

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-14201

(P2017-14201A)

(43) 公開日 平成29年1月19日 (2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/74 (2015.01)	A 6 1 K 35/74 Z N A Z	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/715 (2006.01)	A 6 1 K 31/715	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/46 (2006.01)	A 6 1 K 47/46	4 C 0 8 7
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 有 請求項の数 4 O L 外国語出願 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-126806 (P2016-126806)	(71) 出願人	512259330
(22) 出願日	平成28年6月27日 (2016. 6. 27)		シェン, ユエ
(62) 分割の表示	特願2013-503958 (P2013-503958) の分割		SHEN, Yue
原出願日	平成23年4月7日 (2011. 4. 7)		中華人民共和国 310058 ハンチョウ, ユイハantan ロード 866, ビル ディング 4, ユニット 3, ルーム 1 103
(31) 優先権主張番号	61/345, 039		Room 1103, Unit 3, Bu ilding 4, 866 Yuhang tang Road, Hangzhou, 310058 China
(32) 優先日	平成22年5月14日 (2010. 5. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/321, 527		
(32) 優先日	平成22年4月7日 (2010. 4. 7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

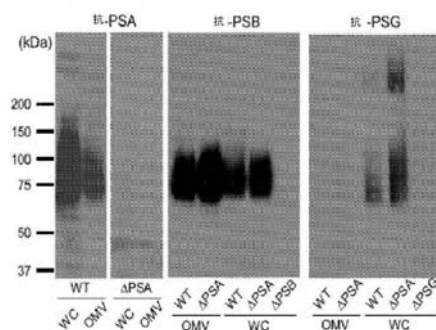
(54) 【発明の名称】 粘膜へ化合物を送るための媒体、それに関連する組成物、方法、及びシステム

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 クロウン病、潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患 (IBD) の治療に有用な新規薬剤の提供。

【解決手段】 水性環境を取り囲む脂質膜で形成されPoly saccharide A (PSA) を含む外膜小胞を有し、前記脂質膜がBacteroides fragilisの細胞膜から得られたものである、薬用組成物。前記PSAは低分子量PSA (L-PSA) であることが好ましい。

【選択図】 図1 B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水性環境を取り囲む脂質膜で形成されPolysaccharide A (PSA) を含む外膜小胞を有し、前記脂質膜がBacteroides fragilisの細胞膜から得られたものである、薬物として使用するための薬用組成物。

【請求項 2】

さらに賦形剤を含む請求項 1 記載の薬用組成物。

【請求項 3】

前記PSAが低分子量PSA (L-PSA) である請求項 1 または 2 に記載の薬用組成物。

【請求項 4】

炎症性腸疾患の治療に有用な既知の 1 種以上の薬物をさらに含む請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の薬用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

米国政府は、国立衛生研究所によって授与された授与 No. DK078938 に従って、本発明においていくらかの権利を有する。

【0002】

本開示は、粘膜へ化合物を送るための媒体、組成物、方法、及びシステムに関する。特に、本開示は、消化管の粘膜へ化合物を送るための媒体に関する。

【背景技術】

【0003】

所望の化合物又は物質を粘膜へ効率的に送ることは、具体的には、消化管へ送ることにおいて、また、特にヒトの消化管へ送ることにおいて、挑戦し続けられている。

【0004】

ヒトの消化管は、免疫機構の進行や機能において広範囲の影響を有する非常に多くの微生物（腸の微生物叢として知られている）を保有している。哺乳類の消化管に存在する無数の細菌種のなかでも、バクテロイデス門は、最も豊富なグラム陰性細菌門である。

【0005】

免疫調節に関わる微生物及び化合物を同定することは、特に興味深いことである。例えば、バクテロイデス フラギリス (Bacteroides fragilis) は、免疫調節の特性を有することを示しヒトと共生する微生物である。特に、バクテロイデス フラギリスの免疫調節特性は、細菌によるポリ多糖 A (PSA) の産生と関連付けられている。

【0006】

グラム陰性細菌は、細菌産生物を出すための複雑な機構、III型分泌装置 (T3SS)、T4SS、及び、T6SSを発達させており、これら装置は、宿主細胞に直接的に接触した後に細菌エフェクタの位置を変える複雑な表面器官を作る。他の分泌戦略は、グラム陰性細菌の表面から放出され、離れた標的細胞へ一式のカーゴ分子を送る外膜媒体 (OMVs) である。多くのグラム陰性細菌（全てではないが）は、OMVsを作り出すようであるが、ヒトと共生する細菌の塩基配列は、普遍的にT3SS、T4SS、及びT6SSがないことが明らかになっている。

【0007】

しかしながら、B. フラギリス（又は共生細菌）が有益な微生物分子を免疫機構へ送り、B. フラギリス（又は共生細菌）が免疫調節特性を行うこととなるための機構及び／又は分子トリガーの同定は、挑戦し続けられている。

【0008】

クローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患 (IBD) は、様々な症状を示し、それによって、制御できない腸の炎症が消化管の深刻な病状を引き起こすこととなる。IBDは、合衆国において約100万人を苦しめている。IBDの医学的及び社会的な負荷に加え、病気の発生は、‘西洋’社会において驚くほどに増えており、現状の治療法は、か

10

20

30

40

50

なり不十分なものである。IBDの原因は、何十年もの研究の後でも明らかにされないままであるが、免疫調節における腸細菌に関する不具合は、病気において重要な役割を有しているようである（非特許文献1）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Braun, J. & Wei, B. Body traffic: ecology, genetics, and immunity in inflammatory bowel disease. Annu Rev Pathol 2, 401-429 (2007).8(1) pp. 2-6

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0010】

開示の1以上の実施形態の詳細は、下記添付の図面及び記述において説明されている。他の特徴、課題、及び効果は、記述、図面及び請求項から明らかになり得る。

【0011】

外膜小胞（OMVs）、宿主細胞の細菌分子を標的とする分泌構造によって、PSAが宿主へ送られることを我々は明らかにした。PSAを含むOMVsは、宿主免疫機構の樹枝状細胞によって吸収される。OMVsの摂取に続き、Foxp3及び抗炎症サイトカインインターロイキン-10（IL-10）を発現する制御性T細胞（Treg）の分化を誘導するために、PSAは、樹枝状細胞を調整（プログラム）する。OMVsによるTregの細胞分化は、

20

トール様受容体2（TLR2）の発現、及び、樹枝状細胞によるIL-10の産生を必要とする。特に、精製されたOMVsは、機能性Tregsのインビトロにおける分化をPSA依存的に強い抑制活性を伴うように導く。PSAを含むOMVsで動物を処置することは、実験的な大腸炎を防止し、消化管における炎症誘発サイトカイン反応を抑制する。これらの発見は、共生細菌が小胞の分泌によって有利な微生物因子を提供することを明らかにし、また、IBDのためのプロバイオティクス療法における運送（デリバリー）の新しいやり方へと設計されるプロセスを明らかにする。

【0012】

一実施形態においては、粘膜へ化合物を送るための薬用組成物が提供され、該薬用組成物は、水性環境を取り囲んでいる脂質膜によって形成された外膜小胞と、製剤上適した担体とを有し、小胞がPSA配位子を含む。

30

【0013】

他の実施形態においては、水性環境を取り囲んでいる脂質膜によって形成されPSA配位子を含む外膜小胞と、製剤上適した担体とを有し、脂質膜がB. フラギリスの外膜から得られた、粘膜へ化合物を送るための薬用組成物が提供されている。

【0014】

段落〔0012〕の組成物におけるより詳しい実施形態においては、PSA配位子がL-PSAである。

【0015】

段落〔0012〕の組成物におけるさらなる他の実施形態においては、薬用組成物が、さらに、炎症性腸疾患の処置において使用されることが知られている薬剤又は処置剤の1種以上を含んでいる。

40

【0016】

一実施形態においては、炎症性疾患又は個体における炎症を処置する方法が、水性環境を取り囲んでいる脂質膜によって形成されPSA配位子を含む外膜小胞を有する組成物の有効量を投与することを有している。

【0017】

段落〔0016〕の方法の詳しい実施形態においては、炎症性疾患が炎症性腸疾患である。

【0018】

さらに他の実施形態においては、粘膜へ化合物を送るための媒体が、水性環境を取り囲

50

んでいる脂質膜によって形成され P S A 配位子を含む外膜小胞を有する。

【0019】

段落〔0018〕の具体的な実施形態においては、媒体が、P S A 以外の化合物をさらに含む。

【0020】

別の実施形態においては、機能性Tregsを強力な抑制活性へと導くための方法であって、水性環境を取り囲んでいる脂質膜によって形成され P S A 配位子を含む外膜小胞を利用する方法が提供される。

【0021】

段落〔0020〕の方法のさらに詳細な実施形態においては、Treg細胞がT細胞の増殖を抑制し、且つ／又は、さらに、樹枝状細胞の活性を減らすことにより免疫力を抑える。

10

【0022】

段落〔0020〕の方法の他の実施形態においては、方法が、さらに、共培養のためのD C sを提供することを有し、該方法においては、IL-10が産生され、IL-10の産生がD C sにおけるTLR2の発現の存在に依存し、IL-10のD C 産生におけるP S A 活性のみ（O M V s の非存在）と比較して、D C s におけるTLR2発現が必要とされない。

【0023】

他の実施形態においては、炎症を減らす化合物、又は、インビトロにおける炎症性疾患の症状を改善する化合物を同定するための方法が提供され、該方法は、候補化合物を提供すること、及び、該化合物を伴ってTreg細胞を培養することを有し、さらには、T細胞を提供すること、そして、前記Treg細胞がT細胞活性を抑制するかどうかを測定することを有する。

20

【0024】

段落〔0023〕の実施形態のさらなる詳細においては、前記方法が樹枝状細胞をさらに有し、且つ／又は、前記Treg細胞がFoxp3を発現する。

【0025】

別の実施形態においては、薬剤としての使用のための細菌物質が提供され、該物質は、水性環境を取り囲んでいる脂質膜によって形成された外膜小胞とP S A 配位子を含む小胞とを含んでいる。

【0026】

段落〔0025〕の薬剤のより詳しい実施形態においては、細菌物質が、さらに、賦形剤、及び／又は、炎症性腸疾患の処置において使用されることが知られている1種以上の薬剤を含んでいる。

30

【0027】

他の実施形態においては、炎症性疾患又は炎症の処置において使用される細菌物質が提供され、該材料は、水性環境を取り囲んでいる脂質膜によって形成された外膜小胞と、P S A 配位子を含む小胞とを有する。

【0028】

段落〔0027〕の細菌物質のより具体的な実施形態においては、炎症性疾患が炎症性腸疾患である。

40

【0029】

他の実施形態においては、機能性Tregの分化を強い抑制活性に導くための組成物が、水性環境を取り囲んでいる脂質膜によって形成され P S A 配位子を含む外膜小胞を有する。

【0030】

段落〔0029〕の組成物のより具体的な実施形態においては、TregがT細胞の活性を抑制し、且つ／又は、Treg細胞がFoxp3を発現する。

【0031】

さらに提供されるものは、免疫調節性、具体的には抗炎症性を有する微生物及びその関連物質を選抜するための方法及びシステムである。特に、いくつかの実施形態において、バクテロイデス フラギリスの1種に匹敵する免疫応答性を個々に誘導できる細菌物質の

50

同定を可能にする方法及びシステムが提供される。

【0032】

他の実施形態においては、免疫調節特性を有する細菌物質を同定するための方法が記載されている。該方法は、T細胞のみを、又は抗原提示細胞の存在下でT細胞を候補細菌物質と接触させること、及び、IL-10、Foxp3、TGF31、TGF32、パーフォリン、及びグランザイムBからなる群より選択される1種以上の抗炎症生物標識、及び、IFN γ 、IFN α 、IFN β 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-13、IL-21、IL-22、IL-23、IL-17、TNF α からなる群より選択される1種以上の炎症生物標識のうちの少なくとも1種の発現を検出することを有する。該方法は、さらに、1種以上の抗炎症生物標識の発現の増加、又は、接触後における1種以上の抗炎症生物標識の発現の減少を検出することにより候補細菌物質の抗炎症性能を測定することを有している。

10

【0033】

さらなる別の実施形態においては、免疫調節性能を有する細菌物質を同定するための方法が提供されている。該方法は、候補細菌物質を抗原提示細胞と接触させること、及び、接触の後に抗原提示細胞をT細胞とともに培養することを有している。該方法は、さらに、IL-10、Foxp3、TGF31、TGF32、パーフォリン、及びグランザイムBからなる群より選択される1種以上の抗炎症生物標識、及び、IFN γ 、IFN α 、IFN β 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-13、IL-21、IL-22、IL-23、IL-17、TNF α からなる群より選択される1種以上の炎症生物標識のうちの少なくとも1種の発現を検出することを有する。該方法は、さらに、1種以上の抗炎症生物標識の発現の増加、又は、培養後における1種以上の抗炎症生物標識の発現の減少を検出することにより候補細菌物質の抗炎症性能を測定することを有している。

20

【0034】

他の側面では、動物における免疫調節能力を備える細菌物質を同定するための方法が記載されている。該方法は、候補細菌物質を用いて組み換え遺伝子マーカー非ヒト動物に処置を施すことを有し、組み換え遺伝子マーカー非ヒト動物は、IL-10、Foxp3、TGF31、TGF32、パーフォリン、及びグランザイムBからなる群より選択される1種以上の標識された抗炎症生物標識、及び、IFN γ 、IFN α 、IFN β 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-13、IL-21、IL-22、IL-23、IL-17、TNF α からなる群より選択される1種以上の標識された炎症生物標識のうちの少なくとも1種を発現させるべく、遺伝子的に改質されている。該方法は、組み換え遺伝子マーカー非ヒト動物において1種以上のうちの少なくとも1種の抗炎症生物標識の発現又は処置後の1種以上のうちの少なくとも1種の炎症生物標識の発現を検出すること、及び、1種以上の抗炎症生物標識の発現の増加、又は、処置後における1種以上の炎症生物標識の発現の減少を検出することにより候補細菌物質の抗炎症性能を測定すること、をさらに有している。

30

【0035】

別の側面では、細菌物質を選別するためのシステムが記載されている。該システムは、少なくとも2種のT細胞と、抗原提示細胞と、IL-10、Foxp3、TGF31、TGF32、パーフォリン、及びグランザイムBからなる群より選択される1種以上の抗炎症生物標識、及び、IFN γ 、IFN α 、IFN β 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-13、IL-21、IL-22、IL-23、IL-17、TNF α からなる群より選択される1種以上の炎症生物標識のうちの少なくとも1種を検出するための試薬とを有し、これらは、上述した抗炎症細菌物質を同定する方法において、同時に、組み合わせられて、又は連続的に使用される。

40

【0036】

上記の方法及びシステムは、医療、薬剤、獣医分野の利用、また、基礎的な生物研究や様々な用途に関連して使用され得るものであり、本開示の解釈において当業者によって特定でき、上記の方法及びシステムにおいては、免疫調節能力を調査すること、及び、特に物質の抗炎症能力を調べることが望ましい。

【0037】

明細書に組み込まれ、明細書の一部をなす添付の図面は、本開示の1以上の実施形態を

50

示しており、詳細な記述及び実施例とともに、本開示の本質や実施を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1A】図1は、バクテロイデス フラギリス (*Bacteroides fragilis*) からの外膜小胞 (OMVs) が PSA を含むことを示している。図1Aは、EDL (電子密度層) に富んだ *B. fragilis* の透過型電子顕微鏡によって検出された野生型 *B. fragilis* 及び *B. fragilis* Δ PSA によって産生された OMVs を示している。

【図1B】図1Bは、野生型細菌及びSA-変異体細菌から取り出した全細胞 (WC) と外膜小胞 (OMV) 抽出物とのイムノブロット解析を示す。

【図1C】図1Cは、精製したOMVsを免疫金標識し、抗PSA及び抗IgG-金コロイド複合体 (5nm) で染色し、電子顕微鏡で分析したものを示す。

【図1D】図1Dは、全細胞及びOMVsから調製した莢膜多糖製剤の糖タンパク質の染色を示す。

【図2A】図2は、OMVsがPSAに依存して、動物を実験的大腸炎、腸炎から保護することを示す典型的な結果を表している。図2Aは、死亡の日 (4日目) までの初期重量からの減少として測定された、TNBS大腸炎 (0日目) 誘発後の、動物群における体重減少を報告する図を示す。全ての群が少なくとも4匹を含み、エラーバーが標準誤差 (SEM) を示す。結果は、3つの独立した試験の代表的なものであり、一元ANOVAによって決定されたp値は、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ である。

【図2B】図2Bは、切除直後における未処理腸の画像を示し、媒体処理 (エタノール) 及びTNBS処理群 ($n = 4$ 匹/群) からの、長さの定量化 (グラフ) を示す。エラーバーはSEMを示す。結果は、独立して行われた3つの複合実験で示され、一元ANOVAによって決定されたp値は、*** $P < 0.001$ 、NS: 有意差なし である。

【図2C】図2Cは、各治療群を代表するヘマトキシリン及びエオシン (H&E) 染色された腸部位の画像を示す。

【図2D】図2Dは、標準のスコアシステム (オンライン) に従い、盲検病理学者 (GWL) によって動物に与えられた大腸炎スコアを示す (Scheiffele and Fuss, (2001) Induction of TNBS colitis in mice. Current Protocols in Immunology, 1.19.1-15.19.14)。各印は、個々の動物を表す。結果は、独立して行われた3つの複合実験から示されており、*** $P < 0.001$ 、NS: 有意差なし。

【図2E】図2Eは、全腸から回収されたRNAのqRT-PCRによってサイトカイン転写解析したものを示す図である。エラーバーは、4匹/群からのSEMを示す。結果は、3つの独立した試験を代表したものである。

【図2F】図2Fは、腸間膜リンパ節の精製CD4+ T細胞から回収されたRNAのqRT-PCRによってサイトカイン転写解析したものを示す図である。エラーバーは、4匹/群からのSEMを示す。結果は、3つの独立した試験を代表したものである。

【図3A】図3は、OMVs含有PSAが、処理されたDScと共培養されたT細胞からのIL-10産生及びFoxp3発現を誘導することを示唆する結果である。図3Aは、DCによって内在化されたOMVのフローサイトメトリー (FC) 分析を示す。OMVsは、FITC (フルオレセインイソチオシアネート) で標識し、種々の時間 (図のように)、育ったDCと共に培養された。細胞は、抗CD11cで染色した。百分率は、CD11c+OMV+個体数を示す。

【図3B】図3Bは、さまざまな時間 (図のように) WT-OMVs及び Δ PSA-OMVsとともに培養され、抗CD11c及び抗MHCIIで染色された、DCのFCプロットを示す。百分率は、CD11c+細胞におけるMHCII個体数を示す。

【図3C】図3Cは、DC細胞又はDC-T細胞の共培養物からの培養上清のIL-10のためのELISA分析を示し、該分析においては、DCがOMVsを用いて18時間標的化され、洗浄され、一次CD4+T細胞とともに、又は該CD4+T細胞がなく共培養された。上清は、培養4日目に採取された。培地サンプルは、OMVsで標識化されないことを示したが、それ以外は同様に処理された。抗CD3は、T細胞反応を増強すべく、いくつかのサンプルに添加された。エラーバ

10

20

30

40

50

ーは、3試料からのSEMを示す。結果は、5以上の独立した試験を代表するものであり、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ である。

【図3D】図3D（左側）は、図3Cと同様にELISA分析を示しているが、IL-10-動物から分化されたDCsをも含んでいる。エラーバーは、3試料からのSEMを示す。結果は、3つの独立した試験の代表的なものであり、* $p < 0.05$ 、NS：有意差なし。図3D（右側）は、図3Cと同様にELISA分析を示しているが、TLR2-/-動物から分化したDCsをも含む。SEA：ブドウ球菌腸毒素A。エラーバーは、3つの試料からのSEMを示す。結果は、3つの独立した試験の代表的なものであり、* $p < 0.05$ 、NS：有意差なし。

【図3E】図3Eは、インビトロでのDCsを用いた培養の後で、精製したT細胞サブセットから回収したRNAのqRT-PCRによって決定された、IL-10（左）及びFoxp3（右）の転写レベルを示す。共培養は、4日目に（c-e）に設定され、CD4 + CD25 + T細胞及びCD4 + CD25-T細胞は、磁気ビーズ分離（純度 > 95 ）によって精製され、RNAは、RNeasyミニキットで抽出された。相対値は、[β]-アクチンに対して標準化した。エラーバーは、3つの試料からのSEMを示す。結果は、3つの独立した試験の代表的なものであり、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.001$ 、NS：有意差なし。

【図3F】図3Fは、（c-e）に設定された共培養を示すが、Foxp3-GFPマウスからのCD4 + T細胞を用いた。DCで標識化されたOMVを用いて4日間培養した後、細胞は、抗-CD4で染色され、FCを使ったGFP発現によってFoxp3が検出された。結果は、2つの独立した試験の代表的なものである。

【図4A】図4は、PSA含有OMVsによるTreg抑制作用のインビトロでの発生を示唆する典型的な結果を示す。図4Aは、OMVsで処理されたDCと4日間共培養した後におけるCD4 + T細胞サブセットによるIL-10発現のFCヒストグラムを示す。脾臓のCD4 + T細胞は、IL-10 GFPマウスから精製し、共培養の後で、抗CD4及び抗CD25で染色し、GFPの発現によりIL-10の発現を測定した。百分率は、CD4 ++ CD25 + およびCD4 + CD25-サブセットにおけるIL-10 + 個体数を示す。結果は、3つの独立した試験を代表したものである。

【図4B】図4Bは、培地（コントロール）、WT-OMVs、 Δ PSA-OMVsで処理したDCsとの共培養の後における、精製されたCD4 + CD25 + T細胞による非投薬反応細胞のインビトロでの抑制を示す。細胞増殖は、CFSE希釈のFCによって測定した。Treg：Teff比が示されており、百分率は、増殖細胞の合計を示している。No Treg：CD4 + CD25-細胞のみを示す。結果は、2つの独立した試験を代表したものである。

【図4C】図4Cは、（図4Bで1、2、3、4、5のように印が付けられているように）各増殖ピークにおけるCD4 + T細胞百分率量を示す。結果は、独立して行った3つの複合実験から示されており、*** $P < 0.001$ 、* $p < 0.05$ であり、NS：有意差なし。

【図5】図5は、野生型*B. fragilis*とPSA欠失変異体*B. fragilis*とが、インビトロ培養中において同様量のOMVsを産生することを示す。各OMVsの調製から回収された総タンパク量は、回収のときに培養のOD600によって標準化された。エラーバーは、SEMを示す。結果は、独立して行った10を超える試験の組み合わせから得た。p値は、スチューデントt検定によって決定され、NS：有意差なし。

【図6】図6は、野生型*B. fragilis*精製されたOMVsの大部分がPSAを含むことを示し、精製OMVsにおけるPSAの免疫金標識化は、PSAに関連する10個のランダムサンプル（ $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ ）範囲のうち、WT-OMVsの60%以下で観察されるが、観察される Δ PSA-OMVsのいずれもPSAのためのポジティブ染色がされなかった。（抗IgG-金を用いたWT-OMVsの免疫金標識は、標識の特異性だけを確実にする）。

【図7】図7は、野生型*B. fragilis*又はPSA欠失変異*B. fragilis*から取り出したOMVsがタンパク質組成物において有意な差を示さないことを表している。プロテオーム質量分析法は、WT-OMVsと Δ PSA-OMVsとの間における同定タンパク質（それぞれのタンパク質と識別される1種を超える特有のペプチド）の100%の重複を示している。同定された全てのタンパク質のうちで、それぞれ識別される特有のペプチドの数に従って、我々は、半定量的に比較的豊富なタンパク質の量を比較した。それらの大半は、独立して行われた違いを示さない。エラーは、SEMを示す。p値は、スチューデントt検定によって決定され、*

10

20

30

40

50

* : $P < 0.01$ 、* : $P < 0.05$ 、NS : 有意差なし。

【図 8】図 8 は、アクチン重合が、DC による OMV 摂取のために必要であることを示す。DC による OMVs の内在化のフローサイトメトリー分析は、サイトカラシン D を用いて前処理された。OMVs は、FITC (フルオレセインイソチオシアネート) で標識され、(示されているように) 育てられた DC とともに種々の時間培養された。細胞は、抗 CD11c で染色された。百分率は、CD11c + OMV + 個体数を示す。

【図 9】図 9 は、WT-OMVs 又は Δ PSA-OMVs が、DCs の細胞質内に内在化及び局在化することを示している。蛍光顕微鏡写真は、DC による OMV (WT 又は Δ PSA) の内在化を示す。OMVs は、FITC (灰色の矢印) で標識され、育てられた DC と共に 2 時間培養された。細胞は、固定処理され、細胞膜は、小麦胚芽凝集素 (WGA) - テトラメチルローダミン (黒矢印) で

10

【図 10】図 10 は、WT-OMVs 及び Δ PSA-OMVs が、DC 活性化のための共刺激分子を上方制御することを示す。WT-OMVs 及び Δ PSA-OMVs で (示されているように) 様々な時間培養され、抗 CD11c 及び抗 CD86 で染色された DCs の FC プロット。百分率は、CD11c+ 細胞における CD86 + の個体数を示す。

【図 11】図 11 は、本明細書に記載の実施形態における生物標識の PSA 誘導発現を示す。各図に示すデータは、3 つの独立した実験を代表するものである。白色の棒は、PBS 処置マウス由来の細胞を示し、灰色の棒は、PSA 処置マウス由来の細胞を示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

20

本明細書では、粘膜へ化合物を送るために適した媒体が記載されている。

【0040】

本明細書では、“野生型 OMV”、“OMVs 含有 PSA”、及び“PSA-OMV”との用語は、同様な意味で用いられる。

【0041】

本開示の趣旨における“媒体”との用語は、化合物がその中に与えられ、また、該化合物がその中に入れられ、発現し且つ／又は性質を表す媒質を示している。典型的な媒体は、特に薬物に関連する有効成分の溶媒、担体、又は結合剤として通常作用する様々な媒質のいくつかを含んでいる。

【0042】

30

本開示の趣旨における化合物又は物質に関連する“送る”及び“運送”との用語は、元々の位置から標的位置へと化合物又は物質が移動することを示しており、具体的には、1 以上の細胞、組織、又は器官のそれぞれによって形成される位置への移動を示している。具体的には、送られる化合物に関連する少なくとも 1 種の活性が 1 以上の細胞、組織、又は器官のそれぞれで機能するように移動が行われるときに、本明細書の趣旨においては、化合物が送られる。

【0043】

本明細書にて用いられる“化合物”との用語は、1 種以上の化学元素で構成された様々な化学物質を示し、生体分子に限定されず、特に薬物を含む様々な物質、分子、又は成分を包含している。本明細書にて用いられる“生体分子”との用語は、糖類、アミノ酸類、ペプチドタンパク質、オリゴヌクレオチド類、ポリヌクレオチド類、ポリペプチド類、有機分子、ハプテン類、エピトープ類、生物細胞、生物細胞の一部、ビタミン類ホルモン類などに限定されないがこれらを包含する生物的活性に関連する物質化合物又は成分を示す。本明細書にて用いられる“薬物”との用語は、生物体へと吸着されたときに、通常の体の機能を変化させる物質を示す。本開示の趣旨において薬物は、具体的には、疾患の処置、治療、予防、又は、疾患の診断において使用される化学物質、又は、別途、肉体的若しくは精神的な健全性を高めるために使用される化学物質を包含している。

40

【0044】

例えば、PSA が上記の“化合物”である場合には、小胞によって、PSA に加え異なる化合物が、さらに送られ得る。

50

【0045】

本開示の趣旨における“粘膜”との用語は、ほぼ内胚葉性であり、上皮において表面に広がり、吸収や分泌に関与する内膜を示す。それぞれ粘膜は、外部環境及び内部器官にさらされる様々な体腔との境界に配されている。粘膜は、鼻、口、唇、まぶた、耳、生殖器、肛門などの様々な場所において、皮膚とつながっている。

【0046】

本明細書において記載されている組成物、及び関連する方法、システムにおいては、媒体は、送られる1種以上の化合物を含む小胞によって形成されている。

【0047】

本開示の趣旨における“小胞”は、水性環境において集合した、膜形成脂質と、さらなる分子とによって形成された超分子複合体である。具体的には、本明細書で記載された小胞においては、膜形成脂質が、細胞質としても示される内部水性環境を取り囲む脂質層に配置されている。

【0048】

本明細書において用いられる“膜形成脂質”又は“両親媒性脂質”との用語は、親水性及び疎水性の両方を有し、水性環境下において脂質層構造となって集まったものを示し、脂質層構造は、極性脂質として知られる両親媒性分子の1つの層又は両親媒性分子が反対方向を向く2つの層のいずれかからなる。それぞれの極性分子は、親水性部分、即ち、誘導体化されたリン酸基や糖基などの極性基と、疎水性部分、即ち、長鎖炭化水素とを有している。例示される極性脂質としては、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、エーテル脂質、ステロール類、及び、ホスフォコリン類が挙げられる。両親媒性脂質としては、限定されないが、膜脂質、即ち、ジミリスティルホスファチジルコリン(DMPC)、ジオレオイルホスフォエタノールアミン(DOPE)、又はジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)などのリン脂質、又は、生物膜を構成する両親媒性脂質が挙げられる。実施形態においては、小胞の膜は、細胞膜(細胞内部を外部環境と分け、水性環境を取り囲む生物膜)に類似した脂質二重層によって形成され、具体例としては*B. fragilis*の外膜である。

【0049】

本明細書に記載されている小胞は、小胞の膜に付随しているか、又は、小胞の水性環境に含有されているリポ多糖(LPS)をも含む。本明細書にて用いられる“リポ多糖”との用語は、共有結合で結合された脂質及び多糖で構成された巨大分子を示し、これは、グラム陰性細菌の外膜にあり、内毒素(エンドトキシン)として作用し、動物において強い免疫反応を引き起こす。具体例としては、本明細書に記載されている小胞は、当業者によって同定される*B. Fragilis*の1種以上のLPSを含む。

【0050】

本明細書にて記載されている小胞は、小胞の膜に付随しているか、又は、小胞の水性環境に含有されているペプチドグリカンをも含み得る。本明細書にて用いられる“ペプチドグリカン”との用語は、糖類及びアミノ酸類で構成された高分子化合物を示し、細菌(古細菌でなく真正細菌)の細胞膜の外方側でメッシュ状の層を形成しており、細胞壁を形成している。具体例としては、本明細書に記載された小胞は、当業者によって同定される*B. Fragilis*の1種以上のペプチドグリカンを含む。

【0051】

小胞に含まれ得るさらなる化合物としては、膜タンパク質、膜糖脂質、核酸が挙げられ、特に、*B. Fragilis*の膜タンパク質、膜糖脂質、核酸が挙げられる。

【0052】

本開示の趣旨における典型的な小胞としては、物質を貯蔵又は移動できる膜で覆われた小さな囊が挙げられる。小胞は、膜形成脂質の特性によって自然発生的に形成されるか、又は、細菌膜から調製され得る。大抵の小胞は、膜に含まれる物質、及び／又は、水性環境に含まれる物質に依存して特異的な作用を有している。

【0053】

ある実施形態においては、本明細書にて記載されている小胞は、細菌の膜の一部によっ

10

20

30

40

50

て形成されている。ある実施形態においては、小胞は、細菌の外膜小胞（OMVs）によって形成されている。

【0054】

ある実施形態においては、本明細書にて記載されている小胞は、B.Fragilisの膜の一部によって形成され、特に、実施例で例示されているように、B.FragilisのOMVから形成されている。

【0055】

ある実施形態においては、送られる化合物は、薬物、候補薬物、栄養補助食品（食事制限を補助することを意図するか、又は食物とみなされない1種以上の成分（ビタミン類又はアミノ酸類）を含む経口用の製品）、又は、粘膜への運送が望まれる他の化合物であり得る。これら1種以上の化合物は、本明細書に記載された小胞に、適した量で含まれ得る。適した量は、送られる特定の化合物により当業者によって決定され得る。

【0056】

ある実施形態においては、1種以上の両イオン性のポリ多糖、特にポリ多糖Aを含む。

【0057】

本明細書において用いられる“両イオン性のポリ多糖”との用語は、グリコシド結合によって1種以上の単糖が結合したものを有する合成又は天然の高分子化合物を示し、該高分子化合物は、少なくとも1つの正電荷部分と、少なくとも1つの負電荷部分とを有する。両イオン性のポリ多糖としては、限定されず、単糖又は二糖の高分子化合物から、単糖を数百から数千含む高分子化合物まで、あらゆる長さの高分子が挙げられる。ある実施形態においては、両イオン性のポリ多糖は、繰り返し単位を含み、各繰り返し単位は、2～10の単糖を有し、正電荷部分（例えば、自由正電荷アミノ部分）と、負電荷部分（スルホン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、及びホスホン酸塩部分など）とを有する。ある実施形態においては、ZPsは、500Daと2,000,000Daとの間の分子量を有する。ある実施形態においては、ZPsは、200Daと2500Daとの間の分子量を有する。典型的なZPSとしては、限定されず、Bacteroides FragilisからのPSA及びPSB、Staphylococcus aureusからのCP5/CD8、及び、Streptococcus pneumoniaからのSp1/CP1が挙げられる。両イオン性のポリ多糖は、天然資源から、特に細菌資源から、具体的には精製によって単離され得る。両イオン性のポリ多糖は、化学的又は生化学的な方法によっても、また、微生物遺伝子組み換え技術によっても、当業者によって識別されて調製され得る。従って、これらの方法や技術については、本明細書においてさらなる詳細を記載していない。

【0058】

本明細書において用いられる“ポリ多糖A”（又はPSA、PSA配位子）との表現は、Bacteroides fragilisのPSA遺伝子座によって産生される分子及びその誘導体を示し、その遺伝子座としては、限定されず、繰り返し単位のポリマー {→3) α-d-AAT Galp (1→4) - [β-d- Galf (1→3)] α-d-GalpNAc (1→3) - [4,6-ピルビン酸] β-d-Galp (1→} が挙げられ、AATGalは、アセトアミド-アミノ-2,4,6-トリデオキシガラクトースであり、ガラクトピラノシル残基は、0-4及び0-6で結合するピルビン酸置換基によって改質されている。第1のポリ多糖（例えばPSA）に対して本明細書にて用いられる“誘導体”との用語は、構造的に第一のポリ多糖に関連している第二のポリ多糖を示し、該第二のポリ多糖は、第一のポリ多糖に存在しない特徴を引き起こし第一のポリ多糖の機能的特性を維持する改質によって第一のポリ多糖から誘導される。従って、PSAのポリ多糖誘導体は、繰り返し単位の改質、又は、1種以上の繰り返し単位の糖成分の改質によって元々のポリ多糖とは通常異なり、該改質は、元々のポリ多糖に存在しないさらなる機能に関連し得るし、関連しないこともあり得る。しかしながら、PSAのポリ多糖の誘導体は、PSAの抗炎症活性と関連する、本明細書に記載されたPSAに関係した1以上の作用的活性を維持している。

【0059】

ある実施形態においては、低分子量PSA（L-PSA）が、70kDa～200kDa

aであり、高分子量P S A（H－P S A）が、200kDaを超える。

【0060】

ある実施形態においては、前記粘膜が、個々の消化管の粘膜であり、特に、腸粘膜、胃粘膜、食道粘膜、頬粘膜、口腔粘膜および/または頬粘膜である。

【0061】

ある実施形態においては、本明細書において記載されている小胞が、添付Aとして含まれU S 仮出願S/N 61/321,527に記載されたもののような手段や用途に関連して使用され得る。この記載は、本開示の一部をなし、全体として本明細書において参照されて組み込まれる。

【0062】

ある実施形態においては、本明細書において記載されている小胞が、添付Bとして含まれU S 出願S/N 12/766787に記載されたもののような方法やシステムに関連して使用され得る。この記載は、本開示の一部をなし、全体として本明細書において参照されて組み込まれる。

【0063】

ある実施形態においては、本明細書において記載されている小胞が、個々の粘膜へ前記化合物を送る方法において使用される。具体例としては、該方法は、物質が膜と接触できる環境下においてしばらくの間、前記化合物を含む小胞と粘膜とを接触させることを有している。該方法においては、小胞が、水性環境を取り囲む脂質膜によって形成され、送られる化合物が、小胞の水性環境中に含まれている。

【0064】

他の実施形態においては、前記小胞又はOMVを含む組成物又は薬用組成物は、物質が膜と接触できる環境下においてしばらくの間、粘膜と接触される。

【0065】

本明細書にて用いられている“接触”又は“培養”との用語は、2つのものの間における相互作用若しくは非相互作用的な働き又は影響の少なくとも1つが発揮されるような環境下にてしばらくの間提供される、2つのものの間における空間的な関係の発生を引き起こす行為を示している。特に、培養は、小胞と粘膜との間で行われ、小胞と粘膜との間で直接的な接触、及び/又は、相互作用を引き起こすこととなるか、又は、小胞の間接的な作用の後で（例えば、膜と直接的に反応する他の物質の作用又は改質の後で）粘膜の改質を引き起こすこととなる。

【0066】

接触又は培養を行うための適当な条件は、前記化合物、前記粘膜、及び実験計画の観点において本開示の記述に沿って当業者によって判断される。

【0067】

ある実施形態においては、本明細書における小胞は、粘膜へ化合物を送るための組成物に含まれ得る。該組成物は、本明細書に記載された1以上の小胞を含み、必要に応じて、小胞の溶媒、担体、結合剤、又は希釈剤として作用するさらなる媒体と組み合わせられる。

【0068】

“条件”との用語は、一動物又はヒトの状況に関するときに一本明細書にて用いられているように、通常、全体的に又は1以上の部分における個々の体の身体状況を示し、該身体状況は、完全な肉体的、精神的、場合により社会的に健全な状況に付随する、全体的に又は1以上の部分における個々の体の身体状況と一致しない。本明細書に記載された条件としては、限定されないが、不調や疾患が挙げられ、“不調”との用語は、体若しくは体のいずれかの部分の機能的な異常に関連した生体の条件を示し、“疾患”との用語は、体若しくは体のいずれかの部分の通常の機能を損ない、特徴的な兆候及び症状が典型的に現れる生体の条件を示している。典型的な条件としては、限定されないが、けが、障害、疾患（精神的、肉体的疾患を含む）、症候群、感染症、常軌を逸した行動、個々の体若しくはその一部における機能及び構造の非定型的な変化が挙げられる。

【0069】

特には、前記化合物が抗炎症化合物として使用される実施形態においては、前記条件は、炎症又は炎症反応に関連するどのような条件にもなり得る。又は、炎症性疾患それ自体として記載された条件になり得る。2つのものに関して本明細書において用いられる“関連する”との表現は、第1のものの発生が第2のものの発生に付随して起こるような2つのものの関係を示し、該関係としては、限定されないが、因果関係、及び、兆候／症状－疾患関係が挙げられる。

【0070】

ヒトにおける炎症（又は、炎症性疾患）に関連する条件としては、限定されないが、炎症性腸疾患が挙げられ、限定されないが、クローン病、潰瘍性大腸炎、喘息、皮膚炎、関節リウマチ、重症筋無力症、グレーブス病、多発性硬化症（MS）、及び、乾癬が挙げられる。当業者は、適当な診断基準を用いて上記の疾患を起こしているものを識別できる。

10

【0071】

ある実施形態においては、PSAを含有するOMVsを含む組成物、薬用組成物は、炎症性疾患の予防のために使用され得る。該疾患としては、限定されないが、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎を含む）、喘息、皮膚炎、関節リウマチ、重症筋無力症、グレーブス病、多発性硬化症、乾癬が挙げられる。

【0072】

本明細書にて用いられる“処置”又は“処置された”との用語は、医療の一部であるか否かに関わらず、どのような作業も示すか、又は、動物又はヒトにおける医学的又は外科的な条件を伴うものである。そのような処置は、医学的又は非医学的な作業によって行われ得る。

20

【0073】

ある実施形態においては、前記組成物が個々に投与され、前記組成物が薬用組成物であり得る。また、該組成物は、それぞれPSAを含有する1以上の小胞を含んでいる。より具体的な実施形態においては、薬用組成物は、それぞれPSAを含有する1以上の小胞と、1以上の他の化合物と、及び／又は、薬理的に可能な若しくは適した担体／媒体を含む。

【0074】

他の実施形態においては、それぞれPSAを含有する1以上の小胞と、1以上の他の化合物と、及び／又は、薬理的に可能な若しくは適した担体／媒体を含む上記の薬用組成物は、この組成物に与えられた炎症条件又は炎症を伴う個体／対象物において、改善を示す。

30

【0075】

ある実施形態においては、本明細書にて記載された小胞は、賦形剤又は希釈剤を伴って薬用組成物中に含まれ得る。特に、ある実施形態においては、薬用組成物は、相溶可能であり薬学的に適切な1以上の媒体、特に薬学的に適切な希釈剤又は賦形剤と組み合わせられて、本明細書にて記載された小胞を含む。

【0076】

本明細書に記載された“賦形剤”との用語は、薬物の有効成分にとって薬学的に可能な又は適した担体として用いられる不活性な物質を示している。本明細書にて開示された薬学的な組成物に適した賦形剤としては、個々の体が本明細書の小胞を吸収する性能を高めるどのような物質も挙げられる。適した賦形剤としては、本明細書に記載の小胞を有する製剤を使いやすくして正確な用量のものとすべく、製剤の容量を増すために用いられ得るのが挙げられる。一回量における賦形剤の使用に加え、賦形剤は、本明細書に記載の小胞の取り扱いを容易にするために製造工程においても使用され得る。投与経路や薬剤調製に応じて、様々な賦形剤が用いられ得る。典型的な賦形剤としては、限定されないが、付着防止剤、結合剤、コーティング剤の崩壊剤、充填剤、香味料（甘味料など）や着色剤、流動促進剤、潤滑剤、防腐剤、吸着剤が挙げられる。

40

【0077】

薬学的に許容され若しくは適当な担体は、限定されないが、有機又は無機の、固体状又

50

は液体状の賦形剤であり得る。該賦形剤は、経口適用や注射といった適用の選択態様に適し、また、一般的な薬学的製剤による態様で投与される。そのような製剤としては、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などの固形物、また、溶液、乳化液、懸濁液などのような液状物が挙げられる。前記担体としては、デンプン、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、デキストリン、セルロース、パラフィン、脂肪酸グリセリド、水、アルコール、アラビアゴムなどが挙げられる。必要であれば、補助剤、安定剤、乳化剤、滑沢剤、結合剤、pH調整剤、等張剤、及び、他の一般的な添加物が添加され得る。

【0078】

薬学的に許容され若しくは適当な担体は、腸の正常でない状況に適し、又は、食用組成物に適していると知られている他の化合物（例えば、ビタミンC、ビタミンEなどの抗酸化剤、セレン、又は亜鉛）を含み得る。食用組成物としては、限定されないが、牛乳、ヨーグルト、豆腐、チーズ、発酵乳、牛乳ベースの発酵製品、アイスクリーム、発酵させた穀物ベースの製品、牛乳ベース粉末、乳児用調製粉乳、錠剤、液状細菌懸濁物、乾燥経口サプリメント、又は、湿潤経口サプリメントが挙げられる。

10

【0079】

本明細書で用いられる“希釈剤”との用語は、組成物の有効成分を希釈又は運ぶために利用される希釈のための物質を示している。適当な希釈剤としては、薬学上の製剤の粘度を減らすことができるどのような物質も挙げられる。

【0080】

ある実施形態においては、組成物、化合物、及び、特に薬用組成物は、腸への投与のために調製され、該腸への投与は、限定されないが、i) 錠剤、カプセル、又はドロップとして経口（口経由）により、ii) 腸栄養チューブ、十二指腸栄養チューブ、又は胃瘻により、及びiii) 直腸坐剤により行われる。

20

【0081】

ある実施形態においては、本明細書に記載のPSAを含む小胞は、各個体の状況を処置又は予防する方法において使用され得る。

【0082】

該方法は、組成物又は薬用組成物の有効量を各個体に与えることを含む。本明細書で用いられる“各個体”との用語は、単一の生物器官を示し、該器官においては、限定されないが、動物、特に高等動物、特に哺乳類などの脊椎動物、特にヒトなどで炎症が生じる。

30

【0083】

“有効量”、“有効な量”、又は、“Xに有効な量”とは、化合物が投与されたときに、処置を必要としている疾患の1以上の症状をある程度治す、取り除く、減少させる、又は改善させるために有効な、又は、予防を必要としている疾患の臨床的指標若しくは症状の開始を遅らせるために有効な、化合物、組成物、又は薬用組成物の量のことである。従って、例えば、有効量は、下記に示すように、化合物／組成物／薬用有効成分の‘改善’作用を示す量である。

【0084】

“有効量”は、処置を必要としている疾患のために知られているインビトロ及びインビボのモデルシステムに関係する化合物を用いて実験することにより、実験的に測定され得る。有効量は、各個体の体重、性別、年齢、及び病歴によって変わり、また、患者の重症度、疾患の種類、投与の様式などによっても変わる。有効量は、所定の実験を行うことにより、容易に決定され、例えば、滴定（有効用量が見つかるまで用量を増やして投与すること）、及び／又は、過去の患者に有効な量を参照することによって決定される。一般的に、本発明の有効量は、患者の体重に対して、約0.1mg/kg及び約20mg/kgの間の範囲の用量で管理される。

40

【0085】

本明細書にて用いられるように、“予防的な有効量”は、疾患に関連する1以上の症状の悪化、再発、又は開始を予防又は減少させるために十分な（又は、他の治療法（例えば他の予防剤）の予防的作用を向上又は改善するために十分な）、化合物／組成物／薬用組

50

成物の量である。

【0086】

さらに期待されることは、本発明の化合物／組成物／薬用組成物が、別々で又は組み合わせられて、炎症性疾患の治療や予防において有用であると知られている既知の1種以上の薬剤と併せて用いられ得ることである。

【0087】

例えば、本発明の化合物／組成物／薬用組成物は、限定されないが、スルファサラジン（アザルフィジン）、メサラジン（アサコール、ペンタサ）、免疫抑制剤（イムラン、6-MP、シクロスポリン）、メトトレキサート、TNF- α 阻害剤（レミケード、ヒュミラ）、及び、コルチコステロイド（エントコート、プレドニゾン）といったIBDの処置において有用であると知られている薬物／処置の1つ又はその併用物と組み合わせられ得る。潰瘍性大腸炎の他の処置（実験的）としては、アロエベラ、酪酸、ボスウェリア、プロバイオティクス、抗生物質、免疫抑制療法、及び、ニコチンが挙げられる。

10

【0088】

例えば、本発明の化合物／組成物／薬用組成物は、限定されないが、アボネックス（製品名）、ベタセロン（製品名）、およびコパクソン（製品名）、レビフ（製品名）、エクスタビア（製品名）、ノバントロン（製品名）（ミトキサントロン）、タイサブリ（製品名）（ナタリズマブ）、及びジレニア（製品名）（フィンゴリモド）といったMSの処置において有用であると知られている薬物／処置の1つ又はその併用物と組み合わせられ得る。他の薬剤としては、静脈内免疫グロブリン（IVIG）療法、メトトレキサート、アザチオプリン（イムラン（製品名））、及びシクロホスファミド（シトキサン（製品名））；コルチコステロイド；シトキサン（製品名）（シクロホスファミド）、イムラン（製品名）（アザチオプリン）、メトトレキサート、血漿交換、パルスソリューションメドロール（製品名）（IVメチルプレドニゾン）；プレドニゾン、デカドロン（製品名）（デキサメタゾン）；メドロール（製品名）（経口メチルプレドニゾン）；血漿（血漿交換）、静注免疫グロブリン（IVIG）療法が挙げられる。

20

【0089】

他の実施形態においては、これら他の薬物がOMVs自体の中に入って送られること、又は作用を発揮することが可能である。

【0090】

本明細書における“改善された”、“改善”、及び、他の文法上の変形は、処置によってもたらされる個体／対象物におけるどのような有利な変化をも包含する。有利な変化は、処置がないときよりも患者の状態が良くなるものである。“改善された”とは、限定されないが、望ましくない状況を予防すること、状況の悪化の速度を遅らせること、望ましくない状況の進行を遅らせること、本来の普通の状況に回復すること、処置がないときよりもより多い回復又はより長い回復の維持を患者に引き起こすこと（即ち、患者の炎症の程度が少なくなる（若しくはなくなる）、又は、ヒトが通常、症状を有さない状態にある）、再発の回数及び／又は程度を減らすこと、及び、磁気共鳴映像法（MRI）画像において観察される新たな部位の進行を減らすことを包含する。

30

【0091】

より具体的には、IBDにおける改善としては、限定されないが、腹部のけいれんや痛み、血便、下痢、腸動を伴う緊急、発熱、食欲不振、体重減少、粘液便、大腸の潰瘍形成、および貧血（血液の損失に起因する）といった1種以上の臨床的IBD症状における重症度又は持続を減少させることが挙げられる。例えば、MSにおける改善は、限定されないが、視覚障害、しびれ、めまい／回転性めまい、膀胱や腸の機能不全、虚弱、ふるえ、運動障害、性機能障害、ろれつが回らない、痙性（脚のこわばり）、嚥下障害、慢性的にうずく痛み、うつ病、軽度の認知、記憶困難といった1種以上の臨床的MS症状における重症度又は持続を減少させることが挙げられる。

40

【0092】

さらには、“改善された”、“改善”、及び、他の文法上の変形は、重症度、持続、及

50

び／又は、炎症性疾患の合併症の進行リスクを軽減させるいかなる変化も包含する。IBDにおいては、例えば、‘改善’とは、IBD対象物におけるリスクを減少させることを意味し、IBD対象物において進行するものとしては、潰瘍から多量の出血、腸の穿孔（破裂）、狭窄や閉塞、瘻孔（異常通路）と肛門周囲疾患、中毒性巨大結腸（大腸の急性非閉塞性拡張）、及び、悪性腫瘍（例えば、結腸癌）がある。

【0093】

ある実施形態においては、膜形成脂質、小胞、PSAの少なくとも2つと、送られる1以上のさらなる化合物とが、本明細書に記載の方法で用いられる適当な他の薬物と併せて、場合によっては、システム内に取り込まれる。

【0094】

前記システムは、キットオブパーツの態様で提供され得る。キットオブパーツにおいては、膜形成脂質、小胞、PSA、付加化合物、薬剤、及び、他の薬物が、1以上の組成物中に含まれ得る。又は、膜形成脂質、小胞、PSA、付加化合物、薬剤、及び、他の薬物のそれぞれが、適当な媒体とともに組成物中に含まれ得る。

【0095】

付加成分としては、標識された分子が挙げられ、特に、抗炎症若しくは炎症生物標識に特異的な、又は、その発現に関連する分子に特異的な標識された捕捉剤が挙げられ、又は、本開示を参照する当業者によって識別されるマイクロ流体チップ、標準品、付加成分が挙げられる。

【0096】

本明細書にて用いられる“捕捉剤”との用語は、標的に特異的に結合する化合物を示す。第1の化合物が第2の化合物に結合することに関連する、本明細書において用いられる“特異的に”、“特異的な”、又は“特異的”との表現は、第1の化合物及び第2の化合物のそれぞれの安定複合体が、存在する他の分子を伴って、認識すること、接触すること、及び構造形成することを実質的に伴わずに、第1の化合物及び第2の化合物の安定複合体を認識すること、接触すること、及び構造形成することを意味している。特定の典型的な結合は、抗原抗体相互反応、細胞受容体ーリガンド相互反応、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション、酵素基質相互反応などである。“安定複合体”によって示されるものは、通常、より大きい安定性が好ましいものの、検出可能であって、安定性の任意レベルを必要としない複合体である。ある実施形態においては、キットが、標識されたポリヌクレオチド又は標識された抗体を含む。

【0097】

本明細書に記載された方法を実施すべく、適当な取扱説明書及び他の必要な試薬を伴ってキットが提供される。キットは、通常、分離された容器に入れられた組成物を有する。例えば、実験を実施すべくテープやCD-ROMなどの電子媒体又は紙に記載、録音された取扱説明書は、通常、キットに備えられている。キットは、使用される特定の方法に応じて、梱包された試薬及び材料（即ち、洗浄緩衝液など）も備え得る。

【0098】

本明細書にて用いられる“免疫調節”との用語は、炎症性反応がないことに関連する状態を促進する性能を示している。特定の免疫調節性能は、抗炎症特性を有し、抗炎症との用語は、炎症を抑制又は減少させる物質又は処置の特性に関する。

【0099】

本明細書にて用いられる“炎症”、“炎症状態”、又は“炎症反応”との用語は、病原体、損傷細胞、又は刺激物などの有害な刺激に対する個体血管組織の複雑な生体反応を示し、サイトカインの分泌、より具体的には炎症誘発性サイトカインの分泌を包含し、即ち、小膠細胞などの活性化免疫細胞によって主に産生され炎症反応の増幅に関与するサイトカインの分泌を包含する。典型的な炎症誘発性サイトカインとしては、限定されないが、IL-1、IL-6、TNF α 、IL-17、IL21、及びIL23が挙げられる。典型的な炎症としては、急性炎症及び慢性炎症が挙げられる。本明細書にて用いられる“急性炎症”との表現は、血漿および白血球による組織における浸潤による炎症（腫脹、発赤、疼痛、発熱、機能の損失

10

20

30

40

50

）の典型的な兆候によって特徴付けられる短期間の過程を示す。急性炎症は、典型的には、障害刺激が存在する間、刺激が取り除かれ、収まり、瘢痕化（線維症）によって守られるまで引き起こされる。本明細書にて用いられる“慢性炎症”との表現は、同時活性炎症、組織破壊、及び修復活動によって特徴付けられる状況を示す。慢性炎症は、上記の急性炎症の典型的な兆候によっては特徴付けられない。一方で、慢性的に炎症を起こしている組織は、単核免疫細胞（単球、マクロファージ、リンパ球、形質細胞）の侵入、組織破壊、及び、血管新生や線維症を含む修復活動によって特徴付けられる。

【0100】

本明細書にて用いられる“物質”との用語は、特定の又は明確な化学構造のものを示す。“細菌物質”との用語は、細菌由来のものを示し、例えば、生細菌、死細菌、及び、特に、加熱死細菌、細菌抽出物、細菌起源の精製分子、細菌起源の精製分子の組み合わせ、細菌起源の精製分子の1種分子又はその分子の組み合わせを含む小胞、又は、細菌起源の精製小胞などがある。具体的には、細菌物質は、外膜小胞（OMVs）によって形成又は該外膜小胞を含み、該外膜小胞は、細菌表面から取り出された小胞であって、一式のカーゴ分子を離れた標的細胞へ送る。より具体的には、細菌物質は、*B. Fragilis*の外膜小胞（OMVs）によって形成又は該外膜小胞を含み、さらに具体的には、そのようなOMVsは、さらに、PSAで構成されている。

10

【0101】

細菌物質は、同じ細菌由来の物質、及び、2種以上の異なる細菌由来の物質を含む。

【0102】

本明細書にて用いられる“細菌”との用語は、単細胞で原核生物であり、典型的には長さが数 μm であり、様々な形状を有する微生物の大きな集団を示す。具体的には、本開示の趣旨における細菌には、ヒト細菌叢の細菌が包含され、即ち、唾液、口若しくは膣の粘膜、消化管において、皮膚の深層などのヒト組織や体液、表面に生息する微生物の集団が包含される。細菌叢としては、腸内細菌叢（ヒトの消化管において検出される細菌）、膣内細菌叢（ヒト女性において子宮から体外部へつながる線維筋性の管状経路において検出される細菌）、皮膚細菌叢（ヒトの皮膚において検出される細菌）が挙げられる。より具体的には、本発明の趣旨における細菌は、腸内細菌叢のバクテロイデス（bacteroidetes）の1種以上によって形成され、特に、グラム陰性属であり、芽胞を形成しない嫌気性のバチルス細菌であり、当業者によって識別されるヒトに共生するバクテロイデスの1種以上によって形成される。代表的なバクテロイデスは、*B. fragilis*である。

20

30

【0103】

本明細書にて用いられる“組み換え遺伝子マーカー非ヒト動物”との用語は、様々な遺伝子組み換え技術のいずれか又は生まれながらに形質転換された非天然の遺伝子材料を含む動物に関する。そのような非天然の遺伝子材料（遺伝子導入）は、“生物マーカー（生物標識）”（本明細書にて定義）として作用し、且つ／又は、非ヒト動物においてRNA又はタンパク質を産生する能力を保有している。

【0104】

本明細書にて用いられる“T細胞”との用語は、当業者によって識別され異なる細胞型を含むリンパ球（白血細胞又は白血球）の下位集団を示す。本開示におけるTヘルパー細胞は、（Th1、Th2、及びTh17などの）エフェクターTh細胞、即ち、他の白血球を刺激又は他の白血球と反応するサイトカイン、タンパク質、又はペプチドを分泌するTh細胞を包含し、また、（Tregなどの）サプレッサーTh細胞、即ち、免疫機構を抑制し、それによって免疫機構の恒常性及び自己抗原への耐性を維持するTh細胞を包含する。

40

【0105】

本明細書にて用いられる“抗原提示細胞”との用語は、その表面において主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）とともに、異物抗原複合体を現す細胞を示す。具体的には、抗原提示細胞は、樹枝状細胞、マクロファージ、B細胞、及び、当業者によって識別される他の細胞を包含する。

【0106】

50

本明細書にて用いられる“接触”又は“培養”との用語は、2つのものの間における相互作用の若しくは非相互作用的な働き又は影響の少なくとも1つが発揮されるような環境下にてしばらくの間提供される、2つのものの間における空間的な関係の発生を引き起こす行為を示している。特に、培養は、細胞物質と細胞との間で行われ、細胞物質と細胞との間で直接的な接触、及び／又は、相互作用を引き起こすこととなるか、又は、細胞物質の間接的な作用の後で（例えば、細胞と直接的に反応する他の物質の作用又は改質の後で）細胞の改質を引き起こすこととなる。

【0107】

“処置すること”又は“処置”は、細菌物質、化合物、組成物、又は薬用組成物を局所的投与又は全身投与によって行うことができる。全身投与としては、消化管内投与（例えば、経口投与、胃栄養チューブ、十二指腸栄養チューブ、胃瘻、経腸栄養、経直腸投与）、及び、非経口の投与（例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、及び膀胱内注入）が挙げられる。典型的な投与としては、経皮投与に限定されないが、吸入投与（喘息治療薬など）、浣腸、点眼薬（結膜上に）、点耳剤、鼻腔内経路（例えば、充血除去剤点鼻薬）、及び腔内投与が挙げられる。

【0108】

同様に、クローン病、潰瘍性大腸炎、喘息、皮膚炎、関節リウマチ、重症筋無力症、グレーブス病、多発性硬化症、乾癬に限定されないが、このような炎症性疾患を患っている個体に与えられる薬用組成物の量は、当業者によって実験的に決定される。

【0109】

抗原提示細胞のT細胞との典型的な培養は、精製した抗原提示細胞をT細胞の培養細胞へ加えること又は精製したT細胞を抗原提示細胞の培養細胞へ加えることによって、抗原提示細胞を含む培養細胞とT細胞を含む培養細胞との混合によってインビトロで行われる。T細胞及び抗原提示細胞とのインビボにおけるさらなる典型的な培養は、T細胞を含む個体の組織へ抗原提示細胞を移植すること、又は、抗原提示細胞を含む個体組織へT細胞を移植することを有する。ある実施形態においては、個体は、標識された炎症又は抗炎症生物標識を発現するように遺伝子的に改質されたヒト以外の遺伝子組み換え動物である。

【0110】

インビトロ又はインビボで、物質とT細胞又は抗原提示細胞とを接触させること、及び、抗原提示細胞とT細胞とを培養することのさらなる操作及び技術は、本開示を参照する当業者によって識別される。

【0111】

本明細書にて記載された方法及びシステムにおいては、炎症生物標識又は抗炎症生物標識の発現の検出は、当業者によって識別される技術によってインビトロ又はインビボで行われ、標識された生物標識などの標識分子、又は、生物標識若しくはそれに関する分子に特異的な標識分子を使用することを有している。

【0112】

本明細書にて用いられる“検出すること”、又は“検出”との用語は、被検体若しくは関連シグナルの存在、又は存在の事実を、試験サンプル、反応混合物、分子複合体、物質に限定されずこれらを包含する空間の一部において測定することを示す。検出は、被検体若しくは関連シグナルの量又は質量の測定（定量とも称される）を示す、又は該測定に関連する、又は該測定を含む“定量的な”ものであり、限定されないが、被検体若しくは関連シグナル量又は濃度を測定するために設計されたどのような分析も包含する。検出は、定量されない他の被検体若しくは関連シグナルの存在量に対して、被検体若しくは関連シグナルの量又は種類の識別を示す、又は該識別に関連する、又は該識別を含む“定量的な”ものである。

【0113】

本明細書において複合体の成分又は分子として用いられる“標識”及び“標識された”との用語は、検出可能な分子に関連し、この標識としては、限定されないが、放射性同位元素、蛍光色素分子、化学発光色素、発色剤、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤

10

20

30

40

50

、染料、金属イオン、ナノ粒子、金属ゾル、リガンド（例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンまたはハプテンなど）などが挙げられる。“蛍光色素分子（フルオロフォア）”との用語は、検出画像において蛍光を発することができる物質又はその一部に関する。従って、本明細書にて用いられる“シグナル”若しくは“標識シグナル”との用語は、標識の検出を可能にする標識から放たれたシグナルを示し、該シグナルとしては、限定されないが、放射能、蛍光、化学発光、酵素反応の結果における化合物の生成などが挙げられる。

【0114】

検出は、生物標識、その前駆体若しくは類似物、及び／又は、それに関連する被検体の発現の程度を検出することによって行われ得る。2つのものに関して本明細書にて用いられる“関連する”との表現は、第1のものの発生が第2のものの発生に関係するような2つのものの間における関係を示し、該関係としては、限定されないが、因果関係、及び、兆候／症状－疾患関係が挙げられる。具体的には、検出は、定性的又は定量的に行われ、RNA、タンパク質、その前駆体、異なる型（即ち、mRNA、tRNA、及びrRNA）、分解産物のような分子の検出、及び／又は、それらに関連する特性の検出又は測定を包含する。検出を行うための技術及び操作は、本開示の記述に接した当業者によって識別される。

【0115】

生物標識の発現を検出する典型的な方法としては、限定されないが、ELISA、Q-PCR、及び、FACSによる細胞内サイトカイン染色検出などの当業者に知られている方法が挙げられる。ある実施形態においては、生物標識の発現は、生物標識若しくはそれに関連した分子に特異的な抗体を使用して行われた培養細胞における蛍光に基づく計測情報によって検出され、抗体は、蛍光色素分子で標識され、該抗体としては、すべてではないが、低分子ダイ（染料）、タンパク質発色団、粒子ドット、及び金微粒子が挙げられる。ある実施形態においては、生物標識の発現は、生物標識プロモータの転写制御において、インビボ（例えば、動物組織）又はインビトロ（培養細胞）にて、標識の発現を検出することにより検出される。これら実施形態にいくつかにおいては、生物標識は、具体的には、IL-10又はFoxp3であり得る。さらなる技術は、本開示の記述に接した当業者によって識別されるため、さらに詳細に記述をしない。

【0116】

本明細書にて記載された方法及びシステムにおいては、候補細菌物質の抗炎症能力は、1種以上の抗炎症生物標識の発現の増加、又は、接触及び／又は培養後の1種以上の炎症生物標識の発現の減少によって測定され得る。生物標識の増加及び／又は減少の測定は、接触及び／又は培養後の炎症生物標識の検出された発現と、接触及び／又は培養がないときの同じ生物標識の発現における予め検出された発現との比較によって行われる。生物標識発現の増加及び／又は減少の測定は、検出された標識の発現と、接触及び／又は培養がないときのコントロール細胞における同じ生物標識の検出された発現とを比較することにより行われる。

【0117】

具体例が実施例において行われており、該実施例においては、抗炎症生物標識であるIL-10、Foxp3、TGF31、TGF-32、パーフォリン、及びグランザイムBの発現の増加と、炎症生物標識であるTNF α 又はIL-17Aの発現の減少とが、バクテロイデスフラギリスの作用機構と関連付けられており、該作用機構は、上記の発現型とバクテロイデスフラギリスの生物活性との間の関係、特に抗炎症作用の関係を支持するものである。バクテロイデスフラギリスの抗炎症活性は、当業者によって識別され、また、様々な刊行物や特許公報に記載されており、該特許公報としては、限定されないが、US05679654, US07083777, US2004092433, W007092451、及び、W02009062132が挙げられ、これらは、全体として、本明細書に参照として組み込まれる。候補細菌物質の特異的な抗炎症活性が、産生される特定のサイトカインセットの測定、また、本明細書に記載された方法によって識別される候補細菌物質により活性化される細胞のさらなる測定に基づいて測定され得るということは、当業者によって理解され得る。

【0118】

ある実施形態においては、抗炎症の発現における増加の検出、又は、炎症生物標識の発現における減少の検出は、IL-10、Foxp3、TGF31、TGF32、パーフォリン、及びグランザイム B、又はその組み合わせなどの抗炎症生物標識を誘導する物質の性能、又は、IFN γ 、IFN α 、IFN β 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-13、IL-21、IL-22、IL-23、IL-17、TNF α 又はその組み合わせなどの炎症サイトカインを抑制する物質の性能を示す。

【0119】

ある実施形態においては、前記方法は、インビトロ又はインビボにおける候補細菌物質を T 細胞と、T 細胞単独又は抗原提示細胞の存在下で接触させること、及び、IL-10、Foxp3、TGF31、TGF-32、パーフォリン、及びグランザイム B からなる群より選択される抗炎症生物標識の少なくとも 1 種の発現を検出することを有しており、該方法においては、接触後の抗炎症生物標識の発現の増加が、候補細菌物質の抗炎症性能を示している。具体的には、これら実施形態のいくつかにおいては、IL-10、Foxp3、TGF31、TGF-32、パーフォリン、及び／又はグランザイム B の発現が、Foxp3 発現 T 細胞、より具体的には、Foxp3 発現 Treg 細胞において行われる。

10

【0120】

ある実施形態においては、前記方法は、候補細菌物質と抗原提示細胞とを接触させること、及び、接触後に抗原提示細胞を T 細胞と培養することを有している。前記方法は、さらに、Foxp3、IL-10、TGF31、TGF32、TGF32、パーフォリン、及びグランザイム B からなる群より選択される抗炎症生物標識の少なくとも 1 種の発現を検出することを有し、該方法においては、培養後における生物標識発現の増加の検出が、候補物質の抗炎症性能を示す。具体的には、これら実施形態のいくつかにおいては、IL-10、パーフォリン、及び／又はグランザイム B の発現が、Foxp3 発現 T 細胞、より具体的には、Foxp3 発現 Treg 細胞において行われる。

20

【0121】

ある実施形態においては、前記方法は、候補細菌物質を T 細胞と単独又は抗原提示細胞の存在下で T 細胞と接触させること、及び、IL-17 及び TNF α からなる群より選択される抗炎症生物標識の少なくとも 1 種の発現を検出することを有しており、該方法においては、接触後における炎症生物標識の発現の減少が、候補細菌物質の抗炎症性能を示している。

30

【0122】

ある実施形態においては、前記方法は、候補細菌物質を抗原提示細胞と接触させること、及び、接触後に抗原提示細胞を T 細胞と培養することを有している。該方法は、さらに、IL-17 及び TNF α からなる群より選択される炎症生物標識の少なくとも 1 種の発現を検出することを有し、該方法においては、接触後における炎症生物標識の発現の減少が、候補細菌物質の抗炎症性能を示す。

【0123】

ある実施形態においては、候補細菌物質は、純粋系における細菌を含む。他の実施形態においては、候補細菌物質は、混合系における細菌を含む。細菌は、生きた細菌、死んだ細菌、細菌から単利した抽出物又は産物、それらを組み合わせたものであり得る。細菌は、研究所からのもの、ATCC などの貯蔵所からのもの、動物から単離されたもの、ヒトから単離されたもの、又はその組み合わせであり得る。

40

【0124】

ある実施形態においては、動物からの単離物は、フンから単離される。単離物は、腸内内容物、又は、フンと腸内内容物との組み合わせであり得る。ある実施形態においては、ヒトからの単離物は、便から単離される。該単離物は、腸内内容物、又は、便と腸内内容物との組み合わせであり得る。

【0125】

ある実施形態においては、前記方法は、組み換え遺伝子マーカー非ヒト動物、具体的には、マウスやラットなどの組み換え遺伝子マーカー哺乳類動物を、候補物質で処置するこ

50

と、及び、処置の後に組み換え遺伝子マーカー動物における生物標識の発現を検出することを有する。組み換え遺伝子マーカー非ヒト動物は、IL-10、Foxp3、TGF31、TGF-32、パーフォリン、グランザイム B、及び IL17、TNF α からなる群より選択される標識された抗炎症又は炎症生物標識を発現するように遺伝的に改質されている。

【0126】

具体的には、ある実施形態においては、上述した組み換え遺伝子マーカー非ヒト動物モデルは、前記物質で、経口的に又は静脈注射により処置されるか、又は、経口強制投与によって生きた細菌を永続的に植えつけられ、そして、Foxp3又はIL-10の生物標識発現量が、脾臓、腸間膜リンパ節、小腸、大腸、肺、膵臓、及び骨髄などのマウスの様々な部分において、物質の免疫調節能力の測定値として表される。

10

【0127】

ある実施形態においては、樹枝状細胞、T細胞、T調節、B細胞、又はマクロファージがマウスから精製又は分化され、IL-10（T細胞分析の場合はFoxp3）の発現は、緑色蛍光タンパク質（GFP）によって標識される。これら実施形態においては、候補細菌物質は、上述した細胞タイプの1種と接触させられ、GFP発現量が測定され、試験される物質の免疫調節能力が示されることとなる。一方、樹枝状細胞又は他の抗原提示細胞は、物質とともに培養され、該物質は、洗浄除去され、続いて樹枝状細胞はT細胞と培養され、T細胞から免疫調節活性を引き起こす樹枝状細胞の能力を測定する。GFP発現は、蛍光活性セルソーター（FACS）又はマイクロプレートリーダーを用いて測定され得る。

20

【0128】

ある実施形態においては、IL-10、Foxp3、TGF32、パーフォリン、及びグランザイム B からなる群より選択される少なくとも1種の抗炎症生物標識の検出、及び、IL-17及びTNF α からなる群より選択される少なくとも1種の標識された炎症生物標識の検出のための、T細胞、抗原提示細胞、及び試薬が、本明細書に記載された方法に従った、免疫調整能力を有する細菌物質を識別するためのシステムに含まれ得る。

【0129】

一実施形態においては、前記システムは、マウスから精製又は分化された樹枝状細胞、T細胞、T調節、B細胞、及び／又はマクロファージを、ある実施形態において含み、IL-10（T細胞分析の場合はFoxp3）の発現は、緑色蛍光タンパク質（GFP）によって標識される。

30

【0130】

前記システムは、キットオブパーツの態様で提供され得る。キットオブパーツにおいては、方法を実施するための多配位捕獲薬剤及び他の薬物が独立してキットに含まれ得る。抗原提示細胞、T細胞、及び試薬は、1種以上の組成物に含まれ、各細胞及び試薬は、適当な媒体とともに組成物中に存在し得る。

【0131】

さらなる成分としては、本開示の記述に接した当業者によって識別される、標識分子、特に抗炎症生物標的又は炎症生物標的又はその発現に関連する分子に特異的な標識捕獲薬物、マイクロ流体チップ、標準品、付加成分が挙げられる。

【0132】

組成物の適当な担体薬物、補助試薬、また、キットの一般的な製造及び梱包に適した識別に関する詳細は、本開示の記述に接した当業者によって認識され得る。

40

【実施例】

【0133】

本明細書にて記載された小胞、組成物、それに関する方法、システムは、実例によって記載される続く実施例において詳細に示され、また、これらに限定されるものではない。

【0134】

具体的には、続く実施例は、PSA（又はPAS配位子）を含むOMVsを細胞と接触させること、及び、生物標識の発現を検出することのための典型的な細胞培養、方法を示している。当業者は、OMVsと、PSAと、さらなる小胞のためのバクテロイデス

50

ラギリスと、OMVs又は他の小胞のPSAへさらに物質が送られることのために詳細に記載された特徴の妥当性を、本開示によって、理解するであろう。

【0135】

下記の材料及び方法は、本明細書にて例示された免疫調節物質の検出のためのすべての方法及びシステムのために用いられた。

【0136】

<細菌株、培養条件、マウス>

B. fragilis 株NCTC 9343をアメリカンタイプカルチャーコレクションから得た。その同系のPSA欠失変異株と、mpi44変異株（PSAのみ産生するが他の多糖を産生しない）とは、「M.J. Coyne, A.O. Tzianabos, B.C. Mallory, V.J. Carey, D.L. Kasper and L.E. Comstock, (2001) Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*, Infect. Immun. 69: 4342-4350.」に記載されている。細菌は、1L ddH₂O中に37g BHI (BD #237200)、0.5 μg/mlヘミン (Sigma H5533)、及び0.5 μg/ml ビタミンK (Sigma V3501)を含む富栄養培地、又は、1LのRPMI (Invitrogen SKU#11835-030)中に、8g グルコース、1% FBS、0.5 μg/ml ヘミン、及び0.5 μg/ml ビタミンKを含む特製の最少培地のいずれかにて育てられた。C57BL/6及び Balb/c株のSPFマウスをTaconic Farms (Germantown, NY)から購入した。TLR2 ノックアウトマウス及びIL-10 ノックアウトマウスをJackson laboratoriesから購入した。IL-10GFPマウスをシンシナティ小児病院のクリストファーカーブ研究所から購入した。Foxp3GFPマウスは、ロサンゼルスのカリフォルニア大学のTalal Chatila研究所から譲り受けた。

【0137】

<EDLに富んだ細菌集団の単離>

パーコール (GE Healthcare #17-0891-01) 不連続濃度勾配遠心分離を野生型*B. fragilis*及びΔ*B. fragilis* (Patrick S, Reid JH. (1983) Separation of capsulate and non-capsulate *Bacteriodes fragilis* on a discontinuous density gradient. J Med Microbiol. 16(2): 239-41.) のEDLの単離のために用いた。即ち、20%、40%、60%、80%のパーコール勾配 (PBSで希釈) を14ml試験管 (各層2ml) 中に調製した。次に、PBS中に再度懸濁させた*B. fragilis*培養物を20%パーコール層の上部に注意深く加えた。さらに、勾配を室温にて800gで20分間遠心分離処理した。EDLに富んだ細菌を分離後に、40%~60%の界面部分から取り戻した。

【0138】

<OMVの精製及び標識化>

斯かる方法には、*E. coli*からのOMVsの調製のために既に記載されている方法 (Amanda L. Horstman and Meta J. Kuehn. (2000) Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. J Biol Chem. 275: 12489-12496.) を適用した。即ち、EDLに富んだ*B. fragilis*を特製のMM中で育てた。4℃にて2時間、40,000gにて遠心分離することにより細菌がない培地の上清からOMVsを回収し、さらにPBSで2回洗浄し、0.45 μmの細長いカラム (Millipore #20-218) で濾過した。精製したOMVsの全タンパク質濃度をブラッドフォード法 (Biorad #500-0205) によって測定した。FITCで標識されたOMVsを既に知られた方法によって調製した (Nicole C. Kesty and Meta J. Keuhn. (2004) Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. J Biol Chem. 279: 2069-2076)。即ち、OMVsを室温で1時間、染色緩衝液 (1mg/ml FITC (Thermo Scientific #46424), 100mM NaCl, 50mM Na₂CO₃, pH 9.2) 中においた。標識されたOMVsを4℃で30分間40,000gで遠心分離することにより回収し、PBS+200ml NaClで2回洗浄した。

【0139】

<細菌の超薄膜切片の電子顕微鏡観察>

EDLに富んだ*B. fragilis*の超薄膜切片を既に知られた方法によって作製した (Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E. (1996) A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane

vesicles. Microb Pathog. 20(4): 191-202.)。即ち、カコジル酸緩衝液の2.5% (v/v) グルタルアルデヒド (Sigma, G5882) 溶液中で 4 °C にて終夜、サンプルを固定し、さらに、暗所にて室温で 3 時間、四酸化オスミウム (1%, w/v) 中で固定を行った。いずれの固定処理においても、ルテニウムレッド (1mg/ml, Sigma R2751) を配合した。そして、濃度勾配のある一連のアルコールで脱水した後に、固定処理したサンプルをエポキシ樹脂に包埋した。超薄膜切片を切り出し、フォルムバー／炭素被覆銅グリッド (EMS #FCF200-Cu) 上にてTEMによる観察の前に、2%酢酸ウラニル及びクエン酸鉛によってネガティブ染色した。

【0140】

<精製したOMVsの免疫金標識>

この方法には、既に知られた手法を適用した (Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E. (1996) A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. Microb Pathog. 20(4): 191-202.)。即ち、精製したOMVの小さな1滴をフォルムバー／炭素被覆金グリッド (EMS #FF200-Au) 上に置き、自然乾燥させた。これらのグリッドの“OMVs”の側が下になるように抗体及び洗浄液の小滴の上にグリッドを浮かべることにより、室温にて免疫金標識を行った。具体的には、0.12%グリシンに5分間おいた後、10%FBS中でサンプルを10分間ブロック処理した。続いて、5nmの金が結合した第2の抗体IgG (Dr. Paul Webster, House Ear Institute, ロサンゼルス から贈呈) をサンプルに塗布し、PBSで再び4分間の洗浄を5回行った。標識後、サンプルを1%グルタルアルデヒド中で5分間固定し、液滴がグリッドを透過するように、PBSの1分間の洗浄を4回、H₂Oの1分間の洗浄を4回行い、よく洗浄した。2%メチルセルロースの3～5%酢酸ウラニルの液滴上にグリッドを氷温で10分間置くことにより対比染色を行った。最後に、輪状針金を用いてグリッドを染色液から取り除き、自然乾燥させた。メチルセルロースの薄膜によって覆われたサンプルを輪状針金から取り除き、透過型電子顕微鏡観察 (TEM) に用いた。

【0141】

<糖タンパク質分析>

全細胞抽出物又はOMVs (*B. fragilis*変異株mpi44由来) から精製されたPSAをSDS-PAGEに供し、続いて、PSAの存在を現すべく、ゲルを糖タンパク質染色キット (G bioscience #786-254) により染色した。

【0142】

<化学的にTNBSで誘発された実験的大腸炎>

この操作としては、既に知られた方法 (Scheiffele and Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. Current Protocols in Immunology.15.19.1-15.19.14.) を採用した。即ち、野生型 (Balb/c) オスのマウスを、TNBS投与の前に、PBS、WT-OMV (5 µg)、又はΔPSA-OMV (5 µg) で1日おきに1週間、経口的に処置した。処置されたマウスをイソフルランで麻酔し、2%TNBS (50% EtOH中、Sigma P2297) の直腸への投与を3.5Fカテーテル (Instech Solomon; SIL-C35) によって行った。TNBS投与の後、経口投与をさらに2回続け、最後の処置の後、マウスを1～2日間分析した。

【0143】

机上の実験例においては、TNBS投与の前にPBS、WT-OMV (5 µg)、又はΔPSA-OMV (5 µg) で1日おきに1週間、経口的にマウスを処置する前に、一上述したように一、同じマウスをTNBSで処置し得る。処置されたマウスを、次に、イソフルランで麻酔し、2%TNBS (50% EtOH中、Sigma P2297) の直腸への投与を3.5Fカテーテル (Instech Solomon; SIL-C35) によって行った。TNBS投与の後、経口投与をさらに2回続け、最後の処置の後、マウスを1～2日間分析した。我々が予測したことは、この操作を採用することにより、これらマウスにおける大腸炎の程度が改善し、良くなり、治癒することであった。この予測は、PSAのみを用いた従前の研究において (Round ら. 2010) TNBS処理の前及び後の両方においてそれぞれ大腸炎を予防し、減少させたという事実に基づき、また、我々の本結果のいくつかに於いてマウスでのOMV作用がPSA濃度依存的であるという事実に基づく。

【0144】

<組織の病理学的分析>

マウスの結腸を中性の10%ホルマリン緩衝液 (ScyTek Laboratories CAS#50-00-0) 中で固定し、H & E 染色のためにパシフィックパソロジー (Pacific Pathology) によって処理した。各結腸部位の大腸炎スコアを病理学者 (Dr. Gregory Lawson, David Geffen School of Medicine, UCLA, ロサンゼルス) によって盲検方式により評価した。組織構造画像を20倍の倍率で光学顕微鏡 (Zeiss) を用いて取得した。

【0145】

<定量リアルタイムPCR>

Trizol試薬 (Invitrogen #15596-018) を用いてマウス組織から、又は、RNeasy ミニキット (Qiagen #74104) を用いて精製細胞からRNAを収集した。iSCRIPT cDNA 合成キット (BioRad #170-8890) をcDNAの変換のために用い、IQ SYBR Green supermix (BioRad #172-8882) をリアルタイムPCRのために用いた。本試験において用いたプライマーは、TNF (F- 5'ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC 3' (配列番号1)) ; (R- 5' GTG GGT GAG GAG CAC GTA GT 3') (配列番号2) ; IL-17 (F- 5' TTA AGG TTC TCT CCT CTG AA 3' (配列番号3)) ; (R- 5' TAG GGA GCT AAA TTA TCC AA 3') (配列番号4) ; IL-10 (F- 5' GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA 3' (配列番号5)) ; (R- 5' ACC TGC TCC ACT GCT TGC T 3') (配列番号6) ; Foxp3 (F- 5' GCA ATA GTT CCT TCC CAG AGT TCT 3' (配列番号7)) ; R- 5' GGA TGG CCC ATC GGA TAA G 3' (配列番号8) ; アクチン (F-5' TTC GTT GCC GGT CCA CA 3' (配列番号9) ; R-5' ACC AGC GCA GCG ATA TCG-3' (配列番号10)である。

【0146】

<蛍光顕微鏡法>

インビトロで分化したBMDCをLab-Tek IIの8ウェルチャンバースライド (Nunc #154534) に50,000細胞/ウェルとなるように播種した。FITCで標識したOMVを培養細胞に10 µg/mlで添加した。2時間の培養後、細胞を4%PFA中で室温にて2時間固定処理した。PBSで5分間の洗浄を3回行った後、WGA (Invitrogen W849) のテトラメチルローダミン複合体の1 µg/mlによって4℃で1時間染色処理した。そして、プロロングゴールド褪色防止剤 (P36930) を、膜染色の後、十分に洗浄した細胞に塗布した。LSM 510顕微鏡、及び、油浸Plan-Neofluar 63x/1.25を用いて蛍光画像を取得した。

【0147】

<フローサイトメトリー法及び染色法>

OMV取得操作又は活性操作由来のBMDCを収集し、5%マウス血清中で氷温にて30分間ブロック処理した。ブロック処理の後、氷温にて30分間、抗CD11c-APC、抗-MHCII-FITC、又は、抗-CD86-PE (ebioscience社) で染色し、フローサイトメトリーの前に4℃にてFACS緩衝液 (HBSS (Ca²⁺/Mg²⁺なし)、1% FBS、2mM EDTA、10mM HEPES) で2回洗浄した。同様に、インビトロでのBMDC-T細胞共培養物由来の細胞をブロック処理し、回収の前にPMA/イオノマイシンを用いて4~4.5時間再刺激したこと以外は、抗-CD4-APC/抗-CD25-PEを用いて同様に染色した。全てのフローサイトメトリーは、BD FACSCaliburを用いて行い、結果は、FlowJoを用いて解析した。

【0148】

<インビトロでのBMDC-T細胞の共培養>

骨髄を異なるマウス株から収集し、既に知られているように (Mazmanian, Liu, Tzianabos, and Kasper (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. Cell 122: 1107-1118)、20ng/ml GM-CSF (Miltenyi Biotec #9517571) の存在下にて8日間、インビトロで分化させた (細胞純度 > 90%)。CD4⁺ 脾臓のT細胞を、磁気ビーズ精製法 (Miltenyi Biotec #130-090-860) によって単離した (細胞純度 > 95%)。OMVで標的化されたBMDCs (10 µl/ml OMVs, 100,000細胞/ml, 12~24時間) をHBSSで洗浄し、そして、抗-CD3を0.01 µl/mlとなるように添加 (0日、図3C、3D、3E、3F、図4A)、2ng/mlTGFβを添加 (0日、図3C、

D及びF、図4A)、及び、5ng/ml II-2を添加(1日及び3日、全てインビトロDC-T細胞共培養法)した丸底の96ウェルプレート中でCD4⁺T細胞(1,000,000細胞/ml)とともに培養した。培養4日後、上清をELISA法(ebioscience #88-7104-77)のために収集し、又は、細胞を染色若しくはフローサイトメトリーのために回収した。

【0149】

<インビトロでの抑制操作>

BMDC(WT-OMV又はAPSA-OMVで標識化)ーT細胞共培養物から精製されたCD4⁺CD25⁺細胞をTreg(Miltenyi Biotec, #130-091-041)源として用いた。マイトマイシンC(Sigma M4278)で処理されたCD4欠失マウス脾臓をAPCs(100,000細胞/ml)として用いた。マウス脾臓から直接的に精製されたCD4⁺CD25⁺T細胞を37℃にて10分間、CFSEで標的化し、続いて、PBSで最初の洗浄を行い、培地で2回目の洗浄を行い、キラー細胞(Teff)として直ちに使用した(500,000細胞/ml)。この操作は、5µg/mlの抗-CD3(ebioscience #16-0031-86)を添加した、200µl容積の96ウェル丸底プレートにおいて行った。Teff:Treg比は、滴定され、細胞は、培養後2~3日後にFACS分析のために収集された。

【0150】

<統計的解析>

スチューデントT検定及び一元ANOVAをそれぞれ対比較及び2群以上の比較のために採用した。統計的な有意差を示す群を識別すべく、ANOVAによる群間の有意差を、ポストホックテストとしてのNewman-Keuls検定を使用することにより解析した。全てのエラーバーは、SEM(誤差範囲)を示している。NS:有意差なし、* p<0.05; *** p<0.01; **** p<0.001。

【0151】

(試験例1)

免疫調製性莢膜多糖PSAを*B. fragilis*のOMVsへ活性的に入れる。

【0152】

*B. fragilis*のEDLに富んだ超薄膜切片を材料及び方法において記載したように調製し、透過型電子顕微鏡で撮影した。

【0153】

図1Aに示される結果は、細菌によってOMVsが豊富に産生され、細菌外膜から外方に出ていることを示している(図1A、より高い倍率)。先行技術においては、PSAの欠失により*B. fragilis*の免疫調節能力がなくなること示されている(Mazmanian, Liu, Tzianabos, and Kasper (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. Cell 122: 1107-1118.)、(Mazmanian, Round, and Kasper (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature. 453 (7195) 620-625.)。PSA変異株(*B. fragilis*ΔPSA)の電子顕微鏡写真は、OMV合成において欠損がないことを示し、また、産生されたOMVの大きさ、形状、存在量が、野生型細菌と区別できないことを示している(図1A及び図5)。具体的には、図1Aに示された結果は、細菌表面から小胞が活発に出ていることを示している。

【0154】

PSAが*B. fragilis*のOMVsと関連しているか否かを測定するために、野生型細菌及びΔPSA細菌由来の精製した小胞を、材料及び方法の段落で記載したように、免疫プロット解析に供した。

【0155】

図1Bに示した結果は、*B. fragilis*ΔPSA由来のOMVsと異なり、野生型由来の小胞がPSAにとって免疫活性を示すことを表している。*B. fragilis*は、細菌表面を覆う少なくとも8種の異なる莢膜多糖を産生し、該多糖は、PSA, PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG, 及びPSHと称される。PSBは、小胞調製において検出される一方で、PSGは、存在しない。これは、包括される所定の多糖のOMVsへの選択性を示している(図1B)。従って、図1Bの結果は、PSAとPSBとは小胞と関連している一方で、PSGは、単に細菌表面

に観察されるのみであることを示している。莢膜多糖の欠失変異体は、各抗血清への選択性を確実なものとする。

【0156】

イムノプロット解析による結果は、材料及び方法の段落で記載したように行った免疫金標識の試験によって裏付けられた。精製した小胞の免疫金標識の結果が図1Cに示されており、PSAが物理的にOMVsと関連し、野生型*B. fragilis*由来のOMVsの大部分がPSAによってポジティブに染まることをこの結果が裏付けている(図6)。PSAがないことによりOMVsの分子組成が変わらないことを検証すべく、プロテオーム解析が質量分析によって行われ、これにより、野生型細菌由来又はPSA-変異細菌由来の小胞の間のタンパク質組成において大きな量的又は質的な違いがないことがわかった(図7)。

10

【0157】

PSAは、繰り返し単位を有する不均一な高分子化合物である。全細胞抽出物から回収したクロマトグラフィーによるPSAのサイズ分離を実施し、全細胞から調製した莢膜多糖の抗PSAを用いたイムノプロット解析を行い、材料及び方法に示したようにOMVsを精製した。

【0158】

図1Dに示された関連する結果は、驚くべきことに、低分子量種、L-PSAのみがOMVsと関連していることを表し、PSAの小胞への特異的な取り込みを示す。具体的には、図1Dの結果は、低分子量PSA(L-PSA)のみが小胞に取り込まれ、これと異なり、高分子量(H-PSA)種は、細菌細胞外膜に付随して留まることを示している。

20

【0159】

上記の結果により、免疫調節性の莢膜多糖PSAは、*B. fragilis*のOMVs中へ活発に入る。

【0160】

(試験例2)

OMVsは、PSA濃度依存的に、実験的な大腸炎及び腸の炎症から動物を保護する。

【0161】

OMVsが疾患の臨床症状を改善することができるかどうかを調査するために、マウスをTNBS(2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸)誘発性大腸炎の間、OMVsを用いた強制経口投与により処置した。

30

【0162】

図2Aに示す結果が示していることは、TNBSの直腸投与の後にコントロール動物が急速に体重を減少させた(図2A、TNBS+PBS)こと、媒体処理されたマウス(図2A、EtOH+PBS)と比べて回復しなかったことである。注目すべきは、OMVsが経口的に与えられたTNBSマウスは、特に、体重減少が予防された(図2A、TNBS+WT-OMV)。最も重要なことは、*B. fragilis* ΔPSA由来のOMVsが投与されると、体重減少がTNBS動物と区別つかなくなり(図2A、TNBS+ΔPSA-OMV)、これは、消耗性疾患の予防にPSAが関与していることを証明している。

【0163】

胃への強制投与の後に結腸で無傷の小胞を検出する我々の試みは、宿主由来の小胞の観察によって結果が混乱するものとなり、既に報告したように(実験データ無し)、無菌(菌がない)マウスにおいても混乱するものとなった。

40

【0164】

結腸長さの減少は、TNBS大腸炎の特徴であるため、結腸長さの測定を、盲腸から直腸まで削除した直後に、操作されていない腸において行い、媒体処理群(EtOH)及びTNBS群(n=4、匹/群)の長さの定量化(グラフ)を行った。具体的には、測定は、死亡後(疾患誘発後4日)に行った。

【0165】

図2Bに示す結果は、PSA含有小胞で処置した動物における通常の腸の長さを示し、PSAがないOMVsで処置した動物におけるものではない(図2B)。

50

【0166】

実験的大腸炎の結果は、腸の構造における激しい病理的变化を引き起こした。従って、各処置群を代表するヘマトキシリン及びエオシン（H&E）染色された腸部位は、図2Cに示されるように提供された。図2Cの画像は、結腸組織の組織学的分析において、PSA含有小胞の経口投与により改善したTNBS処置動物において重大な疾患が観察されたことを示している。

【0167】

図2Cの結果は、クローン病で観察される病変に類似した腸を通して、局所性病変においてTNBS大腸炎が現れ盲検病理学者によって割り当てられた動物における大腸炎のスコアによって確認されたものである。定量的に疾患を評価すべく、臨床症状を標準のスコアシステム（Scheiffele及びFuss, (2001) Induction of TNBS colitis in mice. Current Protocols in Immunology.15.19.1-15.19.14.）を使用して、盲検病理学者によって評価した。図2Dに示された結果は、TNBS及びΔPSA-OMVで処置された動物が全て深刻な影響を受けたものの、WT-OMVSが大幅にほとんどの動物の疾患を減少させた。野生型細菌由来のOMVsで処置した動物は、病理学上の重大な疾患がほとんどなく、病変が観察されたときは、その病変は、ΔPSA-OMVが与えられた動物と比較して小さく、ほとんど正常な組織構造を保持していた。

【0168】

上記の結果は、OMVsの疾患予防活性のためにPSAが必要であることを証明している。

【0169】

（試験例3）

OMVsを含有するPSAがTNF α / IL-17発現を抑制し、IL-10発現を高める。

【0170】

大腸炎に関連する標準的な炎症性及び抗炎症性サイトカインの産生を、試験例2に例示したように処置されたマウスにおいて測定した。具体的には、サイトカイン転写分析を、腸全体から、又は腸間膜リンパ節由来の精製されたCD4+ T細胞から回収されたRNAのqRT-PCR法により行った。

【0171】

3つの独立した試験を代表する関連結果が、図2E（腸全体）及び図2F（腸間膜リンパ節由来の精製されたCD4 + T細胞）に報告されている。これらの結果は、炎症性生物標識／サイトカイン腫瘍壊死因子（TNF- α ）及びIL-17Aの転写レベルが、TNBS処置動物で上昇するが、PSA濃度に依存して、OMV投与により減少することを示している（図2E）。病状からの保護と矛盾せず、OMVsは経口的にΔPSA-OMVが与えられた動物と比較して、抗炎症性生物標識／サイトカインIL-10レベルの生産増加を誘発した（図2F）。腸間膜リンパ節（MLNs）由来の精製されたCD4+ T細胞によって産生されたサイトカイン解析は、PSAに応答して、IL-10が確かにT細胞によって生産されることを確実とした（図2F）。疾患に必要とされるTh17細胞の浸潤が、OMVsによって有意に削減し、強力な炎症性マーカーのTNF- α のレベルとなった（図2F）。我々は、B. fragilisのOMVsへPSAが入ることが、実験的大腸炎の病理学のおよび免疫学的症状から動物を保護すると結論付けている。

【0172】

（試験例4）

B. fragilis由来のOMVsを含むPSAが樹枝状細胞反応を含む

【0173】

樹枝状細胞（DCs）は、腸管内腔に突出し、腸内粒子を捕食し、その後、T細胞反応を開始するためにMLNsに移行する。確かに、動物に経口投与されたPSAは、MLNにおいてCD11c+ DCsと関連している。従って、出願人は、PSAを含有するOMVsもDCsに取り込まれることができるかどうかを試験しようとした。

【0174】

サイトカラシンDを用いた細胞の処理が小胞の取り込みを阻害するため、アクチン濃度に依存して、骨髓由来DCsが急速にOMVsを内在化するという結果が図3Aに示されている

10

20

30

40

50

(図 3 A 及び図 8)。細胞内における局在を共焦点顕微鏡により確認した(図 9)。

【0175】

T細胞活性化マーカーのDCにおけるPSAを媒介した誘導をも調べた。図3Bに示す結果は、WT-OMVs及びΔPSA-OMVs両方の内在化に引き続き、T細胞活性化マーカー(MHCII、CD86)の発現が均等に上昇することを示している(図3Bおよび図10を参照)。MHC及び共刺激性分子の発現増加は、*B. fragilis* 由来のOMVsを含むPSAがT細胞応答に影響を与えることを示している。

【0176】

(試験例5)

OMVsを含有するPSAが、DCs IL-10によってCD4+ T細胞におけるIL-10の発現を誘発する。

【0177】

試験例1～3に例示した実験によって示された大腸炎におけるOMVs含有PSAの保護機能を考慮して、サプレッサーT細胞の応答の誘導におけるOMVsの生物学的作用を試験した。具体的には、大腸炎を阻害することが知られている様々な制御性T細胞(Treg)の集団として、Treg細胞の発達を促進するOMVsの能力を試験した。

【0178】

図3Cに示す結果が示していることは、WT-OMVsがインビトロでのDC-T細胞の共培養からのIL-10の発現を誘発する一方で、これらの条件下のみでは、IL-10がDCsから産生されないことである。増加が媒体制御において検出されたものの、*B. fragilis* ΔPSAから精製された小胞は、WT-OMVsよりもIL-10を大幅に少なく誘導した。DCsからのIL-10の産生は、CD4+ IL-10+ T細胞の発達をインビボ及びインビトロで支えることが知られている。従って、図3Cに示されているものと同様のELISA分析は、IL-10-/-動物から分化したDCsを含むように行われた。

【0179】

図3D(左側)に示した結果が示していることは、IL-10-/-DCsが野生型OMVsで処置されたときに、DC-T細胞の共培養におけるIL-10産生の大幅な減少が、DCsによるIL-10の発現を示唆し、パラクリン様式でCD4 + T細胞からIL-10を誘発することを必要とすることである。

【0180】

(試験例6)

OMVsを含むPSAは、DCsを直接的なFoxp3 Tregの発達及び/又は拡張へ仕向ける。

【0181】

微生物リガンドは、パターン認識受容体のいくつかのクラスによって感知され、PSAは、Th1サイトカイン産生を誘発すべく、トール様受容体2(TLR2)によって信号を送ることが示されている。一連の実験は、従って、TLR2が野生型OMVs(PSAを含む)によるIL-10の誘導のために必要とされるかどうかを試験するために実施され、最近の報告では、Treg機能及びIL-10発現がTLR2の影響を受けることが示されている。

【0182】

図3D(右側)における結果が示していることは、野生型のDCsと比較して、TLR2(TLR2-/-動物由来のDC)の不在が、OMVsに対応して、IL-10産生を完全に抑制するということである。両方のDCは、スーパー抗原(SEA)の刺激に対して同じように反応し、PSAセンシングにおける特定の欠陥を示し、TLR2-/-DCsによるT細胞活性の一般的な不足を示さなかった(図3D)。転写因子Foxp3を発現するCD4+CD25+ T細胞は、重要なTregサブセットである。最近の研究で示されていることは、CD4 + CD25 + FOXP3 +TregsがIL-10を発現させ、TregsからのIL-10産生が腸の炎症を防ぐために必要であるということである。

【0183】

OMVsにおけるPSAによって誘導されるIL-10の源を測定すべく、CD4 + CD25 + T細胞及びCD4 + CD25- T細胞を、DCsとの共培養の後で精製し、IL-10及びFoxp3の発現をqRT-PCRによって測定した。

10

20

30

40

50

【0184】

図3Eに記載された結果が示していることは、特に、PSA-OMVがCD4 + CD25 + Treg集団において、IL-10の発現を大幅に誘発するが、CD4+ CD25-のT細胞からは誘発しないことである。B. fragilis ΔPSAから精製したOMVsは、T細胞集団からのIL-10産生を制御媒体と同じ程度にて、促進することができないということである。PSA依存的に、CD4+CD25+ T細胞において、OMVsによってFoxp3の発現も有意に増加した（図3E）。

【0185】

共培養は、図3C～Eに示された実験と同様に設定されたが、Foxp3-GFPマウスからのCD4 + T細胞を使用した。OMVで標的化されたDCで4日間培養後、FCを使ったGFP発現によって検出される抗CD4及びFoxp3で染色した。

10

【0186】

2つの独立した試験の代表的な結果が図3Fに示されている。

CD4 + T細胞におけるFoxp3の転写の増加と矛盾せず、CD4+ Foxp3 + T細胞の比率が、PSA-OMV処置でなく、WT-OMV処置に応じて増加した（図3F）。総称して、PSAを含むOMVsは、完全にインビトロな培養系において、直接的にTregの発達及び／又は拡張へとDCを仕向ける。

【0187】

（試験例7）

PSA含有OMVsは、IL-10が媒介するFoxp3 Treg抑制作用を誘発する。

【0188】

20

細胞療法としてTregsを使用することが、IBD、自己免疫、アレルギーのために提案されている。OMVsで処置されたDCを用いた4日間の共培養の後に、CD4+ T細胞サブセットによるIL-10発現を調べた。脾臓のCD4+ T細胞をIL-10-GFPマウスから精製し、共培養の後に抗CD4及び抗CD25で染色し、GFPの発現によりIL-10の発現を測定した。

【0189】

精製されたDCs及びT細胞の関連したOMV処置の図4Aにおける結果は、PSAがCD4 + CD25 + TregからIL-10の特異的な産生を促進することを示している。

【0190】

この知見に基づき、PSAの能力が調べられ、CD4 + CD25、培地（コントロール）、OMVs、ΔPSA-OMVsで処置したDCsとの共培養の後に、精製されたCD4 + CD25+ T細胞によるキラー細胞のインビトロ及びエキスピボでの抑制の抑制能を促進することが調べられた。CD4 + CD25-キラー細胞（エフェクター細胞、Teff）が野生型マウスの脾臓から精製され、細胞内の色素CFSE（カルボキシシクシンイミジルエステル）で識別化され、Tregsとともに培養され、3日間抗CD3で刺激された。細胞増殖は、CFSE希釈のFCによって測定した。

30

【0191】

図4B及び4Cに示された結果は、ΔPSA-OMVsに反応するCD4 + CD25 + T細胞と比較して、WT-OMV処理したDCを用いた状況から回復したTregsが、有意に強化された抑制能を表示することを示している。

【0192】

従って、他に多数の微生物リガンド（LPS、リポタンパク質、ペプチドグリカンなど）を含むOMVs由来のPSAの特定の不在は、機能的なTregsを誘導するB. fragilis小胞の能力をなくす。

40

【0193】

（試験例8）

PSAは、Foxp3 Tregにおける様々な生物標識の組み合わせを誘発する。

【0194】

Foxp3-GFPマウスを、経口的に6日間、1日おきに精製したPSAで処置した。MLNsが抽出され、CD4 + Foxp3 + T細胞、又はCD4+ Foxp3- T細胞が、±GFP発現（純度 > 99%）に基づいて、FACSによって精製された。RNAを抽出し、q-PCRに用いた。

【0195】

50

図 1 1 に示す結果は、PSAが、IL-10、TGF- β 、パーフォリン、及びグランザイム A などの複数の抗炎症性遺伝子を誘導することと、TNF α 及び IL17（特に IL17A）を阻害することとを連携させることを実証している。

【0196】

上記の結果は、B.フラジリス (B. fragilis) のプロバイオティクス活性の分子機構を提供し、制御性 T 細胞への免疫受容体伝達と関連する微生物リガンドのための影響力にある例を明示している。具体的には、上記の結果は、宿主細胞への細菌分子を標的とする外膜小胞 (OMVs)、分泌構造 PSA によって、PSA が宿主に送られることを示す。PSA 含有 OMVs は、宿主免疫系の樹枝状細胞によって内在化される。OMVs を取り込んだ後、PSA は、Foxp3 及び抗炎症性サイトカインインターロイキン-10 (IL-10) を発現する制御性 T 細胞 (Treg) の分化を誘導するように、樹枝状細胞を仕向ける。OMVs による Treg の発達は、樹枝状細胞による トール様受容体 2 (TLR2) の発現と IL-10 産生とを必要とする。驚くべきことに、PSA 依存的に、精製された OMVs は、強力な抑制活性を伴って機能性 Treg のインビトロでの分化を誘導する。PSA を含有する OMVs で動物を処理することは、実験的大腸炎を防ぎ、腸における炎症性サイトカイン反応を抑制する。これらの知見は、共生細菌が小胞分泌によって有益な微生物因子を提供すること、IBD のためのプロバイオティクス療法の伝達のための斬新な手法への設計されるプロセスを証明している。

【0197】

具体的には、上記の結果は、PSA を含有する OMVs によって誘発された Tregs が、機能的に抑制され、培養中の T 細胞の活性を阻害することを示している。これは、微生物リガンドによるインビトロでの Treg 発達の最初の証明であり、固有免疫受容体シグナルが Treg 細胞を調節するという、広く推測された考えに対する原理証明を提供している。IBD のための現状の治療法は、無効であるか、又は重大な副作用を持っているため、プロバイオティクスは、免疫調節のための進化した斬新な機構を利用することによる有望な新しい治療選択に相当する。複数の組織において免疫反応が抑制されることを考慮すると、独創性に富んだ我々の PSA によるインビトロでの Treg の発達は、自己免疫、喘息、アレルギーなどの多数の炎症性疾患に対する、新規細胞治療の興味深い可能性を示唆している。

【0198】

免疫調節を媒介する微生物によって作られる分子を同定すべく、細菌産物の画分が精製され、全細菌が使用されるときに同様な結果が得られる純粋な化合物を得るまで、同じ操作が上記のように行われる。また、上記の取り組みは、この活性を有するそれぞれのクローン菌株においてなくなった免疫調節分子を同定すべく、興味ある微生物の変異コレクションを選別するために使用することができる。

【0199】

我々の以前の研究では、PSA が単独で、マウスにおける大腸炎を治療及び予防することが示されている (Round ら 2010)。従って、我々が得た今回の結果が示すことは、PSA を含む野生型 OMV がマウスでの大腸炎を防ぐこと、及び、OMV を用いたこの効果が我々の提示した PSA に依存していると考えられることである、野生 OMV は、同じ TNBS マウスモデルにおける大腸炎の治療に有効であり、IBD を有するヒトに対して有益であり又は改善活性を有する。

【0200】

ここで注目すべきことは、炎症性疾患 (IBD など) の発症予測マーカーが知られていないものの、一度識別されたこれらの予測マーカーは、疾患の発症を防ぐために、上述したような物質／組成物／OMVs によって、疾患が進行するリスクのある物／人間が同様に処置されることを意味しているということである。

【0201】

別の実施形態においては、OMVs (PSA を含む) が、所定の酵素が発現しないように、又は所定の酵素の発現を減らすように改質され得る。凝集活性及び酵素活性 (例えば、アルカリ性及び酸性のホスファターゼ、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホヒドロラーゼ、グルコサミニダーゼなどの加水分解酵素) を、当業者に知られている分子又は物理的方法を用

いて減らす。このような改質OMVsは、その後、炎症又は炎症性疾患を治療または予防するために使用され得る。

【0202】

上記の例は、当該技術分野に対して、本開示の小胞、システム、及び方法の実施形態を使用及び実施するための完全な開示と説明とを当業者を与えるために提供されており、その開示の範囲に関して限定することを意図していない。本開示を実施するために当業者によって明らかである上記様式の変更は、以下の特許請求の範囲の範囲内であることが意図されている。明細書に記載されている全ての特許公報及び刊行物は、本開示に係る当業者の技術レベルを示すものである。本開示に記載された全ての参考文献は、各参考文献が個別に全体的に参考として援用されるときに、同じ程度で参照として援用される。

10

【0203】

技術背景、要約、詳細な説明、及び実施例において記載された各記述（特許公報、特許出願公報、学術論文、抄録、実験マニュアル、書籍、又はその他の開示を含む）の開示全体は、参照により本明細書に援用される。

【0204】

本開示は、特定の組成物又は生物システムに限定されるものでなく、当然のごとく、変えることができると理解すべきである。また、本明細書で使用する用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためのものと理解されるべきであり、限定することを意図するものではない。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるときに、単数形の“a”、“an”、“the”は、内容について別段の明確な指示がない限り、“複数”の対象を包含する。“複数”との用語は、内容について別段の明確な指示がない限り、2つ以上の対象を包含する。別段の規定がない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、関係する当業者によって一般的に理解されるような同じ意味を有している。

20

【0205】

本明細書に記載したものと類似した又は同等の任意の方法および材料が、適切な材料と方法の具体例を試験するために使用され得る。

【0206】

開示の多数の実施形態が記載されている。それにもかかわらず、種々の変更が、本発明の思想および範囲から逸脱することなく行うことができると理解されるべきである。従って、他の実施形態は、以下の特許請求の範囲の範囲内にある。

30

【0207】

本発明を好ましい実施形態に関連して説明してきたが、当業者が容易に理解できるように、本発明の原理および範囲から逸脱することなく改良及び変更を利用できると理解されたい。従って、このような変形例は、以下の特許請求の範囲内で実施され得る。

【0208】

<参考文献>

1. Xavier, R.J. & Podolsky, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434 (2007).
2. Mazmanian, S.K., Round, J.L. & Kasper, D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453, 620-625 (2008).
3. Braun, J. & Wei, B. Body traffic: ecology, genetics, and immunity in inflammatory bowel disease. *Annu Rev Pathol* 2, 401-429 (2007).
4. Round, J.L. & Mazmanian, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* (2009).
5. Scheiffele and Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*.15.19.1-15.19.14.
6. Mazmanian, Liu, Tzianabos, and Kasper (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 122:1 107-118
7. MJ. Coyne, A.O. Tzianabos, B.C. Mallory, V.J. Carey, D.L. Kasper and L.E. Com

40

50

stock, (2001) Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*, *Infect. Immun.* 69: 4342-4350.

8. Patrick S, Reid JH. (1983) Separation of capsulate and non-capsulate *Bacteroides fragilis* on a discontinuous density gradient. *J Med Microbiol.* 16(2): 239-41

9. Amanda L. Horstman and Meta J. Kuehn. (2000) Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem.* 275: 12489-12496.

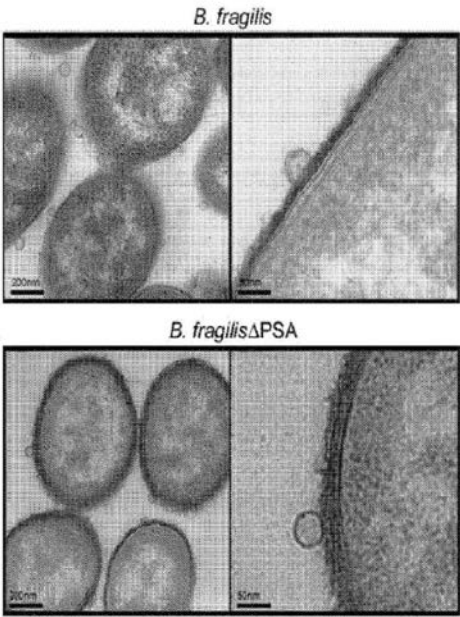
10. Nicole C. Kesty and Meta J. Keuhn. (2004) Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *J Biol Chem.* 279: 2069-2076.

11 . Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E. (1996) A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. *Microb Pathog.* 20(4): 191-202.

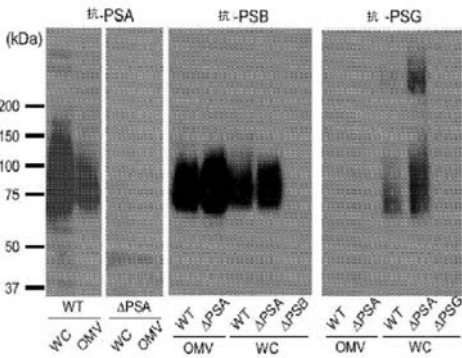
12. Round et al. (2010) Inducible Foxp3+ regulatory T cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *PNAS*, 107 (27). 12204-12209.

10

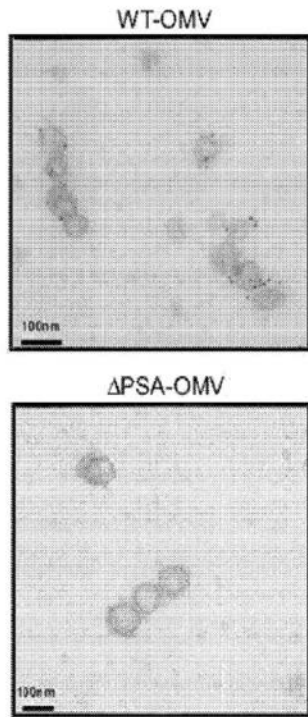
【 図 1 A 】



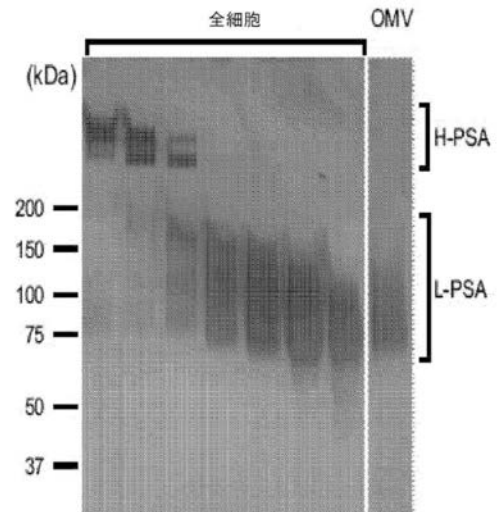
【 図 1 B 】



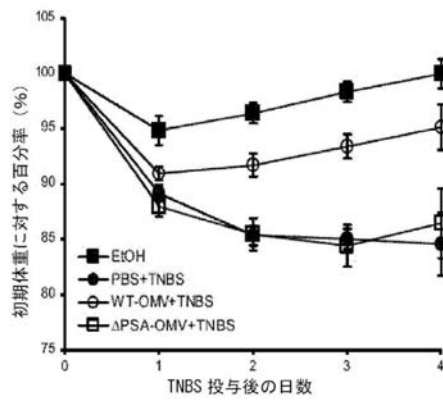
【図 1 C】



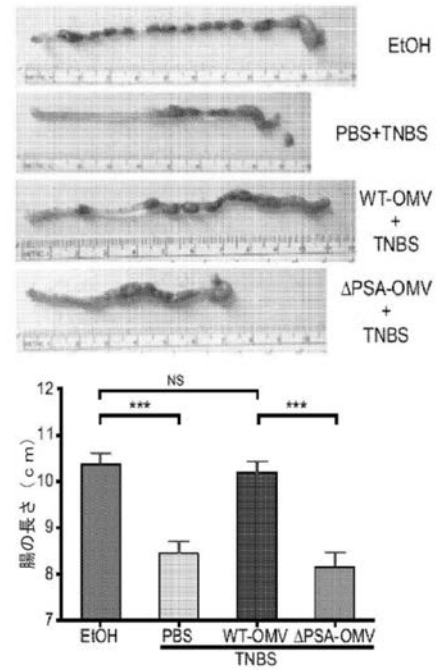
【図 1 D】



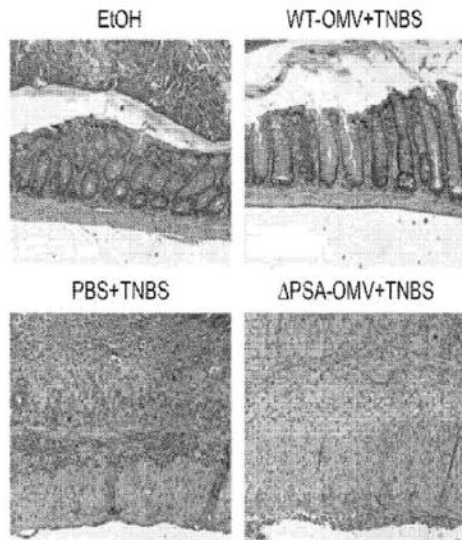
【図 2 A】



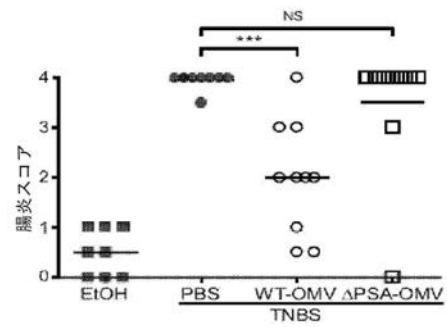
【図 2 B】



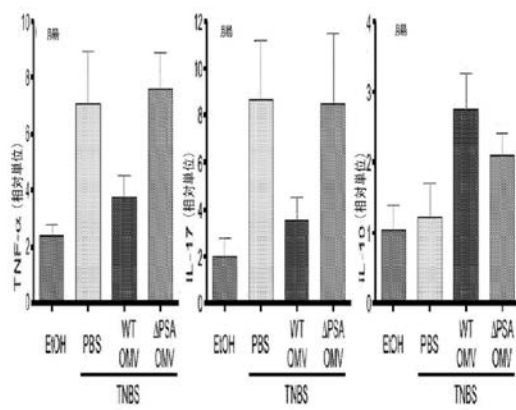
【図 2 C】



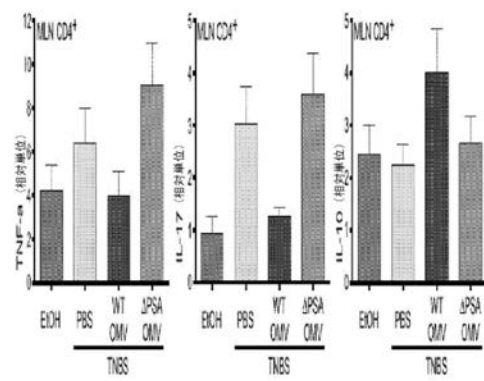
【図 2 D】



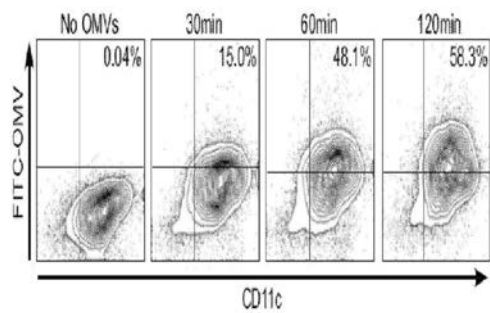
【図 2 E】



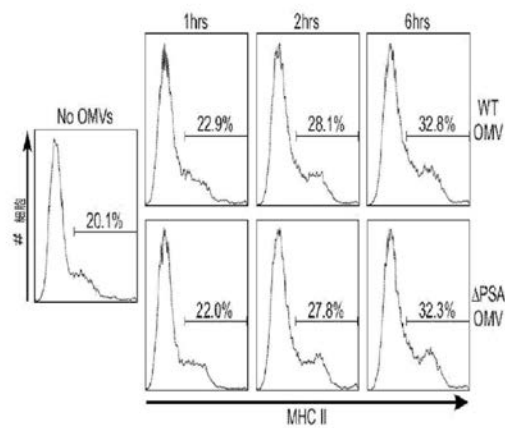
【図 2 F】



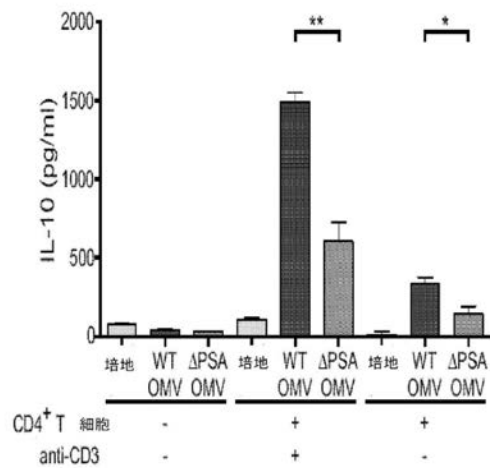
【 図 3 A 】



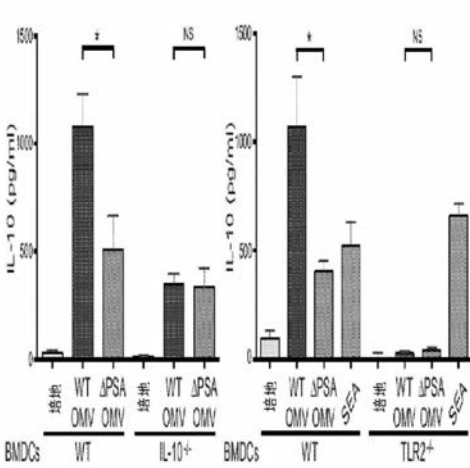
【 図 3 B 】



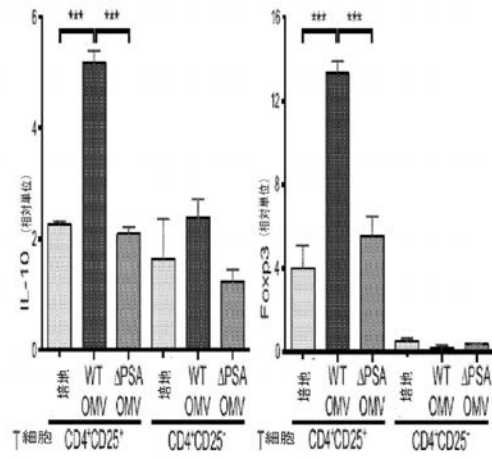
【 図 3 C 】



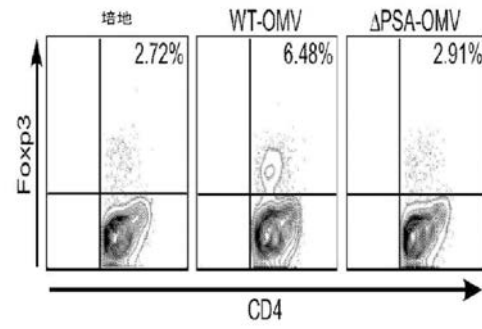
【 図 3 D 】



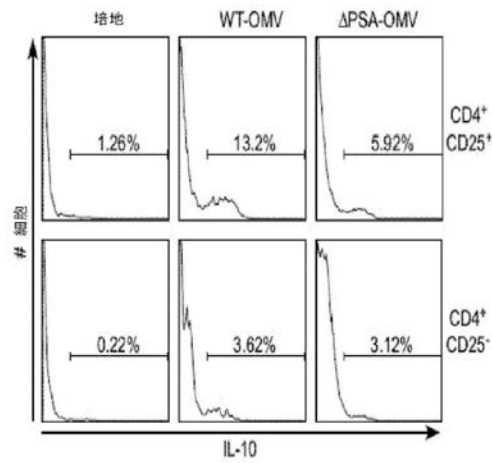
【図 3 E】



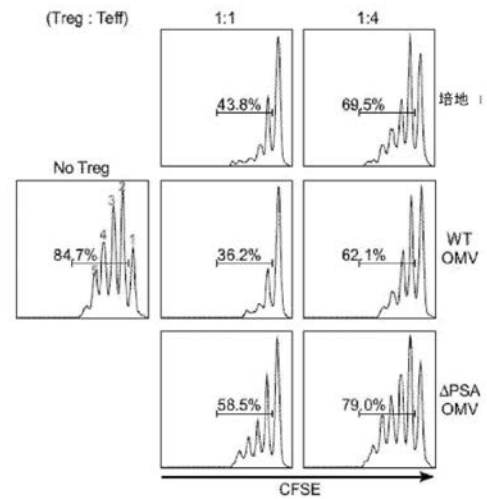
【図 3 F】



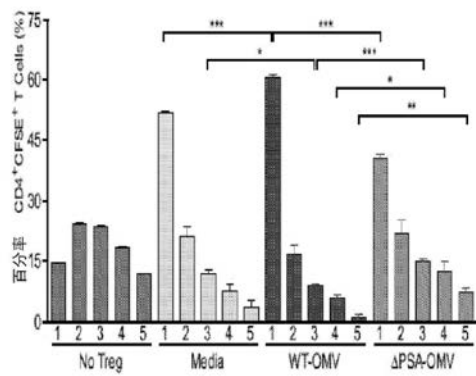
【図 4 A】



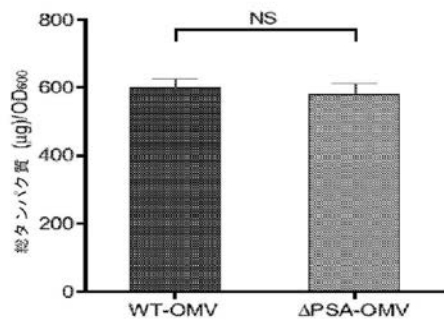
【図 4 B】



【図 4 C】



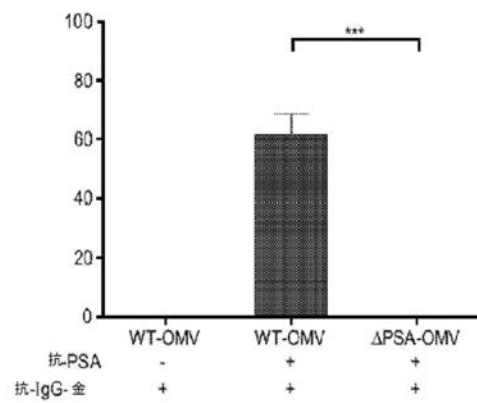
【図 5】



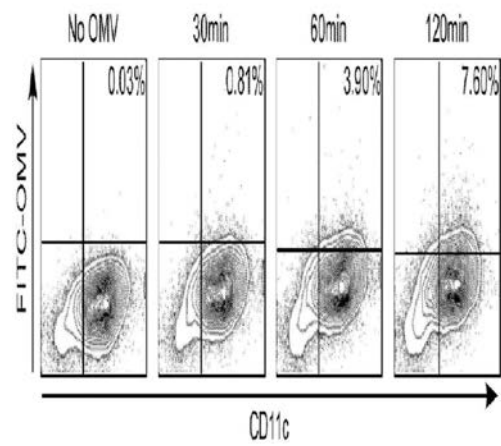
【図 7】

No.	付加 No.	タンパク質名	WT-OMV	ΔPSA-OMV	
BF3567	gj60683022	仮想タンパク質	884±58	452±55	**
BF2157	gj60681638	推定タンパク質	847±45	630±37	NS
BF0285	gj60680161	仮想タンパク質	541±25	298±18	NS
BF2161	gj60681840	仮想タンパク質	213±24	85±5	**
BF2706	gj60682179	推定タンパク質	178±18	128±12	NS
BF1956	gj60681445	推定外膜タンパク質	181±41	128±9	NS
BF0594	gj60680160	仮想タンパク質	142±12	202±8	*
BF1957	gj60681448	仮想タンパク質	134±10	157±17	NS
BF3067	gj60682536	推定タンパク質	124±31	62±5	NS
BF0689	gj60680155	仮想タンパク質	124±17	119±12	NS
BF3432	gj60682894	仮想タンパク質	117±9	98±11	NS
BF2023	gj60681124	推定 ATP/GTP 結合タンパク質	117±13	74±1	*
BF1619	gj60681115	仮想タンパク質	117±9	147±14	NS
BF3144	gj60682813	仮想タンパク質	107±22	110±14	NS

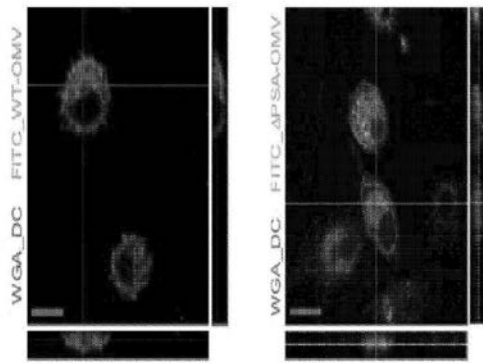
【図 6】



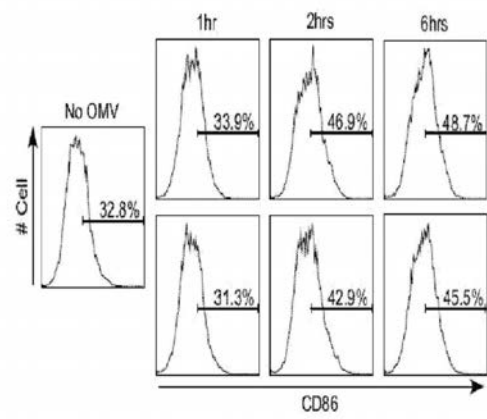
【図 8】



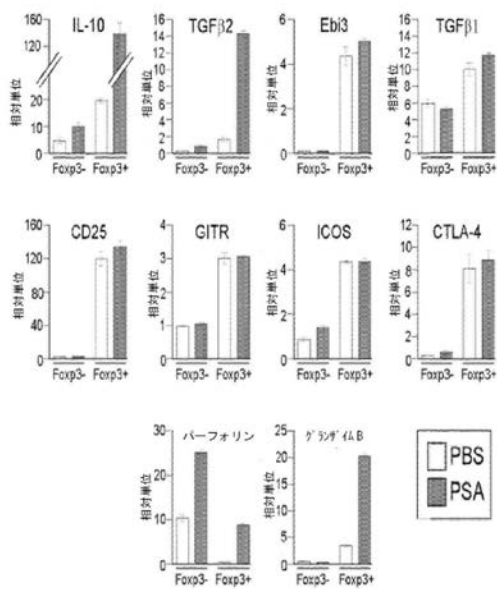
【図 9】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/02 (2006.01) A 6 1 P 37/02
A 6 1 K 9/10 (2006.01) A 6 1 K 9/10

(71)出願人 512259341
マスマニアン, サーキス, ケイ.
MAZMANIAN, Sarkis, K.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 01206 グレンデール, エメラルド アイル ドライブ
3532
3532 Emerald Isle Dr., Glendale, CA 01206 (US)

(74)代理人 100074332
弁理士 藤本 昇

(74)代理人 100114432
弁理士 中谷 寛昭

(74)代理人 100171310
弁理士 日東 伸二

(72)発明者 シェン, ユエ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91106 パサデナ, サウス カタリナ アベニュー 4
50, アpartment 305

(72)発明者 マスマニアン, サーキス, ケイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91326 ポーター ランチ, リヴルノ ウェイ 200
29

F ターム (参考) 4C076 AA16 AA95 CC07 CC16 EE56
4C084 AA19 NA05 NA13 NA14 ZA661 ZA662 ZB071 ZC751
4C086 AA01 AA02 EA20 MA02 MA03 MA04 MA05 MA21 NA05 NA13
NA14 ZA66 ZB07 ZC75
4C087 BC53 CA10 CA19 CA47 MA02 MA21 NA05 NA14 ZA66 ZB07

【外国語明細書】

**VEHICLE FOR DELIVERING A COMPOUND TO A MUCOUS MEMBRANE AND
RELATED COMPOSITIONS, METHODS AND SYSTEMS**

Statement of Government Grant

[0001] The U.S. Government has certain rights in this invention pursuant to Grant No. DK078938 awarded by the National Institutes of Health.

Field of the Invention

[0002] The present disclosure relates to a vehicle for delivering a compound to a mucous membrane compositions, methods and systems. In particular, the present disclosure relates to vehicles for delivering a compound to a mucous membrane of the digestive tract.

Background of the Invention

[0003] Effective delivery of a desired compound or substance to mucous membrane has been challenging in particular when referred to delivery to the digestive tract, and in particular to human gastrointestinal tract.

[0004] The human gastrointestinal tract harbors an extraordinary number of microbes (known as the gut microbiota) that have a profound effect on the development and function of the immune system. Of the innumerable species of bacteria that inhabit the gastrointestinal tract of mammals, Bacteroidetes are the most abundant Gram-negative bacterial phylum.

[0005] Identification of immunomodulatory microorganisms and compounds is of particular interest. In particular, *Bacteroides fragilis* is a human commensal microorganism that has been shown to have immunomodulatory properties. In particular, immunomodulatory properties of *Bacteroides fragilis* have been associated to Polysaccharide A (PSA) production by the bacterium.

[0006] Gram-negative bacteria have evolved intricate mechanisms to export bacterial products; type III secretion systems (T3SS), T4SS and T6SS, which assemble complex surface appendages that translocate bacterial effectors following direct contact with host cells. Another secretion strategy is outer membrane vesicles (OMVs) which are released from the surface of Gram-negative bacteria and deliver a suite of molecular cargo to distant target cells. Although many (if

not all) Gram-negative bacteria appear to produce OMVs, genome sequences of human commensal bacteria reveal a universal absence of T3SS, T4SS and T6SS.

[0007] However, identification of the mechanism and/or molecular triggers by which *B. fragilis* (or any commensal bacteria) delivers beneficial microbial molecules to the immune system and performs the immunomodulatory properties has been challenging.

[0008] Inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis represent serious disorders whereby uncontrolled intestinal inflammation leads to severe pathology of the digestive tract. IBD afflicts an estimated 1 million people in the United States. In addition to the medical and social burden of IBD, the incidences of disease are alarmingly increasing in 'Western' societies and current therapies are largely inadequate. Although the cause(s) for IBD remain enigmatic even after decades of research, defects in immune regulation toward intestinal bacteria appear to play an important role in disease³.

Brief Summary of the Invention

[0009] The details of one or more embodiments of the disclosure are set forth in the accompanying drawings and the description below. Other features, objects, and advantages will be apparent from the description and drawings, and from the claims.

[0010] We reveal herein that PSA is delivered to the host by outer membrane vesicles (OMVs), secretion structures that target bacterial molecules to host cells. OMVs containing PSA are internalized by dendritic cells of the host immune system. Following uptake of OMVs, PSA programs dendritic cells to induce the differentiation of regulatory T cells (Treg) that express Foxp3 and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10). Treg development by OMVs requires toll-like receptor 2 (TLR2) expression and IL-10 production by dendritic cells. Remarkably, purified OMVs direct the *in vitro* differentiation of functional Tregs with potent suppressive activity in a PSA dependent manner. Treatment of animals with OMVs containing PSA prevents experimental colitis and suppresses pro-inflammatory cytokine responses in the gut. These findings reveal that commensal bacteria provide beneficial microbial factors through vesicle secretion, a process that may be engineered into a novel approach for delivery of probiotic therapies for IBD.

[0011] In one embodiment, a pharmaceutical composition for delivering a compound to a mucous membrane is provided, comprising an outer membrane vesicle formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment, the vesicle comprising a PSA ligand; and a pharmaceutically appropriate carrier.

[0012] In another embodiment, a pharmaceutical composition for delivering a compound to a mucous membrane is provided, comprising an outer membrane vesicle formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment, the vesicle comprising a PSA ligand; and a pharmaceutically appropriate carrier, wherein the lipid membrane is derived from the outer membrane of *B. fragilis*.

[0013] In a more particular embodiment of the composition in paragraph [0011], the PSA ligand is L-PSA.

[0014] In yet another embodiment of the composition in paragraph [0011], the pharmaceutical composition further comprises one or more medicaments or treatments known to be useful in the treatment of inflammatory bowel disease.

[0015] In one embodiment, a method of treating an inflammatory disease or inflammation in an individual, comprising administering an effective amount of a composition comprising an outer membrane vesicle formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment, the vesicle comprising a PSA ligand.

[0016] In a particularized embodiment of the method in paragraph [0015], the inflammatory disease is inflammatory bowel disease.

[0017] In yet another embodiment, a vesicle for delivering a compound to a mucous membrane, comprising an outer membrane vesicle formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment, the vesicle comprising a PSA ligand.

[0018] In a more particularized embodiment of the vesicle in paragraph [0017], the vesicle further comprises a compound other than PSA.

[0019] In another embodiment, a method for directing the differentiation of functional Tregs with potent suppressive activity is provided, comprising an outer membrane vesicle formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment, the vesicle comprising a PSA ligand.

[0020] In a more particularized embodiment of the method in paragraph [0019], the Treg cells inhibit T cell proliferation and/or further suppresses immunity by reducing dendritic cell activation.

[0021] In another embodiment of the method in paragraph [0019], the method further comprises providing DCs for co-culture, wherein IL-10 is produced and production of IL-10 is dependent upon the presence of TLR2 expression on the DCs, in comparison to PSA activity alone (in the absence of OMVs) on the DC production of IL-10 where TLR2 expression on the DCs is not required.

[0022] In another embodiment, a method for identifying compounds that reduce inflammation or improve the symptoms of an inflammatory disease *in vitro* is provided, comprising providing a candidate compound and incubating the compound with Treg cells; further providing T cells, and then determining whether said Treg cells inhibit T cell activation.

[0023] In a more particularized embodiment of the method in paragraph [0022], the method further comprises dendritic cells and/or wherein the Treg cells express Foxp3.

[0024] In another embodiment, a bacterial substance for use as a medicament is provided comprising an outer membrane vesicle formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment, the vesicle comprising a PSA ligand.

[0025] In a more particularized embodiment of the medicament in paragraph [0024], the bacterial substance further comprises an excipient and/or one or more medicaments known to be useful in the treatment of inflammatory bowel disease.

[0026] In another embodiment, a bacterial substance for use in the treatment of inflammatory disease or inflammation is provided comprising an outer membrane vesicle formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment, the vesicle comprising a PSA ligand.

[0027] In a more particularized embodiment of the bacterial substance in paragraph [0026], the inflammatory disease is inflammatory bowel diseases.

[0028] In another embodiment, a composition for directing the differentiation of functional Treg with potent suppressive activity, comprising an outer membrane vesicle formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment, the vesicle comprising a PSA ligand.

[0029] In a more particularized embodiment of the composition in paragraph [0028], the Treg inhibit T cell activation and/or wherein the Treg cells express Foxp3.

[0030] Also provided herein, are methods and systems for screening microorganisms and related substances having immunomodulatory and, in particular, anti-inflammatory properties. In particular, provided herein are methods and systems that in several embodiments allow identification of bacterial substances that are able to induce in an individual an immunomodulatory response comparable to the one of *Bacteroides fragilis*.

[0031] According to another embodiment, a method is described for identifying a bacterial substance having immunomodulatory ability. The method comprises contacting a candidate bacterial substance with a T cell alone or in presence of an antigen presenting cell, and detecting expression of at least one of one or more anti inflammatory biomarkers selected from the group consisting of IL-10, Foxp3, TGF β 1, TGF β 2, Perforin and Granzyme B, and one or more inflammatory biomarkers selected from the group consisting of IFN γ , IFN α , IFN β , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17, or TNF α . The method further comprises determining an anti-inflammatory ability of the candidate bacterial substance through detection of an increase of the expression of the one or more anti-inflammatory biomarkers or a decrease of the expression of the one or more inflammatory biomarkers following the contacting.

[0032] According to yet another embodiment, a method is described for identifying a bacterial substance having immunomodulatory ability. The method comprises contacting a candidate bacterial substance with an antigen presenting cell, and incubating the antigen presenting cell with a T cell following the contacting. The method further comprises detecting expression of at least one of one or more anti-inflammatory biomarker selected from the group consisting of IL-10, Foxp3, TGF β 1, TGF β 2, Perforin and Granzyme B, and one or more inflammatory

biomarker selected from the group consisting of IFN γ , IFN α , IFN β , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17 or TNF α . The method further comprises determining an anti inflammatory ability of the candidate bacterial substance through detection of an increase of the expression of the one or more anti-inflammatory biomarkers or a decrease of the expression of the one or more inflammatory biomarkers following the incubating.

[0033] According to another aspect, a method is described for identifying a bacterial substance having immunomodulatory ability in animals. The method comprises treating a transgenic marker non-human animal with a candidate bacterial substance, the transgenic marker non-human animal genetically modified to express at least one of one or more labeled anti-inflammatory biomarkers selected from the group consisting of IL-10, Foxp3, TGF β 1, TGF β 2, Perforin and Granzyme B, and one or more labeled inflammatory biomarker selected from the group consisting of IFN γ , IFN α , IFN β , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17 or TNF α . The method further comprises detecting expression in the transgenic marker non-human animal of at least one of the one or more anti-inflammatory biomarkers or at least one of the inflammatory biomarkers following the treating and determining an anti-inflammatory ability of the candidate bacterial substance through detection of an increase of the expression of the one or more anti-inflammatory biomarkers or a decrease of the expression of the one or more inflammatory biomarkers following the treating.

[0034] According to another aspect a system for screening a bacterial substance is described. The system comprises at least two of a T cell, an antigen presenting cell and reagents for detection of at least one of one or more anti-inflammatory biomarkers selected from the group consisting of IL-10, Foxp3, TGF β 1, TGF β 2, Perforin and Granzyme B and one or more labeled inflammatory biomarker selected from the group consisting of IFN γ , IFN α , IFN β , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17 or TNF α , for simultaneous, combined or sequential use in a method to identify an anti-inflammatory bacterial substance herein described.

[0035] The methods and systems herein described can be used in connection with medical, pharmaceutical, veterinary applications as well as fundamental biological studies and various applications, identifiable by a skilled person upon reading of the present disclosure, wherein

investigating immunomodulatory ability and in particular anti-inflammatory ability of a substance is desirable.

Brief Description of the Drawings

[0036] The accompanying drawings, which are incorporated into and constitute a part of this specification, illustrate one or more embodiments of the present disclosure and, together with the detailed description and example sections, serve to explain the principles and implementations of the disclosure.

[0037] Figure 1 shows that outer membrane vesicles (OMVs) from *Bacteroides fragilis* contain PSA. Figure 1a shows OMVs produced by wild-type *B. fragilis* and *B. fragilis* Δ PSA that were detected by transmission electron microscopy of EDL (electron dense layer)-enriched *B. fragilis*. Figure 1b shows an immunoblot analysis of whole cell (WC) and outer membrane vesicles (OMV) extracts from wild-type and SA-mutant bacteria. Figure 1c shows immunogold labeling of purified OMVs, stained with anti-PSA and anti-IgG-colloidal gold conjugate (5nm), analyzed by electron microscopy. Figure 1d shows a glycoprotein staining of capsular polysaccharide preparations from whole cells and OMVs.

[0038] Figure 2 illustrates exemplary results showing that OMVs protect animals from experimental colitis and intestinal inflammation in a PSA-dependent manner. Figure 2a shows a diagram reporting weight loss in animal groups following the induction of TNBS colitis (day 0) measured as reduction from initial weight until day of sacrifice (day 4). All groups contained at least 4 animals, with error bars indicating standard error of the mean (SEM). Results are representative of 3 independent trials. p values determined by one-way ANOVA: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Figure 2b shows images of unmanipulated colons immediately following resection and quantification of length (graph) from vehicle treated (EtOH) and TNBS groups (n=4 animals/group). Error bars indicate SEM. Results are shown from 3 combined experiments performed independently. p values determined by one-way ANOVA: *** $p < 0.001$. NS: not significant. Figure 2c shows images from hematoxylin and eosin (H & E) stained colon sections representative of each treatment group. Figure 2d shows colitis scores from animals assigned by a blinded pathologist (G.W.L) according to a standard scoring system (ONLINE METHODS) (Scheiffele and Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. Current Protocols in

Immunology. 1.19.1-15.19.14) Each symbol represents an individual animal. Results are shown from 3 combined experiments performed independently. *** $p < 0.001$. NS: not significant. Figures 2e and f show diagrams illustrating cytokine transcript analysis by qRT-PCR from RNA recovered from whole colons (Figure 2e) or purified CD4⁺ T cell from mesenteric lymph nodes (Figure 2f). Error bars indicate SEM from 4 animals/group. Results are representative of 3 independent trials.

[0039] Figure 3 shows results indicating that PSA containing OMVs induce IL-10 production and Foxp3 expression from T cells co-cultured with treated DCs. Figure 3a shows flow cytometry (FC) analysis of OMV internalization by DCs. OMVs were labeled with FITC (Fluorescein isothiocyanate) and incubated with cultured DCs for various times (as indicated). Cells were stained with anti-CD11c. Percentages show CD11c⁺OMV⁺ populations. Figure 3b shows FC plots of DCs incubated with WT-OMVs and Δ PSA-OMVs for various times (as indicated) and stained with anti-CD11c and anti-MHCII. Percentages show MHCII⁺ populations among CD11c⁺ cells. Figure 3c shows ELISA analysis for IL-10 of culture supernatants from DCs or DC-T cell co-cultures, where DCs were pulsed with OMVs for 18 hours, washed and incubated with primary CD4⁺ T cells or not. Supernatants were collected at day 4 of culture. Media samples indicate DCs that were not pulsed with OMVs, but otherwise treated identically. Anti-CD3 was added to some samples to augment T cell responses. Error bars indicate SEM from triplicate samples. Results are representative of over 5 independent trials. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Figure 3d (left panel) shows ELISA analysis similar to Figure 3c, but also including DCs differentiated from IL-10^{-/-} animals. Error bars indicate SEM from triplicate samples. Results are representative of 3 independent trials. * $p < 0.05$. NS: not significant. Figure 3d (right panel) shows ELISA analysis similar to Figure 3c, but also including DCs differentiated from TLR2^{-/-} animals. SEA: staphylococcal enterotoxin A. Error bars indicate SEM from triplicate samples. Results are representative of 3 independent trials. * $p < 0.05$. NS: not significant. Figure 3e shows transcript levels of IL-10 (left) and Foxp3 (right) as determined by qRT-PCR of RNA received from purified T cell subsets following in vitro culture with DCs. Co-cultures were set up as in (c-e); on day 4, CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cell were purified by magnetic bead separation (>95% purity) and RNA extracted with RNeasy mini kit. Relative values were normalized to β -actin. Error bars indicate SEM from triplicate samples. Results are

representative of 3 independent trials. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. NS: not significant. Figure 3f shows co-cultures set up as in (c-e), but using CD4⁺ T cells from Foxp3-GFP mice. Following 4 days of culture with OMV pulsed DCs, cells were stained with anti-CD4 and Foxp3 detected by GFP expression using FC. Results are representative of 2 independent trials.

[0040] Figure 4 shows exemplary results indicating in vitro generation of Treg suppressive function by PSA-containing OMVs. Figure 4a shows FC histograms of IL-10 expression by CD4⁺ T cell subsets following 4 day co-culture with DCs treated with OMVs. Splenic CD4⁺ T cell were purified from IL-10-GFP mice, stained with anti-CD4 and anti-CD25 following co-culture, and IL-10 expression measured by GFP expression. Percentages show IL-10⁺ populations among CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ subsets. Results are representative of 3 independent trials. Figure 4b shows in vitro suppression of naïve responder cells by purified CD4⁺CD25⁺ T cells following co-culture with DCs treated with media (control), WT-OMVs and ΔPSA-OMVs. Cell proliferation was measured by FC of CFSE dilution. Treg:Teff ratios are indicated, and percentages show total proliferating cells. No Treg: CD4⁺CD25⁻ cells only. Results are representative of 2 independent trials. Figure 4c shows the quantification of percentage of CD4⁺ T cells in each proliferating peak (as is labeled as 1, 2, 3, 4, 5 in Fig4b). Results are shown from 3 combined experiments performed independently. *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$. NS: not significant.

[0041] Figure 5 shows wild-type *B. fragilis* and PSA deletional mutant *B. fragilis* produce similar amount of OMVs during in vitro culture. The amount of total protein recovered from each OMVs preparation normalized by OD600 of the culture at the time of harvest. Error bars indicate SEM. Result is shown from >10 combined experiments performed independently. p value determined by Student's t-test. NS: not significant.

[0042] Figure 6 shows Majority OMVs purified from wild-type *B. fragilis* contain PSA. Immunogold labeling of PSA on purified OMVs shows ~60% of WT-OMVs observe among random sampling of 10 areas (1μ m x 1μ m) of sample are associated with PSA, but none of ΔPSA-OMVs observed are stained positively for PSA. (Immunogold labeling of WT-OMVs with anti-IgG-gold only confirms the specificity of the labeling).

[0043] Figure 7 shows OMVs from wild-type or PSA deletional mutant *B. fragilis* show no significant difference in protein composition. Proteome mass spectrometry shows 100% overlap of the identified proteins (>1 unique peptide identified for each protein) between WT-OMVs and Δ PSA-OMVs. Among all of the identified proteins, we semi-quantitatively compared the amount of those relatively abundant proteins according to the number of unique peptides identified for each of them. Majority of them show no difference performed independently. Errors indicate SEM. p value determined by Student's t-test. **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; NS: not significant.

[0044] Figure 8 shows actin polymerization is required for OMV uptake by DCs. Flow cytometry analysis of OMV internalization by DCs pre-treated with Cytochalasin D. OMVs were labeled with FITC (Fluorescein isothiocyanate) and incubated with cultured DCs for various times (as indicated). Cells were stained with anti-CD11c. Percentages show CD11C+OMV+ populations.

[0045] Figure 9 shows WT-OMVs or Δ PSA-OMVs are internalized and localized in the cytoplasm of DCs. Fluorescent micrographs of OMV (WT or Δ PSA) internalization by DCs. OMVs were labeled with FITC (gray arrow) and incubated with cultured DCs for 2hrs. Cells were fixed and cell membrane was stained with Wheat Germ Agglutinin (WGA)-tetramethylrhodamine (black arrow). Scale bar: 7.5 μ m.

[0046] Figure 10 shows WT-OMVs and Δ PSA-OMVs upregulate co-stimulatory molecule for DC activation. FC plots of DCs incubated with WT-OMVs and Δ PSA-OMVs for various times (as indicated) and stained with anti-CD11c and anti-CD86. Percentages show CD86+ populations among CD11c+ cells.

[0047] Figure 11 shows PSA induced expression of biomarkers in an embodiment herein described. The data illustrated in each diagram are representative of three independent experiments. Light bars indicated cells derived from PBS treated mice and dark bars from PSA-treated mice.

Detailed Description of the Invention

[0048] Vehicles are herein described that are suitable for delivering a compound to a mucous membrane.

[0049] The terms “wild-type OMV”, “PSA containing OMVs”, and “PSA-OMV”, are herein used interchangeably.

[0050] The term “vehicle” in the sense of the present disclosure indicates a medium in which a compound is administered, and in which the compound is comprised, expressed, and/or displayed. Exemplary vehicles comprise any of various media acting usually as solvents, carriers, or binders for active ingredients, with particular reference to drugs.

[0051] The term “deliver” and “delivering” referred to a compound or substance in the sense of the present disclosure indicates passage of the compound or substance from an originating location to a target location, and in particular to a location formed by one or more cells, tissues, or organs of an individual. In particular, a compound is delivered in the sense of the present disclosure when the passage is performed so that at least one activity associated to the delivered compound can be exerted on the one or more cells, tissues or organs of the individual.

[0052] The term “compound” as used herein indicates any chemical substance comprised of one or more chemical elements and comprises various substances, molecules or component that include but are not limited to biomolecules and in particular drugs. The term “biomolecule” as used herein indicates a substance compound or component associated to a biological activity including but not limited to sugars, aminoacids, peptides proteins, oligonucleotides, polynucleotides, polypeptides, organic molecules, haptens, epitopes, biological cells, parts of biological cells, vitamins, hormones and the like. The term “drug” as used herein indicates substance that, when absorbed into the body of a living organism, alters normal bodily function. In particular, drugs in the sense of the present disclosure include a chemical substance used in the treatment, cure, prevention, or diagnosis of disease or used to otherwise enhance physical or mental well-being.

[0053] If PSA is for instance the above ‘compound’ then additional different compounds could also be delivered, in addition to PSA, by the vesicle.

[0054] The term “mucous membrane” in the sense of the present disclosure indicates a lining of mostly endodermal origin, covered in epithelium, which are involved in absorption and secretion. In an individual, mucous membranes line various body cavities that are exposed to the

external environment and internal organs. Mucous membranes are at several places continuous with skin: at the nostrils, the mouth, the lips, the eyelids, the ears, the genital area, and the anus.

[0055] In the compositions, and related methods and systems herein described, the vehicle is formed by a vesicle comprising one or more compounds to be delivered.

[0056] A “vesicle” in the sense of the present disclosure is a supramolecular complex formed by a membrane forming lipid and additional molecules assembled in an aqueous environment. In particular, in vesicles herein described the membrane forming lipids are arranged in a lipid layer enclosing an internal aqueous environment herein also indicated as cytosol.

[0057] The term “membrane forming lipid” or “amphipatic lipid” as used herein indicates a lipid possessing both hydrophilic and hydrophobic properties that in an aqueous environment assemble in a lipid layer structure that consists of either one or two opposing layers of amphipatic molecules known as polar lipid. Each polar lipid has a hydrophilic moiety, i.e., a polar group such as, a derivatized phosphate or a saccharide group, and a hydrophobic moiety, i.e., a long hydrocarbon chain. Exemplary polar lipids include phospholipids, sphingolipids, glycolipids, ether lipids, sterols and alkylphosphocholins. Amphipatic lipids include but are not limited to membrane lipids, i.e. amphipatic lipids that are constituents of a biological membrane, such as phospholipids like dimyrisoylphosphatidylcholine (DMPC) or Dioleoylphosphoethanolamine (DOPE) or dioleoylphosphatidylcholine (DOPC). In an embodiment, the membrane of the vesicle is formed by a lipid bilayer mimicking a plasma membrane (a biological membrane separating the interior of a cell from the outside environment, and enclose an aqueous environment) and in particular the outer membrane of *B. fragilis*.

[0058] Vesicles herein described also comprise a lipopolysaccharide (LPS) either associated with the membrane of the vesicle or comprised in the aqueous environment of the vesicle. The term “lipopolysaccharide” as used herein indicates large molecules consisting of a lipid and a polysaccharide joined by a covalent bond; they are found in the outer membrane of Gram-negative bacteria, act as endotoxins and elicit strong immune responses in animals. In particular, vesicles herein described comprise one or more LPS of *B. fragilis* which are identifiable by a skilled person.

[0059] Vesicles herein described can also comprise a peptidoglycan either associated with the membrane of the vesicle or comprised in the aqueous environment of the vesicle. The term “peptidoglycan” as used herein indicates a polymer consisting of sugars and amino acids that forms a mesh-like layer outside the plasma membrane of bacteria (Eubacteria, not Archaeobacteria), forming the cell wall. In particular, vesicles herein described comprise one or more peptidoglycans of *B. fragilis* which are identifiable by a skilled person.

[0060] Additional compounds that can be comprised in the vesicles, comprise membrane proteins, membrane lipids carbohydrates and nucleic acids, and in particular, membrane proteins, membrane lipids carbohydrates and nucleic acids of *B. fragilis*.

[0061] Exemplary vesicles in the sense of the present disclosure comprise small membrane-enclosed sacs that can store or transport substances. Vesicles can form naturally because of the properties of the membrane forming lipid, or they may be prepared from bacterial membranes. Most vesicles have specialized functions depending on what materials they contain on the membrane and/or the aqueous environment.

[0062] In an embodiment, the vesicles herein described are formed by portions of membranes of bacteria. In an embodiment, vesicles are formed by Outer Membrane Vesicles (OMVs) of the bacteria.

[0063] In an embodiment, the vesicles herein described are formed by portions of membranes of *B. fragilis* and in particular from the OMV of *B. fragilis* as exemplified in the Examples section.

[0064] In an embodiment, the delivered compound can be a drug, candidate drug, a supplement (a product taken orally that contains one or more ingredients (as vitamins or amino acids) that are intended to supplement one's diet and are not considered food) or any other compound whose delivery to the mucous membrane is desired. One or more of those compounds can be include in the vesicles herein described in a suitable dosage that can be determined by the skilled person in view of the specific compound to be delivered.

[0065] In an embodiment, the compound comprises one or more zwitterionic polysaccharide and in particular Polysaccharide A.

[0066] The term “zwitterionic polysaccharide” as used herein indicates synthetic or natural polymers comprising one or more monosaccharides joined together by glycosidic bonds, and including at least one positively charged moiety and at least one negatively charged moiety. Zwitterionic polysaccharides include but are not limited to polymers of any length, from a mono- or di- saccharide polymer to polymers including hundreds or thousands of monosaccharides. In some embodiments, a zwitterionic polysaccharide can include repeating units wherein each repeating unit includes from two to ten monosaccharides, a positively charged moiety (e.g. an free positively charged amino moiety) and a negatively charged moiety (such as sulfonate, sulfate, phosphate and phosphonate). In some embodiment ZPs can have a molecular weight comprised between 500 Da and 2,000,000 Da. In some embodiments, the ZPs can have a molecular weight comprised between 200 and 2500. Exemplary ZPS include but are not limited to PSA and PSB from *Bacteroides Fragilis*, CP5/CD8 from *Staphylococcus aureus*, and Sp1/CP1 from *Streptococcus pneumonia*. Zwitterionic polysaccharides can be isolated from natural sources, and in particular from bacterial sources, e.g. by purification. Zwitterionic polysaccharides can also be produced by chemical or biochemical methods, as well as by recombinant microorganism technologies all identifiable by a skilled person. Thus, those methods and technologies will not be further described herein in detail.

[0067] The wording “polysaccharide A” (or PSA, or PSA ligand) as used herein indicates a molecule produced by the PSA locus of *Bacteroides fragilis* and derivatives thereof which include but are not limited to polymers of the repeating unit $\{\rightarrow 3\} \alpha\text{-d-AAT Galp}(1\rightarrow 4)\text{-}[\beta\text{-d-Galf}(1\rightarrow 3)] \alpha\text{-d-GalpNAc}(1\rightarrow 3)\text{-}[4,6\text{-pyruvate}] \text{-}\beta\text{-d-Galp}(1\rightarrow)$, where AATGal is acetamido-amino-2,4,6-trideoxygalactose, and the galactopyranosyl residue is modified by a pyruvate substituent spanning O-4 and O-6. The term “derivative” as used herein with reference to a first polysaccharide (e.g., PSA), indicates a second polysaccharide that is structurally related to the first polysaccharide and is derivable from the first polysaccharide by a modification that introduces a feature that is not present in the first polysaccharide while retaining functional properties of the first polysaccharide. Accordingly, a derivative polysaccharide of PSA, usually differs from the original polysaccharide by modification of the repeating units or of the saccharidic component of one or more of the repeating units that might or might not be associated with an additional function not present in the original polysaccharide. A derivative

polysaccharide of PSA retains however one or more functional activities that are herein described in connection with PSA in association with the anti-inflammatory activity of PSA.

[0068] In one embodiment, low molecular weight PSA (L- PSA) is from 70kDa to 200kDa and high molecular weight PSA (H-PSA) is above 200kDa.

[0069] In an embodiment, the mucous membrane is a mucous membrane of the digestive tract of an individual, and in particular intestinal mucosa, gastric mucosa, esophageal mucosa, buccal mucosa, oral mucosa and/or buccal mucosa.

[0070] In an embodiment, the vesicles herein described can be used in connection with procedures and applications such as the ones described in US Provisional Application S/N 61/321,527 herein enclosed as Exhibit A which forms part of the present disclosure and is incorporated herein by reference in its entirety.

[0071] In an embodiment, the vesicles herein described can be used in connection with methods and systems such as the ones described in US Patent Application S/N 12/766787 herein enclosed as Exhibit B which forms part of the present disclosure and is incorporated herein by reference in its entirety.

[0072] In an embodiment, vesicles herein described can be used in a method to deliver the compound to a mucous membrane of an individual. In particular, the method comprises contacting a vesicle comprising the compound with the mucous membrane for a time and under condition to allow contact of the substance with the membrane. In the method, the vesicle is formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment and the compound to be delivered is comprised in the aqueous environment of the vesicle.

[0073] In another embodiment, a composition or pharmaceutical composition comprising of the vesicle or OMV is contacted with the mucous membrane for a time and under condition to allow contact of the substance with the membrane.

[0074] The term “contacting” or “incubating” as used herein indicates actions directed to creation of a spatial relationship between two items provided for a time and under condition such that at least one of the reciprocal or non reciprocal action or influence between the two items can

be exerted. In particular, incubation can be performed between a vesicle and a mucous membrane and can result in a direct contact and/or interaction between the vesicle and the mucous membrane or can result in a modification of the mucous membrane following an indirect action of the vesicle (e.g. following activation or modification of another substance which directly interacts with the membrane).

[0075] Suitable conditions for performing the contacting or incubation are identifiable by a skilled person upon reading of the present disclosure in view of the compound, the mucous membrane, and the experimental design.

[0076] In an embodiment, vesicles herein described can be comprised in a composition for delivering a compound to a mucous membrane. The composition comprises one or more vesicles herein described optionally in combination with an additional vehicle acting as a solvent, carrier, binder or diluents for the vesicles.

[0077] The term “condition” – when referring to the status of an animal or human - as used herein indicates a usually the physical status of the body of an individual, as a whole or of one or more of its parts, that does not conform to a physical status of the individual, as a whole or of one or more of its parts, that is associated with a state of complete physical, mental and possibly social well-being. Conditions herein described include but are not limited disorders and diseases wherein the term “disorder” indicates a condition of the living individual that is associated to a functional abnormality of the body or of any of its parts, and the term “disease” indicates a condition of the living individual that impairs normal functioning of the body or of any of its parts and is typically manifested by distinguishing signs and symptoms. Exemplary conditions include but are not limited to injuries, disabilities, disorders (including mental and physical disorders), syndromes, infections, deviant behaviors of the individual and atypical variations of structure and functions of the body of an individual or parts thereof.

[0078] In particular, in embodiments where the compound is used as an anti-inflammatory compound, the condition can be any condition associated to an inflammation or inflammatory response; or a condition described as an inflammatory disease itself. The wording “associated to” as used herein with reference to two items indicates a relation between the two items such that

the occurrence of a first item is accompanied by the occurrence of the second item, which includes but is not limited to a cause-effect relation and sign/symptoms- disease relation.

[0079] Conditions associated with an inflammation (or inflammatory diseases) in humans include but are not limited to inflammatory bowel disease, including but not limited to Crohn's disease and ulcerative colitis, asthma, dermatitis, arthritis, myasthenia gravis, Grave's disease, multiple sclerosis (MS), and psoriasis. A person of skill in the art would be able to identify such subjects suffering from the aforementioned diseases using the appropriate clinical criteria.

[0080] In one embodiment, compositions, pharmaceutical composition comprising OMVs containing PSA can be used for the prevention of inflammatory diseases, such as, but not limited to, inflammatory bowel disease (including Crohn's disease and ulcerative colitis), asthma, dermatitis, arthritis, myasthenia gravis, Grave's disease, multiple sclerosis, and psoriasis.

[0081] The term "treatment" or "treated" as used herein indicates any activity whether part of a medical care, or not, for or deals with a condition medically or surgically in animals or humans. Such treatments can be administered by either medical or non-medical personnel.

[0082] In some embodiments, where the composition is to be administered to an individual the composition can be a pharmaceutical composition, and comprise one or more vesicles each comprising PSA. In a more particular embodiment, the pharmaceutical composition can comprise of one or more vesicles each comprising PSA and one or more of another compound, and/or a pharmaceutically acceptable or appropriate carrier/vehicle.

[0083] In another embodiment, the above pharmaceutical composition, comprising one or more vesicles each comprising PSA and one or more of another compound, and/or a pharmaceutically acceptable or appropriate carrier/vehicle, wherein an individual/subject with an inflammatory condition or inflammation given this composition shows an improvement.

[0084] In some embodiments, the vesicles herein described can be included in pharmaceutical compositions together with an excipient or diluent. In particular, in some embodiments, pharmaceutical compositions contain vesicles herein described, in combination with one or more

compatible and pharmaceutically acceptable vehicle, and in particular with pharmaceutically acceptable diluents or excipients.

[0085] The term “excipient” as used herein indicates an inactive substance used as a pharmaceutically acceptable or appropriate carrier for the active ingredients of a medication. Suitable excipients for the pharmaceutical compositions herein disclosed include any substance that enhances the ability of the body of an individual to absorb vesicles herein described. Suitable excipients also include any substance that can be used to bulk up formulations with vesicles herein described to allow for convenient and accurate dosage. In addition to their use in the single-dosage quantity, excipients can be used in the manufacturing process to aid in the handling of vesicles herein described. Depending on the route of administration, and form of medication, different excipients may be used. Exemplary excipients include but are not limited to antiadherents, binders, coatings disintegrants, fillers, flavors (such as sweeteners) and colors, glidants, lubricants, preservatives, sorbents.

[0086] Pharmaceutically acceptable or appropriate carriers can be, but not limited to, organic or inorganic, solid or liquid excipient which is suitable for the selected mode of application such as oral application or injection, and administered in the form of a conventional pharmaceutical preparation. Such preparation includes solid such as tablets, granules, powders, capsules, and liquid such as solution, emulsion, suspension and the like. Said carrier includes starch, lactose, glucose, sucrose, dextrine, cellulose, paraffin, fatty acid glyceride, water, alcohol, gum arabic and the like. If necessary, auxiliary, stabilizer, emulsifier, lubricant, binder, pH adjustor controller, isotonic agent and other conventional additives may be added.

[0087] The pharmaceutically acceptable or appropriate carrier may well include other compounds known to be beneficial to an impaired situation of the gut, (e.g., antioxidants, such as Vitamin C, Vitamin E, Selenium or Zinc); or a food composition. The food composition can be, but is not limited to, milk, yoghurt, curd, cheese, fermented milks, milk based fermented products, ice-creams, fermented cereal based products, milk based powders, infant formulae, tablets, liquid bacterial suspensions, dried oral supplement, or wet oral supplement.

[0088] The term “diluent” as used herein indicates a diluting agent which is issued to dilute or carry an active ingredient of a composition. Suitable diluent include any substance that can decrease the viscosity of a medicinal preparation.

[0089] In certain embodiments, compositions, compounds, and, in particular, pharmaceutical compositions can be formulated for enteral administration including, but not limited to, i) by mouth (orally) as tablets, capsules, or drops; ii) by gastric feeding tube, duodenal feeding tube, or gastrostomy; and enteral nutrition; and iii) rectally as a suppository.

[0090] In some embodiments, vesicles herein described comprising PSA can be used in a method of treating or preventing a condition in an individual.

[0091] The method comprises administering to the individual an effective amount of the composition or pharmaceutical composition. The term “individual” as used herein includes a single biological organism wherein inflammation can occur including but not limited to animals and in particular higher animals and in particular vertebrates such as mammals and in particular human beings.

[0092] The “effective amount”, “amount effective to,” or “amount of X effective to” refers to an amount of the compound, composition or pharmaceutical composition that is effective to treat, relieve, reduce, or improve to some extent one or more of the symptoms of the disease in need of treatment, or to retard initiation of clinical markers or symptoms of a disease in need of prevention, when the compound is administered. Thus, for example an effective amount refers to an amount of the compound/composition/pharmaceutical ingredient which exhibits the ‘improved’ effects, as noted below.

[0093] The “effective amount” may be empirically determined by experimenting with the compounds concerned in known *in vivo* and *in vitro* model systems for a disease in need of treatment. An effective amount will vary according to the weight, sex, age and medical history of the individual, as well as the severity of the patient's condition(s), the type of disease(s), mode of administration, and the like. An effective amount may be readily determined using routine experimentation, e.g., by titration (administration of increasing dosages until an effective dosage is found) and/or by reference to amounts that were effective for prior patients. Generally, the

effective amount of the present invention will be administered in dosages ranging between about 0.1 mg/kg and about 20 mg/kg of the patient's body-weight.

[0094] As used herein, the phrase "prophylactically effective amount" includes the amount of the compound/composition/pharmaceutical composition which is sufficient to result in the prevention or reduction of the development, recurrence or onset of one or more symptoms associated with a disorder (or to enhance or improve the prophylactic effect(s) of another therapy (e.g., another prophylactic agent).

[0095] It is further contemplated that the compound/ composition/pharmaceutical composition of the present invention can be used with one or more known medicaments known to be useful in the treatment or prevention of inflammatory diseases, either separately or in combination.

[0096] For example the compound/ composition/pharmaceutical composition of the present invention can be combined with one or a combination of medicaments/treatments known to be useful in the treatment of IBD such as, but not limited to, sulfasalazine (Azulfadine), mesalamine (Asacol, Pentasa), immunosuppressants (Imuran, 6-MP, cyclosporine); methotrexate, TNF-alpha inhibitors (Remicade and Humira); and corticosteroids (Entocort and prednisone). Other treatments (experimental) for ulcerative colitis, include aloe vera, butyrate, boswellia, probiotics, antibiotics, immunosuppressive therapy, and nicotine.

[0097] For example the compound/ composition/pharmaceutical composition of the present invention can be combined with one or a combination of medicaments/treatments known to be useful in the treatment of MS such as, but not limited to, Avonex®, Betaseron®, and Copaxone®. Rebif®; Extavia® Novantrone® (mitoxantrone); Tysabri® (natalizumab), and Gilenya® (fingolimod). Other drugs include intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy, methotrexate, azathioprine (Imuran®), and cyclophosphamide (Cytosan®); corticosteroids; cytoxan® (cyclophosphamide); Imuran® (azathioprine); methotrexate; plasma exchange; pulse solu-medrol® (IV methylprednisolone); prednisone; Decadron® (dexamethasone); Medrol® (oral methylprednisolone); Plasmapheresis (plasma exchange); intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy.

[0098] In another embodiment, it is possible that these other medicaments could be expressed or delivered within the OMVs themselves.

[0099] As used herein, "improved," "improvement," and other grammatical variants, includes any beneficial change in the individual/subject resulting from a treatment. A beneficial change is any way in which a patient's condition is better than it would have been in the absence of the treatment. "Improved" includes, but is not limited to, prevention of an undesired condition, slowing the rate at which a condition worsens, delaying the development of an undesired condition, restoration to an essentially normal condition; causing the patient to go into remission more often or remain in remission for longer periods than without treatment (i.e. where the degree of inflammation in the patient is less (or absent); or the person usually is without symptoms); reduction in the number and/or severity of relapses; and reduction in the development of new areas of inflammation as seen on magnetic resonance imaging (MRI) scans.

[00100] More particularly, improvement in IBD encompasses a reduction in the severity or duration in any one or more clinical IBD symptoms, such as, but not limited to, Abdominal cramps and pain; Bloody stool; diarrhea; urgency to have a bowel movement; fever; loss of appetite; weight loss; mucus in the stool; ulceration of the large intestine; and anemia (due to blood loss). For example improvement in MS encompasses a reduction in the severity or duration in any one or more clinical MS symptoms, such as, but not limited to fatigue; visual disorders; numbness; dizziness/vertigo; bladder and bowel dysfunction; weakness; tremor; impaired mobility; sexual dysfunction; slurred speech; spasticity (leg stiffness); swallowing disorders; chronic aching pain; depression; mild cognitive and memory difficulties

[00101] Moreover, improved," "improvement," and other grammatical variants includes any change resulting in the reduction in the severity, duration, and/or risk of developing complications of the inflammatory disease. For IBD, 'improved' could mean for example, a reduced risk of the IBD subject developing profuse bleeding from the ulcers; perforation (rupture) of the bowel; strictures and obstruction; fistulae (abnormal passage) and perianal disease; toxic megacolon (acute nonobstructive dilation of the colon); and malignancy (for example, colon cancer).

[00102] In an embodiment, at least two of the membrane forming lipid, vesicles, PSA and one or more additional compounds to be delivered can be comprised in a system possibly together with other reagents suitable to be used in the methods herein described.

[00103] The systems can be provided in the form of kits of parts. In a kit of parts, the membrane forming lipid, vesicles, PSA, addition compounds, medicaments, and other the reagents can be included in one or more compositions, or each lipid, vesicles, PSA, addition compounds, medicaments compound and reagent can be in a composition together with a suitable vehicle.

[00104] Additional components can include labeled molecules and in particular, labeled capture agents specific for an anti-inflammatory or an inflammatory biomarker or a molecule associated to the expression thereof, a microfluidic chip, reference standards, and additional components identifiable by a skilled person upon reading of the present disclosure.

[00105] The term “capture agent” as used herein indicates a compound that can specifically bind to a target. The wording “specific” “specifically” or “specificity” as used herein with reference to the binding of a first molecule to second molecule refers to the recognition, contact and formation of a stable complex between the first molecule and the second molecule, together with substantially less to no recognition, contact and formation of a stable complex between each of the first molecule and the second molecule with other molecules that may be present. Exemplary specific bindings are antibody-antigen interaction, cellular receptor-ligand interactions, polynucleotide hybridization, enzyme substrate interactions etc. By “stable complex” is meant a complex that is detectable and does not require any arbitrary level of stability, although greater stability is generally preferred. In some embodiments, the kit can comprise labeled polynucleotides or labeled antibodies.

[00106] The components of the kit can be provided, with suitable instructions and other necessary reagents, in order to perform the methods here described. The kit will normally contain the compositions in separate containers. Instructions, for example written or audio instructions, on paper or electronic support such as tapes or CD-ROMs, for carrying out the assay, will

usually be included in the kit. The kit can also contain, depending on the particular method used, other packaged reagents and materials (i.e. wash buffers and the like).

[00107] The term “immunomodulatory” as used herein indicates the ability to promote a state associated with absence of an inflammatory response. Particular immunomodulatory properties comprise anti-inflammatory properties, wherein the term anti-inflammatory refers to the property of a substance or treatment that prevents or reduces inflammation.

[00108] The term “inflammation”, “inflammatory state” or “inflammatory response” as used herein indicate the complex biological response of vascular tissues of an individual to harmful stimuli, such as pathogens, damaged cells, or irritants, and includes secretion of cytokines and more particularly of pro-inflammatory cytokine, i.e. cytokines which are produced predominantly by activated immune cells such as microglia and are involved in the amplification of inflammatory reactions. Exemplary pro-inflammatory cytokines include but are not limited to IL-1, IL-6, TNF- α , IL-17, IL21, and IL23. Exemplary inflammations include acute inflammation and chronic inflammation. The wording “acute inflammation” as used herein indicates a short-term process characterized by the classic signs of inflammation (swelling, redness, pain, heat, and loss of function) due to the infiltration of the tissues by plasma and leukocytes. An acute inflammation typically occurs as long as the injurious stimulus is present and ceases once the stimulus has been removed, broken down, or walled off by scarring (fibrosis). The wording “chronic inflammation” as used herein indicates a condition characterized by concurrent active inflammation, tissue destruction, and attempts at repair. Chronic inflammation is not characterized by the classic signs of acute inflammation listed above. Instead, chronically inflamed tissue is characterized by the infiltration of mononuclear immune cells (monocytes, macrophages, lymphocytes, and plasma cells), tissue destruction, and attempts at healing, which include angiogenesis and fibrosis.

[00109] The term “substance” as used herein indicates a matter of particular or definite chemical constitution. The term “bacterial substance” indicates matter of bacterial origin such as, a live bacteria, dead bacteria, and in particular heat- killed bacteria, bacterial extracts, purified molecules from bacteria, a combination of molecules purified from bacteria, or vesicles containing one molecule or a combination of molecules purified from bacteria or purified

vesicles from bacteria. In particular, bacterial substance can be formed by, or comprises, the outer membrane vesicles (OMVs) which are vesicles released from the surface of bacteria and deliver a suite of molecular cargo to distant target cells. Even more particularly, the bacterial substance can be formed by, or comprises, the OMVs of *B. Fragilis*, and more particularly, such OMVs are further comprised of PSA.

[00110] Bacterial substance comprises substance derived from a same bacteria and substance derived from two or more different bacteria.

[00111] The term “bacteria” as used herein indicates large group of unicellular, prokaryote, microorganisms, typically of a few micrometers in length, and having a wide range of shapes. In particular, bacteria in the sense of the present disclosure comprise bacteria of the human flora, i.e. the assemblage of microorganisms that reside on the surface and in human tissues and bodily fluids such as deep layers of skin, in saliva, oral or vaginal mucosa, and in the gastrointestinal tracts. Bacterial flora comprises gut flora (bacteria detectable in the digestive tract of humans) vaginal flora (bacteria detectable in the fibromuscular tubular tract leading from the uterus to the exterior of the body in female humans) and skin flora (bacteria detectable in human skin). More specifically, bacteria in the sense of the present disclosure can be formed by one or more bacteroidetes of the gut flora and in particular one or more bacteroides, a genus of Gram- negative, non endospore forming anaerobes bacillus bacteria, symbiotic with humans and identifiable by a skilled person. A representative bacteroides is *B. fragilis*.

[00112] The term “transgenic marker non-human animal” as used herein refers to an animal that contains non-native, genetic material that has been transferred naturally or by any of a number of genetic engineering techniques. Such non-native, genetic material (or transgene) may act as a “biomarker” (as defined herein) and/or retain the ability to produce RNA or protein in the non-human animal.

[00113] The term “T cell” as used herein indicates a sub-group of lymphocytes (a type of white blood cell or leukocyte) including different cell types identifiable by a skilled person. T-helper cell according to the present disclosure and include effector T_h cells (such as Th1, Th2 and Th17)- i.e. Th cells that secrete cytokines, proteins or peptides that stimulate or interact

with other leukocytes, including T_h cells - and suppressor Th cells (such as Treg) i.e. Th cells that suppress activation of the immune system and thereby maintain immune system homeostasis and tolerance to self-antigens.

[00114] The term “antigen presenting cell” as used herein indicates a cell that displays foreign antigen complex with major histocompatibility complex (MHC) on its surface. In particular, antigen presenting cell comprise dendritic cell, macrophage, B cells and additional cells identifiable by a skilled person.

[00115] The term “contacting” or “incubating” as used herein indicates actions directed to creation of a spatial relationship between two items provided for a time and under condition such that at least one of the reciprocal or non reciprocal action or influence between the two items can be exerted. In particular, incubation can be performed between a bacterial substance and a cell and can result in a direct contact and/or interaction between the bacterial substance and the cell or can result in a modification of the cell following an indirect action of the bacterial substance (e.g. following activation or modification of another substance which directly interacts with the cell).

[00116] The ‘treating’, or ‘treatment’ can be performed by administering the bacterial substance, compound, composition, or pharmaceutical composition by topical or systemic administration. Systemic administration includes enteral administration (e.g. oral administration, administration by gastric feeding tube, administration by duodenal feeding tube, gastrostomy, enteral nutrition, and rectal administration) and parenteral administration (e.g. intravenous administration, intra-arterial administration, intramuscular administration, subcutaneous administration, intradermal, administration, intraperitoneal administration, and intravesical infusion. Topical administration include but is not limited to epicutaneous administration, inhalational administration (e.g. in asthma medications), enema, eye drops (e.g. onto the conjunctiva), ear drops, intranasal route (e.g. decongestant nasal sprays), and vaginal administration.

[00117] Similarly, the amount of pharmaceutical composition given to individuals suffering from an inflammatory disease such as, but not limited to, Crohn's disease and

ulcerative colitis, asthma, dermatitis, arthritis, myasthenia gravis, Grave's disease, multiple sclerosis, or psoriasis, can be determined by the skilled person experimentally.

[00118] Exemplary incubation of an antigen presenting cell with a T cell can be performed *in vitro* by mixing a cell culture comprising the antigen presenting cell with a cell culture comprising the T cell, by adding a purified antigen presenting cell to a culture of T cells, or by adding a purified T cell to a culture of antigen presenting cells. Additional exemplary incubation between a T cell and an antigen presenting cell *in vivo* comprise transplanting antigen presenting cell in a into a tissue of an individual, the tissue comprising T cell, or transplanting T cell into a tissue of an individual the tissue comprising antigen presenting cell. In an embodiment, the individual is a transgenic animal other than humans genetically modified to express a labeled inflammatory or an anti inflammatory biomarker.

[00119] Additional procedures and techniques suitable for performing contacting between a substance and a T cell or antigen presenting cell and incubation between an antigen presenting cell and a T cell *in vitro* or *in vivo* can be identified by a skilled person upon reading of the present disclosure.

[00120] In methods and systems herein described, detection of the expression of an inflammatory or an anti-inflammatory biomarker can be performed *in vitro* and *in vivo* by techniques identifiable by a skilled person which comprise use of labeled molecules, including labeled biomarkers or labeled molecule specific for the biomarker or molecule associated thereto.

[00121] The term “detect” or “detection” as used herein indicates the determination of the existence, presence or fact of an analyte or related signal in a limited portion of space, including but not limited to a sample, a reaction mixture, a molecular complex and a substrate. A detection is “quantitative” when it refers, relates to, or involves the measurement of quantity or amount of the analyte or related signal (also referred as quantitation), which includes but is not limited to any analysis designed to determine the amounts or proportions of the analyte or related signal. A detection is “qualitative” when it refers, relates to, or involves identification of a

quality or kind of the analyte or related signal in terms of relative abundance to another analyte or related signal, which is not quantified.

[00122] The terms “label” and “labeled molecule” or a used herein as a component of a complex or molecule referring to a molecule capable of detection, including but not limited to radioactive isotopes, fluorophores, chemiluminescent dyes, chromophores, enzymes, enzymes substrates, enzyme cofactors, enzyme inhibitors, dyes, metal ions, nanoparticles, metal sols, ligands (such as biotin, avidin, streptavidin or haptens) and the like. The term “fluorophore” refers to a substance or a portion thereof which is capable of exhibiting fluorescence in a detectable image. As a consequence, the wording “signal” or “labeling signal” as used herein indicates the signal emitted from the label that allows detection of the label, including but not limited to radioactivity, fluorescence, chemiluminescence, production of a compound in outcome of an enzymatic reaction and the like.

[00123] Detection can be performed by detecting levels of expression of the biomarker, a precursor or analog thereof, and/or of an analyte associated thereto. The wording “associated to” as used herein with reference to two items indicates a relation between the two items such that the occurrence of a first item is accompanied by the occurrence of the second item, which includes but is not limited to a cause-effect relation and sign/symptoms-disease relation. In particular, the detection can be performed qualitatively or quantitatively and can involve detection of molecules such as RNA, protein, their precursors, differing types (i.e. mRNA, tRNA, and rRNA) and/or degradation products, and/or detection or measurable properties associated thereof. Techniques and procedures to perform detection are identifiable by a skilled person upon reading of the present disclosure.

[00124] Exemplary methods for detection of a biomarker expression comprise methods known to a skilled person including but not limited to ELISA, Q-PCR and intracellular cytokine staining detected by FACS. In some embodiments, expression of a biomarker can be detected via fluorescent based readouts on a cell culture performed using an antibody specific for the biomarker or molecule associated thereto, labeled with fluorophore, which includes, but not exhaustively, small molecular dyes, protein chromophores, quantum dots, and gold nanoparticles. In an embodiment expression of a biomarker can be detected by detecting

expression of a label under the transcriptional control of a biomarker promoter *in vivo* (e.g., in an animal tissue) or *in vitro* (e.g. in a cell culture). In some of those embodiments the biomarker can be in particular IL-10 or Foxp3. Additional techniques are identifiable by a skilled person upon reading of the present disclosure and will not be further discussed in detail.

[00125] In methods and systems herein described an anti-inflammatory ability of the candidate bacterial substance can be determined through detection of an increase of expression of the one or more anti-inflammatory biomarkers or a decrease of the expression of the one or more inflammatory biomarkers following the contacting and/or the incubating. Determining increase and/or decrease of a biomarker expression can be performed by comparing the detected expression of the biomarker following the contacting and/or incubating, with a predetermined detected expression of the same biomarker in absence of contacting and/or incubating. Determining increase and/or decrease of a biomarker expression can be performed by comparing the detected expression marker with the detected expression of the same biomarker in a control cell in absence of contacting and/or incubating.

[00126] Reference is made to the Examples section wherein increase in expression of the anti-inflammatory biomarkers IL-10, Foxp3, TGF β 1, TGF- β 2, perforin and granzyme B and decrease of expression in inflammatory biomarkers TNF- α or IL-17A are associated with the mechanism of action of *Bacteroides fragilis* supporting association between the above expression pattern and the biological activities of *Bacteroides fragilis*, with particular reference to anti-inflammatory abilities. The anti-inflammatory abilities of *Bacteroides fragilis* are identifiable by a skilled person and described in various publications and patent including but not limited to US05679654, US07083777, US2004092433, WO07092451 and WO2009062132, each of which is herein incorporated by reference in its entirety. A skilled person will understand that the specific anti-inflammatory ability of the candidate bacterial substance will be possibly determined based on further determination of the specific set of cytokines produced and cells activated by the candidate bacterial substance identified by methods herein described.

[00127] In an embodiment, detection of an increase in expression of the anti-inflammatory or detection of a decrease in expression of an inflammatory biomarker indicates the ability of a substance to induce anti-inflammatory molecules such as IL-10,

Foxp3, TGF β 1 or TGF- β 2, perforin and granzyme B or a combination thereof, or suppress inflammatory cytokines such as IFN γ , IFN α , IFN α , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17 or TNF α or a combination thereof.

[00128] In an embodiment, the method comprises contacting a candidate bacterial substance in vitro and/or in vivo with a T cell alone or in presence of an antigen presenting cell, and detecting expression of at least one anti inflammatory biomarker selected from the group consisting of IL-10, Foxp3, TGF β 1, TGF β 2, perforin and granzyme B, wherein an increase of the expression of the anti-inflammatory biomarker following the contacting indicates an anti inflammatory ability of the candidate bacterial substance. In particular, in some of those embodiments, expression of IL-10, TGF β 1, TGF β 2, perforin and/or granzyme B can be performed on Foxp3 expressing T cell, and more particularly Foxp3 expressing Treg cell.

[00129] In an embodiment, the method comprises contacting a candidate bacterial substance with an antigen presenting cell, and incubating the antigen presenting cell with a T cell following the contacting. The method further comprises detecting the expression of at least one anti-inflammatory biomarker selected from the group consisting of Foxp3, IL-10, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 2, Perforin and Granzyme B, wherein detection of an increase of the biomarker expression following the incubating indicates an anti-inflammatory ability of the candidate substance. In particular, in some of those embodiments, expression of IL-10, perforin and/or granzyme B can be performed on Foxp3 expressing T cell, and more particularly Foxp3 expressing Treg cell.

[00130] In an embodiment, the method comprises contacting a candidate bacterial substance with a T cell alone or in presence of an antigen presenting cell, and detecting expression of at least one inflammatory biomarker selected from the group consisting of IL-17 and TNF α , wherein a decrease of the expression of the inflammatory biomarker following the contacting indicates an anti-inflammatory ability of the candidate bacterial substance.

[00131] In an embodiment, the method comprises contacting a candidate bacterial substance with an antigen presenting cell, and incubating the antigen presenting cell with a T cell following the contacting. The method further comprises detecting the expression of at least one

inflammatory biomarker selected from the group consisting of IL-17 and TNF α , wherein a decrease of the expression of the inflammatory biomarker following the contacting indicates an anti-inflammatory ability of the candidate bacterial substance.

[00132] In an embodiment, the candidate bacterial substance comprises bacteria in a pure pool. In other embodiments, the candidate bacterial substance comprises bacteria in a mixed pool. The bacteria can be live bacteria, dead bacteria, extracts or products isolated from bacteria, or combinations of each. The bacteria may also be from laboratory strains, isolates from repositories such as ATCC, isolates from animals, isolates from humans, or combinations of each.

[00133] In an embodiment, the isolate from animals is isolated from feces. The isolate can also come from intestinal contents or combinations of feces and other intestinal contents. In one embodiment, the isolate from humans is isolated from feces. The isolate can also come from intestinal contents or combinations of feces and other intestinal contents.

[00134] In an embodiment, the method comprises treating a transgenic marker non-human animal and in particular a transgenic marker mammal such as a mouse or a rat, with a candidate substance, the transgenic non-human marker animal genetically modified to express a labeled anti-inflammatory or inflammatory biomarker selected from the group consisting of IL-10 and Foxp3 but also perforin and granzyme B, IL17 and TNF α ; and detecting biomarker expression in the transgenic marker animal following the treating.

[00135] In particular, in one embodiment the aforementioned transgenic non-human animal models can be treated either orally or intravenously with the substance, or permanently colonized with live bacteria by oral gavage and the amount of biomarker expression Foxp3 or IL-10 expression will be monitored in the various compartments of the mouse including the spleen, mesenteric lymph nodes, small and large intestine, lungs, pancreas, and bone marrow as a measure of the immunomodulatory ability of the substance.

[00136] In one embodiment dendritic cells, T cells, T regulatory, B cells or macrophages can be purified or differentiated from mice where expression of IL-10 (or Foxp3 in the case of T cell analysis) is marked by the fluorophore Green fluorescent protein (GFP). In those

embodiments, the candidate bacterial substance is contacted with one of the aforementioned cell types and the amount of GFP expression will be determined indicating the immunomodulatory ability of the substance being tested. Alternatively, dendritic cells or other antigen presenting cells can be incubated with the substance, the substance can be washed off and the dendritic cells can be subsequently incubated with T cells to determine the ability of the dendritic cells to elicit immunomodulatory activity from the T cell. GFP expression can be determined using fluorescent activated cell sorting (FACS) or a microplate reader.

[00137] In an embodiment, a T cell, antigen presenting cell, and reagents for detection of at least one of one or more anti-inflammatory biomarkers selected from the group consisting of IL-10, Foxp3, TGF β 2, Perforin and Granzyme B and one or more labeled inflammatory biomarker selected from the group consisting of IL-17 and TNF α , can be comprised in a system for identifying a bacterial substance having immunomodulatory ability according to methods herein described.

[00138] In an embodiment, the system comprises: dendritic cell, T cell, T regulatory, B cells and/or macrophages that, in some embodiments, can be purified or differentiated from mice where expression of IL-10 (or Foxp3 in the case of T cell analysis) is marked by the fluorophore Green fluorescent protein (GFP).

[00139] The systems can be provided in the form of kits of parts. In a kit of parts, the multi-ligand capture agent and other reagents to perform the method can be comprised in the kit independently. The antigen presenting cell, the T cell and the reagents can be included in one or more compositions, and each cell and reagent can be in a composition together with a suitable vehicle.

[00140] Additional components can include labeled molecules and in particular, labeled capture agents specific for an anti-inflammatory or an inflammatory biomarker or a molecule associated to the expression thereof, a microfluidic chip, reference standards, and additional components identifiable by a skilled person upon reading of the present disclosure.

[00141] Further details concerning the identification of the suitable carrier agent or auxiliary agent of the compositions, and generally manufacturing and packaging of the kit, can be identified by the person skilled in the art upon reading of the present disclosure.

[00142] EXAMPLES

[00143] The vesicles, compositions and related methods and systems herein described are further illustrated in the following examples, which are provided by way of illustration and are not intended to be limiting.

[00144] In particular, the following examples illustrate exemplary cell cultures, methods for contacting OMVs comprising PSA (or PSA ligand) with cells and detecting expression of a biomarker. A person skilled in the art will appreciate the applicability of the features described in detail for OMVs and PSA and *Bacteroides fragilis* for additional vesicles and delivery of substances additional to PSA in OMVs or other vesicles according to the present disclosure.

[00145] The following material and methods were used for all the methods and systems for detection of immunomodulatory substances exemplified herein.

[00146] Bacterial strains and culture conditions and mice *B. fragilis* strain NCTC 9343 was obtained from the American Type Culture Collection, its isogenic PSA deletion mutant and mpi44 mutant (produces only PSA but not other polysaccharides) has been described (M.J. Coyne, A.O. Tzianabos, B.C. Mallory, V.J. Carey, D.L. Kasper and L.E. Comstock, (2001) Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*, Infect. Immun. 69: 4342–4350.) Bacteria were grown either in a rich medium containing 37g BHI (BD #237200), 0.5μ g/ml Hemin (Sigma H5533), and 0.5μ g/ml Vitamin K (Sigma V3501) in 1L ddH₂O or a customized minimum medium (MM), which contained 8g Glucose, 1% FBS, 0.5μ g/ml Hemin, and 0.5μ g/ml Vitamin K in 1L of RPMI (Invitrogen SKU#11835-030). SPF mice of strains C57BL/6 and Balb/c were purchased from Taconic Farms (Germantown, NY). TLR2 knockout mice and IL-10 knockout mice were purchased from Jackson laboratories IL-10GFP mice were procured from the laboratory of Christopher Karp from Cincinnati Children's medical hospital, and, Foxp3GFP mice were given by the laboratory of Talal Chatila from the University of California Los Angeles.

[00147] Isolation of EDL-enriched bacterial population. Percoll (GE Healthcare #17-0891-01) discontinuous density-gradient centrifugation was used for EDL isolation of both wild-type *B. fragilis* and *B. fragilis* ΔPSA (Patrick S, Reid JH. (1983) Separation of capsulate and non- capsulate *Bacteriodes fragilis* on a discontinuous density gradient. J Med Microbiol. 16(2): 239-41.) Briefly, a 20%, 40%, 60%, 80% Percoll gradient (diluted with PBS) was created in a 14ml test tube (2ml for each layer). Then *B. fragilis* culture resuspended in PBS was carefully added on top of the 20% Percoll layer. Subsequently, the gradient was centrifuged at 800g for 20min at RT. EDL-enriched bacteria can be recovered from the 40%-60% interface of the gradient after the separation.

[00148] OMV purification and labeling. This method is adapted from a previously described protocol for the preparation of OMVs from *E. coli* (Amanda L. Horstman and Meta J. Kuehn. (2000) Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. J Biol Chem. 275: 12489-12496.) Briefly, EDL-enriched *B. fragilis* was grown in customized MM. OMVs were recovered from the bacteria-free supernatant of the culture by centrifugation at 40,000g for 2hrs at 4 C and further washed twice with PBS and filtered through 0.45μ m spin columns (Millipore #20-218). Total protein concentration of the purified OMVs was determined by Bradford assay (Biorad #500-0205). FITC-labeled OMVs were prepared as previously described (Nicole C. Kesty and Meta J. Keuhn. (2004) Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. J Biol Chem. 279: 2069-2076). Briefly, OMVs were incubated in the staining buffer (1mg/ml FITC (Thermo Scientific #46424), 100mM NaCl, 50mM Na₂CO₃, pH 9.2) for 1hr at RT. Labeled OMVs were collected by centrifugation at 40,000g for 30min at 4 C and washed twice with PBS+200mM NaCl.

[00149] Electron microscopy of bacterial ultrathin section. Ultrathin sections of EDL-enriched *B. fragilis* were prepared as previously described (Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E. (1996) A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacterioides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. Microb Pathog. 20(4):191-202.) Briefly, samples were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde (Sigma, G5882) in cacodylate buffer overnight at 4°C, followed by further fixation in osmium tetroxide (1%, w/v) for 3hrs at RT in the dark. Ruthenium Red (1mg/ml, Sigma R2751) was included in both of the fixation processes. Then

fixed samples were embedded in epoxy resin after dehydration in a graded series of alcohols. Ultrathin sections (100~200nm) were cut and negatively stained with 2% uranyl acetate and lead citrate on formvar/carbon coated copper grids (EMS #FCF200-Cu) before visualization by TEM.

[00150] Immunogold labeling of purified OMVs. This method was adapted from a previously described protocol (Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E. (1996) A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. Microb Pathog. 20(4):191-202.) Briefly, a tiny drop of purified OMV was applied to formvar/carbon coated gold grids (EMS #FF200-Au) and air-dried. Immunogold labeling was performed at RT by floating these grids with "OMVs"-side down on a series of small drops of antibody and wash solutions. Particularly, samples were blocked in 10% FBS for 10min after 5min incubation in 0.12% glycine. After blocking, samples were further incubated with antibody against PSA diluted in 10% FBS for 20min, followed by 5 washes x 3min with PBS. Subsequently, secondary antibody-IgG conjugated with 5nm gold (kind gift from Dr. Paul Webster, House Ear Institute, Los Angeles) was applied to the samples for 20min, followed again by 5 washes x 4min with PBS. After labeling, samples were fixed in 1% glutaraldehyde for 5min and washed extensively by transferring grids to drops of PBS 4x1min and H₂O 4x1min. Contrast staining was performed by placing the grids on drops of 3-5% uranyl acetate in 2% methylcellulose for 10min on ice. Finally, grids were removed from the staining solution by a wire loop and air-dried. Samples covered by a thin film of methylcellulose were removed from loop and used for visualization by transmission electron microscopy (TEM).

[00151] Glycoprotein assay. PSA purified from whole cell extracts or OMVs (from *B. fragilis* mutant mpi44) were subjected to SDS-PAGE and the gel was stained subsequently by glycoprotein staining kit (G bioscience #786-254) to show the presence of PSA.

[00152] Chemical (TNBS)-induced experimental colitis. This protocol is adapted from a previously described method (Scheiffele and Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. Current Protocols in Immunology.15.19.1-15.19.14.) Briefly, wild-type (Balb/c) male mice were orally treated with PBS, WT-OMV (5 μ g) or Δ PSA-OMV (5 μ g) every other day for a week before TNBS administration. The treated mice were anesthetized with isofluorene and rectal administration of 2% TNBS (in 50% EtOH, Sigma P2297) was applied through a 3.5F catheter

(Instech Solomon; SIL-C35). Oral treatment continued for another two times after TNBS administration and mice were analyzed 1-2 days after the last treatment.

[00153] In a prophetic example, the same mice may be treated with the TNBS – as indicated above – prior to orally treating the mice with PBS, WT-OMV (5 μ g) or Δ PSA-OMV (5 μ g) every other day for a week before TNBS administration. The treated mice would then be anesthetized with isofluorene and rectally administered with 2% TNBS (in 50% EtOH, Sigma P2297) as applied through a 3.5F catheter (Instech Solomon; SIL-C35). Oral treatment would be continued for another two times after TNBS administration and then mice were analyzed 1-2 days after the last treatment. We expect that using this protocol, the degree of colitis in these mice would be improved, reduced or cured. This expectation is based on the fact that our previous studies using PSA alone (Round et al. 2010) both prior to and after TNBS treatment have both prevented and reduced colitis, respectively; and the fact that some of our present results show that our OMV effect on these mice is PSA dose dependent.

[00154] Tissue pathology analysis Mouse colons were fixed in neutral buffered 10% formalin (ScyTek Laboratories CAS#50-00-0) and processed by Pacific Pathology for H & E staining. Colitis scores for each colon section were evaluated in a blinded fashion by a pathologist (Dr. Gregory Lawson, David Geffen School of Medicine, UCLA, Los Angeles). Histology images were taken using light microscopy (Zeiss) at 20x magnification.

[00155] Quantitative real-time PCR RNA was collected either from mouse tissues using Trizol (Invitrogen #15596-018) or from purified cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen #74104). iSCRIPT cDNA synthesis kit (BioRad #170-8890) was used for conversion of cDNA and IQ SYBR Green supermix (BioRad #172-8882) was used for real-time PCR. Primers used in this study are: TNF (F- 5' ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC 3' (SEQ ID NO:1); R- 5' GTG GGT GAG GAG CAC GTA GT 3') (SEQ ID NO 2); IL-17 (F- 5' TTA AGG TTC TCT CCT CTG AA 3' (SEQ ID NO:3); R- 5' TAG GGA GCT AAA TTA TCC AA 3') (SEQ ID NO: 4) IL-10 (F- 5' GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA 3' (SEQ ID NO:5); R- 5' ACC TGC TCC ACT GCT TGC T 3') (SEQ ID NO: 6) Foxp3 (F- 5' GCA ATA GTT CCT TCC CAG AGT TCT 3' (SEQ ID NO: 7); R- 5' GGA TGG CCC ATC GGA TAA G 3' (SEQ ID NO: 8)) actin (F-5'

TTC GTT GCC GGT CCA CA 3'(SEQ ID NO:9); R-5' ACC AGC GCA GCG ATA TCG-3' (SEQ ID NO: 10)).

[00156] Fluorescent microscopy In vitro differentiated BMDCs were plated into Lab-Tek II 8- well chamber slide (Nunc #154534) at 50,000 cells/well. FITC labeled OMVs were added into the cell culture at 10 μ g/ml. After 2hrs incubation, cells were fixed in 4% PFA for 20min at RT. After 3 washes x 5min with PBS, cell membrane was stained with 1 μ g/ml tetramethylrhodamine conjugate of WGA (Invitrogen W849) for 1hr at 4 C. And ProLong Gold anti-fade reagent (P36930) was applied to the sample after extensive washes following membrane staining. Fluorescent images were taken using LSM 510 microscope and Plan-Neofluar 63x/1.25 oil objective.

[00157] Flow cytometry and staining BMDCs from OMV uptake assay or activation assay were collected and blocked in 5% mouse serum for 30min on ice. After blocking, cells were stained with anti-CD11c-APC, anti-MHCII-FITC or anti-CD86-PE (ebioscience) for 30min on ice and washed 2x with FACS buffer (HBSS (no Ca²⁺/Mg²⁺), 1% FBS, 2mM EDTA, 10mM HEPES) at 4°C before flow cytometry analysis. Similarly, cells from in vitro BMDC-T cell co-culture were blocked, and stained with anti-CD4-APC/anti-CD25-PE the same way except that the cells were re-stimulated using PMA/Ionomycin for 4-4.5hrs before collecting. All flow cytometry was done with BD FACSCalibur and results were analyzed using FlowJo.

[00158] In vitro BMDC-T cell co-culture. Bone marrow was collected from different stains of mice and differentiated in vitro in the presence of 20ng/ml GM-CSF (Miltenyi Biotec #9517571) for 8 days as described previously (Mazmanian, Liu, Tzianabos, and Kasper (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. Cell 122:1 107-118.). (Cell purity was > 90%.) CD4+ splenic T cells were isolated by magnetic microbead purification (Miltenyi Biotec #130-090-860) (Cell Purity is > 95%.) OMV-pulsed BMDCs (10 μ l/ml OMVs, 100,000 cells/ml, 12hrs-24hrs) were washed with HBSS and then incubated with CD4+ T cells (1,000,000 cells/ml) in a round bottom 96 well plate with addition of 0.01 μ l/ml anti-CD3 (day 0, Fig 3c as indicated, 3d, e, f , Fig 4a), 2ng/ml TGFb (day 0, Fig 3c, d & f, Fig4a), and 5ng/ml IL-2 (day 1 and day 3, all in vitro DC-T cell co-culture

assays). After total 4 days of culture, supernatants were collected for ELISA (ebioscience #88-7104-77) or cells were harvested for staining and flow cytometry analysis.

[00159] In vitro suppression assay: CD4+CD25+ cells purified from BMDC (pulsed with WT- OMV or Δ PSA-OMV)-T cell co-culture were used as a source of Tregs (Miltenyi Biotec, #130-091-041). CD4 depleted mouse splenocytes treated with Mitomycin C (Sigma M4278) were used as APCs (100,000 cells/ml). CD4+CD25- T cells directly purified from mouse spleen were pulsed with CFSE for 10min at 37°C, followed by first wash with PBS and a second wash with culture media, and used immediately (500,000 cells/ml) as responder cells (Teff). This assay was conducted in a round bottom 96 well plate with an addition of 5 μ g/ml of anti-CD3 (ebioscience #16-0031-86) in 200 μ l volume. Teff:Treg ratio was titrated and cells were collected after 2-3 days of culture for FACS analysis.

[00160] Statistical Analyses: Student T test and one-way ANOVA were applied for pairwise comparisons and comparisons among >2 groups, respectively. Significant differences among groups detected by ANOVA were analyzed using Newman-Keuls test as the post-hoc test to identify groups exhibiting statistically significant differences. All error bars indicate SEM. NS: not significant; * p<0.05; *** p<0.01; **** p<0.001.

[00161] Example 1: Immunomodulatory capsular polysaccharide PSA is actively sorted into OMVs of *B. fragilis*.

[00162] Ultrathin sections of EDL-enriched *B. fragilis* were prepared as described in materials and methods and imaged by transmission electron microscopy.

[00163] The results illustrated in Figure 1a show that OMVs were abundantly produced by bacteria, and could be observed budding from the bacterial envelope (Figure 1a, higher magnification). Applicants' previous studies have shown that deletion of PSA abrogates the immunomodulatory capacity of *B. fragilis* (Mazmanian, Liu, Tzianabos, and Kasper (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. Cell 122:1 107-118.) (Mazmanian, Round, and Kasper (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature. 453 (7195) 620-625. Electron micrographs of a PSA mutant strain (*B. fragilis* Δ PSA) illustrate no defect in OMV synthesis, and

the size, shape and abundance of OMVs produced were indistinguishable from wild-type bacteria (Figure 1a and Figure 5). In particular, the results illustrated in Figure 1a reveal that vesicles are actively budding from the surface of bacteria.

[00164] To determine if PSA is associated with OMVs of *B. fragilis*, purified vesicles from wild-type and Δ PSA bacteria were subjected to immunoblot analysis as described in the materials and methods section.

[00165] The results illustrated in Figure 1b show that the vesicles from wild-type displayed immunoreactivity for PSA, unlike OMVs from *B. fragilis* Δ PSA. *B. fragilis* produces at least 8 distinct capsular polysaccharides which coat the surface of bacterial cells, named PSA, PSB, PSC, PSD, PSE, PSF, PSG, and PSH. While PSB was also detected in vesicle preparations, PSG was absent, demonstrating selectivity for certain polysaccharides to be packaged with OMVs (Figure 1b). Accordingly, the results of Figure 1b show that PSA and PSB are associated with vesicles, while PSG is only found on the bacterial surface. Deletion mutants for capsular polysaccharides confirm specificity of each anti- serum.

[00166] The results from immunoblot analysis were confirmed by experiments of immunogold labeling performed as described in the materials and methods section. The results of immunogold labeling of purified vesicles illustrated in Figure 1c and confirm that PSA is physically associated with OMVs, and that the vast majority of OMVs from wild-type *B. fragilis* stain positively for PSA (Figure 6). To verify that the absence of PSA did not alter the molecular composition of OMVs, a proteomic analysis was performed by mass spectrometry which revealed no major qualitative or quantitative differences in the protein composition between vesicles from wild-type or PSA-mutant bacteria (Figure 7).

[00167] PSA is a heterogeneous polymer of repeating subunits. Size separation of PSA recovered from whole cell extracts by chromatography was performed as well as an immunoblot analysis with anti-PSA of capsular polysaccharide preparations from whole cells and purified OMVs as indicated in material and methods.

[00168] The relevant results illustrated in Figure 1d surprisingly show that only the low molecular weight species, L-PSA, is associated with OMVs, illustrating specificity of PSA

packaging into vesicles. In particular, the results of Figure 1d show that only low molecular weight PSA (L- PSA) is packaged into vesicles unlike the high molecular weight (H-PSA) species that remains associated with the bacterial cell envelope.

[00169] Together, the above results reveal that the immunomodulatory capsular polysaccharide PSA is actively sorted into OMVs of *B. fragilis*.

[00170] Example 2: OMVs protect animals from experimental colitis and intestinal inflammation in a PSA-dependent manner.

[00171] To investigate if OMVs can ameliorate clinical symptoms of disease, mice were treated by gavage with OMVs during the induction of TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) colitis.

[00172] The results illustrated in Figure 2a indicate that control animals rapidly lost weight following rectal administration of TNBS (Figure 2a; TNBS+PBS), which did not recover compared to vehicle treated mice (Figure 2a; ETOH+PBS). Remarkably, OMVs given orally to TNBS animals significantly protected from weight loss (Figure 2a; TNBS+WT-OMV). Most importantly, when OMVs from *B. fragilis*ΔPSA were administered, weight loss was indistinguishable from TNBS animals (Figure 2a; TNBS+ΔPSA-OMV), demonstrating that PSA is responsible for preventing wasting disease.

[00173] Our efforts to detect intact vesicles in the colon after intra-gastric gavage were confounded by observations of host-derived vesicles, even in germ-free (sterile) mice as previously reported (data not shown).

[00174] Since reduction in colon length is a hallmark of TNBS colitis detection of colon length was performed in unmanipulated colons immediately following resection from cecum to rectum and quantification of length (graph) from vehicle treated (EtOH) and TNBS groups (n=4 animals/group). In particular, measurement were performed at time of sacrifice (day 4 following disease induction).

[00175] The results illustrated in Figure 2b showed normal intestinal lengths in animals treated with PSA-containing vesicles, but not in animal treated with OMVs deficient in PSA (Figure 2b).

[00176] Experimental colitis results in severe pathological alterations in intestinal architecture. Accordingly, hematoxylin and eosin (H & E) stained colon sections representative of each treatment group were provided and are shown in Figure 2c. The images of Figure 2c show that upon histological analysis of colonic tissues, a significant disease was observed in TNBS treated animals that were ameliorated by oral administration of PSA-containing vesicles.

[00177] The results of Figure 2c were confirmed by colitis scores from animals assigned by a blinded pathologist TNBS colitis manifests itself in focal lesions throughout the colon which mimic the pathology observed in Crohn's disease. To quantitatively assess disease, clinical symptoms were evaluated by a blinded pathologist using a standard scoring system (Scheiffele and Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. Current Protocols in Immunology.15.19.1-15.19.14.) The results illustrated in Figure 2d, indicate that while all TNBS and Δ PSA-OMV treated animals were severely affected, WT-OMVs significantly reduced disease in most animals. Animals treated with OMVs from wild-type bacteria had much fewer focal sights of pathology, and when lesions were observed, they were smaller and retained considerably normal tissue architecture compared to animals given Δ PSA-OMV.

[00178] The above results establish that PSA is required for the disease protective activity of OMVs.

[00179] Example 3: PSA containing OMVs inhibits TNF- α /IL-17, enhances IL-10 expression.

[00180] The production of canonical pro- and anti-inflammatory cytokines associated with colitis was measured in mice treated as exemplified in Example 2. In particular, cytokine transcript analysis was performed by qRT-PCR from RNA recovered from whole colons or purified CD4⁺ T cell from mesenteric lymph nodes.

[00181] The relevant results representative of 3 independent trials are reported in Figure 2e (whole colons) and Figure 2f (purified CD4⁺ T cell from mesenteric lymph nodes). Those results show that transcript levels of pro-inflammatory biomarkers/cytokines tumor necrosis factor (TNF- α) and IL-17A were elevated in TNBS- treated animals, but reduced by OMV administration in a PSA-dependent manner (Figure 2e). Consistent with protection from pathology, OMVs elicited the production of increased anti-inflammatory biomarkers/cytokines IL-10 levels compared to animals orally given Δ PSA-OMV (Figure 2f). Analysis of cytokine production by purified CD4⁺ T cells from mesenteric lymph nodes (MLNs) confirmed that IL-10 was indeed being produced by T cells in response to PSA (Figure 2f). Infiltration of Th17 cells, which are required for disease, were significantly reduced by OMVs, as were levels of the potent pro-inflammatory marker TNF- α (Figure 2f). We conclude that PSA packaging into OMVs of *B. fragilis* protects animals from the pathological and immunological manifestations of experimental colitis.

[00182] Example 4: PSA containing OMVs from *B. fragilis* induce dendritic cell responses.

[00183] Dendritic cells (DCs) extend protrusions into the gut lumen and sample intestinal particles, and subsequently migrate to MLNs in order to initiate T cell reactions. Indeed, PSA administered orally to animals is associated with CD11c⁺ DCs in the MLN. Accordingly, Applicants sought to test whether OMVs containing PSA can also be taken up by DCs.

[00184] The results illustrated in Figure 3a show that bone-marrow derived DCs rapidly internalized OMVs in an actin-dependent manner as treatment of cells with cytochalasin D significantly inhibited vesicle uptake (Fig. 3a and Figure 8). Intracellular localization was confirmed by confocal microscopy (Figure 9).

[00185] PSA mediated induction in the DCs of T cell activation markers was also investigated. The results illustrated in Figure 3b indicated that expression of T cell activation markers (MHCII, CD86) was elevated equally following internalization of both WT-OMVs and Δ PSA- OMVs (Figure 3b and Figure 10). Increased expression of MHC and co-stimulatory molecules indicate that PSA containing OMVs from *B. fragilis* can influence T cell responses.

[00186] Example 5: PSA containing OMVs induce IL-10 expression in CD4+ T cell through DCs IL-10 expression.

[00187] In light of PSA containing OMVs protective role in colitis shown with experiments exemplified in Examples 1 to 3, the biological effects of OMVs on the induction of suppressive T cell responses were tested. In particular, as various regulatory T cell (Treg) populations are known to inhibit colitis, OMVs' ability to promote Treg development was examined.

[00188] The results illustrated in Figure 3c indicate that WT-OMVs induced the expression of IL-10 from in vitro DC-T cell co-cultures, while no IL-10 was produced from DCs alone under these conditions. Vesicles purified from *B. fragilis*ΔPSA induced significantly less IL-10 than WT-OMVs, although an increase was detected over media controls. The production of IL-10 from DCs is known to support CD4+IL-10+ T cell development *in vivo* and *in vitro*. Accordingly, ELISA analysis similar to the one whose results are illustrated in Figure 3c, was performed also including DCs differentiated from IL-10^{-/-} animals.

[00189] The results illustrated in Figure 3d (left panel) show a greatly reduced IL-10 production in DC-T cell co-cultures when IL-10^{-/-} DCs were treated with wild type OMVs, suggesting IL-10 expression by DCs is required to induce IL-10 from CD4+ T cell in a paracrine manner.

[00190] Example 6: PSA containing OMVs programs DCs to direct Foxp3 Treg development and/or expansion.

[00191] Microbial ligands are sensed by several classes of pattern recognition receptors, and PSA has been shown to signal through toll-like receptor 2 (TLR2) to elicit Th1 cytokine production. A series of experiments were therefore performed to test whether TLR2 is required for induction of IL-10 by wild-type OMVs (containing PSA), as recent reports have shown that Treg function and IL-10 expression are influenced by TLR2.

[00192] The results illustrated in Figure 3d (right panel) indicate that compared to wild-type DCs, the absence of TLR2 (DCs from TLR2^{-/-} animals) completely inhibit IL-10

production in response to OMVs. Both DCs responded equally to superantigen (SEA) stimulation, demonstrating a specific defect in PSA sensing and not a general lack of T cell activation by TLR2-/- DCs (Figure 3d). CD4+CD25+ T cells that express the transcription factor Foxp3 are an important Treg subset. Recent studies have shown that CD4+CD25+Foxp3+ Tregs can express IL-10, and IL-10 production from Tregs is required to prevent intestinal inflammation.

[00193] To determine the source of IL-10 induced by PSA on OMVs, CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells were purified following co-culture with DCs and the expression of IL-10 and Foxp3 were measured by qRT-PCR.

[00194] The results illustrated in Figure 3e indicate that remarkably, PSA-OMV significantly induced IL-10 expression in the CD4+CD25+ Treg population, but not from CD4+CD25- T cells. OMVs purified from *B. fragilis*ΔPSA were unable to promote IL-10 production from either T cell population, with levels identical to media controls. Expression of Foxp3 was also significantly increased exclusively in CD4+CD25+ T cells by OMVs in a PSA-dependent manner (Figure 3e).

[00195] Co-cultures were set up as for experiments illustrated in Figures 3c-e, but using CD4+ T cells from Foxp3-GFP mice. Following 4 days of culture with OMV pulsed DCs, cells were stained with anti-CD4 and Foxp3 detected by GFP expression using FC.

[00196] The results representative of 2 independent trials are illustrate in Figure 3f. Consistent with the increased transcription of Foxp3 among CD4+ T cells, proportions of CD4+Foxp3+ T cells increased in response to WT-OMV but not PSA-OMV treatment (Figure 3f). Collectively, OMVs containing PSA program DCs to direct Treg development and/or expansion in an entirely in vitro culture system.

[00197] Example 7: PSA-containing OMVs induce IL10 mediated Foxp3 Treg suppressive function

[00198] The use of Tregs as cellular therapies has been proposed for IBD, autoimmunity and allergies. IL-10 expression by CD4+ T cell subsets following 4 day co-culture with DCs

treated with OMVs was investigated. Splenic CD4⁺ T cell were purified from IL-10-GFP mice, stained with anti-CD4 and anti-CD25 following co-culture, and IL-10 expression measured by GFP expression.

[00199] The results of the relevant OMV treatment of purified DCs & T cells illustrate in Figure 4a indicate that revealed that PSA promotes the specific production of IL-10 from CD4⁺CD25⁺ Tregs.

[00200] Based on this finding, the ability of PSA was investigated to promote the suppressive capacity of Tregs ex vivo. in vitro suppression of naïve responder cells by purified CD4⁺CD25⁺ T cells following co-culture with DCs treated with media (control), WT-OMVs and ΔPSA-OMVs. CD4⁺CD25⁻ responder cells (effector cells; Teff) were purified from spleens of wild-type mice, pulsed with intracellular dye CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester), incubated with Tregs and stimulated with anti-CD3 for 3 days. Cell proliferation was measured by FC of CFSE dilution.

[00201] The results illustrated in Figure 4b and 4c indicate Tregs recovered from conditions with WT-OMV-treated DCs displayed significantly enhanced suppressive capacity compared to CD4⁺CD25⁺ T cells in response to ΔPSA-OMVs.

[00202] Therefore, the specific absence of PSA from OMVs that otherwise contain numerous microbial ligands (LPS, lipoproteins, peptidoglycan, etc) abrogates the ability of *B. fragilis* vesicles to induce functional Tregs.

[00203] Example 8: PSA induce various biomarkers combination in Foxp3 Treg

[00204] Foxp3-GFP mice were orally treated with purified PSA every other day for 6 days. MLNs were extracted and CD4⁺Foxp3⁺ or the CD4⁺Foxp3⁻ T cells were purified by FACS based on ±GFP expression (purity >99%). RNA was extracted and used for q-PCR.

[00205] The results illustrated in Figure 11 demonstrate that PSA coordinates induction of multiple anti-inflammatory genes including IL-10, TGF-β, perforin, and granzyme A and the inhibition of TNFα and IL17 (in particular IL17A).

[00206] The above results provide a molecular mechanism for the probiotic activity of *B. fragilis*, and reveal a seminal example for a microbial ligand that links innate immune receptor signaling to regulatory T cell development. In particular the above results indicate that PSA is delivered to the host by outer membrane vesicles (OMVs), secretion structures that target bacterial molecules to host cells. OMVs containing PSA are internalized by dendritic cells of the host immune system. Following uptake of OMVs, PSA programs dendritic cells to induce the differentiation of regulatory T cells (Treg) that express Foxp3 and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10). Treg development by OMVs requires toll-like receptor 2 (TLR2) expression and IL-10 production by dendritic cells. Remarkably, purified OMVs direct the in vitro differentiation of functional Tregs with potent suppressive activity in a PSA dependent manner. Treatment of animals with OMVs containing PSA prevents experimental colitis and suppresses pro-inflammatory cytokine responses in the gut. These findings reveal that commensal bacteria provide beneficial microbial factors through vesicle secretion, a process that can be engineered into a novel approach for delivery of probiotic therapies for IBD.

[00207] In particular, the above results show that Tregs induced by OMVs containing PSA are functionally suppressive and inhibit T cell activation in culture. This is the first demonstration of in vitro Treg development by a microbial ligand, and provides proof-of-principle to the widely- speculated notion that innate immune receptor signaling modulates Treg function. As current therapies for IBD are either ineffective or have severe side effects, probiotics represent promising new treatment options by harnessing well-evolved evolutionary mechanisms for immunomodulation. Given that Tregs suppress immune responses in multiple tissues, our seminal demonstration of in vitro Treg development by PSA suggests the exciting possibility of novel cellular therapies for numerous inflammatory disorders including autoimmunity, asthma and allergies.

[00208] To identify molecules made by microorganisms that mediate immunomodulation, fractions of bacterial products can be purified and the same assays performed as above until a pure compound is found which mimics that outcome when whole bacteria are used. Also, the approaches above could be used to screen a mutant library of a microorganism of interest to identify immunomodulatory molecules that have been deleted in a respective clone of a strain which possesses this activity.

[00209] Our previous studies have shown that PSA alone can both treat and prevent colitis in mice (Round et al. 2010). Accordingly, given our present results that show wildtype OMV, containing PSA, can prevent colitis in mice, and that this effect with the OMV seems to be PSA dependent we now propose that wildtype OMV will be effective in treating colitis in the same TNBS mice model, and have a beneficial or improved affect on humans with IBD.

[00210] It should be noted at the present time that although predictive markers for the onset of inflammatory diseases (such as IBD) are not known, once identified these predictive markers will mean that subjects/humans at risk of developing the disease can be similarly treated with the substances/compositions/OMVs as disclosed herein, to prevent the onset of the disease.

[00211] In another embodiment, OMVs (containing PSA) could be altered so that they either do not express or have reduced expression of certain enzymes (for instance. haemagglutinating and enzymic activities (hydrolyzing enzymes such as alkaline and acid phosphatases, esterase lipase. Phosphohydrolyase, glucosaminidase etc.) using molecular or physical methods known to those of skill in the art. Such modified OMVs could then be used to treat or prevent inflammation or inflammatory diseases.

[00212] The examples set forth above are provided to give those of ordinary skill in the art a complete disclosure and description of how to make and use the embodiments of the vesicles, systems and methods of the disclosure, and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their disclosure. Modifications of the above-described modes for carrying out the disclosure that are obvious to persons of skill in the art are intended to be within the scope of the following claims. All patents and publications mentioned in the specification are indicative of the levels of skill of those skilled in the art to which the disclosure pertains. All references cited in this disclosure are incorporated by reference to the same extent as if each reference had been incorporated by reference in its entirety individually.

[00213] The entire disclosure of each document cited (including patents, patent applications, journal articles, abstracts, laboratory manuals, books, or other disclosures) in the Background, Summary, Detailed Description, and Examples is hereby incorporated herein by reference.

[00214] It is to be understood that the disclosures are not limited to particular compositions or biological systems, which can, of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting. As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural referents unless the content clearly dictates otherwise. The term "plurality" includes two or more referents unless the content clearly dictates otherwise. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which the disclosure pertains.

[00215] Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice for testing of the specific examples of appropriate materials and methods are described herein.

[00216] A number of embodiments of the disclosure have been described. Nevertheless, it will be understood that various modifications can be made without departing from the spirit and scope of the present disclosure. Accordingly, other embodiments are within the scope of the following claims.

References

1. Xavier, R.J. & Podolsky, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434 (2007).
2. Mazmanian, S.K., Round, J.L. & Kasper, D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453, 620-625 (2008).
3. Braun, J. & Wei, B. Body traffic: ecology, genetics, and immunity in inflammatory bowel disease. *Annu Rev Pathol* 2, 401-429 (2007).
4. Round, J.L. & Mazmanian, S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* (2009).
5. Scheiffele and Fuss. (2001) Induction of TNBS colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*.15.19.1-15.19.14.
6. Mazmanian, Liu, Tzianabos, and Kasper (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 122:1 107-118

7. M.J. Coyne, A.O. Tzianabos, B.C. Mallory, V.J. Carey, D.L. Kasper and L.E. Comstock, (2001) Polysaccharide biosynthesis locus required for virulence of *Bacteroides fragilis*, *Infect. Immun.* 69: 4342–4350.
8. Patrick S, Reid JH. (1983) Separation of capsulate and non-capsulate *Bacteriodes fragilis* on a discontinuous density gradient. *J Med Microbiol.* 16(2): 239-41
9. Amanda L. Horstman and Meta J. Kuehn. (2000) Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem.* 275: 12489-12496.
10. Nicole C. Kesty and Meta J. Keuhn. (2004) Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *J Biol Chem.* 279: 2069-2076.
11. Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E. (1996) A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. *Microb Pathog.* 20(4):191-202.
12. Round et al. (2010) Inducible Foxp3+ regulatory T cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *PNAS*, 107 (27). 12204-12209.

[00217] Although the present invention has been described in connection with the preferred embodiments, it is to be understood that modifications and variations may be utilized without departing from the principles and scope of the invention, as those skilled in the art will readily understand. Accordingly, such modifications may be practiced within the scope of the following claims.

Claims

1. A pharmaceutical composition for use as a medicament, the composition comprising an outer membrane vesicle formed by a lipid membrane enclosing an aqueous environment, the vesicle comprising a Polysaccharide A (PSA), wherein the lipid membrane is derived from the outer membrane of *Bacteroides fragilis*.
2. The pharmaceutical composition of claim 1, further comprising an excipient.
3. The pharmaceutical composition of claim 1 or 2, wherein the PSA is low molecular weight PSA (L- PSA).
4. The pharmaceutical composition of any of claims 1 to 3, further comprising one or more medicaments known to be useful in the treatment of inflammatory bowel disease.

Abstract

[00218] PSA is delivered to the host by outer membrane vesicles (OMVs), secretion structures that target bacterial molecules to host cells. Purified OMVs direct the in vitro differentiation of functional Tregs with potent suppressive activity in a PSA dependent manner. Treatment of animals with OMVs containing PSA prevents experimental colitis and suppresses pro-inflammatory cytokine responses in the gut, and indicate that compositions, medicaments, and methods useful for the treatment of inflammation, and more particularly, inflammatory bowel diseases.

(Figure 1b)

a

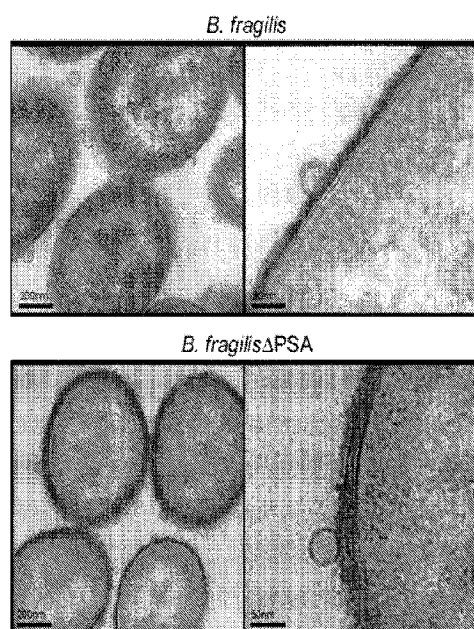


Figure 1A

b

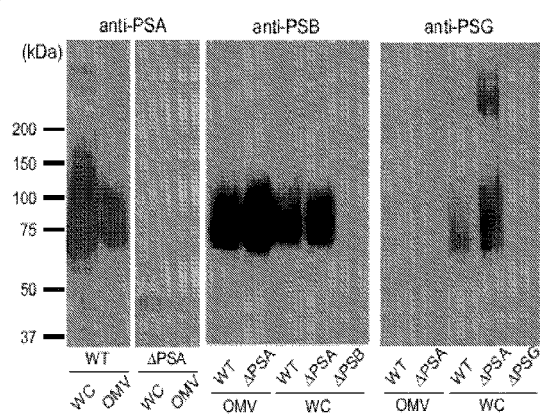


Figure 1B

C

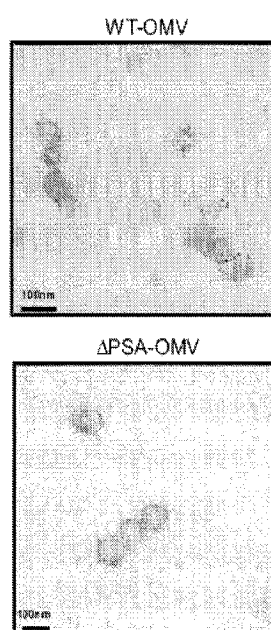


Figure 1C

d

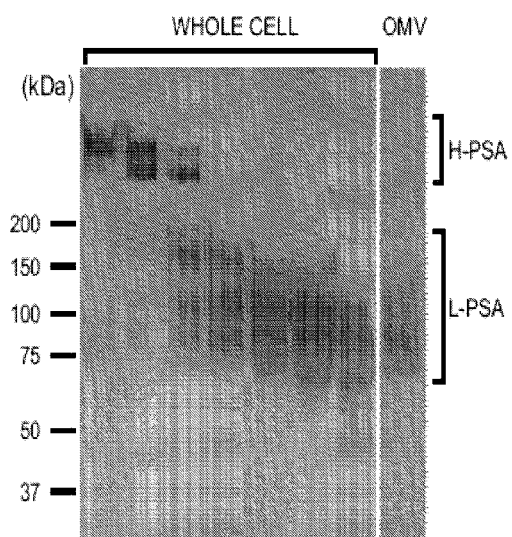


Figure 1D

【 F i g 2 A 】

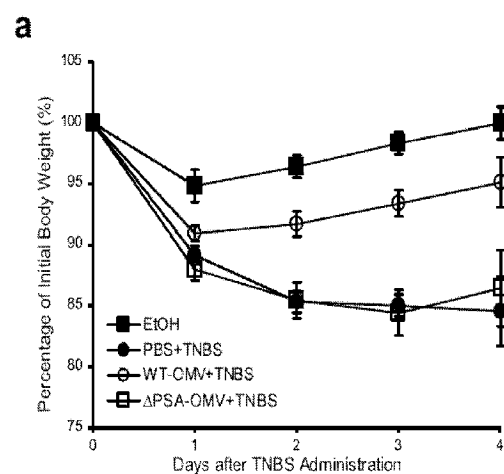


Figure 2A

【 F i g 2 B 】

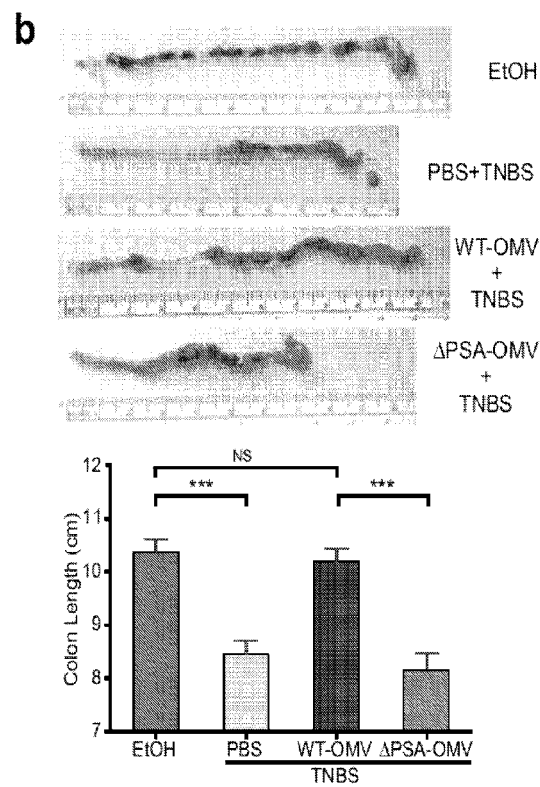


Figure 2B

【 F i g 2 C 】

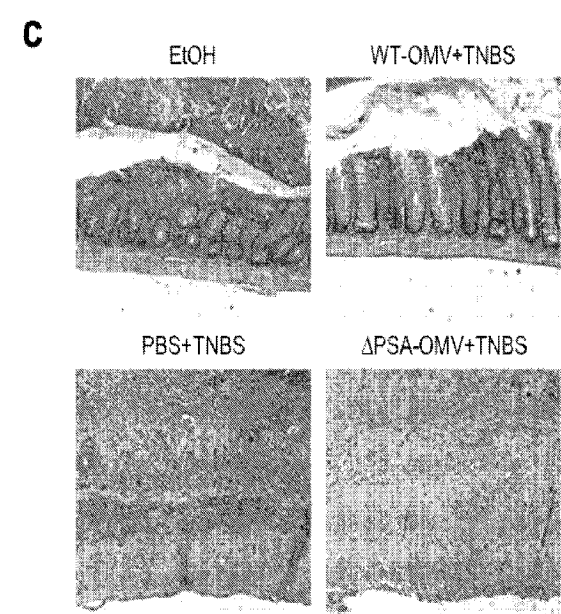


Figure 2C

【 F i g 2 D 】

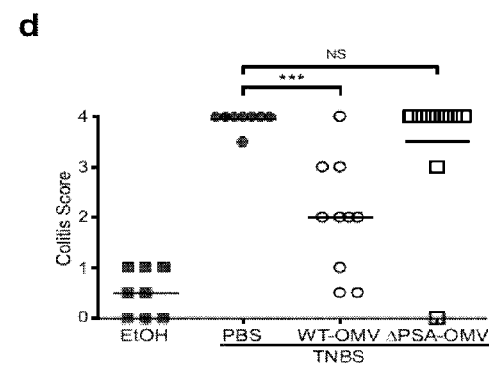


Figure 2D

【 F i g 2 E 】

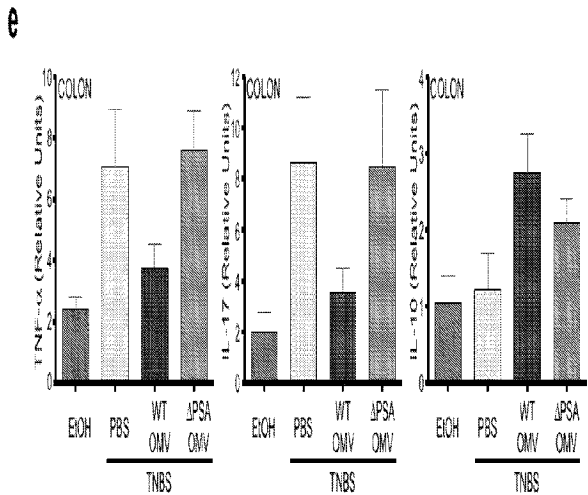


Figure 2E

【 F i g 2 F 】

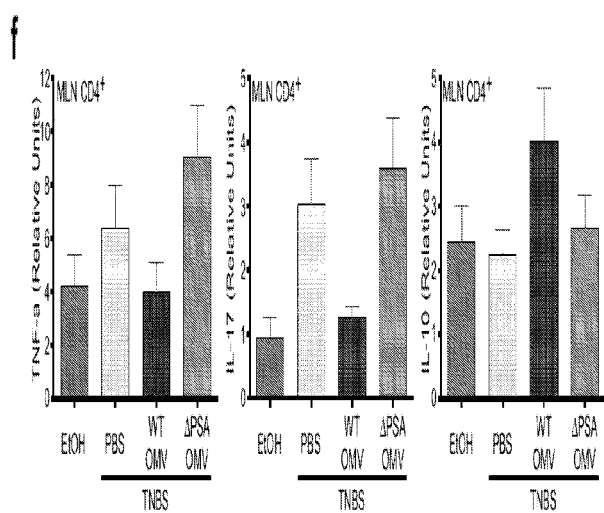


Figure 2F

【 F i g 3 A 】

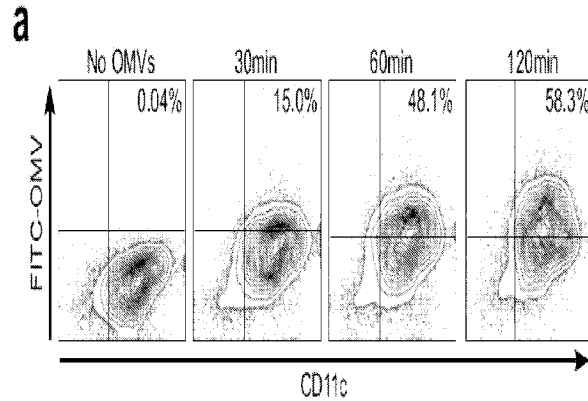


Figure 3A

【 F i g 3 B 】

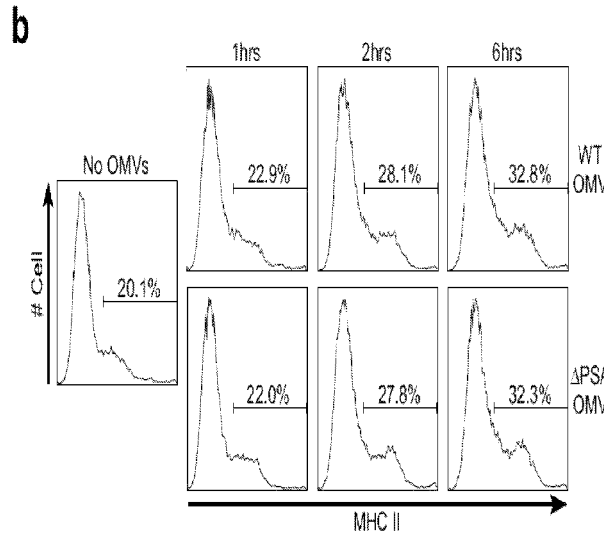


Figure 3B

【 F i g 3 C 】

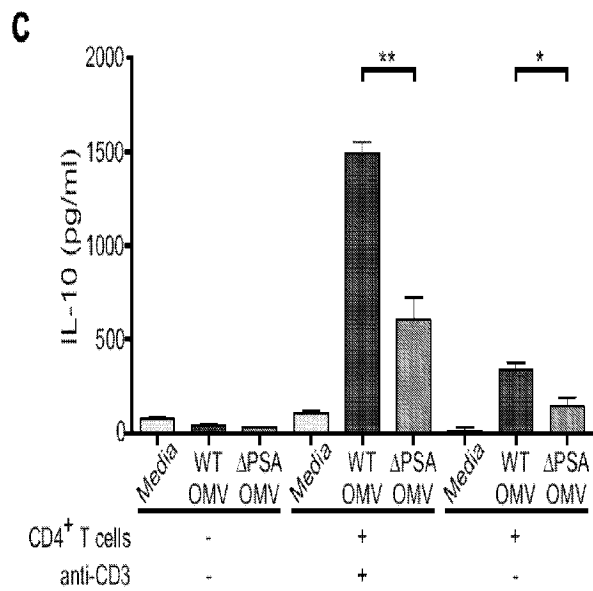


Figure 3C

【 F i g 3 D 】

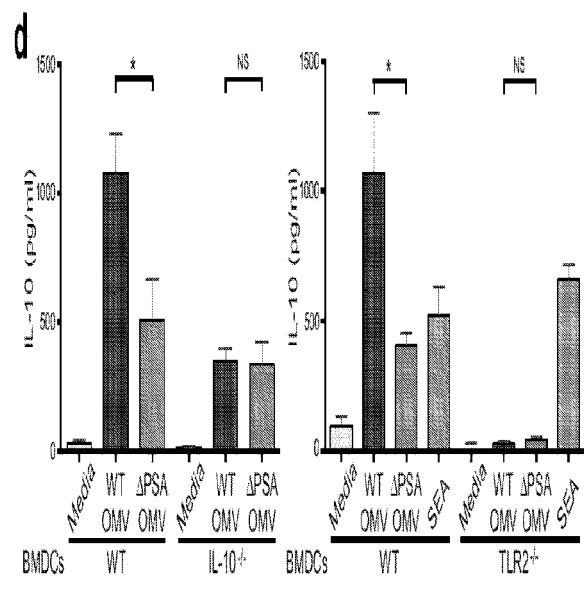


Figure 3D

【 F i g 3 E 】

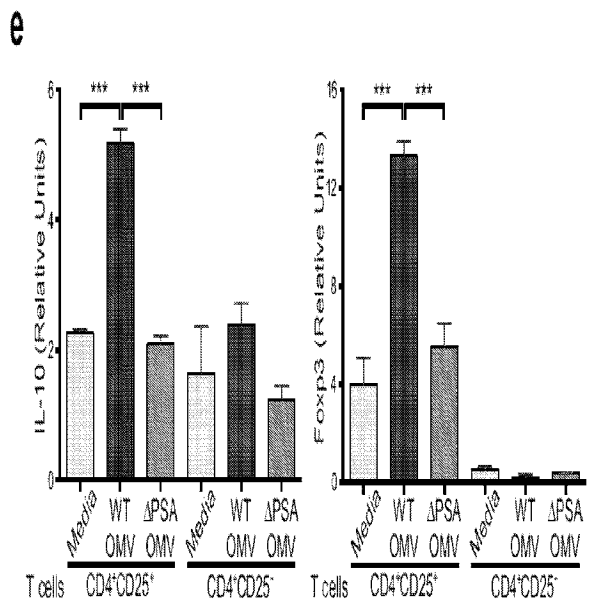


Figure 3E

【 F i g 3 F 】

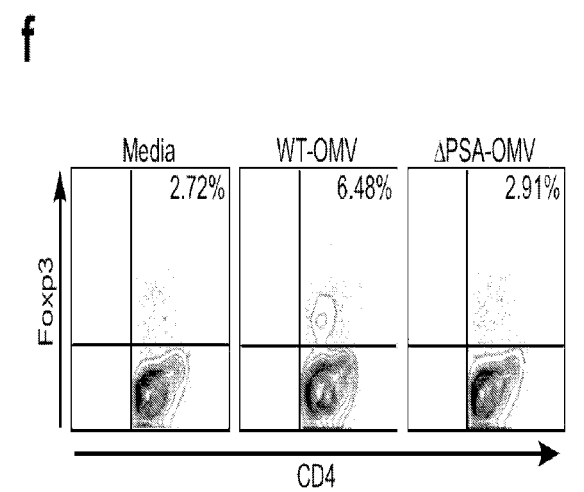


Figure 3F

【 F i g 4 A 】

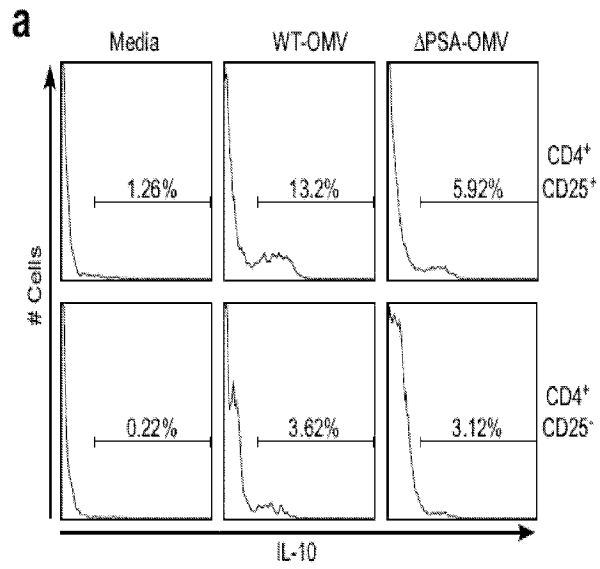


Figure 4A

【 F i g 4 B 】

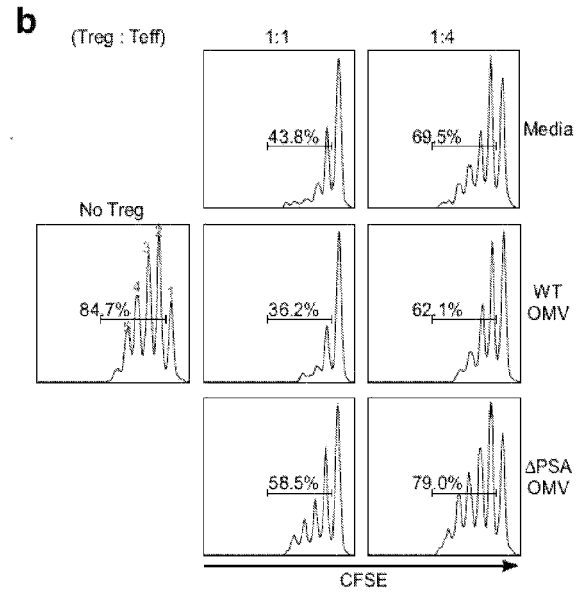


Figure 4B

【 F i g 4 C 】

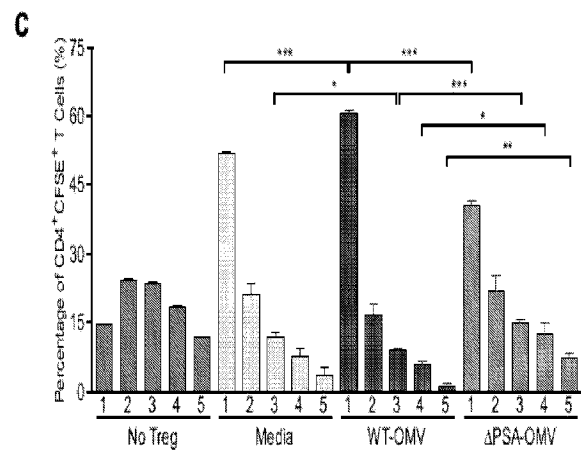


Figure 4C

【 F i g 5 】

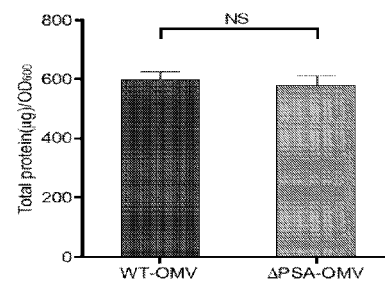


Figure 5

【 F i g 6 】

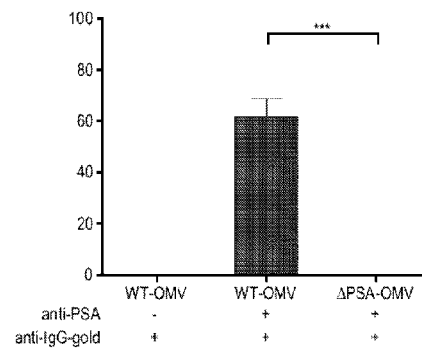


Figure 6

【 F i g 7 】

No.	Accession No.	Protein Name	WT-OMV	Δ PSA-OMV	
BF3567	gi 60683022	hypothetical protein	864 $\pm$ 58	452 $\pm$ 65	**
BF2157	gi 60681638	putative lipoprotein	647 $\pm$ 45	630 $\pm$ 37	NS
BF0585	gi 60680181	hypothetical protein	341 $\pm$ 25	296 $\pm$ 18	NS
BF2161	gi 60681640	hypothetical protein	213 $\pm$ 24	85 $\pm$ 5	**
BF2706	gi 60682179	putative lipoprotein	178 $\pm$ 18	128 $\pm$ 12	NS
BF1956	gi 60681445	putative outer membrane protein	161 $\pm$ 41	123 $\pm$ 9	NS
BF0594	gi 60680180	hypothetical protein	142 $\pm$ 12	202 $\pm$ 8	*
BF1957	gi 60681446	hypothetical protein	134 $\pm$ 10	157 $\pm$ 17	NS
BF3067	gi 60682536	putative lipoprotein	124 $\pm$ 31	62 $\pm$ 6	NS
BF0589	gi 60680155	hypothetical protein	124 $\pm$ 17	119 $\pm$ 12	NS
BF3432	gi 60682694	hypothetical protein	117 $\pm$ 9	96 $\pm$ 11	NS
BF2023	gi 60681124	putative ATP/GTP-binding protein	117 $\pm$ 13	74 $\pm$ 1	*
BF1619	gi 60681115	hypothetical protein	117 $\pm$ 9	147 $\pm$ 14	NS
BF3144	gi 60682613	putative lipoprotein	107 $\pm$ 22	110 $\pm$ 14	NS

Figure 7

【 F i g 8 】

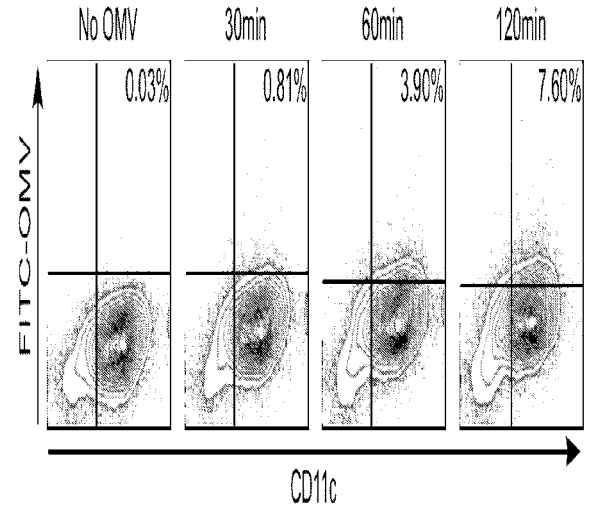


Figure 8

【 F i g 9 】

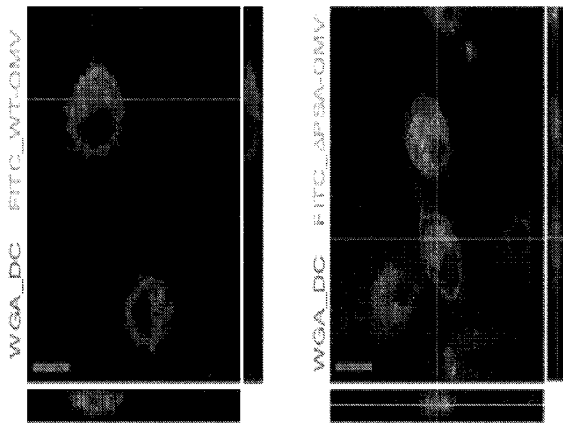


Figure 9

【 F i g 1 0 】

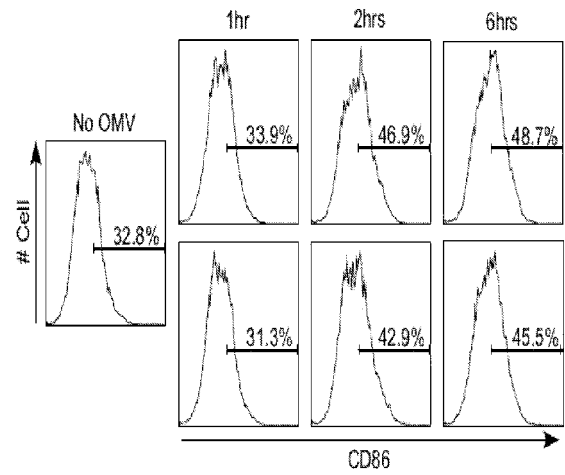


Figure 10

【 F i g 1 1 】

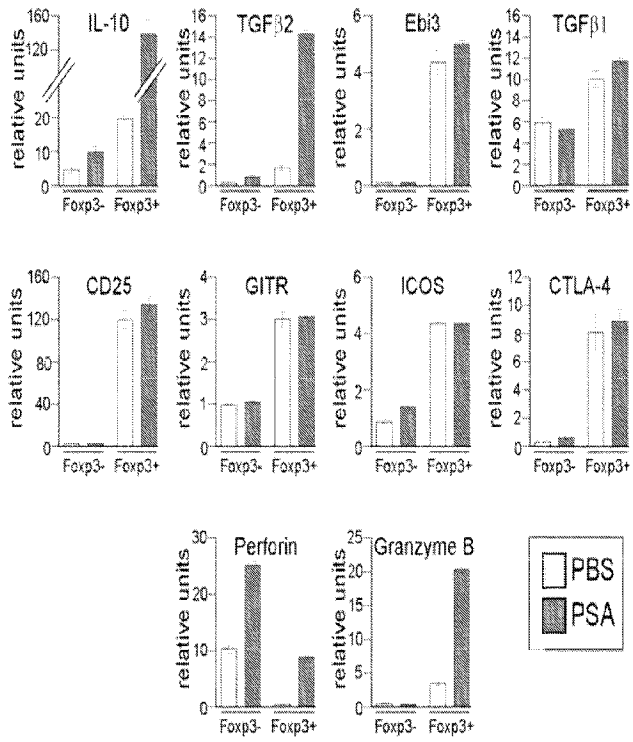


Figure 11