



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108271354 B

(45) 授权公告日 2022.07.29

(21) 申请号 201680040548.6

希尼恩·麦克卢斯基

(22) 申请日 2016.06.15

艾玛·拉夫缇斯

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

申请公布号 CN 108271354 A

专利代理人 王达佐 洪欣

(43) 申请公布日 2018.07.10

(51) Int.CI.

(30) 优先权数据

A61K 35/74 (2015.01)

1510466.4 2015.06.15 GB

A61P 1/00 (2006.01)

1520508.1 2015.11.20 GB

A61P 11/06 (2006.01)

1606810.8 2016.04.19 GB

A61P 29/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 19/02 (2006.01)

2018.01.09

A61P 25/28 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

PCT/GB2016/051770 2016.06.15

A61P 37/02 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 17/06 (2006.01)

W02016/203218 EN 2016.12.22

A61P 1/12 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A61P 11/00 (2006.01)

NCIMB 42381 2015.03.12

A61P 27/02 (2006.01)

NCIMB 42486 2015.11.16

A61P 9/00 (2006.01)

(73) 专利权人 4D制药研究有限公司

A61P 9/10 (2006.01)

地址 英国阿伯丁郡

A61P 1/02 (2006.01)

(72) 发明人 乔治·格兰特

A61P 11/02 (2006.01)

安吉拉·玛格丽特·帕特森

A61P 37/08 (2006.01)

伊姆克·马尔德

审查员 陈中伟

权利要求书1页 说明书44页

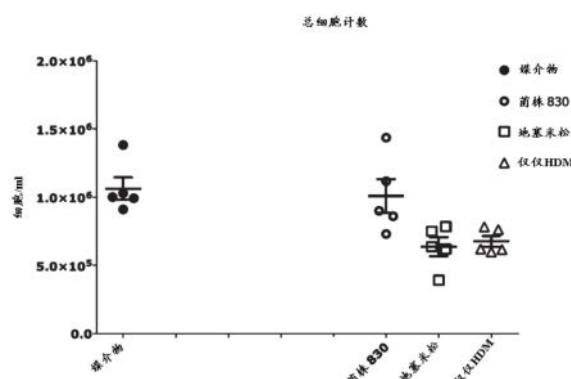
序列表（电子公布） 附图76页

(54) 发明名称

包含细菌菌株的组合物

(57) 摘要

本发明提供了包含细菌菌株的组合物，其用于治疗和预防炎性和自身免疫性疾病。



1. 粪便布劳特氏菌(*Blautia stercoris*)物种的细菌菌株在制备用于治疗或预防炎性或自身免疫性疾病的药物中的用途,其中所述药物用于治疗或预防选自由以下组成的群组的疾病或病状:哮喘;关节炎;多发性硬化;牛皮癣;炎性肠病;慢性阻塞性肺病;异位性皮炎以及过敏性鼻炎,

其中所述细菌菌株是以登记号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株的细胞或生物纯培养物。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述哮喘是过敏性哮喘或中性粒细胞性哮喘。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述关节炎是类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎或幼年特发性关节炎。

4. 如权利要求1所述的用途,其中所述炎性肠病是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

5. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物用于治疗或预防哮喘,并且其中所述药物用于在哮喘治疗中减少中性粒细胞增多或嗜酸性粒细胞增多。

6. 如权利要求5所述的用途,其中所述哮喘是中性粒细胞性哮喘或过敏性哮喘。

7. 如权利要求1所述的用途,其中

所述药物用于治疗或预防类风湿性关节炎,并且

其中所述药物用于减少类风湿性关节炎中的关节肿胀。

8. 如权利要求1所述的用途,其中

所述药物用于治疗或预防多发性硬化,并且

所述药物用于降低发病率或疾病严重度。

9. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物用于在炎性或自身免疫性疾病的治疗或预防中减少IL-17产生或减少Th17细胞分化。

10. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物用于具有高IL-17水平或Th17细胞的患者中。

11. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物用于经口施用。

12. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载剂。

13. 如权利要求1所述的用途,其中所述细菌菌株是冻干的。

14. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物是疫苗组合物。

包含细菌菌株的组合物

技术领域

[0001] 本发明属于包含从哺乳动物消化道分离的细菌菌株的组合物和此类组合物用于治疗疾病的用途的领域。

背景技术

[0002] 虽然认为人类肠道在子宫内是无菌的,但在出生后其立刻暴露于大量的母体和环境微生物。此后,出现微生物定殖和演替的动态期,其受例如分娩模式、环境、饮食和宿主基因型等因素影响,所有因素都影响肠微生物丛的组成,特别是在童年期间。随后,微生物丛稳定化并变成成人样[1]。人类肠微生物丛含有超过500-1000个基本上属于两大细菌分类脆弱拟杆菌(Bacteroidete)和厚壁门菌(Firmicute)的不同种系型[2]。由人类肠的细菌定殖产生的成功共生关系产生多种代谢、结构、保护和其它有益功能。定殖肠部的增强代谢活性确保降解以其它方式无法摄取的饮食组分,同时释放副产物,为宿主提供重要的营养物来源。类似地,充分认识到肠微生物丛的免疫重要性,且在免疫系统减弱的无菌动物中例示,其免疫系统在引入共生细菌后在功能上复原[3-5]。

[0003] 微生物丛组成的显著变化已经在例如炎性肠病(IBD)等肠胃病症中证明。举例来说,在IBD患者中梭菌属(Clostridium) XIVa簇细菌的水平降低,而大肠杆菌数目增加,表明肠内共生体与病原性共生体的平衡的变化[6-9]。有趣地,此微生物生态失调也与效应T细胞群体的不平衡相关。

[0004] 认识到某些细菌菌株对动物肠可能具有潜在的积极作用,已经提议各种菌株用于治疗各种疾病(参见例如[10-13])。也已经提议某些菌株,包括大部分乳杆菌属(Lactobacillus)和双歧杆菌属(Bifidobacterium)菌株,用于治疗不直接与肠相关的各种炎性和自身免疫性疾病(综述参见[14]和[15])。然而,不同疾病和不同细菌菌株之间的关系和特定细菌菌株对肠和在全身水平下和对任何特定类型疾病的准确作用尚未很好地表征。

[0005] 本领域中需要治疗炎性和自身免疫性疾病的新方法。还需要待表征的肠细菌的潜在作用,以可以研发使用肠细菌的新疗法。

发明内容

[0006] 本发明人已经研发用于治疗和预防炎性和自身免疫性疾病的新疗法。具体来说,本发明人已经研发用于治疗和预防由IL-17或Th17通路介导的疾病和病状的新疗法。具体来说,本发明人已经确定来自布劳特氏菌属(Blautia)的细菌菌株可以有效减少Th17炎性反应。如实施例中所描述,经口施用包含粪便布劳特氏菌(Blautia stercoris)的组合物可以降低哮喘、类风湿性关节炎和多发性硬化的小鼠模型中包括Th17炎性反应在内的炎性反应的严重度。还如实施例中所描述,经口施用包含韦氏布劳特氏菌(Blautia wexlerae)的组合物可以降低葡萄膜炎的小鼠模型中包括Th17炎性反应在内的炎性反应的严重度。因此,本发明人已经确定两种来自布劳特氏菌属中的不同物种的不同菌株可以有效治疗炎性

和自身免疫性疾病。

[0007] 因此,在第一实施方案中,本发明提供了一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,其用于治疗或预防由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状的方法中。本发明人已经确定用来自此种属的细菌菌株治疗可以降低包括IL-17在内的作为Th17通路的一部分的细胞因子的水平,可以减轻Th17炎性反应且在由IL-17和Th17通路介导的炎性和自身免疫性疾病的小鼠模型中可以提供临床益处。

[0008] 在特定实施方案中,本发明提供了一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,其用于治疗或预防选自由以下组成的群组的疾病或病状的方法中:多发性硬化;关节炎,例如类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎或幼年特发性关节炎;视神经脊髓炎(德维克氏病(Devic's disease));强直性脊柱炎;脊柱关节炎;牛皮癣;系统性红斑狼疮;炎性肠病,例如克罗恩氏病(Crohn's disease)或溃疡性结肠炎;乳糜泻;哮喘,例如过敏性哮喘或中性粒细胞性哮喘;慢性阻塞性肺病(COPD);癌症,例如乳腺癌、结肠癌、肺癌或卵巢癌;葡萄膜炎;巩膜炎;血管炎;白塞氏病(Behcet's disease);动脉粥样硬化;异位性皮炎;肺气肿;牙周炎;过敏性鼻炎;以及同种异体移植排斥。来自布劳特氏菌属的细菌菌株展示的对Th17炎性反应的作用可以为由IL-17和Th17通路介导的疾病和病状,例如上列疾病和病状提供治疗益处。

[0009] 在优选实施方案中,本发明提供了一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,其用于治疗或预防例如中性粒细胞性哮喘或过敏性哮喘的哮喘的方法中。本发明人已经确定用布劳特氏菌属菌株治疗可以减少中性粒细胞和嗜酸性粒细胞募集到肺中,此可以帮助治疗或预防哮喘。此外,本发明人已经测试和证明布劳特氏菌属菌株在哮喘的小鼠模型中的功效。在某些实施方案中,组合物用于治疗或预防中性粒细胞性哮喘或嗜酸性粒细胞性哮喘的方法中。本发明的组合物展示的对中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的作用意味着其可以特别有效地治疗或预防中性粒细胞性哮喘和嗜酸性粒细胞性哮喘。实际上,在某些实施方案中,组合物用于在哮喘治疗或预防中降低中性粒细胞性炎性反应的方法中,或组合物用于在哮喘治疗或预防中降低嗜酸性粒细胞性炎性反应的方法中。在优选实施方案中,本发明提供了一种包含粪便布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物,其用于治疗哮喘,且尤其嗜酸性粒细胞性或过敏性哮喘。粪便布劳特氏菌在哮喘模型中还展示对中性粒细胞具有特别深远的作用,且用粪便布劳特氏菌治疗可以特别有效地治疗中性粒细胞性哮喘。在某些实施方案中,本发明提供了一种包含韦氏布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物,其用于治疗哮喘,且尤其嗜酸性粒细胞性或过敏性哮喘。

[0010] 在其它优选实施方案中,本发明提供了一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,其用于治疗或预防类风湿性关节炎的方法中。本发明人已经确定用布劳特氏菌属菌株治疗可以在类风湿性关节炎的小鼠模型中提供临床益处且可以减少关节肿胀。在优选实施方案中,本发明提供了一种包含粪便布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物,其用于治疗类风湿性关节炎。使用粪便布劳特氏菌的组合物可以特别有效地治疗类风湿性关节炎。在某些实施方案中,本发明提供了一种包含韦氏布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物,其用于治疗类风湿性关节炎。

[0011] 在其它优选实施方案中,本发明提供了一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,其用于治疗或预防多发性硬化的办法中。本发明人已经确定用布劳特氏菌属菌株治疗

可以降低多发性硬化的小鼠模型中的发病率和疾病严重度。在优选实施方案中，本发明提供了一种包含粪便布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物，其用于治疗多发性硬化。使用粪便布劳特氏菌的组合物可以特别有效地治疗多发性硬化。在某些实施方案中，本发明提供了一种包含韦氏布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物，其用于治疗多发性硬化。

[0012] 在其它优选实施方案中，本发明提供了一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，其用于治疗或预防例如后葡萄膜炎的葡萄膜炎的方法中。本发明人已经确定用布劳特氏菌属菌株治疗可以降低葡萄膜炎的小鼠模型中的发病率和疾病严重度并且可以预防或减少视网膜损伤。在优选实施方案中，本发明提供了一种包含韦氏布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物，其用于治疗葡萄膜炎。使用韦氏布劳特氏菌的组合物可以特别有效治疗葡萄膜炎。在某些实施方案中，本发明提供了一种包含粪便布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物，其用于治疗葡萄膜炎。

[0013] 在其它优选实施方案中，本发明提供了一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，其用于治疗或预防例如乳腺癌、肺癌或肝癌的癌症的方法中。包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物可以减少乳腺癌、肺癌和肝癌的小鼠模型中的肿瘤生长。在某些实施方案中，组合物用于在癌症治疗中减小肿瘤尺寸或预防肿瘤生长的方法中。在某些实施例中，本发明提供了一种包含粪便布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物，其用于治疗癌症。在某些实施方案中，本发明提供了一种包含韦氏布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物，其用于治疗癌症。

[0014] 在某些实施方案中，本发明的组合物用于在由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状的治疗或预防中减少IL-17产生或减少Th17细胞分化的方法中。具体来说，本发明的组合物可以用于在哮喘、类风湿性关节炎或多发性硬化或者哮喘、类风湿性关节炎、多发性硬化、葡萄膜炎或癌症的治疗或预防中减少IL-17产生或减少Th17细胞分化。优选地，本发明提供了包含粪便布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物，其用于在哮喘、类风湿性关节炎或多发性硬化的治疗或预防中减少IL-17产生或减少Th17细胞分化。本发明还提供了包含粪便布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物，其用于在葡萄膜炎的治疗或预防中减少IL-17产生或减少Th17细胞分化。本发明还提供了包含韦氏布劳特氏菌物种的细菌菌株的组合物，其用于在哮喘、类风湿性关节炎或多发性硬化或葡萄膜炎的治疗或预防中减少IL-17产生或减少Th17细胞分化。

[0015] 在某些实施方案中，组合物用于具有高IL-17水平或Th17细胞的患者中。布劳特氏菌属菌株展示的对Th17炎性反应的作用可能特别有益于此类患者。

[0016] 在本发明的优选实施方案中，组合物中的细菌菌株属于粪便布劳特氏菌。也可以使用紧密相关的菌株，例如具有与粪便布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列的细菌菌株。优选地，细菌菌株具有与SEQ ID NO:1或2至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地，序列同一性是针对SEQ ID NO:2。优选地，用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:2表示的16s rRNA序列。

[0017] 在本发明的优选实施方案中，组合物中的细菌菌株属于韦氏布劳特氏菌。也可以使用紧密相关的菌株，例如具有与韦氏布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列的细菌菌株。优选地，细菌菌

株具有与SEQ ID NO:3或4至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地，序列同一性是针对SEQ ID NO:4。优选地，用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:4表示的16s rRNA序列。

[0018] 在某些实施方案中，本发明的组合物用于经口施用。经口施用本发明的菌株可以有效地治疗IL-17或Th17通路介导的疾病和病状。此外，经口施用便于患者和开业医师且允许传递到肠和/或部分或全部定殖肠部。

[0019] 在某些实施方案中，本发明的组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载剂。

[0020] 在某些实施方案中，本发明的组合物包含已冻干的细菌菌株。冻干是一项制备允许传递细菌的稳定组合物的有效和便利的技术。

[0021] 在某些实施方案中，本发明提供了一种包含如上所述的组合物的食品。

[0022] 在某些实施方案中，本发明提供了一种包括如上所述的组合物的疫苗组合物。

[0023] 另外，本发明提供了一种治疗或预防由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状的方法，其包括施用包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物。

[0024] 在研发以上发明时，本发明人已经鉴别和表征特别适用于疗法的细菌菌株。本发明的粪便布劳特氏菌菌株展示有效治疗本文中描述的疾病，例如关节炎、哮喘和多发性硬化。因此，在另一个方面中，本发明提供了一种以登记号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞。本发明还提供了包含此类细胞的组合物或此类细胞的生物纯培养物。本发明还提供了一种以登记号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞，其用于治疗中，尤其用于本文中描述的疾病。

[0025] 在研发以上发明时，本发明人已经鉴别和表征特别适用于疗法的另一细菌菌株。本发明的韦氏布劳特氏菌菌株展示有效治疗本文中描述的疾病，例如葡萄膜炎。因此，在另一个方面中，本发明提供了一种以登记号NCIMB 42486保藏的韦氏布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞。本发明还提供了包含此类细胞的组合物或此类细胞的生物纯培养物。本发明还提供了一种以登记号NCIMB 42486保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞，其用于治疗中，尤其用于本文中描述的疾病。

附图说明

- [0026] 图1:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-总BAL流体细胞计数。
- [0027] 图2:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中总嗜酸性粒细胞计数。
- [0028] 图3:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中嗜酸性粒细胞比例。
- [0029] 图4:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中总巨噬细胞计数。
- [0030] 图5:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中巨噬细胞比例。
- [0031] 图6:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中总中性粒细胞计数。
- [0032] 图7:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中中性粒细胞比例。
- [0033] 图8:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中总淋巴细胞计数。
- [0034] 图9:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中淋巴细胞比例。
- [0035] 图10:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-总BAL流体细胞计数。
- [0036] 图11:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-BALF中总嗜酸性粒细胞计数。

- [0037] 图12:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-BALF中嗜酸性粒细胞比例。
- [0038] 图13:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-BALF中总巨噬细胞计数。
- [0039] 图14:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-BALF中巨噬细胞比例。
- [0040] 图15:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-BALF中总中性粒细胞计数。
- [0041] 图16:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-BALF中中性粒细胞比例。
- [0042] 图17:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-BALF中总淋巴细胞计数。
- [0043] 图18:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-BALF中淋巴细胞比例。
- [0044] 图19:类风湿性关节炎的小鼠模型-体重,第-14天到第0天。数据呈现为初始(第-14天)体重的平均值±SEM百分比。
- [0045] 图20:类风湿性关节炎的小鼠模型-体重,第0天到第42天。数据呈现为初始(第0天)体重的平均值±SEM百分比。当与媒介物处理组比较时,◆ $p<0.05$ 。
- [0046] 图21:类风湿性关节炎的小鼠模型-临床评分。数据呈现为平均值±SEM。当与媒介物处理组中第21天比较时,**** $p<0.0001$ 。当既定日与媒介物处理组比较时,◆ $p<0.05$ 。
- [0047] 图22:类风湿性关节炎的小鼠模型-对II型胶原蛋白的脾细胞增殖反应。基于3H-TdR掺入,每分钟减去培养基本底[CII刺激-培养基本底]计数。所有数据呈现为平均值±SEM。与媒介物组相比,* $p<0.05$ 。
- [0048] 图23:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织培养上清液中IFN γ 的水平。线表示组中位值。
- [0049] 图24:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织培养上清液中IL-17A的水平。线表示组中位值。
- [0050] 图25:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织培养上清液中IL-10的水平。线表示组中位值。
- [0051] 图26:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织培养上清液中IL-6的水平。线表示组中位值。
- [0052] 图27:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-血清中总IgE。
- [0053] 图28:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-血清中HDM特异性IgG1。
- [0054] 图29:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中总IgE。
- [0055] 图30:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-BALF中HDM特异性IgG1。
- [0056] 图31:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-组织学分析-平均细支气管支气管周浸润评分。
- [0057] 图32:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-组织学分析-平均血管周浸润评分。
- [0058] 图33:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-组织学分析-平均炎症评分(细支气管支气管周与血管周浸润评分的平均值)。
- [0059] 图34:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-组织学分析-粘液评分。
- [0060] 图35:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-9水平。
- [0061] 图36:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-1a水平。
- [0062] 图37:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中IFN γ 水平。
- [0063] 图38:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-17A水平。
- [0064] 图39:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-4水平。

- [0065] 图40:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-5水平。
- [0066] 图41:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-1b水平。
- [0067] 图42:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中RANTES水平。
- [0068] 图43:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中MIP-1a水平。
- [0069] 图44:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中KC水平。
- [0070] 图45:屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型-肺组织中MIP-2水平。
- [0071] 图46:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-血清中HDM特异性IgG1。
- [0072] 图47:严重中性粒细胞性哮喘-血清中HDM特异性IgG2a。
- [0073] 图48:严重中性粒细胞性哮喘-BALF中HDM特异性IgG1。
- [0074] 图49:严重中性粒细胞性哮喘-BALF中HDM特异性IgG2a。
- [0075] 图50:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-组织学分析-平均细支气管支气管周湿润评分。
- [0076] 图51:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-组织学分析-平均血管周湿润评分。
- [0077] 图52:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-组织学分析-平均炎症评分(细支气管支气管周与血管周湿润评分的平均值)。
- [0078] 图53:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中TNF α 水平。
- [0079] 图54:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-1a水平。
- [0080] 图55:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中IFN γ 水平。
- [0081] 图56:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-17F水平。
- [0082] 图57:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-1b水平。
- [0083] 图58:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中RANTES水平。
- [0084] 图59:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中MIP-2水平。
- [0085] 图60:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中KC水平。
- [0086] 图61:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-17A水平。
- [0087] 图62:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中MIP-1a水平。
- [0088] 图63:严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型-肺组织中IL-33水平。
- [0089] 图64:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织病理学评分的目测模板。代表性影像展示胶原蛋白诱发的关节炎研究中来自小鼠跗关节的综合评分。
- [0090] 图65:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织病理学:炎症评分。数据呈现为平均值 \pm SEM。当与媒介物处理组比较时,**p<0.01。
- [0091] 图66:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织病理学:软骨评分。数据呈现为平均值 \pm SEM。当与媒介物处理组比较时,***p<0.001。
- [0092] 图67:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织病理学:骨骼评分。数据呈现为平均值 \pm SEM。当与媒介物处理组比较时,***p<0.001。
- [0093] 图68:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织病理学:总评分。数据呈现为平均值 \pm SEM。当与媒介物处理组比较时,***p<0.001。
- [0094] 图69:类风湿性关节炎的小鼠模型-组织病理学:代表性图。在括号之间指示动物ID (#n.n) 和四肢(R为右,L为左)。左影像(媒介物):炎症和纤维化延伸到关节周围的大范围关节和骨骼破坏。

- [0095] 图70:多发性硬化的小鼠模型-临床评分。
- [0096] 图71:多发性硬化的小鼠模型-发病率。
- [0097] 图72:葡萄膜炎的小鼠模型-对IRBP肽的淋巴结增殖反应。基于³H-胸昔掺入,每分钟减去培养基本底[IRBP刺激-培养基本底]计数。所有数据都呈现为平均值+SEM(n=3)。
- [0098] 图73:葡萄膜炎的小鼠模型-对照组中的TEFI评分。数据呈现为平均值±SEM。
- [0099] 图74:葡萄膜炎的小鼠模型-第21天的TEFI评分。数据呈现为平均值±SEM。
- [0100] 图75:LPS诱发的炎症分析-IL-6水平
- [0101] 图76:LPS诱发的炎症分析-TNF α 水平
- [0102] 图77:LPS诱发的炎症分析-Mo-DC成熟水平
- [0103] 图78:卵白蛋白诱发的炎症分析-CD4+细胞水平
- [0104] 发明详述
- [0105] 细菌菌株
- [0106] 本发明的组合物包含布劳特氏菌属的细菌菌株。所述实施例证明此种属的细菌可用于治疗或预防由IL-17或Th17通路介导的疾病和病状。优选的细菌菌株属于布劳特氏菌属。
- [0107] 用于本发明的布劳特氏菌属菌株的实例包括粪便布劳特氏菌、粪布劳特氏菌(*B. faecis*)、球形布劳特氏菌(*B. coccoides*)、格鲁氏布劳特氏菌(*B. glucerasea*)、汉逊氏布劳特氏菌(*B. hansenii*)、氢营养布劳特氏菌(*B. hydrogenotrophica*)、卢氏布劳特氏菌(*B. luti*)、生产布劳特氏菌(*B. producta*)、史氏布劳特氏菌(*B. schinkii*)和韦氏布劳特氏菌。布劳特氏菌属物种是革兰氏反应呈阳性的不运动细菌,其可以是球形或椭圆形,并且都是产生乙酸作为葡萄糖发酵的主要最终产物的专性厌氧菌[16]。布劳特氏菌属可以从人类肠道分离,不过生产布劳特氏菌是从败血症样品分离。粪便布劳特氏菌菌株GAM6-1^T的16S rRNA基因序列的GenBank登记号是HM626177(本文中公开为SEQ ID NO:1)。一种示例性粪便布劳特氏菌菌株描述于[17]中。韦氏布劳特氏菌的模式菌株是WAL 14507=ATCC BAA-1564=DSM 19850[18]。韦氏布劳特氏菌菌株WAL 14507T的16S rRNA基因序列的GenBank登记号是EF036467(本文中公开为SEQ ID NO:3)。此示例性韦氏布劳特氏菌菌株描述于[18]中。
- [0108] 以登记号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌细菌在所述实施例中进行测试且在本文中又称为菌株830。测试的830菌株的16S rRNA序列提供于SEQ ID NO:2中。菌株830由GT Biologics有限公司(Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland)以“粪便布劳特氏菌830”在2015年3月12日保藏在国际保藏局NCIMB有限公司(Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland)并分配登记号NCIMB 42381。GT Biologics有限公司随后将其名称改为4D Pharma Research有限公司。
- [0109] 菌株830的基因组包含染色体和质粒。菌株830的染色体序列提供于SEQ ID NO:5中。菌株830的质粒序列提供于SEQ ID NO:6中。这些序列使用PacBio RS II平台产生。
- [0110] 以登记号NCIMB 42486保藏的韦氏布劳特氏菌细菌在所述实施例中进行测试且在本文中又称为菌株MRX008。测试的MRX008菌株的16S rRNA序列提供于SEQ ID NO:4中。菌株MRX008由4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland)以“布劳特氏菌属/瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)”在2015年11月16日保藏在国际保藏局NCIMB有限公司(Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland)并分

配登记号NCIMB 42486。

[0111] 还预期与实施例中测试的菌株紧密相关的细菌菌株有效治疗或预防由IL-17或Th17通路介导的疾病和病状。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与粪便布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:1或2至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是针对SEQ ID NO:2。优选地,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:2表示的16s rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与韦氏布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:3或4至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是针对SEQ ID NO:4。优选地,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:4表示的16s rRNA序列。

[0112] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:5具有序列同一性的染色体。在优选实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有在SEQ ID NO:5的至少60%(例如至少65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)上与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性(例如至少92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)的染色体。举例来说,用于本发明的细菌菌株可以具有在SEQ ID NO:5的70%上与SEQ ID NO:5至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:5的80%上与SEQ ID NO:5至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:5的90%上与SEQ ID NO:5至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:5的100%上与SEQ ID NO:5至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:5的70%上与SEQ ID NO:5至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:5的80%上与SEQ ID NO:5至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:5的90%上与SEQ ID NO:5至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:5的70%上与SEQ ID NO:5至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:5的80%上与SEQ ID NO:5至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:5的90%上与SEQ ID NO:5至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:5的100%上与SEQ ID NO:5至少98%序列同一的染色体。

[0113] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:6具有序列同一性的质粒。在优选实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有在SEQ ID NO:6的至少60%(例如至少65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)上与SEQ ID NO:6至少90%序列同一(例如至少92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一)的质粒。举例来说,用于本发明的细菌菌株可以具有在SEQ ID NO:6的70%上与SEQ ID NO:6至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:6的80%上与SEQ ID NO:6至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:6的90%上与SEQ ID NO:6至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:6的100%上与SEQ ID NO:6至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:6的70%上与SEQ ID NO:6至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:6的80%上与SEQ ID NO:6至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:6的90%上与SEQ ID NO:6至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:6的100%上与SEQ ID NO:6至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:6的70%上与SEQ ID NO:6至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:6的80%上与SEQ ID NO:6至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:6的90%上与SEQ ID NO:6至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:6的100%上与SEQ ID NO:6至少98%序列同一的质粒。

[0114] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID N0:5具有序列同一性的染色体和与SEQ ID N0:6具有序列同一性的质粒。

[0115] 还预期作为以登记号42381保藏的细菌的生物型的细菌菌株有效治疗或预防由IL-17或Th17通路介导的疾病和病状。还预期作为以登记号42486保藏的细菌的生物型的细菌菌株有效治疗或预防由IL-17或Th17通路介导的疾病和病状。生物型是具有相同或极类似的生理和生物化学特性的密切相关菌株。

[0116] 作为以登记号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的生物型且适合用于本发明中的菌株可以通过对以登记号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的其它核苷酸序列进行测序来鉴别。举例来说,基本上全基因组可以进行测序,且用于本发明的生物型菌株可以在其全基因组的至少80%上(例如在至少85%、90%、95%或99%上或在其全基因组上)具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性。用于鉴别生物型菌株的其它适合序列可以包括hsp60或重复序列,例如BOX、ERIC、(GTG)₅或REP或[19]。生物型菌株可以具有与以登记号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的对应序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一的序列。

[0117] 或者,作为以登记号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的生物型且适用于本发明中的菌株可以通过使用登记号NCIMB 42381保藏物或登记号NCIMB 42486保藏物和限制性片段分析和/或PCR分析,例如通过使用荧光扩增片段长度多态性(fluorescent amplified fragment length polymorphism,FAFLP)和重复DNA组件(rep)-PCR指纹法,或蛋白质谱分析,或部分16S或23s rDNA测序来鉴别。在优选实施方案中,此类技术可以用于鉴别其它粪便布劳特氏菌或韦氏布劳特氏菌菌株。

[0118] 在某些实施方案中,作为以登记号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的生物型且适用于本发明中的菌株是当通过扩增核糖体DNA限制性分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis,ARDRA)进行分析时,例如当使用Sau3AI限制酶(关于示例性方法和指导参见例如[20])时提供与以登记号NCIMB 42381或42486保藏的细菌相同模式的菌株。或者,生物型菌株被确定是具有与以登记号NCIMB 42381或42486保藏的细菌相同的碳水化合物发酵模式的菌株。

[0119] 适用于本发明的组合物和方法的其它布劳特氏菌属菌株,例如以登记号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的生物型可以使用任何适当方法或策略,包括实施例中描述的测定来鉴别。举例来说,用于本发明中的菌株可以通过在厌氧YCFA中培养和/或将细菌施用到II型胶原蛋白诱发的关节炎小鼠模型并接着评估细胞因子水平来鉴别。具体来说,具有与以登记号NCIMB 42381或42486保藏的细菌类似的生长模式、代谢类型和/或表面抗原的细菌菌株可用于本发明。适用的菌株将具有与NCIMB 42381或42486菌株相当的免疫调节活性。具体来说,生物型菌株将对哮喘、关节炎、多发性硬化和葡萄膜炎疾病模型引起与实施例中所示的作用相当的作用,并且对细胞因子水平引起与实施例中所示的作用相当的作用,其可以通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴别。

[0120] 本发明的一种尤其优选的菌株是以登记号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株。它是实施例中测试的示例性830菌株并且展示有效治疗疾病。因此,本发明提供了以登记号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,例如分离细胞。本发明还提供了一种组合物,其包含以登记号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物

的细胞。本发明还提供了一种以登记号NCIMB42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株的生物纯培养物。本发明还提供了以登记号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,其用于治疗中,尤其用于本文中描述的疾病。

[0121] 本发明的一种尤其优选的菌株是以登记号NCIMB 42486保藏的韦氏布劳特氏菌菌株。它是实施例中测试的示例性MRX008菌株并且展示有效治疗疾病。因此,本发明提供了以登记号NCIMB 42486保藏的韦氏布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,例如分离细胞。本发明还提供了一种组合物,其包含以登记号NCIMB 42486保藏的韦氏布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞。本发明还提供了一种以登记号NCIMB 42486保藏的韦氏布劳特氏菌菌株的生物纯培养物。本发明还提供了以登记号NCIMB 42486保藏的韦氏布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,其用于治疗中,尤其用于本文中描述的疾病。

[0122] 以登记号NCIMB 42381或42486保藏的菌株的衍生物可以是子代菌株(后代)或从原始菌株培养(亚克隆)的菌株。本发明菌株的衍生物可以例如在基因水平下进行修饰,而不消除生物活性。具体来说,本发明的衍生菌株具治疗活性。衍生菌株将具有与原始NCIMB 42381或42486菌株相当的免疫调节活性。具体来说,衍生菌株将对哮喘、关节炎、多发性硬化和葡萄膜炎疾病模型引起与实施例中所示的作用相当的作用,并且对细胞因子水平引起与实施例中所示的作用相当的作用,其可以通过使用实施例中描述的培养和施用方案来鉴别。NCIMB 42381菌株的衍生物一般将是NCIMB 42381菌株的生物型。NCIMB 42486菌株的衍生物一般将是NCIMB 42486菌株的生物型。

[0123] 对以登记号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株的细胞的提及涵盖具有与以登记号NCIMB 42381保藏的菌株相同的安全性和治疗功效特性的任何细胞,并且本发明涵盖此类细胞。对以登记号NCIMB 42486保藏的韦氏布劳特氏菌菌株的细胞的提及涵盖具有与以登记号NCIMB 42486保藏的菌株相同的安全性和治疗功效特性的任何细胞,并且本发明涵盖此类细胞。

[0124] 在优选实施方案中,本发明组合物中的细菌菌株能存活并能够部分或全部定殖肠部。

[0125] 治疗用途

[0126] 如实施例中证明,本发明的细菌组合物有效减少Th17炎性反应。具体来说,用本发明的组合物治疗实现IL-17A水平的降低和其它Th17通路细胞因子的减少,以及由IL-17和Th17通路介导的病状的动物模型中的临床改善。因此,本发明的组合物可用于治疗或预防炎性和自身免疫性疾病和尤其由IL-17介导的疾病或病状。具体来说,本发明的组合物可用于减少IL-17炎性反应或预防IL-17炎性反应升高。

[0127] Th17细胞是产生例如IL-17A、IL17-F、IL-21和IL-22的T辅助细胞子集。Th17细胞分化和IL-17表达可能由IL-23驱动。这些细胞因子和其它因子形成Th17通路的重要部分, Th17通路是公认的炎症信号传导通路,其促成且引起大量的炎性和自身免疫性疾病(如例如[21-26]中所述)。使Th17通路活化的疾病是Th17通路介导的疾病。Th17通路介导的疾病可以通过抑制Th17通路来改善或减轻, Th17通路可以通过减少Th17细胞分化或降低其活性或降低Th17通路细胞因子的水平来抑制。由Th17通路介导的疾病可以通过由Th17细胞产生的细胞因子,例如IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22、IL-26、IL-9的水平增加来表征([27]中评述)。由Th17通路介导的疾病可以通过Th-17相关基因,例如Stat3或IL-23R的表达增加来表

征。由Th17通路介导的疾病可能与增加的Th17细胞水平相关。

[0128] IL-17是一种促炎性细胞因子,其促成若干炎性和自身免疫性疾病和病状的发病机理。如本文所用,IL-17可以指IL-17家族的任何成员,包括IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F。IL-17介导的疾病和病状的特征在于罹患所述疾病或病状的组织中IL-17的高表达和/或IL-17阳性细胞的累积或存在。类似地,IL-17介导的疾病和病状是因高IL-17水平或IL-17水平增加而加重且因低IL-17水平或IL-17水平降低而减轻的疾病和病状。IL-17炎性反应可以是局部或全身性的。

[0129] 可能由IL-17或Th17通路介导的疾病和病状的实例包括多发性硬化;关节炎,例如类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣性关节炎或幼年特发性关节炎;视神经脊髓炎(德维克氏病);强直性脊柱炎;脊柱关节炎;牛皮癣;系统性红斑狼疮;炎性肠病,例如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎;乳糜泻;哮喘,例如过敏性哮喘或中性粒细胞性哮喘;慢性阻塞性肺病(COPD);癌症,例如乳腺癌、结肠癌、肺癌或卵巢癌;葡萄膜炎;巩膜炎;血管炎;白塞氏病;动脉粥样硬化;异位性皮炎;肺气肿;牙周炎;过敏性鼻炎;以及同种异体移植排斥。在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防这些病状或疾病中的一种或多种。在其它优选实施方案中,这些病状或疾病由IL-17或Th17通路介导。

[0130] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于在由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状的治疗或预防中减少IL-17产生或减少Th17细胞分化的方法中。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防炎性或自身免疫性疾病,其中所述治疗或预防通过减少Th17炎性反应或预防其升高来实现。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗患有炎性或自身免疫性疾病的患者中,其中所述患者具有高IL-17水平或升高的Th17细胞或展现Th17炎性反应。在某些实施方案中,患者可以经诊断患有慢性炎性或自身免疫性疾病或病状,或本发明的组合物可以用于预防炎性或自身免疫性疾病或病状发展成为慢性炎性或自身免疫性疾病或病状。在某些实施方案中,疾病或病状可能对用TNF- α 抑制剂治疗不起反应。本发明的这些用途可以应用于前段中列出的任何特定疾病或病状。

[0131] IL-17和Th17通路常常与慢性炎性和自身免疫性疾病相关,因此本发明的组合物可能特别适用于治疗或预防如上列出的慢性疾病或病状。在某些实施方案中,组合物用于患有慢性疾病的患者中。在某些实施方案中,组合物用于预防慢性疾病发展。

[0132] 本发明的组合物可用于治疗由IL-17或Th17通路介导的疾病和病状且对付Th17炎性反应,因此本发明的组合物可能特别适用于治疗或预防慢性疾病、治疗或预防对其它疗法(例如用TNF- α 抑制剂治疗)不起反应的患者的疾病,和/或治疗或预防与IL-17和Th17细胞相关的组织损伤和症状。举例来说,已知IL-17活化软骨和骨组织中的基质破坏并且IL-17对软骨细胞和成骨细胞中的基质产生具有抑制作用,因此本发明的组合物可用于治疗或预防骨质侵蚀或软骨损伤。

[0133] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗降低IL-17水平、尤其IL-17A水平或预防其升高。在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗降低TNF α 、IFN- γ 或IL-6水平或预防其升高。这些细胞因子的水平的此类降低或预防水平升高可用于治疗或预防炎性和自身免疫性疾病和病状,尤其由IL-17或Th17通路介导的疾病和病状。

[0134] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗降低CD4+细胞水平或预防CD4+细胞水平升高。在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗降低树突状细胞成熟水平、尤其CD1a+

CD14-单核细胞来源的树突状细胞水平或预防其升高。CD4+细胞水平的此类降低或预防升高或树突状细胞成熟水平的此类降低或预防升高可用于治疗或预防炎性和自身免疫性疾病和病状,尤其由IL-17或Th17通路介导的疾病和病状。

[0135] 哮喘

[0136] 在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防哮喘。实施例证明在用屋尘螨提取物致敏和激发后本发明的组合物减少中性粒细胞和/或嗜酸性粒细胞募集到气道中,因此其可用于治疗或预防哮喘。哮喘是一种特征为气道有炎症且受限制的慢性疾病。哮喘炎症可能由IL-17和/或Th17细胞介导,因此本发明的组合物可以特别有效地预防或治疗哮喘。哮喘炎症可能由嗜酸性粒细胞和/或中性粒细胞介导。

[0137] 在某些实施方案中,哮喘是嗜酸性粒细胞性或过敏性哮喘。嗜酸性粒细胞性和过敏性哮喘的特征是外周血和气道分泌物中嗜酸性粒细胞数目增加且在病理学上与基底膜区域变厚相关并且在药理学上与皮质类固醇反应相关[28]。减少或抑制嗜酸性粒细胞募集或活化的组合物可用于治疗或预防嗜酸性粒细胞性和过敏性哮喘。

[0138] 在其它实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防中性粒细胞性哮喘(或非嗜酸性粒细胞性哮喘)。高中性粒细胞数目与可能对皮质类固醇治疗不敏感的重症哮喘有关。减少或抑制中性粒细胞募集或活化的组合物可用于治疗或预防中性粒细胞性哮喘。

[0139] 嗜酸性粒细胞性和中性粒细胞性哮喘并非是互斥的病状且一般帮助对付嗜酸性粒细胞和中性粒细胞反应任一者的治疗都可用于治疗哮喘。

[0140] 增加的IL-17水平和Th17通路活化与重症哮喘有关,因此本发明的组合物可用于预防重症哮喘的发展或用于治疗重症哮喘。

[0141] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于在哮喘治疗或预防中降低嗜酸性粒细胞性炎性反应的方法中,或用于在哮喘治疗或预防中降低中性粒细胞性炎性反应的方法中。如上所指出,哮喘中高水平嗜酸性粒细胞在病理学上与基底膜区域变厚相关,因此在哮喘治疗或预防中减少嗜酸性粒细胞性炎性反应也许能特别地对付所述疾病的此特征。此外,与升高的嗜酸性粒细胞组合或其不存在的升高的嗜中性粒细胞与重症哮喘和慢性气道变窄有关。因此,减少中性粒细胞性炎性反应可能特别适用于对付重症哮喘。

[0142] 在某些实施方案中,组合物减少过敏性哮喘中的细支气管支气管周浸润,或用于在过敏性哮喘的治疗中减少细支气管支气管周浸润。在某些实施方案中,组合物减少中性粒细胞性哮喘中的细支气管支气管周和/或血管周浸润,或用于在过敏性中性粒细胞性哮喘的治疗中减少细支气管支气管周和/或血管周浸润。

[0143] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗降低TNF α 水平或预防其升高。

[0144] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于减少嗜酸性粒性细胞和/或中性粒细胞性炎性反应的哮喘治疗方法中。在某些实施方案中,待治疗的患者已经或先前已经被鉴别为具有高水平的嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞,例如通过采血或唾液分析来鉴别。

[0145] 本发明的组合物在施用于新生儿或孕妇时可用于预防新生儿中的哮喘发展。组合物可用于预防儿童中的哮喘发展。本发明的组合物可用于治疗或预防成年发作型哮喘。本发明的组合物可用于管理或减轻哮喘。本发明的组合物可能特别适用于减少与由例如屋尘螨等过敏原加重的哮喘相关的症状。

[0146] 治疗或预防哮喘可以指例如减轻症状严重度或降低恶化频率或缩小触发物的范

围,这些症状、恶化和触发物对患者来说会引起问题。

[0147] 关节炎

[0148] 在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)。实施例证明本发明的组合物减少小鼠模型中RA的临床征象,减少软骨和骨骼损伤,并且减少IL-17炎性反应,因此其可用于治疗或预防RA。RA是一种主要影响关节的全身性炎性病症。RA与引起关节肿胀、滑膜增生以及软骨和骨骼破坏的炎性反应有关。IL-17和Th17在RA中可能具有关键作用,例如因为IL-17抑制软骨细胞和成骨细胞中的基质产生,并且活化基质金属蛋白酶的产生和功能,且因为RA疾病活动性与IL-17水平和Th-17细胞数相关[29, 30],因此本发明的组合物可特别有效预防或治疗RA。

[0149] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于在RA治疗或预防中降低IL-17水平或预防IL-17水平升高。在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗降低IL-17水平、尤其IL-17A水平或预防其升高。在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗降低IFN- γ 或IL-6水平或预防其升高。

[0150] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗减少关节肿胀。在某些实施方案中,本发明的组合物用于关节肿胀的患者或经鉴别处于关节肿胀风险中的患者中。在某些实施方案中,本发明的组合物用于减少RA中的关节肿胀的方法中。

[0151] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗减少软骨损伤或骨骼损伤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在RA治疗中减少或预防软骨或骨骼损伤。在某些实施方案中,组合物用于治疗患有严重RA的处于软骨或骨骼损伤风险中的患者。

[0152] IL-17水平和Th17细胞数增加与RA中软骨和骨组织破坏有关[29, 30]。已知IL-17活化软骨和骨组织中的基质破坏并且IL-17对软骨细胞和成骨细胞中的基质产生具有抑制作用。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物用于在RA治疗中预防骨质侵蚀或软骨损伤。在某些实施方案中,组合物用于治疗展现骨质侵蚀或软骨损伤的患者或经鉴别处于骨质侵蚀或软骨损伤风险中的患者。

[0153] TNF- α 也与RA相关,但TNF- α 不参与此病后期的发病机理。相比之下,IL-17在整个慢性疾病阶段具有作用[31]。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗慢性RA或晚期RA,例如包括关节破坏和软骨丧失的疾病。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗先前已接受抗TNF- α 疗法的患者。在某些实施方案中,尚未治疗的患者不对或不再对抗TNF- α 疗法起反应。

[0154] 本发明的组合物可用于调节患者的免疫系统,因此,在某些实施方案中,本发明的组合物用于预防已经被鉴别为处于RA风险中或已经被诊断为患有早期RA的患者的RA。本发明的组合物可用于预防RA发展。

[0155] 本发明的组合物可用于管理或减轻RA。本发明的组合物可能特别适用于减少与关节肿胀或骨组织破坏相关的症状。治疗或预防RA可指例如减轻症状严重度或降低恶化频率或缩小触发物的范围,这些症状、恶化和触发物对患者来说会引起问题。

[0156] 多发性硬化

[0157] 在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防多发性硬化。实施例证明本发明的组合物降低多发性硬化小鼠模型(EAE模型)的发病率和疾病严重度,因此其可用于治疗或预防多发性硬化。多发性硬化是一种与神经元、特别是脑和脊柱中的神经元的髓鞘

损伤相关的炎性病症。多发性硬化是一种慢性疾病,其逐步丧失活动能力且连串进展。IL-17和Th17细胞在多发性硬化中可能具有关键作用,例如因为IL-17水平可能与多发性硬化病变相关,IL-17会破坏血脑屏障内皮细胞的紧密接头,且Th17细胞会迁移到中枢神经系统中并引起神经元丧失[32,33]。因此,本发明的组合物可以特别有效预防或治疗多发性硬化。

[0158] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗降低发病率或疾病严重度。在某些实施方案中,本发明的组合物用于降低发病率或疾病严重度。在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗预防运动功能衰退或改善运动功能。在某些实施方案中,本发明的组合物用于预防运动功能衰退或用于改善运动功能。在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗预防出现瘫痪。在某些实施方案中,本发明的组合物在多发性硬化治疗中用于预防瘫痪。

[0159] 本发明的组合物可用于调节患者的免疫系统,因此,在某些实施方案中,本发明的组合物用于预防已经被鉴别为处于多发性硬化风险中或已经被诊断为患有早期多发性硬化或“复发缓解型”多发性硬化的患者的多发性硬化。本发明的组合物可用于预防出现硬化症。实际上,实施例展示施用本发明的组合物预防许多小鼠中出现疾病。

[0160] 本发明的组合物可用于管理或减轻多发性硬化。本发明的组合物可能特别适用于减少与多发性硬化相关的症状。治疗或预防多发性硬化可以指例如减轻症状严重度或降低恶化频率或缩小触发物的范围,这些症状、恶化和触发物对患者来说会产生问题。

[0161] 葡萄膜炎

[0162] 在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防葡萄膜炎。实施例证明本发明的组合物降低葡萄膜炎的动物模型的发病率和疾病严重度,因此其可用于治疗或预防葡萄膜炎。葡萄膜炎是葡萄膜炎症且会引起视网膜组织破坏。其可以呈不同解剖形式(前葡萄膜炎、中间葡萄膜炎、后葡萄膜炎或弥漫性葡萄膜炎)存在且由不同但相关的病因引起,包括全身性自身免疫性病状。IL-17和Th17通路主要与葡萄膜炎相关,因此本发明的组合物可以特别有效地预防或治疗葡萄膜炎。参考文献[34-41]描述葡萄膜炎患者中升高血清水平的介白素-17A,IL17A基因变异体与全葡萄膜炎特定相关,Th17相关的细胞因子在实验自身免疫性葡萄膜炎的发病机理中的作用,在单相实验自身免疫性葡萄膜炎期间Th17细胞与调节T细胞之间的不平衡,葡萄膜炎和活动性亚当=白塞病和沃格特-小柳-原田(Vogt-Koyanagi-Harada, VKH)病患者中IL-17A上调,用苏金单抗(secukinumab)(抗IL-17A抗体)治疗非感染性葡萄膜炎,和葡萄膜炎眼睛中的Th17。

[0163] 在某些实施方案中,葡萄膜炎是后葡萄膜炎。后葡萄膜炎主要存在着视网膜和脉络膜炎症,并且实施例证明本发明的组合物有效减少视网膜炎症和损伤。

[0164] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗减少视网膜损伤。在某些实施方案中,本发明的组合物在葡萄膜炎治疗中用于减少或预防视网膜损伤。在某些实施方案中,组合物用于治疗处于视网膜损伤风险中的严重葡萄膜炎患者。在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗减少视神经盘炎症。在某些实施方案中,本发明的组合物用于减少或预防视神经盘炎症。在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗减少炎性细胞浸润视网膜组织。在某些实施方案中,本发明的组合物用于减少炎性细胞浸润视网膜组织。在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗维持或改善视力。在某些实施方案中,本发明的组合物用于维持或改善视力。

[0165] 在某些实施方案中,组合物用于治疗或预防与非感染性或自身免疫性疾病,例如白塞氏病、克罗恩氏病、富克斯异色性虹膜睫状体炎 (*Fuchs heterochromic iridocyclitis*)、肉芽肿病伴多血管炎、HLA-B27相关葡萄膜炎、幼年特发性关节炎、结节病、脊柱关节炎、交感性眼炎、小管间质性肾炎和葡萄膜炎综合征或沃格特-小柳-原田综合征相关的葡萄膜炎。IL-17A已经显示与例如白塞氏病和沃格特-小柳-原田疾病相关。

[0166] 葡萄膜炎的治疗或预防可以指例如减轻症状严重度或预防复发。

[0167] 癌症

[0168] 在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防癌症。IL-17和Th17通路在癌症发展和进展中具有重要作用,因此本发明的组合物可用于治疗或预防癌症。

[0169] 虽然IL-17和Th17细胞在癌症中的作用尚未完全了解,但已知IL-17和Th17细胞的许多促肿瘤作用。举例来说,Th17细胞和IL-17可以促进血管生成,增加增生和肿瘤细胞存活并且活化促肿瘤转录因子[42-44]。

[0170] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗减小肿瘤尺寸或减少肿瘤生长。在某些实施方案中,本发明的组合物用于减小肿瘤尺寸或减少肿瘤生长。本发明的组合物可以有效减小肿瘤尺寸或生长。在某些实施方案中,本发明的组合物用于具有实体瘤的患者中。在某些实施方案中,本发明的组合物在癌症治疗中用于减少或预防血管生成。IL-17和Th17细胞在血管生成中具有重要作用。在某些实施方案中,本发明的组合物用于预防转移。

[0171] 在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防乳腺癌。本发明的组合物可以有效治疗乳腺癌,并且IL-17和Th17细胞在乳腺癌中具有重要作用[45]。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在乳腺癌治疗中减小肿瘤尺寸,减少肿瘤生长,或减少血管生成。在优选实施方案中,癌症是乳腺癌。在优选实施方案中,癌症是IV期乳腺癌。

[0172] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防肺癌。本发明的组合物可以有效治疗肺癌,并且IL-17和Th17细胞在肺癌中具有重要作用[46]。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在肺癌治疗中减小肿瘤尺寸,减少肿瘤生长,或减少血管生成。在优选实施方案中,癌症是肺癌。

[0173] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防肝癌。本发明的组合物可以有效治疗肝癌,并且IL-17和Th17细胞在肝癌中具有重要作用[47]。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在肝癌治疗中减小肿瘤尺寸,减少肿瘤生长,或减少血管生成。在优选实施方案中,癌症是肝癌(肝细胞癌)。

[0174] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防癌瘤。本发明的组合物可以尤其有效治疗癌瘤。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防非免疫原性癌。本发明的组合物可以有效治疗非免疫原性癌。

[0175] 在其它实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防急性成淋巴细胞性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL)、急性骨髓性白血病、肾上腺皮质癌、基细胞癌瘤、胆管癌、膀胱癌、骨肿瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、乳腺癌、支气管腺癌/类癌瘤、伯基特氏淋巴瘤 (*Burkitt's lymphoma*)、类癌瘤肿瘤、子宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性脊髓增生病、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤因肉瘤 (*Ewing's sarcoma*)、眼内黑色素瘤、视网

膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠基质肿瘤(gastrointestinal stromal tumor,GIST)、生殖细胞肿瘤、儿童期视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、黑色素瘤、胰岛细胞癌瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi sarcoma)、肾细胞癌、喉癌、白血病、淋巴瘤、间皮瘤、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺癌、咽癌、垂体腺瘤、浆细胞瘤形成、前列腺癌、肾细胞癌瘤、视网膜母细胞瘤、肉瘤、睾丸癌、甲状腺癌或子宫癌。

[0176] 本发明的组合物可能在与其它治疗剂组合使用时特别有效。本发明组合物的免疫调节作用可能在与更直接的抗癌剂组合时有效。因此，在某些实施方案中，本发明提供了一种组合物，其包含布劳特氏菌属的细菌菌株和抗癌剂。在优选实施方案中，抗癌剂是免疫检查点抑制剂、靶向抗体免疫疗法、CAR-T细胞疗法、溶瘤病毒或抑制细胞生长药物。在优选实施方案中，组合物包含选自由以下组成的群组的抗癌剂：Yervoy(易普利单抗(ipilimumab),BMS);Keytruda(派姆单抗(pembrolizumab),Merck);Opdivo(纳武单抗(nivolumab),BMS);MEDI4736(AZ/MedImmune);MPDL3280A(Roche/Genentech);曲美目单抗(Tremelimumab)(AZ/MedImmune);CT-011(皮利珠单抗(pidilizumab),CureTech);BMS-986015(利鲁单抗(lirilumab),BMS);MEDI0680(AZ/MedImmune);MSB-0010718C(Merck);PF-05082566(Pfizer);MEDI6469(AZ/MedImmune);BMS-986016(BMS);BMS-663513(优瑞路单抗(urelumab),BMS);IMP321(Prima Biomed);LAG525(Novartis);ARGX-110(arGEN-X);PF-05082466(Pfizer);CDX-1127(瓦利路单抗(varlilumab);CellDex Therapeutics);TRX-518(GITR Inc.);MK-4166(Merck);JTX-2011(Jounce Therapeutics);ARGX-115(arGEN-X);NLG-9189(英多莫德(indoximod),NewLink Genetics);INCB024360(Icyte);IPH2201(Innate Immotherapeutics/AZ);NLG-919(NewLink Genetics);抗VISTA(JnJ);依帕斯塔特(Epacadostat)(INCB24360,Icyte);F001287(Flexus/BMS);CP 870893(University of Pennsylvania);MGA271(Macrogenix);依玛珠单抗(Emactuzumab)(Roche/Genentech);加尼斯替(Galunisertib)(Eli Lilly);优库路单抗(Ulocuplumab)(BMS);BKT140/BL8040(Biokine Therapeutics);巴维昔单抗(Bavituximab)(Peregrine Pharmaceuticals);CC 90002(Celgene);852A(Pfizer);VTX-2337(VentiRx Pharmaceuticals);IMO-2055(Hybridon,Idera Pharmaceuticals);LY2157299(Eli Lilly);EW-7197(Ewha Women's University,Korea);威罗菲尼(Vemurafenib)(Plexxikon);达拉菲尼(Dabrafenib)(Genentech/GSK);BMS-777607(BMS);BLZ945(Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre);Unituxin(地土昔单抗(dinutuximab),United Therapeutics Corporation);Blincyto(布尔莫单抗(blinatumomab),Amgen);Cyramza(雷莫芦单抗(ramucirumab),Eli Lilly);Gazyva(欧努珠单抗(obinutuzumab),Roche/Biogen);Kadcyla(阿多曲妥珠单抗恩他新(ado-trastuzumab emtansine),Roche/Genentech);Perjeta(帕妥珠单抗(pertuzumab),Roche/Genentech);Adcetris(布瑞西单抗维多新(brentuximab vedotin),Takeda/Millennium);Arzerra(奥法木单抗(ofatumumab),GSK);Vectibix(帕尼单抗(panitumumab),Amgen);Avastin(贝伐单抗(bevacizumab),Roche/Genentech);Erbitux(西妥昔单抗(cetuximab),BMS/Merck);Bexxar(托西莫单抗(tositumomab)-I131,GSK);Zevalin(替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan),Biogen);Campath(阿仑单抗(alemtuzumab),Bayer);Mylotarg(吉妥珠单抗奥唑米星(gemtuzumab

ozogamicin), Pfizer); Herceptin(曲妥珠单抗(trastuzumab), Roche/Genentech); Rituxan(利妥昔单抗(rituximab), Genentech/Biogen); 伏洛昔单抗(volociximab) (Abbvie); 艾那维单抗(Enavatuzumab) (Abbvie); ABT-414 (Abbvie); 埃罗妥珠单抗(Elotuzumab) (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Ablynx); 奥扎利单抗(Ozaralizumab) (Ablynx); 埃替单抗(Actimab)-C (Actinium); 埃替单抗-P (Actinium); 米拉珠单抗-多柔比星(Milatuzumab-dox) (Actinium); Emab-SN-38 (Actinium); 伊土莫单抗(Naptumonmab estafenatox) (Active Biotech); AFM13 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (萨玛利单抗(samalizumab), Alexion); ALT-836 (Altor Bioscience); ALT-801 (Altor Bioscience); ALT-803 (Altor Bioscience); AMG780 (Amgen); AMG 228 (Amgen); AMG820 (Amgen); AMG172 (Amgen); AMG595 (Amgen); AMG110 (Amgen); AMG232 (阿达木单抗(adecatumumab), Amgen); AMG211 (Amgen/MedImmune); BAY20-10112 (Amgen/Bayer); 瑞洛土单抗(Rilotumumab) (Amgen); 戴诺素单抗(Denosumab) (Amgen); AMP-514 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/MedImmune); MEDI6383 (AZ/Med Immune); MEDI551 (AZ/MedImmune); 帕莫西单抗(Moxetumomabpasudotox) (AZ/MedImmune); MEDI565 (AZ/MedImmune); MEDI0639 (AZ/MedImmune); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MEDI562 (AZ/MedImmune); AV-380 (AVEO); AV203 (AVEO); AV299 (AVEO); BAY79-4620 (Bayer); 拉安土单抗(Anetumab ravidansine) (Bayer); 万替珠单抗(vantictumab) (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); 西罗珠单抗(Sibrotuzumab) (Boehringer Ingelheim); BI-836845 (Boehringer Ingelheim); B-701 (BioClin); BIIB015 (Biogen); 欧努珠单抗(Biogen/Genentech); BI-505 (Bioinvent); BI-1206 (Bioinvent); TB-403 (Bioinvent); BT-062 (Biotest); BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS); 奈西莫单抗(Necitumumab) (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex); CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo); 帕曲土单抗(patritumab) (Daiichi Sankyo); 替加土单抗(tigatuzumab) (Daiichi Sankyo); 尼妥珠单抗(nimotuzumab) (Daiichi Sankyo); DS-8895 (Daiichi Sankyo); DS-8873 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORab-004 (Eisai); MORab-009 (Eisai); MORab-003 (Eisai); MORab-066 (Eisai); LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212 (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly); 西妥木单抗(cixutumumab) (Eli Lilly); 法拉维单抗(Flavotumab) (Eli Lilly); IMC-TR1 (Eli Lilly); 雷莫芦单抗(Eli Lilly); 塔巴木单抗(Tabalumab) (Eli Lilly); 扎诺利单抗(Zanolimumab) (Emergent Biosolution); FG-3019 (FibroGen); FPA008 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics); FPA144 (Five Prime Therapeutics); 卡妥索单抗(catumaxomab) (Fresenius Biotech); IMAB362 (Ganymed); IMAB027 (Ganymed); HuMax-CD74 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745 (Gilead); GS-6624 (Gilead); OMP-21M18 (登西珠单抗(demcizumab), GSK); 马帕木单抗(mapatumumab) (GSK); IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen); IMGN853 (ImmunoGen); IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130 (Immunomedics); 米拉珠单抗-多柔比星(Immunomedics); IMMU-115 (Immunomedics); IMMU-132 (Immunomedics); IMMU-106 (Immunomedics); IMMU-102

(Immunomedics) ; 依帕珠单抗 (Epratuzumab) (Immunomedics) ; 克利瓦单抗 (Clivatuzumab) (Immunomedics) ; IPH41 (Innate Immunotherapeutics) ; 达拉土单抗 (Daratumumab) (Janssen/Genmab) ; CNT0-95 (Intetumumab, Janssen) ; CNT0-328 (西妥昔单抗 (siltuximab), Janssen) ; KB004 (KaloBios) ; 莫加利单抗 (mogamulizumab) (Kyowa Hakko Kirrin) ; KW-2871 (依美昔单抗 (ecromeximab), Life Science) ; 索奈珠单抗 (Sonepcizumab) (Lpath) ; 马士西单抗 (Margetuximab) (Macrogenics) ; 恩利珠单抗 (Enoblituzumab) (Macrogenics) ; MGD006 (Macrogenics) ; MGF007 (Macrogenics) ; MK-0646 (达洛珠单抗 (dalotuzumab), Merck) ; MK-3475 (Merck) ; Sym004 (Symphogen/Merck Serono) ; DI17E6 (Merck Serono) ; MOR208 (Morphosys) ; MOR202 (Morphosys) ; Xmab5574 (Morphosys) ; BPC-1C (恩斯土单抗 (ensituximab), Precision Biologics) ; TAS266 (Novartis) ; LFA102 (Novartis) ; BHQ880 (Novartis/Morphosys) ; QGE031 (Novartis) ; HCD122 (卢卡木单抗 (lucatumumab), Novartis) ; LJM716 (Novartis) ; AT355 (Novartis) ; OMP-21M18 (登西珠单抗, OncoMed) ; OMP52M51 (Oncomed/GSK) ; OMP-59R5 (Oncomed/GSK) ; 万替珠单抗 (Oncomed/Bayer) ; CMC-544 (奥英妥珠单抗 (inotuzumab ozogamicin), Pfizer) ; PF-03446962 (Pfizer) ; PF-04856884 (Pfizer) ; PSMA-ADC (Progenics) ; REGN1400 (Regeneron) ; REGN910 (奈瓦库单抗 (nesvacumab), Regeneron/Sanofi) ; REGN421 (恩替库单抗 (enotucumab), Regeneron/Sanofi) ; RG7221、RG7356、RG7155、RG7444、RG7116、RG7458、RG7598、RG7599、RG7600、RG7636、RG7450、RG7593、RG7596、DCDS3410A、RG7414 (帕萨珠单抗 (parsatuzumab)) 、RG7160 (伊佳珠单抗 (imgatuzumab)) 、RG7159 (欧宾珠单抗 (obintuzumab)) 、RG7686、RG3638 (欧奈珠单抗 (onartuzumab)) 、RG7597 (Roche/Genentech) ; SAR307746 (Sanofi) ; SAR566658 (Sanofi) ; SAR650984 (Sanofi) ; SAR153192 (Sanofi) ; SAR3419 (Sanofi) ; SAR256212 (Sanofi) , SGN-LIV1A (林妥珠单抗 (lintuzumab), Seattle Genetics) ; SGN-CD33A (Seattle Genetics) ; SGN-75 (马维珠单抗 (vorsetuzumab mafodotin), Seattle Genetics) ; SGN-19A (Seattle Genetics) ; SGN-CD70A (Seattle Genetics) ; SEA-CD40 (Seattle Genetics) ; 替伊莫单抗 (Spectrum) ; MLN0264 (Takeda) ; 加尼妥单抗 (ganitumab) (Takeda/Amgen) ; CEP-37250 (Teva) ; TB-403 (Thrombogenic) ; VB4-845 (Viventia) ; Xmab2512 (Xencor) ; Xmab5574 (Xencor) ; 尼妥珠单抗 (YM Biosciences) ; 卡路单抗 (Carlumab) (Janssen) ; NY-ESO TCR (Adaptimmune) ; MAGE-A-10TCR (Adaptimmune) ; CTL019 (Novartis) ; JCAR015 (Juno Therapeutics) ; KTE-C19CAR (Kite Pharma) ; UCART19 (Celllectis) ; BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals) ; BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals) ; ATTCK20 (Unum Therapeutics) ; CAR-NKG2D (Celyad) ; Onyx-015 (Onyx Pharmaceuticals) ; H101 (Shanghai Sunwaybio) ; DNX-2401 (DNAtrix) ; VCN-01 (VCN Biosciences) ; Colo-Ad1 (Psi0xus Therapeutics) ; ProstAtak (Advantagene) ; Oncos-102 (Oncos Therapeutics) ; CG0070 (Cold Genesys) ; Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics) ; GL-ONC1 (Genelux) ; T-VEC (Amgen) ; G207 (Medigene) ; HF10 (Takara Bio) ; SEPREHVIR (HSV1716, Virttu Biologics) ; OrienX010 (OrienGene Biotechnology) ; Reolysin (Oncolytics Biotech) ; SVV-001 (Neotropix) ; Cacatak (CVA21, Viralytics) ; Alimta (Eli Lilly) 、顺铂 (cisplatin) 、奥沙利铂 (oxaliplatin) 、伊立替康 (irinotecan) 、亚叶酸 (folinic acid) 、甲氨蝶呤 (methotrexate) 、环磷酰胺 (cyclophosphamide) 、5-氟尿

嘧啶(5-fluorouracil)、Zykadia(Novartis)、Tafinlar(GSK)、Xalkori(Pfizer)、Iressa(AZ)、Gilotrif(Boehringer Ingelheim)、Tarceva(Astellas Pharma)、Halaven(Eisai Pharma)、Veliparib(abbvie)、AZD9291(AZ)、阿雷替尼(Alectinib)(Chugai)、LDK378(Novartis)、盖纳特皮(Genetespib)(Synta Pharma)、Tergenpumatumucel-L(NewLink Genetics)、GV1001(Kael-GemVax)、替瓦替尼(Tivantinib)(ArQule);Cytoxan(BMS);Oncovin(Eli Lilly);阿霉素(Adriamycin)(Pfizer);Gemzar(Eli Lilly);Xeloda(Roche);Ixempra(BMS);Abraxane(Celgene);Trelstar(Debiopharm);Taxotere(Sanofi);Nexavar(Bayer);IMMU-132(Immunomedics);E7449(Eisai);Thermodox(Celsion);Cometriq(Exelixis);Lonsurf(Taiho Pharmaceuticals);Camptosar(Pfizer);UFT(Taiho Pharmaceuticals);和TS-1(Taiho Pharmaceuticals)。

[0177] 施用模式

[0178] 优选地,本发明的组合物待施用于胃肠道,以便能够传递到肠和/或使本发明的细菌菌株部分或全部定殖肠部。一般地,虽然本发明的组合物经口施用,但其可以经直肠、鼻内或通过颊或舌下途径施用。

[0179] 在某些实施方案中,本发明的组合物可以呈泡沫、喷雾或凝胶形式施用。

[0180] 在某些实施方案中,本发明的组合物可以呈栓剂,例如直肠栓剂,例如呈可可豆油(可可脂)、合成硬脂(例如suphocire、witepsol)、甘油基-明胶、聚乙二醇或肥皂甘油组合物的形式施用。

[0181] 在某些实施方案中,本发明的组合物通过管,例如鼻饲管、口胃管、胃管、空肠造口管(J型管)、经皮内窥镜胃造口术(percutaneous endoscopic gastrostomy,PEG)或端口,例如通向胃、空肠和其它适合进入端口的胸壁端口施用于胃肠道。

[0182] 本发明的组合物可以施用一次,或其可以作为治疗方案一部分连续施用。在某些实施方案中,本发明的组合物将每日施用。

[0183] 在本发明的某些实施方案中,根据本发明的治疗伴随有患者肠微生物丛的评估。如果未实现本发明的菌株传递和/或部分或全部定殖未实现,从而未观测到功效,那么可以重复治疗,如果传递和/或部分或全部定殖成功且观测到功效,那么可以停止治疗。

[0184] 在某些实施方案中,本发明的组合物可以施用于怀孕动物,例如哺乳动物,例如人类,以预防炎性或自身免疫性疾病在其子女中在出生前和/或出生后出现。

[0185] 本发明的组合物可以施用于经诊断为患有由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状或已经被鉴别为处于由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状风险中的患者。组合物也可以作为预防措施施用以预防健康患者中由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状出现。

[0186] 本发明的组合物可以施用于已经被鉴别为具有异常肠微生物丛的患者。举例来说,患者可以具有减少或缺乏的布劳特氏菌属和尤其粪便布劳特氏菌或韦氏布劳特氏菌的定殖。

[0187] 本发明的组合物可以作为食品,例如营养增补剂施用。

[0188] 一般地,本发明的组合物用于治疗人类,不过其可以用于治疗动物,包括单胃哺乳动物,例如家禽、猪、猫、犬、马或兔。本发明的组合物可用于增强动物的生长和性能。如果施用于动物,那么可以使用经口管饲法。

[0189] 组合物

[0190] 一般地,本发明的组合物包含细菌。在本发明的优选实施方案中,组合物呈冻干形式配制。举例来说,本发明的组合物可以包含含有本发明的细菌菌株的颗粒或明胶胶囊,例如硬明胶胶囊。

[0191] 优选地,本发明的组合物包含冻干细菌。细菌冻干是一种成熟的程序且相关指导可于例如参考文献[48-50]中获得。

[0192] 或者,本发明的组合物可以包含活的活性细菌培养物。

[0193] 在优选实施方案中,本发明的组合物被囊封成能够传递细菌菌株到肠。囊封保护组合物免于降解,直到通过例如用化学或物理刺激,例如压力、酶活性或物理性崩解(其可以通过pH值改变而触发)进行破裂而在目标位置传递。可以使用任何适当囊封法。示例性囊封技术包括截留在多孔基质内、附着或吸附在固体载体表面上、通过絮凝或利用交联剂而自我凝聚以及机械密封在微孔膜或微胶囊后。关于可用于制备本发明的组合物的囊封的指导可以于例如参考文献[51]和[52]中获得。

[0194] 组合物可以经口施用且可以呈片剂、胶囊或散剂形式。囊封产品是优选的,因为布劳特氏菌属是厌氧菌。其它成分(例如维生素C)可以作为除氧剂和益生元基质而包括以改善活体内传递和/或部分或全部定殖和存活。或者,本发明的益生组合物可以作为食品或营养产品,例如基于牛奶或乳清的发酵乳制品,或作为药品经口施用。

[0195] 组合物可以被配制为益生菌。

[0196] 本发明的组合物包括治疗有效量的本发明的细菌菌株。治疗有效量的细菌菌株足以对患者发挥有益作用。治疗有效量的细菌菌株可以足够传递到患者肠部和/或部分或全部定殖患者肠部。

[0197] 例如适合于成年人的细菌日剂量可以是约 1×10^3 到约 1×10^{11} 菌落形成单位(colony forming unit, CFU);例如约 1×10^7 到约 1×10^{10} CFU;在另一实例中,约 1×10^6 到约 1×10^{10} CFU。

[0198] 在某些实施方案中,组合物含有相对于组合物的重量,约 1×10^6 到约 1×10^{11} CFU/g,例如约 1×10^8 到约 1×10^{10} CFU/g的量的细菌菌株。剂量可以是例如1g、3g、5g和10g。

[0199] 通常,益生菌,例如本发明的组合物,任选地与至少一种适合益生元化合物组合。益生元化合物通常是不易消化的碳水化合物,例如寡糖或多糖,或糖醇,其在上部消化道中不降解或吸收。已知的益生元包括商业产品,例如菊糖和反式半乳寡糖。

[0200] 在某些实施方案中,本发明的益生菌组合物包括相对于组合物总重量,约1到约30重量%(例如5到20重量%)的量的益生元化合物。碳水化合物可以选自由以下组成的群组:果寡糖(或FOS)、短链果寡糖、菊糖、异麦芽寡糖、果胶、木寡糖(或XOS)、几丁寡糖(或COS)、 β -葡聚糖、阿拉伯胶改性和抗性淀粉、聚葡萄糖、D-塔格糖、阿拉伯胶纤维、角豆树、燕麦和柑桔纤维。在一个方面中,益生元是短链果糖-寡糖(下文中简单起见展示为FOSs-c.c);所述FOSs-c.c是不可消化的碳水化合物,一般由甜菜糖转变获得并且包括三个葡萄糖分子键结的蔗糖分子。

[0201] 本发明的组合物可以包含药学上可接受的赋形剂或载剂。此类适合赋形剂的实例可以见于参考文献[53]中。用于治疗用途的可接受的载剂或稀释剂是医药技术中众所周知的并且描述于例如参考文献[54]中。适合载剂的实例包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇、山梨糖醇等等。适合稀释剂的实例包括乙醇、甘油和水。医药载剂、赋

形剂或稀释剂的选择可以针对预期施用途径和标准医药实践来选择。药物组合物可以包含任何适合粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包被剂、增溶剂作为载剂、赋形剂或稀释剂或除载剂、赋形剂或稀释剂之外可以包含所述物质。适合粘合剂的实例包括淀粉、明胶、天然糖(例如葡萄糖、无水乳糖、自由流动乳糖、 β -乳糖、玉米甜味剂)、天然和合成胶(例如阿拉伯胶、黄蓍胶或海藻酸钠)、羧甲基纤维素和聚乙二醇。适合润滑剂的实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等等。防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂可以提供于药物组合物中。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可以使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0202] 本发明的组合物可以被配制为食品。举例来说,除本发明的治疗作用之外,食品可以提供营养益处,例如在营养增补剂中。类似地,食品可以被配制成增强本发明组合物的口味,或通过使其更类似于常见食品而非药物组合物而使得组合物食用起来更具吸引力。在某些实施方案中,本发明的组合物被配制为基于牛奶的产品。术语“基于牛奶的产品”意指具有变化脂肪含量的任何基于牛奶或乳清的液体或半固体产品。基于牛奶的产品可以是例如奶牛奶、山羊奶、绵羊奶、脱脂乳、全脂奶、无任何加工下由奶粉与乳清重组而来的牛奶或加工产品,例如酸奶酪、凝乳、凝块、酸牛奶、酸全脂奶、白脱牛奶和其它酸牛奶产品。另一重要群组包括乳制饮料,例如乳清饮料、发酵牛奶、炼乳、婴儿或婴孩牛奶;增香乳、冰淇淋;含牛奶的食品,例如甜点。

[0203] 在某些实施方案中,本发明的组合物含有单一细菌菌株或物种且不含有任何其它细菌菌株或物种。此类组合物可以仅仅包含最低限度量或生物学上不相关量的其它细菌菌株或物种。此类组合物可以是基本上不含其它生物体物种的培养物。

[0204] 根据本发明使用的组合物可能需要或可能不需要上市批准。

[0205] 在一些情况下,冻干细菌菌株在施用之前复原。在一些情况下,复原是通过使用本文中描述的稀释剂。

[0206] 本发明的组合物可以包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂。

[0207] 在某些实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,其包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载剂或稀释剂;其中细菌菌株在施用于有需要的受试者时量足够治疗病症;并且其中病症选自由以下组成的群组:哮喘、过敏性哮喘、中性粒细胞性哮喘、骨关节炎、牛皮癣性关节炎、幼年特发性关节炎、视神经脊髓炎(德维克氏病)、强直性脊柱炎、脊柱关节炎、系统性红斑狼疮、乳糜泻、慢性阻塞性肺病(COPD)、癌症、乳腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、葡萄膜炎、巩膜炎、血管炎、白塞氏病、动脉粥样硬化、异位性皮炎、肺气肿、牙周炎、过敏性鼻炎和同种异体移植排斥。

[0208] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,其包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载剂或稀释剂;其中细菌菌株的量足够治疗或预防由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状。在优选实施方案中,所述疾病或病状选自由以下组成的群组:类风湿性关节炎、多发性硬化、牛皮癣、炎性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、哮喘、过敏性哮喘、中性粒细胞性哮喘、骨关节炎、牛皮癣性关节炎、幼年特发性关节炎、视神经脊髓炎(德维克氏病)、强直性脊柱炎、脊柱关节炎、系统性红斑狼疮、慢性阻塞性肺病(COPD)、癌症、乳腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、葡萄膜炎、巩膜炎、血管炎、白塞氏病、动脉粥样硬化、异位性皮炎、肺气肿、牙周炎、过敏性鼻炎和同种异体移植排斥。

[0209] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其中细菌菌株的量是相对于组合物的重量每克约 1×10^3 到约 1×10^{11} 菌落形成单位。

[0210] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其中组合物以1g、3g、5g或10g的剂量施用。

[0211] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其中组合物通过选自由口腔、直肠、皮下、鼻、颊和舌下组成的群组的方法施用。

[0212] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其包含选自由乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇和山梨糖醇组成的群组的载剂。

[0213] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其包含选自由乙醇、甘油和水组成的群组的稀释剂。

[0214] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其包含选自由以下组成的群组的赋形剂:淀粉、明胶、葡萄糖、无水乳糖、自由流动的乳糖、 β -乳糖、玉米甜味剂、阿拉伯胶、黄蓍胶、海藻酸钠、羧甲基纤维素、聚乙二醇、油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠和氯化钠。

[0215] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其进一步包含防腐剂、抗氧化剂和稳定剂中的至少一种。

[0216] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其包含选自由苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯组成的群组的防腐剂。

[0217] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其中所述细菌菌株是冻干的。

[0218] 在某些实施方案中,本发明提供了以上药物组合物,其中当组合物存储在密封容器中约4°C或约25°C下并且将容器置于具有50%相对湿度的气氛中时,如以菌落形成单位测量,在至少约1个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年时期后,至少80%细菌菌株残留。

[0219] 培养方法

[0220] 用于本发明的细菌菌株可以使用如例如参考文献[55-57]中详述的标准微生物学技术培养。

[0221] 用于培养的固体或液体培养基可以是YCFA琼脂或YCFA培养基。YCFA培养基可以包括(每100ml,近似值):酪胨(1.0g)、酵母提取物(0.25g)、NaHCO₃(0.4g)、半胱氨酸(0.1g)、K₂HPO₄(0.045g)、KH₂PO₄(0.045g)、NaCl(0.09g)、(NH₄)₂SO₄(0.09g)、MgSO₄·7H₂O(0.009g)、CaCl₂(0.009g)、刃天青(0.1mg)、氯化血红素(1mg)、生物素(1μg)、钴胺素(1μg)、对氨基苯甲酸(3μg)、叶酸(5μg)和吡哆胺(15μg)。

[0222] 用于疫苗组合物中的细菌菌株

[0223] 本发明人已经确定本发明的细菌菌株可用于治疗或预防由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状。此可能是本发明的细菌菌株作用于宿主免疫系统的结果。因此,当作为疫苗组合物施用时,本发明的组合物也可用于预防由IL-17或Th17通路介导的疾病或病状。在某些此类实施方案中,本发明的细菌菌株可以是杀死的、灭活的或减毒的。在某些此类实施方案中,组合物可以包含疫苗佐剂。在某些实施方案中,组合物用于通过注射,例如通过皮下注射施用。

[0224] 通则

[0225] 除非另外指明,否则本发明的实施将采用在本领域技能内的常规化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药理学方法。此类技术在文献中予以充分解释。参见例如参考文献[58]和[59-65]等。

[0226] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由……组成”,例如“包含”X的组合物可以仅仅由X组成,或可以包括其它某物,例如X+Y。

[0227] 关于数值x的术语“约”是任选选用的并且意指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0228] 词语“基本上”不排除“完全”,例如“基本上不含”Y的组合物可完全不含Y。必要时,本发明的定义中可以省略词语“基本上”。

[0229] 提及两种核苷酸序列之间的序列同一性百分比意指在比对时,比较两种序列中相同的核苷酸百分比。此比对和同源性或序列同一性百分比可以使用本领域中已知的软件程序,例如参考文献[66]的部分7.7.18中描述的软件程序确定。优选比对通过Smith-Waterman同源性搜索算法,使用仿射空位搜索(其中开放空位罚分是12且空位延伸罚分是2,BLOSUM 62矩阵)来确定。Smith-Waterman同源性搜索算法在参考文献[67]中公开。

[0230] 除非特别陈述,否则包括多个步骤的工艺或方法可以在方法开始或结束包括额外步骤,或可以包括额外插入步骤。此外,适当时步骤可以组合,省去或以替代次序进行。

[0231] 本文中描述本发明的多个实施方案。应了解每个实施方案中说明的特征都可以与其它所说明的特征进行组合以提供其它实施方案。具体来说,本文中强调为适合、典型或优选的实施方案可以彼此进行组合(除非其互斥时)。

具体实施方式

[0232] 实施例1-细菌接种物在屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型中的功效

[0233] 概述

[0234] 向小鼠施用包含根据本发明的细菌菌株的组合物,且随后用屋尘螨(HDM)提取物激发以引起过敏性炎性反应。对HDM的炎性反应包括嗜酸性粒细胞组分和中性粒细胞组分,是由IL-17和Th17通路介导,并且是哮喘的模型。将用本发明的组合物处理的小鼠所展现的炎性反应的程度和特征与对照组相比较。发现本发明的组合物减轻炎性反应,并且减少嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞募集,这表明其可用于治疗IL-17和Th17介导的病状,例如嗜酸性粒细胞增多、中性粒细胞增多和哮喘。

[0235] 菌株

[0236] 830:粪便布劳特氏菌

[0237] 研究设计

[0238] 组:

[0239] 1. 阴性对照组。用媒介物对照物处理(经口)。

[0240] 6. 用治疗性细菌接种物菌株830处理(经口)。

[0241] 7. 阳性对照组。用地塞米松处理(腹膜内)。

[0242] 8. 未处理的对照组。

[0243] 每组小鼠数目=5

[0244] 第-14天到第13天:每日经口施用媒介物对照物(组1)。

[0245] 第-14天到第13天:每日经口施用治疗性细菌接种物(组2-6)。

[0246] 第0天、第2天、第4天、第7天、第9天、第11天,经鼻施用含15ug HDM(屋尘螨提取物-目录号:XPB70D3A25,批号:231897,Greer Laboratories(Lenoir,NC,USA))的30ul体积的PBS(组1-8)。

[0247] 第0天、第2天、第4天、第7天、第9天、第11天,施用地塞米松(腹膜内,3mg/kg,Sigma-Aldrich,目录号D1159)(组7)。

[0248] 第14天将所有动物处死以供分析用。

[0249] 小鼠总数=40。

[0250] 终点和分析

[0251] 在第14天,通过腹膜内注射致命戊巴比妥(pentobarbital)(Streuli Pharma AG(Uznach),目录号:1170139A)将动物处死,接着立刻进行支气管肺泡灌洗(BAL)。

[0252] 将细胞与BAL(支气管肺泡灌洗)流体分离并进行细胞分类计数(200个细胞计数/样品)。

[0253] 材料与方法

[0254] 小鼠。从Charles River Laboratories购买7周龄的雌性BALB/c小鼠并随机分配到各个笼,每个笼都是5只小鼠(通风笼来源于Indulab AG(Gams,Switzerland),笼型:“The SealsafeTM-IVC笼。产品号1248L)。笼标记有研究号、组号和实验开始日期。每周对小鼠进行监测并使其适应设施7天,接着开始研究(研究第-14天)。在研究第-14天,动物是8周龄。饮用水和食物可随意取用。笼中进行丰容。根据地方特许牌照号2283.1(由Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud颁予和批准)对动物进行每日护理。饮用水和食物可随意取用且每日补充一次。笼中进行丰容。观测到如由瑞士官方机构根据联邦兽医办公室(Federal Veterinary Office,FVO)关于实验动物的饲养管理、遗传修饰动物的产生和动物实验方法的条例455.163所给出的动物福利规定。

[0255] 细菌接种物的培养。在无菌工作站内,通过在手套手中进行温热来使低温细菌小瓶解冻并将约0.7ml内含物注射到含有8ml厌氧YCFA的亨盖特管(Hungate tube)(目录号1020471,Glasgerätebau Ochs(Bovenden-Lenglern,Germany))中。通常每个菌株准备两个管。接着将亨盖特管在37°C下培育(静止)长达24-26小时(菌株830)。

[0256] 媒介物对照物的培养。将含有8ml厌氧YCFA的亨盖特管在37°C下培育(静止)16小时。

[0257] 细菌接种物或媒介物对照物的施用。每天根据经口管饲法施用400ul所培养的细菌接种物或媒介物对照物。

[0258] 鼻内致敏。通过腹膜内注射每公斤9.75mg xylasol和48.75mg ketasol(Dr.E.Graeub AG,Bern,Switzerland)将小鼠麻醉且每个鼻子施用含15ug HDM(目录号:XPB70D3A25,批号:231897,Greer Laboratories(Lenoir,NC,USA))的30ul体积的PBS。

[0259] 阳性对照化合物地塞米松的制备和施用。使地塞米松21-磷酸二钠盐(Sigma-Aldrich,目录号D1159,货号N°SLBD.1030V)溶解在H₂O中,并在以上研究方案中所指示的天数以3mg/kg的剂量于200ul体积中经口施用于动物。

[0260] 终末程序。在第14天,通过腹膜内注射致命戊巴比妥(Streuli Pharma AG(Uznach),目录号:1170139A)将动物处死,接着在500ul生理食盐水中立刻进行支气管肺泡灌洗(BAL)。

[0261] 对细胞浸润到BAL中的测量。将细胞与BAL流体分离并基于标准形态学和细胞化学标准进行细胞分类计数。

[0262] 图表和统计分析。所有图表都用Graphpad Prism第6版产生并应用单向ANOVA。来自统计分析的结果具备个别数据表。误差线表示平均标准误差(Standard Error of the Mean, SEM)。

[0263] 结果和分析

[0264] 实验结果示于图1-9中。

[0265] 在用细菌或媒介物处理的小鼠中未注意到发病或死亡。两种对照物媒介物处理(阴性对照物)和地塞米松处理(阳性对照物)如所预期般起作用,其中在地塞米松处理后注意到减弱的嗜酸性粒细胞增多和中性粒细胞增多。

[0266] 此实验的最重要的结果展现在图6和7中,图6和7报告在用HDM激发后在支气管灌洗中检测到的嗜中性粒细胞的总数和百分比。相对于仅仅媒介物的对照物,菌株830的施用使得BAL中总嗜中性粒细胞和嗜中性粒细胞的比例减少。

[0267] 实施例2-细菌接种物在严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型中的功效

[0268] 概述

[0269] 向小鼠施用包含根据本发明的细菌菌株的组合物且随后通过皮下施用屋尘螨(HDM)提取物来致敏,并且通过鼻内施用HDM来激发,以便模拟严重中性粒细胞性哮喘的炎性反应。将用本发明的组合物处理的小鼠所展现的炎性反应的程度和特征与对照组相比较。发现本发明的组合物减轻炎性反应,并且尤其减少嗜中性粒细胞的募集,其方式与包括施用抗IL-17抗体的阳性对照物相当。因此,数据表明本发明的组合物可用于治疗IL-17和Th17介导的病状,例如中性粒细胞增多和哮喘。

[0270] 菌株

[0271] 830:粪便布劳特氏菌

[0272] 研究设计

[0273] 组:

[0274] 1. 阴性对照组。用媒介物对照物处理(经口)。

[0275] 6. 用治疗性细菌接种物菌株830处理(经口)。

[0276] 7. 阳性对照组。用抗IL-17处理(腹膜内)。

[0277] 8. 未处理的对照组。

[0278] 9:健康小鼠(基线)。

[0279] 每组小鼠数目(组1-8)=5

[0280] 第14天到第17天:每日经口施用媒介物对照物(组1)。

[0281] 第14天到第17天:每日经口施用治疗性细菌接种物(组2-6)。

[0282] 第0天:用含HDM的CFA致敏(皮下)(组1-8)。

[0283] 第7天:用含HDM的CFA致敏(皮下)(组1-8)。

[0284] 第13天、第15天、第17天:经腹膜内施用抗IL-17中和抗体(组7)。

[0285] 第14天、第15天、第16天、第17天:经鼻用含HDM的30ul PBS激发(组1-8)。

[0286] 第18天:将所有动物处死以供分析。

[0287] 终点和分析:

[0288] 在第14天,通过腹膜内注射致命戊巴比妥(Streuli Pharma AG, (Uznach, 目录号: 1170139A) 将动物处死,接着立刻进行支气管肺泡灌洗(BAL)。将细胞与BAL流体分离并进行细胞分类计数(200个细胞计数/样品)。

[0289] 材料与方法

[0290] 小鼠。从Charles River Laboratories购买7周龄的雌性C57BL/6小鼠并随机分配到各个笼,每个笼都是5只小鼠(通风笼来源于Indulab AG (Gams, Switzerland), 笼型: "The SealsafeTM-IVC笼。产品号1248L)。笼标记有研究号、组号和实验开始日期。每周对小鼠进行监测且使其适应设施7天,接着开始研究(研究第-14天)。在研究第-14天,动物是8周龄。饮用水和食物可随意取用。笼中进行丰容。根据地方特许牌照号2283.1(由Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud颁予和批准)对动物进行每日护理。饮用水和食物可随意取用且每日补充一次。笼中进行丰容。观测到如瑞士官方机构根据联邦兽医办公室(FVO)关于实验动物的饲养管理、遗传修饰动物的产生和动物实验方法的条例455.163所给出的动物福利规定。

[0291] 细菌接种物的培养。在无菌工作站内,通过在手套手中进行温热来使低温细菌小瓶解冻且将约0.7ml内含物注射到含有8ml厌氧YCFA的亨盖特管(目录号1020471, Glasgerätebau Ochs (Bovenden-Lenglern, Germany))中。通常每个菌株准备两个管。接着将亨盖特管在37°C下培育(静止)长达24-26小时(菌株830)。

[0292] 媒介物对照物的培养。将含有8ml厌氧YCFA的亨盖特管在37°C下培育(静止)16小时。

[0293] 细菌接种物或媒介物对照物的施用。每天根据经口管饲法施用400ul所培养的细菌接种物或媒介物对照物。

[0294] HDM致敏。使PBS中50μg HDM(目录号:XPB70D3A25, 批号: 231897, Greer Laboratories (Lenoir, NC, USA))在等体积的完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA Chondrex Inc. (Washington, USA))中乳化,并且在两周内在相对的腰窝上以200μl体积皮下施用两次。进行第二次免疫接种一周后,通过腹膜内注射每公斤9.75mg xylasol和48.75mg ketasol(Dr.E.Graeub AG, Bern, Switzerland)将小鼠麻醉,接着连续4日,以含15μg HDM的30ul体积的PBS给与鼻内激发。在最终激发后的一天进行分析。

[0295] 阳性对照化合物抗小鼠IL-17抗体的制备和施用。抗IL-17中和抗体来源于Bio X Cell且存储在4°C下(克隆17F3, 目录号BE0173, Bio X Cell),且在以上研究方案中所指示的天数以12.5mg/kg的剂量经腹膜内施用。

[0296] 终末程序。在第18天,通过腹膜内注射致命戊巴比妥(Streuli Pharma AG (Uznach), 目录号: 1170139A) 处死动物,接着在500ul生理食盐水中立刻进行支气管肺泡灌洗(BAL)。

[0297] 对细胞浸润到BAL中的测量。将细胞与BAL流体分离并基于标准形态学和细胞化学标准进行细胞分类计数。

[0298] 图表和统计分析。所有图表都用Graphpad Prism第6版产生并应用单向ANOVA。来自统计分析的结果具备个别数据表。误差线表示平均标准误差(SEM)。

[0299] 结果和分析

[0300] 实验结果示于图10-18中。

[0301] 在用细菌或媒介物处理的小鼠中未注意到发病或死亡。如图11、12、15和16中所示,某些用菌株830处理的小鼠展现减少的嗜酸性粒细胞增多和中性粒细胞增多。

[0302] 实施例3-细菌接种物治疗II型胶原蛋白诱发的关节炎小鼠模型中的关节炎的功效

[0303] 材料与方法

[0304] 菌株

[0305] 830:粪便布劳特氏菌

[0306] 细菌培养物

[0307] 使细菌培养物在厌氧工作站(Don Whitley Scientific)中生长以供施用。

[0308] 使用甘油原液来使细菌菌株#830生长。甘油原液存储在-80°C下。使甘油原液在室温下解冻且在YCFA平板上划线,每周进行三次。每次使用新的甘油等分试样。使细菌在给定平板上生长长达72小时。

[0309] 每天制备待施用于动物的溶液两次,在上午(AM)和下午(PM)处理之间有八小时时间间隔。从划线的平板挑选菌落,并且转移到含有YCFA培养基的管中。使细菌菌株#830生长24小时,接着AM施用。细菌以1%传代培养到YCFA培养基中进行PM施用。在上午和下午处理制备后记录每个菌株的OD值。

[0310] II型胶原蛋白诱发的关节炎小鼠模型

[0311] 将成年的雄性DBA/1小鼠随机分配到实验组并使其适应两周。在第0天,通过皮下注射100微升含有100微克II型胶原蛋白(CII)于补充有4mg/ml结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)H37Ra的不完全弗氏佐剂中的乳液来施用于动物。在第21天,通过皮下注射含有100 μ g II型胶原蛋白于不完全弗氏佐剂中的加强乳液来施用于动物。

[0312] 根据以下施用时间表给与处理。从第-14天直到第45天实验结束,将每周动物称重三次。从第21天直到实验结束,每周针对关节炎的临床征象,包括后爪和前爪、桡腕(腕)关节和胫跗(踝)关节的肿胀对动物进行三次评分。

[0313] 在第45天,对小鼠进行淘汰并获取终末血液样品以供细胞因子分析用。

[0314] 在第-14天、第0天和第45天,收集粪便样品以供微生物分析用,立刻进行速冻且存储在-80°C下。

[0315] 胶原蛋白诱发的关节炎(CIA)小鼠模型是公认的类风湿性关节炎小鼠模型[68]。用CII免疫接种引起包括类风湿性关节炎的若干重要病理学特征,包括滑膜增生、单核细胞浸润和软骨退变的发病机理。重要地,CIA的发展是由Th17细胞,通过分泌IL-17A来介导[69]。潜伏在关节炎模型下的免疫反应通过使用补充有结核分枝杆菌的弗氏佐剂来增强。

[0316] 在第21天,从每个组中的三只卫星动物收集脾。将细胞在II型胶原蛋白存在或不存在下培养72小时。通过Luminex对培养物上清液中和终末血清中的包括TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、IL-4、IL-10和IL-17在内的细胞因子进行定量。使用氟化胸腺嘧啶掺入法定量细胞增殖。

[0317] 处理组和剂量

[0318] 所有组n=15(主要研究组n=12且卫星组n=3)。

[0319] 生物治疗剂所用的媒介物是酵母提取物-酪胨-脂肪酸(YCFA)培养基。

组	剂量	施用 途径		方案	疾病诱发
		途径	方案		
[0320]	I 媒介物	5 ml/kg		BID: 第-14天-结束	第0天: 胶原蛋白/CFA, 一次, SC 第21天: 胶
	3 生物治疗剂 #830	5 ml/kg	PO		原蛋白/IFA, 一次, SC

- [0322] PO: 经口管饲法, SC: 皮下注射, BID: 一天两次, CFA: 完全弗氏佐剂
- [0323] 体重
- [0324] 从第-14天直到实验结束, 每周将动物称重三次。将数据绘图(平均值±SEM)。
- [0325] 非特异性临床观测结果
- [0326] 从第-14天直到实验结束, 每天检查动物的非特异性临床征象, 包括姿势异常(弓背)、异常皮毛情况(竖毛)和异常活动水平(活动减少或增加)。
- [0327] 临床观测结果
- [0328] 从第21天直到第45天实验结束, 每周针对关节炎的临床征象, 包括后爪和前爪、桡腕(腕)关节和胫跗(踝)关节的肿胀对动物进行三次评分。使用以下量表对每肢进行评分: (0) 正常, (1) 轻微肿胀, (2) 轻度肿胀, (3) 中度肿胀和 (4) 重度肿胀。通过将每肢评分相加来计算临床评分。动物的最大可能临床评分是(16)。两个连续时刻的评分等于(12)的动物和任一时刻评分超过(12)的动物被淘汰。将数据绘图(平均值±SEM)。
- [0329] 细胞增殖分析
- [0330] 第21天, 每组挑选三只卫星动物且将脾解剖出。将脾细胞在II型胶原蛋白存在或不存在下培养72小时。在72小时后, 在氟化胸腺嘧啶存在下对细胞进行脉冲一夜。通过测量胸苷掺入来定量细胞增殖。将数据绘图(平均值±SEM)。获取上清液并测试关键细胞因子的存在。
- [0331] 细胞因子分析
- [0332] 测试来自脾细胞培养物的终末上清液以通过Luminex对TNF-α、IL-6、IFN-γ、IL-4、IL-10和IL-17进行定量。将数据绘图(平均值±SEM)。
- [0333] 微生物分析
- [0334] 在第-14天、第0天和第45天, 从每只动物收集粪便样品, 立刻进行速冻且存储在-80°C下。将盲肠(包括内含物)立刻速冻且存储在-80°C下。每天通过涂铺细菌进行细菌鉴别测试。
- [0335] 组织病理学
- [0336] 在实验结束时, 将后爪存储在组织固定剂中。将样品转移到脱钙液中。将组织样品加工, 切片, 并用苏木精与伊红染色。由对实验设计不知情的合格组织病理学家针对关节炎征象, 包括炎症、关节软骨损伤和下层干骺端骨骼损伤对切片进行评分。使用详述的评分系统(见下文)。将数据绘图(平均值±SEM)。提供原始数据和分析数据以及代表图。
- [0337] 表1: 组织病理学评分系统

级别	描述
炎症	
0	正常关节
1	[0338] 轻度滑膜增生，具有以嗜中性粒细胞为主的炎症。关节间隙中存在少量的嗜中性粒细胞和巨噬细胞。
2	具有涉及嗜中性粒细胞与巨噬细胞两者的中度到显著炎症的滑膜增生。关节间隙中存在嗜中性粒细胞和巨噬细胞；可能存在一些坏死组织碎片。
3	具有涉及嗜中性粒细胞与巨噬细胞两者的显著炎症的滑膜增生。丧失滑膜细胞内层。炎症可以从滑膜延伸到包括肌肉在内的周围组织。关节间隙中存在大量的嗜中性粒细胞和巨噬细胞，以及显著的坏死组织碎片。
关节软骨损伤	
0	正常关节
1	关节软骨仅仅显示轻度退行性改变。周边可能存在早期血管翳形成。
2	关节软骨显示中度退行性改变和病灶性丧失。病灶上存在血管翳形成。
3	关节软骨显著破坏和丧失，大范围形成血管翳。
下层干骺端骨骼损伤	
0	正常关节
1	[0339] 下层干骺端骨骼无变化
2	可能是干骺端骨骼的病灶性坏死或纤维化。
3	干骺端骨骼破坏或塌缩。大范围的炎症、坏死或纤维化，延伸到干骺端的髓腔。
[0340] 结果和分析	
[0341]	存活和非特异性临床观测结果
[0342]	一些动物在研究按计划结束之前因关节炎的临床征象的严重度或因非特异性临床观测结果的严重度而被淘汰。
[0343]	组1中的1只动物(媒介物处理)在预处理时期期间被淘汰(第-14天到第0天-动物从供应者处到达后腿断了)。
[0344]	7只动物因关节炎的临床征象的严重度而被淘汰：组1中的5只动物(媒介物处理)和组3中的2只动物(生物治疗剂#830处理)。
[0345]	6只动物因包括姿势异常(弓背)、异常皮毛情况(竖毛)、异常活动水平(活动减少)在内的非特异性临床征象的严重度而淘汰：组1中3只动物(媒介物处理)和组3中3只动物(生物治疗剂#830处理)。
[0346]	体重
[0347]	从第-14天直到第0天，记录体重数据，且表示为初始(第-14天)体重的百分比，通过双向ANOVA，接着邓尼特事后检验(Dunnett's post-test)进行分析，以与第-14天进行多重比较，接着与媒介物处理组进行多重比较。数据呈现于图19中。来自在实验按计划结束之前被淘汰的动物的数据被排除在分析之外。

[0348] 当与第-14天比较时,在媒介物处理组中,在第-9天和第-7天,以及在组3(生物治疗剂#830处理)中,在第-11天和第-9天,通过经口管饲法每天施用两次诱发显著的体重损失。

[0349] 从第0天直到第28天,记录体重数据,且表示为初始(第0天)体重的百分比,通过双向ANOVA,接着邓尼特事后检验进行分析,以与媒介物组中的第0天进行多重比较,接着与媒介物处理组进行多重比较。数据呈现于图20中。来自在实验按计划结束之前被淘汰的动物和来自卫星动物的数据被排除在外分析之外。第28天、第35天和第42天数据通过单向ANOVA,接着邓尼特事后检验进行进一步分析,以与媒介物处理组进行多重比较。

[0350] 当与媒介物处理组中的第0天比较时,在第26天和第28天关节炎的临床征象的发作与显著体重损失有关($p<0.0001$)。

[0351] 当与媒介物处理组比较时,在第28天所处理的组3(生物治疗剂#830)中体重显著更高(<0.005)。

[0352] 临床观测结果

[0353] 通过双向ANOVA,接着邓尼特事后检验来分析临床评分数据,以在媒介物处理组中的各天之间进行多重比较,接着在实验组与媒介物处理组之间每天进行多重比较。数据呈现于图21中。从在实验结束之前被淘汰的动物记录的数据被排除在分析之外。当动物因关节炎的临床征象的严重度而被淘汰时,后面天数报告最后记录的评分且用于统计分析中。

[0354] 当与第21天比较时,从第28天直到第45天,在媒介物处理组中观测到临床评分显著增加($p<0.0001$)。

[0355] 当与媒介物处理组比较时,从第28天直到第45天,生物治疗剂#830诱发临床评分减少。在第31天和第45天,减少是统计上显著的($p<0.05$)。

[0356] 细胞增殖分析

[0357] 为了证实所述测定,将脾细胞在作为阳性对照刺激物的可溶性抗CD3和抗CD28(抗CD3/CD28)存在下培养以证实细胞的增殖潜能。

[0358] 在所有实验组中都看到对抗CD3/CD28的强烈增殖反应,表明细胞健康、有活力且能够对活化信号作出反应。

[0359] 为了测试在II型胶原蛋白(CII)存在下的增殖反应,将脾细胞在50 μ g/ml CII存在下培养。通过双向ANOVA,接着斯达克事后检验(Sydak's post-test)来分析对CII的脾细胞增殖反应,以在未刺激与CII刺激的脾细胞之间进行多重比较,且通过单向ANOVA,接着邓尼特事后检验进行分析,以将不同实验组与媒介物处理组中的CII刺激的反应进行比较。数据呈现于图22中。

[0360] 当与媒介物处理组中的未刺激脾细胞比较时,CII诱发 ^{3}H -胸昔掺入(cpm)极其显著的增加($p<0.0001$)。

[0361] 用生物治疗剂#830处理的组证明CII诱发的脾细胞增殖水平显著低于媒介物处理组。

[0362] 组织培养上清液中的细胞因子水平

[0363] 在来源于抗CD3/CD28刺激的培养物的组织培养上清液中,通过luminex分析来测量每种细胞因子的水平。这些表明所有测量的细胞因子具有稳固的反应(媒介物组中的平均水平如下:IL-4=6,406pg/ml;IL-6=306pg/ml;IL-10=10,987pg/ml;IL-17A=11,

447pg/ml; IFN- γ = 15,581pg/ml; TNF- α = 76pg/ml)。

[0364] 以下部分概述了从II型胶原蛋白刺激的培养物获得的数据。在适用时,先后使用双向ANOVA和斯达克事后检验对未刺激和CII刺激的脾细胞的上清液中的细胞因子水平之间的差异进行统计分析,以进行多重比较,而先后使用单向ANOVA和邓尼特事后检验来比较生物治疗剂处理组与媒介物处理组中的CII刺激的反应。在两种情况下所述组之间的细胞因子水平无显著差异。此可能归因于使用的样本尺寸小(n=3)。

[0365] 为了更精确地呈现细胞因子的数据分布与数据的大体散布,此作呈散布图呈现。

[0366] 在用CII刺激后的组织培养上清液中IL-4的组平均值<5pg/ml。这些不视为生物学上显著的且这里不包括这些。用胶原蛋白刺激后的组织培养上清液中TNF- α 的组平均值低于定量限度。

[0367] 上清液的IFN- γ 水平(图23)

[0368] IFN- γ 与IL-17一起是CIA模型中驱动疾病的主要细胞因子。图23中的散布图显示CII刺激后的IFN- γ 水平,其中与生物治疗剂比较,媒介物处理组的组中位数更高。

[0369] 上清液的IL-17A水平(图24)

[0370] 在媒介物处理组的CII刺激的培养物中IL-17A水平是50pg/ml。与媒介物处理比较,在生物治疗剂组中此细胞因子的水平似乎较低。

[0371] 上清液的IL-10水平(图25)

[0372] 媒介物处理组中CII刺激和培养基对照培养物的IL-10水平分别是13pg/ml和2.1pg/ml。可预期媒介物处理组的IL-10(它是消炎细胞因子)水平较高,因为炎症和促炎性细胞因子诱发可以伴随有消炎反馈机制。

[0373] 上清液的IL-6水平(图26)

[0374] 在抗CII培养物中例如IL-6和TNF- α 等炎性细胞因子通常产生水平不高。然而,其水平可能由于免疫调节而改变。CII刺激的培养物中IL-6水平适中,达到10pg/ml。虽然高于培养基对照培养物,但这些差异太小,以致于无法提供进行统计分析的基本原理。

[0375] 微生物分析

[0376] 通过使用光谱仪测量600nm下的光密度来证实细菌生长。通过比较划线平板图像与参考图像,证实细菌身份。

[0377] 在改良的细菌制备方法后,如测量的高OD值所指示,从第-2天和第-3天施用一致高剂量的细菌菌株。

[0378] 在第-14天、第0天和终止时收集粪便样品并进行速冻。

[0379] 组织病理学

[0380] 组织病理学结果示于图65-69中。如针对此模型所预期的,根据关节炎存在/不存在或存在的改变严重度,观测个体内和个体间的变化性。

[0381] 病理性质如针对此模型所预期的,滑膜和滑液囊大范围的混合型慢性-活动性炎症,延伸到涉及关节周围的软组织(肌肉、脂肪组织、皮肤胶原蛋白)。在最严重受影响的关节中,存在关节软骨退化和丧失,具有关节内碎片和炎症以及关节和骨结构因纤维化和炎症而被破坏。

[0382] 组织病理学改变的发生率是:媒介物-80% (16/20);生物治疗剂#830-20% (4/20)。当与媒介物处理组比较时,用生物治疗剂#830处理降低小鼠后肢中组织病理学评分的

发生率(参见图65-68)。通过单向ANOVA,针对非参数数据(克鲁斯凯-沃利斯检验(Kruskal-Wallis test))分析组织病理学评分,接着进行邓尼特事后检验,以与媒介物处理组进行多重比较。当与媒介物处理组比较时,生物治疗剂#830诱发在组织病理学中观测到的关节炎症评分显著减少($p<0.01$)。当与媒介物处理组比较时,生物治疗剂#830诱发在组织病理学中观测到的软骨损伤评分显著减少($p<0.001$)。当与媒介物处理组比较时,生物治疗剂#830诱发在组织病理学中观测到的骨骼损伤评分显著减少($p<0.001$)。当与媒介物处理组比较时,生物治疗剂#830诱发总组织病理学评分显著减少($p<0.001$)。

[0383] 概述

[0384] 如在DBA/1小鼠中的此种关节炎模型中所预期,从II型胶原蛋白第一次施用后的第28天观测到临床评分增加。生物治疗剂#830显示在此种模型中有效治疗关节炎。生物治疗剂#830有效减少临床评分的严重度,并且有效减少关节中的病理性疾病,如组织病理学分析中所证明。

[0385] 在来自所有实验组的脾细胞培养物中都看到对II型胶原蛋白的记忆性增殖反应。胶原蛋白特异性反应在用生物治疗剂#830处理后显著减少(组3)。

[0386] 大部分所测试的T细胞细胞因子展示在媒介物处理组中II型胶原蛋白刺激的培养基与培养基对照之间可检测的增加。这些增加在生物治疗剂处理组中不是那么明显。这广泛地证明了上述的对II型胶原蛋白的记忆性增殖反应。

[0387] 有证据证明Th1/Th17轴受到抑制,Th1/Th17轴是此种模型和人类RA中的病理性反应。降低的细胞因子水平与减少的增殖的相关性暗示免疫调节。没有证据证明此调节是由Th2相关的IL-4水平增加或免疫调节细胞因子IL-10的增加引起。

[0388] 实施例4-对细菌接种物在屋尘螨诱发的哮喘的小鼠模型中的作用的进一步分析

[0389] 对在实施例1中测试的小鼠进行进一步分析以进一步表征本发明的组合物对过敏性哮喘炎性反应的作用。

[0390] 材料与方法

[0391] 在第14天抽血和制备血清。通过心脏穿刺来收集动物的血液样品。通过在14000g下离心5分钟将血清从血液样品分离,并存储在-20℃下。

[0392] 在第14天摘取器官。将左肺叶收集在福尔马林中以供后续组织学分析用。收集右肺叶(所有剩余肺叶)和去除血清以进行速冻和供后续分析用。将剩余BAL流体速冻以供后续分析用。

[0393] 在血清和BAL流体中抗体水平的测量

[0394] 通过ELISA测定,在BAL和血清中测量总IgE和屋尘螨(HDM)特异性IgG1抗体产生。

[0395] 肺分离和组织学分析

[0396] 将左肺叶固定在福尔马林中,接着嵌入石蜡中,切片,且用苏木精和伊红和PAS染色。如下采用盲法进行后续组织学评分:针对炎症(支气管周浸润和血管周浸润)和粘液产生,对每个样品的5个随机视野进行评分。用以下分级系统对炎性浸润进行评分:

[0397] 0-正常

[0398] 1-轻度炎性浸润

[0399] 2-中度炎性浸润

[0400] 3-显著炎性浸润

[0401] 4-严重的炎性浸润

[0402] 5-非常严重的炎性浸润

[0403] 在每个视野中,气道以尺寸测量且粘液细胞数以 μm 定量。

[0404] 在肺组织中炎症介质的测量

[0405] 将被分离用于定量炎症介质的右肺叶(所有剩余肺叶)进行速冻,以供随后通过市售多重测定(Merck-Millipore)测量CCL11、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-9、IL-17A、CXCL1、CCL3、CXCL2和CCL5。根据制造商的说明书进行分析。

[0406] 结果和分析

[0407] 实验结果示于图27-45中。

[0408] 对用菌株830处理的小鼠的肺组织中的细胞浸润物的分析显示平均炎症评分明显和统计上显著的减少(参见图31和33),证实了实施例1中描述的发现。

[0409] 对BAL流体和血清中的抗体水平进行分析(参见图27-30)。未观测到细菌处理对血清抗体水平有明确的作用。此可能反映出实验失败,因为每一处理中的数据散布和误差线均较大,并且阳性和阴性对照物似乎并未如所预期的那样起作用。也可能基线血清抗体水平掩盖了任何改变。

[0410] 类似地,未观测到细菌处理对肺组织中的细胞因子水平有明确的作用(参见图35-45)。此可能再次反映出实验失败,因为每一处理中的数据散布和误差线均较大,并且阳性和阴性对照物似乎并未如预期的那样起作用。还有可能是所涉及的作用机制影响早期细胞因子反应,所述细胞因子反应在最终HDM气道激发后第4天再也检测不到。归因于所检测水平的可变性,当解释当前研究中细胞因子数据时应谨慎一些。这种可变性在某种程度上可以由以下事实来解释:分离肺组织来进行不同分析,且归因于炎症的斑块状分布,因此一个肺叶可能不具充分代表性或可能与其它小鼠中的相同肺叶相当。

[0411] 实施例5-对细菌接种物在严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型中的作用的进一步分析

[0412] 对在实施例2中测试的小鼠进行进一步分析以进一步表征本发明的组合物对与重症哮喘相关的中性粒细胞性反应的作用。

[0413] 材料与方法

[0414] 在第18天摘取器官。将左肺叶收集在福尔马林中以供后续组织学分析用。收集右肺叶(所有剩余肺叶)和去除血清以进行速冻和供后续分析用。将剩余BAL流体速冻以供后续分析用。

[0415] 在肺组织中炎症介质的测量(后续分析)。将被分离用于定量炎症介质的右肺叶(所有剩余肺叶)速冻,以便随后通过市售多重测定(Merck-Millipore)测量IFN- γ 、IL-1 α 、IL-1 β 、CXCL1、CCL3、CXCL2、CCL5、IL-17A、TNF- α 、IL-17F、IL-23和IL-33。根据制造商的说明书进行分析。

[0416] 在血清和BAL流体中抗体水平的测量(后续分析)。通过ELISA测定,在BAL和血清中测量屋尘螨(HDM)特异性IgG1和IgG2a抗体产生。

[0417] 肺分离和组织学分析(后续分析)。将左肺叶固定在福尔马林中,接着嵌入石蜡中,切片,且用苏木精和伊红和PAS染色。如下采用盲法进行后续组织学评分:针对炎症(支气管周浸润和血管周浸润)和粘液产生,对每个样品的5个随机视野进行评分。用以下分级系统

对炎性浸润进行评分：

- [0418] 0-正常
- [0419] 1-轻度炎性浸润
- [0420] 2-中度炎性浸润
- [0421] 3-显著炎性浸润
- [0422] 4-严重的炎性浸润
- [0423] 5-非常严重的炎性浸润
- [0424] 结果和分析
- [0425] 实验结果示于图46-63中。

[0426] 关于细胞因子水平,如在实施例4中,每一处理中的数据散布和误差线均较大,且阳性和阴性对照物似乎未必定如所预期的那样起作用。还有可能是作用机制涉及影响早期细胞因子反应,所述细胞因子反应在最终HDM气道激发后第4天再也检测不到。归因于所检测水平的可变性,当解释当前研究中的细胞因子数据时应谨慎一些。这种可变性在某种程度上可以由以下事实来解释:分离肺组织来进行不同分析,且归因于炎症的斑块状分布,因此一个肺叶可能不具充分代表性或可能与其它小鼠中的相同肺叶相当。尽管有这种可变性,但仍显示菌株830对细胞因子水平有明确的消炎作用,且阳性对照物抗IL-17抗体大体如预期般起作用。

[0427] 在以上说明下,图53中的数据表明用菌株830处理可以实现TNF α 水平的降低,此可以指示与对基质或先天免疫细胞的趋化因子释放(和因此对细胞募集)的影响相关的作用机制。TNF α 是Th17通路的一部分。将此数据集联系在一起,可以得出以下结论:在这种严重中性粒细胞性哮喘的小鼠模型中菌株830对炎症机制具有有益作用。

[0428] 实施例6-细菌接种物在多发性硬化的小鼠模型中的功效

[0429] 概述

[0430] 向小鼠施用包含根据本发明的细菌菌株的组合物且随后用髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白将小鼠免疫接种以诱发实验自身免疫性脑脊髓炎(EAE)。EAE是最常用的人类多发性硬化实验模型。发现本发明的组合物对发病率和疾病严重度具有显著作用。

[0431] 菌株

[0432] 830:以登记号NCIMB 42381保藏的细菌

[0433] 研究设计

[0434] 组:

[0435] 1. 阴性对照组。用媒介物对照物处理(经口)。

[0436] 5. 用治疗性细菌接种物菌株830处理(经口)。

[0437] 9. 阳性对照组。用地塞米松处理(腹膜内)。

[0438] 10. 未处理的对照组。

[0439] 每组小鼠数目=10

[0440] 第-14天到第27天:每日经口施用媒介物对照物(组1)。

[0441] 第-14天到第27天:每日经口施用治疗性细菌接种物(组5)。

[0442] 第0-28天:一周施用地塞米松(腹膜内)三次(组9)

[0443] 第0天:MOG35-55(髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白-2mg/ml)和CFA(2mg/ml MTB)

1:1混合,产生1mg/ml溶液。将100μl肽-CFA混合物皮下注射到每个后腿中。腹膜内施用百日咳毒素(300ng)。

[0444] 第1天:腹膜内施用百日咳毒素(300ng)。

[0445] 第7天起:测量发病率和称重,一周三次。

[0446] 终点和分析

[0447] 分析小鼠的发病率和疾病严重度,一周三次。评分采用盲法进行。使用在0到5范围内的临床评分来评估疾病严重度,其中5指示小鼠死亡(参见以下临床评分系统)。

[0448] 监测

[0449] 在指示天数,将小鼠称重并观测疾病活动性评分和发病率。

[0450] 疾病活动性评分的观测结果:

[0451] 0-与未免疫接种的小鼠比较,运动功能无明显变化。

[0452] 0.5-尾部尖端无力。

[0453] 1.0-尾巴无力。

[0454] 1.5-尾巴无力并且后腿受阻。

[0455] 2.0-尾巴无力并且后腿虚弱。

[0456] 或-当观测到行走时存在明显的头部倾斜征象。平衡性差。

[0457] 2.5-尾巴无力并且后腿拖曳。

[0458] -或-存在强烈的头部倾斜,此引起小鼠有时跌倒。

[0459] 3.0-尾巴无力并且后腿完全麻痹。

[0460] 3.5-尾巴无力并且后腿完全麻痹。

[0461] 外加:小鼠绕笼移动,但当将小鼠放在一侧时,无法自己恢复正常。

[0462] 后腿一起在身体一侧上。

[0463] 4.0-尾巴无力、后腿完全瘫痪并且前腿部分瘫痪。

[0464] -小鼠最低限度地绕笼移动,但似乎警觉且进食

[0465] 4.5-后腿完全瘫痪并且前腿部分瘫痪,不绕笼运动。

[0466] 立刻对小鼠执行安乐死并从笼去除。

[0467] 5.0因严重瘫痪而对小鼠执行安乐死。

[0468] 当动物的疾病活动性评分等于或大于1时,认为其具有正发病评分。

[0469] 结果

[0470] 研究结果示于图70和71中。

[0471] 阴性对照组中的疾病诱发成功,其中媒介物对照物和未处理的对照物展示高的评分。用菌株830处理的作用显著并且用菌株830处理的小鼠展现明显降低的发病率和疾病严重度。实际上,发病率和疾病严重度的降低与阳性对照组相当。这些数据表明菌株830可用于治疗或预防多发性硬化。

[0472] 实施例7-细菌接种物在葡萄膜炎的小鼠模型中的功效

[0473] 概述

[0474] 本研究使用光感受器间类视黄醇结合蛋白(IRBP)诱发的葡萄膜炎的小鼠模型测试细菌施用对葡萄膜炎的作用。葡萄膜炎是一种由眼内炎症和视网膜组织破坏引起的威胁视力的病状。此疾病可以在啮齿类动物中在实验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎

(experimental autoimmune uveoretinitis, EAU) 模型中进行研究[70]。EAU是一种器官特异性病症,其中Th1/Th17细胞是针对视网膜抗原的并且产生细胞因子,所述细胞因子活化驻留和浸润的单核细胞,导致组织破坏。可以通过用包括光感受器间类视黄醇结合蛋白肽(IRBPp)在内的视网膜抗原激发,在小鼠中诱发EAU。通常在第8-9天发病,并在14-15天后达到峰值。临床疾病的征象可以使用局部内窥镜眼底成像(topical endoscopic fundal imaging, TEFI)监测。

[0475] 菌株

[0476] MRX008: 韦氏布劳特氏菌,以登记号NCIMB 42486保藏的细菌。

[0477] 生物治疗剂提供于丙三醇原液中。微生物生长培养基(YCFA)用于培养此剂。

[0478] 小鼠

[0479] 小鼠是品系C57BL/6并且在研究开始时是6周龄。使用72只小鼠(+36只卫星动物)。不健康的动物被排除在研究之外。将动物圈养在恒温监测保藏室($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$)中无特异病原(spf)条件下。在使用前使动物适应标准畜舍条件,历时最少一周。在整个时间段内监测动物的健康状态,并且在研究开始前评定各动物用于实验使用的适合性。在研究持续时间期间,小鼠以每笼至多10只动物成组圈养。在整个适应和研究时期期间,经过辐射的颗粒饮食(实验室饮食,欧盟啮齿类动物饮食22%,5LF5)和水随意取用。饮食或水的任何成分不能干扰研究。

[0480] 实验概述

[0481] 将成年雌性C57BL/6小鼠随机分配至实验组并且使其适应一周。根据以下时间表施用处理。在第0天,通过皮下注射,向动物施用含有200 μg 光感受器间类视黄醇结合蛋白肽1-20(IRBP p1-20)于补充有2.5mg/ml结核分枝杆菌(Mycobacterium Tuberculosis)H37Ra完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant,CFA)中的乳液。同时在第0天,通过腹膜内注射,向动物施用1.5 μg 百日咳杆菌毒素(Bordetella Pertussis toxin)。从第-14天起,动物每周称重三次。从第-1天到第42天实验结束,使用局部内窥镜眼底成像(TEFI),针对葡萄膜炎的临床征象,每周监测动物两次。

[0482] 施用时间表

[0483] 所有组都是n=12

[0484] 经口施用的媒介物是YCFA培养基。

[0485] 每日经口施用两次的施用体积是5ml/kg。

	组	处理	剂量	途径	频率	疾病诱发
[0486]	1	媒介物	5 ml/kg	PO	BID 第-14天-结束	第0天: IRBP/CFA , SC 第0天: PTx, IP
	2	MRX008	5 ml/kg			

[0487] PO:经口施用,BID:每日两次,SC:皮下注射,IP:腹膜内注射,IRBP:光感受器间结合蛋白,CFA:完全弗氏佐剂,PTx:百日咳毒素

[0488] 还使用用药物环孢菌素A处理来测试阳性对照组。

[0489] 读出

[0490] 体重。从第-14天起,动物一周称重三次。连续两个时刻体重损失等于或超过其初始(第0天)体重15%的动物被淘汰。

[0491] 非特异性临床观测结果。从第-14天到实验结束,每日检查动物的非特异性临床征象,包括姿势异常(弓背)、异常皮毛情况(竖毛)和异常活动水平(活动减少或增加)。

[0492] 临床评分:通过局部内窥镜眼底成像(TEFI)进行视网膜成像。从第-1天到实验结束,每周针对葡萄膜炎的临床征象,对动物进行两次评分。在未麻醉但受约束的动物中,使用托吡卡胺(Tropicamide)1%、接着盐酸苯肾上腺素(Phenylephrine hydrochloride)2.5%进行瞳孔扩张后,使用TEFI捕捉视网膜影像。使用以下系统对视网膜影像评分。最大累积评分是20。

[0493]	评分	视神经盘炎症	视网膜血管	视网膜组织湿润	结构损伤
	1	最低	1-4 个轻度袖口状白血球聚集	1-4 个小小的损害或 1 个线性损害	视网膜损害或萎缩涉及视网膜区域的 $\frac{1}{4}$ 至 $\frac{3}{4}$
[0494]	2	轻度	>4 个轻度袖口状白血球聚集或 1-3 个中度袖口状白血球聚集	5-10 个小小的损害或 2-3 个线性损害	具有多个小的损害(伤痕)或 ≤ 3 个线性损害(伤痕)的全视网膜萎缩
	3	中度	>3 个中度袖口状白血球聚集	>10 个小小的损害或 >3 个线性损害	具有 >3 个线性损害或融合性损害(伤痕)的全视网膜萎缩
	4	重度	>1 个重度袖口状白血球聚集	线性损害融合	具有折叠的视网膜剥离
	5	不可见(乳白或重度剥离)			

[0495] 结果

[0496] 研究结果示于图72-74中。

[0497] 细胞增殖(卫星动物,第21天)。去除引流淋巴结(draining lymph node,DLN)并分离细胞。计数后,将细胞在IRBP肽存在或不存在下培养72小时。在用3H-胸昔进行脉冲之前移取用于细胞因子分析的上清液。接着再培养细胞18小时,接着收获,且通过掺入3H-胸昔,使用 β -计数器来确定增殖。

[0498] 这些组展示针对IRBP刺激物的细胞增殖超过在培养基对照孔中见到的细胞增殖(从IRBP结果减去这些本底值以提供数据为 Δ cpm)。两组对阳性对照刺激物(抗CD3/CD28)发出强增殖反应,显示培养的细胞是活的并能够增殖(数据未展示)。

[0499] 通过单向ANOVA,接着邓尼特事后检验来分析对IRBP肽的增殖反应,以比较实验组与对照组中的刺激反应。

[0500] 疾病对照动物中对IRBP肽的增殖反应具有针对此种模型所预期的程度。阳性对照药物环孢菌素A减少增殖,不过此减少未达到统计显著性(图72)。

[0501] 处理组(包括单独媒介物)展示超过对照动物中所见的增殖的非显著增加的增殖。

[0502] 通过单向ANOVA,接着邓尼特事后检验来分析对IRBP肽的增殖反应,以比较处理组与媒介物组中的刺激反应。未看见统计学差异。

[0503] 临床评分:通过局部内窥镜眼底成像(TEFI)进行视网膜成像。通过针对非参数数

据进行克鲁斯凯-沃利斯检验,接着针对实验日之间的多重比较进行邓恩事后检验(Dunn's post-test),来分析从第0天到第21天在对照组中测量的TEFI评分数据。

[0504] 当与对照组中第0天相比时,IRBP施用诱发从第14天($p<0.01$)和在第21天($p<0.0001$)测量的TEFI评分显著增加(图73)。

[0505] 通过针对非参数数据进行克鲁斯凯-沃利斯检验,接着针对实验组数之间的多重比较进行邓恩事后检验,来分析在所有实验组中在第21天测量的TEFI评分数据。

[0506] 在实验此阶段,实验组之间无显著差异,但在MRX008处理组中TEFI评分比阴性对照组中低。实际上,在MRX008处理组中TEFI评分低于阳性对照环孢菌素A处理组。

[0507] 结论。排除未处理动物,在来自所有实验组的淋巴结培养物中看到对IRBP肽的增殖反应,表明疾病诱发成功。如在IRBP诱发的葡萄膜炎的此种模型中所预期,通过TEFI测定的临床评分从第14天起增加。到第21天,实验组之间的显著差异尚未可见,但在MRX008处理的组中观察到发病率和疾病严重度惊人的下降,此大于阳性对照组中所见的下降。具体地说,这些数据表明用菌株MRX008处理减少视网膜损伤、视神经盘炎症和/或视网膜组织被炎性细胞浸润(参见以上TEFI视网膜影像评分系统)。这些数据表明菌株MRX008可用于治疗或预防葡萄膜炎。

[0508] 实施例8-MRX006的细菌接种物在LPS诱发的炎症模型中的功效-降低细胞因子浓度

[0509] 概述

[0510] 在消炎分析($n=9$)中测试细菌菌株MRX006(830)以测定其对细胞因子浓度的作用。使用公认的炎性反应触发物脂多糖(LPS)来诱发炎症。将MRX006(830)处理组中炎性反应的程度和特征与对照组相比较。发现本发明的组合物减轻炎性反应,并且尤其降低细胞因子IL-6和TNF α 的浓度。因此,所述数据表明本发明的组合物具有广泛的炎症表型并且可用于治疗炎性疾病,例如中性粒细胞增多和哮喘。

[0511] 结果和分析

[0512] 实验结果展示于图75和76中。

[0513] 分别如图75和76中所示,如诱发炎症后所预期般,施用LPS引起IL-6和TNF α 水平增加。重要地,在用MRX006(830)处理的组中这些细胞因子的水平显著下降。因此,本发明的组合物降低炎性细胞因子的浓度,因此具有广泛的消炎表型。

[0514] 实施例9-MRX006的细菌接种物在LPS诱发的炎症模型中的功效-减少单核细胞来源的树突状细胞(Mo-DC)成熟

[0515] 概述

[0516] 在涉及单核细胞来源的树突状细胞(Mo-DC)的成熟程度检测的消炎分析中测试细菌菌株MRX006(830)。这些细胞,特别是如用于此实施例的CD1a+CD14-细胞,在成熟时与炎性反应相关。CD1a+CD14-细胞的成熟通过其CD80、CD83、CD86和HLA-DR的表达增加来表明。发现本发明的组合物减轻炎性反应,并且尤其减少与炎性反应相关的树突状细胞(CD1a+CD14-)的成熟。因此,所述数据表明本发明的组合物可用于治疗炎性疾病,例如中性粒细胞增多和哮喘。

[0517] 结果和分析

[0518] 实验结果示于图77中。

[0519] 如图77中所示,施用LPS引起MoDC上成熟标记物的表达增加,如黑线移至图右边所指示。重要地,在用MRX006处理的LPS组中成熟标记物的表达水平降低(如黑色填充线移至左边所指示)。对于LPS+MRX006组,CD80、CD83和HLA-DR炎症标记物的表达水平回至未刺激对照物中的表达水平(虚线)。另外,LPS+MRX006组中CD86的表达水平与单独LPS组比较也极大地减少。因此,本发明的组合物降低与炎症相关的MoDC成熟的水平,因此具有广泛的消炎表型。

[0520] 实施例10-细菌接种物在卵白蛋白诱发的炎症模型的小鼠模型中的功效-减少CD4+细胞分裂

[0521] 概述

[0522] 在涉及CD4+细胞水平检测的另一炎症分析(n=5)中测试细菌菌株MRX006(830)。CD4+细胞水平增加是炎症指示物。此增加的原因之一是CD4+细胞与Th17和IL-17炎症通路相关。使用公认的炎性反应触发物卵白蛋白诱发炎症。发现本发明的组合物减轻炎性反应,并且尤其减少CD4+细胞数目。因此,所述数据表明本发明的组合物可用于治疗炎性疾病,例如中性粒细胞增多和哮喘。

[0523] 结果和分析

[0524] 实验结果示于图78中。

[0525] 如图78中所示,在用卵白蛋白激发后群体中进行三次或更多次细胞分裂的CD4+细胞数目增加(如在炎性反应时所预期般)。关键地,在用MRX006处理的组中在用卵白蛋白激发后进行三次或更多次分裂的细胞数目显著下降。因此,本发明的组合物降低CD4+细胞水平,因此发明可用于治疗炎性疾病,例如中性粒细胞增多和哮喘。

[0526] 实施例11-稳定性测试

[0527] 将含有至少一种本文中描述的细菌菌株的本文中描述的组合物存储在密封容器中25°C或4°C下并且将容器置于具有30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或95%相对湿度的气氛中。如以通过标准方案测定的菌落形成单位测量,在1个月、2个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年后,至少50%、60%、70%、80%或90%的细菌菌株应残留。

[0528] 序列

[0529] SEQ ID NO:1(粪便布劳特氏菌菌株GAM6-1 16S核糖体RNA基因,部分序列-HM626177)

1 tgcaagtgcg gcaaggcgct tacgacagaa cttcgggg aagatgttaag ggactgagcg
 61 gcggacgggt gagtaacgcg tggtaacct gcctcataca ggggataac agtggaaac
 121 ggctgctaaccgcataag cgacggtat cgcatgatac agtgtaaaa actccggtgg
 181 tatgagatgg acccgctct gattagctg ttggaggg aacggccac caaggcgacg
 241 atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggc ctgagacacg gccagactc
 301 ctacgggagg cagcagtgg gaatattgca caatgggg aaccctgatc cagcgacgcc
 361 gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa acttctatca gcagggaga aaatgacggt
 421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gttaggggca
 481 agcgttatcc ggattactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgttg
 541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttctttag tgccggagag
 601 gtaagcggaa ttcctagtgt agcggtaaa tgcgtagata ttaggagaa caccagtggc
 [0530] 661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg
 721 attagataacc ctggtagtcc acgcgtaaa cgtataac taggtgttgg ggagcaaaagc
 781 tcttcggtgc cgcaaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
 841 aaactcaaag gaattgacgg ggaccgcac aagcgtgg acatgtgggtaattcgaag
 901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggacaccc
 961 cttcgggac agagaagaca ggtgtgcata ggtgtcgatc agctcgatc gtgagatgtt
 1021 gggtaagtc ccgcaacggc cgcaacccct atcctcagta gccagcaggt gaagctggc
 1081 actctgtgg gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
 1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtct acaatggcgt aaacaaagg aagcgagccc
 1201 gcgaggggg acaaattcca aaaataacgt cccagttcg actgcagtct gcaactcgac
 1261 tgcacgaagc tggaaatcgatc agtaatcgatc aatcagaatg tgcgtgaa tacgttcccg
 1321 ggtttgtac acaccggcc tcacaccatg ggagtca gacccggaa tc

[0531] SEQ ID NO:2(粪便布劳特氏菌菌株830的共有16S rRNA序列)

TTKGTCGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGTTACGACAGAACCTT
 CGGGGGAAAGATGTAAGGACTGAGCGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGTAACCTGCCTCATACAGGGGGATAACA
 GTGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACTGTGAAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
 GGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGTAACGCCACCAAGGCAGCATCGTAGCCGGCTGAGAGGGTGA
 ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCAATGGGGAAA
 CCTGATGCGACGCCCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTCTATCAGCAGGGAAAGAAAATGACGG
 TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
 ACTGGGTGAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGCTTAACCCCAGGACTGCATTGG
 AACTGTTTCTTGAGTGCAGGAGAGGTAAAGCGGAATTCTTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
 CACCACTGGCGAAGCGGCTTACTGGACGGTAACGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGAGCAAAGCTCTCGGTGCCAGCAAACGCAA
 TAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTGACATCGATCTGACCGGTTGTAATGGAACCTT
 TCCTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA

CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAGCTGGGACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
 AAGGCAGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
 AAGCGAGCCCGCAGGGGGAGCAAATCCAAAAATAACGTCCTAGTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
 AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCGGTCTTGTACACACCAGCCGTCAC
 ACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCAGGGATTGATAACTG
 GGGTGAAGTCTAGGGGGT

[0533] SEQ ID NO:3(韦氏布劳特氏菌菌株WAL 14507 16S核糖体RNA基因,部分序列-EF036467)

- [0534] 1 caagtcaac gggattttt ttattgaaac ttccgtcgat ttaatttaat tcttagtgccg
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
 121 tgctaataacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtaaaaact ccgggttgtat
 181 aagatggacc cgcgttggat tagcttggg gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc
 241 catagccgc ctgagaggtt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
 301 cgggaggcag cagtgggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcccg
 361 tgaaggaaga agtatctcg tatgtaaact tctatcagca gggaaagatag tgacggtacc
 421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagcccg gtaatacgta gggggcaagc
 481 gttatccgaa tttactgggt gtaaaggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa
 541 ggcattggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
 601 agcggattc ctatgttagc ggtggaaatgc gtagatatta ggagaacac cagtggcgaa
 661 ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctgaaag cgtggggagc aaacaggatt
 721 agataccctg ttagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcggtt ggaaagcca
 781 ttcgggtccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgacaa gcgggtggagc atgtggttt attcgaagca
 901 acgcaagaa ctttaccaag tcttacatc cgcctgaccg atccttaacc ggttttcc
 961 ttcgggacag gcgagacagg tggcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg
 1021 gttaagtccc gcaacgagcg caacccctat cctcgttagc cagcattaa ggtggcact
 1081 ctggggagac tgccaggat aacctggagg aaggcgggaa tgacgtcaaa tcatcatgcc
 1141 ctttatgatt tggctacac acgtctaca atggctaaa caaaggaaag cgagattgt
 1201 agatggagca aatccaaaa ataacgtccc agttcggact gtatctgca acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgcgc cggtaatac gttccgggt
 1321 cttgtacaca ccgccccgtca caccatgggaa gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaacc
 1381 tgcaaagaag gagctgccga aggccggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt
- [0535] SEQ ID NO:4(韦氏布劳特氏菌菌株MRX008的共有16S rRNA序列)
 TTCATTGAGACTTCGGTGGATTTAGATTCTATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGCTGGGTAACCTGCCTTAT
 ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAAACTC
 CGGTGGTATAAGATGGACCCCGCTGGATTAGCTTGGTGGGTAACGGCCCACCAAGGCAGCATCCATAGCCG
 GCCTGAGAGGGTGAACGGCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTG
 CACAATGGGGAAACCCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACCTTCTATCAGCAGG
 GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAACCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGGGAAAG
 CGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGCTAACCT
 GTGGACTGCATTGGAAACTGTCATACTTGAGTGGCGGAGGGTAAGCGGAATTCTTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GATATTAGGAGGAACACCACTGGCAAGGCGCTTACTGGACGGTAACGTGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGC
 AACAGGATTAGATAACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGAGCATGGCTCTTCGGTG
 CCGTCGCAAACCGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC
 GCACAAAGCGGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTAACCAAGTCTGACATCCGCTGACCGA
 TCCTTAACCGGATCTTCCTCGGGACAGGCAGACAGGTGGTCATGGTTGTCGTCACTCGTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGAACGAGCGAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTAAAGGTGGGACTCTGGGGAGACTGCCA
 GGGATAACCTGGAGGAAGGCAGGAGTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGTCACACGTGCTACAAT
 GGCCTAAACAAAGGGAAAGCGAGATCGTAGGAGATGGAGCAAATCCAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGTAGTCTGC
 AACCCGACTACACCGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCGGGTCTTGT
 CACACCGCCCCGTACACCATGGGAGTCAGTAACCCCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA
- [0536]
- [0537]
- [0538] SEQ ID NO:5(菌株830染色体序列)-参见电子序列表。
- [0539] SEQ ID NO:6(菌株830质粒序列)-参见电子序列表。
- [0540] 参考文献
- [0541] [1]Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol.9 (4) :279-90.

- [0542] [2]Eckburg et al. (2005) *Science*.10;308 (5728) :1635-8.
- [0543] [3]Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect*.3 (12) :1021-35
- [0544] [4]Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci*.59 (12) :2088-96.
- [0545] [5]Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122 (1) :107-18.
- [0546] [6]Frank et al. (2007) *PNAS* 104 (34) :13780-5.
- [0547] [7]Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol*.44 (11) :3980-8.
- [0548] [8]Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis*.16 (12) :2034-42.
- [0549] [9]Machiels et al. (2013) *Gut*.63 (8) :1275-83.
- [0550] [10]WO 2013/050792
- [0551] [11]WO 03/046580
- [0552] [12]WO 2013/008039
- [0553] [13]WO 2014/167338
- [0554] [14]Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis*.46 Suppl 2:S96-100.
- [0555] [15]Azad et al. (2013) *BMJ*.347:f6471.
- [0556] [16]Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58,1896-1902.
- [0557] [17]Park et al. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol*.62 (Pt 4) :776-9.
- [0558] [18]Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol*.58 (Pt 8) :1896-902.
- [0559] [19]Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*.26:557-563.
- [0560] [20]Srutková et al. (2011) *J.Microbiol.Methods*.87 (1) :10-6.
- [0561] [21]Ye et al. (2015) *PLoS One*.10 (1) :e01 17704.
- [0562] [22]Fabro et al. (2015) *Immunobiology*.220 (1) :124-35.
- [0563] [23]Yin et al. (2014) *Immunogenetics*.66 (3) :215-8.
- [0564] [24]Cheluvappa et al. (2014) *Clin Exp Immunol*.175 (2) :316-22.
- [0565] [25]Schieck et al. (2014) *J Allergy Clin Immunol*.133 (3) :888-91.
- [0566] [26]Balato et al. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol*.28 (8) :1016-24.
- [0567] [27]Monteleone et al. (2011) *BMC Medicine*.2011,9:122.
- [0568] [28]Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6,256-259
- [0569] [29]Miossec and Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov* 11 (10) :763-76.
- [0570] [30]Yang et al. (2014) *Trends Pharmacol Sct*.35 (10) :493-500.
- [0571] [31]Koenders et al. (2006) *J. Immunol*.176:6262-6269.
- [0572] [32]Amedei et al. (2012) *Int J Mol Sci*.13 (10) :13438-60.
- [0573] [33]Shabgah et al. (2014) *Postepy.Dermatol.Alergol*.31 (4) :256-61.
- [0574] [34]Zhang (2015) *Inflammation*.Aug 23.
- [0575] [35]Sun et al. (2015) *Cytokine*.74 (1) :76-80.
- [0576] [36]Mucientes et al. (2015) *Br J Ophthalmol*.99 (4) :566-70.
- [0577] [37]Jawad et al. (2013) *Ocul Immunol Inflamm*.21 (6) :434-9.
- [0578] [38]Maya et al. (2014) *J.Ophthalmology*.310329
- [0579] [39]Chi et al. (2007) *J.Allergy and Clinical Immunology*.119 (5) :1218-1224.

- [0580] [40]Chi et al. (2008) Investigative Ophthalmology&Visual Science.49 (7) : 3058-3064.
- [0581] [41]Luger and Caspi (2008) Semin.Immunopathol.30 (2) :134-143.
- [0582] [42]Numasaki et al (2003) Blood.101:2620-2627.
- [0583] [43]Zhang et al. (2008) Biochem..Biophys.Res.Commun.374:533-537.
- [0584] [44]Karin (2006) Nature.441:431-436.
- [0585] [45]Faghih et al. (2013) .Iranian Journal of Immunology.10 (4) :193-204.
- [0586] [46]Numasaki et al (2005) J.Immunol.175:6177-6189
- [0587] [47]Hammerich and Tacke (2014) Clin Exp Gastroenterol.7:297-306.
- [0588] [48]Miyamoto-Shinohara et al. (2008) J.Gen.Appl.Microbiol.54,9-24.
- [0589] [49]Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [0590] [50]Leslie et al. (1995) Appl.Environ.Microbiol.61,3592-3597.
- [0591] [51]Mitropoulou et al. (2013) J Nutr Metab (2013) 716861.
- [0592] [52]Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intest Microbiol.3 (2) :39-48.
- [0593] [53]Handbook of Pharmaceutical Excipients.2nd Edition. (1994) .Edited by A Wade and PJ Weller
- [0594] [54]Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R.Gennaro edit.1985)
- [0595] [55]Handbook of Microbiological Media.Fourth Edition (2010) Ronald Atlas,CRC Press.
- [0596] [56]Mainaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C.Hunter-Cevera, Academic Press
- [0597] [57]Strobel (2009) Methods Mol Biol.581:247-61.
- [0598] [58]Gennaro (2000) Remington:The Science and Practice of Pharmacy.20th edition,ISBN:0683306472.
- [0599] [59]Molecular Biology Techmques:An Intensive Laboratory Course. (Ream et al.,eds.,1998.Academic Press) .
- [0600] [60]Methods In Enzymology (S.Colowick and N.Kaplan,eds.,Academic Press.Ine.)
- [0601] [61]Handbook of Experimental Immnology,Vols.I-IV (D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds,1986,Blackwell Scientific Publications)
- [0602] [62]Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning:A Laboratory Manual.3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press) .
- [0603] [63]Handbook of Sarfoce and Colloidal Chemistry (Birdi,K.S.ed.,CRC Press,1997)
- [0604] [64]Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology.5th edition (Current Protocols) .
- [0605] [65]PCR (Introduction to Biotechniques Series) ,2nd ed. (Newton&Graham

eds., 1997, Springer Verlag)

[0606] [66] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30

[0607] [67] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

[0608] [68] Brand et al. (2007) Nature Protocols. 2 (5) : 1269-1275

[0609] [69] Jiao et al. (2014) Immunopathology and Infectious Diseases. 184 (4) : 1085-93.

[0610] [70] Caspi (2003) Curr Protoc Immunol. Chapter 15: Unit 15.6.

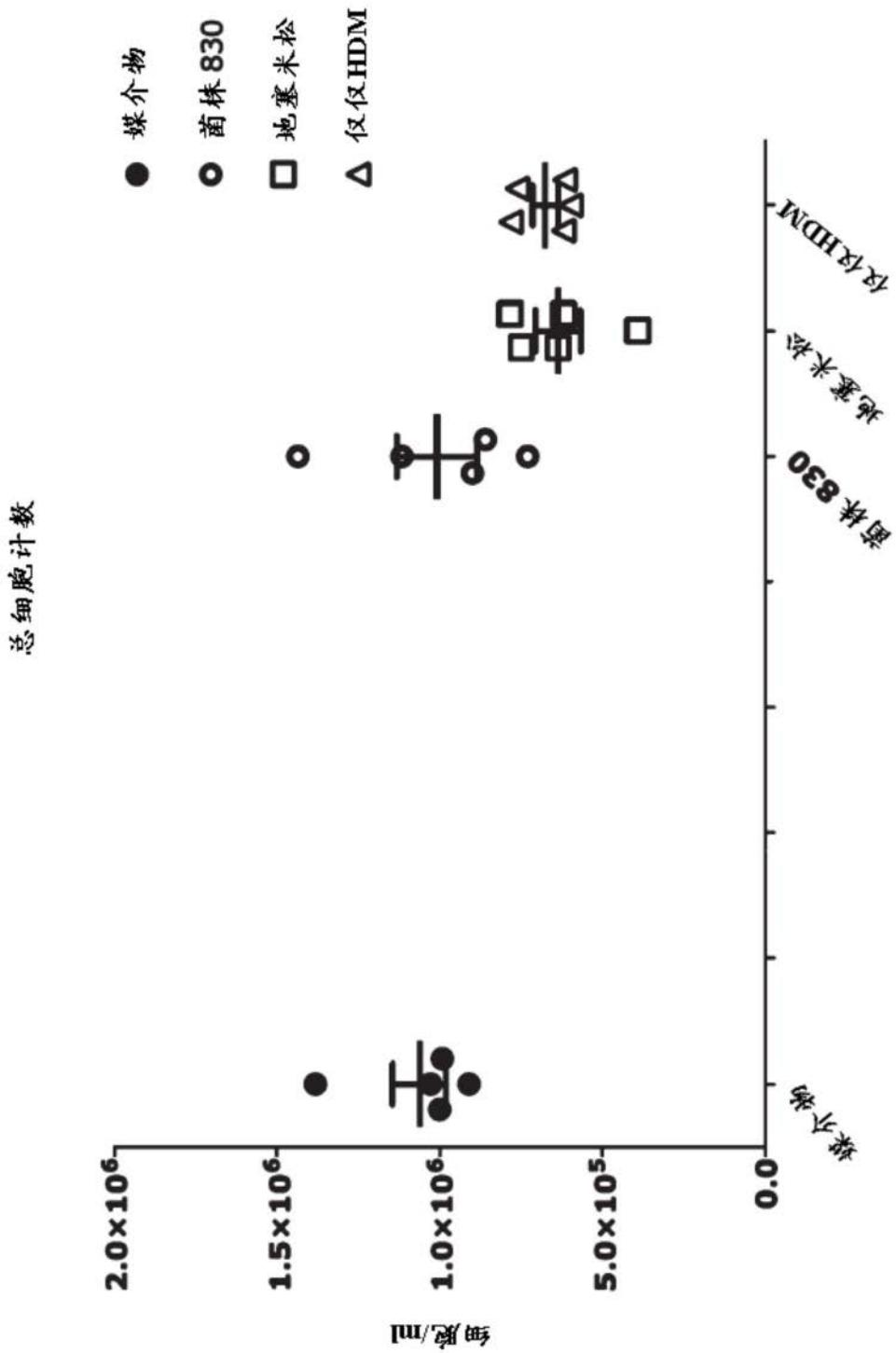


图1

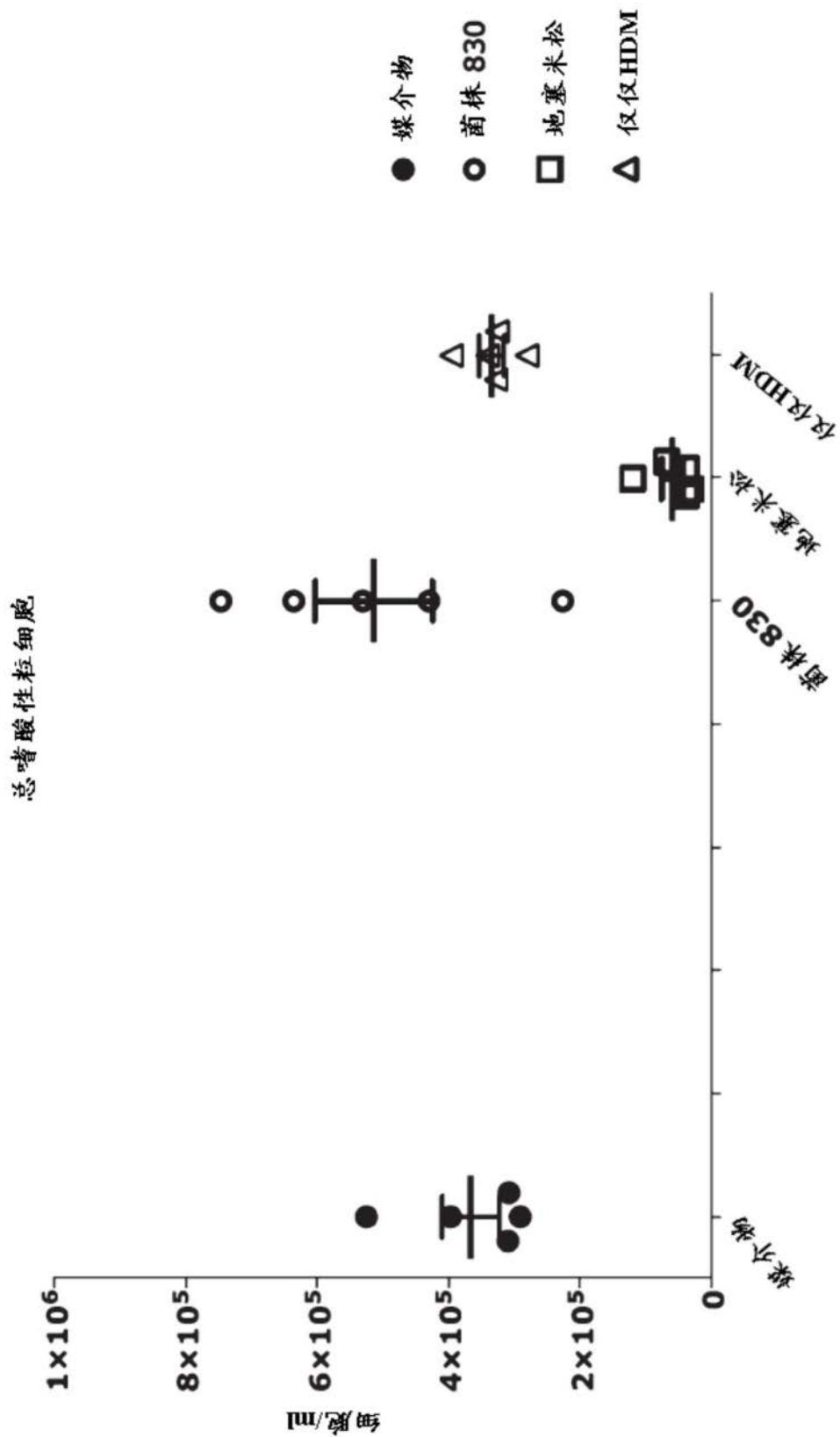


图2

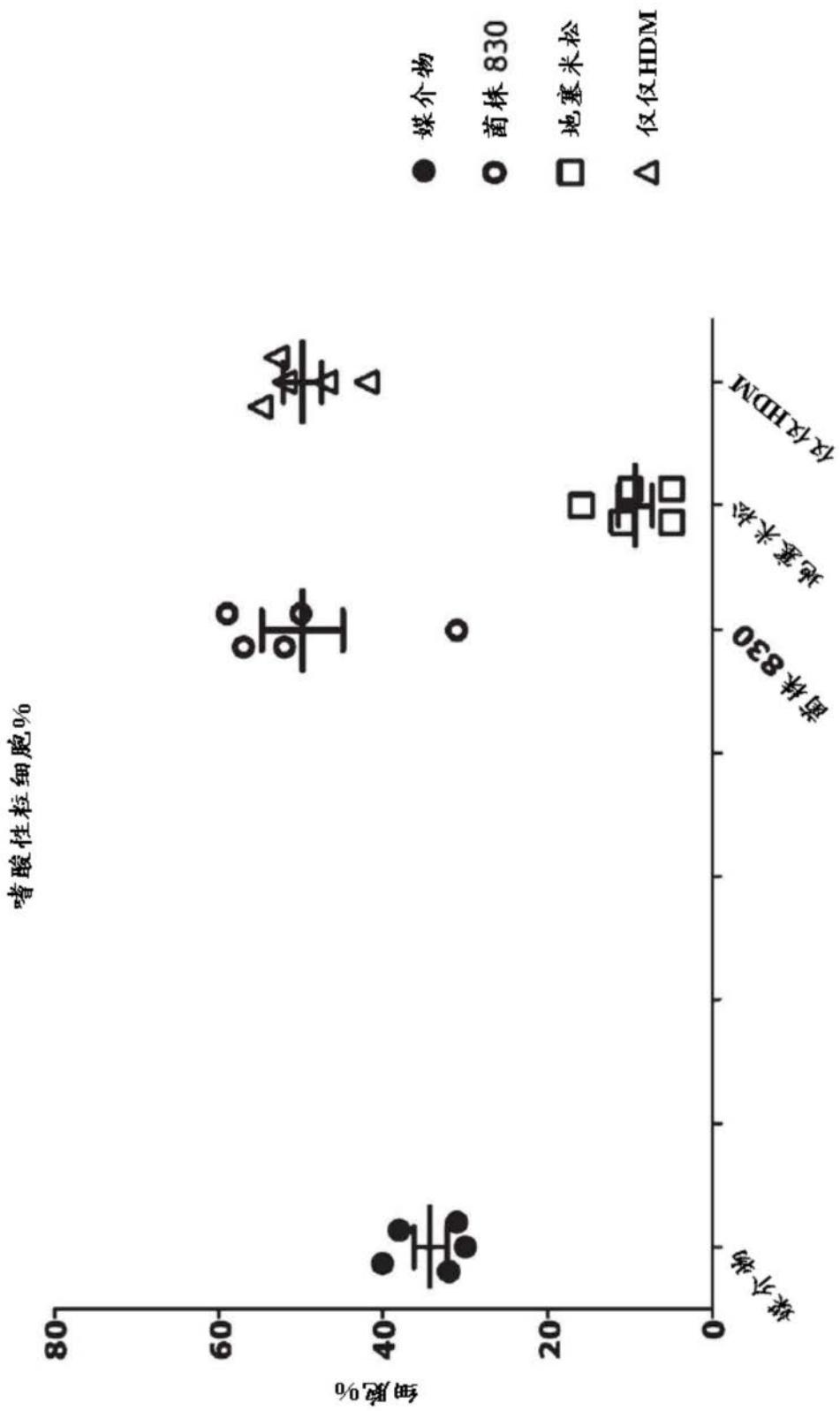


图3

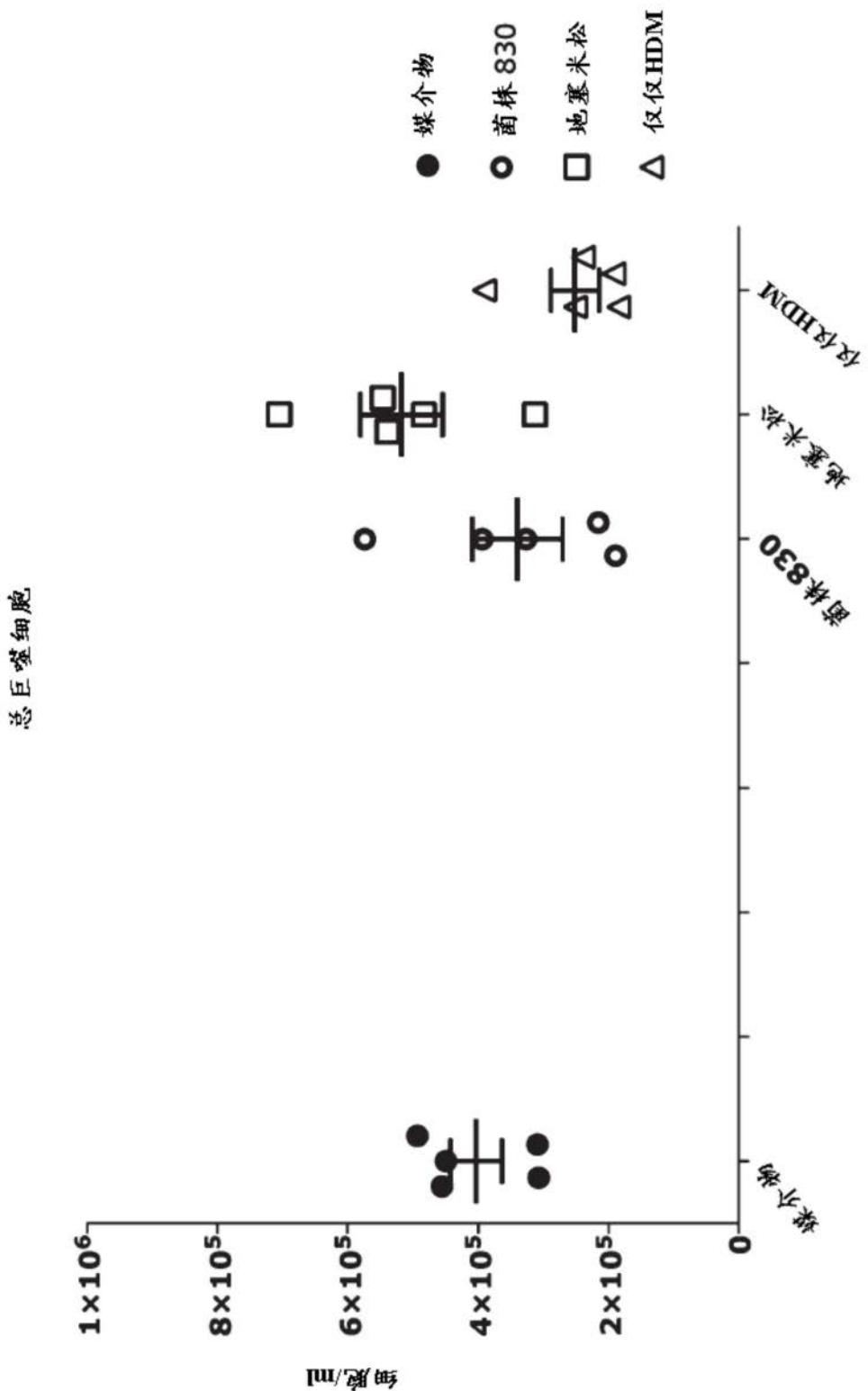


图4

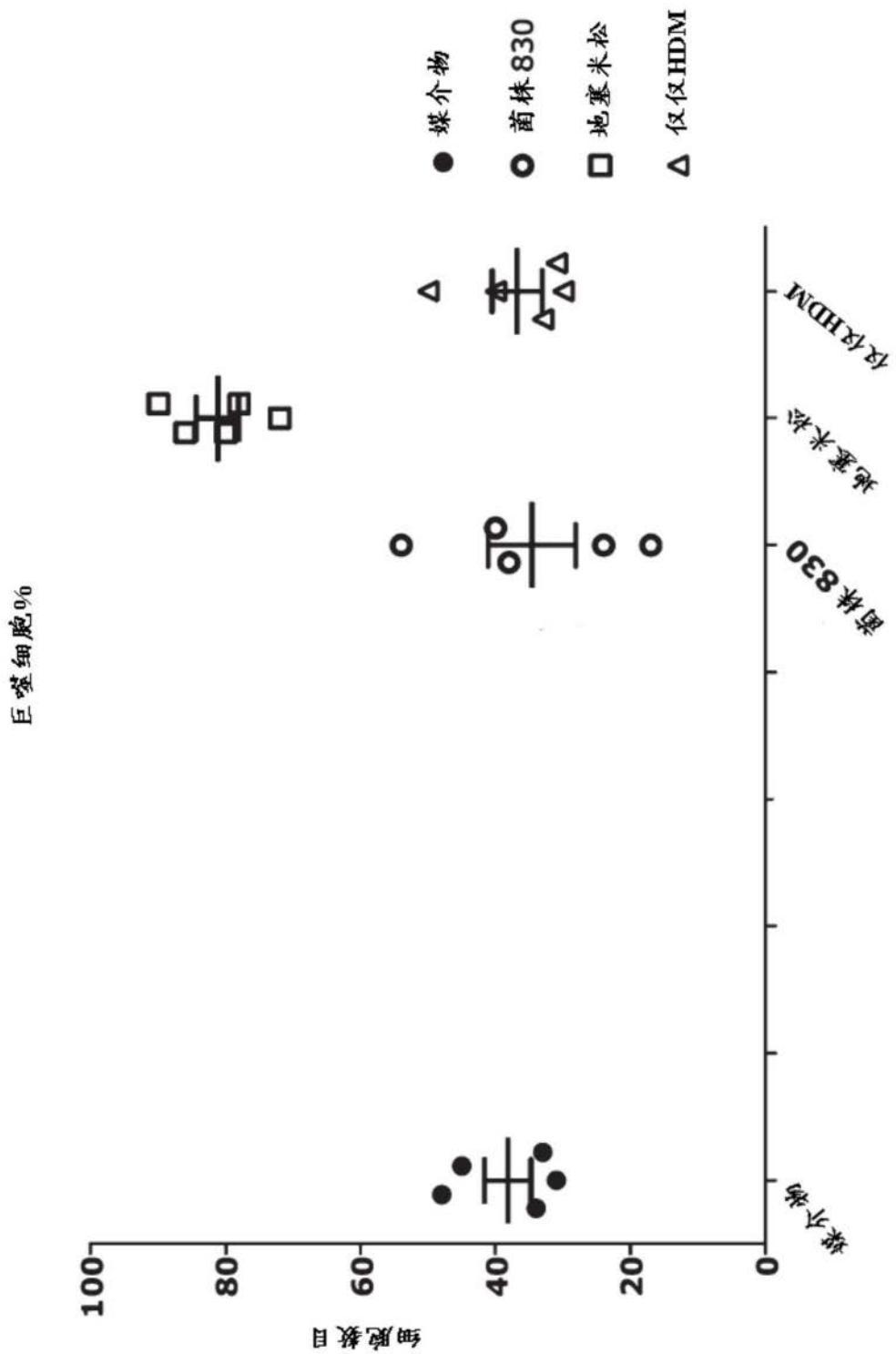


图5

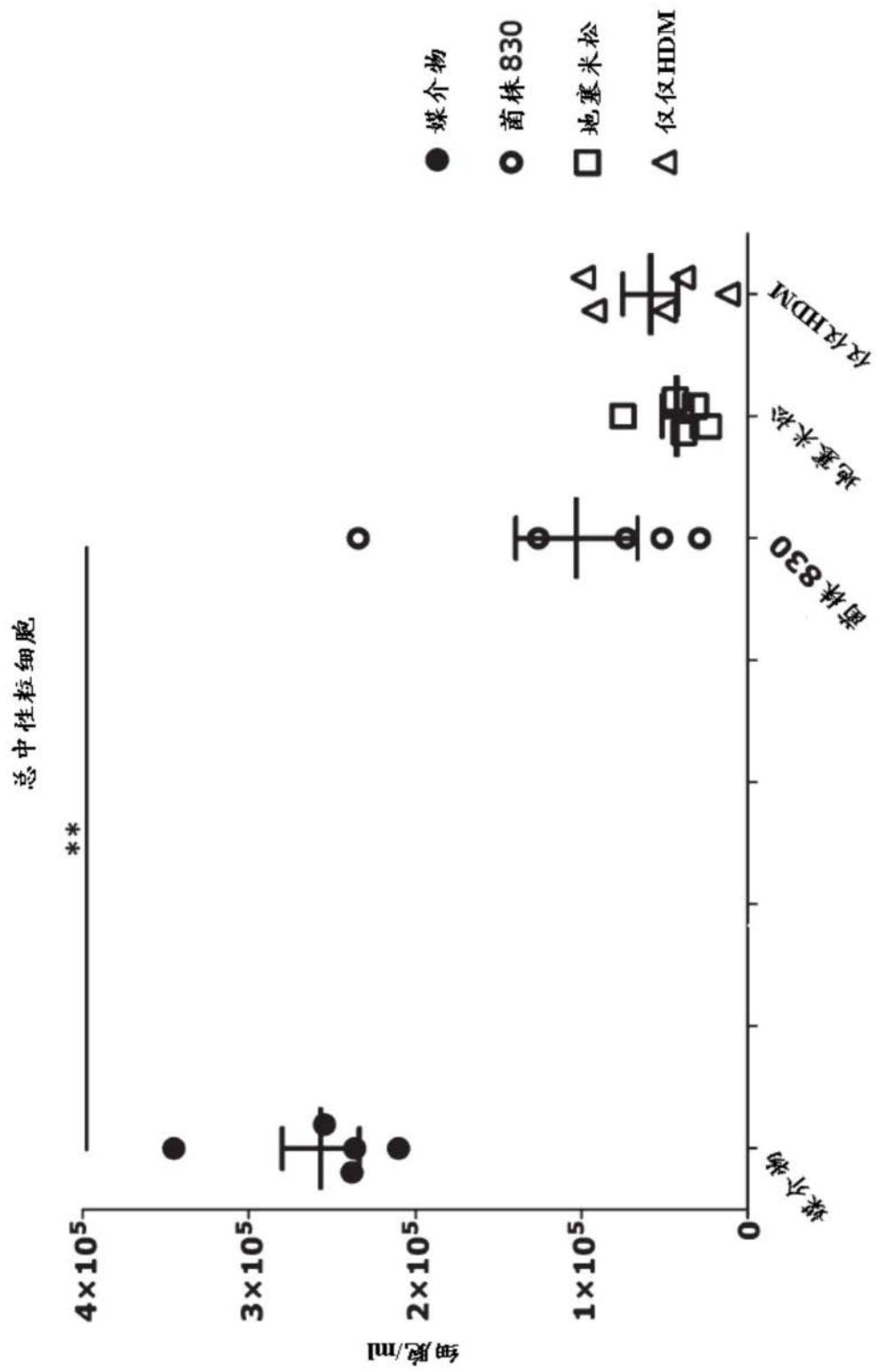


图6

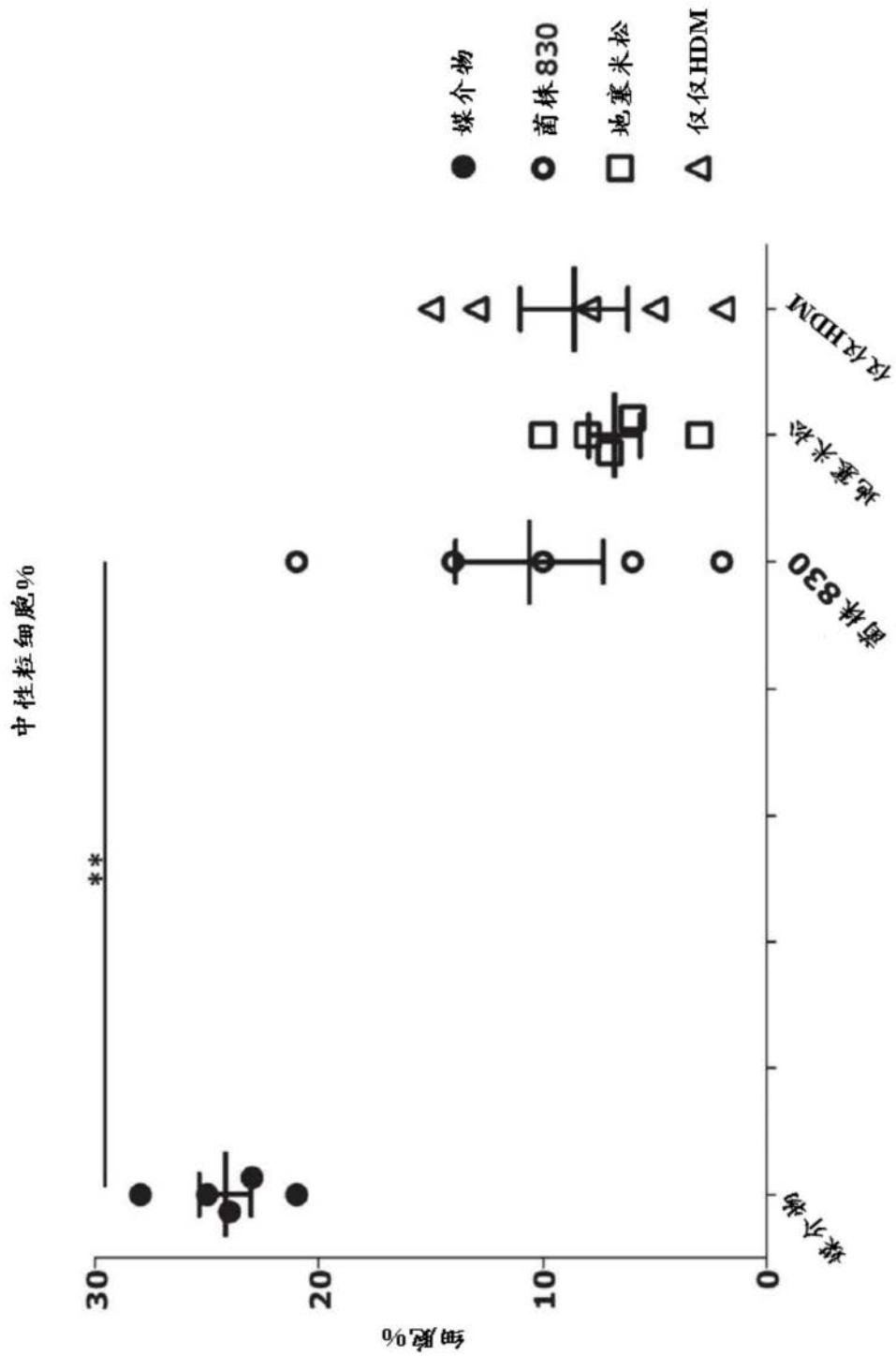


图7

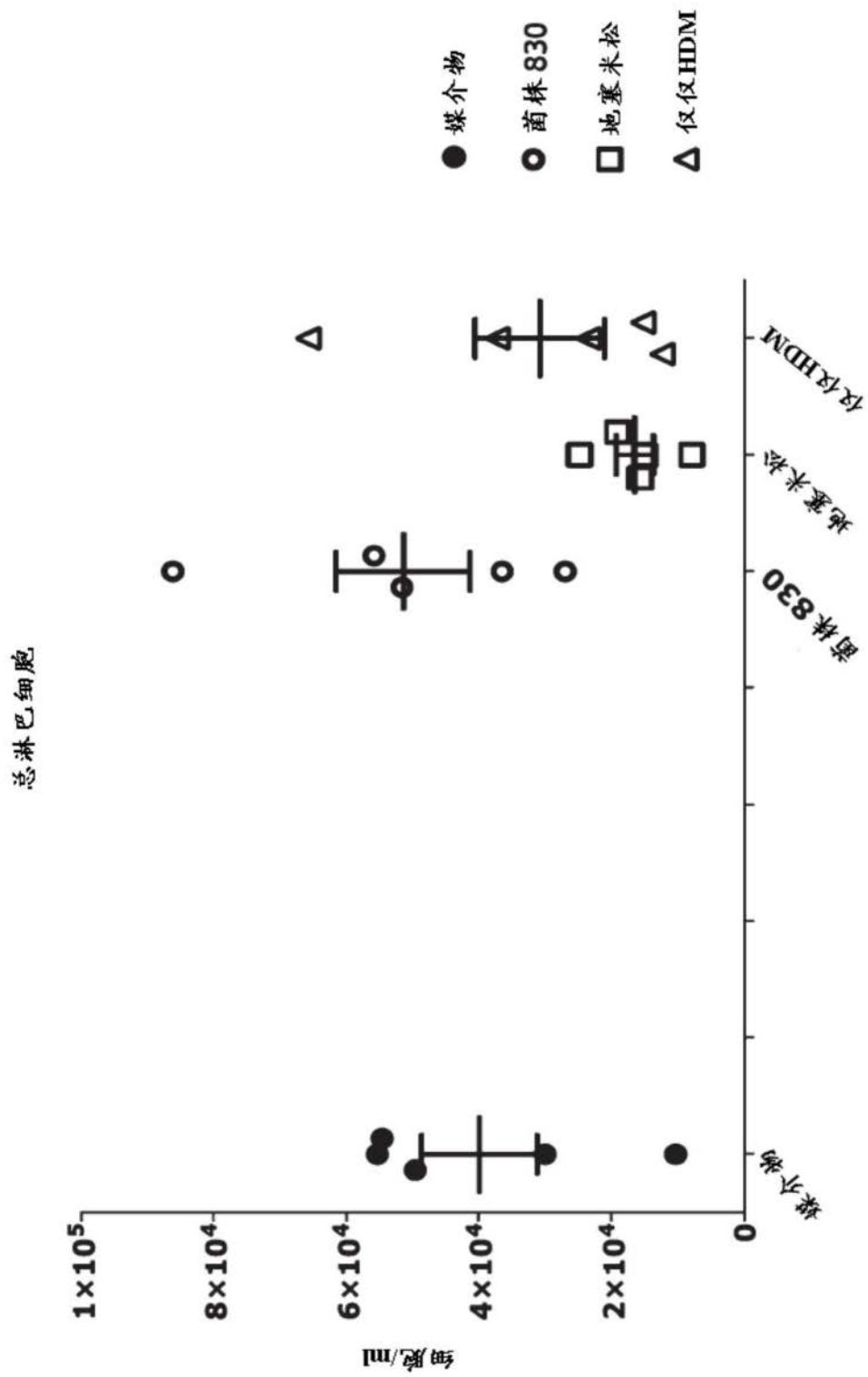


图8

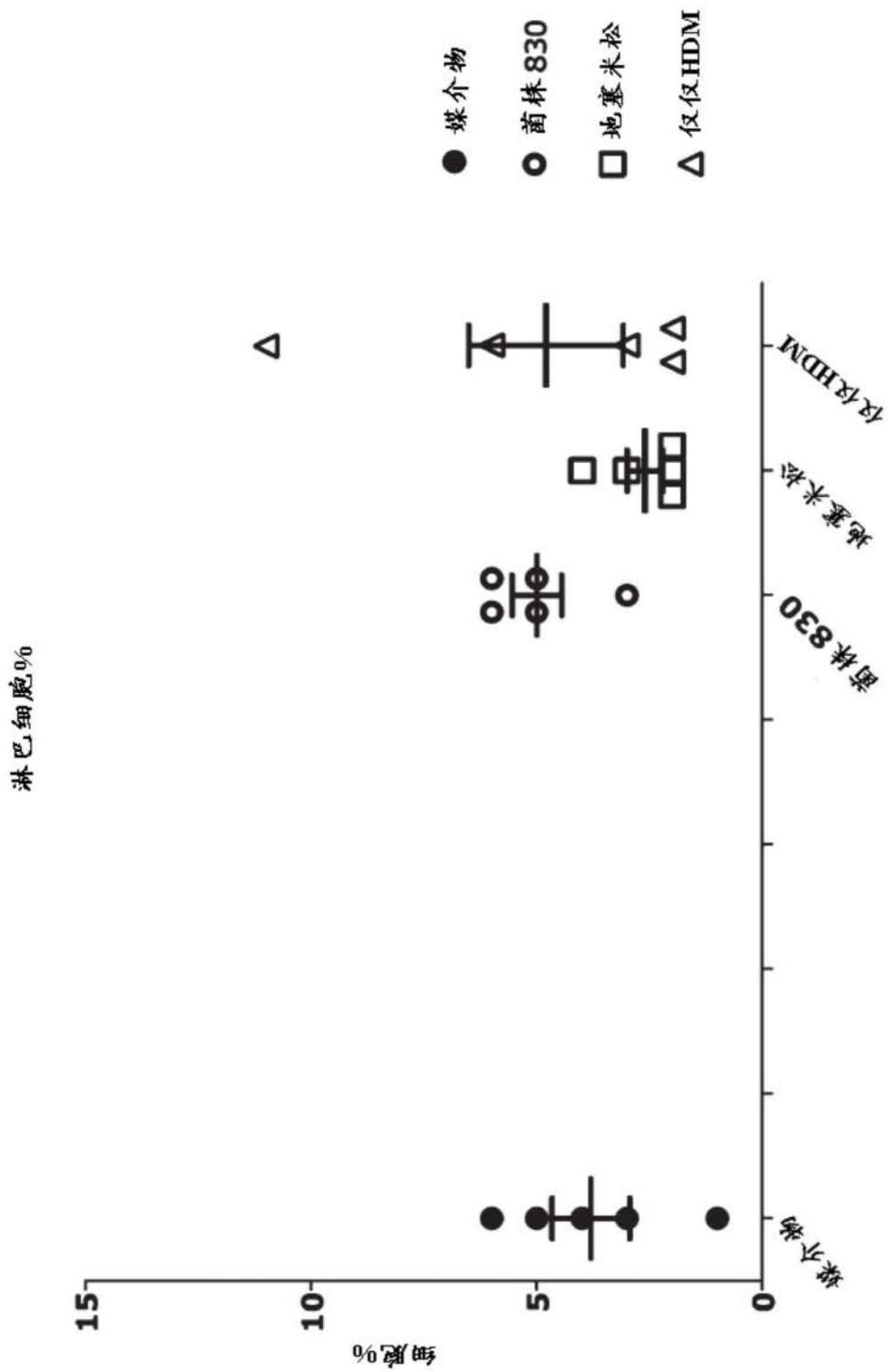


图9

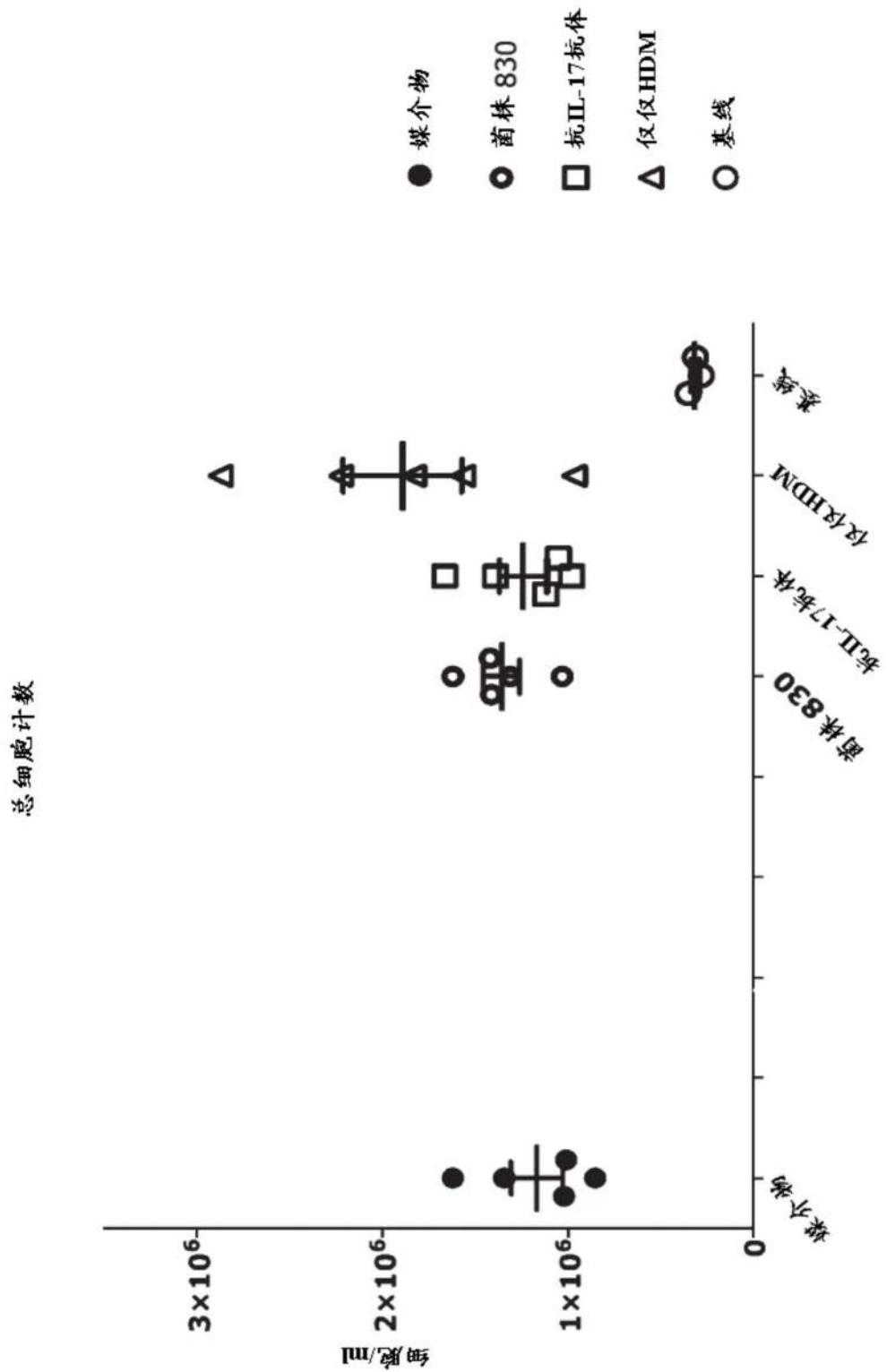


图10

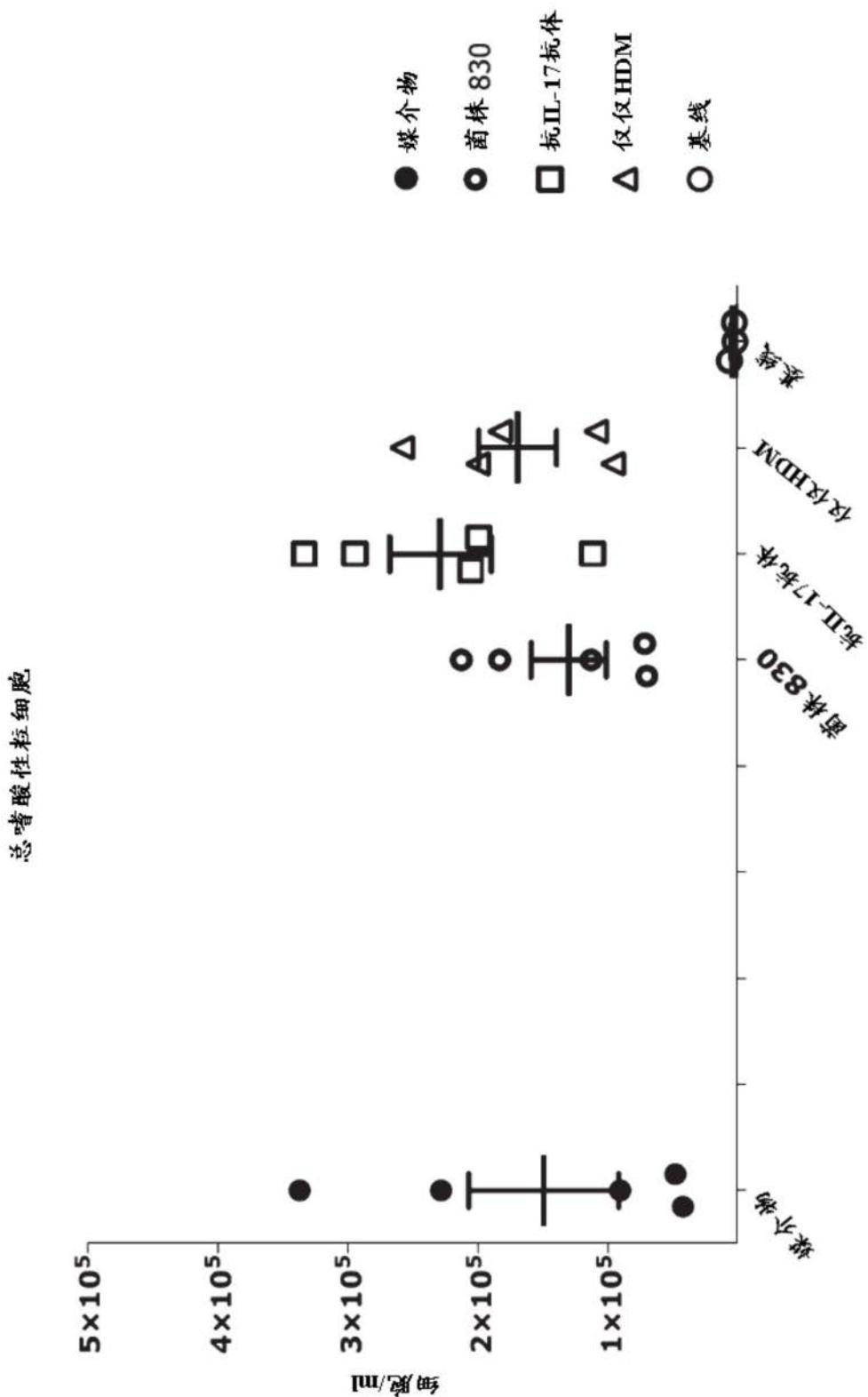


图11

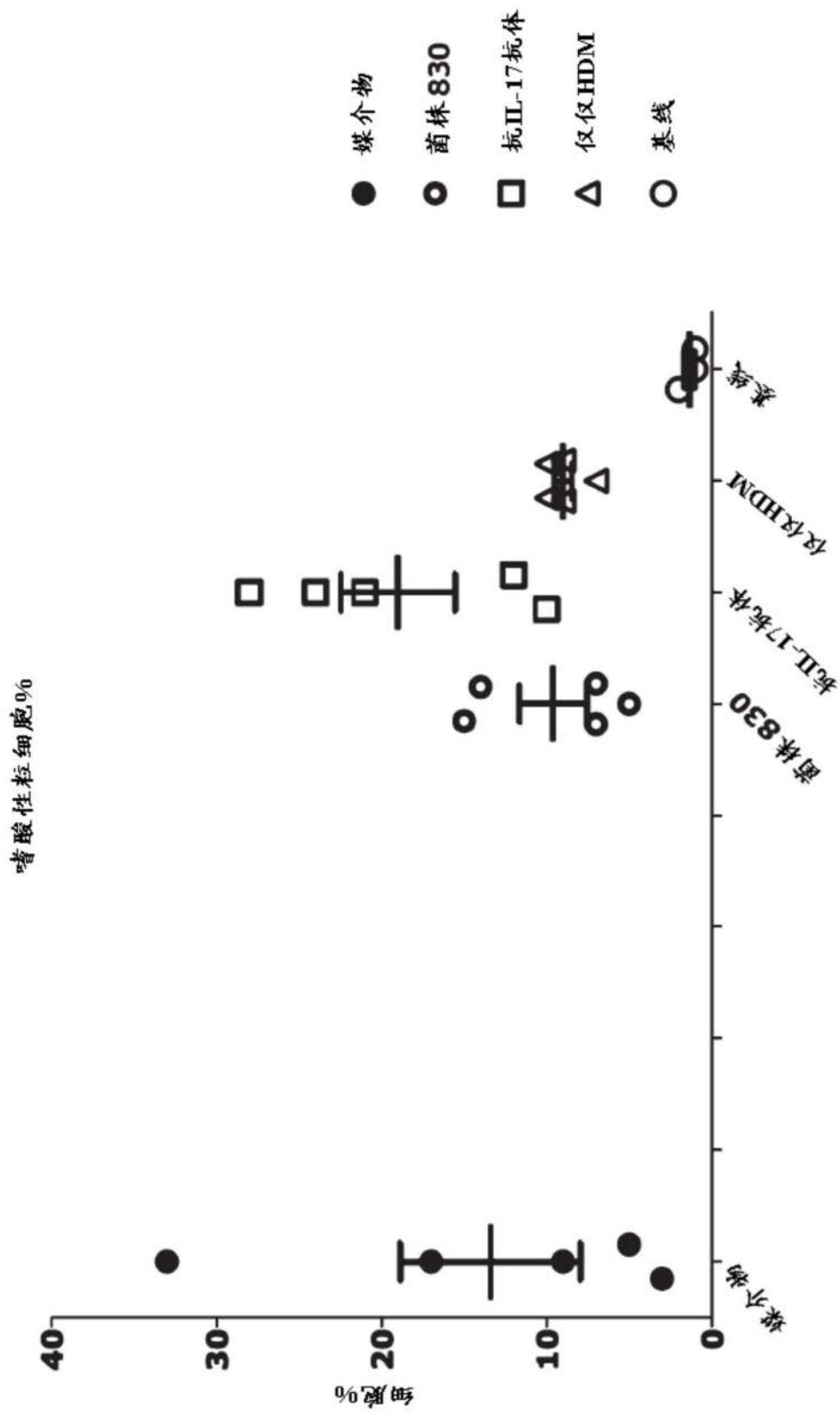


图12

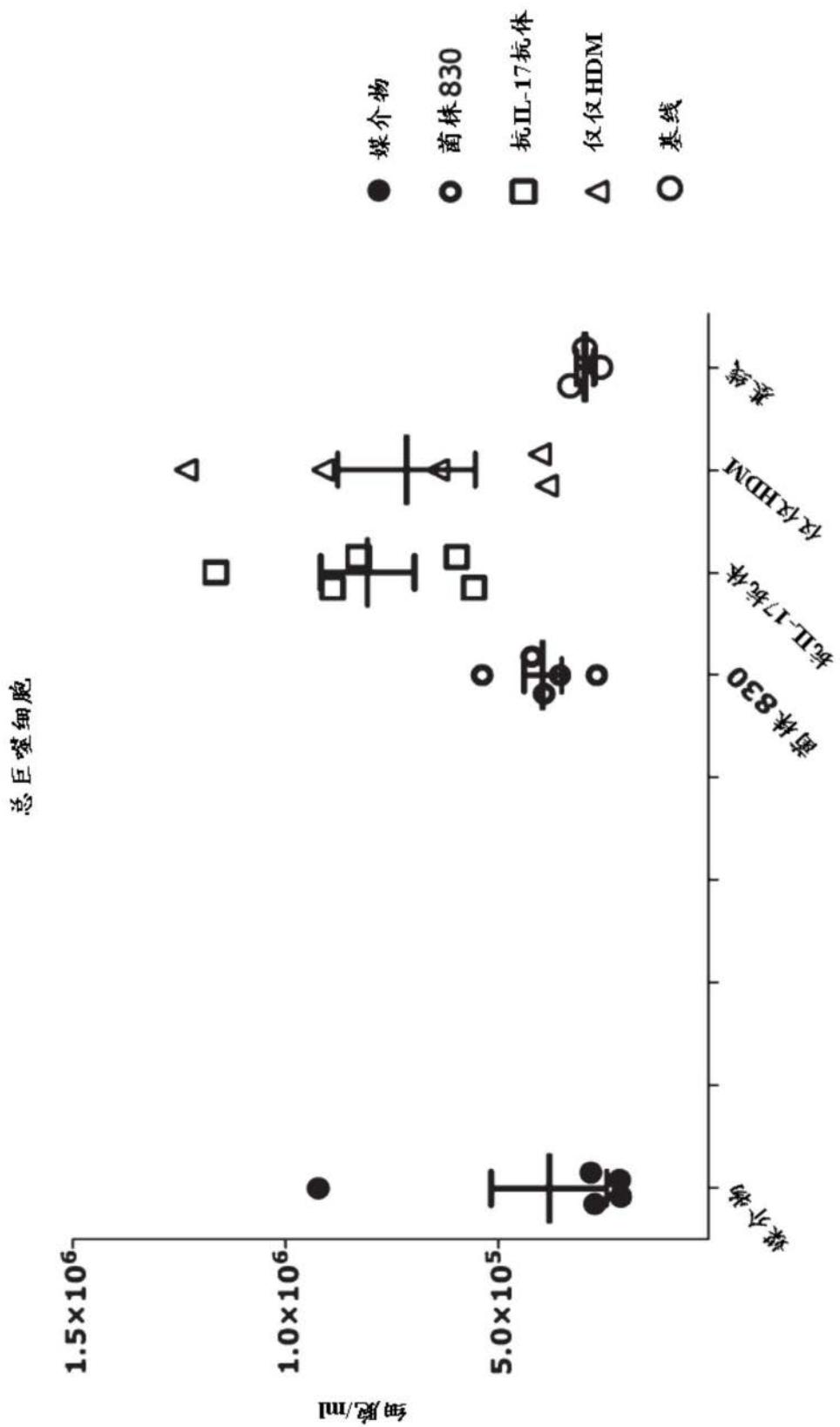


图13

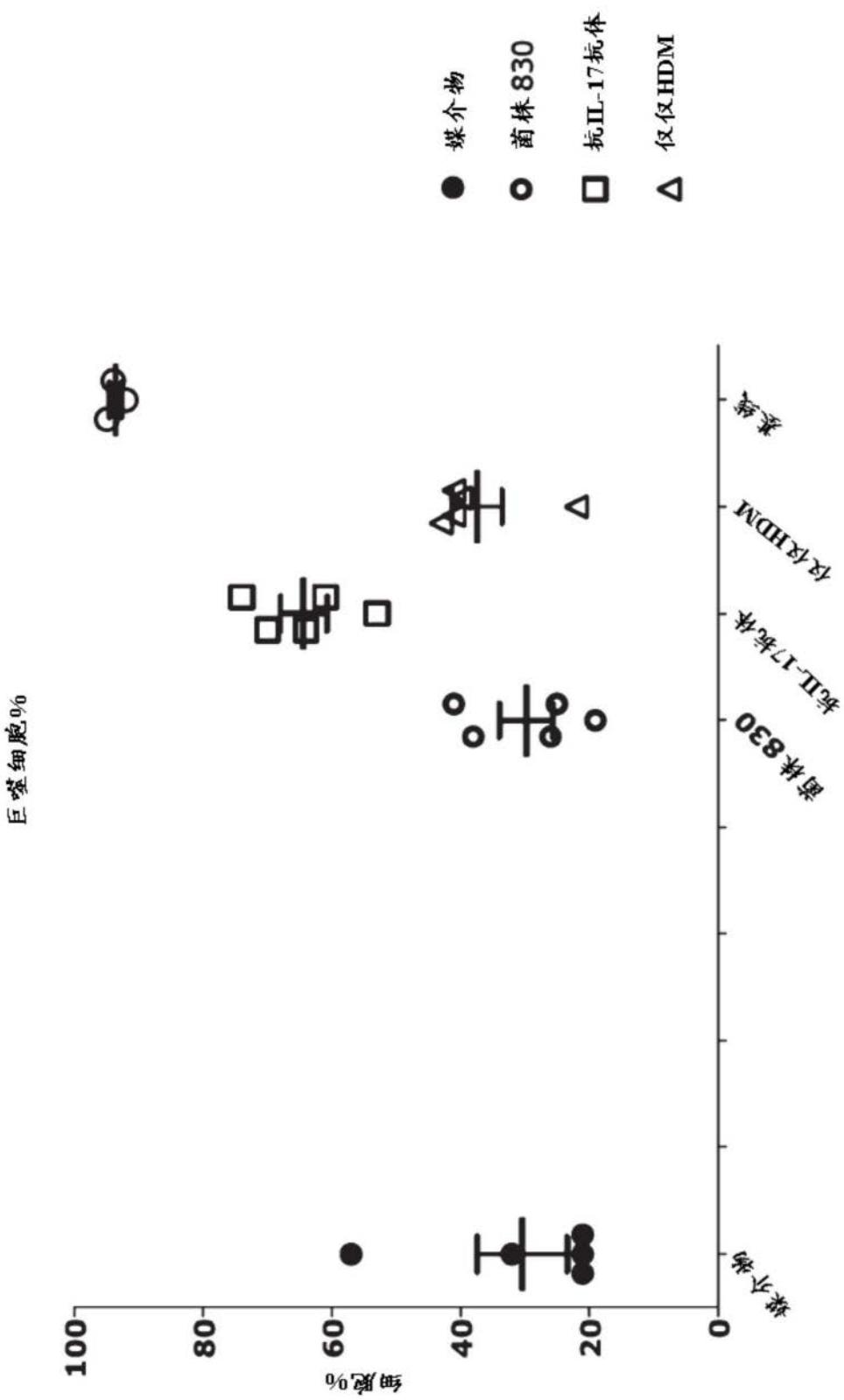


图14

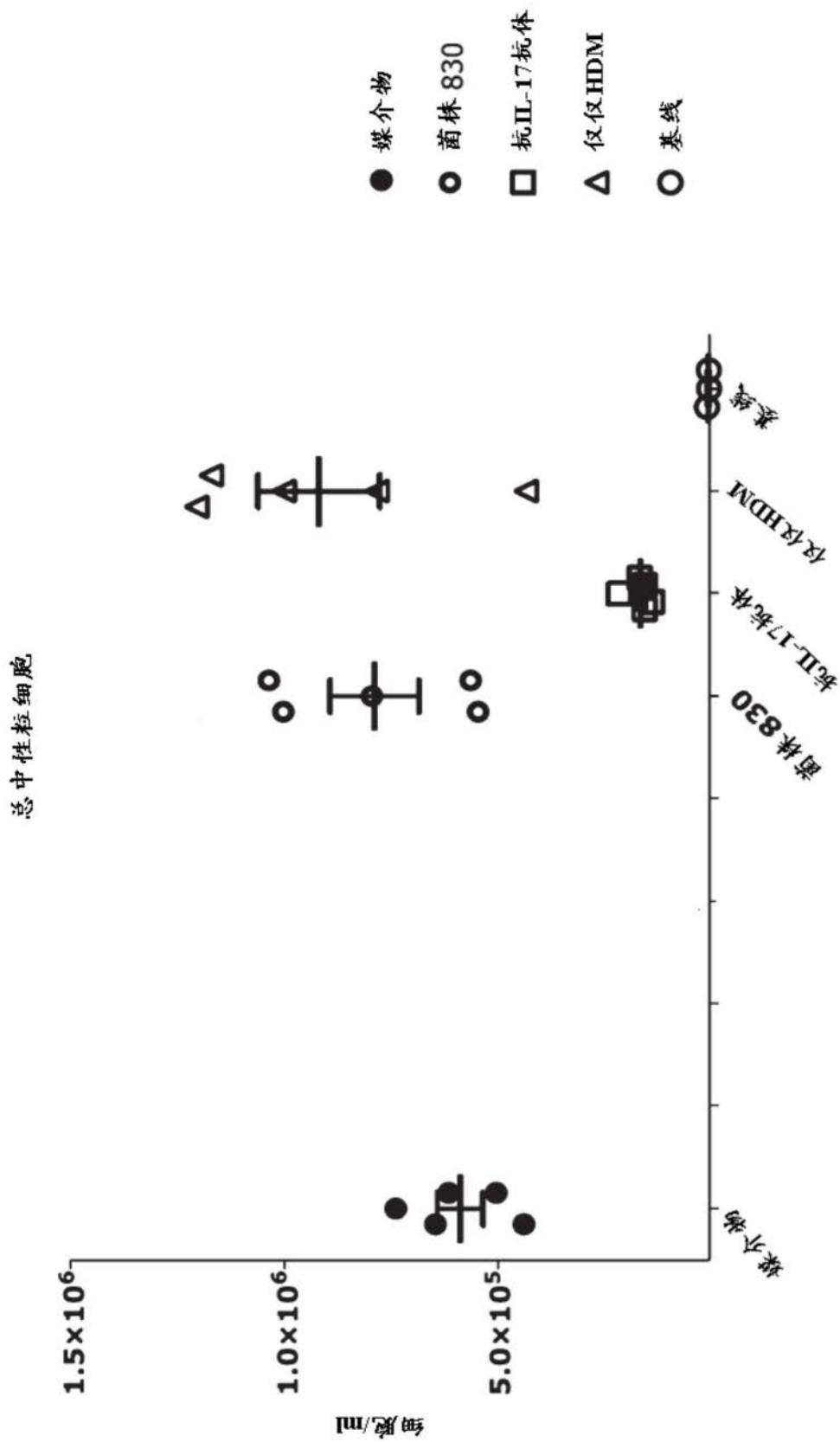


图15

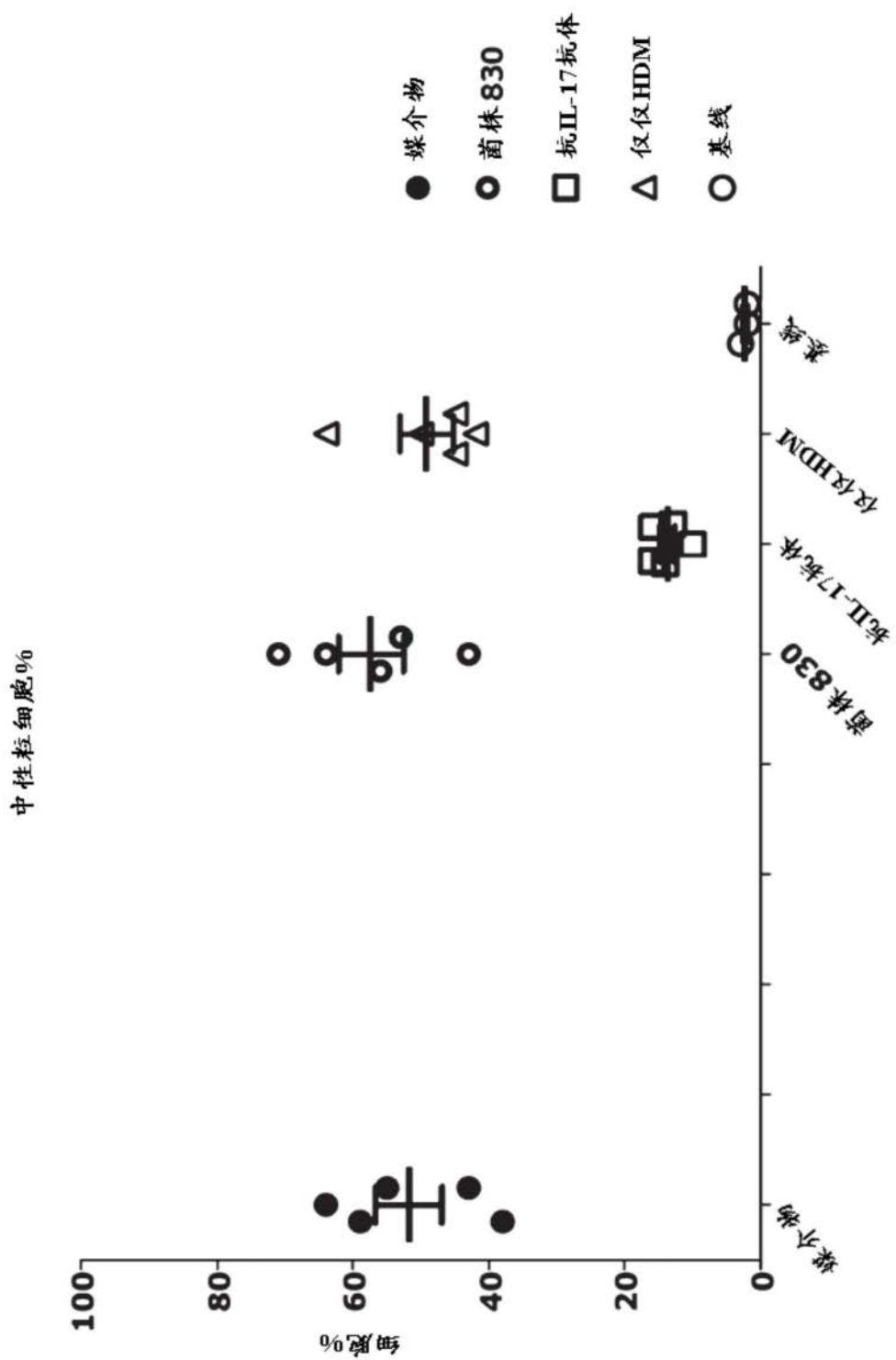


图16

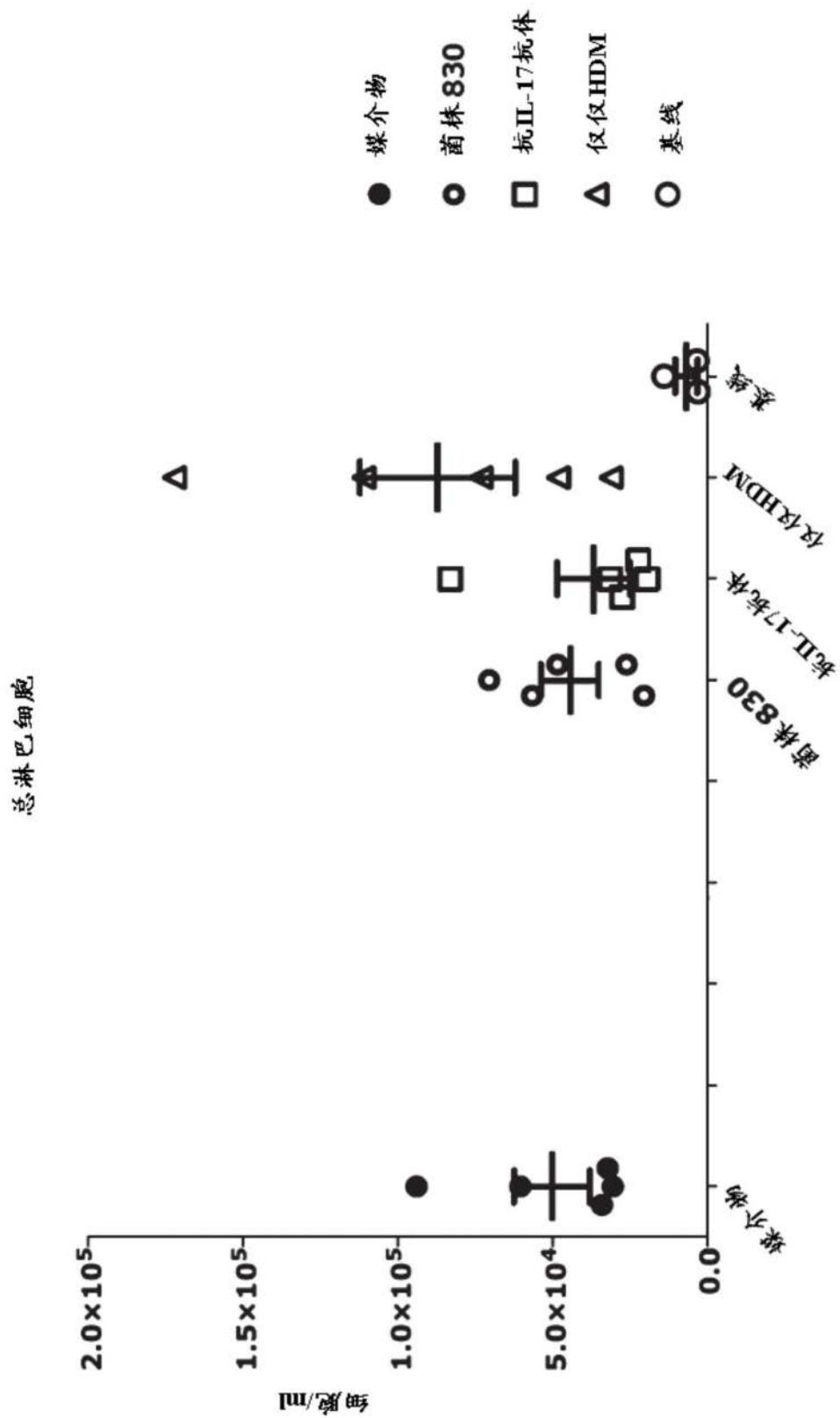


图17

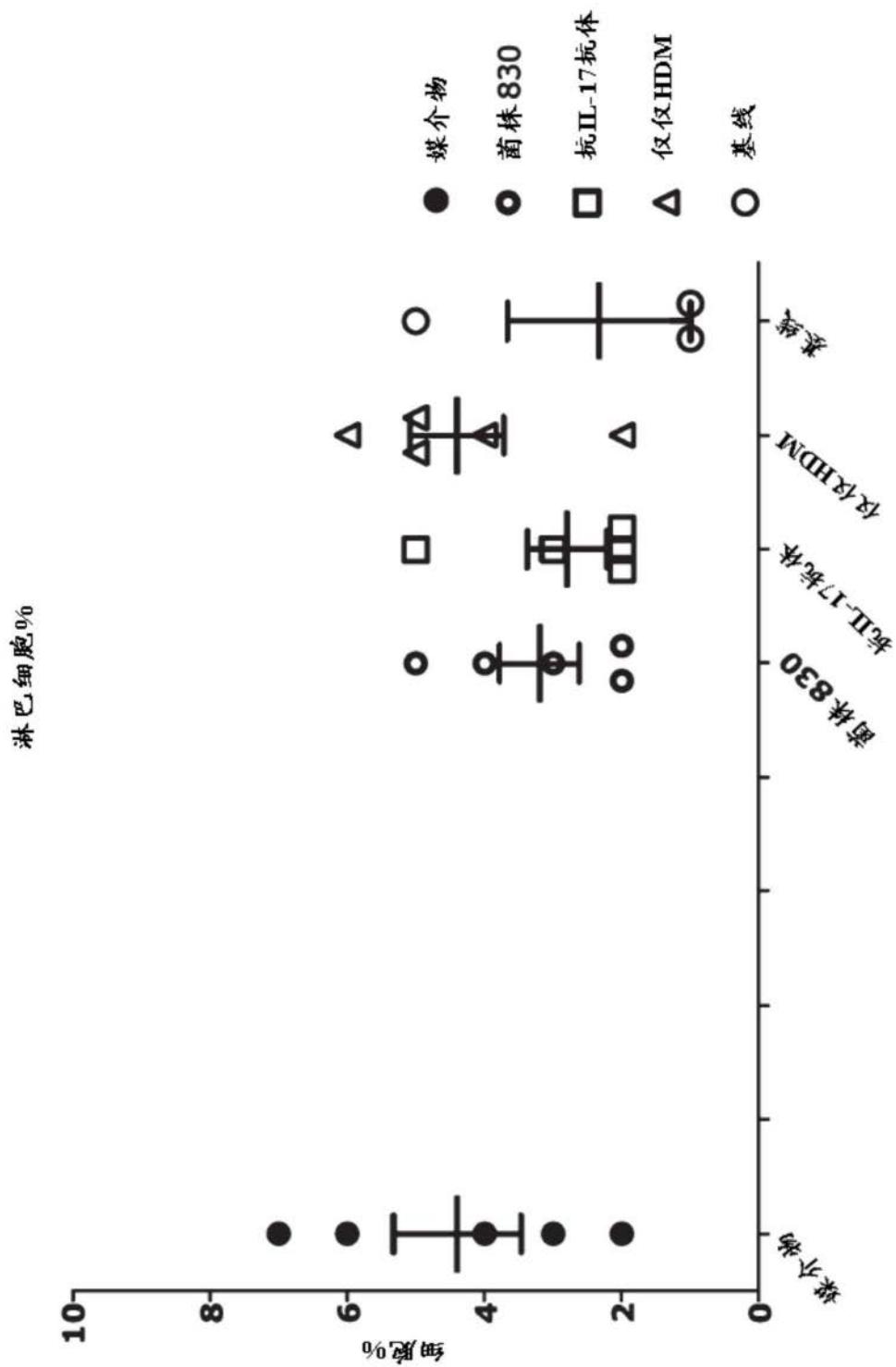


图18

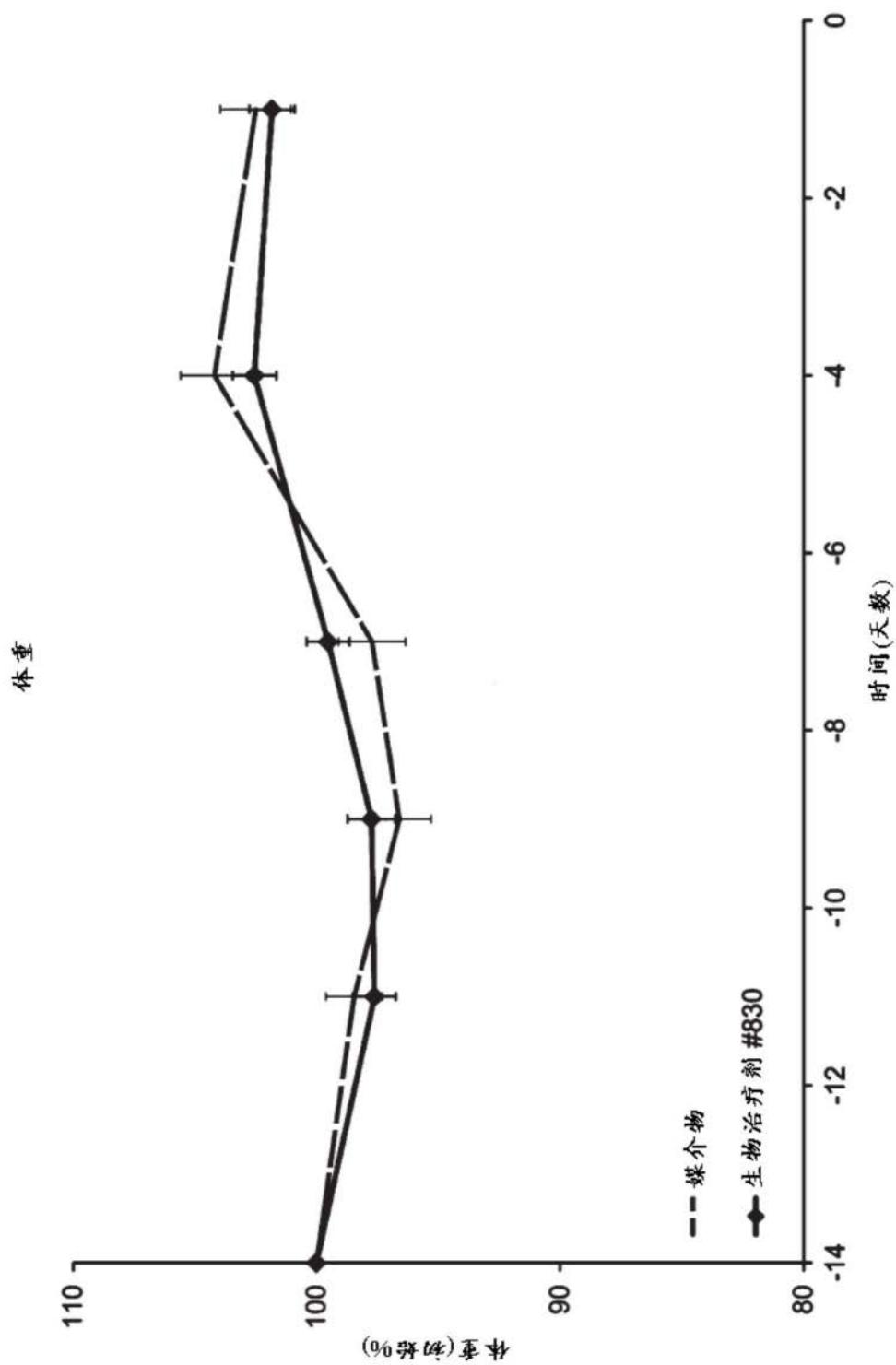
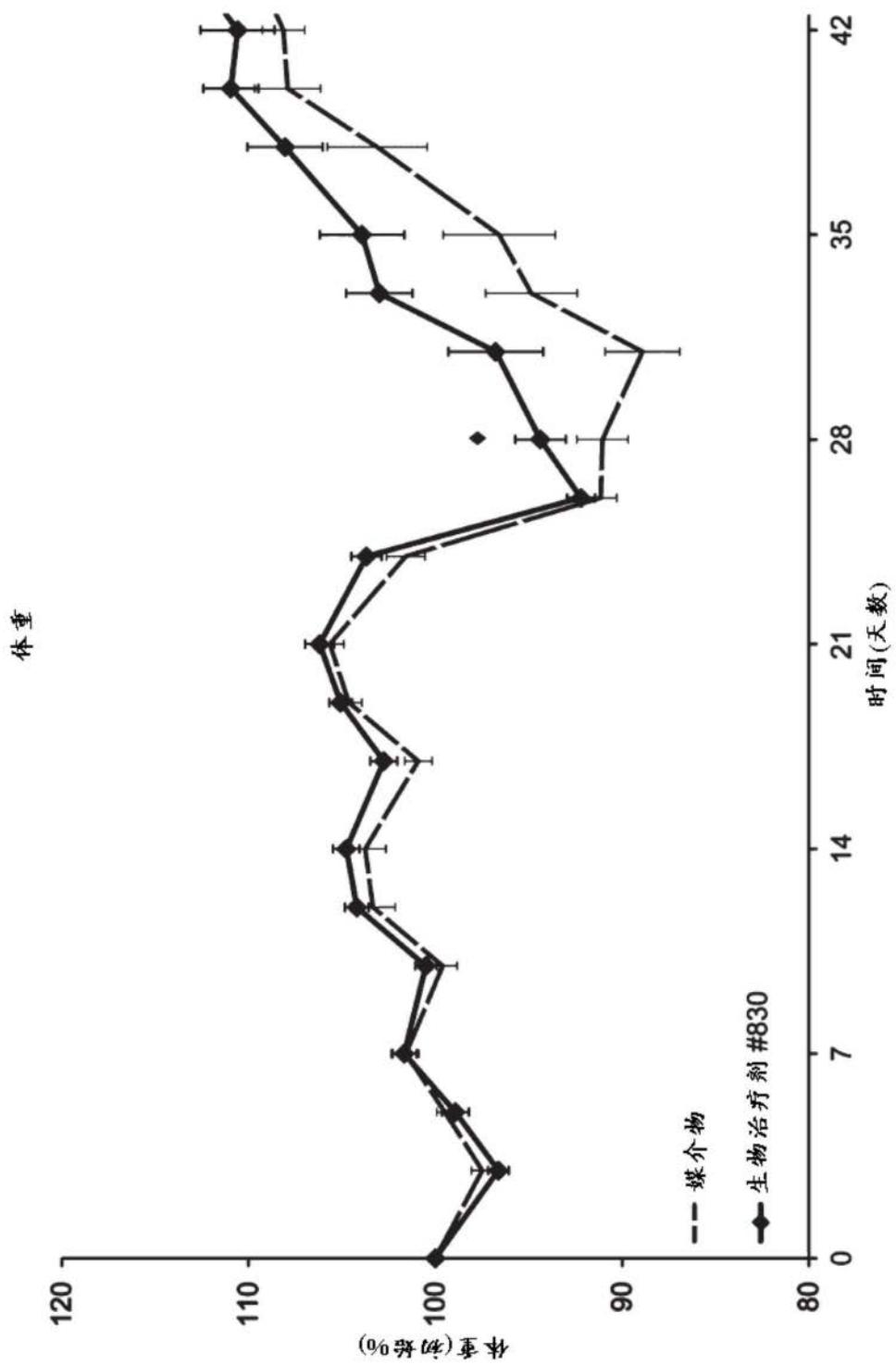


图19



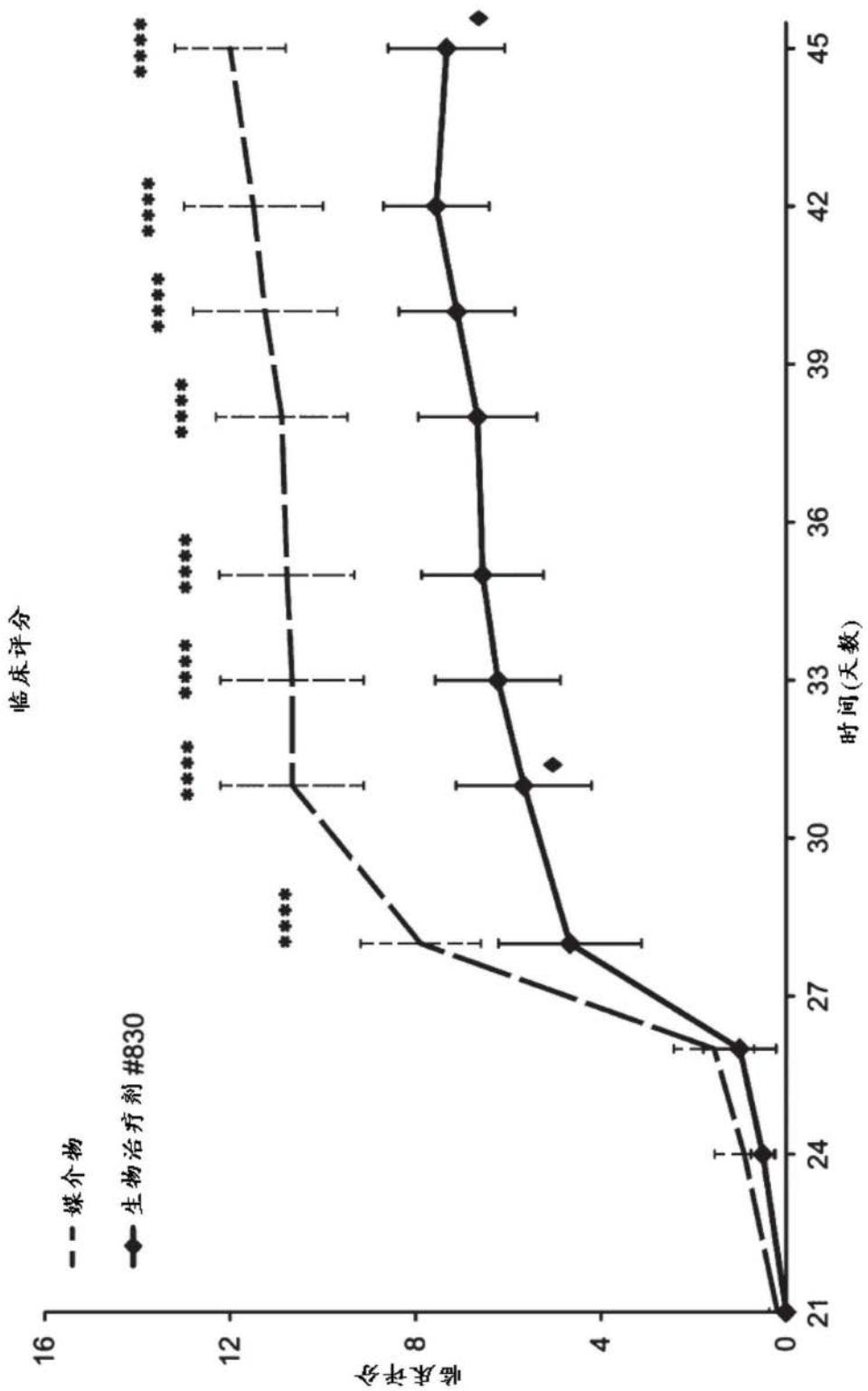


图21

对Ⅱ型胶原蛋白的肺细胞增殖

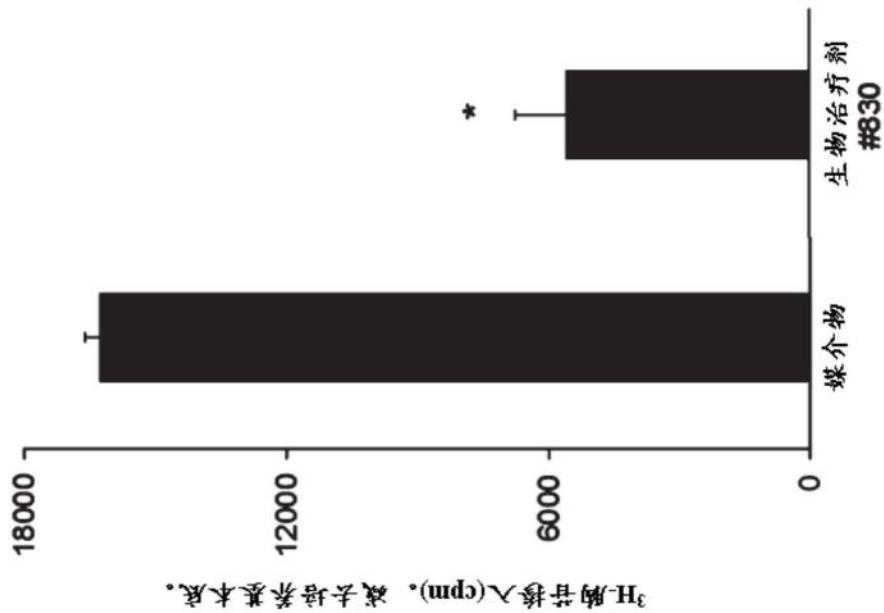


图22

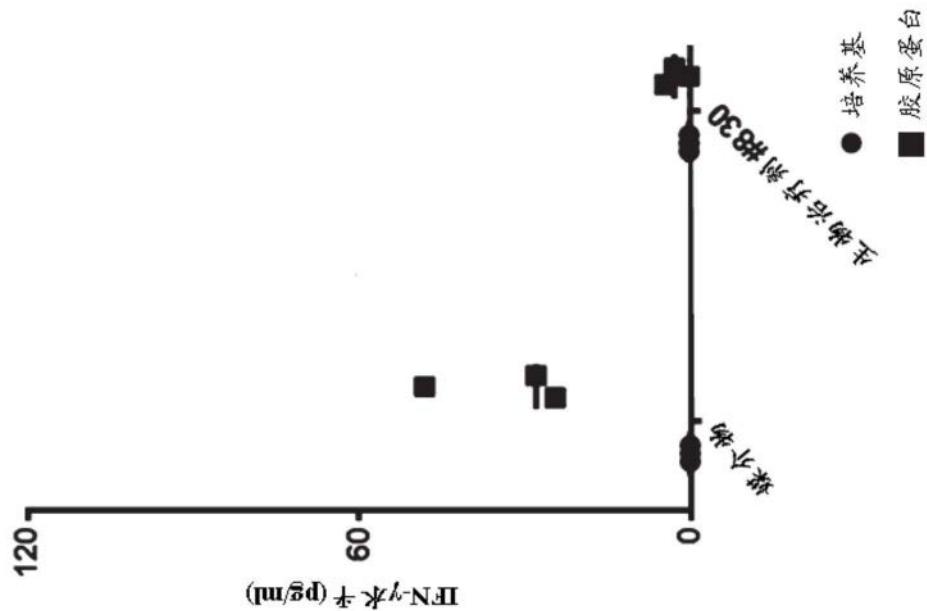


图23

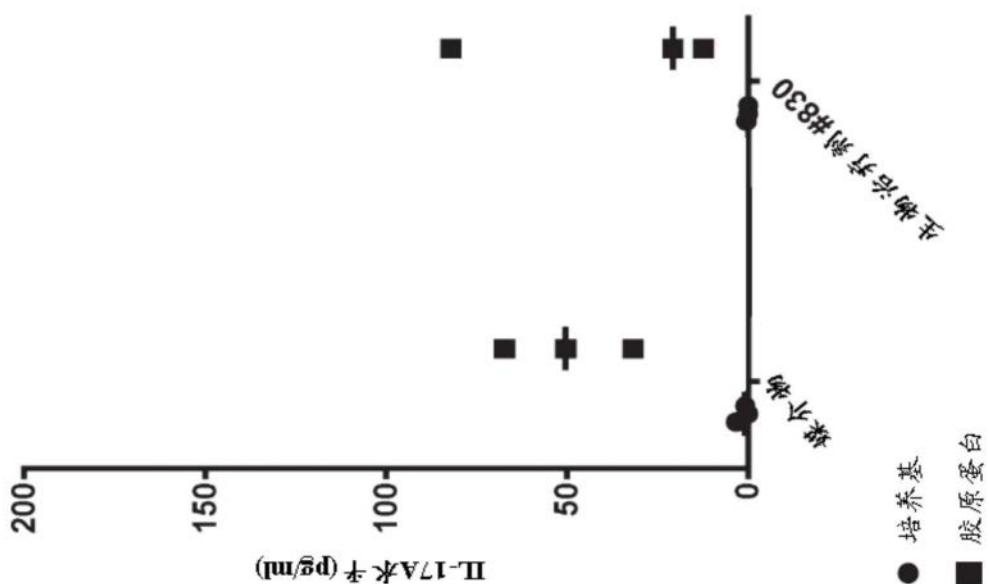


图24

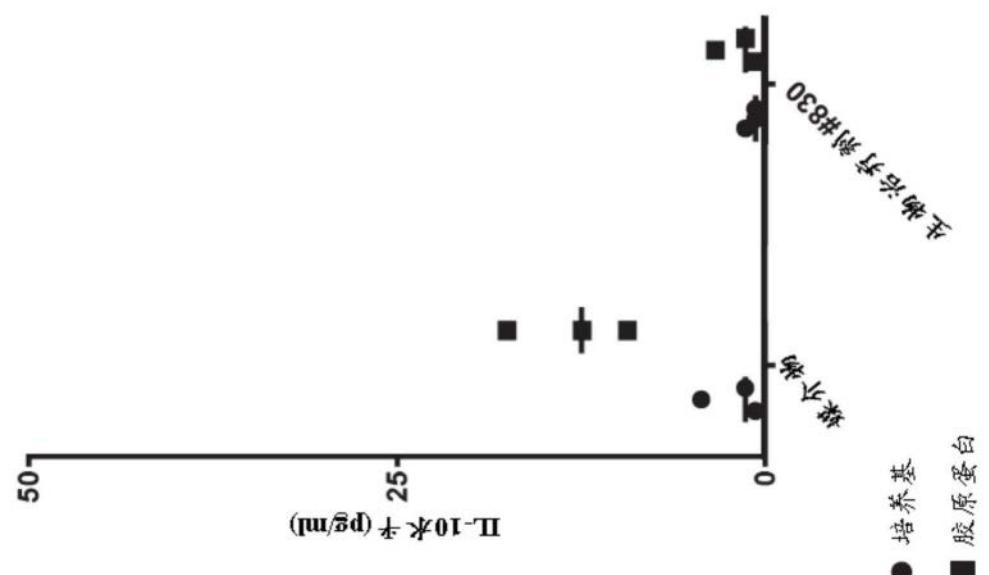


图25

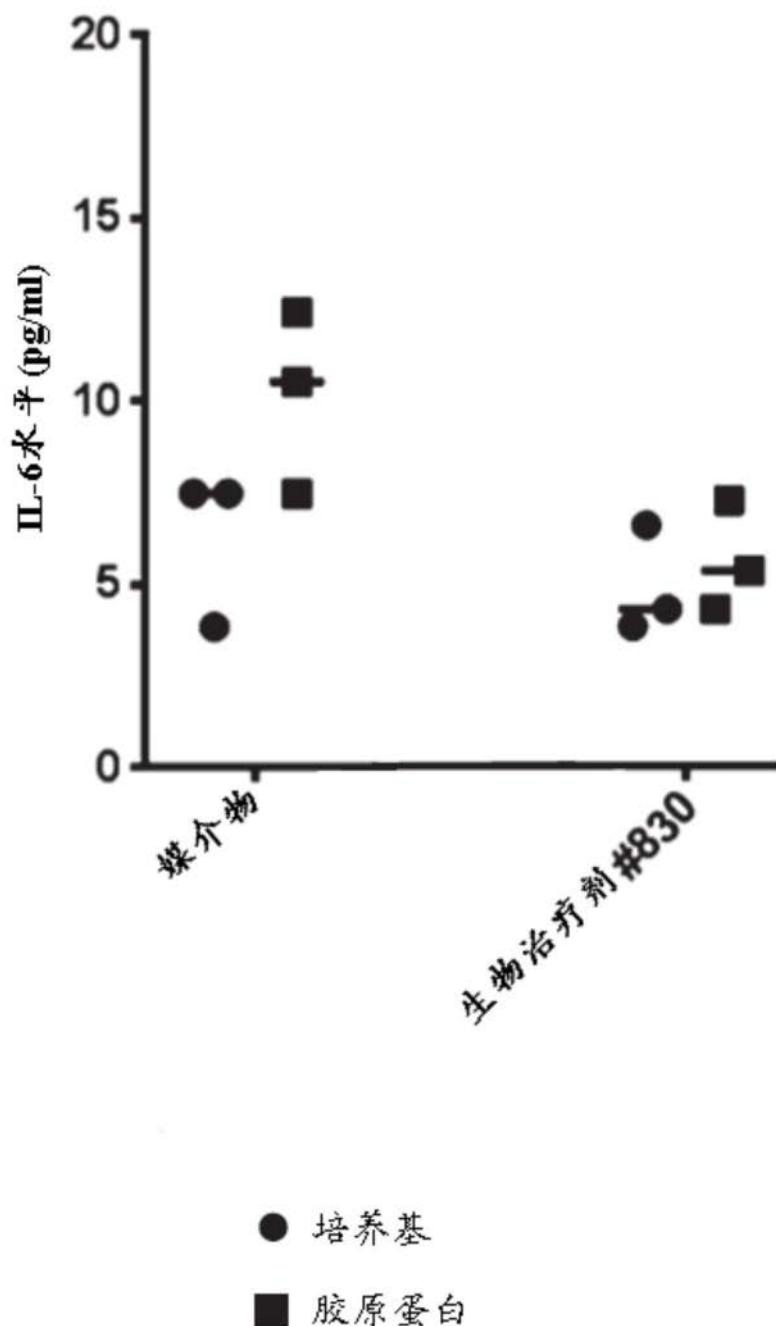


图26

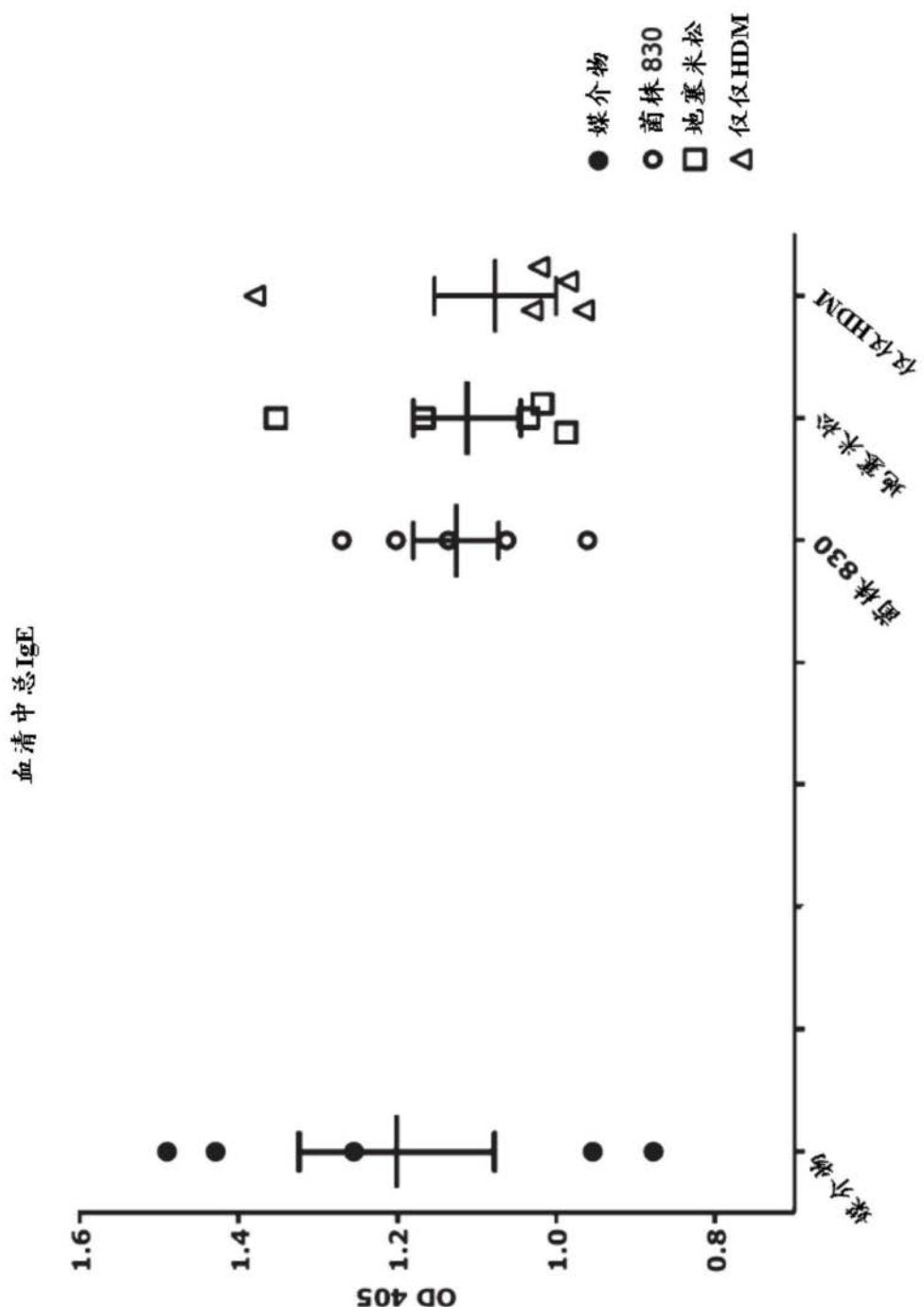


图27

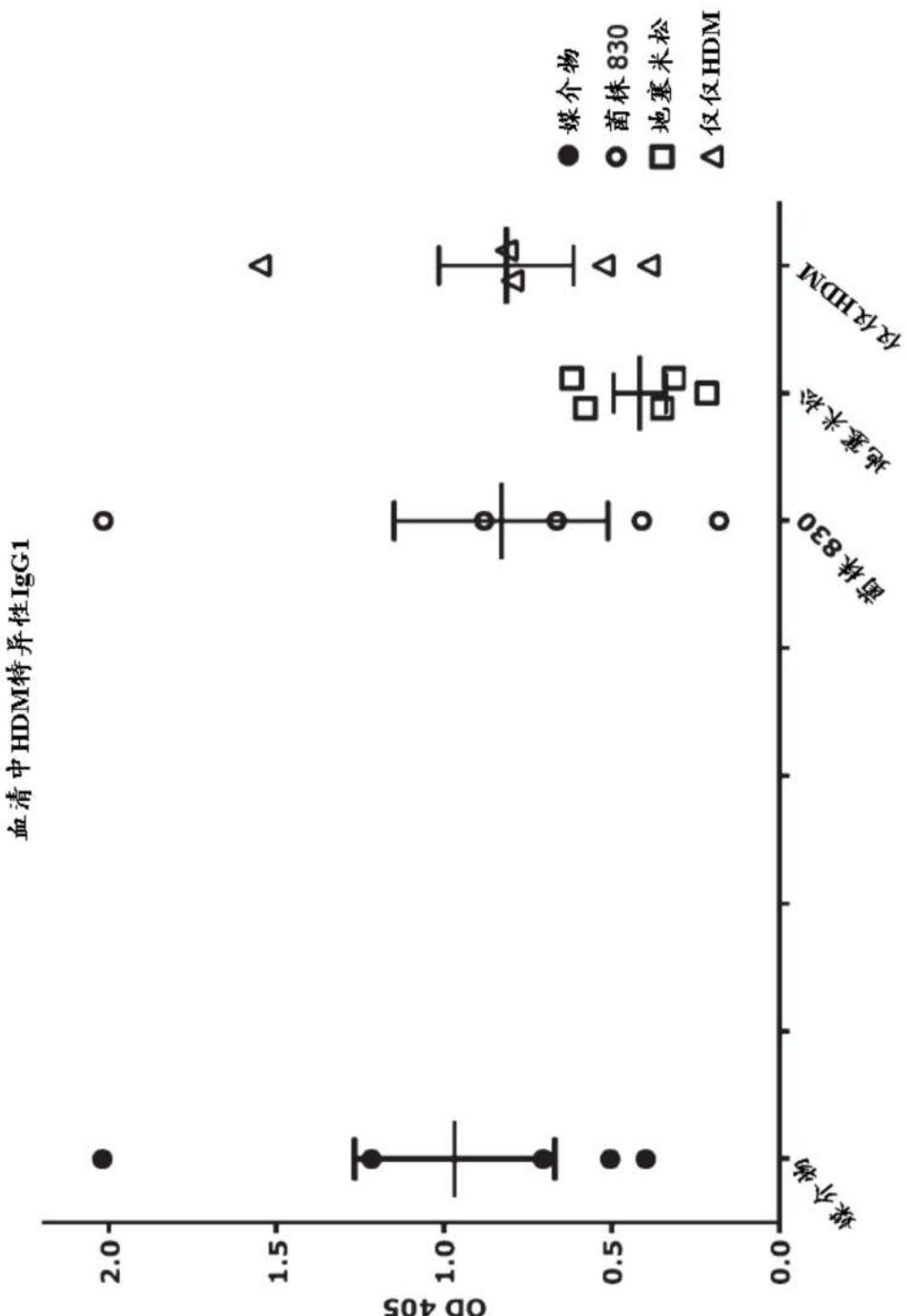


图28

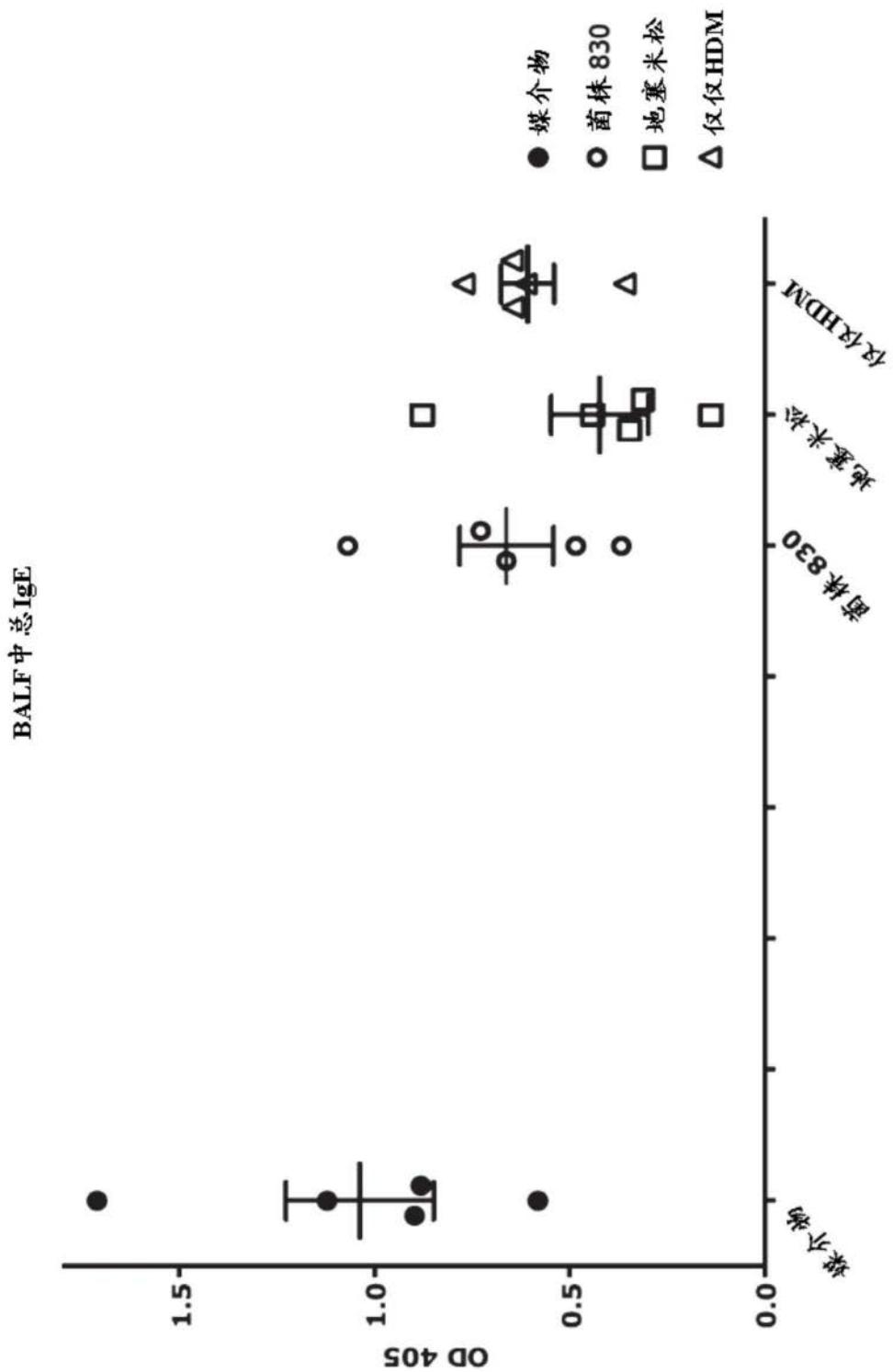


图29

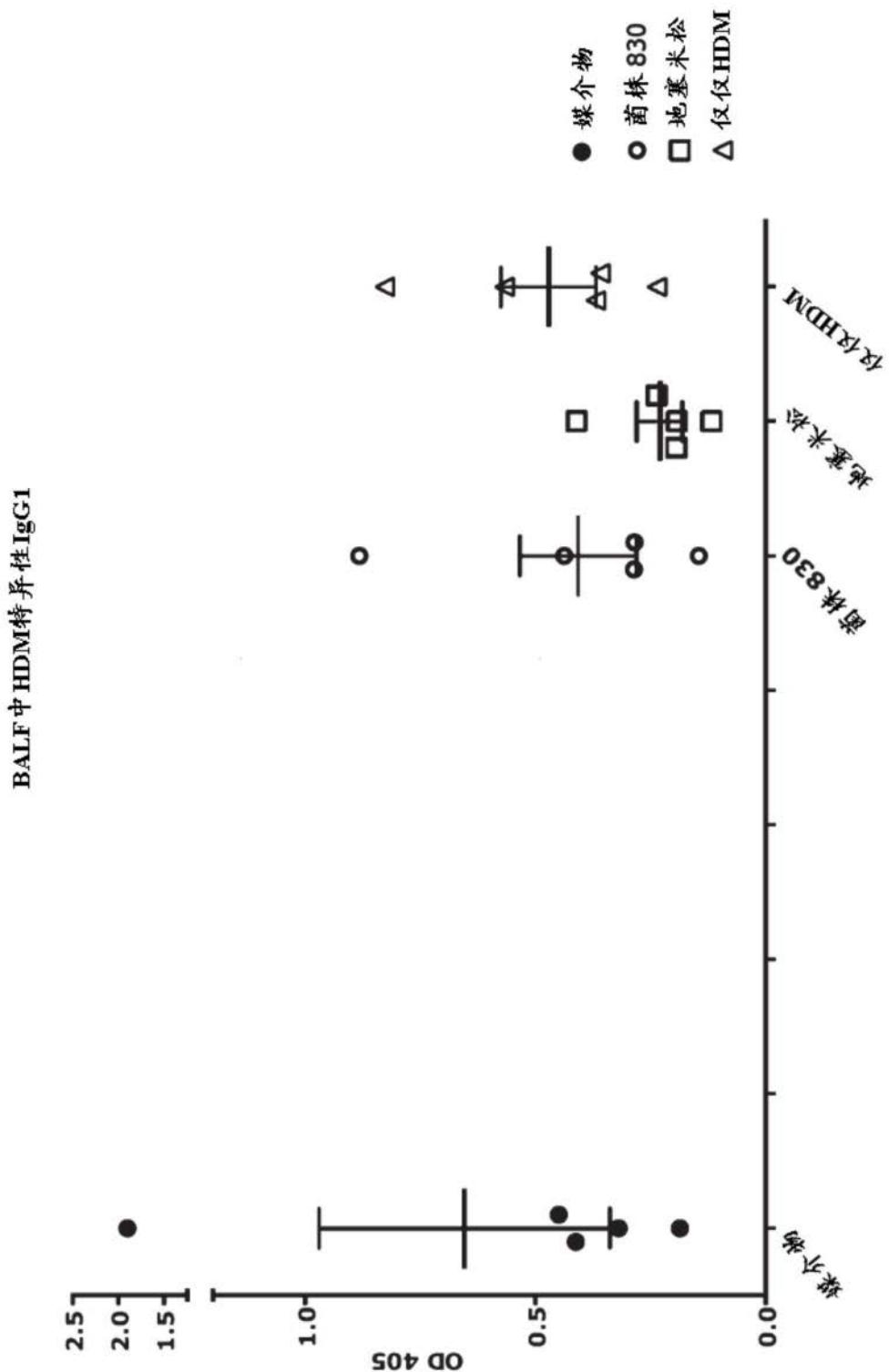


图30

组织学分析-平均细支气管支气管周围湿润评分

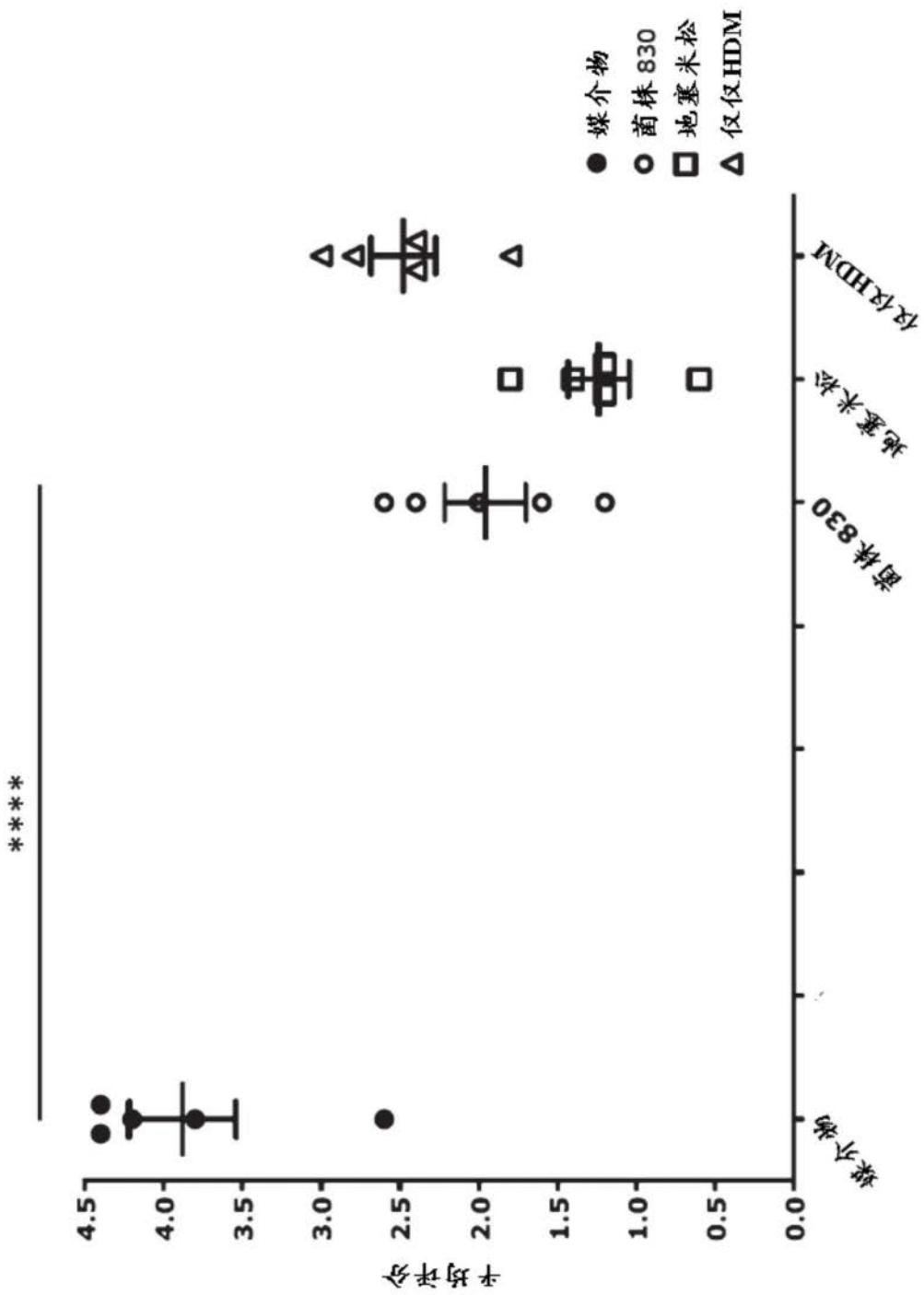


图31

组织学分析-平均血管周浸润评分

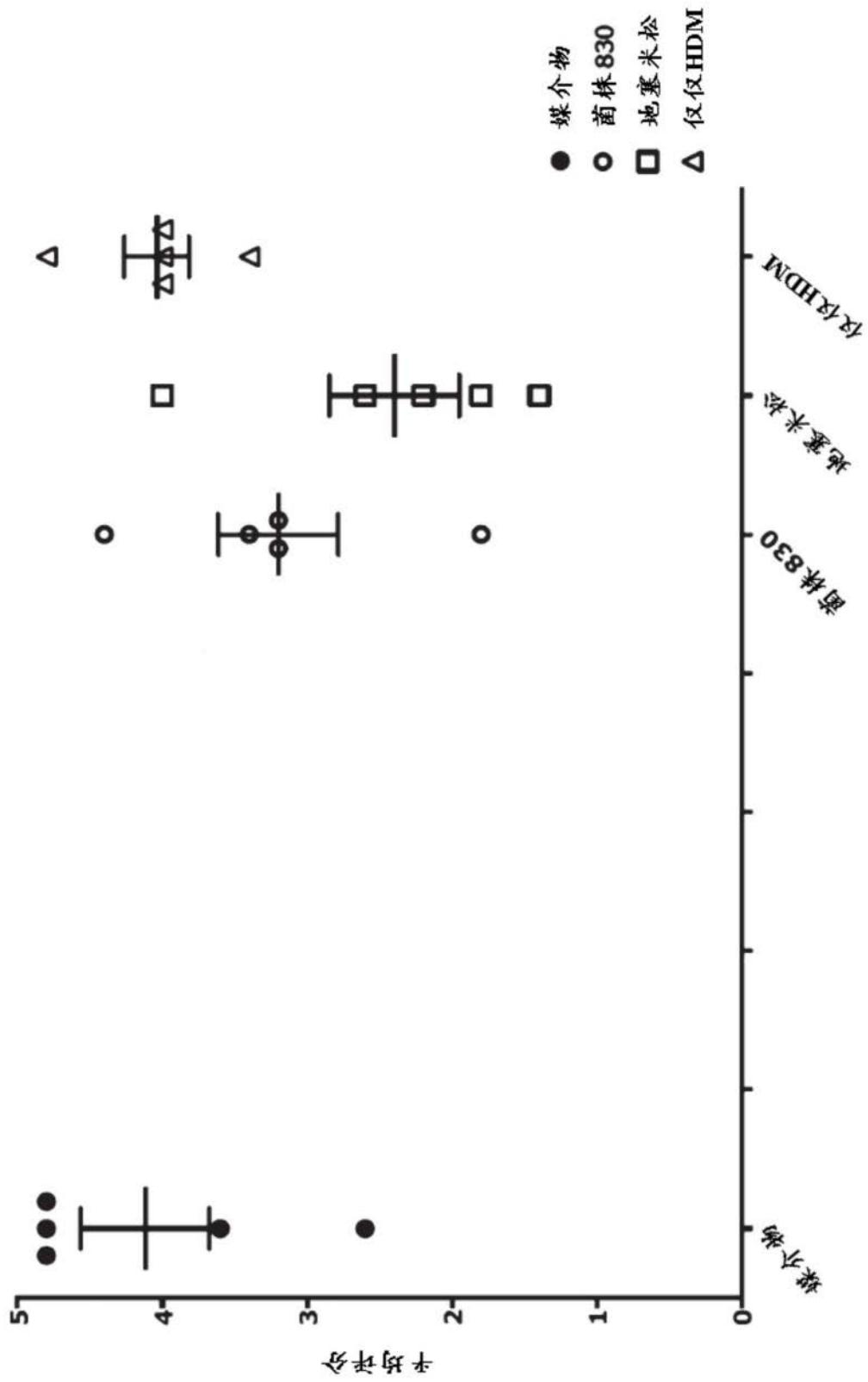


图32

组织学分析-平均炎症评分(细支气管支气管周与血管周湿润评分的平均值)

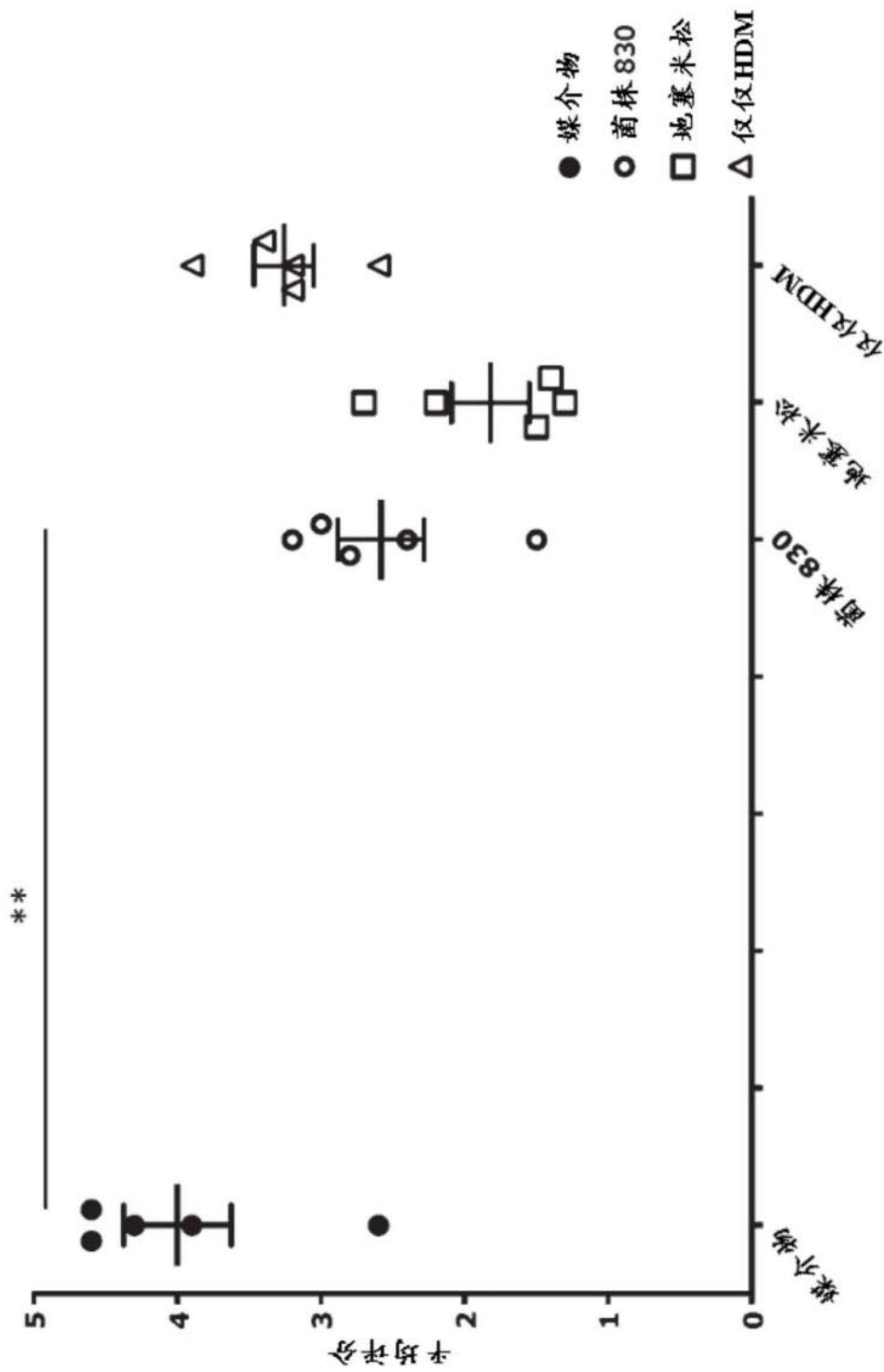


图33

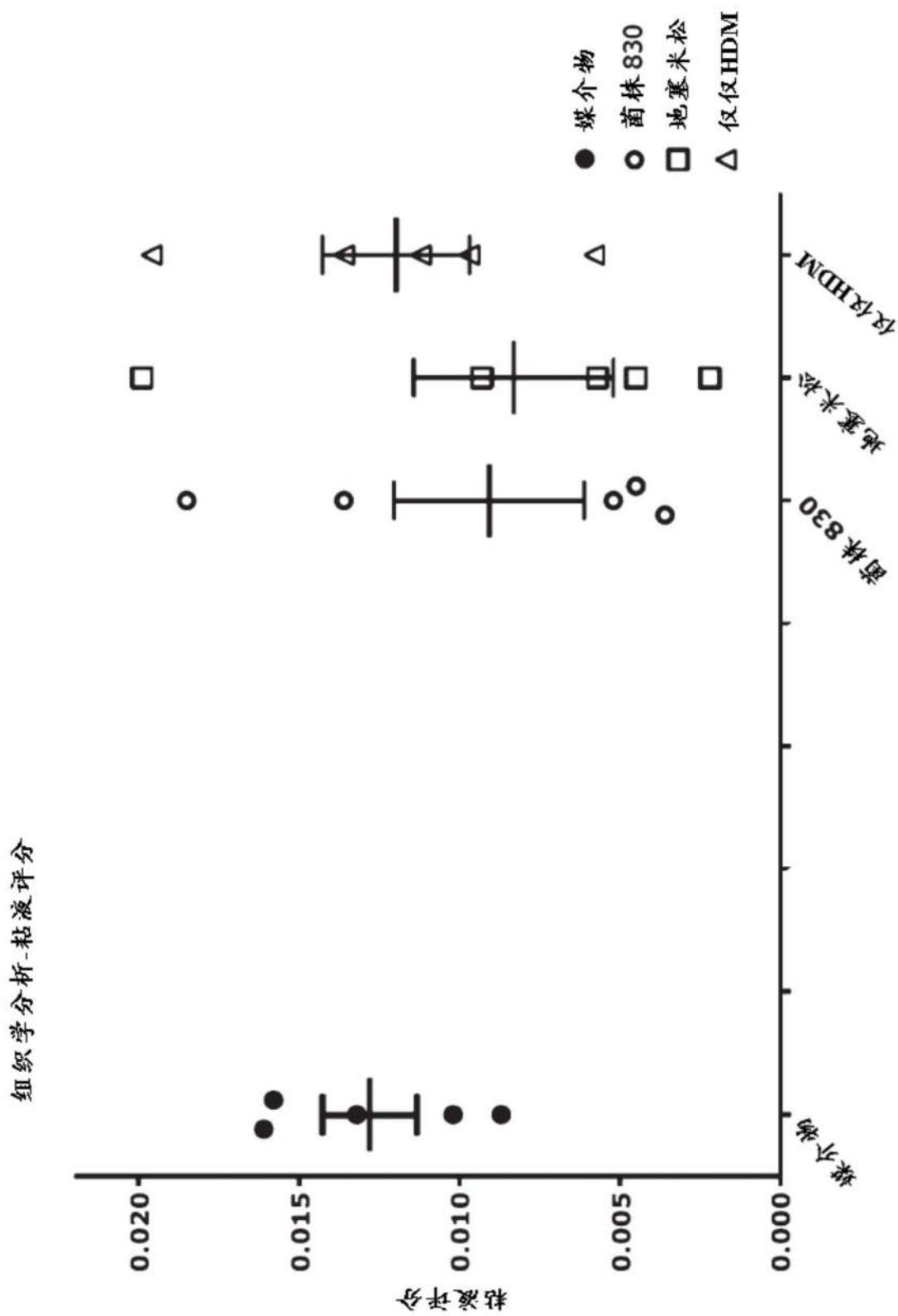


图34

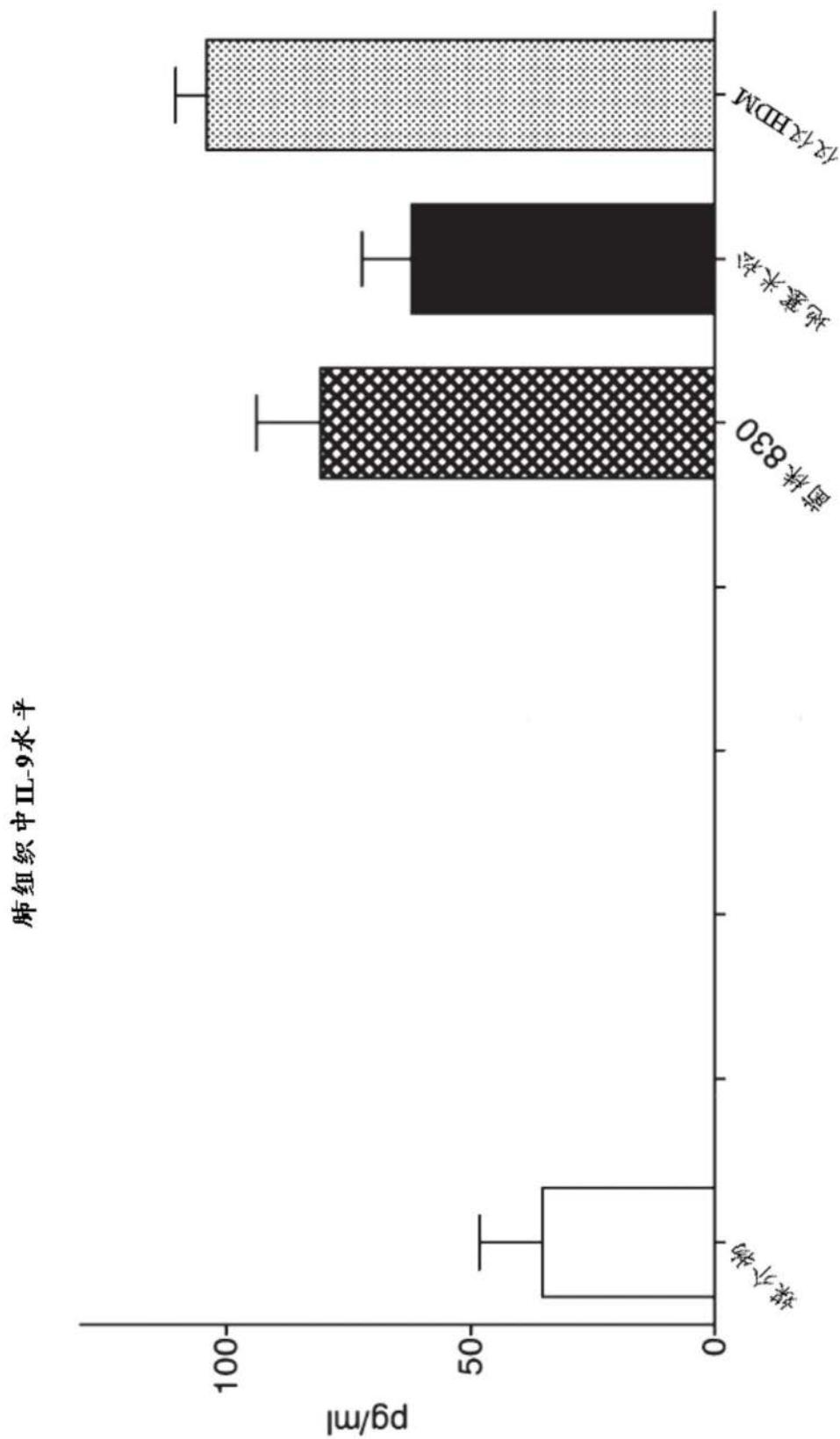


图35

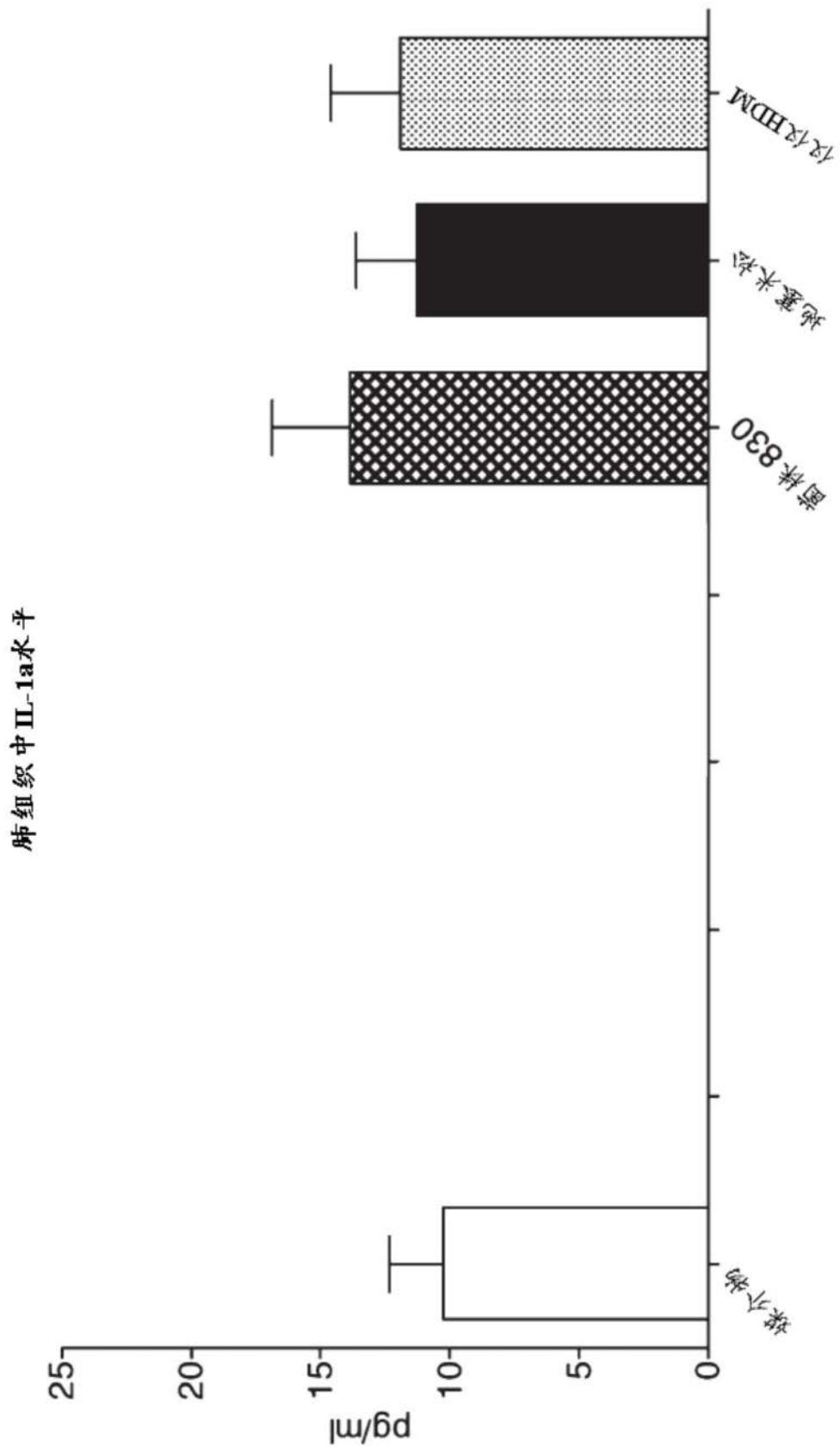


图36

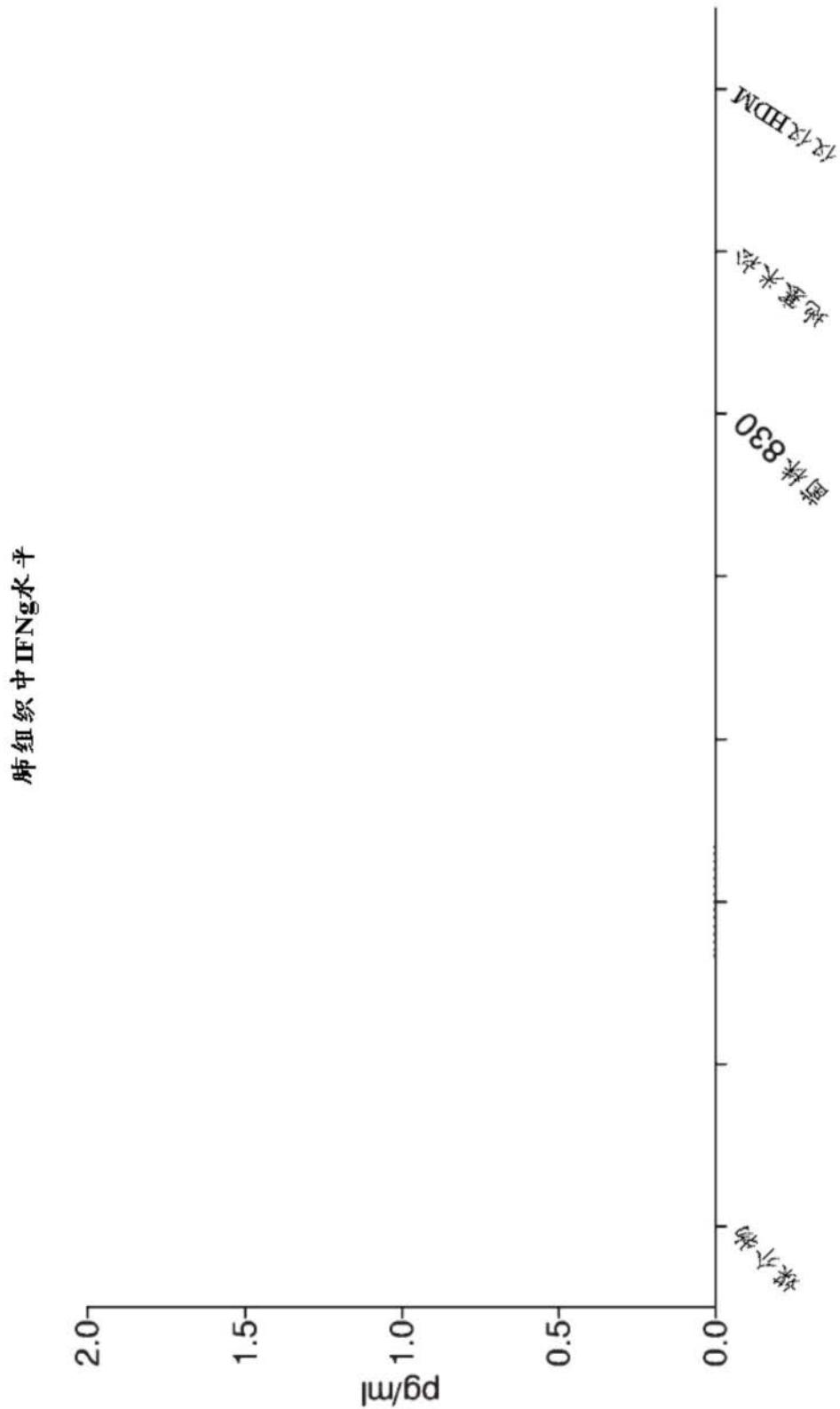


图37

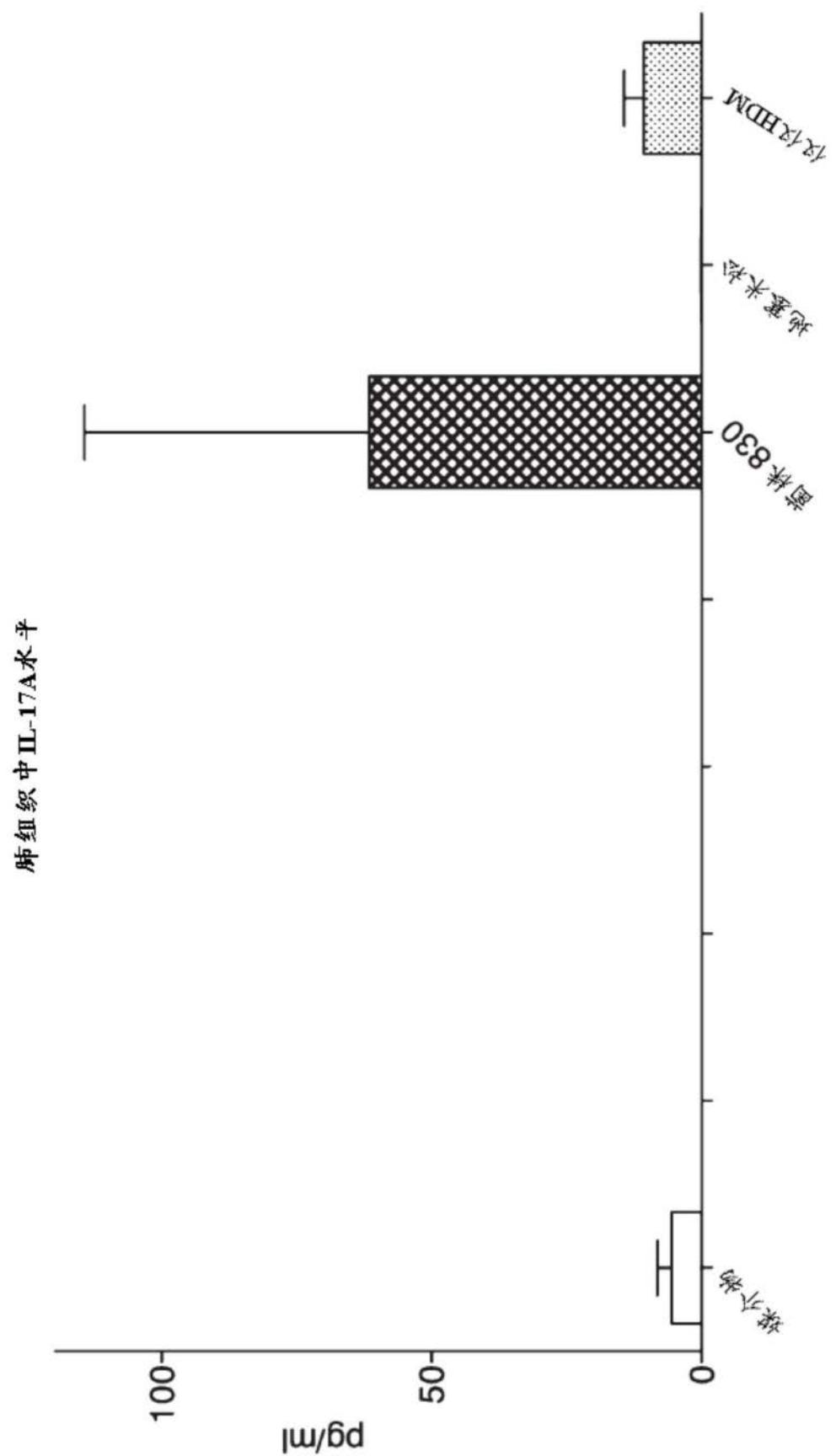


图38

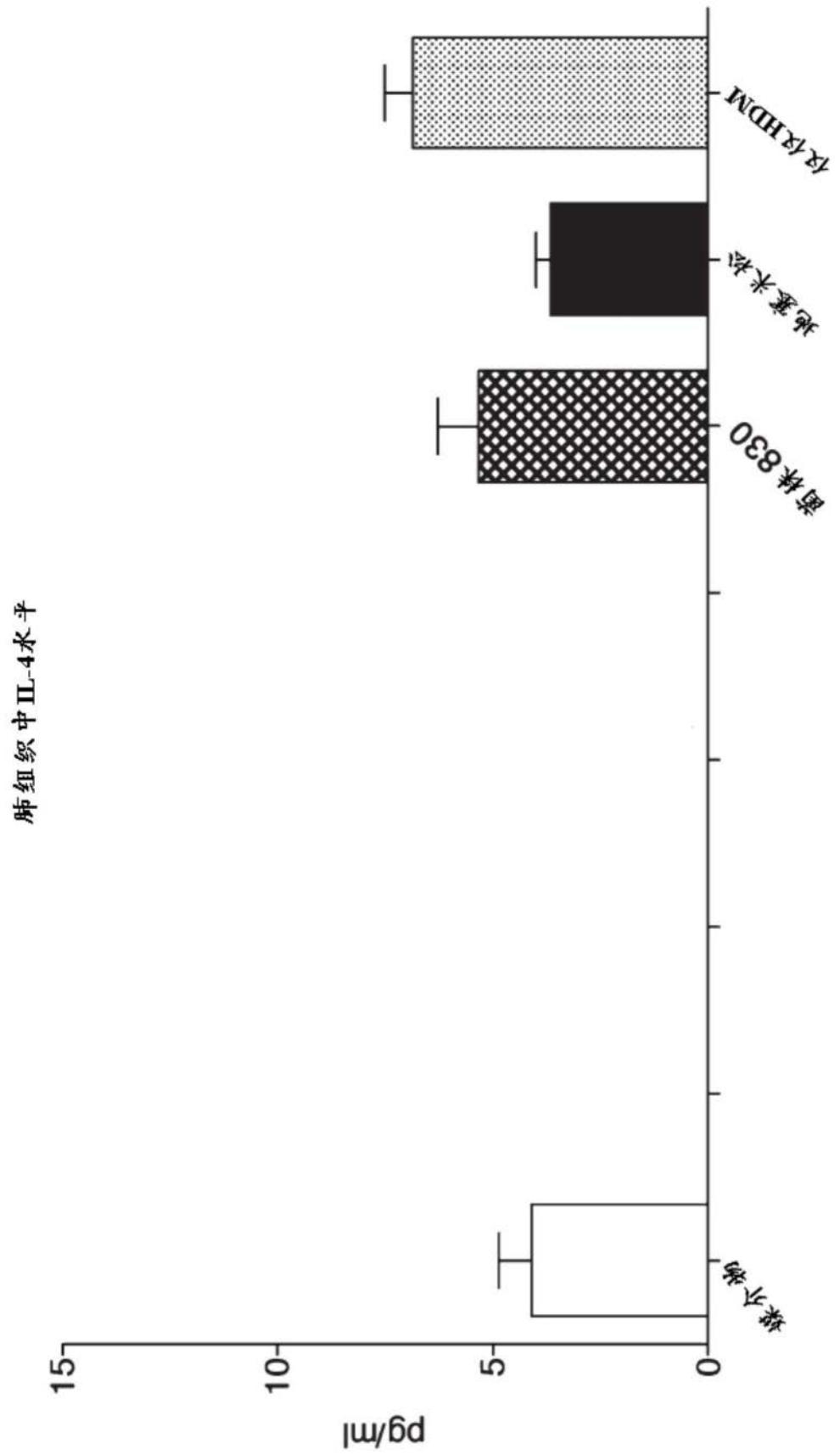


图39

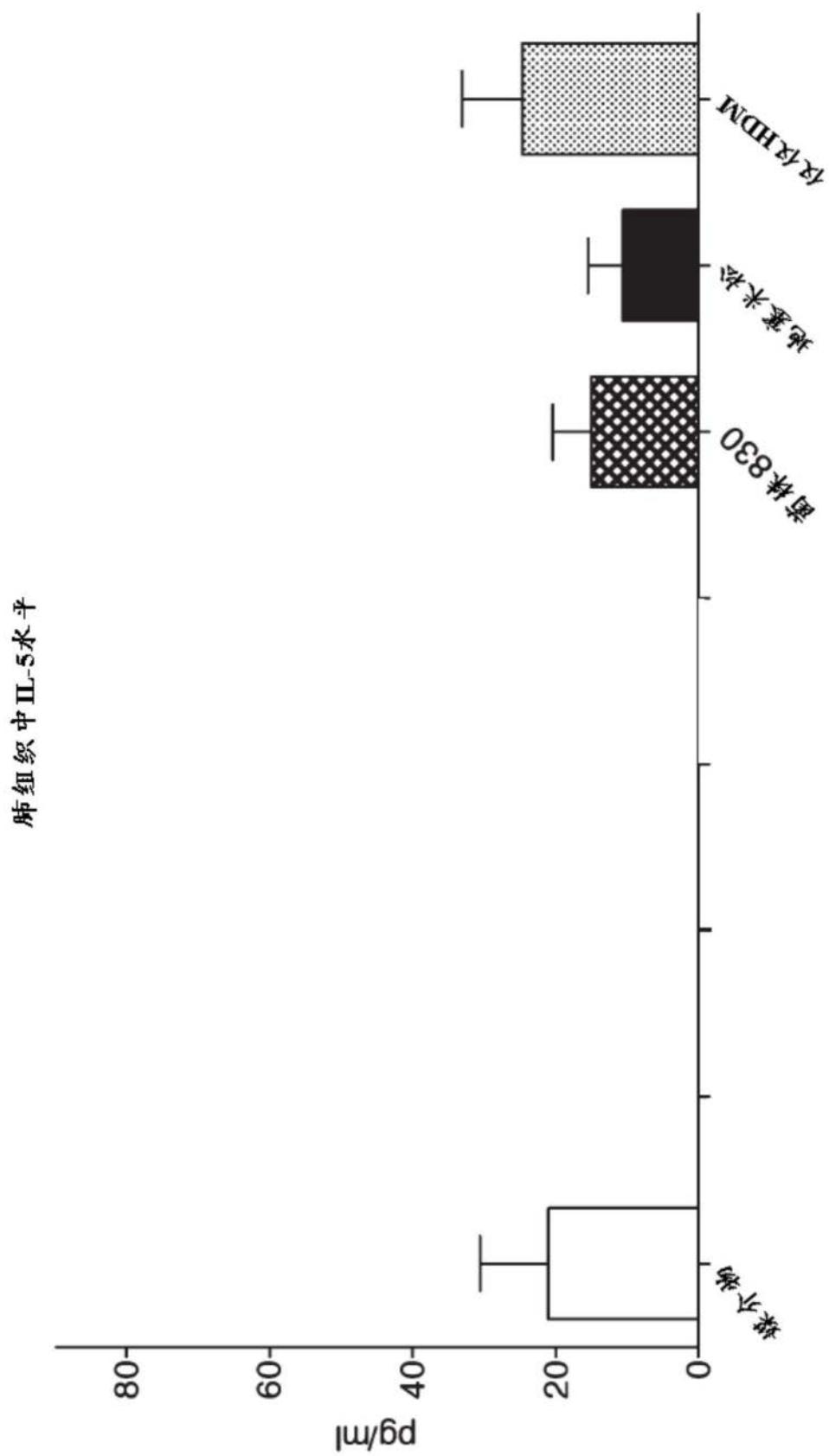


图40

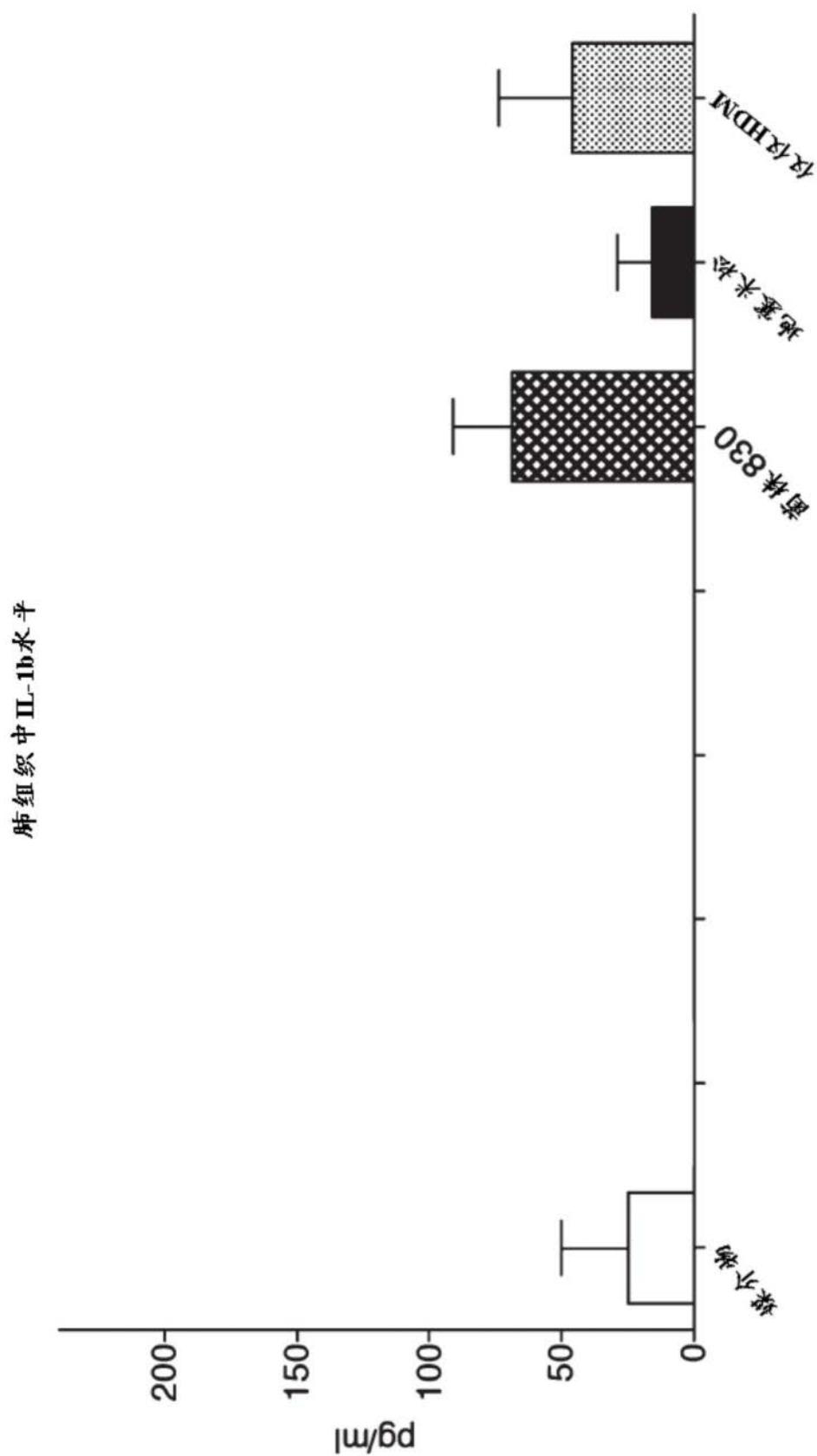


图41

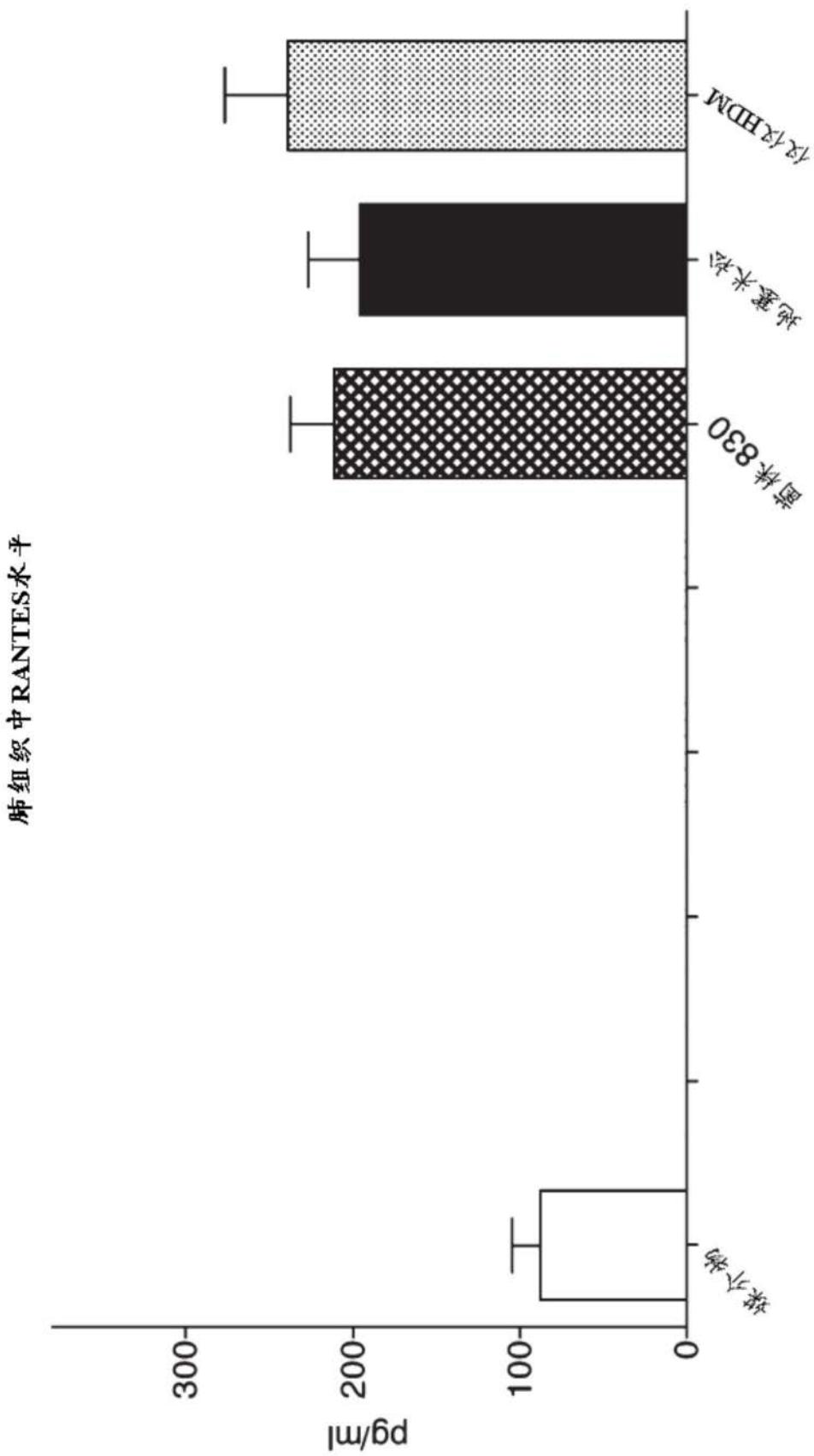


图42

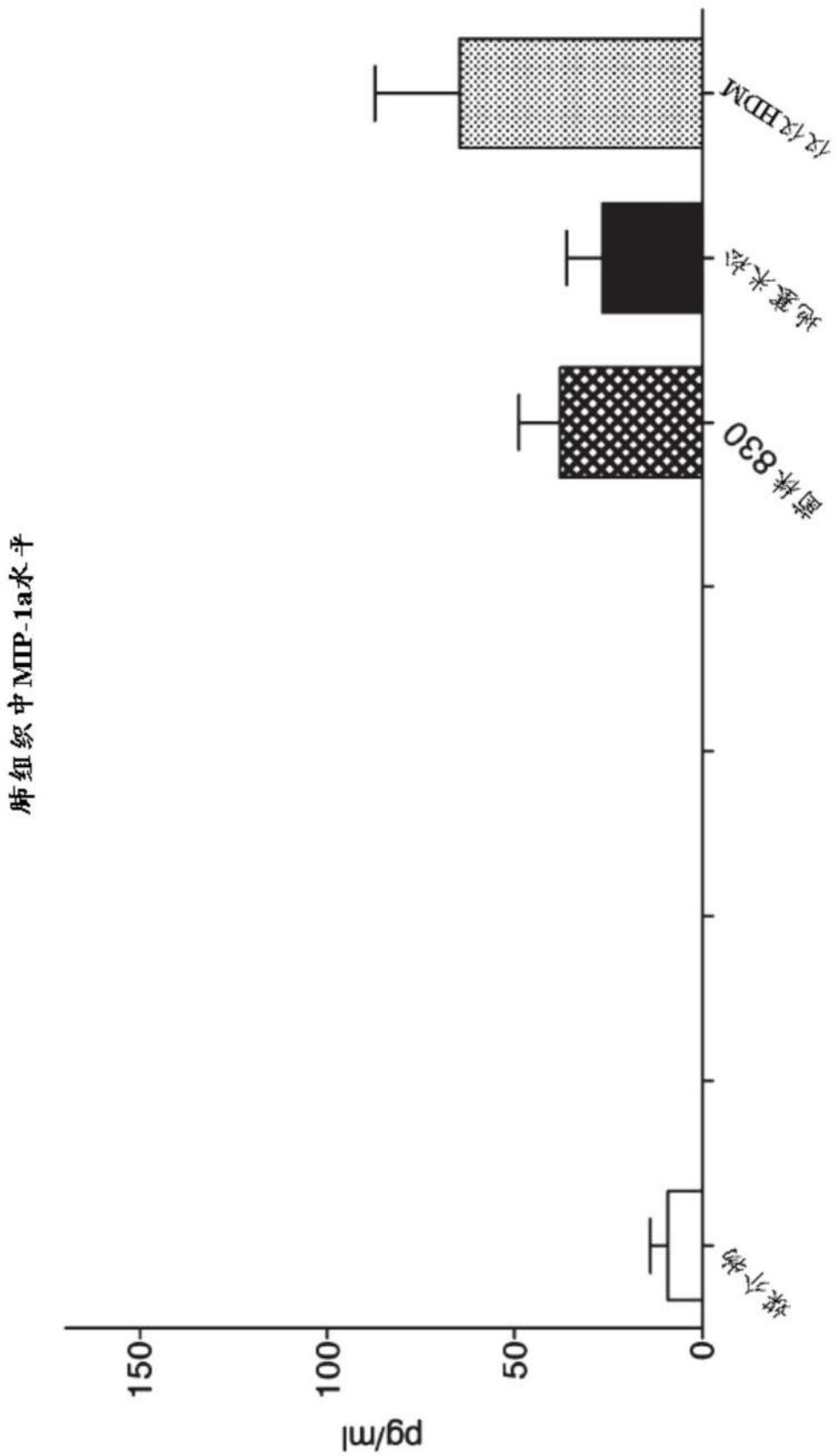


图43

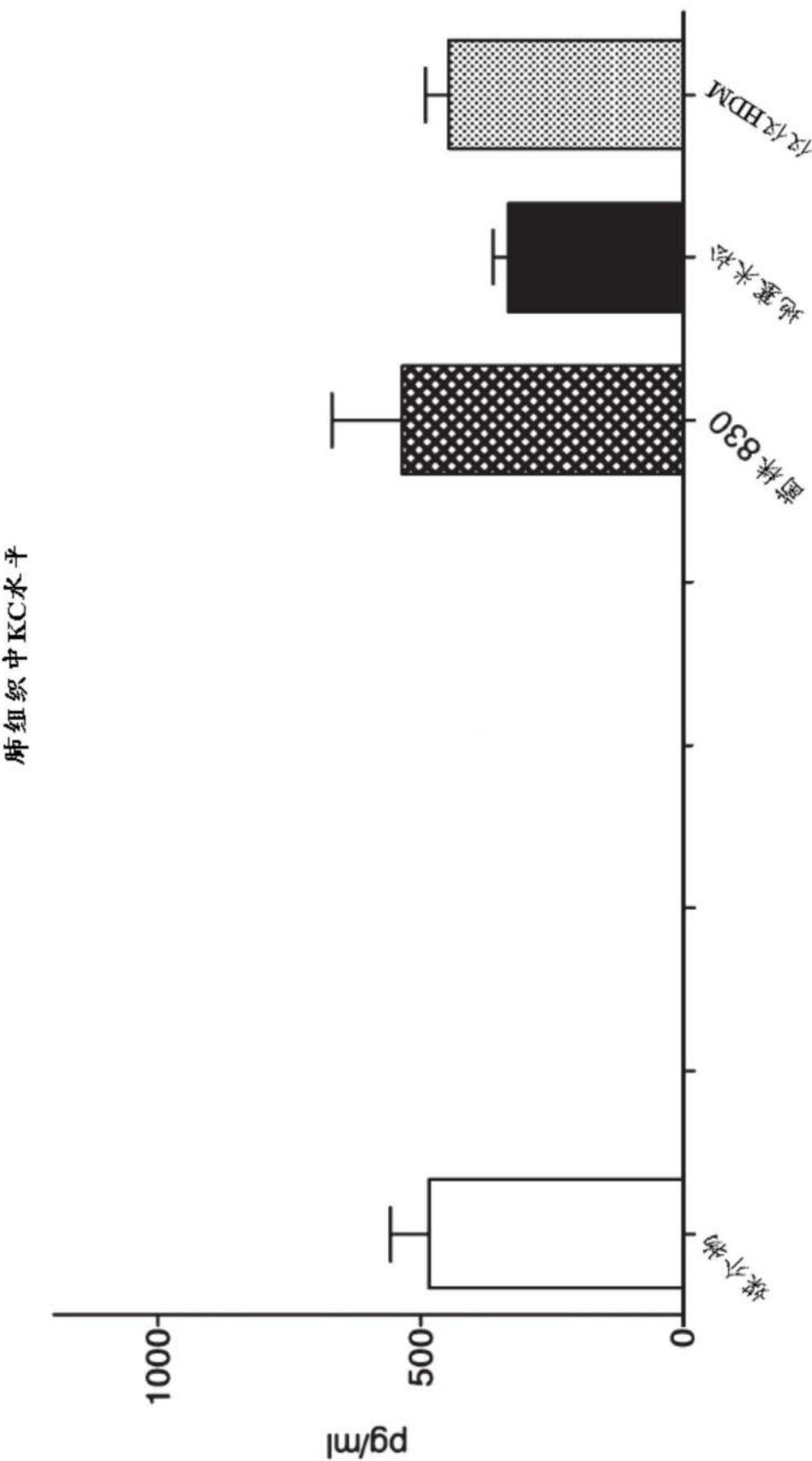


图44

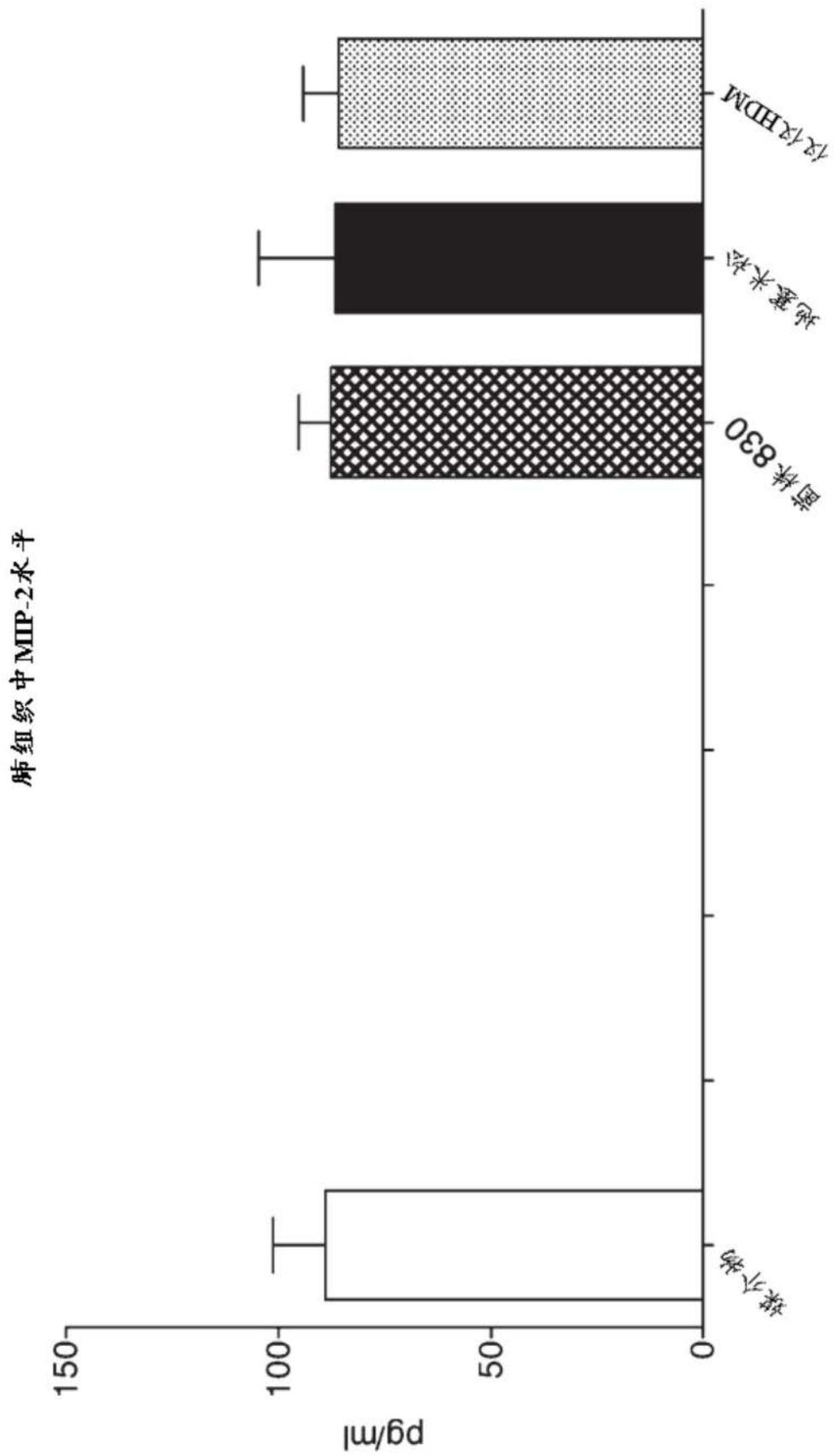


图45

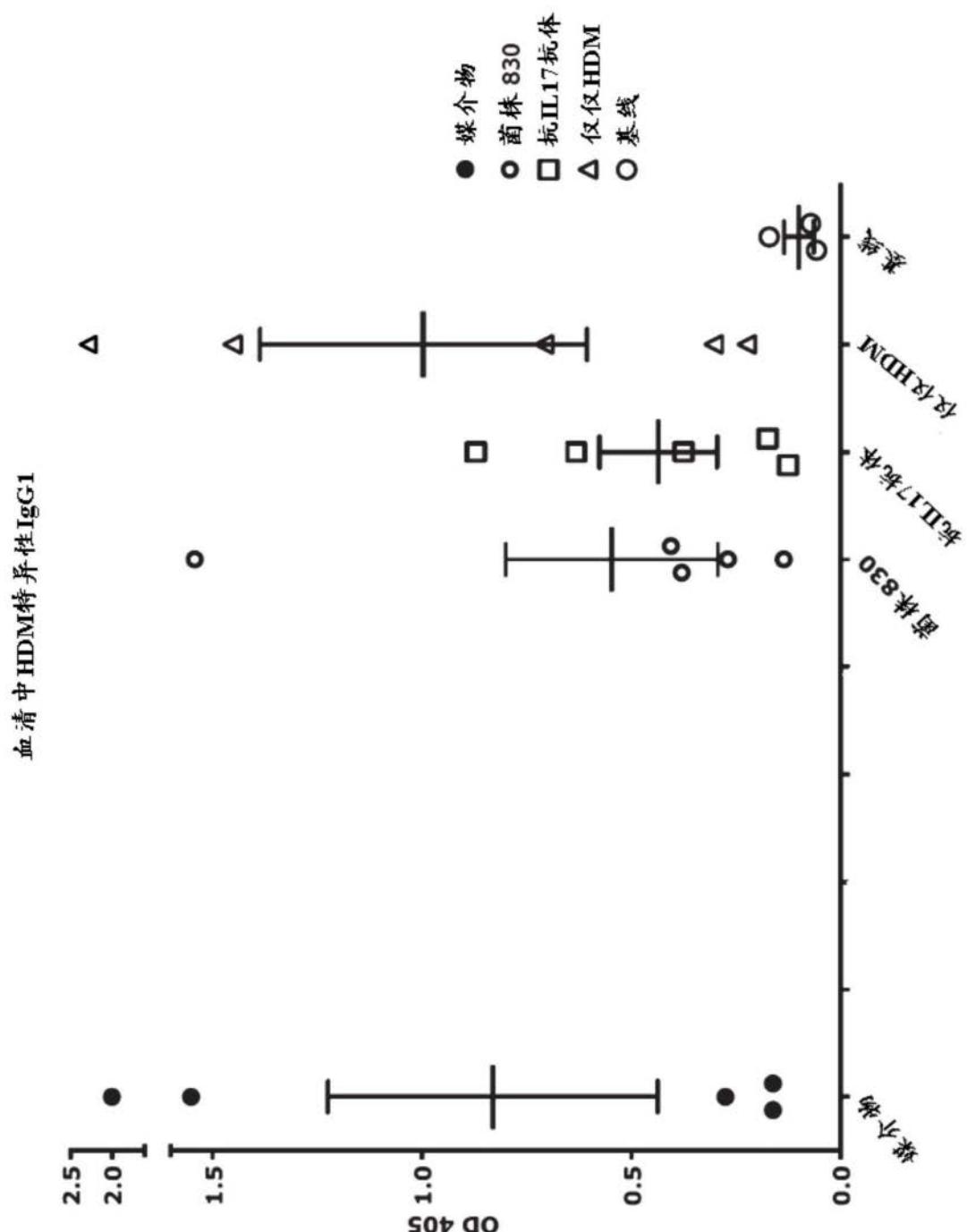


图46

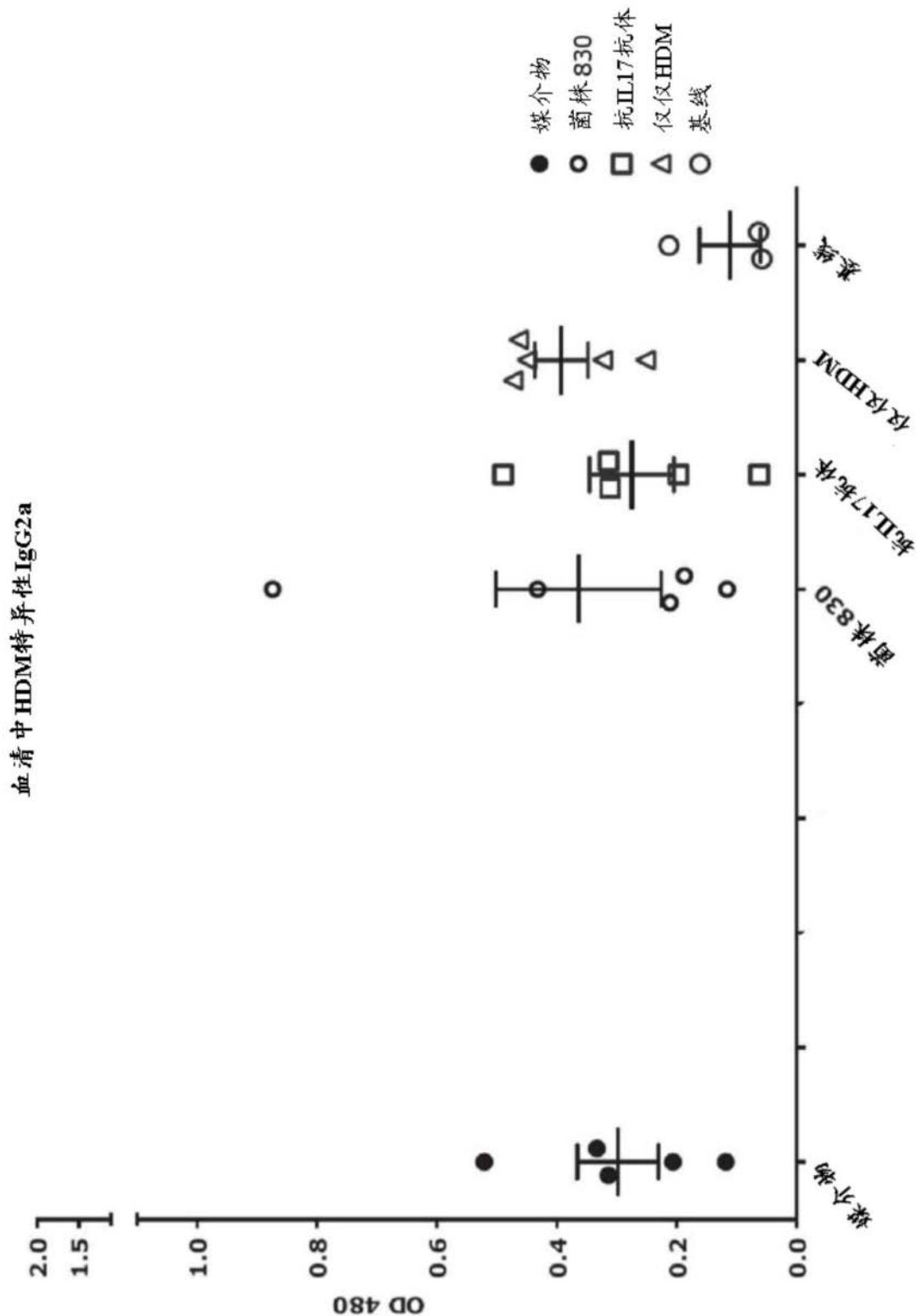


图47

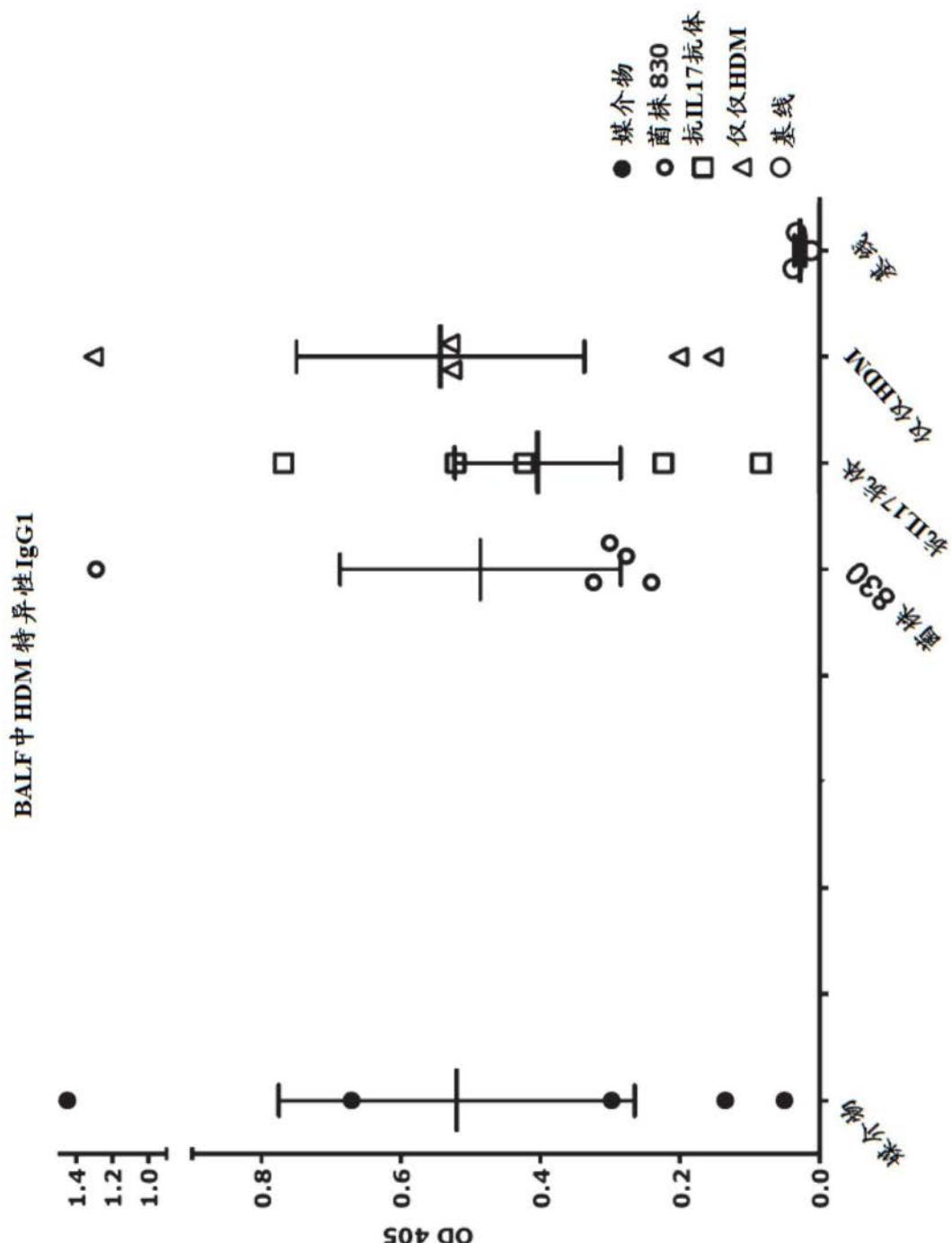


图48

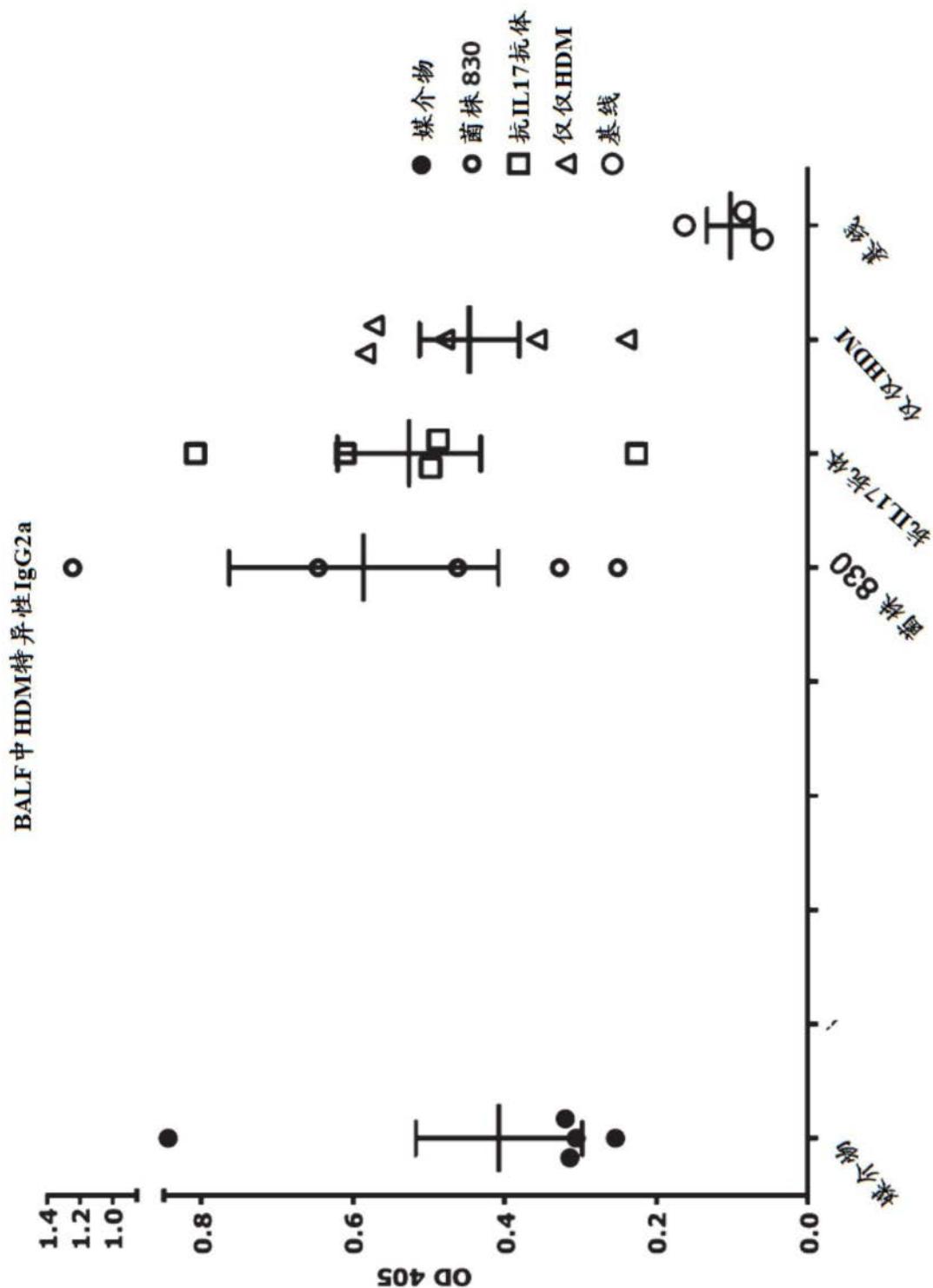


图49

组织学分析-平均细支气管支气管周浸润评分

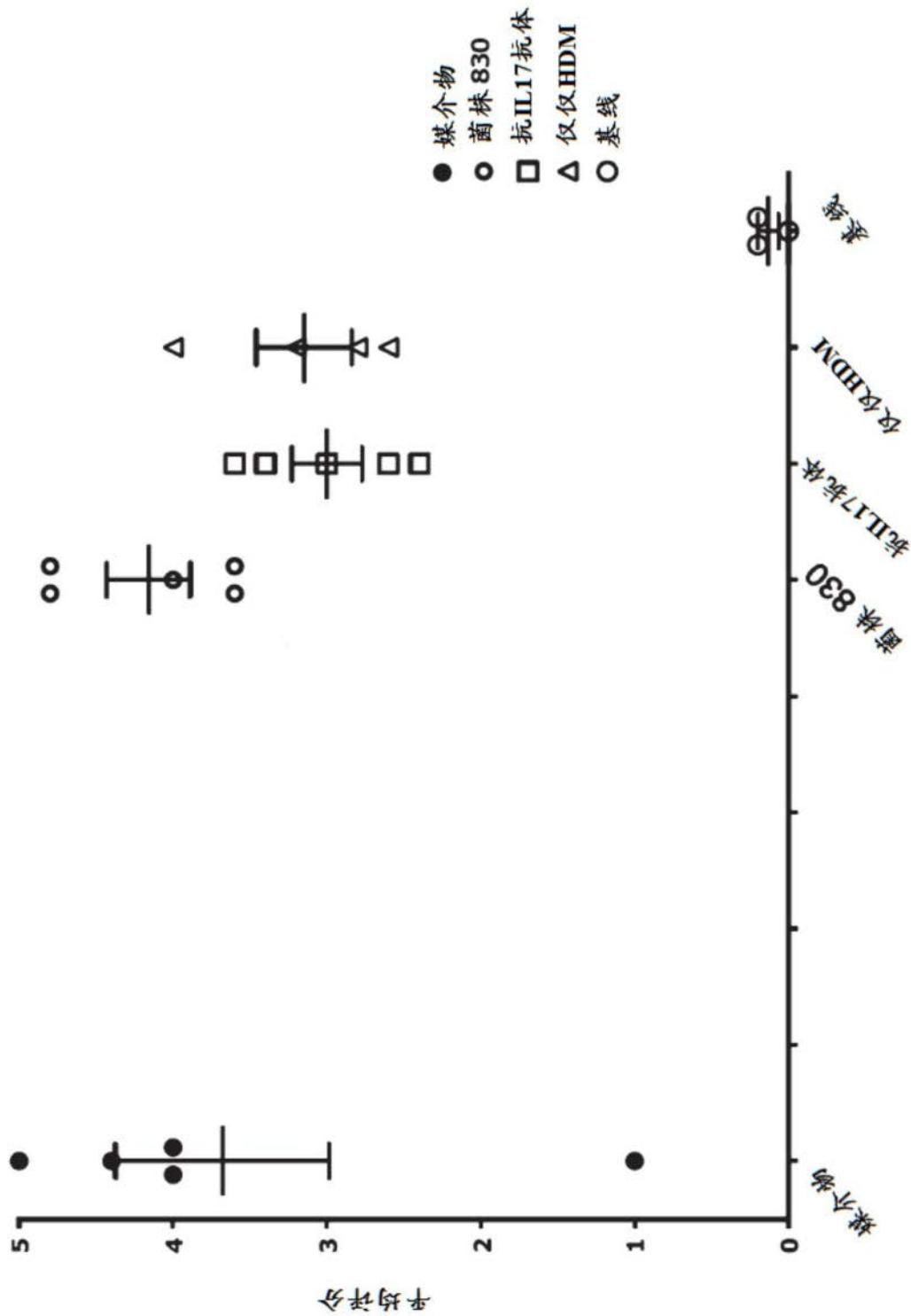


图50

组织学分析-平均血管周浸润评分

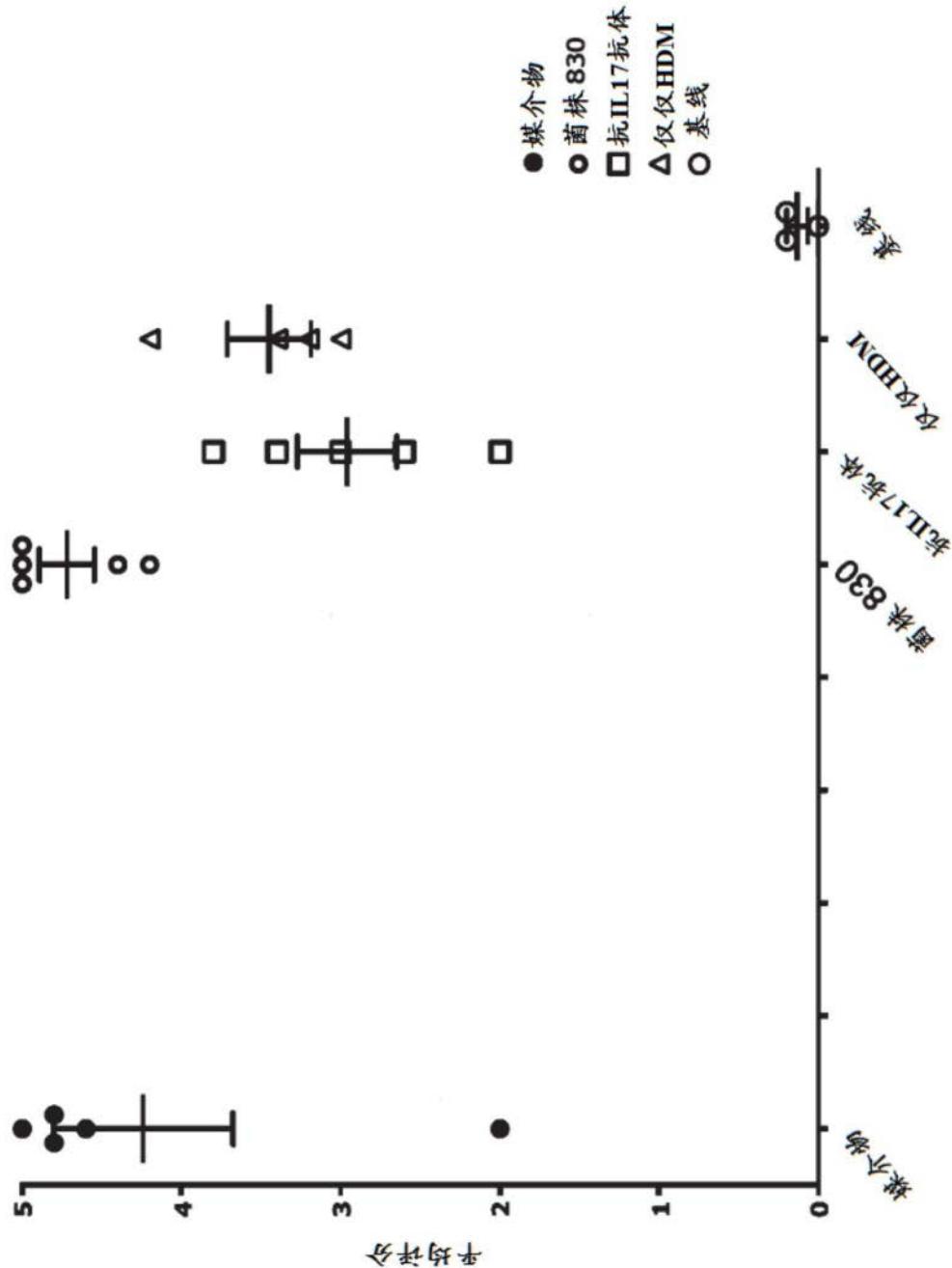


图51

组织学分析-平均炎症评分(细支气管支气管周与
血管周湿润评分的平均值)

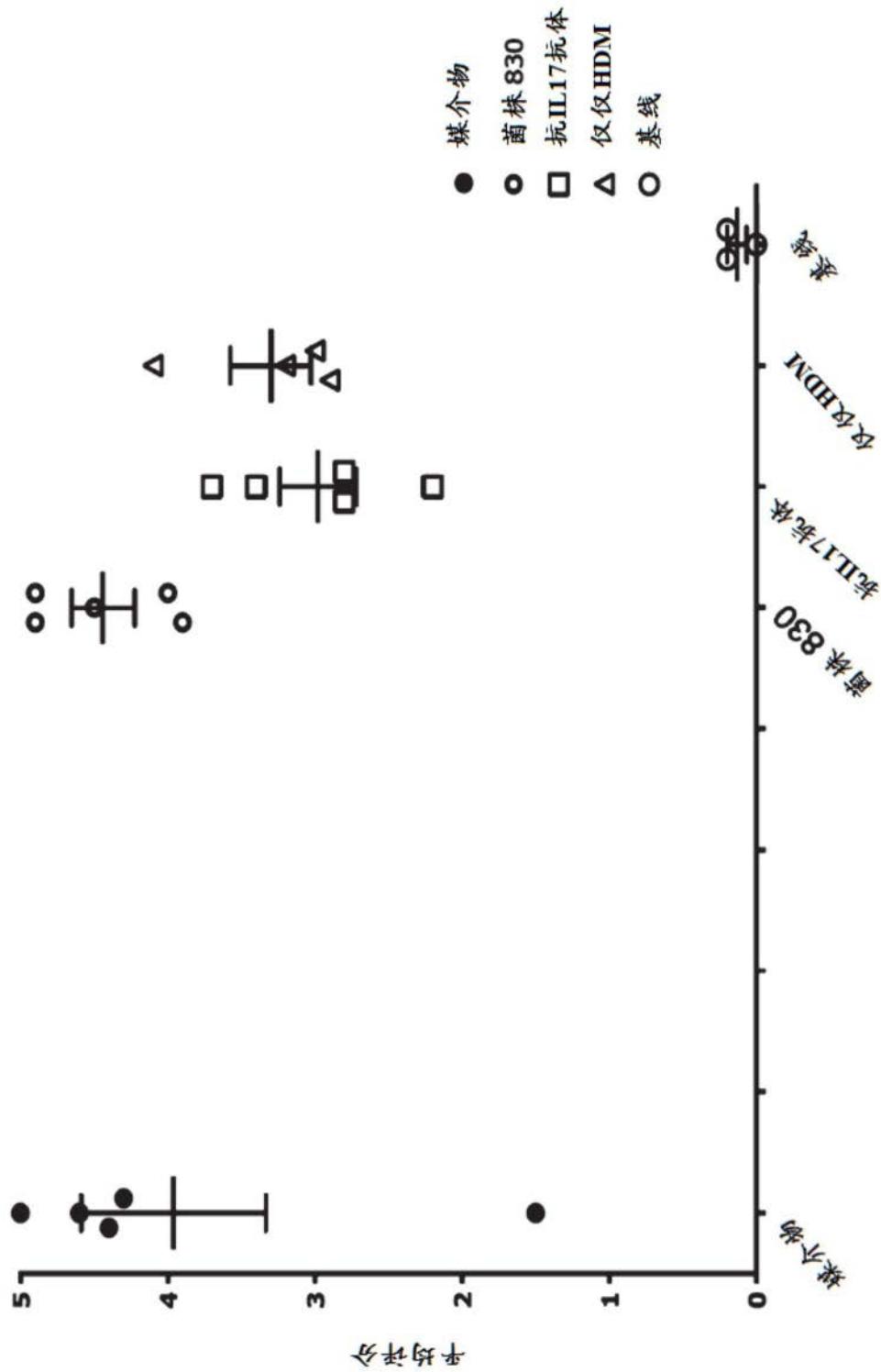


图52

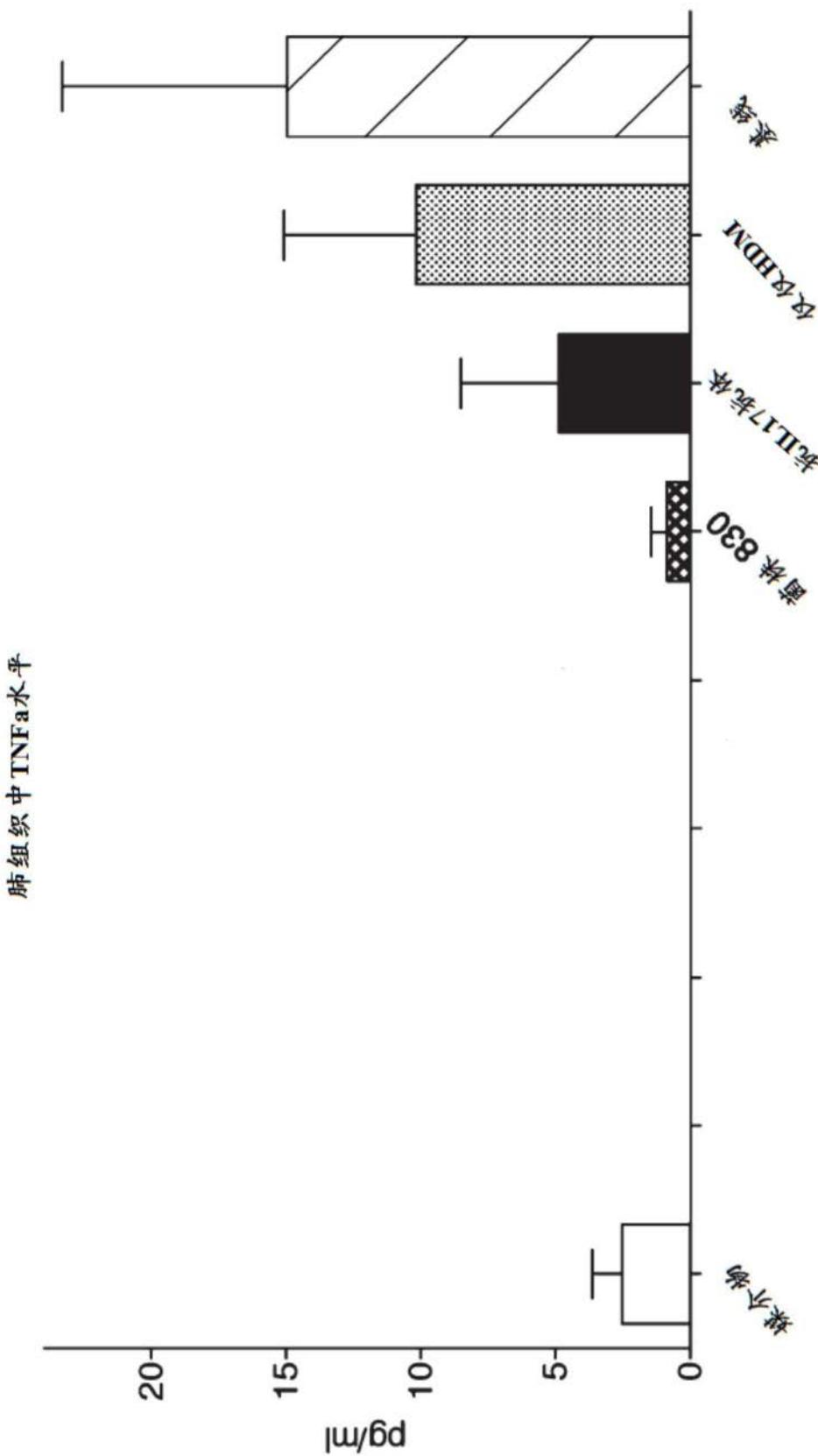


图53

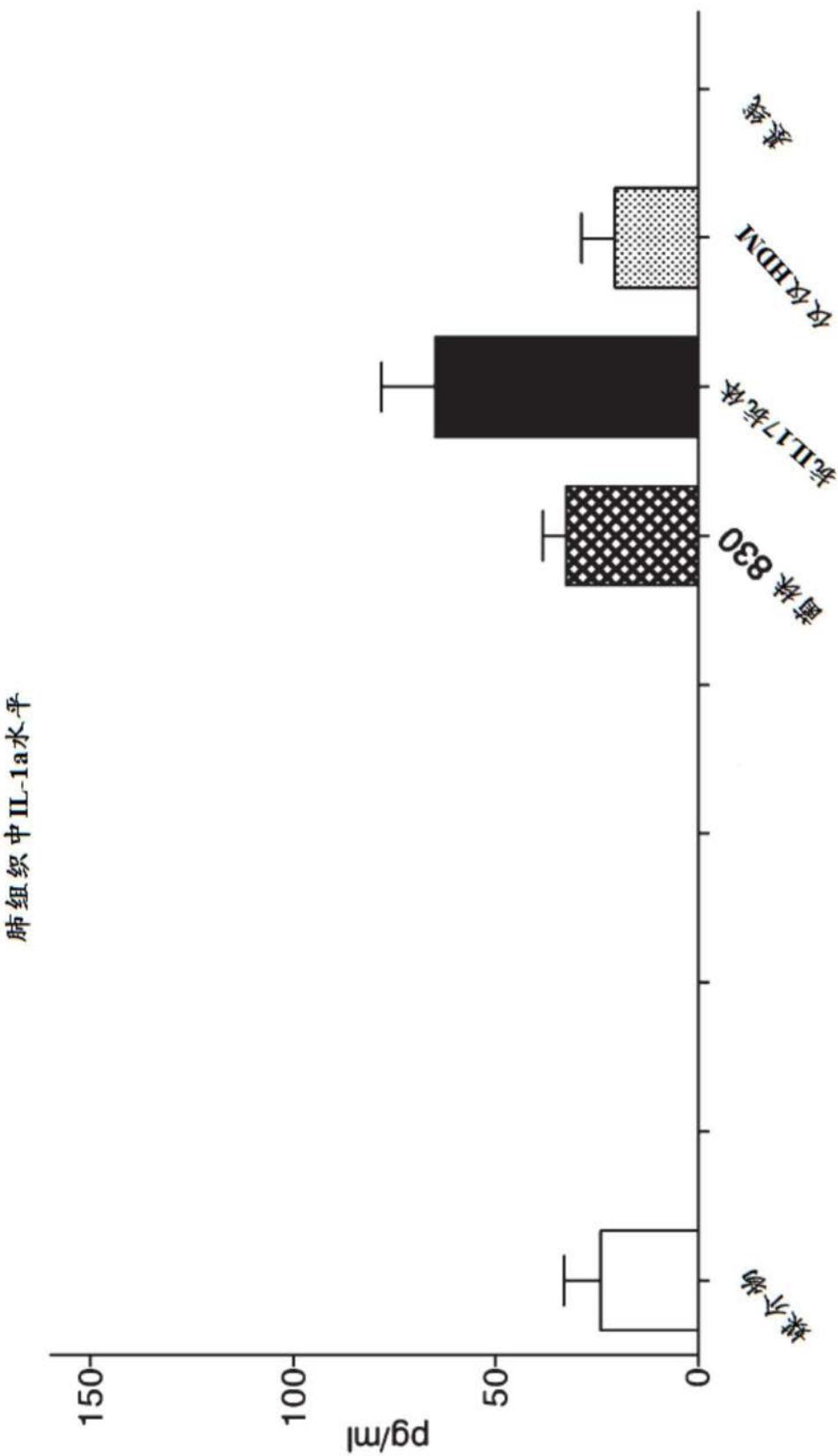


图54

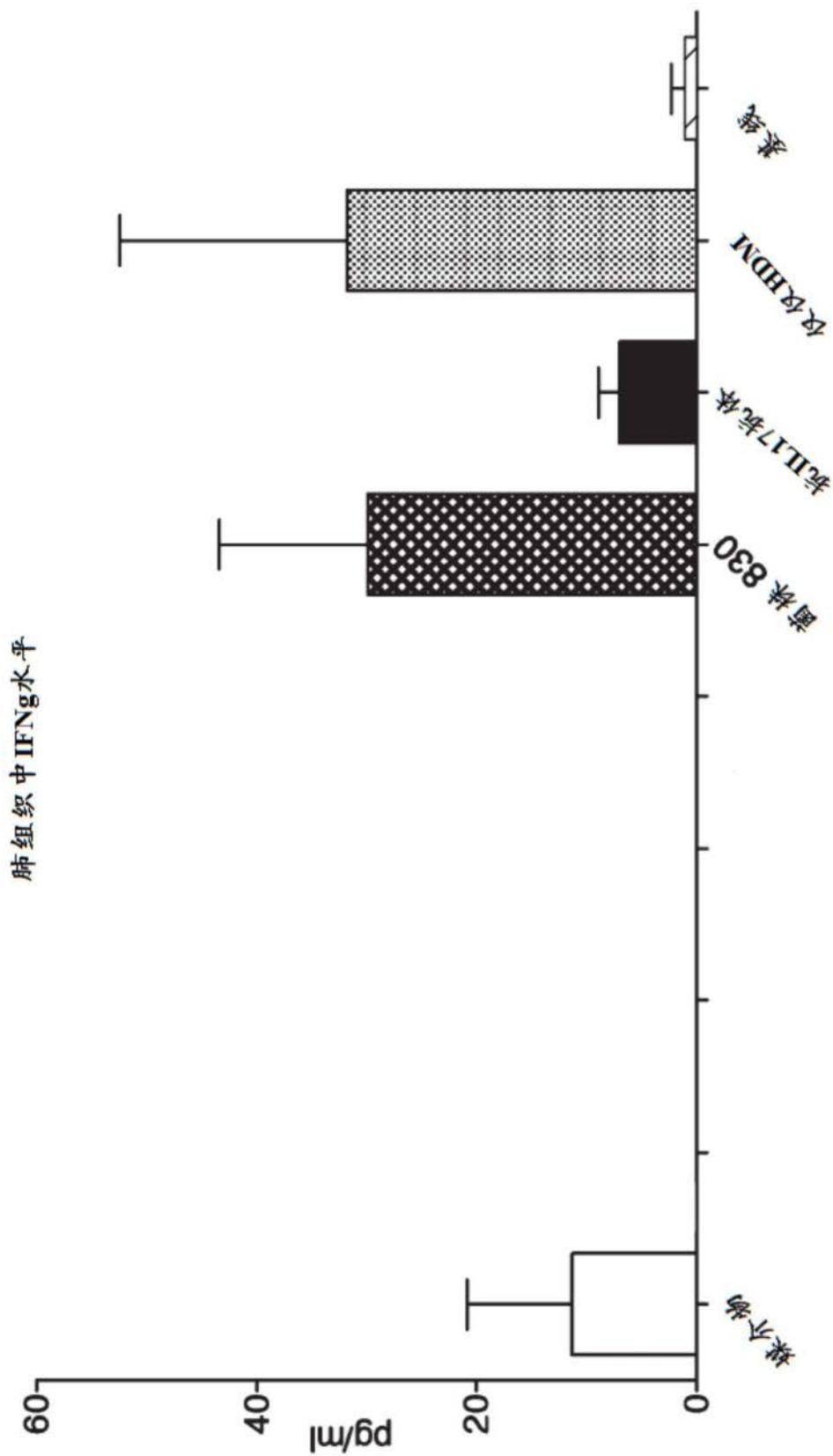


图55

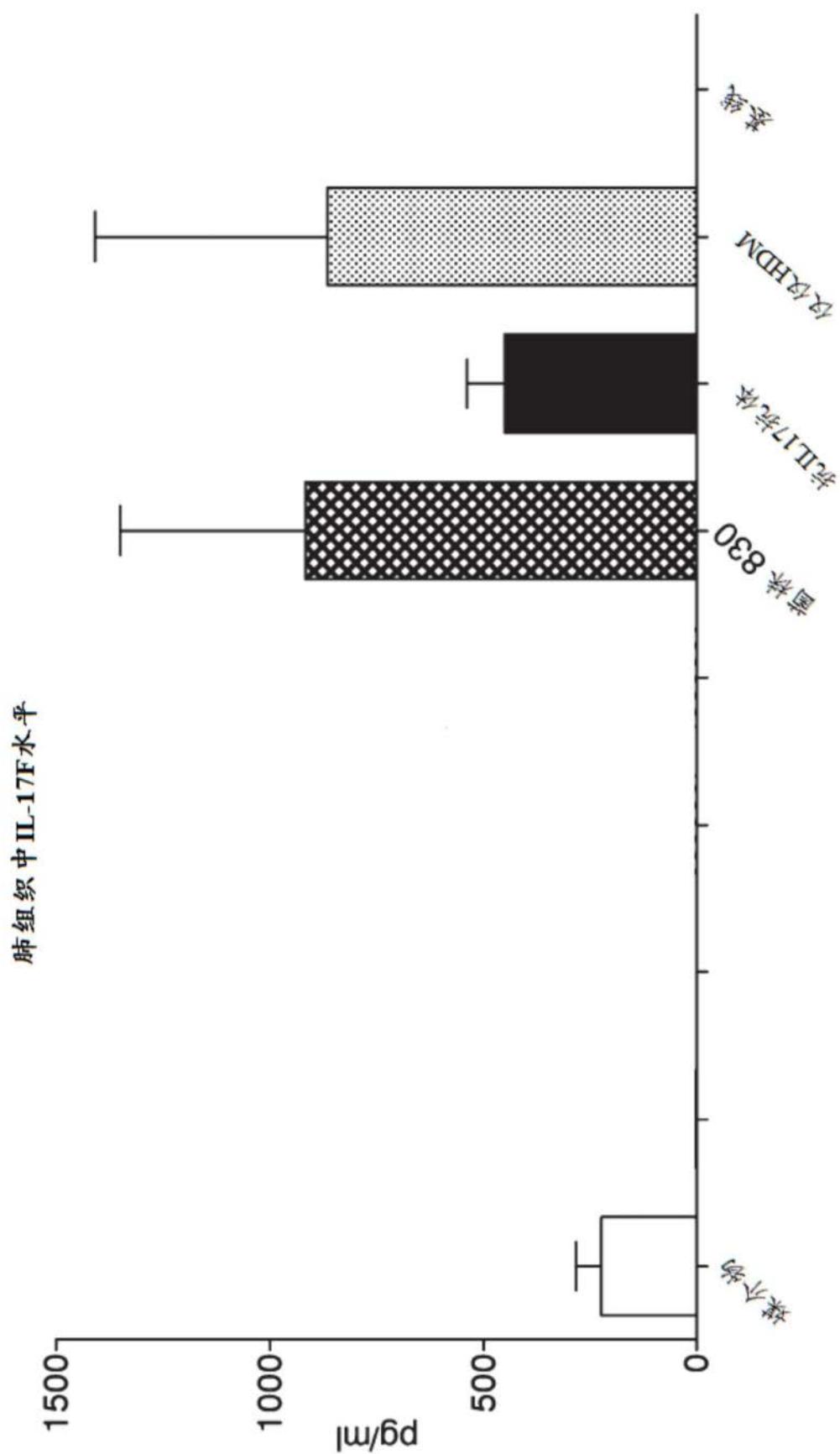


图56

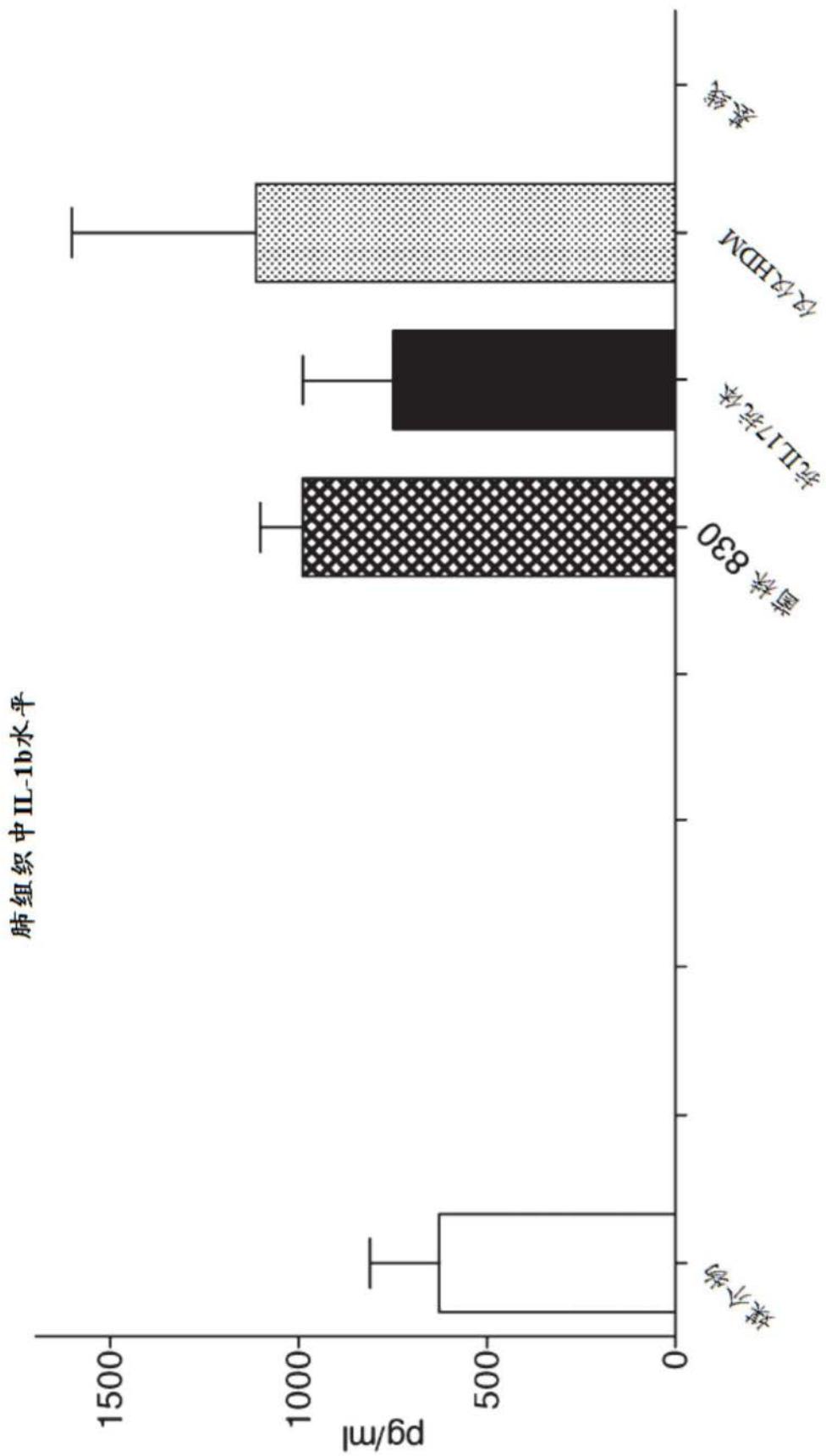


图57

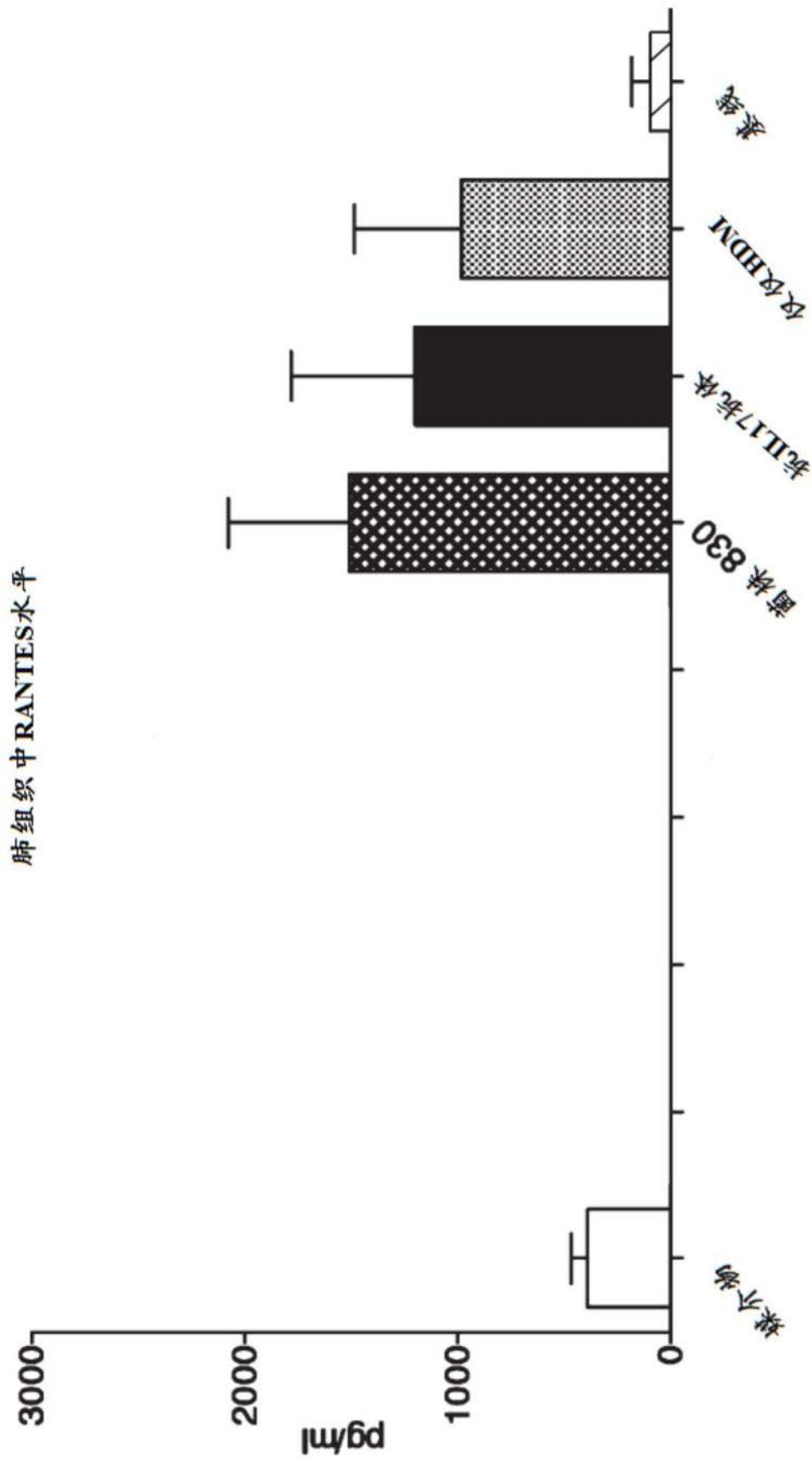


图58

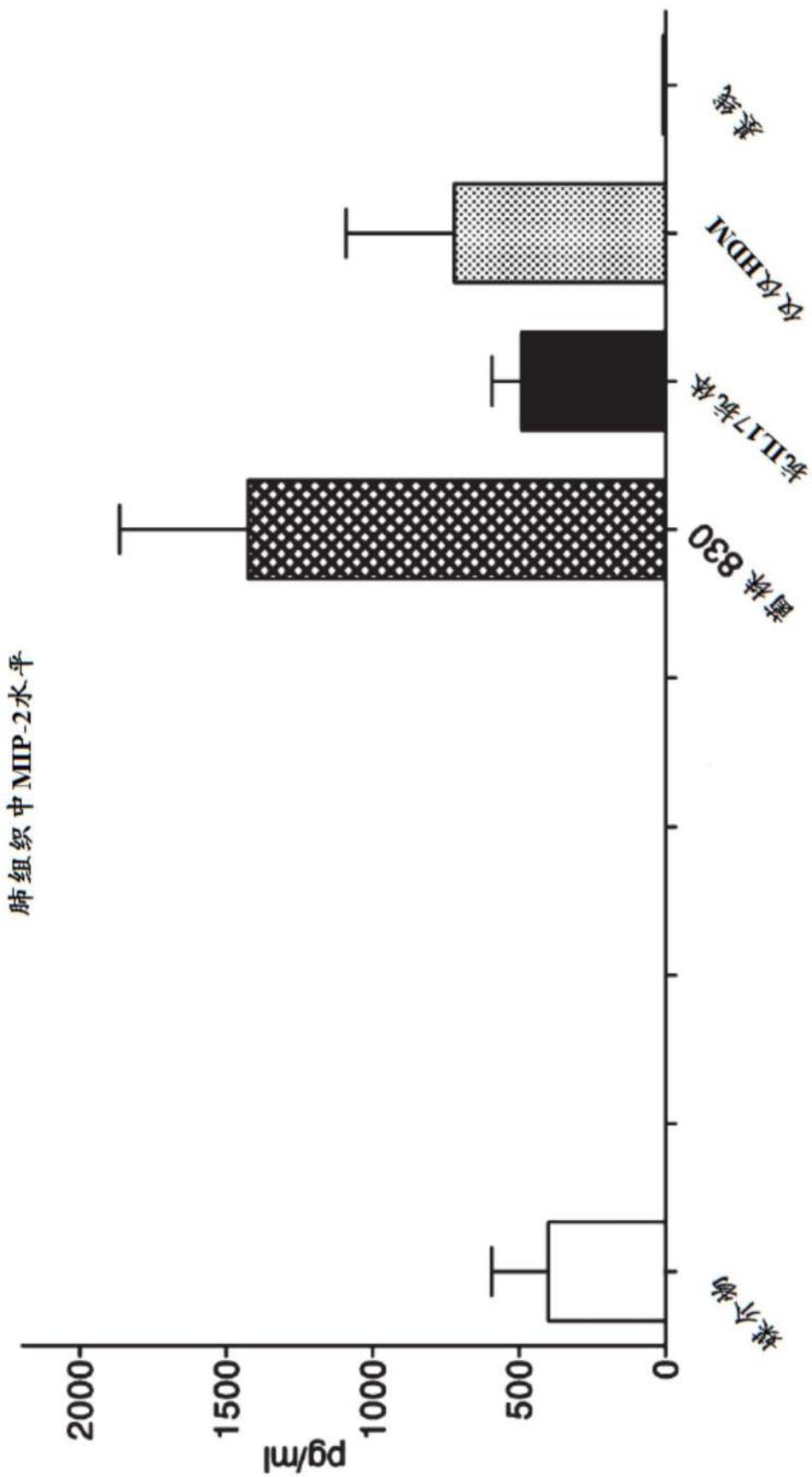


图59

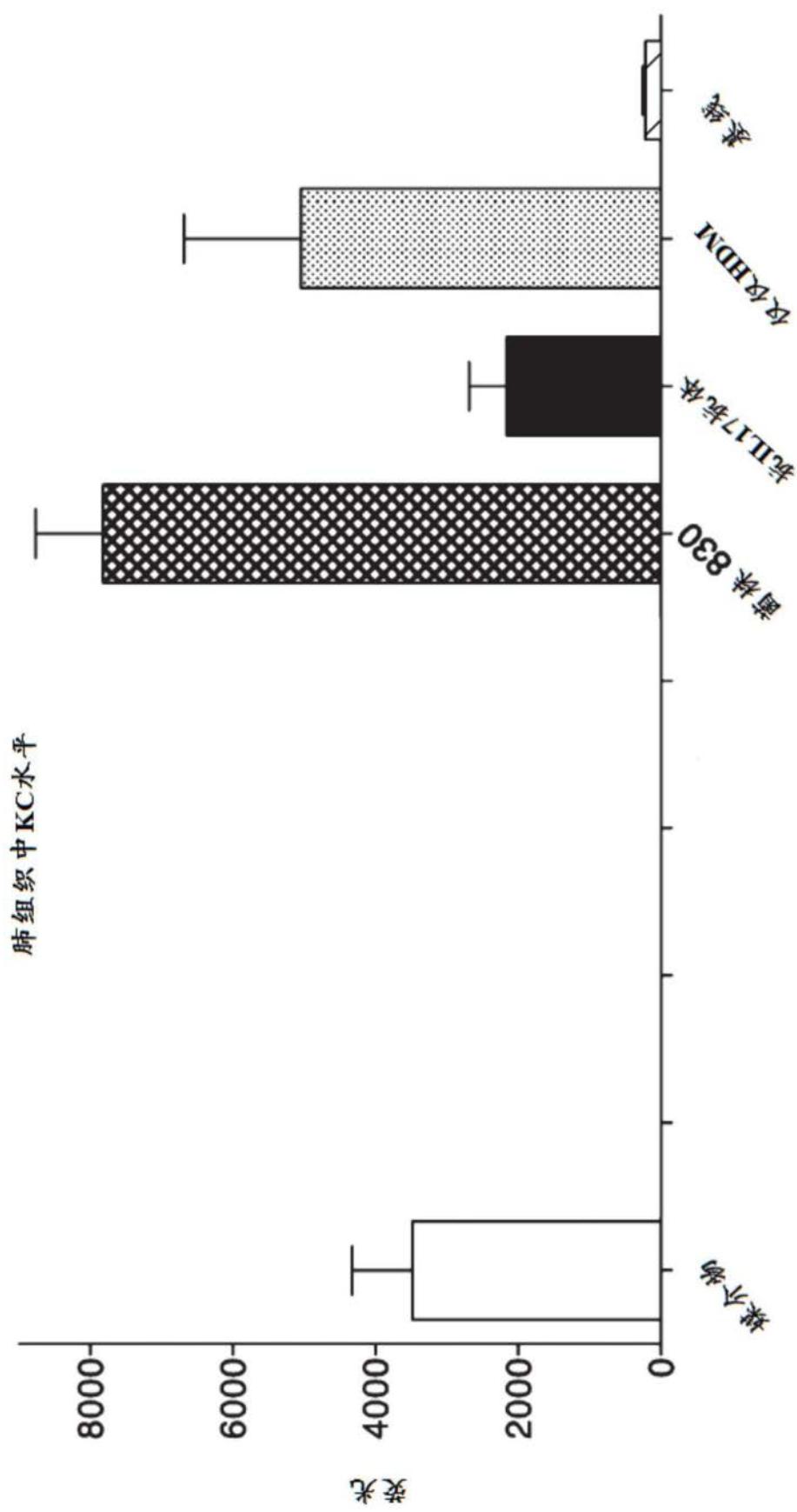


图60

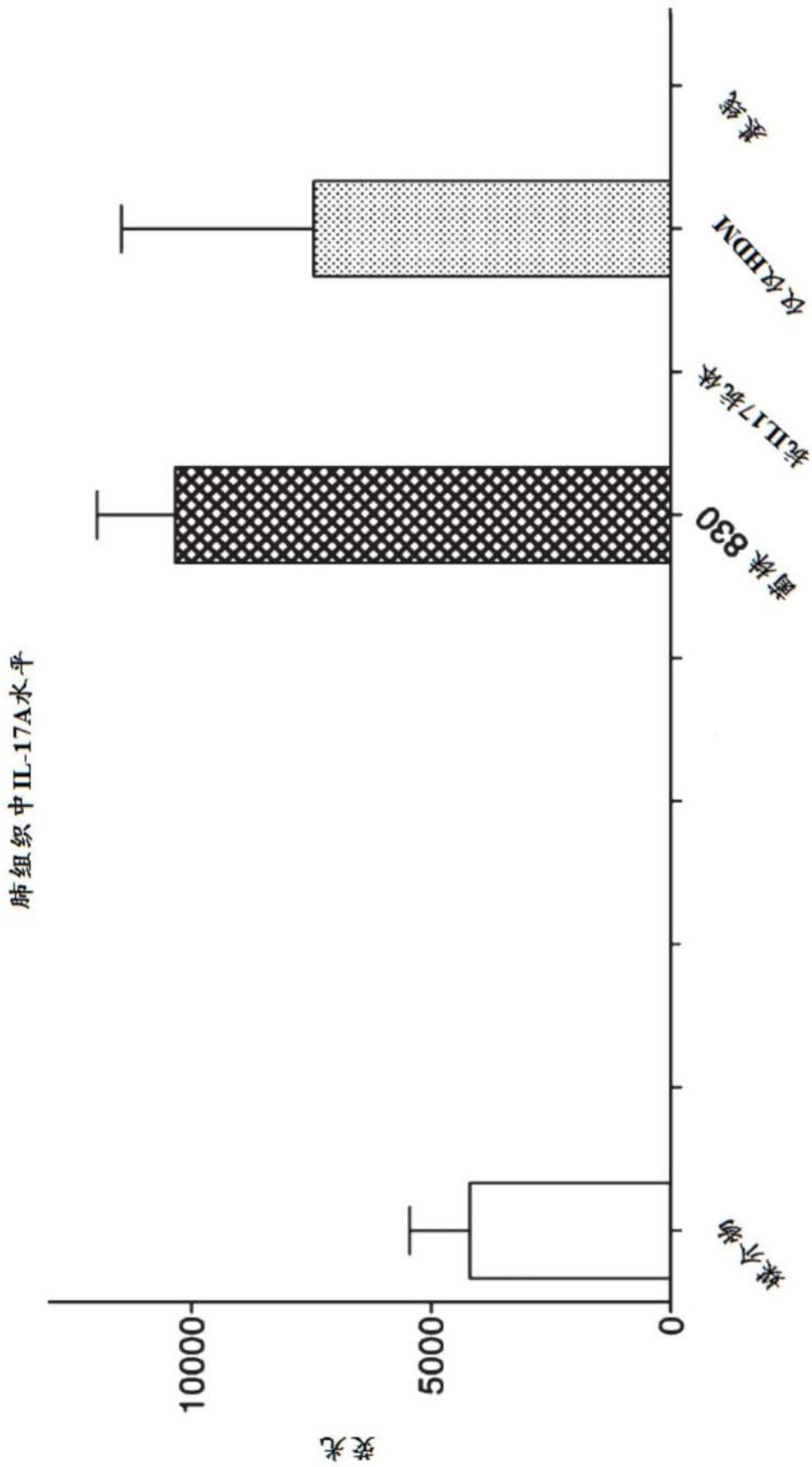


图61

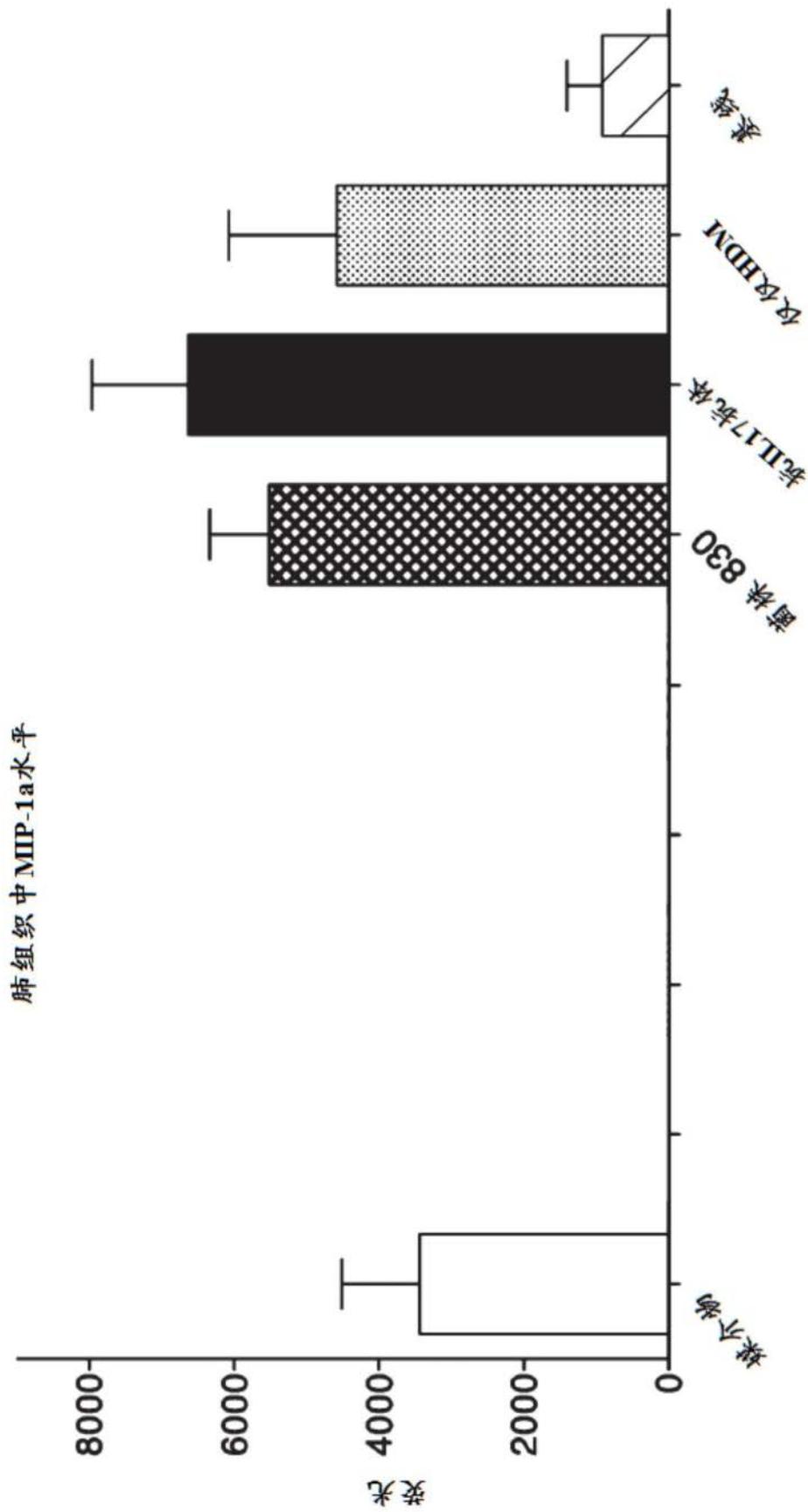


图62

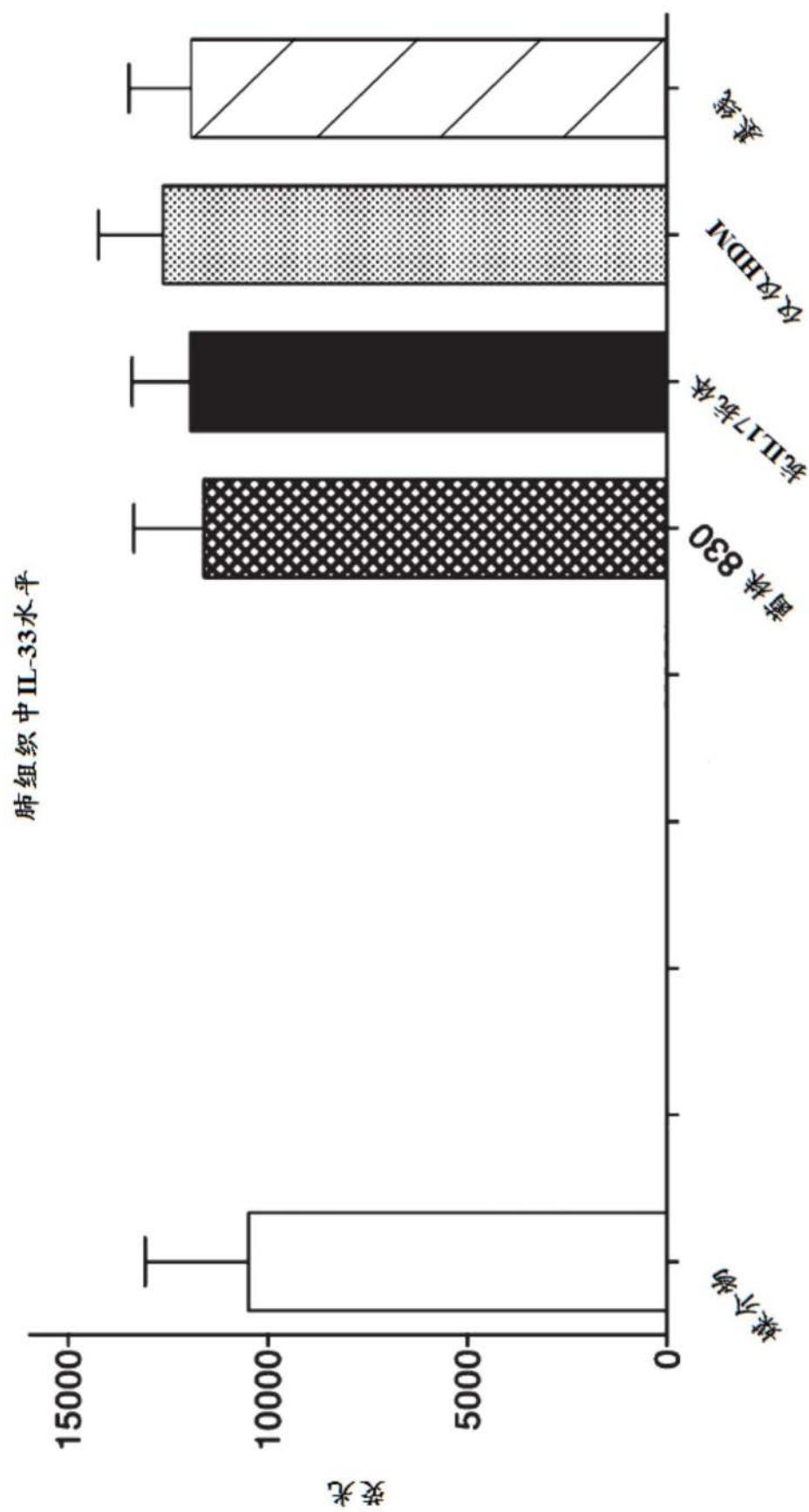
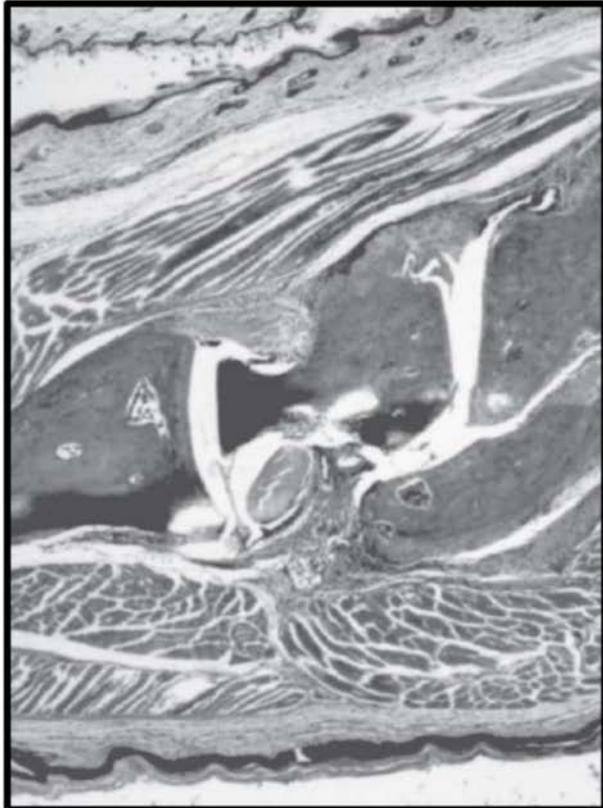
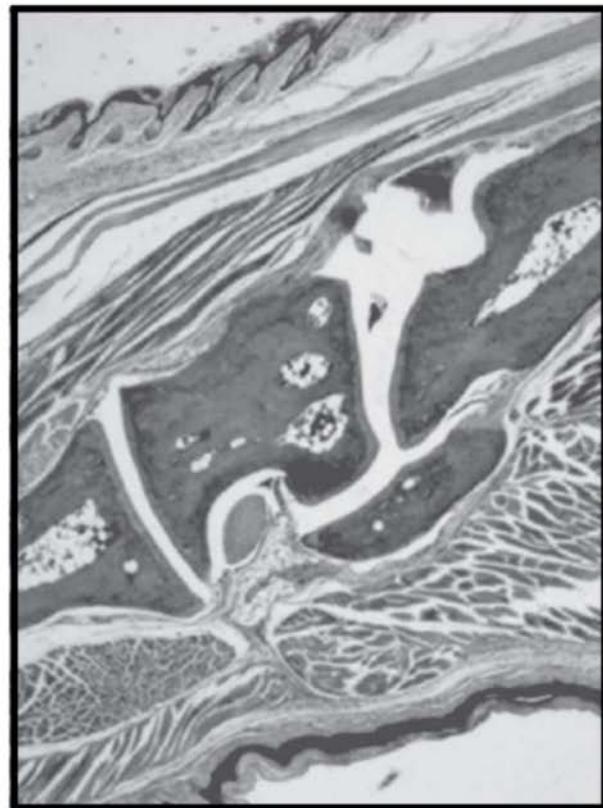


图63

组织病理学评分的目测模板

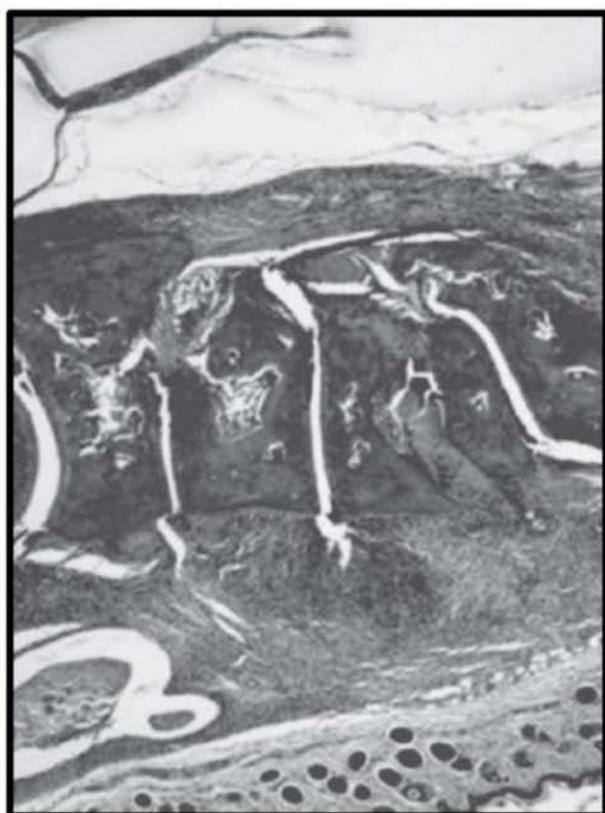


级别 1

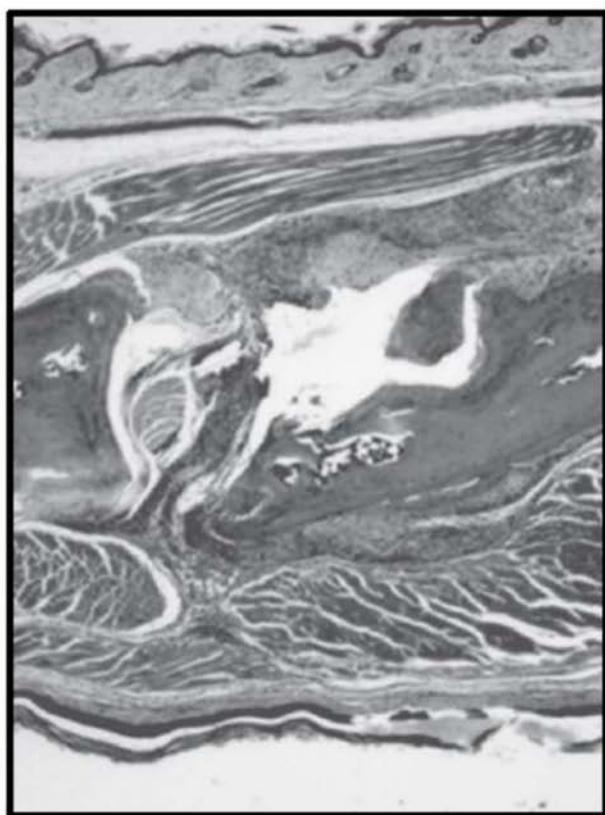


级别 0

图64

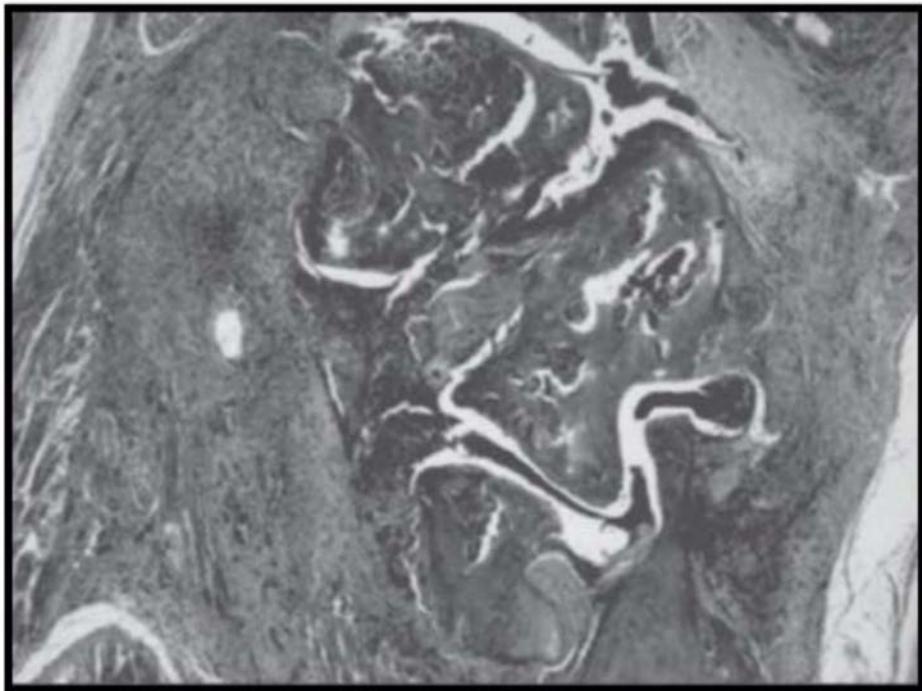


级别 7



级别 4

图64 (续)



级别 9

图64(续)

组织病理学：炎症评分

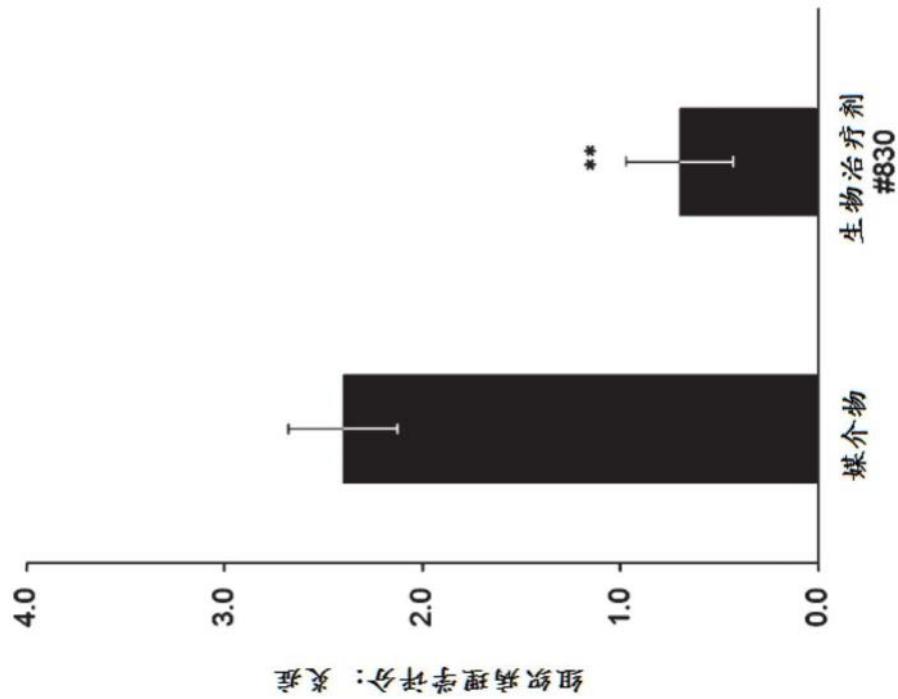


图65

组织病理学：骨骼评分

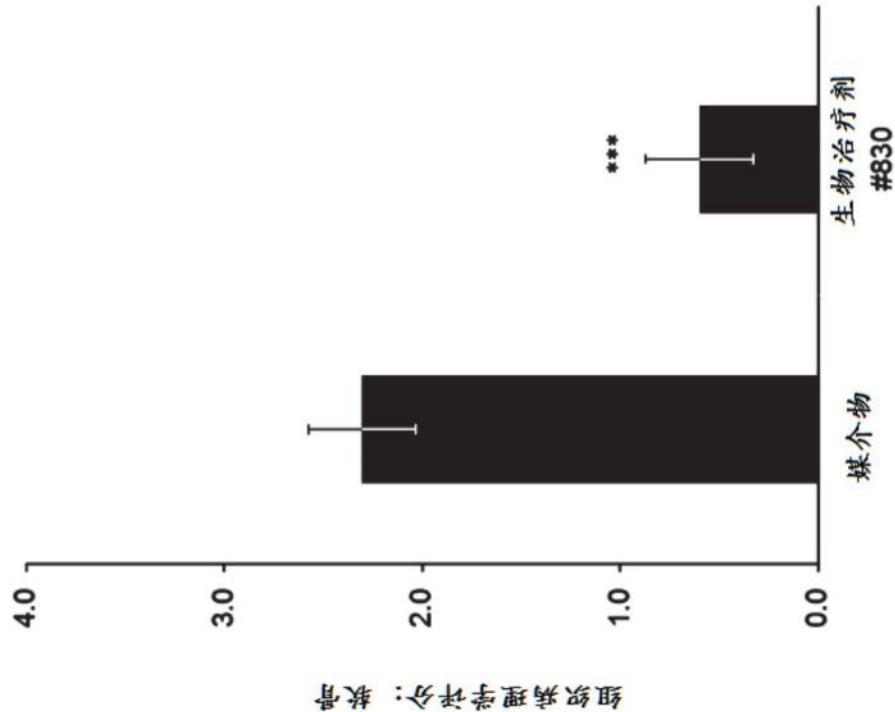


图66

组织病理学：骨骼评分

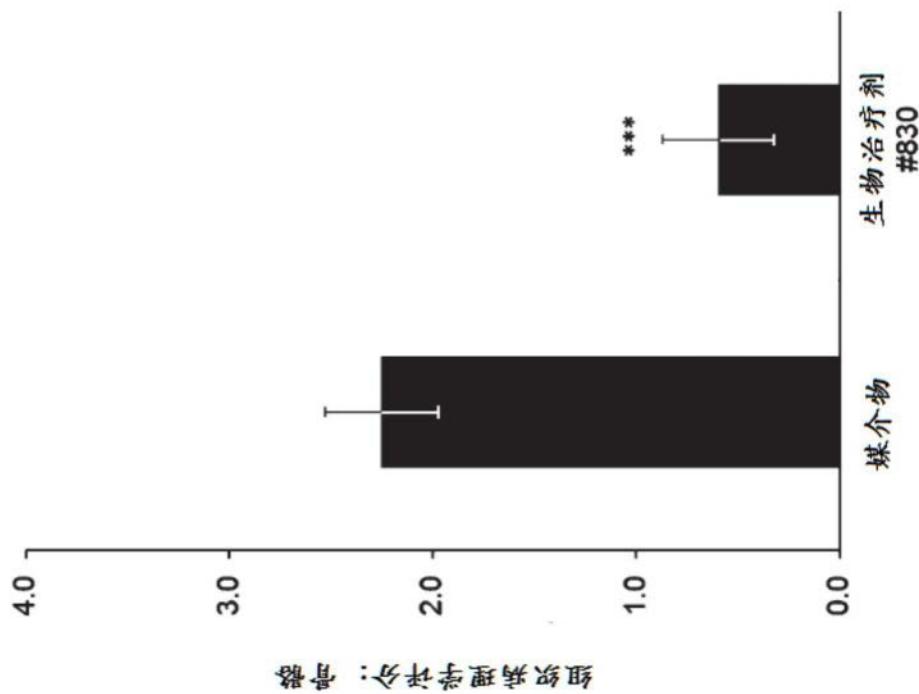


图67

组织病理学：总评分

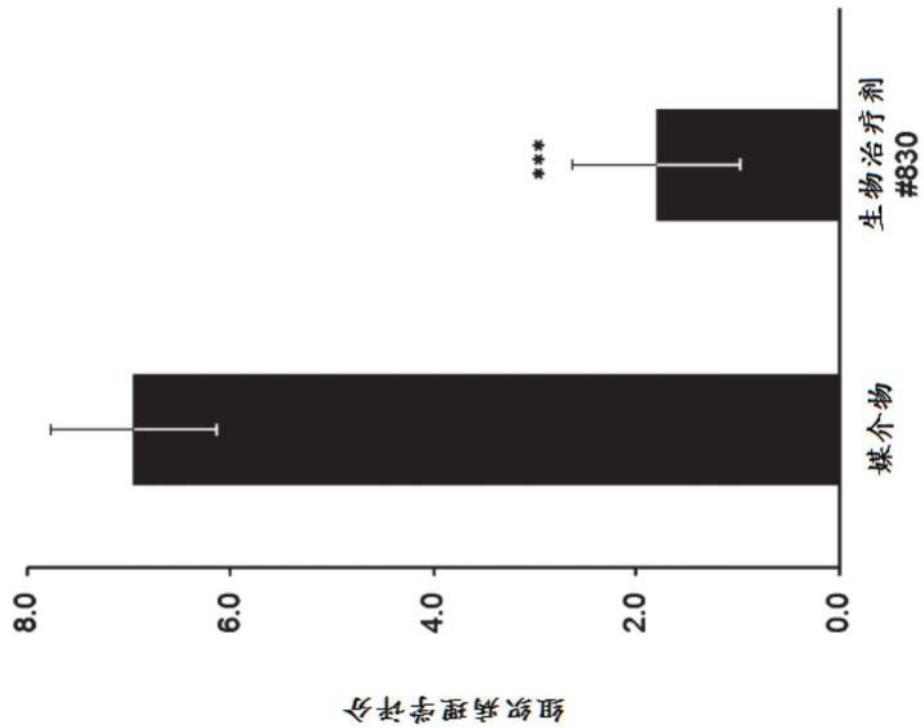
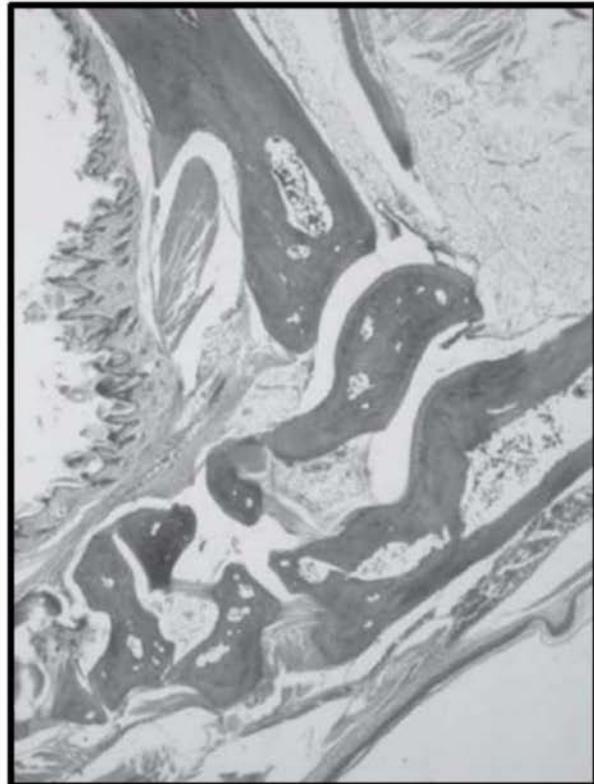
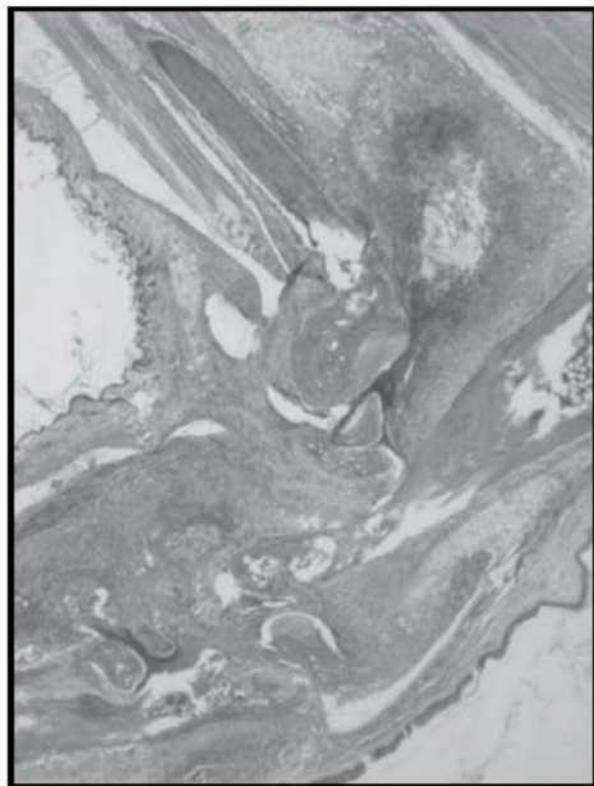


图68



菌株 #830 (#3.2R, 级别 0)



媒介物 (#1.1 1R, 级别 9)

图69

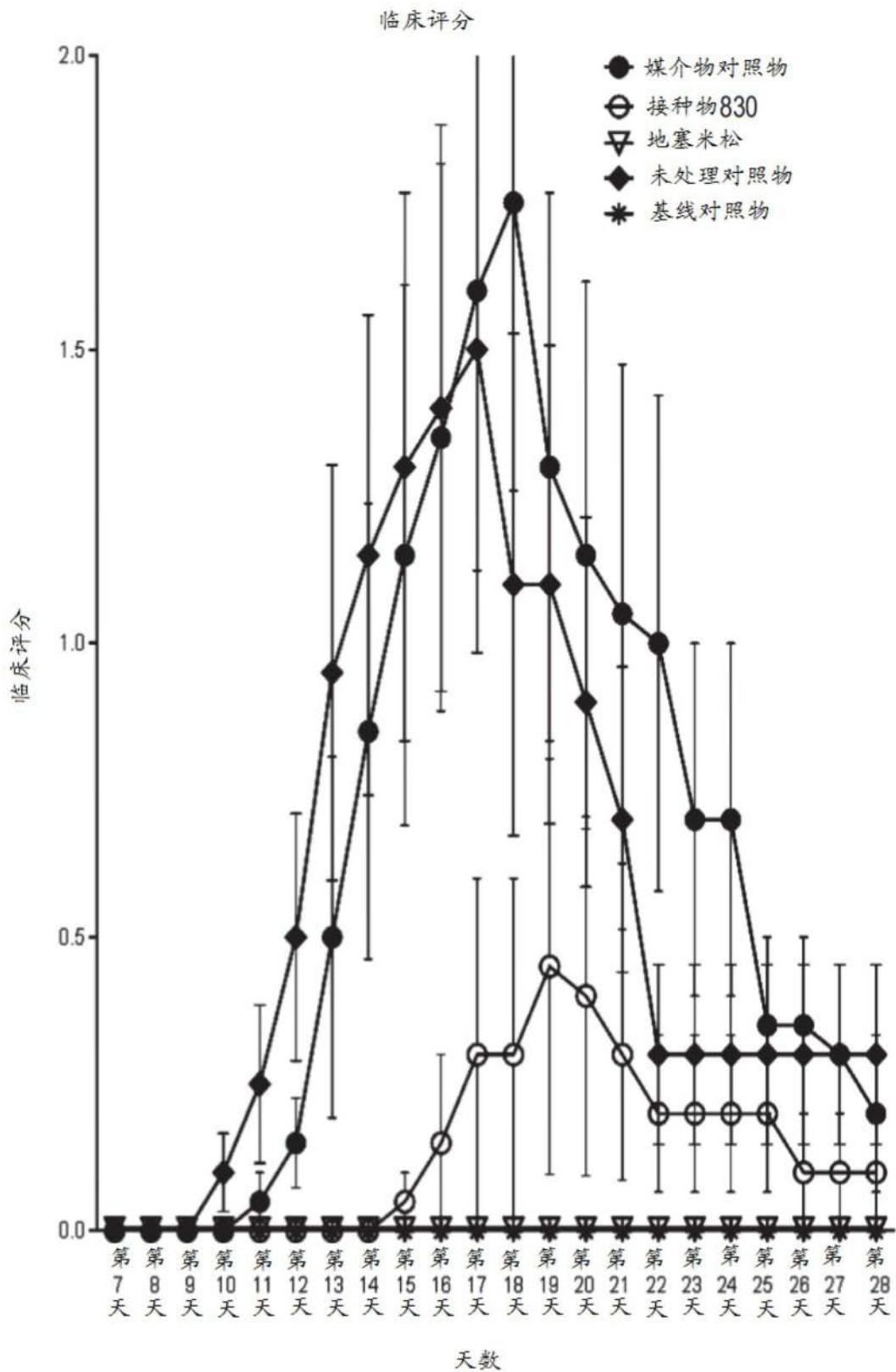


图70

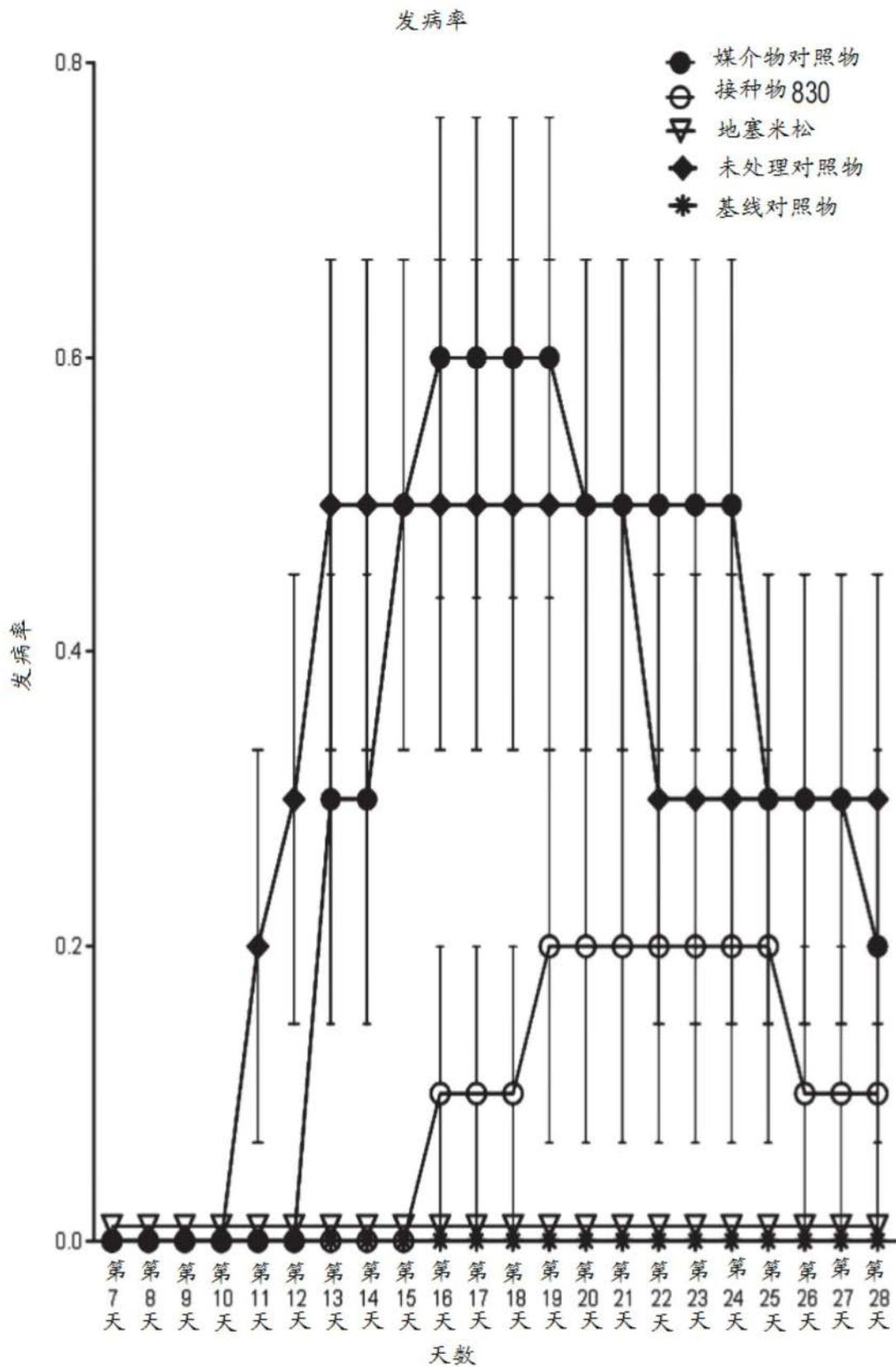


图71

第21天对IRBP的淋巴结增殖反应

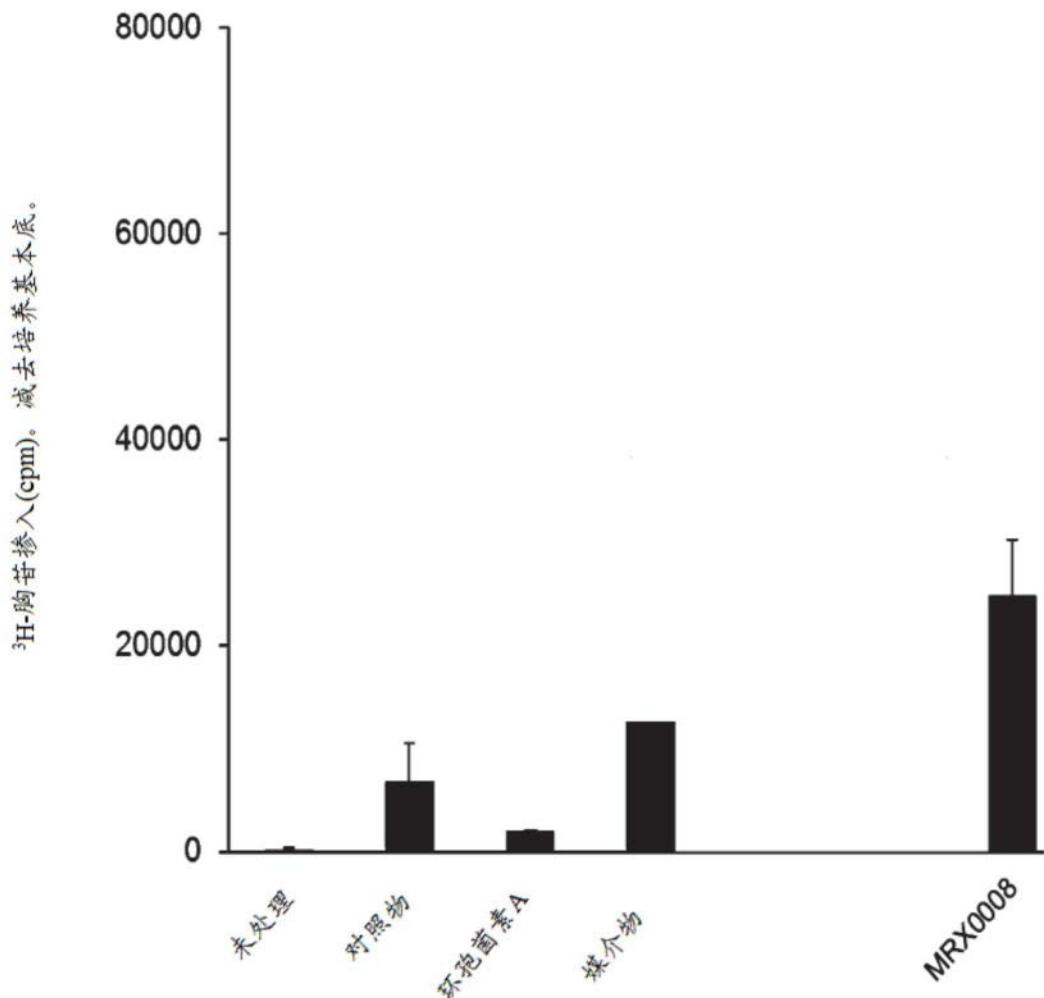


图72

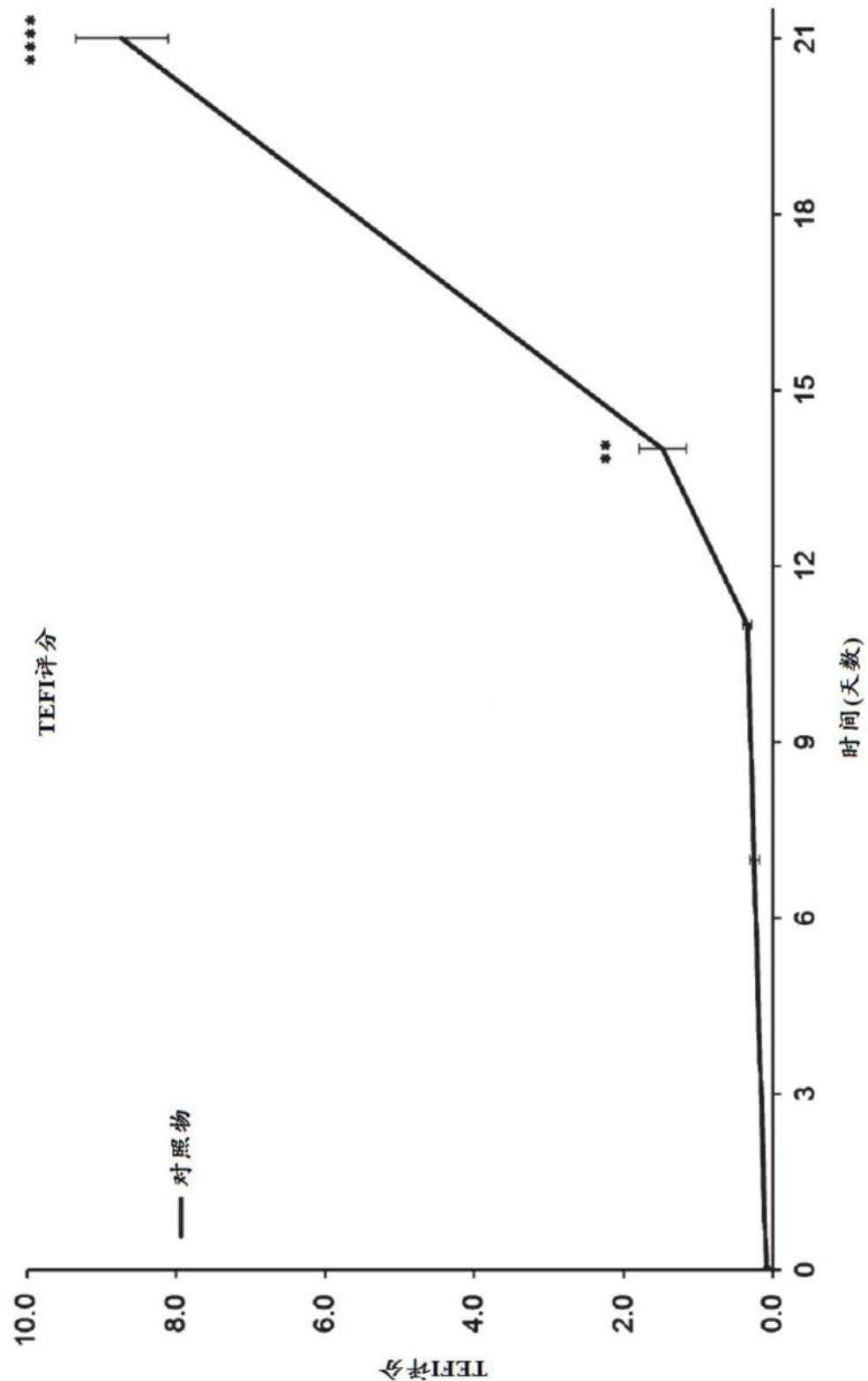


图73

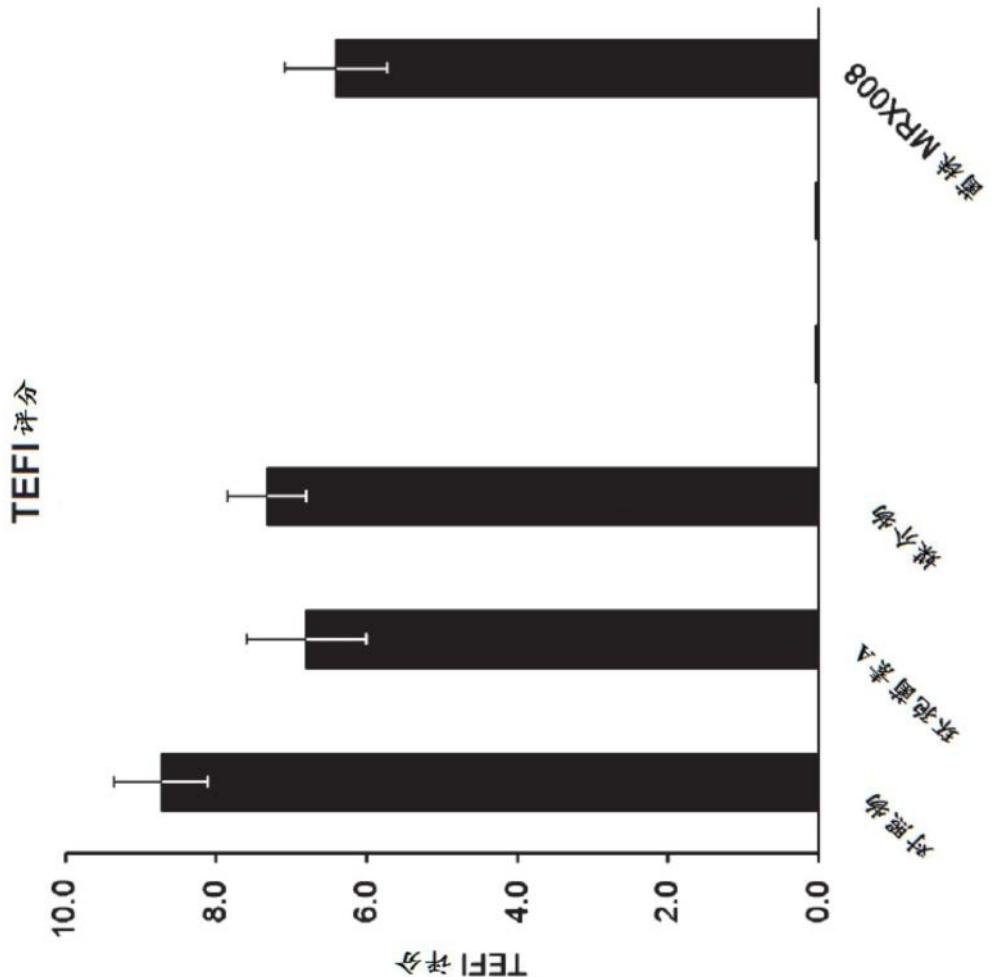


图74

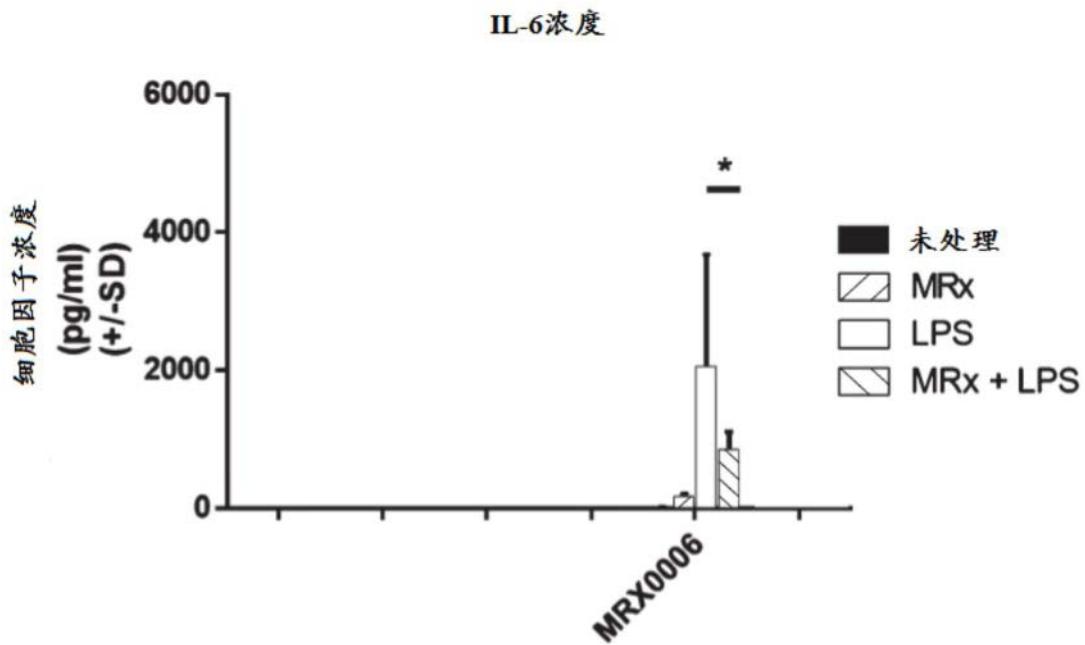


图75

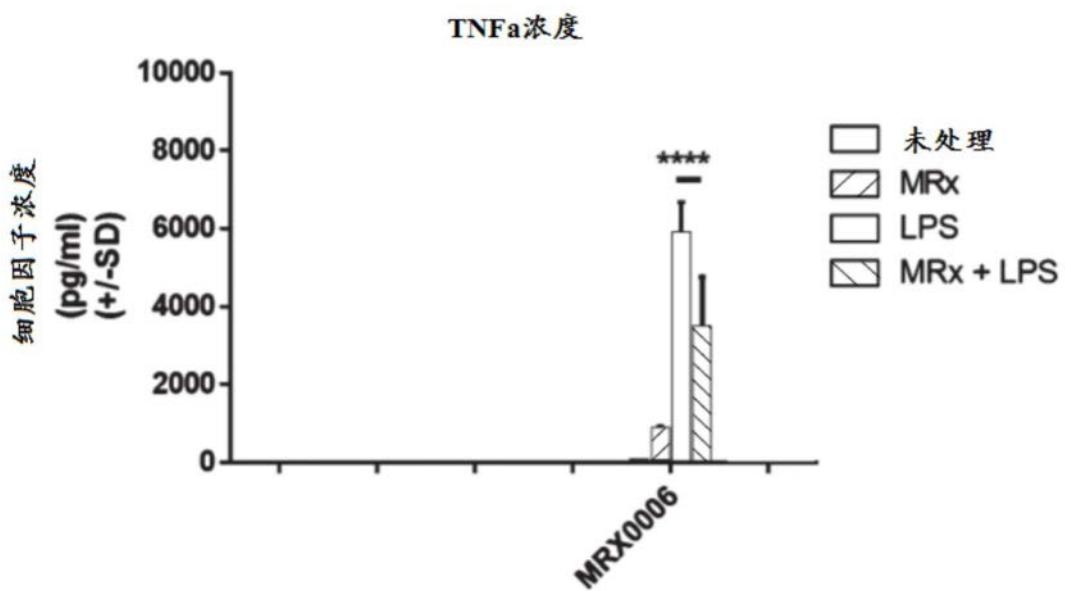


图76

MoDC (Cd1a+ CD14-) 成熟

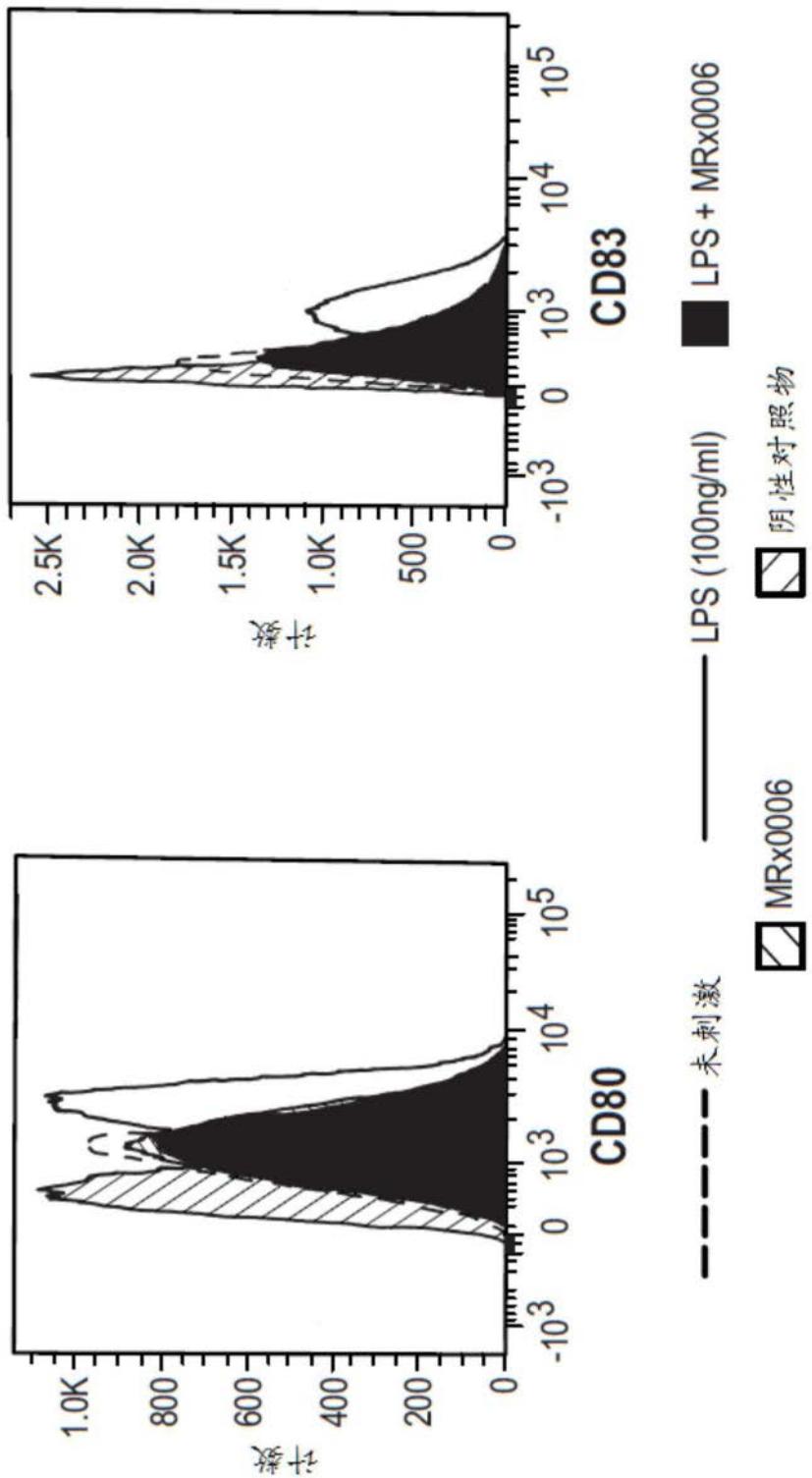


图77

MoDC (Cd1a+ CD14-) 成熟

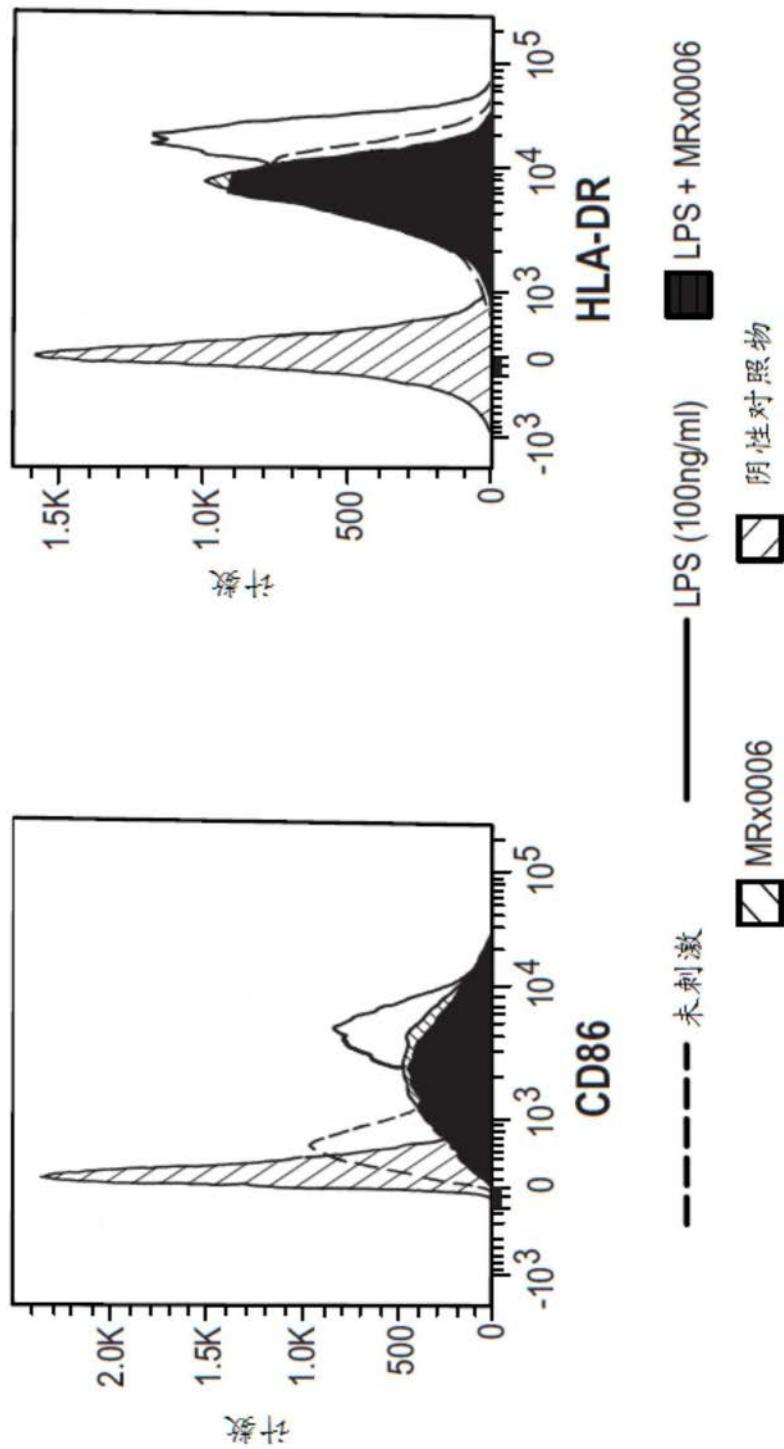


图77(续)

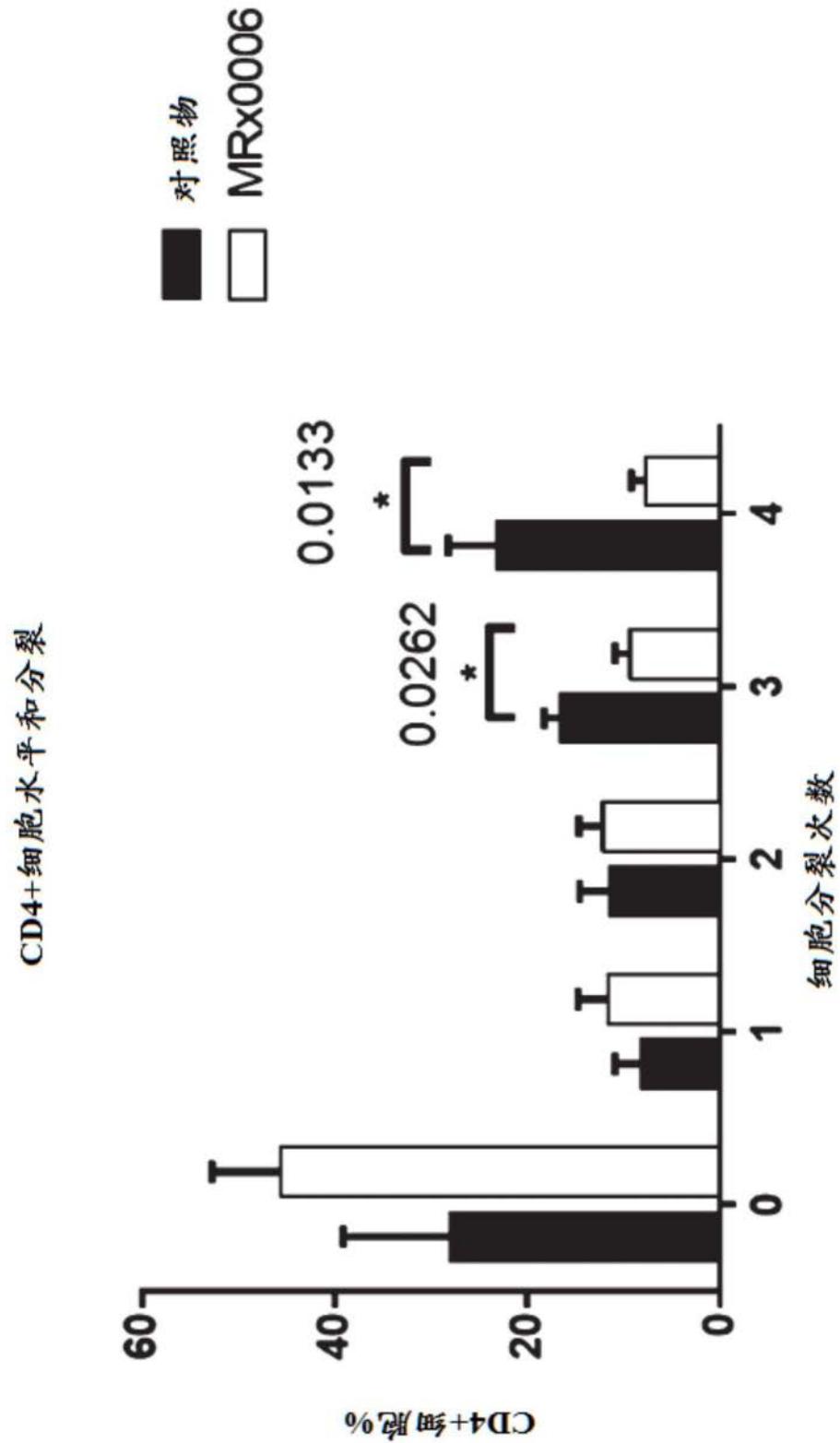


图78