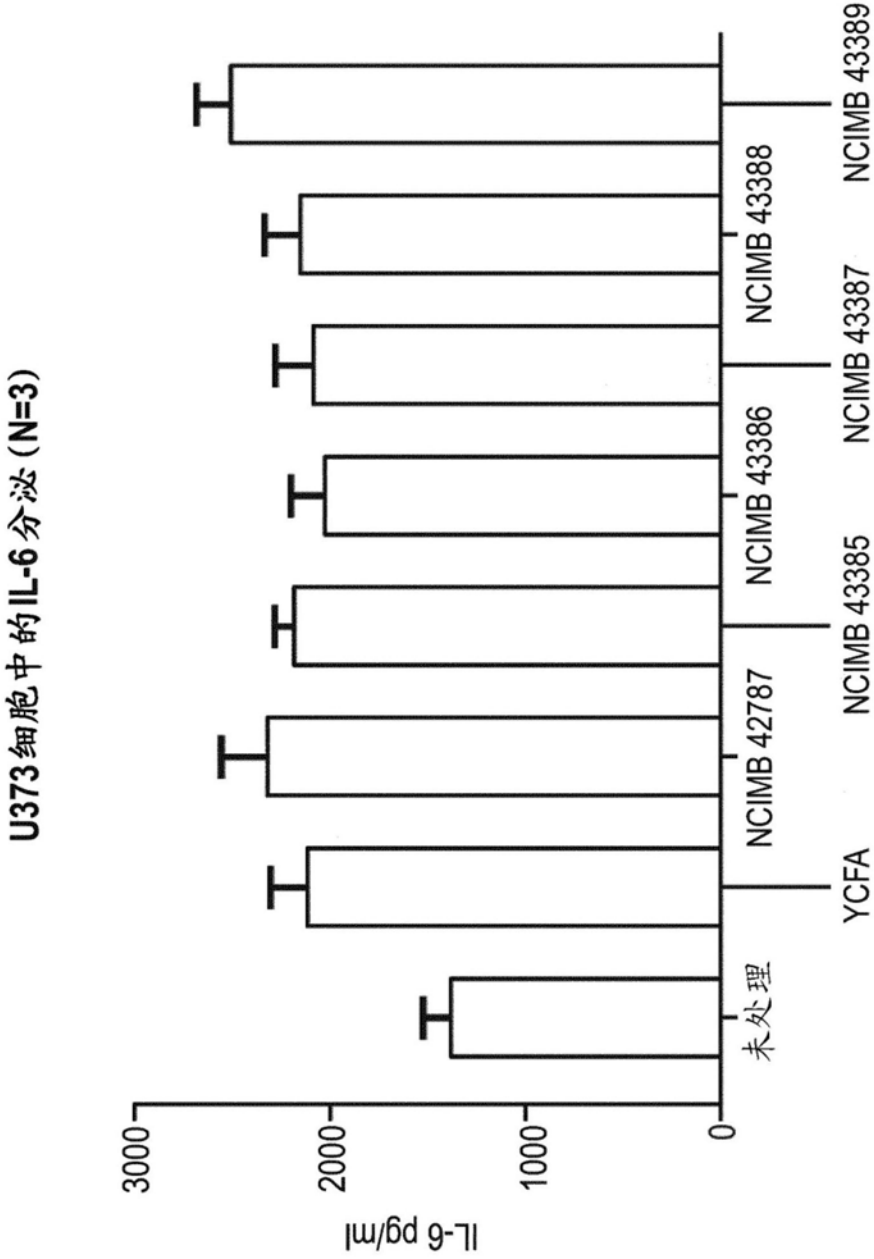


图59

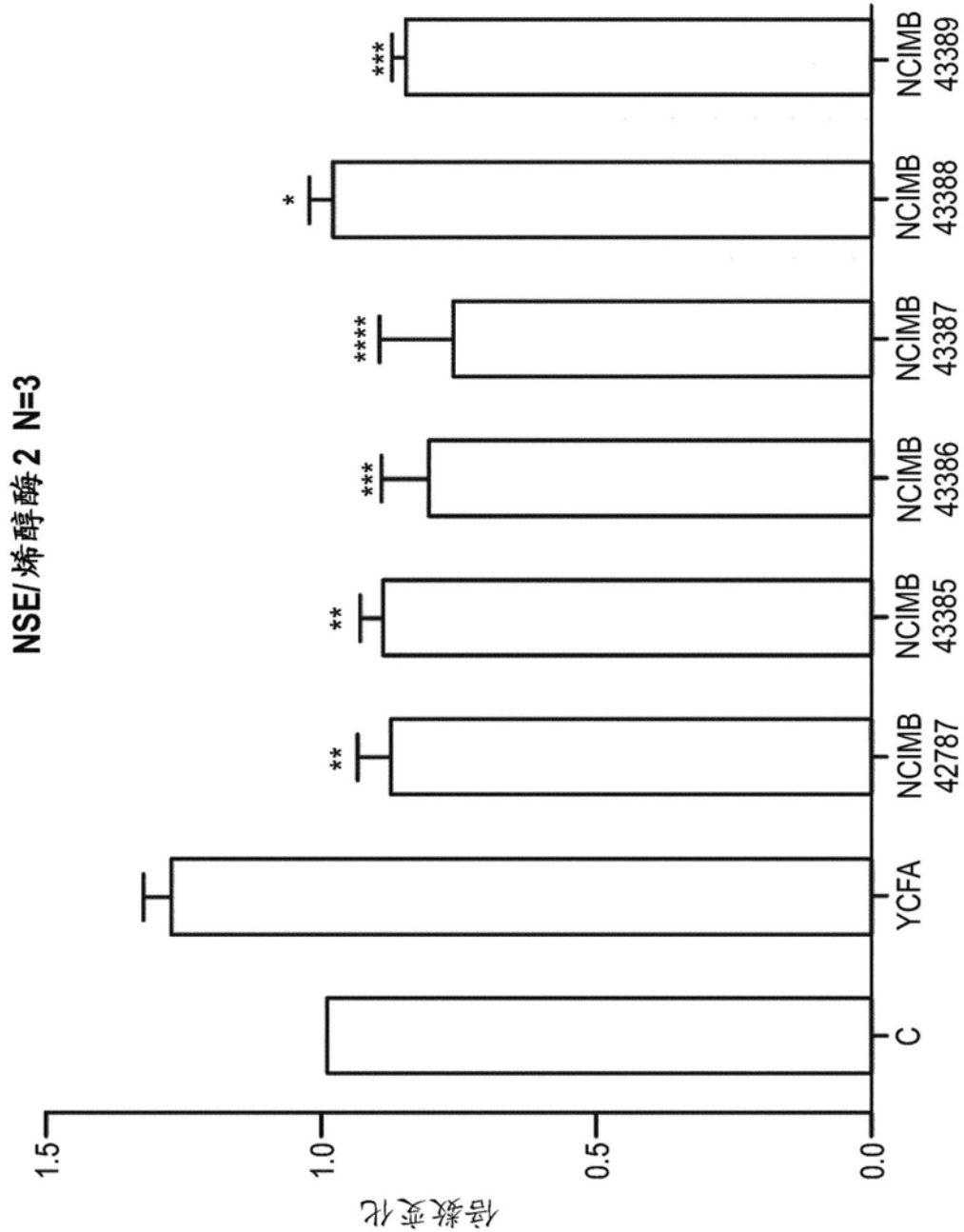


图60

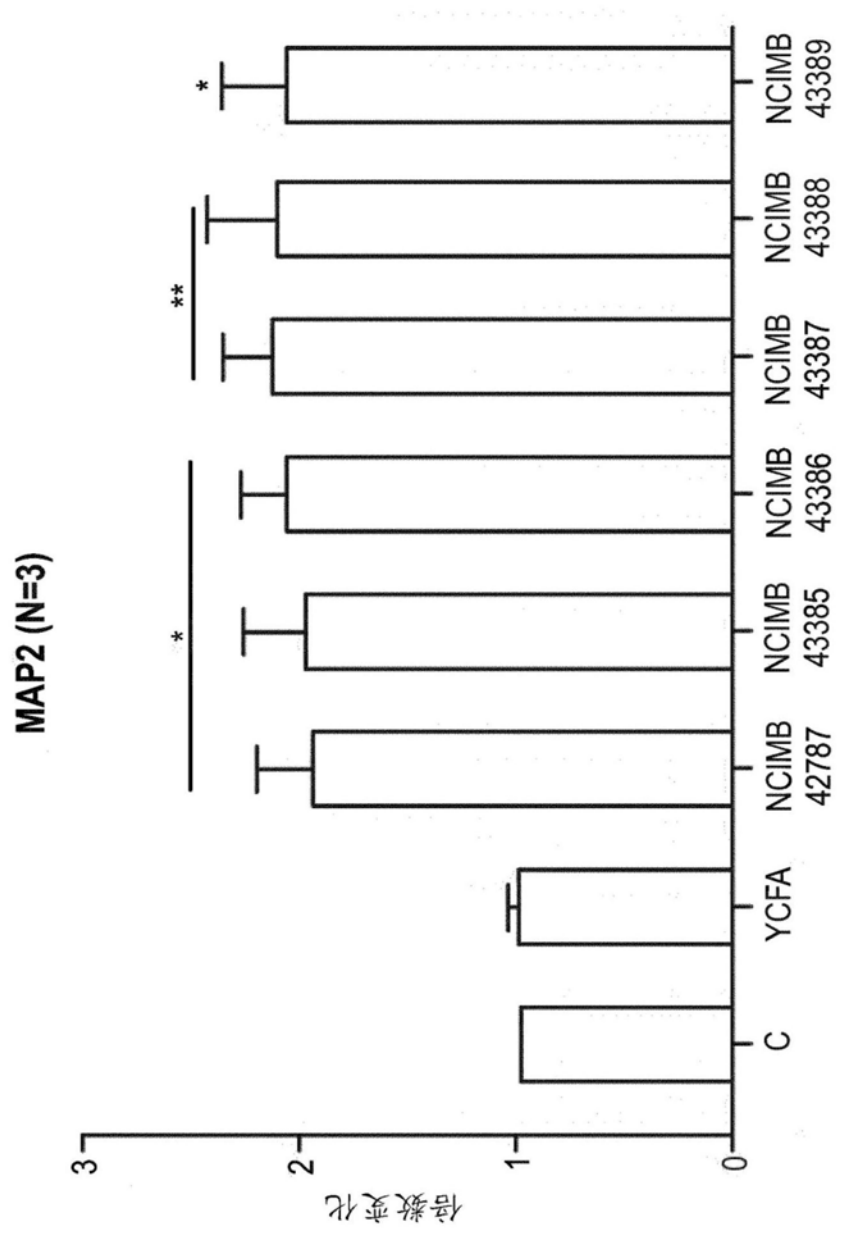


图61A

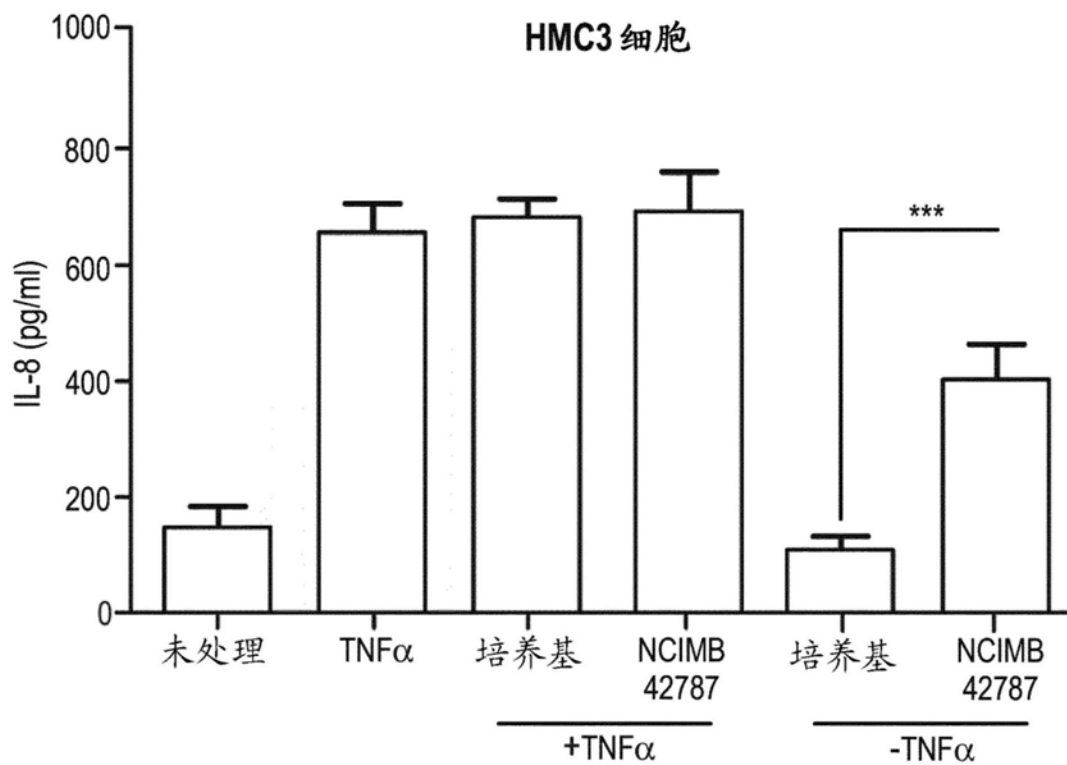


图61B

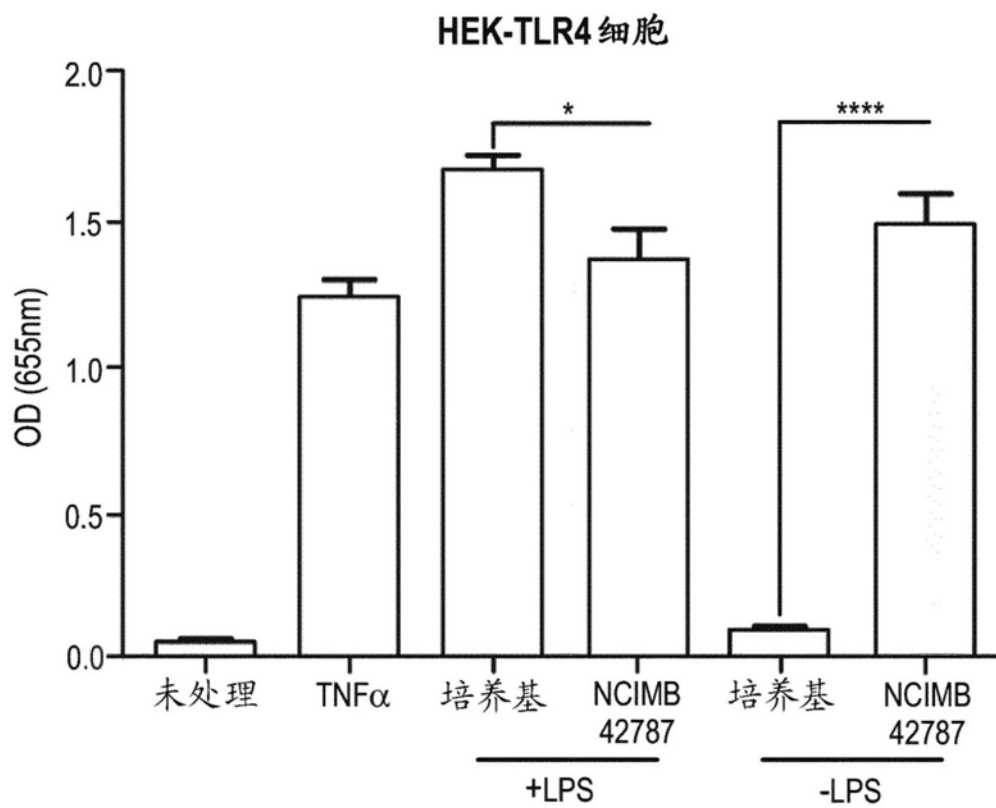


图61C

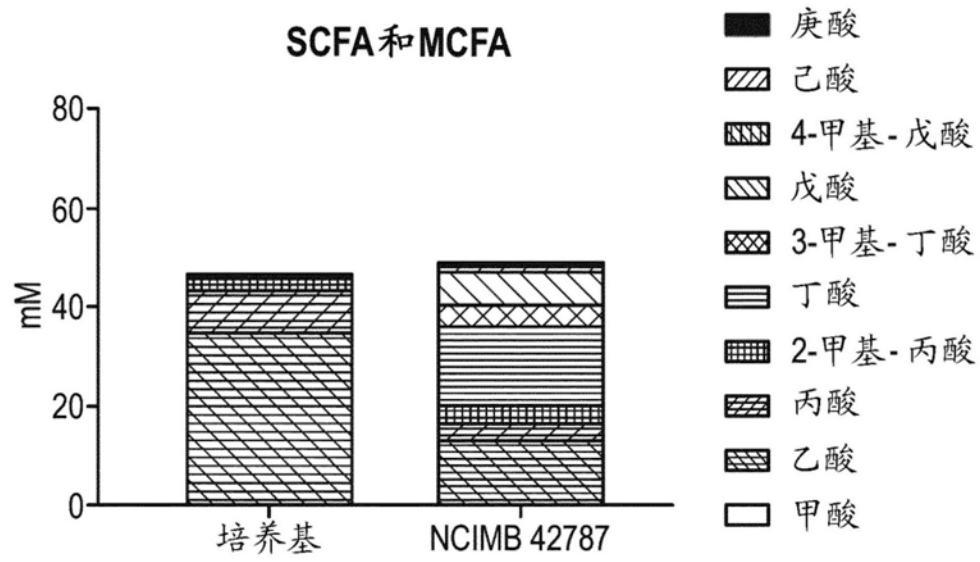


图62A

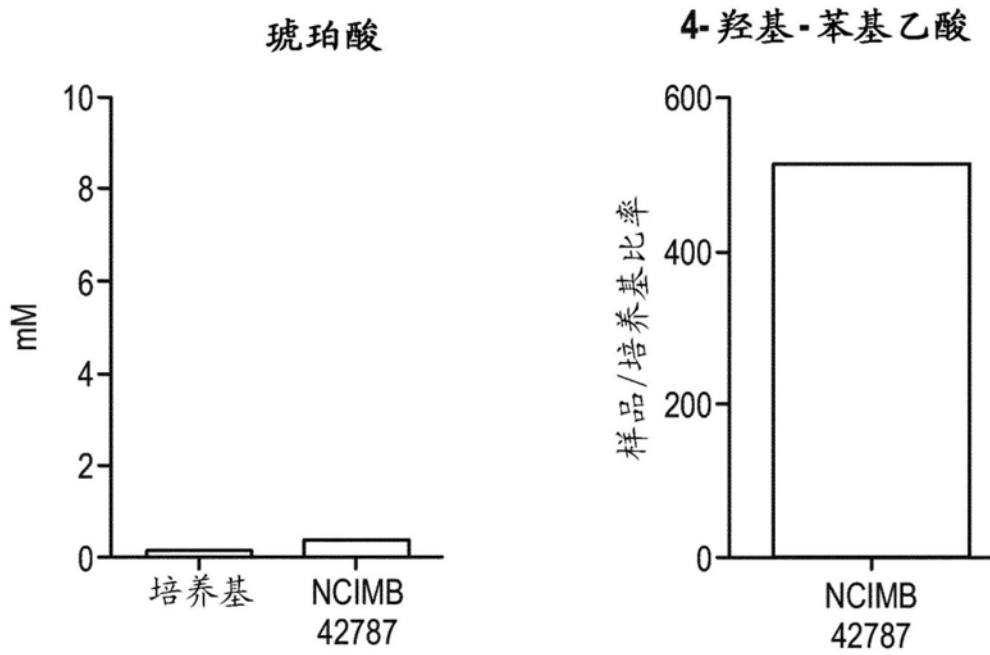


图62B

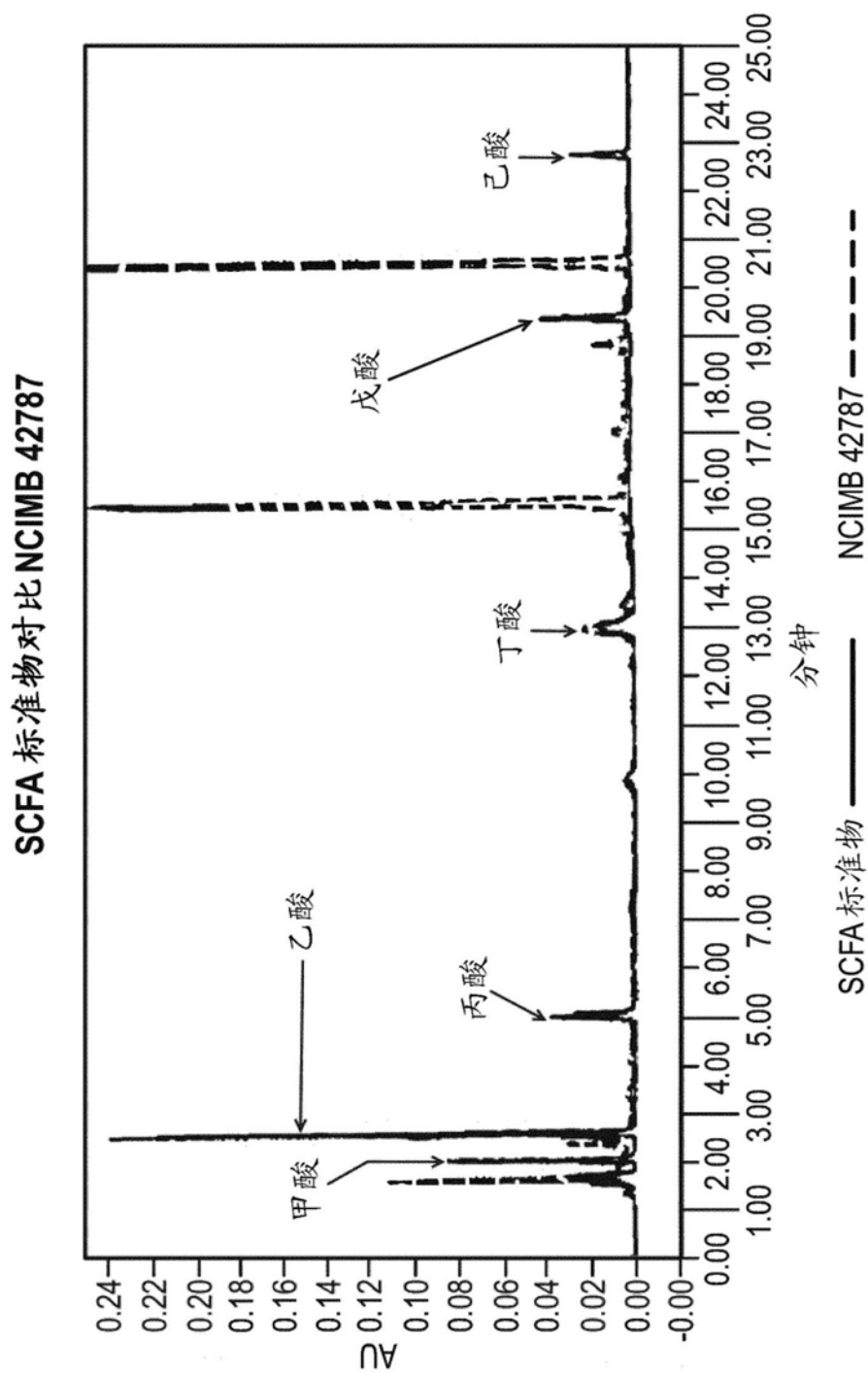


图62C

U373 细胞

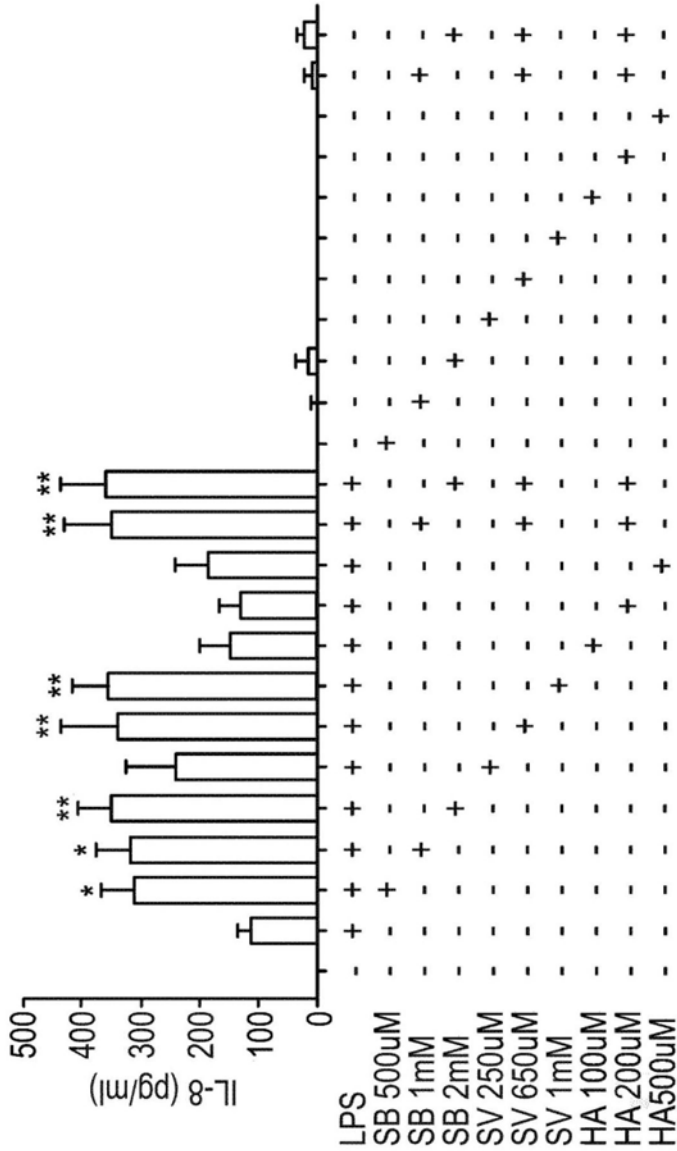


图63

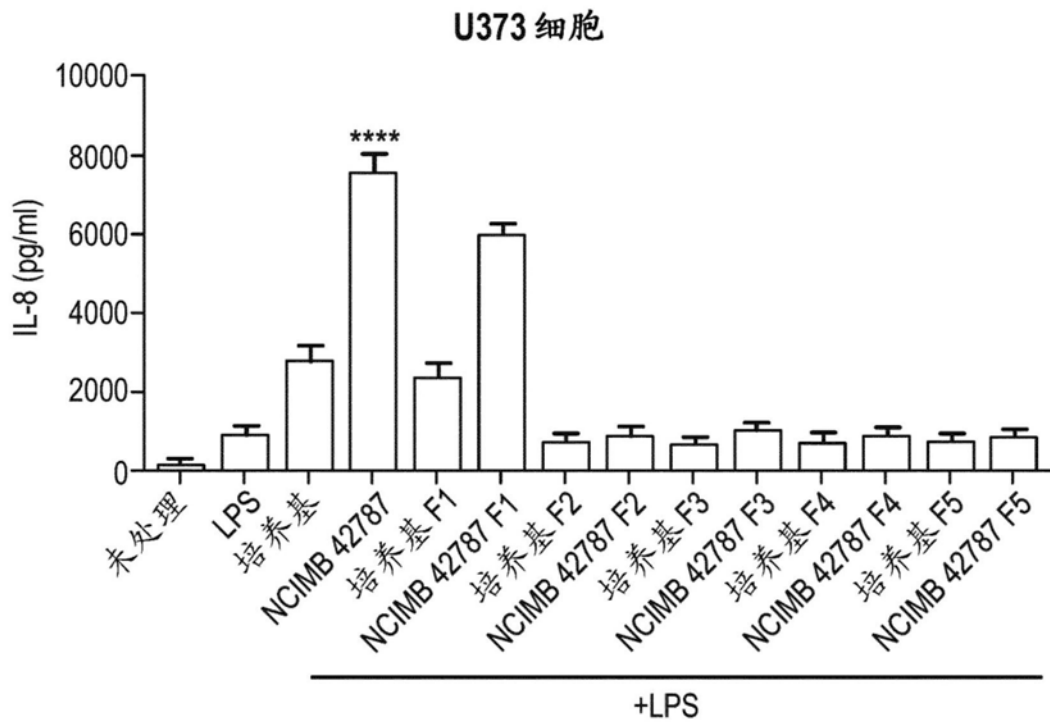


图64A

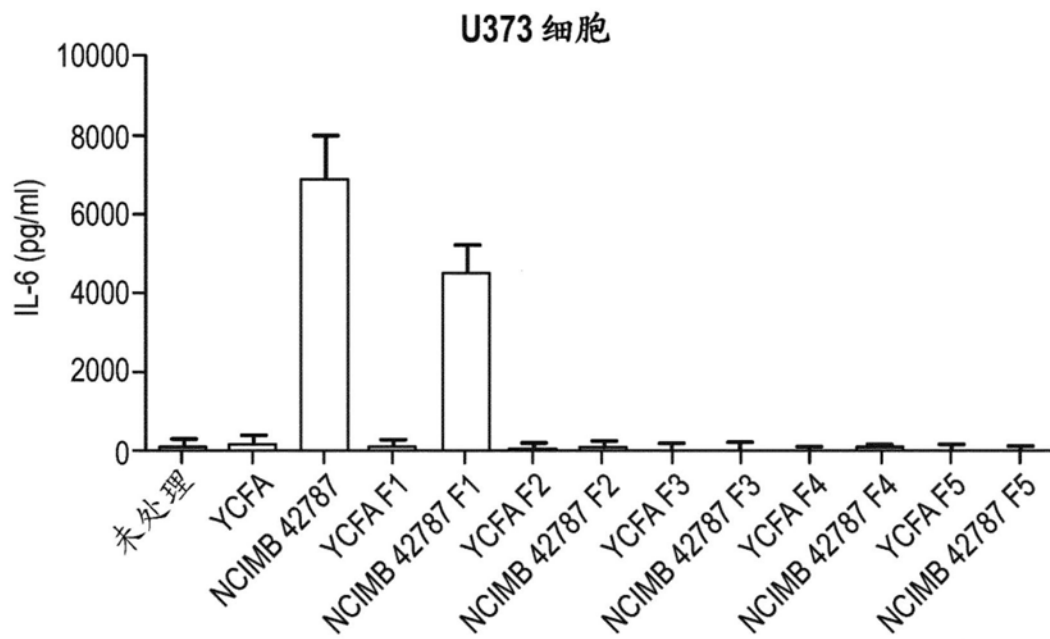


图64B

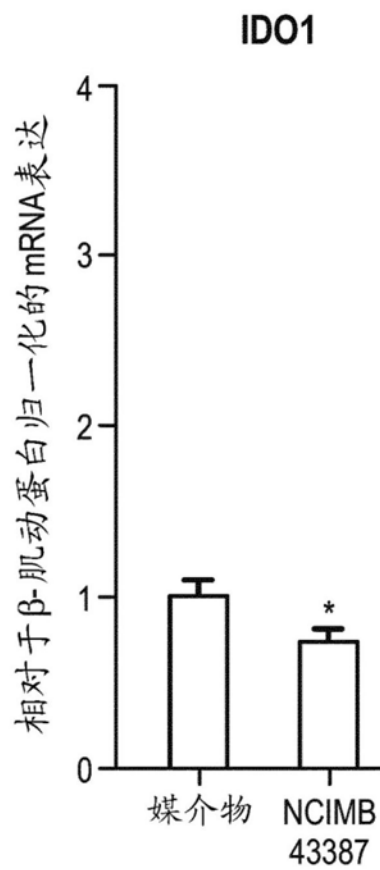


图65

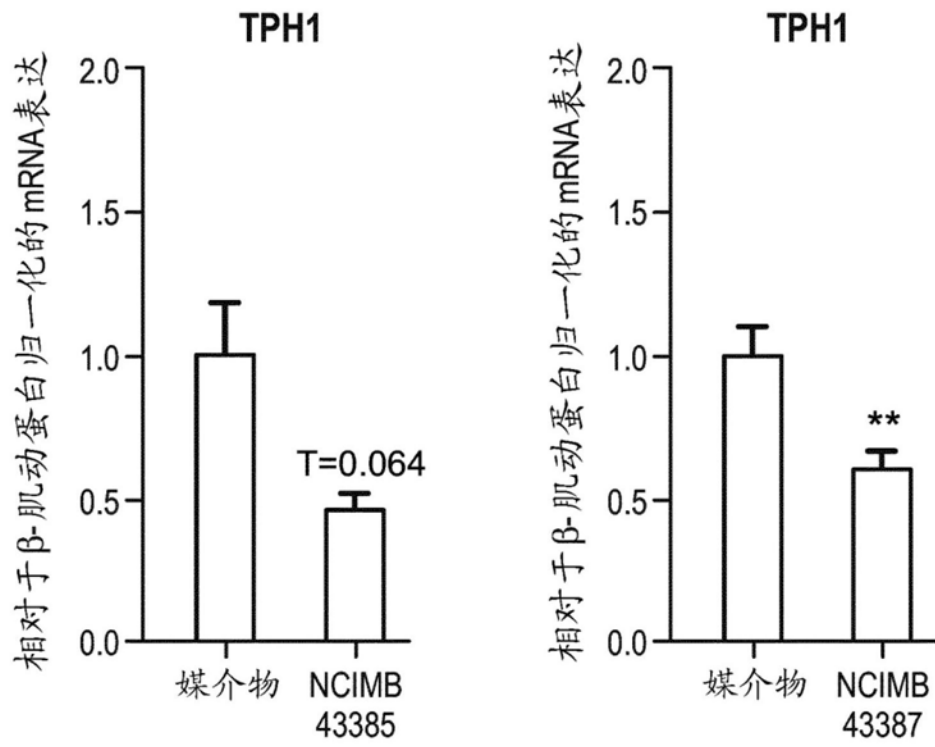


图66

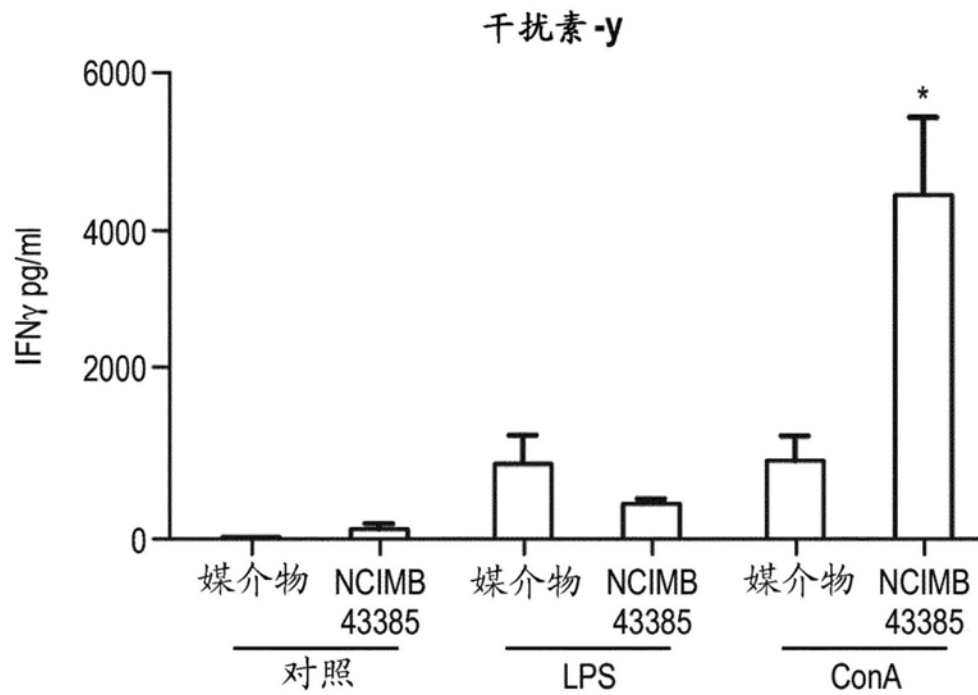


图67A

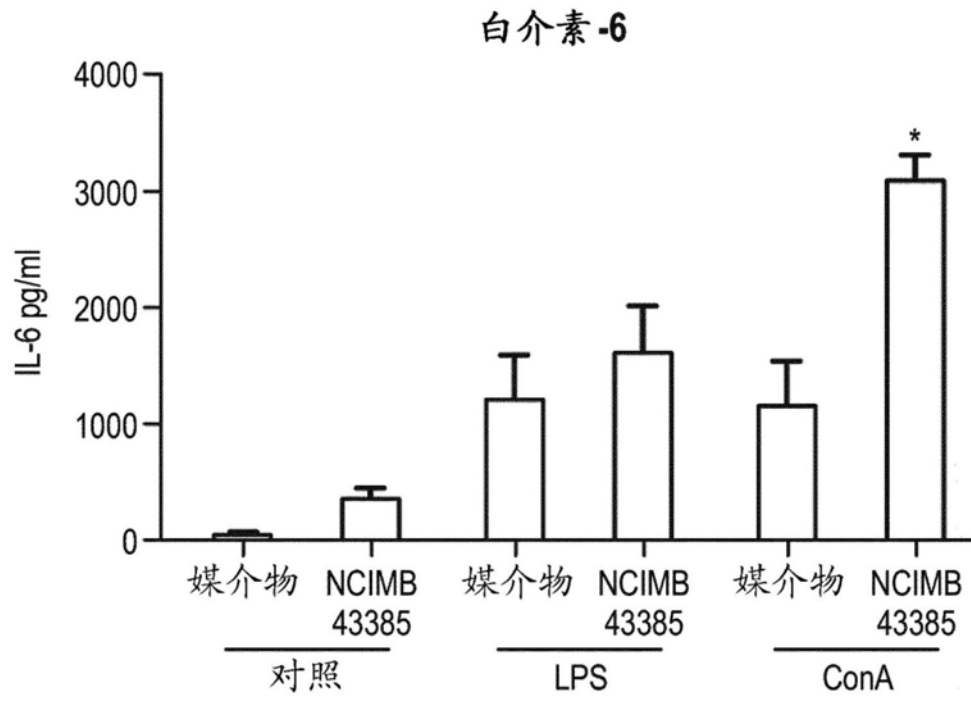


图67B

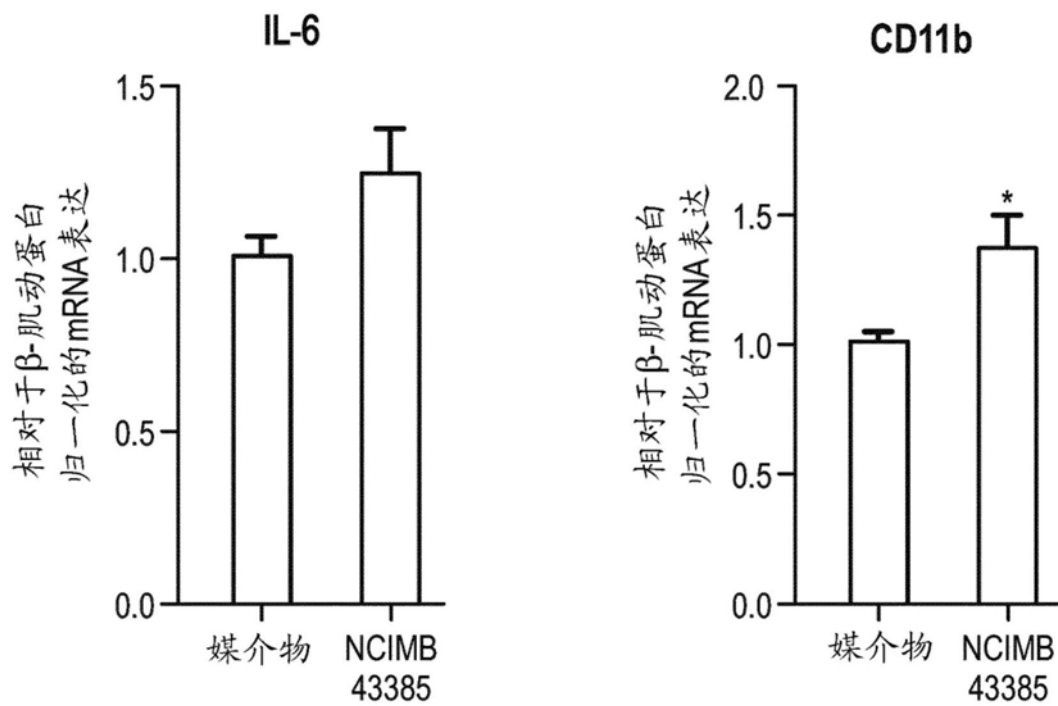


图68

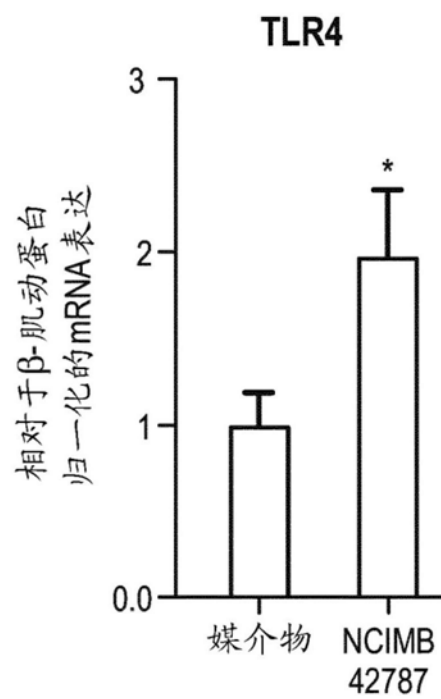


图69