



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113423413 A

(43) 申请公布日 2021.09.21

(21) 申请号 201980070558.8

(22) 申请日 2019.08.19

(30) 优先权数据

18189521.0 2018.08.17 EP

1817648.7 2018.10.29 GB

1900335.9 2019.01.10 GB

1901203.8 2019.01.29 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.02.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/072181 2019.08.19

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/035623 EN 2020.02.20

(83) 生物保藏信息

NCIMB 42380 2015.03.12

(71) 申请人 4D制药研究有限公司

地址 英国阿伯丁郡

(72) 发明人 伊姆克·伊丽莎白·马尔德

马西里奥·阿德里亚尼

艾米·贝丝·霍尔特

玛丽亚·克里斯托弗

菲利普·科威 艾玛·拉夫缇斯

黛尔芬·路易丝·克劳黛特·劳特  
卡里

艾玛·伊丽莎白·克莱尔·汉尼斯

苏阿德·艾哈迈德 安娜·埃托尔

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

权利要求书2页 说明书61页

序列列表2页

PCT/RO/134表2页 附图50页

(54) 发明名称

包含细菌菌株的组合物

(57) 摘要

本发明提供一种包含细菌菌株的组合物,所述组合物用于刺激受试者的免疫系统。

1. 一种包含短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) 菌种的细菌菌株的组合物, 所述组合物用于刺激受试者的免疫系统。

2. 根据权利要求1使用的组合物, 其中所述组合物是用于治疗受试者的免疫缺陷疾病。

3. 根据权利要求2使用的组合物, 其中所述免疫缺陷疾病是原发性免疫缺陷疾病或继发性免疫缺陷疾病。

4. 根据权利要求3使用的组合物, 其中所述原发性免疫缺陷疾病是选自。

5. 根据权利要求3使用的组合物, 其中所述继发性免疫缺陷疾病是选自AIDS、免疫系统癌症如白血病、免疫复合体性疾病如病毒性肝炎多发性骨髓瘤。

6. 根据权利要求1使用的组合物, 其中所述组合物是用作疫苗佐剂。

7. 根据权利要求1使用的组合物, 其中所述组合物是用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

8. 根据权利要求1使用的组合物, 其中所述组合物是用于增强细胞疗法如CAR-T。

9. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述组合物是用于增加IL-12p70、IL-12p70、IFN  $\gamma$ 、IL-4、TNF- $\alpha$ 和/或IL-17 $\alpha$ 的表达水平和/或活性。

10. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述组合物是用于刺激TLR2。

11. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述组合物是用于刺激NF $\kappa$ B。

12. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述细菌菌株包含完整胞外多糖基因座。

13. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述细菌菌株表达支链淀粉酶。

14. 一种包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物, 所述组合物用于治疗或预防细菌感染。

15. 根据权利要求14使用的组合物, 其中所述组合物是用于治疗或预防胃肠道细菌感染。

16. 根据权利要求14或权利要求15使用的组合物, 其中所述组合物是用于治疗或预防革兰氏阴性细菌感染。

17. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:1至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA基因序列, 或者其中所述细菌菌株具有由SEQ ID NO:1表示的16s rRNA基因序列。

18. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述细菌菌株能够使棉子糖发酵。

19. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述细菌菌株能够使以下中的一种或多种例如2种、3种、4种、5种、6种或全部7种发酵: $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\alpha$ -阿拉伯糖、甘露糖和棉子糖。

20. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述细菌菌株是以登录号42380保藏在NCIMB的菌株。

21. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述组合物是用于经口施用。

22. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。

23. 根据前述权利要求中任一项使用的组合物, 其中所述细菌菌株是冻干的。

24. 一种治疗或预防与免疫刺激降低相关的疾病或疾患的方法, 所述方法包括向有需要的患者施用包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物。

25. 一种包含如权利要求1至19中任一项所述的细菌菌株的细胞的组合物,其中所述细胞表达一种或多种异源抗原。

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

27. 根据权利要求25或权利要求26所述的组合物,所述组合物用作疫苗。

28. 一种如权利要求1至23中任一项所述的细菌菌株的细胞,其中所述细胞表达一种或多种异源抗原。

29. 根据权利要求28所述的细胞,其中所述细胞呈递所述一种或多种异源抗原。

30. 根据权利要求28或权利要求29所述的细胞,所述细胞用作疫苗。

## 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这些组合物用于治疗疾病、特别是在疾病治疗中刺激免疫系统的用途的领域。

### [0002] 发明背景

[0003] 虽然认为人类肠道在子宫内是无菌的,但在出生后其立即暴露于大量的各种母体和环境微生物。此后,出现微生物定殖和演替的变动期,其受例如分娩模式、环境、饮食和宿主基因型的因素影响,所有因素都影响肠微生物群(microbiota)的组成,特别是在生命早期期间。随后,微生物群稳定化并且变为成体样[1]。人类肠微生物群含有超过500-1000种基本上属于两大细菌门即拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)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、保护和其他有益功能。定殖肠部的增强代谢活性确保原本无法消化的膳食组分降解,同时释放副产物,从而为宿主提供重要营养物质来源。类似地,肠道微生物群的免疫学重要性是公认的并且在无菌动物中示例,所述无菌动物具有在引入共生细菌后在功能上重构的受损免疫系统[3-5]。

[0004] 微生物群组成的显著变化已在例如炎症性肠病(IBD)的胃肠病症中得以证明。例如,在IBD患者中梭菌属(*Clostridium*) XIVa簇细菌的水平降低,而大肠杆菌(*E.coli*)数目增加,这表明肠内共生体与致病共生菌(pathobiont)的平衡的变化[6-9]。有趣的是,这种微生物生态失调也与效应T细胞群体的不平衡相关。

[0005] 认识到某些细菌菌株对动物肠可能具有的潜在积极作用,已提出将各种菌株用于治疗各种疾病(参见例如[10-13])。此外,已提出将某些菌株(主要包括乳杆菌属(*Lactobacillus*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)菌株)用于例如通过抗炎机制治疗不直接与肠相关联的各种炎症性和自身免疫性疾病(关于综述,参见[14]和[15])。已提出某些链球菌属(*Streptococcus*)和韦荣氏球菌属(*Veillonella*)菌株以及较小程度的肠球菌属(*Enterococcus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)菌株具有免疫调节作用,对体外不同细胞因子具有不同作用。然而,不同疾病与不同细菌菌株之间的关系以及特定细菌菌株对肠和在系统水平上以及对任何特定类型疾病的准确作用尚未充分表征。

[0006] 最近,已研究各种双歧杆菌属菌种的抗炎性质,并且若干人类试验已证实双歧杆菌的治疗性质可成功地从实验室转化至临床,特别是用于炎症性和自身免疫性病症。例如,长双歧杆菌(*B.longum*) CECT7347和婴儿双歧杆菌(*B.infantis*) NLS在乳糜泻患者中都引发保护作用[16,17])。研究也已证实双歧杆菌能够调节肠道以外的疾病。由长双歧杆菌BB536、婴儿双歧杆菌M-63和短双歧杆菌M-16V构成的三菌株制剂减轻与儿童过敏性鼻炎和轻度间歇性哮喘相关的症状[18]。此外,向患有溃疡性结肠炎、牛皮癣和慢性疲劳综合征的患者施用长双歧杆菌35624使所有三种病症中C反应蛋白的血浆水平降低[19],表明这种菌株可能能够调节全身免疫。

[0007] 已在例如[20]和[21]中提出来自短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)菌种的生物体因代谢亚油酸而用于制备免疫刺激补充剂。然而,这些文献中并无任何内容表明这些生物体在施用于受试者时可引发免疫刺激反应。

[0008] 参考文献[22]表明包含 $\beta$ -低聚半乳糖A和B的营养组合物可引发免疫刺激作用。据称包含那些糖的组合物可另外包含各种其他包括短双歧杆菌的组分,但并未表明短双歧杆菌生物体有助于或增强 $\beta$ -低聚半乳糖的任何免疫刺激性质。

[0009] [23]中提出了来自短双歧杆菌菌种的生物体的治疗用途。然而,并未表明其中公开的细菌菌株具有免疫刺激作用。

[0010] 关于研究双歧杆菌属菌株对口服霍乱疫苗免疫原性的潜在作用的研究报道于[24]中。然而,该研究的结果尚无定论;该论文中报道测试菌株虽然耐受良好,但并未展现出明显的疫苗接种后免疫刺激作用。

[0011] 本领域需要治疗疾病的新方法。也需要表征肠细菌的潜在作用,以便可开发出使用肠细菌的新疗法。

## 发明内容

[0012] 本发明人已开发包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的新组合物,其可用于刺激受试者的免疫系统以及治疗和预防受试者的疾病。本发明人已鉴定短双歧杆菌菌种的菌株可有效地激活免疫系统。

[0013] 因此,本发明提供了一种包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物,其用于刺激受试者的免疫系统。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于刺激免疫系统。

[0014] 另外,本发明提供了一种刺激免疫系统的方法,其包括向受试者施用包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物。此外,本发明提供了包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物用于制造用于刺激受试者的免疫系统的药物的用途。

[0015] 在其他方面,本发明提供了一种包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物,其用作疫苗佐剂。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用作疫苗佐剂。

[0016] 在其他方面,本发明提供了一种包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物,其用于治疗、预防或延迟免疫衰老。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

[0017] 在其他方面,本发明提供了一种包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物,其用于增强细胞疗法,例如CAR-T。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于增强细胞疗法,例如CAR-T。

[0018] 本发明人也已表征了特别有效刺激免疫系统的短双歧杆菌菌株并且已鉴定出其效力可由其胞外多糖(EPS)介导。因此,本发明优选使用包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物,其用于刺激受试者的免疫系统,所述细菌菌株包含完整EPS基因座和/或在其表面上表达EPS。

[0019] 优选地,用于本发明中的细菌是以登录号42380保藏在NCIMB的菌株。

[0020] 在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,其用于在疾病的治疗或预防中增加IL-12p70、IL-12p70、IFN  $\gamma$ 、IL-4和/或TNF- $\alpha$ 的表达水平和/或活性,如在实施例中所证实。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于在疾病的治疗或预防中增加IL-12p70、IL-12p70、IFN  $\gamma$ 、IL-4和/或

TNF- $\alpha$ 的表达水平和/或活性。

[0021] 在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,其用于在疾病的治疗或预防中增加IL-12p70、IL-12p70、IFN  $\gamma$ 、IL-4、TNF- $\alpha$ 和/或TNF-17 $\alpha$ 的表达水平和/或活性,如在实施例中所证实。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于在疾病的治疗或预防中增加IL-12p70、IL-12p70、IFN  $\gamma$ 、IL-4、TNF- $\alpha$ 和/或IL-17 $\alpha$ 的表达水平和/或活性。

[0022] 在优选的实施方案中,本发明提供了用于刺激TLR2的组合物。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于刺激TLR2。

[0023] 在优选的实施方案中,本发明提供了一种用于刺激NF $\kappa$ B的组合物。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于刺激NF $\kappa$ B。

[0024] 在优选的实施方案中,本发明的细菌菌株表达支链淀粉酶,其在实施例中显示为由有效的短双歧杆菌菌株高度表达并且可能参与粘附。

[0025] 在其他方面,本发明提供了一种包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物,其用于治疗或预防受试者的细菌感染。实施例证实短双歧杆菌并且特别是本发明的短双歧杆菌菌株具有有效的抗微生物活性。另外,本发明提供了治疗或预防受试者的细菌感染的方法,其包括施用短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物。此外,本发明提供了一种包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物用于制造用于治疗或预防受试者的细菌感染的药物的用途。

[0026] 在优选的实施方案中,感染是胃肠感染。在优选的实施方案中,感染是革兰氏(Gram)阴性细菌感染。在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防胃肠大肠杆菌感染。在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防胃肠道沙门氏菌(*S.enterica*)感染。在一些实施方案中,本发明的组合物用于在细菌感染的治疗中降低细菌活力。本发明的细菌可用于将病原细菌的水平恢复至无症状水平或从受试者中完全消除病原细菌,从而治疗细菌感染,以及减轻与细菌水平升高相关的症状。

[0027] 预期与实施例中测试的短双歧杆菌菌株密切相关的菌株特别有效刺激免疫系统。在优选的实施方案中,本发明提供了一种组合物,其中细菌菌株具有与SEQ ID NO:1至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA基因序列,或者其中细菌菌株具有由SEQ ID NO:1表示的16s rRNA基因序列。

[0028] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于经口施用。本发明的菌株的经口施用可有效刺激免疫系统。此外,经口施用对于患者和专业人员而言是方便的并且允许递送至肠部和/或部分或全部定殖肠部。

[0029] 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体。

[0030] 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。本发明的组合物还可包含短双歧杆菌菌种的冻干细菌菌株。冻干是用于制备允许递送细菌的稳定组合物的有效且方便的技术。

[0031] 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。本发明还提供了一种包含如本文所述的短双歧杆菌菌种的细菌菌株的食品。

[0032] 在某些实施方案中,本发明提供了一种包含如上所述的细菌菌株的疫苗组合物。本发明还提供了一种包含根据本发明的组合物的疫苗组合物。

[0033] 另外,本发明提供了一种治疗或预防与免疫刺激降低相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向有需要的患者施用包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物。

## 附图说明

[0034] 图1:小鼠乳腺癌模型-肿瘤体积。

[0035] 图2:小鼠肺癌模型-肿瘤体积。

[0036] 图3:小鼠肝癌模型-肝脏重量。

[0037] 图4:单独MRX004的Rapid ID 32 A谱(A)和与短双歧杆菌型菌株的Rapid ID 32 A谱(B)的比较。白色=阴性反应(无颜色变化),向下交叉影线=中间阳性反应(弱颜色变化)和黑色=阳性反应(适当的强颜色变化)。

[0038] 图5:MRX004的API® 50 CH分析。向上交叉影线=阴性反应(无颜色变化),向下交叉影线=中间阳性反应(弱颜色变化),黑色=阳性反应(适当的强颜色变化)和白色=可疑反应(意外颜色变化)。

[0039] 图6:MRX004和短双歧杆菌型菌株附着于人类细胞。

[0040] 图7:通过MRx0004处理刺激NFκB和TLR2。用活MRx0004 (MRx0004<sub>LV</sub>)、MRx0004培养上清液 (MRx0004<sub>SN</sub>) 和热灭活MRx0004 (MRx0004<sub>HK</sub>) 的处理物以MOI 100:1将THP-1-NFκB (A) 和 HEK-TLR2 (B) 报告细胞系处理22小时。数据代表三个生物学重复。使用常规单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和Tukey多重比较检验实施统计分析。统计学显著差异呈现为\*p<0.05、\*\*\*p<0.001和\*\*\*\*p<0.0001。

[0041] 图8:MRx0004在体外和响应于IEC的转录反应。在对数后期生长中的培养物与IEC接触(3小时)后的培养物之间分析并比较十个MRx0004基因的表达。数据呈现为在命名条件之间计算并相对于groEL归一化的变化倍数( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )值,并且代表三个独立生物学重复。使用常规单因素方差分析和Tukey多重比较检验实施统计分析。\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001,\*\*\*\*p<0.0001。

[0042] 图9:MRx0004和相关菌株的EPS基因座内的序列多样性

[0043] 图10:MRx0004的EPS阴性衍生菌株的表型性质。对MRx0004 (A) 和其EPS阴性菌株 (EPS<sup>阴性</sup>) (B) 实施透射电子显微术 (TEM)。(C) 在将HT29-MTX细胞和细菌菌株以MOI 100:1共温育3小时后,分析细菌与IEC的粘附。呈现的数据是来自初始接种物的粘附CFU百分比的三个生物学重复的平均值。使用常规单因素方差分析和Tukey多重比较检验实施统计分析。\*p<0.05,\*\*p<0.01。

[0044] 图11:EPS耗尽对MRx0004表面蛋白质检测的影响。显示在(A) MRx0004刮取 (shaved) 和脱落 (shed) 的蛋白质级分、(B) EPS<sup>阴性</sup>刮取和脱落的蛋白质级分以及(C) MRx0004和EPS<sup>阴性</sup>刮取的蛋白质级分中鉴定的蛋白质数目的文氏图 (Venn diagram)。

[0045] 图12.通过MRx0004阐明EPS在免疫调节中的作用。将活处理物 (LV) 和培养上清液 (SN) 以100:1的MOI添加至HEK-TLR2报告细胞 (A) 和THP-1-NFκB报告细胞 (B) 中,并温育22小时。先前已在图7中呈现针对MRx0004<sub>LV</sub>和MRx0004<sub>SN</sub>所呈现的数据。数据代表三个独立重复。(C) 将HT29-MTX细胞与活细菌共温育3小时,接着以10ng/ml的浓度引入TNFα持续24小时。使

用ELISA分析共培养上清液中的IL-8水平。数据代表五个生物学重复。使用常规单因素方差分析和Tukey多重比较检验实施统计分析。 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ 。

[0046] 图13:通过流式细胞术鉴定免疫细胞子集。将来自六个健康供体的PBMC与以下处理物中的一者温育72小时;单独RPMI培养基、MRx0004<sub>HK</sub>或EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>。显示盒须图,其最小值和最大值由竖直须线(whisker)表示。细胞活化标志物CD25的表达显示为CD8<sup>+</sup>细胞和CD4<sup>+</sup>细胞的百分比(A-B)。Treg (CD25<sup>+</sup>(高)/CD127<sup>-</sup>(低))显示为CD4<sup>+</sup>细胞的百分比(C)。从各供体计算独立Treg/CD8<sup>+</sup>比率(D)并且将B细胞(CD19<sup>+</sup>)显示为CD3<sup>-</sup>细胞的百分比(E),并且使用常规单因素方差分析,接着使用Tukey多重比较检验实施统计分析。 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ 。

[0047] 图14:由外周血单核细胞(PBMC)产生的细胞因子谱。将细胞与以下处理物中的一者温育72小时;单独RPMI培养基、MRx0004<sub>HK</sub>或EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>。显示盒须图,其最小值和最大值由竖直须线表示。从6个健康供体获得PBMC,并且使用多重测定确定细胞因子浓度(A-G)。从各供体计算独立IL-12p70/IL-4比率、IL-10/IL1p70比率和IL-1 $\beta$ /IL12p70比率(H-J),并且使用常规单因素方差分析,接着使用Tukey多重比较检验实施统计分析。 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ 。

[0048] 图15:利用InteractiVenn生成的文氏图,其显示在MRx0004刮取和脱落的蛋白质级分中鉴定的蛋白质数目(列于表2中)。

[0049] 图16:(A)通过插入诱变产生MRx0004的EPS阴性菌株。(B)MRx0004及其衍生菌株EPS<sup>阴性</sup>、EPS<sup>载体</sup>和EPS<sup>比较</sup>的自动聚集。

[0050] 图17:比较MRx0004SN和EPS阴性SN中鉴定的蛋白质数目的文氏图。

[0051] 图18:用于七色板(seven colour panel)流式细胞术实验的门控(Gating)策略。使用活细胞群体以 $1 \times 10^5$ 个事件(event)设定采集临限值。显示来自未处理样品的人类外周血单核细胞(PBMC)的代表性伪彩图。在FloJo中使用同种型对照和FMO设定门控。使用正向散射和侧向散射鉴定淋巴细胞,然后门控出双重峰群体并利用活力染料排除死细胞。利用CD19对CD3<sup>-</sup>细胞进行次门控(sub-gated)以鉴定B细胞,而CD3<sup>+</sup>细胞群体用于进一步区分CD4<sup>+</sup>细胞和CD8<sup>+</sup>细胞。然后使用CD25来观察活化细胞的百分比,并且在CD4<sup>+</sup>群体的情况下,其也与CD127结合用于鉴定Treg (CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>-</sup>)。

[0052] 图19:通过流式细胞术鉴定免疫细胞子集。将来自六个健康供体的PBMC与以下处理物中的一者温育72小时;单独RPMI培养基、MRx0004<sub>HK</sub>或EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>。显示盒须图,其最小值和最大值由竖直须线表示。CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>细胞显示为CD3<sup>+</sup>的百分比(A-B)并且活化B细胞显示为CD19<sup>+</sup>的百分比(C)。使用常规单因素方差分析,接着使用Tukey多重比较检验实施统计分析。 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ 。

[0053] 图20:通过流式细胞术鉴定免疫细胞子集。将来自六个健康供体的PBMC与以下处理物中的一者温育72小时:MRx0004<sub>HK</sub>、EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>、EPS<sup>载体</sup><sub>HK</sub>或EPS<sup>比较</sup><sub>HK</sub>。显示散布图,其标准差由竖直条表示。CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>细胞的表达显示为CD3<sup>+</sup>细胞的百分比(A、C)。细胞活化标志物CD25的表达显示为CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞的百分比(B、D)。Treg (CD25<sup>+</sup>(高)/CD127<sup>-</sup>(低))显示为CD4<sup>+</sup>细胞的百分比(E),并且B细胞(CD19<sup>+</sup>)显示为CD3<sup>-</sup>细胞的百分比(F)并且活化B细胞显示为CD19<sup>+</sup>的百分比(G)。从各供体计算独立Treg/CD8<sup>+</sup>比率(H),并且使用常规单因素方差分析,接着使用Tukey多重比较检验实施统计分析。 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ 。

[0054] 图21:由外周血单核细胞(PBMC)产生的细胞因子谱。将细胞与以下处理物中的一者温育72小时:MRx0004<sub>HK</sub>、EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>、EPS<sup>载体</sup><sub>HK</sub>或EPS<sup>比较</sup><sub>HK</sub>。显示盒须图,其最小值和最大值由竖直须线表示。从6个健康供体获得PBMC,并且使用多重测定确定细胞因子浓度(A-G)。从各供体计算独立IL-12p70/IL-4比率、IL-10/IL1p70比率和IL-1 $\beta$ /IL12p70比率(H-J)。使用常规单因素方差分析,接着使用Tukey多重比较检验实施统计分析。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ , $***p<0.001$ , $****p<0.0001$ 。

[0055] 图22:共培养抗微生物板测定的实施例。显示指示菌株、测试菌株和抑制区。

[0056] 图23:测试菌株和参考短双歧杆菌菌株的API 32A测试结果。白色=阴性反应(无颜色变化)、星形=中间阳性反应(弱颜色变化)和黑色=阳性反应(适当的强颜色变化)。

[0057] 图24:测试菌株和参考短双歧杆菌菌株的PFGE SpeI消化。

[0058] 图25:SpeI消化的1%PFGE凝胶,其在0.5%TBE中操作,18小时,6V/cm,1-15秒ST。黑色箭头指示DNA大小标准物。将泳道1和2与来自同一凝胶的不同部分的泳道3-7分组。泳道1= $\lambda$ ,泳道2=MRx0004,泳道3=短双歧杆菌参考7,泳道4=短双歧杆菌参考6,泳道5=短双歧杆菌参考1,泳道6=短双歧杆菌参考2,泳道7= $\lambda$

[0059] 图26:基于该研究中包括的短双歧杆菌的PFGE图谱的UPGMA树形图(A)。从图B代表的PFGE条带图谱产生的相似性矩阵。

[0060] 图27:在不添加细胞因子(无细胞因子)的情况下,使用热杀灭的MRx0004(HK 4)、来自MRx0004培养物的上清液(SP 4)或RPMI培养基在T辅助细胞群体中诱导T细胞分化。 $**=p\leq 0.01$ 。

[0061] 图28:在不添加细胞因子(无细胞因子)的情况下,使用热杀灭的MRx0004(HK 4)、来自MRx0004培养物的上清液(SP 4)或RPMI培养基在细胞毒性T淋巴细胞(CTL)群体中诱导T细胞分化。 $*=p\leq 0.05$ ; $***=p\leq 0.001$ ; $****=p\leq 0.0001$ 。

[0062] 图29:脾细胞的活力。

[0063] 图30:脾细胞在用MRx004处理后产生的细胞因子谱。

[0064] 图31:脾脏中CD8+IFN  $\gamma$  +和CD4+IFN  $\gamma$  +细胞的频率和每细胞IFN  $\gamma$  的产生。

## 具体实施方式

[0065] 细菌菌株

[0066] 本发明的组合物包含短双歧杆菌菌种的菌株。实施例证实这些细菌菌株可用于刺激免疫系统。本发明的优选细菌菌株是以登录号NCIMB 42380保藏的细菌。

[0067] 以登录号NCIMB 42380保藏的短双歧杆菌细菌在实施例中进行测试,并且在本文中也称为菌株751、MRX004或MRx0004。所测试的MRX004菌株的部分16S rRNA序列以SEQ ID NO:1提供。短双歧杆菌菌株MRX004由GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) 于2015年3月12日以识别参考751保藏在国际保藏机构NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) 并且被指定登录号NCIMB 42380。GT Biologics Ltd. 随后更其名为4D Pharma Research Limited。这些保藏物公布于W02016/203223中。

[0068] 菌株NCIMB 42380的基因组序列提供于W02016/203223的SEQ ID NO:2中。

[0069] 也预期与实施例中测试的菌株密切相关的细菌菌株有效刺激免疫系统。在某些实

施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与SEQ ID NO:1至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,细菌菌株具有由SEQ ID NO:1表示的16s rRNA序列。最佳地,细菌菌株是以登录号NCIMB 42380保藏的短双歧杆菌菌株。

[0070] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有序列同一性的基因组。在优选的实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有在W02016/203223的SEQ ID NO:2的至少60% (例如至少65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 上与W02016/203223的SEQ ID NO:2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) 的基因组。例如,用于本发明中的细菌菌株可具有如下基因组:所述基因组在W02016/203223的SEQ ID NO:2的70%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的80%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的90%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的100%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的70%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的80%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的90%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的100%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的70%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少98%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的80%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少98%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的90%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少98%序列同一性,或在W02016/203223的SEQ ID NO:2的100%上与W02016/203223的SEQ ID NO:2具有至少98%序列同一性。

[0071] 在优选的实施方案中,本发明的组合物包含活细菌。在优选的实施方案中,本发明的组合物包含呈活性状态、优选冻干的活细菌。实施例证实,活细菌的施用比热杀灭的细菌或上清液更有效。

[0072] 在优选的实施方案中,本发明的细菌激活TLR2,例如在如实施例中所描述的HEK-TLR2报告基因测定中。在其他实施方案中,本发明的细菌不激活TLR4、TLR5或TLR9。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含激活TLR2的细菌,并且用作疫苗佐剂。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含激活TLR2的细菌,并且用于增强细胞疗法。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含激活TLR2的细菌,并且用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

[0073] 在优选的实施方案中,本发明的细菌激活NF $\kappa$ B,例如在如实施例中所描述的THP-1-NF $\kappa$ B报告基因测定中。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含激活NF $\kappa$ B的细菌,并且用作疫苗佐剂。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含激活NF $\kappa$ B的细菌,并且用于增强细胞疗法。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含激活NF $\kappa$ B的细菌,并且用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

[0074] 在某些实施方案中,本发明的细菌与对数后期相比在静止期以更高水平表达一种或多种选自以下组成的组的基因:oppA、支链淀粉酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin) 和

tadA,例如,当在液体培养中生长时,如实施例中所示。实施例证实这些基因可介导有用的治疗作用。

[0075] 在某些实施方案中,本发明的细菌与静止期相比在对数后期以更高水平表达一种或多种选自以下组成的组的基因:eftU、烯醇酶和pGTF,例如,当在液体培养中生长时,如实施例中所示。实施例证实这些基因可介导有用的治疗作用。

[0076] 在某些实施方案中,本发明的细菌与对数后期相比在与肠上皮细胞接触后以更高水平表达一种或多种选自以下组成的组的基因:烯醇酶、pGTF、oppA、丝氨酸蛋白酶抑制剂和转醛醇酶,例如,当在液体培养中生长时,如实施例中所示。实施例证实这些基因可介导有用的治疗作用。

[0077] 在某些实施方案中,本发明的细菌表达支链淀粉酶、NlpC/P60家族蛋白质、FtsI、转醛醇酶、GAPDH、DnaK、GroEL和烯醇酶中的一种或多种并将其分泌至培养上清液中。在某些实施方案中,本发明的细菌表达表2中的蛋白质中的一种或多种(例如2种、3种、5种、10种、15种或全部)并将其分泌至培养上清液中。实施例证实这些蛋白质可介导有用的治疗作用。

[0078] 在某些实施方案中,本发明的细菌在其细胞表面上表达以下中的一种或多种:支链淀粉酶、I型聚酮合酶、转醛醇酶、GAPDH、DnaK、GroEL、烯醇酶和Eftu。在某些实施方案中,本发明的细菌表达表3中的蛋白质中的一种或多种(例如2种、3种、5种、6种、8种或全部)并将其分泌至培养上清液中。实施例证实这些蛋白质可介导有用的治疗作用。

[0079] 在某些实施方案中,本发明的细菌表达支链淀粉酶。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含表达支链淀粉酶的细菌,并且用作疫苗佐剂。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含表达支链淀粉酶的细菌,并且用于增强细胞疗法。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含表达支链淀粉酶的细菌,并且用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

[0080] 在优选的实施方案中,本发明的细菌包含完整的EPS基因座。实施例证实完整EPS基因座可能有助于增加治疗效力。在这些实施方案中,EPS基因座包含引发(priming)糖基转移酶、一种或多种额外糖基转移酶、焦磷酸噻胺结合蛋白、跨膜蛋白、翻转酶和链长决定子。在优选的实施方案中,EPS基因座的大小超过30Kb(包括侧接假设蛋白)。实施例证实这样的EPS基因座对于免疫刺激功能足够。在优选的实施方案中,EPS基因座的大小为25-60Kb、30-50Kb、30-40Kb、30-35Kb或30-32Kb。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含具有完整EPS基因座的细菌,并且用作疫苗佐剂。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含具有完整EPS基因座的细菌,并且用于增强细胞疗法。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含具有完整EPS基因座的细菌,并且用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

[0081] 在优选的实施方案中,本发明的细菌具有EPS基因座,所述EPS基因座与菌株MRX004的EPS基因座具有高水平的核苷酸同一性,例如至少90%、92%、94%、96%、98%、99%或99.5%的核苷酸同一性,例如如实施例中所确定。实施例证实菌株MRX004的EPS基因座在遗传上不同于其他短双歧杆菌菌株,并且可能有助于效力和治疗效用。

[0082] 在优选的实施方案中,本发明的细菌在其表面上带有EPS。实施例证实EPS调节细胞表面上蛋白质的暴露。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含在表面上带有EPS的细菌,并且用作疫苗佐剂。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含在表面上带有

EPS的细菌,并且用于增强细胞疗法。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物包含在表面上带有EPS的细菌,并且用于治疗、预防或延迟免疫衰老。

[0083] 优选地,用于本发明中的细菌能够使棉子糖发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时。实施例表明,最有效的短双歧杆菌菌株能够使棉子糖发酵,并且其参与EPS产生。在其他优选的实施方案中,用于本发明中的细菌能够使以下中的一种或多种(例如2种、3种、4种、5种、6种或全部7种)发酵: $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\alpha$ -阿拉伯糖、甘露糖和棉子糖,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时。在其他优选的实施方案中,用于本发明中的细菌能够使以下中的一种或多种(例如2种、3种、4种、5种、6种或全部7种)发酵:精氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、酪氨酸、甘氨酸和组氨酸。可使用本领域已知的任何合适的测定来评估细菌使碳水化合物源或氨基酸发酵的能力。优选地,使用Rapid ID 32A分析(优选使用来自bioMérieux的Rapid ID 32A系统)。

[0084] 优选地,用于本发明中的细菌展现出 $\beta$ -葡萄糖苷酶的中间发酵或 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵,或者更优选 $\beta$ -葡萄糖苷酶的中间发酵和 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时,以及例如当进行Rapid ID 32A分析时。实施例证实短双歧杆菌菌株MRX004和测试3都具有有用的活性,并且都展现出 $\beta$ -葡萄糖苷酶和 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵。在特别优选的实施方案中,用于本发明中的细菌展现出 $\beta$ -葡萄糖苷酶的中间发酵、 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵和阿拉伯糖的阳性发酵。

[0085] 优选地,用于本发明中的细菌未展现出N-乙酰基- $\beta$ -氨基葡萄糖苷酶的阳性发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时,以及例如当进行Rapid ID 32A分析时。细菌可能仅展现出N-乙酰基- $\beta$ -氨基葡萄糖苷酶的中间发酵或不发酵。实施例证实短双歧杆菌菌株MRX004和测试2都具有有用的活性,并且都未展现出N-乙酰基- $\beta$ -氨基葡萄糖苷酶的阳性发酵。在特别优选的实施方案中,用于本发明中的细菌未展现出N-乙酰基- $\beta$ -氨基葡萄糖苷酶的阳性发酵,并且确实展现出阿拉伯糖的阳性发酵。

[0086] 优选地,用于本发明中的细菌展现出 $\alpha$ -半乳糖苷酶的中间发酵或 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵,或者更优选 $\alpha$ -半乳糖苷酶的中间发酵和 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时,以及例如当进行Rapid ID 32A分析时。实施例证实短双歧杆菌菌株MRX004和测试8都具有有用的活性,并且都展现出 $\alpha$ -半乳糖苷酶和 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵。在特别优选的实施方案中,用于本发明中的细菌展现出 $\alpha$ -半乳糖苷酶的中间发酵和 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵,以及阿拉伯糖的阳性发酵。

[0087] 在替代实施方案中,用于本发明中的细菌使丝氨酸芳基酰胺酶发酵,而不使亮氨酸甘氨酸芳基酰胺酶发酵,并且不使丙氨酸芳基酰胺酶发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时,以及例如当进行Rapid ID 32A分析时。实施例证实短双歧杆菌菌株测试11和测试12都具有有用的活性,并且都使丝氨酸芳基酰胺酶发酵,而不使亮氨酸甘氨酸芳基酰胺酶发酵,并且不使丙氨酸芳基酰胺酶发酵。在特别优选的实施方案中,用于本发明中的细菌也使阿拉伯糖发酵。

[0088] 在替代实施方案中,用于本发明中的细菌展现出丝氨酸芳基酰胺酶的中间发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时,以及例如当进行Rapid ID 32A分析时。实施例证实短双歧杆菌菌株测试3和测试7都具有有效的抗微生物活

性,并且都展现出丝氨酸芳基酰胺酶的中间发酵。在特别优选的实施方案中,用于本发明中的细菌也使阿拉伯糖发酵。

[0089] 可使用本领域已知的任何合适的测定来评估细菌使碳水化合物源或氨基酸发酵的能力。优选地,使用Rapid ID 32A分析(优选使用来自bioMérieux的Rapid ID 32A系统)。

[0090] 优选地,当进行使用标准条件(例如用于实施例10中的标准条件)的脉冲场凝胶电泳时,用于本发明中的细菌产生图24或图25中针对MRX004所示的图谱。

[0091] 在替代性优选的实施方案中,用于本发明中的细菌能够使以下中的一种或多种(例如2种、3种、4种、5种、10种、15种、20种、25种或全部)发酵:淀粉(amidon/starch)、苦杏仁苷、熊果苷、纤维二糖、七叶苷、半乳糖、龙胆二糖、葡萄糖、糖原、果糖、岩藻糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、甘露糖醇、蜜二糖、松三糖、甲基 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷、N-乙酰氨基葡萄糖、核糖、蔗糖(saccharose/sucrose)、水杨苷、山梨糖醇、海藻糖、松二糖和木糖醇。在这些实施方案中,可使用本领域已知的任何合适的测定来评估细菌使碳水化合物源发酵的能力。优选地,使用来自bioMérieux的API 50 CH分析。

[0092] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含一种短双歧杆菌菌株,所述菌株展现出对人类细胞的附着减少,特别是当在YCFA培养基中测试时,特别是在实施例5的条件下。

[0093] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含以登录号NCIMB 42380保藏的细菌的生物型。也预期作为以登录号NCIMB 42380保藏的细菌的生物型的细菌菌株有效刺激免疫系统。生物型将具有与原始NCIMB 42380菌株相当的免疫调节活性。生物型为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。

[0094] 生物型将引发与实施例中所示作用相当的对免疫系统的作用,其可通过使用实施例中所述的培养和施用方案来鉴定。特别是,生物型将引发与NCIMB 42380相当的对T细胞和细胞因子的作用。

[0095] 作为以登录号NCIMB 42380保藏并且适用于本发明中的细菌的生物型的菌株可通过对以登录号NCIMB 42380保藏的细菌的其他核苷酸序列进行测序来鉴定。例如,基本上全基因组可进行测序,并且用于本发明中的生物型菌株可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。例如,在一些实施方案中,生物型菌株在其基因组的至少98%上具有至少98%序列同一性,或在其基因组的99%上具有至少99%序列同一性。用于鉴定生物型菌株的其他合适序列可包括hsp60或重复序列,例如BOX、ERIC、(GTG)<sub>5</sub>或REP [25]。

[0096] 生物型菌株可具有与以登录号NCIMB 42380保藏的细菌的相应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的这些序列。在一些实施方案中,生物型菌株可具有与以登录号NCIMB 42380保藏的细菌的相应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的16S rRNA序列。在一些实施方案中,生物型菌株可包含与SEQ ID NO:1至少99%同一(例如至少99.5%或至少99.9%同一)的16S rRNA序列。在一些实施方案中,生物型菌株具有SEQ ID NO:1的16S rRNA序列。

[0097] 或者,作为以登录号NCIMB 42380保藏的细菌的生物型并且适用于本发明中的菌株可通过使用登录号NCIMB 42380保藏物以及限制片段分析和/或PCR分析,例如通过使用荧光扩增片段长度多型性(fluorescent amplified fragment length polymorphism,

FAFLP) 和重复DNA元件(rep)-PCR指纹或蛋白质剖析(profiling)或部分16S或23s rDNA测序来鉴定。在优选的实施方案中,这些技术可用于鉴定其他短双歧杆菌菌株。

[0098] 在某些实施方案中,作为以登录号NCIMB 42380保藏的细菌的生物型并且适用于本发明中的菌株是当通过扩增核糖体DNA限制分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis,ARDRA)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[26])时提供与以登录号NCIMB 42380保藏的细菌相同的模式的菌株。或者,将生物型菌株鉴定为具有与以登录号NCIMB 42380保藏的细菌相同的碳水化合物发酵模式的菌株。

[0099] 可用于本发明的组合物和方法的其他短双歧杆菌菌株(例如以登录号NCIMB 42380保藏的细菌的生物型)可使用任何适当方法或策略(包括实施例中所测定的测定)鉴定。特别是,具有与以登录号NCIMB 42380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中。

[0100] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含以登录号NCIMB 42380保藏的细菌的衍生物。以登录号NCIMB 42380保藏的菌株的衍生物可为子代菌株(后代)或从原始培养(亚克隆)的菌株。本发明菌株的衍生物可例如在基因水平下修饰,而不消除生物活性。特别是,本发明的衍生菌株有治疗活性。衍生菌株将具有与原始NCIMB 42380菌株相当的免疫调节活性。衍生菌株将具有与原始NCIMB 42380菌株相当的微生物群调节活性。因此,衍生菌株将有效刺激免疫系统。

[0101] 衍生菌株将引发与实施例中所示作用相当的对癌症模型的作用,其可通过使用实施例中所测定的培养和施用方案来鉴定。特别是,衍生菌株将引发与以登录号NCIMB 42380保藏的细菌相当的对细胞因子和基因表达的作用。特别是,衍生菌株将引发与以登录号NCIMB 42380保藏的细菌相当的对免疫刺激的作用。NCIMB 42380菌株的衍生物一般将为NCIMB 42380菌株的生物型。

[0102] 细菌菌株也可为具有与以登录号NCIMB 42380保藏的菌株相同的安全性和治疗功效特性的菌株,并且本发明涵盖这些细胞。因此,所述组合物可包含短双歧杆菌菌株,所述短双歧杆菌菌株并非以登录号NCIMB 42380保藏的菌株,但具有与以登录号NCIMB 42380保藏的菌株相同的安全性和治疗功效特性。可例如通过测试菌株对抗生素的抗性(例如区分对抗生素的固有抗性和可传递抗性)来确定菌株的安全性特性。也可通过评价体外菌株的病原性质(例如毒素产生水平)来确定菌株的安全性特性。其他安全性测试包括测试大鼠和小鼠模型中细菌菌株的急性或慢性毒性。可通过使用相关模型在体外和体内对细菌菌株进行功能表征来确定菌株的治疗功效。

[0103] 在优选的实施方案中,本发明组合物中的细菌菌株可存活并且能够部分或全部定殖肠部。

[0104] 在一个优选的实施方案中,用于本发明中的细菌菌株与一种或多种于图9中列出的短双歧杆菌菌株相比,在YCFA中对人类肠上皮细胞、特别是Caco-2细胞的粘附性更低(例如粘附性小于总培养物的1%,例如优选小于0.5%或小于0.3%),并且与一种或多种于图9中列出的短双歧杆菌菌株相比,产生更多结合的表面胞外多糖。

[0105] 在某些优选的实施方案中,用于本发明中的细菌菌株能够使多糖棉子糖发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时。

[0106] 在某些实施方案中,与双歧杆菌、特别是短双歧杆菌相比,用于本发明中的细菌菌株使 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和/或 $\beta$ -葡萄糖苷酶发酵的能力降低,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时。

[0107] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株包含一种或多种于W02016/203223(其通过引用并入本文)的表1中列出的基因,例如5种、10种、20种、50种或所有于W02016/203223的表1中的基因。在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株包含一种或多种于W02016/203223的表1中列出的以单下划线突出显示的基因,例如预测ECF转运蛋白的激励模块(energizing module)的跨膜组分BL0694和/或预测ECF转运蛋白的激励模块的复制ATP酶组分BL0693。在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株包含一种或多种于W02016/203223的表1中列出的以双下划线并以粗体突出显示的基因,例如1种、2种、3种、4种或5种选自以下的基因:麦芽糊精葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20)、推定半乳糖苷酶、纤维素合酶(形成UDP)(EC 2.4.1.12)、几丁质酶(EC 3.2.1.14)和感受盒/GGDEF家族蛋白质。在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株包含一种或多种于W02016/203223的表1中列出的以斜体突出显示的基因,例如1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种或9种选自以下的基因: $\omega$ -3多不饱和脂肪酸合酶亚基PfaA、I型聚酮合酶、未知功能的推定糖基水解酶(DUF1680)、生物素ECF转运蛋白的激励模块的ATP酶组分BioM、转运阳离子的ATP酶E1-E2家族、核糖ABC转运系统通透酶蛋白质RbsC(TC 3.A.1.2.1)、核糖ABC转运系统ATP结合蛋白RbsA(TC 3.A.1.2.1)、3'-5'寡聚核糖核酸酶(orn)、与放线杆菌属(*Actinobacillus*)蛋白质相关的膜蛋白(1944168)。

[0108] 在优选的实施方案中,用于本发明中的细菌菌株包含一种或多种(例如5种、10种、15种、20种、25种、30种、40种、45种、50种或所有)选自以下的基因:2-琥珀酰基-5-烯醇丙酮酰基-6-羧基-3-环己烯-1-羧酸合酶(EC 2.2.1.9);3'-5'寡聚核糖核酸酶(orn); $\alpha$ -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22);ECF转运蛋白的通用激励模块的ATP酶组分;Q核昔(queuosine)调控的ECF转运蛋白的激励模块的ATP酶组分STY3233;ATP依赖性DNA解旋酶recG(EC 3.6.1.-); $\beta$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21);纤维素合酶(形成UDP)(EC 2.4.1.12);几丁质酶(EC 3.2.1.14);COG1309:转录调控子;D-丙胺酰基-D-丙氨酸羧肽酶(EC 3.4.16.4);预测ECF转运蛋白的激励模块的复制ATP酶组分BL0693;果糖激酶(EC 2.7.1.4);葡萄糖/甘露糖:H<sup>+</sup>同向转运蛋白GlcP;糖基转移酶(EC 2.4.1.-);GMP合酶[水解谷氨酰胺](EC 6.3.5.2);与靛玉苷(indigoidine)合酶indA、PfkB家族激酶成簇的假设糖激酶;偏好肌苷-尿苷的核苷水解酶(EC 3.2.2.1);LSU核糖体蛋白L31p/LSU核糖体蛋白L31p,不依赖于锌;LSU核糖体蛋白L33p/LSU核糖体蛋白L33p,不依赖于锌;麦芽糊精葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20);与放线杆菌属蛋白质有关的膜蛋白(1944168);膜结合裂解性胞壁质转糖苷酶D前体(EC 3.2.1.-);甲基转移酶(EC 2.1.1.-);NADH依赖性丁醇脱氢酶A(EC 1.1.1.-);磷酸乙醇酸磷酸酶(EC 3.1.3.18);磷酸核糖基邻氨基苯甲酸异构酶(EC 5.3.1.24);未知功能的假定糖基水解酶(DUF1680);含鼠李糖的多糖易位通透酶;核糖激酶(EC 2.7.1.15);核糖ABC转运系统ATP结合蛋白RbsA(TC 3.A.1.2.1);核糖ABC转运系统ATP结合蛋白RbsA(TC 3.A.1.2.1);核糖ABC转运系统高亲和性通透酶RbsD(TC 3.A.1.2.1);核糖ABC转运系统周质核糖结合蛋白RbsB(TC 3.A.1.2.1);核糖ABC转运系统通透酶蛋白质RbsC(TC 3.A.1.2.1);核糖ABC转运系统通透酶蛋白质RbsC(TC 3.A.1.2.1);山梨糖醇脱氢酶(EC 1.1.1.14);SSU核糖体蛋白S14p

(S29e)/SSU核糖体蛋白S14p(S29e),不依赖于锌;Q核苷调控的ECF转运蛋白的底物特异性组分STY3230;蔗糖-6-磷酸水解酶(EC 3.2.1.B3);磷壁酸输出ATP结合蛋白TagH(EC 3.6.3.40);预测ECF转运蛋白的激励模块的跨膜组分BL0694;Q核苷调控的ECF转运蛋白的激励模块的跨膜组分STY3231;与HrtAB转运蛋白共定位的双组分反应调控物;I型限制修饰系统DNA-甲基转移酶亚基M(EC 2.1.1.72);I型限制修饰系统限制性亚基R(EC 3.1.21.3);I型限制修饰系统特异性亚基S(EC 3.1.21.3);I型限制修饰系统特异性亚基S(EC 3.1.21.3);木糖醇脱氢酶(EC 1.1.1.9);和木糖ABC转运蛋白周质木糖结合蛋白Xy1F。在优选的实施方案中,用于本发明中的细菌菌株包含一种或多种(例如5种、10种、15种、20种、25种、30种或35种或所有)于前一句中列出并且未在W02016/203223的表1中突出显示的基因。

[0109] 治疗用途

[0110] 刺激免疫系统

[0111] 实施例显示本发明的组合物的施用可引起免疫刺激。由于本发明的组合物的施用显示具有免疫刺激作用,因此本发明的组合物可用于治疗疾病,特别是特征在于免疫活化降低的疾病和可通过增加免疫反应来治疗的疾病。在某些实施方案中,本发明的组合物用于刺激免疫系统。在某些实施方案中,本发明的组合物通过刺激免疫系统而用于治疗疾病。在某些实施方案中,本发明的组合物用于促进免疫反应。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于任何这类用途。

[0112] 免疫缺陷是患者的免疫系统受损或完全缺失的状态。免疫缺陷疾病是特征在于免疫活化降低的疾病的实例,并且其中刺激患者的免疫系统以治疗疾病将为有利的。在一些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防免疫缺陷疾病。

[0113] 存在两种类型的免疫缺陷疾病。原发性免疫缺陷疾病是由遗传突变引起的遗传性免疫病症,所述遗传突变通常在出生时存在并且在儿童期诊断。继发性免疫缺陷疾病是由疾病或环境来源(例如有毒化学品)引起的后天免疫缺陷。在一些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防原发性免疫缺陷疾病或继发性免疫缺陷疾病。

[0114] 原发性免疫缺陷病症的实例包括X连锁无丙种球蛋白血症(XLA)、慢性肉芽肿病(CGD)、常见可变量免疫缺陷(CVID)和重症联合免疫缺陷(SCID)(也称为淋巴细胞缺乏或“气泡中的男孩(boy in a bubble)”疾病)。继发性免疫缺陷病症可由例如重度烧伤、化疗、辐射、糖尿病、营养不良引起。继发性免疫缺陷病症的实例包括AIDS,免疫系统癌症如白血病,免疫复合体性疾病如病毒性肝炎多发性骨髓瘤[27]。干扰素- $\gamma$ 是经批准用于免疫缺陷疾病CGD的疗法[28]。实施例证实本发明的组合物可增加IFN- $\gamma$ 的产生,因此本发明的组合物可特别有效地治疗免疫缺陷疾病,包括原发性和继发性免疫缺陷疾病。

[0115] 在优选的实施方案中,本发明的组合物通过刺激TLR2而用于刺激免疫系统。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在疾病的治疗中刺激TLR2。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗与TLR2活性降低相关的疾病,或用于治疗鉴定为具有降低的TLR2活性的患者。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于任何这类用途。

[0116] 在某些实施方案中,用本发明的组合物治疗驱动Th1细胞反应。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在疾病的治疗中驱动Th1细胞反应。在某些实施方案中,本发明的

组合物用于治疗与Th1细胞活性降低相关的疾病,或用于治疗鉴定为具有降低的Th1细胞活性的患者。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于任何这类用途。

[0117] 在优选的实施方案中,本发明的组合物通过激活NF $\kappa$ B而用于刺激免疫系统。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在疾病的治疗中刺激NF $\kappa$ B。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗与NF $\kappa$ B活性降低相关的疾病,或用于治疗鉴定为具有降低的NF $\kappa$ B活性的患者。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于任何这类用途。

[0118] 本发明的组合物可用于治疗特征在于活化CD8<sup>+</sup>细胞的水平降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加CD8<sup>+</sup>细胞的数目或水平而用于刺激免疫反应。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加CD8<sup>+</sup>细胞的活性或水平而用于治疗疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过激活CD8<sup>+</sup>细胞而用于刺激免疫反应。

[0119] 本发明的组合物可用于治疗特征在于B细胞的水平降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加B细胞的活性或水平而用于刺激免疫反应。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加B细胞的活性或水平而用于治疗疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过激活B细胞而用于刺激免疫反应。

[0120] 本发明的组合物可用于治疗特征在于活化CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞的水平降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞的活性或水平而用于刺激免疫反应。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞的活性或水平而用于治疗疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过激活CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞而用于刺激免疫反应。

[0121] 本发明的组合物可用于治疗特征在于B细胞的数目或百分比降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防特征在于B细胞的数目或百分比降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加细胞群体中B细胞的数目或百分比而用于治疗或预防疾病,其中B细胞的数目或百分比增加引起免疫刺激。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加B细胞的数目或百分比而用于刺激免疫反应。

[0122] 实施例显示本发明的组合物的施用可引起例如促炎性细胞因子的促炎性分子的表达增加。在施用本发明的组合物后显示表达水平增加的促炎性分子的实例包括IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IFN  $\gamma$  和IL-17 $\alpha$ 。由于本发明的组合物的施用显示增加促炎性分子的表达,因此本发明的组合物可用于治疗特征在于例如促炎性细胞因子的促炎性分子的表达降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防特征在于促炎性分子的表达和/或活性降低的疾病,特别是特征在于促炎性细胞因子的表达和/或活性降低的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防特征在于IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IL-4和/或IFN  $\gamma$  的表达和/或活性降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IL-4和/或IFN  $\gamma$  的表达和/或活性而用于治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IL-4和/或IFN  $\gamma$  的表达和/或活性而用于促进免疫反应。在一个特定实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防特征在于IL-17 $\alpha$  IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IFN  $\gamma$  和/或IL-17 $\alpha$ 的表达和/或活性降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IFN  $\gamma$  和/或IL-17 $\alpha$ 的表达和/或活性而用于治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IL-

4IFN  $\gamma$  和/或IL-17 $\alpha$ 的表达和/或活性而用于促进免疫反应。

[0123] 实施例也显示本发明的组合物的施用可引起IL-1 $\beta$ 的表达的增加。IL-1 $\beta$ 是促炎性细胞因子[29]。IL-1 $\beta$ 的产生和分泌由发炎体调控,发炎体是与炎性反应的激活相关的蛋白质复合物[30]。由于本发明的组合物的施用显示增加IL-1 $\beta$ 的表达,因此本发明的组合物可用于治疗特征在于IL-1 $\beta$ 的表达降低的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防特征在于IL-1 $\beta$ 的表达和/或活性降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-1 $\beta$ 的表达和/或活性而用于治疗或预防疾病。

[0124] 实施例显示本发明的组合物的施用可引起肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达增加。TNF- $\alpha$ 是一种促炎性细胞因子,已知其参与促进细胞死亡的各种信号通路。TNF- $\alpha$ 通过结合至其同源受体TNFR-1而起始细胞凋亡,这引起细胞凋亡途径中切割事件的级联[31]。TNF- $\alpha$ 也可经由RIP激酶依赖性机制引起坏死[32]。由于本发明的组合物的施用显示增加TNF- $\alpha$ 的表达,因此本发明的组合物可用于治疗疾病,特别是用于治疗或预防特征在于TNF- $\alpha$ 的表达降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗特征在于TNF- $\alpha$ 的表达降低的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防特征在于TNF- $\alpha$ 的表达和/或活性降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加TNF- $\alpha$ 的表达和/或活性而可用于治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加TNF- $\alpha$ 的表达和/或活性而用于促进免疫反应。

[0125] 由于本发明的组合物的施用显示增加IL-4的表达,因此本发明的组合物可用于治疗疾病,特别是用于治疗或预防特征在于IL-4的表达降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗特征在于IL-4的表达降低的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防特征在于IL-4的表达和/或活性降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-4的表达和/或活性而可用于治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-4的表达和/或活性而用于促进免疫反应。

[0126] 由于本发明的组合物的施用显示增加IL-17 $\alpha$ 的表达,因此本发明的组合物可用于治疗疾病,特别是用于治疗或预防特征在于IL-17 $\alpha$ 的表达降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗特征在于IL-17 $\alpha$ 的表达降低的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防特征在于IL-17 $\alpha$ 的表达和/或活性降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-17 $\alpha$ 的表达和/或活性而可用于治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-17 $\alpha$ 的表达和/或活性而用于促进免疫反应。

[0127] 由于本发明的组合物的施用显示增加IL-12p70的表达,因此本发明的组合物可用于治疗疾病,特别是用于治疗或预防特征在于IL-12p70的表达降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗特征在于IL-12p70的表达降低的疾病。在一个特定的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防特征在于IL-12p70的表达和/或活性降低的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-12p70的表达和/或活性而可用于治疗或预防疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-12p70的表达和/或活性而用于促进免疫反应。

[0128] 在某些实施方案中,有待通过本发明的组合物治疗的疾病不是癌症。

[0129] 在某些实施方案中,有待通过本发明的组合物治疗的疾病不由IL-17或Th17途径介导。在某些实施方案中,本发明的组合物增加IL-17和/或Th17途径的表达或活性。

[0130] 在本发明的优选的实施方案中,施用本发明组合物的受试者没有正在服用亚油酸补充剂和/或不具有富含亚油酸的饮食。另外或可替代地,本发明的组合物不包含亚油酸。

[0131] 在实施方案中,本发明的组合物不包含 $\beta$ -低聚半乳糖A和/或B。

[0132] 需要免疫刺激的患者可能处于细菌感染风险之下。实施例证实本发明的组合物具有抗微生物活性。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物用于刺激免疫系统和治疗或预防细菌感染。在某些实施方案中,本发明的组合物通过刺激免疫系统和抑制细菌感染的生长而用于治疗细菌感染。在某些实施方案中,本发明的组合物用于促进针对病原细菌的免疫反应和抑制细菌生长。优选地,细菌感染是胃肠道细菌感染。优选地,细菌感染是革兰氏阴性细菌感染。

[0133] 实施例也证实本发明的组合物促进T辅助细胞和细胞毒性T淋巴细胞的分化。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物用于刺激T辅助细胞和/或细胞毒性T淋巴细胞的分化。

#### [0134] 作为疫苗佐剂的用途

[0135] 实施例显示本发明的组合物的施用刺激免疫系统并且可引起肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达和TLR2的活化增加。已知TNF- $\alpha$ 对疫苗反应而言是重要的。例如,已证明TNF- $\alpha$ 是老年群体的流感疫苗接种中的高效疫苗反应所需的[33]。类似地,TLR2是疫苗佐剂改进反应的重要靶标[34]。由于本发明的组合物的施用显示增加TNF- $\alpha$ 表达和TLR2活性,因此本发明的组合物可用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加TNF- $\alpha$ 的水平和/或活性而用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加TLR2的水平和/或活性而用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物用作疫苗佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物在流感疗法中用作疫苗佐剂。在某些实施方案中,本发明的组合物用于增强针对抗原的免疫反应。在某些实施方案中,本发明提供了一种组合物,其与抗原组合施用。在某些实施方案中,本发明的组合物用于在即将接种疫苗之前或之后立即施用于患者。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于作为疫苗佐剂的任何这类用途。

[0136] 实施例证实本发明的细菌激活TLR2。TLR激动剂特别是在老年群体中作为一系列抗原类型内的疫苗佐剂处于开发中[35]。因此,本发明的组合物可用作疫苗佐剂,特别是用于施用于可能有免疫系统活性降低的老年患者(例如,年龄超过40岁、50岁、60岁、70岁或80岁)的疫苗。TLR2信号传导也在年龄相关的先天免疫反应中起关键作用[36]。在某些实施方案中,组合物用于增强先天免疫反应。尽管TLR2激动剂作为疫苗佐剂正处于开发中,但这些都来自已知病原体和/或是合成的。相比之下,本发明的组合物包含共生细菌。

[0137] 实施例也显示本发明的组合物的施用可引起IL-1 $\beta$ 的表达的增加。Li等人[37]证明佐剂氢氧化铝激活IL-1 $\beta$ 的分泌,并且提出IL- $\beta$ 本身可充当佐剂。由于本发明的组合物的施用显示增加IL-1 $\beta$ 表达,因此本发明的组合物可用作疫苗佐剂。

[0138] 实施例证实本发明的组合物可增加IFN  $\gamma$  水平并促进Th1细胞反应,这些都与针对抗原的抗体反应增加相关[38]。在某些实施方案中,本发明的组合物用于促进针对抗原、特别是病原性或癌症抗原的抗体反应。此外,它是接受研究性疟疾疫苗的志愿者中经疫苗诱导的T细胞反应的IFN-  $\gamma$  量度[39]。在某些实施方案中,本发明的组合物用于促进针对抗原、特别是病原性或癌症抗原的T细胞反应。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加

IFN- $\gamma$  的水平和/或活性而用作疫苗佐剂。在某些实施方案中,组合物用于防止疟疾。

[0139] 实施例也显示本发明的组合物的施用可引起IL-12p70的表达或水平的增加。这种作用已与疫苗佐剂效率相关联,并且已提出将IL-12作为佐剂本身[40],这表明本发明的组合物将有效作为佐剂。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加IL-12p70的水平 and/或活性而用作疫苗佐剂。

[0140] 在一些实施方案中,当用作疫苗佐剂时,本发明的组合物将独自施用以向分别施用于患者的抗原提供佐剂作用。在某些实施方案中,本发明的组合物是经口施用的,而抗原是经胃肠外注射的。

[0141] 本发明的组合物可用于增强对任何有用抗原的免疫反应。用于本发明的示例性抗原包括:病毒抗原,例如病毒表面蛋白;细菌抗原,例如蛋白质和/或糖抗原;真菌抗原;寄生虫抗原;和肿瘤抗原。本发明特别可用于针对以下的疫苗:流感病毒、HIV、钩虫、乙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒、狂犬病、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、披衣菌属(*chlamydia*)、SARS冠状病毒、水痘带状疱疹病毒、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein Barr virus)、人类乳头状瘤病毒等。用于本发明的其他抗原包括糖蛋白和脂聚糖抗原、古细菌抗原、黑素瘤抗原E (MAGE)、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、HER2、唾液酸基-Tn (STn)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、威尔姆氏肿瘤基因(Wilms tumour gene) (WT1)、CA-125、前列腺特异性抗原(PSA)、爱泼斯坦-巴尔病毒抗原、新抗原、致癌蛋白、 $\beta$ -淀粉粉状蛋白、 $\tau$ 蛋白、PCSK9和成瘾物质,例如烟碱、酒精或鸦片剂。

[0142] 用于本发明的优选抗原包括病原体抗原和肿瘤抗原。抗原将引发对抗原特异的免疫反应,这将有效防止病原体感染或攻击肿瘤。抗原可为例如肽或多糖。

[0143] 本发明还提供了以下各者在制造用于提高患者的免疫反应的药物中的用途:(i) 抗原的水性制剂;和(ii) 包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物。优选地,细菌菌株是以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型。

[0144] 通过这些方法和用途提高的免疫反应一般包括抗体反应,优选保护性抗体反应。

[0145] 在一些实施方案中,短双歧杆菌菌种的细菌菌株被工程改造以呈递抗原。在本发明的细菌菌株上呈递抗原可最大化免疫刺激活性并进一步增强针对所述抗原产生的保护性免疫反应。另外,以这种方式制造和递送包含抗原和本发明的细菌的治疗剂可比抗原和包含细菌菌株的组合物中的每一者分开制造和施用更高效和有效。因此,在一些实施方案中,本发明提供了一种包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的组合物,所述细菌菌株在例如其细胞表面上呈递抗原。在一些实施方案中,包含呈递抗原的细菌菌株的组合物用作疫苗抗原。在一些实施方案中,抗原来源于HIV、钩虫、乙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒、狂犬病、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒、金黄色葡萄球菌、披衣菌属、SARS冠状病毒、水痘带状疱疹病毒、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、结核分枝杆菌、炭疽芽孢杆菌、爱泼斯坦-巴尔病毒或人类乳头状瘤病毒。在一些实施方案中,抗原是糖蛋白抗原、脂聚糖抗原、古细菌抗原、黑素瘤抗原E (MAGE)、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、HER2、唾液酸基-Tn (STn)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、威尔姆氏肿瘤基因(WT1)、CA-125、前列腺特异性抗原(PSA)、爱泼斯坦-巴尔病毒抗原、新抗原、致癌蛋白、 $\beta$ -淀粉粉状蛋白、 $\tau$ 蛋白、PCSK9或成瘾物质,例如酒精、鸦片剂等。

[0146] 在一些实施方案中,本发明的细菌表达一种或多种抗原。一般来说,抗原将是重组表达的并且对于本发明的细菌而言将是异源的。因此,本发明提供了表达异源抗原的短双歧杆菌菌种的细菌菌株。抗原可为与细菌同源的一种或多种多肽一起表达的融合多肽的一部分。在一些实施方案中,细菌将抗原表达为非融合多肽。在一些实施方案中,本发明提供了一种包含短双歧杆菌菌种的细菌菌株的细胞的组合物,其中所述细胞表达异源抗原。在一些实施方案中,组合物用作疫苗。在一些实施方案中,本发明提供了短双歧杆菌菌种的细菌菌株的细胞,其中所述细胞表达异源抗原。在一些实施方案中,细胞用作疫苗。

[0147] 用于本发明的示例性抗原包括:病毒抗原,例如病毒表面蛋白;细菌抗原,例如蛋白质和/或糖抗原;真菌抗原;寄生虫抗原;和肿瘤抗原。用于在短双歧杆菌菌种的细菌菌株中表达的其他抗原包括糖蛋白和脂聚糖抗原、古细菌抗原、黑素瘤抗原E (MAGE)、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、HER2、唾液酸基-Tn (STn)、人类端粒酶逆转录酶(hTERT)、威尔姆氏肿瘤基因(WT1)、CA-125、前列腺特异性抗原(PSA)、爱泼斯坦-巴尔病毒抗原、新抗原、致癌蛋白、 $\beta$ -淀粉状蛋白、 $\tau$ 蛋白、PCSK9和成瘾物质,例如烟碱、酒精、鸦片剂等。

[0148] 本发明也可用于增强针对例如阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease)和其他神经退化性病症的非传染性疾病的疫苗的反应,在这种情况下用于本发明的抗原可为 $\beta$ -淀粉状蛋白或 $\tau$ 蛋白。非传染性疾病的其他这些抗原包括PCSK9(用于治疗升高的胆固醇)。

[0149] 本发明还可用于增强针对例如烟碱、酒精或鸦片剂的成瘾物质的疫苗的反应。

[0150] 实施例也证实本发明的组合物具有抗微生物活性。因此,本发明的组合物可特别有效地用于针对细菌感染、特别是革兰氏阴性细菌感染的疫苗。本发明的组合物可发挥抗细菌感染的抗微生物作用,同时也刺激免疫系统以应对感染。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物治疗细菌感染和预防将来的细菌感染。

#### [0151] 细胞疗法

##### [0152] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)疗法

[0153] 实施例也证明本发明的组合物的施用可引起TLR2的活化的增加。TLR2刺激增强CAR-T疗法的功效[41]。因此,本发明的组合物可用于细胞疗法,特别是CAR-T细胞疗法中。在一个实施方案中,本发明的组合物用于细胞疗法中。在一个实施方案中,本发明的组合物用于CAR-T细胞疗法中。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗慢性淋巴细胞性白血病。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于任何这类用途。

[0154] 实施例也证明本发明的组合物的施用可引起NF $\kappa$ B的活化的增加。NF $\kappa$ B活化提高CAR-T疗法的效力[42]。因此,本发明的组合物可用于细胞疗法、特别是CAR-T细胞疗法中。

[0155] 在某些实施方案中,在CAR-T疗法期间T细胞过继性转移之前,将本发明的组合物施用于患者。

[0156] 在某些实施方案中,在CAR-T疗法期间T细胞过继性转移之后,将本发明的组合物施用于患者。

[0157] 因此,本发明的组合物可用于细胞疗法,特别是用于增强对细胞疗法的反应。

##### [0158] 间充质干细胞(MSC)疗法

[0159] 已报道间充质干细胞(MSC)疗法具有免疫刺激性质。当MSC用LPS处理时,它们上调促炎性细胞因子IL-8,这引起B细胞增殖增加[43]。因此,由于本发明的组合物显示增加B细

胞增殖的表达,因此它们可与MSC细胞疗法组合使用。

#### [0160] 干细胞移植疗法

[0161] 已报道,代替在干细胞移植疗法中使用未分化干细胞,在移植前使干细胞在某种程度上分化可能有益。例如,Heng等人[44]报道干细胞的心肌源性分化通过具有较高植入效率、增强的肌细胞再生和增加的心脏功能恢复而可能有益。此外,研究已证明,用某些共生细菌菌株进行胃肠道定殖可改善同种异体造血细胞移植后的存活[45]。由于本发明的组合物的施用刺激细胞,因此本发明的组合物可用于干细胞移植疗法中的干细胞分化。

#### [0162] 免疫衰老

[0163] Fulop等人[46]确定Treg细胞数目增加和B细胞数目降低与适应性免疫系统的衰老相关。因此,本发明的组合物可用于预防或延迟免疫衰老。在一个实施方案中,本发明的组合物用于预防免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于延迟特征在于Treg细胞数目增加的免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于延迟特征在于B细胞数目降低的免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物用于延迟特征在于Treg细胞数目增加和B细胞数目降低的免疫衰老。在一个实施方案中,本发明的组合物通过降低Treg细胞数目而用于延迟免疫衰老。在一个实施方案中,本发明的组合物通过增加B细胞数目而用于延迟免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物通过降低Treg细胞数目和增加B细胞数目而用于延迟免疫衰老。在一个实施方案中,本发明的组合物用于治疗由免疫衰老引起的疾病。在一个实施方案中,本发明的组合物通过延迟和/或预防免疫衰老而用于治疗衰老相关的疾病。优选地,本发明提供了一种包含以登录号42380保藏在NCIMB的菌株、或其衍生物或生物型的组合物,其用于任何这类用途。

[0164] 此外,已提出疫苗佐剂可克服免疫衰老[47]。由于本发明的组合物适合用作疫苗佐剂,因此本发明的组合物可用于预防或延迟免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物作为疫苗佐剂用于延迟和/或预防免疫衰老。在另一个实施方案中,本发明的组合物用作疫苗佐剂,其中所述组合物延迟和/或预防免疫衰老。

[0165] 与免疫衰老相关的疾病包括心血管疾病、神经退化性疾病如阿尔茨海默病和帕金森氏病(Parkinson's disease)、癌症、2型糖尿病[48]和自身免疫性病症[49]。

[0166] 患有免疫衰老的受试者可能易受细菌感染。实施例显示本发明的组合物具有抗微生物活性。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防展现出免疫衰老的患者(例如老年患者、或年龄超过50岁、55岁、60岁、65岁、70岁或75岁的患者)的细菌感染。

#### [0167] 治疗和预防细菌感染

[0168] 实施例证实短双歧杆菌并且特别是本发明的短双歧杆菌菌株具有有效的抗微生物活性。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防细菌感染。

[0169] 在优选的实施方案中,感染是胃肠感染。已显示短双歧杆菌菌株,并且特别是本发明的短双歧杆菌菌株在施用于胃肠道时具有有效作用(参见实施例和W02016/2032)。在优选的实施方案中,感染是革兰氏阴性细菌感染。在尤其优选的实施方案中,感染是革兰氏阴性胃肠感染,例如幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)、肠炎沙门氏菌、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)或大肠杆菌感染。通常,细菌感染是病原性细菌感染。在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防胃肠大肠杆菌感染。在其他优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防胃肠道沙门氏菌感染。

[0170] 在一些实施方案中,细菌感染属于选自以下组成的清单的属:埃希氏菌属(*Escherichia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是大肠杆菌感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是鼠伤寒沙门氏菌(*S.Typhimurium*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)感染。本发明的组合物显示对这些细菌具有有效的抗微生物活性。

[0171] 在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是沙眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是脑膜炎奈瑟氏球菌感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是铜绿假单胞菌感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是幽门螺旋杆菌感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是肠炎沙门氏菌感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是伤寒沙门氏菌感染。在一些实施方案中,用于治疗或预防的细菌感染是副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi*)感染。这些细菌是革兰氏阴性,因此可能对本发明的组合物敏感,如实施例所示。

[0172] 在一些实施方案中,本发明的组合物用于在细菌感染的治疗中降低细菌活力。本发明的细菌可用于将病原细菌的水平恢复至无症状水平或从受试者中完全消除病原细菌,从而治疗细菌感染,以及减轻与细菌水平升高相关的症状。在一些实施方案中,本发明的组合物用于在细菌感染的预防治疗中抑制细菌的生长。换句话说,组合物可对引起感染的细菌具有细胞生长抑制活性。

[0173] 在某些实施方案中,组合物延迟复发性感染的发作或预防复发性感染。在某些实施方案中,有待治疗的受试者处于患上细菌感染的风险下,例如是无症状带菌者。在其他实施方案中,本发明的组合物用于治疗展现出细菌感染症状的患者。

[0174] 优选地,本发明中用于治疗或预防细菌感染的细菌能够使棉子糖发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时。

[0175] 优选地,本发明中用于治疗或预防细菌感染的细菌展现出β-葡萄糖苷酶的中间发酵或α-阿拉伯糖的中间发酵,或者更优选β-葡萄糖苷酶的中间发酵和α-阿拉伯糖的中间发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时,以及例如当进行Rapid ID 32A分析时。实施例证实短双歧杆菌菌株MRX004和测试3都具有有用的活性,并且都展现出β-葡萄糖苷酶和α-阿拉伯糖的中间发酵。

[0176] 优选地,本发明中用于治疗或预防细菌感染的细菌未展现出N-乙酰基-β-氨基葡萄糖苷酶的阳性发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时,以及例如当进行Rapid ID 32A分析时。细菌可能仅展现出N-乙酰基-β-氨基葡萄糖苷酶的中间发酵或不发酵。实施例证实短双歧杆菌菌株MRX004和测试2都具有有用的活性,并且都未展现出N-乙酰基-β-氨基葡萄糖苷酶的阳性发酵。

[0177] 优选地,本发明中用于治疗或预防细菌感染的细菌展现出α-半乳糖苷酶的中间发酵或α-阿拉伯糖的中间发酵,或者更优选α-半乳糖苷酶的中间发酵和α-阿拉伯糖的中间发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时,以及例如当进行Rapid ID 32A分析时。实施例证实短双歧杆菌菌株MRX004和测试8都具有有用的活性,并且都展现出α-半乳糖苷酶和α-阿拉伯糖的中间发酵。

[0178] 在替代实施方案中,本发明中用于治疗或预防细菌感染的细菌使丝氨酸芳基酰胺酶发酵,而不使亮氨酸甘氨酸芳基酰胺酶发酵,并且不使丙氨酸芳基酰胺酶发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时,以及例如当进行Rapid ID 32A分析时。实施例证实短双歧杆菌菌株测试11和测试12都具有有用的活性,并且都使丝氨酸芳基酰胺酶发酵,而不使亮氨酸甘氨酸芳基酰胺酶发酵,并且不使丙氨酸芳基酰胺酶发酵。

[0179] 在替代实施方案中,本发明中用于治疗或预防细菌感染的细菌展现出丝氨酸芳基酰胺酶的中间发酵,例如当在适当悬浮培养基(例如API悬浮培养基)中于37℃下培养4小时时,以及例如当进行Rapid ID32A分析时。实施例证实短双歧杆菌菌株测试3和测试7都具有有效的抗微生物活性,并且都展现出丝氨酸芳基酰胺酶的中间发酵。

[0180] 可使用本领域已知的任何合适的测定来评估细菌使碳水化合物源或氨基酸发酵的能力。优选地,使用Rapid ID 32A分析(优选使用来自bioMérieux的Rapid ID 32A系统)。

[0181] 施用模式

[0182] 优选地,本发明的组合物被配制以施用于胃肠道,以便使得能够递送至肠部和/或使本发明的细菌菌株能够部分或全部定殖肠部。在一些实施方案中,术语“肠的完全定殖”是指细菌已定殖在肠的所有部分(即小肠、大肠和直肠)。在本发明的其他实施方案中,术语“完全定殖”或“部分定殖”是指细菌分别永久或暂时保留在肠中。一般来说,虽然本发明的组合物是经口施用的,但其可经直肠、经鼻内或经由颊或舌下途径施用。

[0183] 在某些实施方案中,本发明的组合物可呈泡沫、喷雾或凝胶形式施用。

[0184] 在某些实施方案中,本发明的组合物可呈栓剂如直肠栓剂,例如呈可可油(可可脂)、合成硬脂(例如suppocire、witepsol)、甘油基-明胶、聚乙二醇或肥皂甘油组合物的形式施用。

[0185] 在某些实施方案中,本发明的组合物经由管(例如鼻胃管、口胃管、胃管、空肠造瘘管(J型管)、经皮内视镜胃造瘘术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG))或口(port)(例如提供出入胃、空肠的胸壁口和其他合适出入口)施用于胃肠道。

[0186] 本发明的组合物可施用一次,或者其可作为治疗方案的一部分依序施用。在某些实施方案中,本发明的组合物将每天施用(一次或若干次)。

[0187] 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群的评估。如果未实现本发明的菌株的递送和/或部分或全部定殖而使得未观测到功效,则可重复治

疗,或者如果递送和/或部分或全部定殖成功并且观测到功效,则可停止治疗。

[0188] 在某些实施方案中,本发明的组合物可施用于怀孕动物,例如哺乳动物,例如人类,以降低其子代在子宫内和/或其子代在出生后发生疾病的可能性。

[0189] 本发明的组合物可施用于已诊断患有由免疫活性降低介导的疾病或疾患或者已鉴定为处于由免疫活性降低介导的疾病或疾患风险下的患者。组合物也可作为预防措施施用以防健康患者中由免疫活性降低介导的疾病或疾患的发生。

[0190] 本发明的组合物可施用于已诊断有免疫活性缺乏或已鉴定为处于免疫活性缺乏风险下的患者。例如,患者可具有减少或缺乏的短双歧杆菌定殖。

[0191] 本发明的组合物可作为食品,例如营养补充剂施用。

[0192] 一般来说,本发明的组合物用于治疗人类,但其可用于治疗动物,包括单胃哺乳动物,例如家禽、猪、猫、狗、马或兔。本发明的组合物可用于增强动物的生长和性能。如果施用于动物,则可使用经口管饲法。

[0193] 组合物

[0194] 一般来说,本发明的组合物包含细菌。在本发明的优选的实施方案中,组合物是以冻干形式配制。例如,本发明的组合物可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。

[0195] 优选地,本发明的组合物包含冻干细菌。细菌冻干是众所周知的程序并且相关指导可于例如参考文献[50,52]中获得。实施例证实冻干组合物特别有效。

[0196] 或者,本发明的组合物可包含活的活性细菌培养物。

[0197] 在优选的实施方案中,本发明的组合物被囊封以使得能够将细菌菌株递送至肠。囊封保护组合物免于降解,直至通过例如用化学或物理刺激如压力、酶促活性或物理崩解(其可通过pH值变化引起)破裂而在目标位置递送。可使用任何适当的囊封法。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聚集以及机械容纳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于例如参考文献[53]和[54]中获得。

[0198] 组合物可经口施用并且可呈片剂、胶囊或散剂的形式。囊封产品是优选的,因为短双歧杆菌是厌氧菌。其他成分(例如维生素C)可作为除氧剂和益生元基质包括在内以改进体内递送和/或部分或全部定殖和存活。或者,本发明的益生菌组合物可作为食品或营养产品,例如基于牛乳或乳清的发酵乳制品,或作为药物产品经口施用。

[0199] 在一些实施方案中,组合物不包含水解牛乳清。

[0200] 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足以使得递送至患者肠部和/或部分或全部定殖患者肠部。

[0201] 例如适于成年人的细菌日剂量可为约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 菌落形成单位(colony forming unit, CFU);例如约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU;在另一个实例中,约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU;在另一个实例中,约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{11}$ CFU;在另一个实例中,约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU;在另一个实例中,约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{11}$ CFU。

[0202] 在某些实施方案中,细菌的剂量为每天至少 $10^9$ 个细胞,例如每天至少 $10^{10}$ 个、至少 $10^{11}$ 个或至少 $10^{12}$ 个细胞。

[0203] 在某些实施方案中,组合物含有相对于组合物的重量约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{11}$ CFU/g,例如约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU/g的量的细菌菌株。剂量可为例如1g、3g、5g和10g。

[0204] 组合物的剂量可包含相对于组合物的重量约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 菌落形成单位(CFU)/g的细菌菌株。剂量可适于成年人。例如,组合物可包含如下量的细菌菌株:约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^{11}$ CFU/g;例如约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU/g;在另一个实例中,约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU/g;在另一个实例中,约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{11}$ CFU/g;在另一个实例中,约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU/g;在另一个实例中,约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{11}$ CFU/g。所述剂量可为例如1g、3g、5g和10g。

[0205] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中细菌菌株的量为相对于组合物的重量每克约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 菌落形成单位。

[0206] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述组合物是以500mg与1000mg之间、600mg与900mg之间、700mg与800mg之间、500mg与750mg之间或750mg与1000mg之间的剂量施用。在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述药物组合物中的冻干细菌是以500mg与1000mg之间、600mg与900mg之间、700mg与800mg之间、500mg与750mg之间或750mg与1000mg之间的剂量施用。

[0207] 组合物可配制为益生菌。益生菌由FAO/WHO定义为当以足够量施用时,赋予宿主健康益处的活微生物。

[0208] 通常,任选地将益生菌(例如本发明的组合物)与至少一种合适的益生元化合物组合。益生元化合物通常是在上消化道中不降解或吸收的不易消化的碳水化合物,例如寡糖或多糖,或糖醇。已知益生元包括商业产品,例如菊糖和反式低聚半乳糖。

[0209] 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为约1至约30重量%(例如5重量%至20重量%)的量的益生元化合物。碳水化合物可选自由以下组成的组:低聚果糖(或FOS)、短链低聚果糖、菊糖、低聚异麦芽糖、果胶、低聚木糖(或XOS)、低聚壳聚糖(或COS)、 $\beta$ -葡聚糖、阿拉伯胶改性和抗性淀粉、聚右旋糖、D-塔格糖、阿拉伯胶纤维、角豆胶(carob)、燕麦和柑橘纤维。在一个方面,益生元是短链低聚果糖(下文中为简单起见而显示为FOS-c.c);所述FOS-c.c是不可消化的碳水化合物,一般由甜菜糖转化获得并且包括三个葡萄糖分子键合的蔗糖分子。

[0210] 本发明的组合物可包含药学上可接受的赋形剂或载体。这些合适赋形剂的实例可见于参考文献[55]中。用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂是制药领域中众所周知的并且描述于例如参考文献[56]中。合适载体的实例包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇、山梨糖醇等。合适稀释剂的实例包括乙醇、甘油和水。药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可针对预期施用途和标准医药实践来选择。药物组合物可包含任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包被剂、增溶剂作为载体、赋形剂或稀释剂,或除载体、赋形剂或稀释剂之外还可包含任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包被剂、增溶剂。合适粘合剂的实例包括淀粉,明胶,天然糖如葡萄糖、无水乳糖、自由流动乳糖、 $\beta$ -乳糖、玉米甜味剂,天然和合成胶如阿拉伯胶、黄蓍胶或海藻酸钠、羧甲基纤维素和聚乙二醇。合适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。防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂可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。还可使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0211] 本发明的组合物可配制为食品。例如,除本发明的治疗作用之外,食品也可提供营养益处,例如在营养补充剂中。类似地,可将食品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,使得组合物食用起来更具吸引力。在某些实施方案中,将本发明的组合物配制为乳基产品。术语“乳基产品”是指具有变化脂肪含量的任何基于乳或乳清的液体或半固体产品。乳基产品可为例如牛乳、山羊乳、绵羊乳、脱脂乳、全乳、无任何加工下由乳粉与乳清重组的乳,或加工产品如酸奶酪、凝乳、凝块、酸乳、酸全乳、酪乳和其他酸乳产品。另一重要组包括乳饮料如乳清饮料、发酵乳、炼乳、婴儿或幼儿乳;调味乳、冰淇淋;含乳食品如甜食。

[0212] 在某些实施方案中,本发明的组合物含有单一细菌菌株或菌种并且不含任何其他细菌菌株或菌种。在某些实施方案中,本发明的组合物含有单一细菌菌种并且不含任何其他细菌菌种。在某些实施方案中,本发明的组合物含有单一细菌菌株并且不含任何其他细菌菌株。例如,本发明的组合物可仅包含短双歧杆菌菌种的细菌。这些组合物可仅包含最低限量或生物学上不相干量的其他细菌菌株或菌种。这些组合物可为基本上不含其他生物体物种的培养物。在一些实施方案中,这些组合物可为基本上不含其他生物体物种的冻干物。

[0213] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含超过一种细菌菌株或菌种。例如,在一些实施方案中,本发明的组合物包含超过一种来自同一物种内的菌株(例如超过1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、15种、20种、25种、30种、35种、40种或45种菌株),并且任选地不含来自任何其他物种的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含小于50种来自同一物种内的菌株(例如小于45种、40种、35种、30种、25种、20种、15种、12种、10种、9种、8种、7种、6种、5种、4种或3种菌株),并且任选地不含来自任何其他物种的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含1-40种、1-30种、1-20种、1-19种、1-18种、1-15种、1-10种、1-9种、1-8种、1-7种、1-6种、1-5种、1-4种、1-3种、1-2种、2-50种、2-40种、2-30种、2-20种、2-15种、2-10种、2-5种、6-30种、6-15种、16-25种或31-50种来自同一物种内的菌株,并且任选地不含来自任何其他物种的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含超过一个来自同一属内的物种(例如超过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、12个、15个、17个、20个、23个、25个、30个、35个或40个物种),并且任选地不含来自任何其他属的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含少于50个来自同一属内的物种(例如少于50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个、15个、12个、10个、8个、7个、6个、5个、4个或3个物种),并且任选地不含来自任何其他属的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含1-50个、1-40个、1-30个、1-20个、1-15个、1-10个、1-9个、1-8个、1-7个、1-6个、1-5个、1-4个、1-3个、1-2个、2-50个、2-40个、2-30个、2-20个、2-15个、2-10个、2-5个、6-30个、6-15个、16-25个或31-50个来自同一属内的物种,并且任选地不含来自任何其他属的细菌。本发明包含前述的任何组合。

[0214] 在一些实施方案中,组合物包含微生物共生物种(consortium)。例如,在一些实施方案中,组合物包含短双歧杆菌细菌菌株作为微生物共生物种的一部分。例如,在一些实施方案中,短双歧杆菌细菌菌株与一种或多种(例如至少2种、3种、4种、5种、10种、15种或20种)来自布劳特氏菌属(*Blautia*)和/或其他属的其他细菌菌株组合存在,所述短双歧杆菌细菌菌株可与其他细菌菌株在体内肠内共生生活。例如,在一些实施方案中,组合物包含短

双歧杆菌的细菌菌株与来自不同属的细菌菌株的组合。在另一个实例中,组合物包含短双歧杆菌的细菌菌株与来自双歧杆菌属的细菌菌株的组合,或者组合物包含短双歧杆菌的细菌菌株与来自双歧杆菌属的细菌菌株和来自不同属的细菌菌株的组合。在一些实施方案中,微生物共生物种包含两种或更多种从单一生物体(例如人类)的粪便样品获得的细菌菌株。在一些实施方案中,发现微生物共生物种在自然界中不是一起存在。例如,在一些实施方案中,微生物共生物种包含从至少两种不同生物体的粪便样品获得的细菌菌株。在一些实施方案中,两种不同生物体来自同一物种,例如两种不同人类。在一些实施方案中,两种不同生物体是人类婴儿和成年人。在一些实施方案中,两种不同生物体是人类和非人类哺乳动物。

[0215] 在一些实施方案中,本发明的组合物另外包含一种细菌菌株,所述细菌菌株具有与以登录号NCIMB 42380保藏的短双歧杆菌菌株相同的安全性和治疗功效特性,但其并非以登录号NCIMB 42380保藏的短双歧杆菌菌株。

[0216] 在本发明的组合物包含超过一种细菌菌株、物种或属的一些实施方案中,个别细菌菌株、物种或属可用于分开、同时或依序施用。例如,组合物可包含所有超过一种的细菌菌株、物种或属,或者细菌菌株、物种或属可分开储存并且可分开、同时或依序施用。在一些实施方案中,将超过一种细菌菌株、物种或属分开储存,但在使用前混合在一起。

[0217] 在一些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株获自成人粪便。在本发明的组合物包含超过一种细菌菌株的一些实施方案中,所有细菌菌株都获自成人粪便,或者如果存在其他细菌菌株,则其仅以最低量存在。细菌可能已在从成人粪便中获得并用于本发明的组合物中之后进行培养。

[0218] 在一些实施方案中,一种或多种短双歧杆菌细菌菌株是本发明的组合物中的唯一治疗活性剂。在一些实施方案中,组合物中的细菌菌株是本发明的组合物中的唯一治疗活性剂。

[0219] 根据本发明使用的组合物可能需要或可能无需上市许可。

[0220] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述细菌菌株是冻干的。在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述细菌菌株是喷雾干燥的。在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述细菌菌株是冻干的或喷雾干燥的并且其中它是活的。在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述细菌菌株是冻干的或喷雾干燥的并且其中它可存活。在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述细菌菌株是冻干的或喷雾干燥的并且其中它能够部分或全部定殖肠部。在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述细菌菌株是冻干的或喷雾干燥的并且其中它可存活并且能够部分或全部定殖肠部。

[0221] 在一些情况下,使冻干或喷雾干燥的细菌菌株在施用之前重构。在一些情况下,重构是通过使用本文中所述的稀释剂实现。

[0222] 本发明的组合物可包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0223] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中当施用于有需要的受试者时,所述细菌菌株的量足以治疗病症。

[0224] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细

菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防疾病或疾患。

[0225] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防疾病或疾患。

[0226] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防疾病或疾患。

[0227] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含:本发明的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株的量足以治疗或预防由降低的免疫反应介导的疾病或疾患。

[0228] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中细菌菌株的量为相对于组合物的重量每克约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 菌落形成单位。

[0229] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述组合物是以1g、3g、5g或10g的剂量施用。

[0230] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述组合物是通过选自由经口、直肠、皮下、经鼻、经颊和舌下组成的组的方法施用。

[0231] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,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组的载体。

[0232] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其包含选自由乙醇、甘油和水组成的组的稀释剂。

[0233] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其包含选自由以下组成的组的赋形剂:淀粉、明胶、葡萄糖、无水乳糖、自由流动乳糖、 $\beta$ -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。

[0234] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其还包含防腐剂、抗氧化剂和稳定剂中的至少一者。

[0235] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其包含选自由苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯组成的组的防腐剂。

[0236] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中所述细菌菌株是冻干的。

[0237] 在某些实施方案中,本发明提供了上述药物组合物,其中当将组合物在密封容器中于约4℃或约25℃下储存并且将容器置于具有50%相对湿度的气氛中时,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%如以菌落形成单位测量的细菌菌株保留。

[0238] 在一些实施方案中,本发明的组合物提供于包含如本文所述组合物的密封容器中。在一些实施方案中,密封容器是药囊或瓶。在一些实施方案中,本发明的组合物提供于包含如本文所述组合物的注射器中。

[0239] 在一些实施方案中,本发明的组合物可作为药物制剂提供。例如,组合物可作为片剂或胶囊提供。在一些实施方案中,胶囊是明胶胶囊(“囊形片(gel-cap)”)。胶囊可为硬胶

囊或软胶囊。在一些实施方案中,制剂是软胶囊。软胶囊是如下胶囊:其由于添加存在于胶囊壳中的软化剂(例如甘油、山梨糖醇、麦芽糖醇和聚乙二醇)而可具有特定的弹性和柔软性。软胶囊可例如基于明胶或淀粉来生产。基于明胶的软胶囊可从各种供应商购得。取决于施用方法,例如经口或经直肠施用,软胶囊可具有各种形状,其可为例如圆形、椭圆形、长椭圆形或鱼雷形。软胶囊可通过常规工艺生产,例如通过Scherer工艺、Accogel工艺或微滴或吹制工艺。

[0240] 在一些实施方案中,本发明的组合物是经口施用的。经口施用可能涉及吞咽,使得化合物进入胃肠道。

[0241] 适于经口施用的药物制剂包括固体栓(solid plug)、固体微粒、半固体和液体系统(包括多相或分散系统),例如片剂;含有多颗粒或纳米颗粒的软或硬胶囊、液体(例如水溶液)、乳液或散剂;糖锭(包括充液型);嚼锭(chew);凝胶;快速分散剂型;膜剂;珠形剂(ovule);喷雾剂;和经颊/粘膜粘着贴片。

[0242] 在一些实施方案中,药物制剂是肠溶制剂,即适于通过经口施用将本发明的组合物递送至肠的耐胃制剂(例如,耐胃pH)。当细菌或组合物的另一组分对酸敏感(例如在胃条件下易于降解)时,肠溶制剂可能尤其有用。

[0243] 在一些实施方案中,肠溶制剂包含肠溶包衣。在一些实施方案中,制剂是肠溶包衣剂型。例如,制剂可为肠溶包衣片剂或肠溶包衣胶囊等。肠溶包衣可为常规肠溶包衣,例如,用于经口递送的片剂、胶囊等的常规包衣。制剂可包含膜包衣,例如肠溶聚合物的薄膜层,例如酸不溶性聚合物。

[0244] 在一些实施方案中,肠溶制剂是本质上肠溶性的,例如耐胃的,而无需肠溶包衣。因此,在一些实施方案中,制剂是不包含肠溶包衣的肠溶制剂。在一些实施方案中,制剂是由热胶凝材料制成的胶囊。在一些实施方案中,热胶凝材料是纤维素材料,例如甲基纤维素、羟甲基纤维素或羟丙基甲基纤维素(HPMC)。在一些实施方案中,胶囊包含不含任何成膜聚合物的壳。在一些实施方案中,胶囊包含壳,并且所述壳包含羟丙基甲基纤维素,并且不包含任何成膜聚合物(例如参见[57])。在一些实施方案中,制剂是本质上肠溶性的胶囊(例如,来自Capsugel的Vcaps®)。

[0245] 培养方法

[0246] 用于本发明的细菌菌株可使用如例如参考文献[58-60]中详述的标准微生物学技术来培养。

[0247] 用于培养的固体或液体培养基可为YCFA琼脂或YCFA培养基。YCFA培养基可包括(每100ml,近似值):酪朊(1.0g)、酵母提取物(0.25g)、 $\text{NaHCO}_3$ (0.4g)、半胱氨酸(0.1g)、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0.045g)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.045g)、 $\text{NaCl}$ (0.09g)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.09g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.009g)、 $\text{CaCl}_2$ (0.009g)、刃天青(0.1mg)、氯化血红素(1mg)、生物素(1 $\mu\text{g}$ )、钴胺素(1 $\mu\text{g}$ )、对氨基苯甲酸(3 $\mu\text{g}$ )、叶酸(5 $\mu\text{g}$ )和吡哆胺(15 $\mu\text{g}$ )。

[0248] 用于疫苗组合物中的细菌菌株

[0249] 本发明人已确定本发明的细菌菌株可用于治疗或预防与免疫活性降低相关的疾病或疾患。这可能是本发明的细菌菌株对宿主免疫系统所具有的作用的结果。因此,当作为疫苗组合物施用时,本发明的组合物也可用于预防疾病或疾患。在某些这样的实施方案中,本发明的细菌菌株可被杀灭、灭活或减毒。在某些这样的实施方案中,组合物可包含疫苗佐

剂。在某些实施方案中,组合物用于经由注射,例如经由皮下注射施用。

#### [0250] 通则

[0251] 除非另外指明,否则本发明的实施将采用在本领域技术内的习知化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药理学方法。这些技术在文献中有充分解释。参见例如参考文献[61]和[62,68]等。

[0252] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由……组成”,例如“包含”X的组合物可排他性地由X组成,或者可包括其他某物,例如X+Y。

[0253] 关于数值x的术语“约”是任选的并且是指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0254] 词语“基本上”不排除“完全地”,例如“基本上不含”Y的组合物可完全地不含Y。必要时,本发明的定义中可省略词语“基本上”。

[0255] 提及两个核苷酸序列之间的序列同一性百分比是指,当比对时,在比较所述两个序列时所述百分比的核苷酸相同。这种比对和同源性或序列同一性百分比可使用本领域已知的软件程序,例如参考文献[69]的部分7.7.18中所述的软件程序来确定。优选的比对通过Smith-Waterman同源性搜索算法使用仿射空位搜索(其中空位开放罚分为12并且空位延伸罚分为2、BLOSUM矩阵为62)来确定。Smith-Waterman同源性搜索算法公开于参考文献[70]中。

[0256] 除非特别陈述,否则包括多个步骤的工艺或方法可在方法开始或结束时包括其他步骤,或者可包括其他插入步骤。此外,适当时,步骤可组合、省略或以替代次序进行。

[0257] 本文中阐述本发明的各个实施方案。应了解每个实施方案中说明的特征均可与其他所说明的特征组合以提供其他实施方案。特别是,本文中强调为合适、典型或优选的实施方案可彼此组合(除非其互斥时)。

[0258] 本说明书中引用的所有专利和参考文献都特此通过引用整体并入。

[0259] 任何对治疗方法的提及(包括向患者施用剂)也涵盖用于所述治疗方法中的所述剂,以及所述剂在所述治疗方法中的用途,以及所述剂在制造药物中的用途。

[0260] 以下实施例仅出于说明目的而提供,并且并不旨在以任何方式限制本发明的范围。

#### [0261] 实施本发明的模式

##### [0262] 实施例1

##### [0263] 概述

[0264] 本研究的目的是表征MRx0004的体外免疫调节性质。另外,基因组学、转录组学和蛋白质组学的组合用于鉴定可能负责介导宿主对MRx0004的反应的潜在关键效应物。

##### [0265] 材料与方法

##### [0266] 细菌菌株、质粒和引物

[0267] 用于产生该研究中的菌株的所有细菌菌株和质粒和引物都列于表1中。除非另有说明,否则在厌氧操作台(workstation) (Don Whitley Scientific, Shipley, UK) 中在酵母提取物-酪蛋白水解产物-脂肪酸(YCFA)肉汤(E&O Labs, Bonnybridge, UK) 中在37°C下常规培养短双歧杆菌菌株。在37°C下将大肠杆菌菌株在Luria Bertani (LB) 肉汤[71]中在搅动下常规培养。适当时,生长培养基补充有四环素(10 $\mu$ g/ml)、氯霉素(对于大肠杆菌为10 $\mu$ g/ml或对于短双歧杆菌为3 $\mu$ g/ml)、红霉素(对于大肠杆菌为100 $\mu$ g/ml或对于短双歧杆菌为1 $\mu$

g/ml)、奇霉素(100-300 $\mu$ g/ml)或卡那霉素(kanamycin)(50 $\mu$ g/ml)(所有抗生素都来自Sigma-Aldrich,Gillingham,UK)。在补充有40 $\mu$ g/ml X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷)和0.1M IPTG(异丙基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷)(都由Sigma-Aldrich供应)的LB琼脂上选择含有pORI19或pWSK29的重组大肠杆菌细胞。

#### [0268] 永生化细胞的常规培养

[0269] 在补充有10% (v/v) 胎牛血清(FBS)、4mM L-谷氨酰胺、1X非必需氨基酸溶液和1X抗生素抗真菌溶液的用高葡萄糖改良的杜尔贝科最低伊格尔培养基(Dulbecco's Minimal Eagle's Medium,DMEM)中常规培养HT29-MTX-E12细胞(Public Health England, Salisbury,UK)。将细胞接种至测定容器中并培养9天,接着将其用汉克氏(Hank's)平衡盐水溶液洗涤两次并置于共培养基(补充有4mM L-谷氨酰胺、1X非必需氨基酸溶液、5 $\mu$ g/ml脱铁转铁蛋白(apo-transferrin)和200ng/ml亚硒酸钠的DMEM)中,之后开始处理。

#### [0270] 用于共培养测定的细菌处理物的制备

[0271] 对于共培养实验,培养细菌直至其达到对数期。通过离心分离活细菌细胞和上清液,接着用PBS(Sigma-Aldrich)将活细菌(命名为 $L_V$ )洗涤一次,并且重悬于适当细胞培养基中用于下游使用。使上清液(命名为 $S_N$ )通过0.22 $\mu$ m过滤器并在共培养基中适当稀释。通过在80 $^{\circ}$ C温育30分钟,接着用PBS洗涤并且重悬于适当细胞培养基中来制备热灭活细菌(命名为 $H_K$ )。通过涂铺确认活菌计数。

#### [0272] 报告基因测定

[0273] 使HEK-Blue<sup>TM</sup>-hTLR2和THP1-Blue<sup>TM</sup> NF- $\kappa$ B细胞生长至90%密度,用PBS洗涤一次,并且分别以280,000个细胞/ml和500,000个细胞/ml的密度重悬于不含抗生素的培养基中。将细菌处理物(活的、热杀灭的和上清液)以100:1的感染复数(MOI)添加至细胞中。阳性测定对照、PamCS3K4(Invivogen)和热杀灭的单核细胞增生李斯特菌(L.monocytogenes)(HKLM)(Invivogen)分别以10ng/ml浓度和200:1的MOI使用。制备阴性对照、培养基和媒介物以提供每次处理的等同物。然后将细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下温育22h。将来自共培养物的培养基在QUANTI-Blue<sup>TM</sup>(Invivogen)中稀释十倍,并且温育1小时(NF $\kappa$ B)或2小时(TLR2)并记录655nm处的光密度。

#### [0274] 与HT29-MTX细胞的大规模共培养物

[0275] 如先前所述,在10cm直径的Transwells<sup>®</sup>(Thermo Fisher Scientific, Waltham,MA,USA)的上室中培养HT29-MTX细胞。如先前所述将细菌培养至对数后期,洗涤并再悬浮。将细菌以100:1的MOI添加至细胞中,并且将共培养物在厌氧条件下在37 $^{\circ}$ C下温育3小时。从transwell的上室收集含有细菌的培养基,并以5000xg离心5-10分钟以收集细菌细胞用于下游应用。

#### [0276] 细菌qPCR分析

[0277] 收集细菌用于在对数后期和静止生长期以及在与HT29-MTX大规模共培养后从体外培养物中分离RNA。依照制造商的说明书(QIAGEN,Hilden,Germany),使用RNAProtect细菌试剂收集并储存细菌。通过以下方式裂解细菌细胞:将其与溶菌酶(15mg/ml)(Sigma-Aldrich)和蛋白酶K(6mAU)(QIAGEN)在37 $^{\circ}$ C下温育30分钟,随后使用FastPrep 24仪器(6m/s持续20s,2个循环)和裂解基质(Lysing Matrix)B(都来自MP Biomedicals,Santa Ana,CA,USA)进行匀浆化。使用RNeasy微型试剂盒(QIAGEN)分离总RNA,并且使用无RNA酶的DNA

酶在柱上消化 (on-column digest) (QIAGEN) 中去除基因组DNA, 两者都依照制造商的说明书进行。依照制造商的说明书, 使用Superscript IV试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 合成cDNA。使用Primer3Plus软件设计引物[72]。依照制造商的建议在Power SYBR™ Green PCR主混合物 (Thermo Fisher Scientific) 中设立qPCR反应, 并且使用以下循环在7500快速实时PCR系统 (Thermo Fisher Scientific) 上实施测定: 95℃持续10分钟, 接着进行95℃持续15秒、60℃持续1分钟的40个循环。使用双 $\Delta C_t$ 分析对数据进行分析, 并且相对于管家groEL将测试基因的表达归一化。

#### [0278] 细菌细胞刮取

[0279] 适当时, 在对数后期生长期中或在与HT29-MTX接触 (详情参见上文共培养部分) 后通过离心收获细菌细胞。然后洗涤细胞并以1/20稀释度将其重悬于50mM TEAB缓冲液 (pH 8.5) (Sigma-Aldrich) 中。通过将细胞与测序级修饰胰蛋白酶 (Promega, Madison, WI, USA) 在37℃下在补充有1mM DTT (Sigma-Aldrich) 的50mM TEAB缓冲液中温育30分钟来产生经刮取蛋白质级分。对于各样品, 平行温育不含胰蛋白酶的管, 作为脱落蛋白质的对照 (脱落蛋白质级分)。通过在4℃下以4000xg离心15分钟收获经刮取和脱落的蛋白质级分, 并且通过Millex-GV 0.22 $\mu$ m的低蛋白质结合膜 (Millipore) 进行注射器过滤。根据制造商的说明书使用Pierce™ BCA蛋白质测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 测量总蛋白质浓度, 并且通过SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 评估样品质量。在胰蛋白酶处理之前和之后, 通过在YCFA琼脂上涂铺, 进行活细胞计数。对于各测定, 然后通过纳米LC-MS/MS分析来自三个生物学重复的样品。

#### [0280] 通过LC-MS/MS鉴定蛋白质

[0281] 简言之, 将培养上清液浓缩至0.5ml并用超纯水洗涤, 使用ReadyPrep 2-D纯化试剂盒 (Cleanup Kit) (Bio-Rad) 使蛋白质沉淀, 并将其重悬于100 $\mu$ l 50mM碳酸氢铵中。然后将样品与猪胰蛋白酶 (Promega) 在37℃下温育16h, 并且通过真空离心将所得上清液干燥并溶解于0.1%三氟乙酸中。使用 $\mu$ -C18ZipTips (Merck, Kenilworth, NJ, USA) 将肽进一步脱盐并洗脱至96孔微量滴定板中, 通过真空离心干燥并溶解于10 $\mu$ l LC-MS装载溶剂 (2%乙腈、0.1%甲酸) 中。通过纳米LC-MS/MS (Q精确混合四极-轨道阱MS系统) (Thermo Fisher Scientific) 使用15-cm PepMap柱、60分钟LC-MS采集方法和5 $\mu$ l的注射体积分离并鉴定肽。对于刮取和脱落的蛋白质级分, 将70 $\mu$ l 50mM碳酸氢铵直接添加至30 $\mu$ l样品中。然后将样品与猪胰蛋白酶 (Promega) 在37℃下温育过夜, 并且将所得上清液在-70℃下冷冻, 通过真空离心干燥并溶解于20 $\mu$ l LC-MS装载溶剂中。通过纳米LC-MS/MS (Q精确混合四极-轨道阱MS系统, Thermo Scientific) 使用25-cm PepMap柱、60分钟LC-MS采集方法和2 $\mu$ l的注射体积分离并鉴定肽。利用Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific) 进行数据分析。Mascot Server用作具有以下参数的搜索引擎: 酶=胰蛋白酶, 最大混合切割位点=2, 前体质量公差=10ppm, 动态修饰=氧化 (M), 静态修饰=脲甲基 (C)。将鉴定的肽与基于短双歧杆菌MRx0004的测序基因组构建的菌株特异性蛋白质序列数据库 (2,047个序列) 相匹配。当在所有三个生物学重复中鉴定出至少五种肽时, 认为蛋白质鉴定有效。

#### [0282] 短双歧杆菌MRx0004-EPS<sup>阴性</sup>的互补

[0283] 通过使用Q5高保真度聚合酶 (High-Fidelity Polymerase) (New England BioLabs, Herefordshire, United Kingdom) 和引物对 (pGTFcompF和pGTFcompR) 从短双歧杆

菌MRx0004染色体DNA进行PCR扩增,产生涵盖编码主要糖基转移酶的基因pGTF及其假定启动子的DNA片段。用HindIII和XbaI(都来自New England Biolabs,Ipswich,MA,USA)消化所得片段,并且将其连接至类似消化的pBC1.2。通过电转化将连接混合物引入大肠杆菌EC101中,然后基于Cm抗性选择转化体。通过限制性分析筛选许多Cm抗性转化体的质粒含量。通过测序确认克隆插入物在许多重组质粒中的完整性,然后将其引入大肠杆菌EC101pWSK29-MRX-M+S中,以促进甲基化。通过电穿孔与在补充有Tet和Cm的强化梭菌琼脂(Reinforced Clostridial Agar)(RCA;Thermo Fisher Scientific)进行选择将甲基化pBC1.2或pBC1.2-pGTF转化至MRx0004-EPS<sup>阴性</sup>中。使用质粒DNA的菌落PCR限制分析检查转化体的质粒含量,并通过测序进行验证。将所得菌株分别命名为短双歧杆菌MRx0004-EPS<sup>-</sup>-pBC1.2和MRx0004-EPS<sup>-</sup>-pBC1.2-pGTF。

[0284] 来自HT29-MTX细胞的细胞因子分析

[0285] 将活细菌(如先前所述制备)与HT29-MTX细胞在24孔板中在37℃和5%CO<sub>2</sub>下以100:1的MOI共温育3小时。然后将人类重组TNFα(PeproTech,Rocky Hill,NJ,USA)以10ng/ml添加至细胞中,接着将共培养物再温育24小时,随后收集上清液并在4℃下以12000xg离心3分钟以去除细胞碎片。依照制造商的推荐,使用人类IL-8(CXCL8)标准ABTS ELISA显色试剂盒(PeproTech)分析上清液中的IL-8水平。

[0286] 与PBMC的共培养

[0287] 健康冷冻的人外周血单核细胞(PBMC)购自STEMCELL Technologies(Cambridge,UK)。将细胞解冻并在具有10%FBS、2mM L谷氨酰胺和100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素的完全生长培养基RPMI 1640中在37℃和5%CO<sub>2</sub>下静置过夜(所有试剂都来自Sigma-Aldrich)。如先前所述制备细菌处理物。对于共温育,将细胞以750,000个细胞/孔的密度涂铺在48孔板中,并且与热灭活的细菌和MOI为10:1的细菌上清液共培养,以适当的媒介物和5ug/ml PHA(Sigma-Aldrich)作为对照。将共培养物在37℃和5%CO<sub>2</sub>下温育72小时,接着收集细胞并在4℃下以10000xg离心3分钟。收集无细胞上清液并将其储存在-80℃下用于细胞因子分析。将细胞沉淀洗涤一次,然后在冰上重悬于PBS中。

[0288] 流式细胞术

[0289] 汇集处理孔,每组得到 $1.5 \times 10^6$ 个PBMC,将其重悬于150μl PBS中并转移至准备用于染色的96V型底板中。首先在室温下在黑暗中用Viobility 405/520可固定染料(Miltenyi Biotec Ltd.,Bergisch Gladbach,Germany)将细胞染色10分钟,以区分活细胞和死细胞。然后将其与CD3、CD4、CD8、CD25、CD127和CD19的抗体混合物一起染色以确定细胞表型(Miltenyi REA抗体)并在室温下再温育10分钟。然后洗涤细胞并将其重悬于PBS中,并且立即经由流式细胞术分析进行分析。同种型用于第一实验期间的所有抗体以帮助设定门控,并且在所有实验中都包括FMO对照。使用BD FACS Aria II进行所有实验,其中使用FACSDiva软件(BD Biosciences,Reading,UK)在“活”门控中对100,000个细胞设定用于采集的停止门(stopping gate)。所述分析是使用Flowjo 10.4.2版软件(FlowJo LLC,Oregon,USA)进行,并且是基于用活力染料鉴定的活细胞。

[0290] 细胞因子分析

[0291] 依照制造商的推荐,使用定制的ProcartaPlex多重免疫测定(Thermo Fisher Scientific),在来自PBMC共培养物的无细胞上清液中实施细胞因子定量。简言之,使用

**MAGPIX® MILLIPLEX®** 系统 (Merck), 利用 xPONENT 软件 (Luminex, Austin, TX, USA) 处理 50  $\mu$ l 上清液。使用 **MILLIPLEX®** 分析软件 (Merck), 利用 5 参数逻辑曲线和背景扣除将平均荧光强度 (MFI) 转换成 pg/ml 值来分析数据。

#### [0292] 数据分析

[0293] 使用用于 Windows, GraphPad Software, La Jolla CA USA 的 GraphPad Prism 7.00 版实施统计分析。使用单因素方差分析和 Tukey 多重比较检验分析数据。使用 Interactivenn 产生文氏图 [73]。

#### [0294] 结果

##### [0295] MRx0004 刺激 NF $\kappa$ B 和 TLR2 报告细胞

[0296] 由于促炎转录因子 NF $\kappa$ B 在先天性免疫的调控中的必要作用, 因此采用 THP-1-NF $\kappa$ B 报告细胞系来检查 MRx0004 对促炎转录因子 NF $\kappa$ B 激活的影响。热杀灭的单核细胞增生李斯特菌 (HKLM) (InvivoGen) 用作该测定的阳性对照。为了鉴定这种菌株的有效级分, 将 THP-1-NF $\kappa$ B 细胞与活细菌 (MRx0004<sub>LV</sub>)、细菌培养上清液 (MRx0004<sub>SN</sub>) 和热灭活细菌 (MRx0004<sub>HK</sub>) 的处理物共温育。与未处理细胞和细菌生长培养基 (YCFA) 的阴性对照相比, 所有三种细菌处理物都显著激活 NF $\kappa$ B (对于所有比较,  $p < 0.0001$ ) (图 7A)。MRx0004<sub>LV</sub> 是最有效的处理, 并且比 MRx0004<sub>SN</sub> 和 MRx0004<sub>HK</sub> 显著更具刺激性 (对于两种比较,  $p < 0.0001$ )。MRx0004<sub>HK</sub> 的活性进而显著高于 MRx0004<sub>SN</sub> ( $p = 0.006$ )。

[0297] 由于 MRx0004 显示激活 NF $\kappa$ B, 因该研究 MRx0004 刺激上游受体 TLR2、TLR4、TLR5 和 TLR9 的能力。初步数据表明 MRx0004 不激活 TLR4、TLR5 和 TLR9 (数据未示出)。用阳性对照 Pam3CSK4 以及上文所述相同的 MRx0004 处理物和阴性对照处理 HEK-TLR2 报告基因测定 (图 7B)。与阴性对照相比, 所有 MRx0004 处理都刺激 TLR2 (对于所有比较,  $p < 0.0001$ )。与 MRx0004<sub>SN</sub> ( $p < 0.0001$ ) 和 MRx0004<sub>HK</sub> ( $p < 0.0001$ ) 相比, MRx0004<sub>LV</sub> 是最具刺激性的处理, MRx0004<sub>HK</sub> 是有效性最低的处理。基于这些数据, MRx0004 能够以 TLR2 相关方式有效刺激先天免疫反应。

##### [0298] MRx0004 的转录和蛋白质组学剖析揭示潜在宿主反应效应物

[0299] 为了在 MRx0004 中鉴定宿主反应的潜在效应物, 采用了三种方法。采用靶向转录测定来分析十个作为双歧杆菌-宿主相互作用的已知效应物的具有预测同一性的 MRx0004 基因 (数据未示出)。这些基因包括编码预测的粘附素和兼职 (moonlighting) 蛋白质 (oppA、烯醇酶、转醛醇酶、tadA、eftU、支链淀粉酶) 的基因 (广泛综述于 [74] 中), 以及在定殖和免疫调节中具有推定作用的基因 (MRx0004EPS 基因座的主要糖基转移酶 (pGTF) [75]、luxS [76] 和丝氨酸蛋白酶抑制剂 [77]) 和具有推定治疗作用的基因 (pks [78])。在从 MRx0004 分离的 RNA 中分析这些基因的表达, 所述 MRx0004 在液体培养中生长至对数后期和静止期, 以及已与大规模 transwell 中培养的 HT29-MTX 细胞接触 3h。qPCR 分析 (图 8) 证实, 与静止期相比, eftU、烯醇酶和 pGTF 在对数后期显著上调, 而 oppA、支链淀粉酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂和 tadA 在静止期的表达显著高于对数后期。六种基因 (eftU、烯醇酶、pGTF、oppA、丝氨酸蛋白酶抑制剂和转醛醇酶) 相对于对数后期, 响应于肠上皮细胞 (IEC) 而显著上调。从该分析显而易见, MRx0004 的基因表达通过与 IEC 的接触而改变, 推断上调基因在 MRx0004-宿主相互作用中的潜在作用。该 qPCR 分析中大多数显著上调的基因已预测在与 IEC 的粘附中的作用, 其表明这可能是 MRx0004 的重要功能性质。

[0300] 通过鉴定培养上清液中和细胞表面上存在的蛋白质,进一步表征MRx0004对其他宿主-反应效应物的表达。纳米LC-MS/MS分析在MRx0004<sub>SN</sub>中鉴定出64种蛋白质(表2)。用最高匹配肽数目(PSM)鉴定的蛋白质是支链淀粉酶( $351.33 \pm 33.62$ )、两种NlpC/P60家族蛋白质( $82 \pm 15.62$ 和 $71.67 \pm 13.61$ )、ABC转运蛋白系统的溶质结合蛋白( $56 \pm 7$ )和细胞分裂蛋白质FtsI( $56 \pm 4.36$ )。鉴定若干参与短双歧杆菌和其他细菌菌种中的宿主相互作用的兼职蛋白质,其包括转醛醇酶( $32.67 \pm 3.79$ )、GAPDH( $30 \pm 3.61$ )、DnaK( $17.67 \pm 3.21$ )、GroEL( $12.67 \pm 0.58$ )和烯醇酶( $5.67 \pm 0.58$ ) [74, 79-84]。

[0301] 使用酶促细胞刮取方法进行MRx0004细胞表面上存在的蛋白质的鉴定。使用胰蛋白酶刮取细菌细胞,并且使用LC-MS/MS鉴定经切割的表面相关蛋白质(经刮取蛋白质级分)。还收获了来自非胰蛋白酶对照的蛋白质并通过LC-MS/MS分析,允许鉴定松散地结合至表面的蛋白质(脱落蛋白质级分)。鉴定出总共106种经刮取蛋白质,其中44种经预测锚定在细胞壁中(即存在于经刮取蛋白质级分中并且不存在于脱落蛋白质级分中)(表3,图15)。如对MRx0004<sub>SN</sub>所观测到的,所鉴定的最丰富的经刮取蛋白质是支链淀粉酶( $136.67 \pm 17.47$ ),其也在脱落蛋白质级分( $79 \pm 10.54$ )中检测到。有趣的是,也在两种细胞刮取级分中鉴定出I型聚酮合酶,尽管在经刮取蛋白质级分中比在脱落蛋白质级分中鉴定出更多匹配的肽(分别为 $54.67 \pm 10.69$ 和 $11.67 \pm 6.43$ )。也在MRx0004细胞刮取级分中检测到所有在MRx0004<sub>SN</sub>中存在并且在上文列出的兼职蛋白质(表3)。此外,在经刮取蛋白质级分和脱落蛋白质级分二者中都鉴定出EfTu(PSM分别= $32 \pm 5$ 和 $24.33 \pm 8.39$ )。也在细胞刮取和上清液数据集中的一者或两者中检测到五种通过qPCR分析的基因(eftU、烯醇酶、luxS、支链淀粉酶和转醛醇酶),从而确认这些基因的翻译。来自转录和蛋白质组学数据集的数据共同使我们能够鉴定MRx0004中的潜在相关新颖效应物。

[0302] 有趣的是,淀粉分解酶支链淀粉酶(细胞刮取数据集中最丰富的蛋白质)是兼职蛋白质,已报道其可能参与化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)与糖蛋白和宿主细胞的体外粘附[85,86]。另外,已报道来自动物双歧杆菌乳酸亚种(*B. animalis* subsp. *lactis*)的DnaK和烯醇酶[82,83]和来自长双歧杆菌的EfTu[87]体外粘附至纤溶酶原。此外,两歧双歧杆菌(*B. bifidum*) A8的糖酵解酶转醛醇酶在乳酸乳球菌(*L. lactis*)中的重组表达增加了该菌株对粘蛋白的粘附性[84]。MRx0004生产这些兼职蛋白质表明它们可能在MRx0004的粘附能力中起作用,从而促进与宿主细胞表面的相互作用。尚未阐述双歧杆菌兼职蛋白质对特定宿主细胞受体和信号通路的作用,并且这些可能代表MRx0004的新颖调控途径,MRx0004通过所述新颖调控途径与宿主相互作用。

[0303] 研究MRx0004调节先天免疫反应的特征

[0304] 进行进一步实验以表征宿主对MRx0004的反应。

[0305] 为了辅助该研究,构建一种菌株(EPS<sup>阴性</sup>),其中EPS基因座的pGTF基因通过插入诱变而失活(图16A)。通过利用[88]中所述的方法而非操纵II型限制-修饰(RM)系统来构建该菌株,使来自MRx0004I型RM系统的甲基化酶和特异性亚基表达并用于使质粒DNA甲基化,接着进行转化。还产生互补EPS<sup>阴性</sup>菌株(EPS<sup>比较</sup>)和EPS<sup>阴性</sup>空载体菌株(EPS<sup>载体</sup>)作为对照。

[0306] 通过将HEK-TLR2和THP-1-NFκB报告细胞与MRx0004、EPS<sup>阴性</sup>、EPS<sup>载体</sup>和EPS<sup>比较</sup>的活的上清液处理物共温育来评估EPS对TLR2和NFκB活化的影响。所有活细菌处理都以相当的程度激活TLR2(图12A)。相比之下,MRx0004<sub>LV</sub>对NFκB的活化显著低于EPS<sup>阴性</sup><sub>LV</sub>( $p=0.003$ )和EPS

载体<sub>LV</sub> ( $p=0.009$ ), 但不低于EPS<sup>比较</sup><sub>LV</sub> (图12B)。MRx0004<sub>SN</sub>和EPS<sup>比较</sup><sub>SN</sub>之间的TLR2和NF $\kappa$ B活化没有差异, 证实在这种情况下野生型和互补型展示出相似的表型。EPS<sup>阴性</sup><sub>SN</sub>和EPS<sup>载体</sup><sub>SN</sub>对于TLR2 (对于两者,  $p<0.0001$ ) 和NF $\kappa$ B (分别为 $p=0.002$ 和 $0.0013$ ) 的刺激性显著高于MRx0004<sub>SN</sub>。这些数据表明MRx0004对TLR2的活化并非通过其EPS直接介导。相比之下, 在不存在EPS的情况下, 响应于MRx0004细胞表面的暴露, NF $\kappa$ B的活化增加。这些数据表明MRx0004的有效免疫调节最佳使用整个完整细胞来实现, 并且TLR2的MRx0004配体主要是细胞表面相关的, 但也可脱落或分泌。

[0307] 还研究了MRx0004及其衍生菌株对体外IEC炎症模型的影响。用MRx0004及其衍生物将HT29-MTX细胞引发3小时, 接着将TNF $\alpha$ 作为发炎刺激剂添加至孔中并且再持续24小时。使用该模型, 与无细菌对照相比, MRx0004不降低TNF $\alpha$ 介导的IL-8分泌 (图12C)。然而, 与基线对照相比, MRx0004处理使非TNF $\alpha$ 刺激的细胞中的IL-8分泌降低。与MRx0004的处理相比, EPS<sup>阴性</sup>处理使TNF $\alpha$ 诱导的IL-8分泌显著降低 ( $p<0.0001$ )。EPS<sup>载体</sup>处理细胞和EPS<sup>比较</sup>处理细胞中的IL-8分泌也显著低于对MRx0004的反应 (对于两种比较,  $p<0.0001$ )。有趣的是, 与报告基因测定中由EPS<sup>阴性</sup>所证实的作用不同, 表面相关抗原的未屏蔽似乎对IEC具有抗炎作用。

[0308] MRx0004对适应性免疫反应的影响

[0309] 为了检查MRx0004对适应性免疫系统的作用, 使用来自健康人类供体的外周血单核细胞 (PBMC) 来表征细胞群体和细胞因子分泌谱。PHA在这种测定中用作阳性对照 (数据未示出)。将PBMC与来自MRx0004及其衍生菌株的热灭活细菌细胞和无细胞培养上清液共温育72小时。通过流式细胞术分析T细胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)、Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) 和B细胞 (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) 表面标志物 (连同活化标志物CD25) 的表达 (门控策略参照图18)。在该模型中使用热灭活细菌而非活细菌作为处理物, 这是因为在72小时温育期间活细菌可能生长并且在营养物竞争方面超过人类细胞。细胞表面标志物和细胞因子响应于来自所有测试菌株的细菌上清液的表达与响应于媒介物 (YCFA) 观测到的表达相比并无显著不同 (数据未示出)。EPS<sup>载体</sup>和EPS<sup>比较</sup>的数据示于图20和图21中。

[0310] 与未处理的对照相比, MRx0004<sub>HK</sub>处理使活化CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>子集显著增加 ( $p=0.0038$ , 图13A), 而与对照相比, EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>并未显著增加活化CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞的百分比。与对照相比, MRx0004<sub>HK</sub>和EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>均未显著增加CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞群体的百分比 (图19A和19B、图13B)。与未处理细胞相比, MRx0004<sub>HK</sub>和EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>以相似的统计学显著程度增加B细胞群体 (分别为 $p=0.001$ 和 $0.0013$ , 图13E)。B细胞活化 (CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) 未受到任何施加的处理的显著影响 (图19-C)。在CD4<sup>+</sup>细胞群体内, 使用CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>表面标志物分析Treg细胞的比例。当与未处理的细胞相比时, 在EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>处理的PBMC中而非MRx0004<sub>HK</sub> PBMC中观察到Treg的相对百分比的增加 ( $p=0.0014$ , 图13C)。EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>相对于MRx0004<sub>HK</sub>增加Treg ( $p=0.0196$ )。与未处理的细胞相比, 对于MRx0004<sub>HK</sub>处理观测到Treg/CD8<sup>+</sup>比率向调控性T细胞反应的偏斜 (skew) ( $p=0.0008$ , 图13D)。此外, 增加的响应于MRx0004<sub>HK</sub>的CD8<sup>+</sup>正偏斜显著高于向EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>的偏斜 ( $p=0.0272$ , 图13D)。总之, 这些数据确认MRx0004的免疫刺激作用, 并且表明EPS的丧失可导致增加的Treg刺激和Treg/CD8<sup>+</sup>比率以及降低的免疫刺激作用。虽然EPS可能在CD8<sup>+</sup>细胞的活化中起作用, 但它似乎不参与显著调节B细胞群体。

[0311] 通过对主要与Th1 (IL-12p70、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ )、Th2 (IL-4)、Th17 (IL-17 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) 和Treg (IL-10) 群体相关的细胞因子进行定量, 也确定用MRx0004<sub>HK</sub>和EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>处理的PBMC的分

泌细胞因子特征(signature)。与未处理细胞相比,MRx0004<sub>HK</sub>处理显著增加TNF $\alpha$ 、IL-12p70、IFN  $\gamma$ 、IL-4和IL-17 $\alpha$ (分别为 $p=0.0038$ 、 $0.0025$ 、 $0.0036$ 、 $0.027$ 和 $0.0316$ ,图14A-D)。用EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>处理诱导TNF $\alpha$ 、IFN  $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10和IL-17 $\alpha$ 的显著反应(分别为 $p=0.0001$ 、 $0.0267$ 、 $<0.0001$ 、 $0.0004$ 和 $0.0103$ ,图14A、图14C、图14E-G)。与MRx0004<sub>HK</sub>不同,与未处理细胞相比,EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>并未显著增加IL-12p70或IL-4的分泌。与EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>相比,MRx0004<sub>HK</sub>也显著增加IL-12p70( $p=0.0118$ ,图14B),而相反,发现EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>处理比MRx0004<sub>HK</sub>产生更高浓度的IL-1 $\beta$ 和IL-10(分别为 $p=0.0008$ 和 $0.014$ ,图14E-F)。

[0312] 使用由各个别T辅助细胞亚型产生的细胞因子作为指标分析细胞因子比率以推断细菌处理是否使T辅助细胞反应向特定亚型偏斜(Th1或Th2;IL-12p70/IL-4,Treg;IL-10/IL1p70,Th17;IL-1 $\beta$ /IL12p70,图14H-J)。与未处理细胞相比,MRx0004<sub>HK</sub>处理似乎使免疫反应显著向Th1表型偏斜( $p=0.0172$ ,图14H),而与未处理细胞相比,EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>处理似乎诱导向Treg反应和Th17反应两者的偏斜( $p=0.0312$ 和 $0.0005$ ,图14I-J)。与MRx0004<sub>HK</sub>相比,EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>Treg和Th17偏斜也显著增加( $p=0.0423$ 和 $0.0008$ ,图14J)。在MRx0004<sub>HK</sub>与EPS<sup>阴性</sup><sub>HK</sub>处理之间观测到其驱动不同T细胞反应子集的能力的明显区别。

[0313] 总之,该研究中的观测结果证实MRx0004调控先天性和适应性免疫反应的促炎小组(arm)。因此,MRx0004和其他短双歧杆菌菌株可用于刺激免疫系统和治疗与免疫活性降低相关的疾病。

[0314] 实施例2-表征MRx0004eps基因座对效力的作用

[0315] 概述

[0316] 本研究的目的是表征MRx0004胞外多糖(EPS)在MRx0004的免疫刺激和治疗性质中的作用。

[0317] 材料与方法

[0318] 如实施例1中所述进行实验,其他程序如下文所述。

[0319] 永生化细胞的常规培养

[0320] 使HEK-Blue<sup>TM</sup>-hTLR2细胞(InvivoGen, San Diego, CA, USA)在补充有10% (v/v) FBS、4mM L-谷氨酰胺、4.5mg/ml葡萄糖、100U/ml青霉素、100 $\mu$ g/ml链霉素、100 $\mu$ g/ml Normocin<sup>TM</sup>(InvivoGen)、30 $\mu$ g/ml灭瘟素(blastocystin)和100 $\mu$ g/ml zeocin的DMEM中生长至90%密度。使THP1-Blue<sup>TM</sup> NF-kB细胞(InvivoGen)在补充有10% (v/v) 热灭活FBS、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素、100 $\mu$ g/ml链霉素、25mM HEPES、100 $\mu$ g/ml Normocin<sup>TM</sup>、10 $\mu$ g/ml灭瘟素(cRPMI)的RPMI 1640中生长。在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下培养细胞系。除非另有说明,否则所有试剂都由Sigma-Aldrich供应。

[0321] MRx0004 EPS基因座与相关短双歧杆菌菌株的比较分析

[0322] 在GenBank数据库中可获得的双歧杆菌属菌株基因组被用于来自双歧杆菌属菌株的推定胞外多糖基因簇的EPS簇和物理图谱的计算机分析。

[0323] MRx0004 EPS基因座的差异表达分析

[0324] 根据略作修改的制造商方案,利用RNAprotect (Qiagen) 和RNeasy微型试剂盒(Qiagen)对菌株MRx0004的对数后期培养物提取总RNA。使用裂解基质B和振荡设定为6m/s的MP Fast-Prep-24组织和细胞匀浆器(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)进行机械细胞裂解。将细胞破碎两个20秒循环,在循环之间在冰上静置1分钟。利用Agilent RNA

Screeentape (Agilent Technologies) 在 Tapestation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 上检查 RNA 质量。检查到 RNA 降解的缺失, 并且所有样品都具有  $\geq 9$  的最小 RNA 完整性数目 (Integrity Number)。MICROBExpress 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 用于耗尽 rRNA 物质。使用 Agilent RNA RNA Screeentape (Agilent Technologies) 在 Agilent 生物分析仪上检查评估 16S 和 23S rRNA 物质的缺失。将耗尽 rRNA 的 RNA 样品送至 GATC Biotech 进行链特异性文库制备, 并且在 Illumina 测序上测序以产生 150bp 的单端读段 (read)。获得每个 RNA-Seq 文库平均 22,3878,08 个 (对数后期样品) 和 18627178.6 个 (静止期样品) 原始读段, 总计分别超过 10.07Gbp 和 8.38Gbp。使用 Trimmomatic 修剪原始读段 (1) 并且使用 Bowtie 相对于 MRx0004 基因组进行质量过滤 (98.36% 对数后期样品和 98.26% (静止期样品) 读段通过 QC 并且是经比对 99.11% (LL) 和 98.72% (SP) 的经作图有效读段 (clean reads mapped)) (2)。使用 XX 和 DeSeq2 v X (Love 等人, 2014) 计算 MRx0004 EPS 基因座中各基因的各生长期的重复样品的表达水平, 随后使用 Geneious R11 (Biomatters, Auckland, New Zealand) 显现。呈现两个生长期之间的差异表达。两个样品之间的归一化值的比率的以 2 为底的对数, 并且当一个样品没有或有非常低的表达时,  $\log_2$  比率的上限为  $\pm 1,000,000$ 。

[0325] 透射电子显微术 (TEM)

[0326] 将细菌在固定溶液 (于 0.1M 磷酸钠缓冲液中的 0.5M 蔗糖、2% 多聚甲醛和 0.16% 戊二醛) 中以 1:5 稀释, 并且在室温下固定 2 小时。此后, 使 Formvar-碳涂覆的铜格网在 100 $\mu$ l 短双歧杆菌悬浮液微滴上漂浮 1 小时, 用 PBS 中的 0.02M 甘氨酸洗涤三次。用 1.0% 钼酸铵对细胞进行负染色。使用 JEM-1400 透射电子显微镜 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) 检查格网, 并且使显微照片显现。

[0327] 细菌粘附测定

[0328] 将活细菌 (如先前所述制备并重悬于共培养基中) 以 100:1 的 MOI 施加至 24 孔板中的 HT29-MTX 细胞, 并且在厌氧条件下在 37 $^{\circ}$ C 下共温育 3 小时。用 PBS 将细胞洗涤两次以去除未结合的细菌, 并且用 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 裂解。将裂解物涂铺, 并且使用回收的菌落形成单位 (CFU) 的数目来确定粘附百分比。

[0329] 结果

[0330] MRx0004 的 eps 基因座在遗传上不同于其他短双歧杆菌菌株, 并且在对数后期生长期高度表达。

[0331] 菌株 MRx0004 的基因组测序表明其带有 28Kb EPS 基因座, 发现所述基因座编码 27 个基因, 代表了预测在短双歧杆菌中 EPS 生物合成所需的完整全套功能。该区域包括: 引发糖基转移酶、四种额外糖基转移酶、在跨膜蛋白下游编码的焦磷酸噻胺结合蛋白、翻转酶和链长决定子 (图 9)。大多数短双歧杆菌 EPS 基因座 (包括菌株 MRx0004 的 EPS 基因座) 侧接假设蛋白 (将 MRx0004 区域延伸至 31.5Kb), 所述假设蛋白已被排除在图 9 中所呈现的短双歧杆菌 EPS 基因座的代表之外。大多数 (16/19) 于图 9 中所示的菌株是婴儿分离物, 其基因组在公共数据库中过度呈现。认为超过 50Kb 的短双歧杆菌 EPS 区域代表编码所有产生 EPS 阳性表型所需功能的完整基因座 [89]。相比之下, 当这些区域  $< 30$ Kb 时, 认为其代表不完整或残留的基因座 [89]。

[0332] 比较分析将 EPS 基因座鉴定为菌株 MRx0004 (数据未示出) 与其他短双歧杆菌菌株

的基因组之间的遗传差异的主要区域。将MRx0004EPS基因座与可公开获得的短双歧杆菌基因组进行比较。EPS基因座展示与菌株MRx0004的高水平的序列同一性(ID)和基因同线性的短双歧杆菌菌株示于图9中,并且根据其菌株MRx0004的相似性(在操纵子的长度上的平均nt ID%)排序。短双歧杆菌NRBB51(婴儿(母乳喂养)分离物)与菌株MRx0004在两个基因座的整个长度上共有最高水平的核苷酸同一性(ID) (91.5%)。编码两种菌株中预测转座酶的中心1.3Kb区域代表菌株MRx0004与NRBB51之间的多样性的主要区域。在MRx0004基因座的起点和终点编码的基因展示出与其他短双歧杆菌分离物的最高水平的序列保守性(图9)。对于主要EPS生物合成步骤必不可少的MRx0004的pGTF与比较菌株中的同源物共有92.2%配对ID(aa)。涵盖链长调控物的4Kb区域以及编码假设蛋白和跨膜蛋白的基因在所检查的菌株中共有98.3%nt ID。编码假设蛋白和转座酶的基因代表菌株MRx0004与十个最密切相关的EPS基因座之间的序列多样性的主要区域(图9)。相比之下,发现与菌株MRx0004的EPS基因座较不相似的短双歧杆菌EPS基因座(图9中的底部9个菌株)展示出对EPS产生至关重要的基因(包括gtf、聚合酶和乙酰基转移酶基因)的数目和顺序的变异(图9)。

[0333] 为了确定MRx0004的EPS基因座是否在对数后期或静止期生长期间更高转录,对在YCFA中生长的菌株MRx0004的单培养物实施差异表达分析。(图9B)。大多数预测主要负责MRx0004EPS合成(如上所述)的基因在对数后期生长期间上调。MRx0004EPS基因座编码10种假设蛋白和5种转座酶,其代表在MRx0004静止期生长期间上调的唯一基因类别(图9)。假设蛋白在MRx0004EPS合成中的作用仍然未知。

[0334] MRx0004的EPS阴性菌株的产生

[0335] 研究MRx0004EPS在宿主-微生物相互作用和免疫调节中的作用,并且如上文所述构建一种菌株(EPS<sup>阴性</sup>),其中EPS基因座的pGTF基因通过插入诱变而失活(图16A)。通过利用[88]中所述的方法而非操纵II型限制-修饰(RM)系统来构建此菌株,使来自MRx0004I型RM系统的甲基化酶和特异性亚基表达并用于使质粒DNA甲基化,之后进行转化。还产生互补EPS<sup>阴性</sup>菌株(EPS<sup>比较</sup>)和EPS<sup>阴性</sup>空载体菌株(EPS<sup>载体</sup>)作为对照。与MRx0004相比,EPS<sup>阴性</sup>和EPS<sup>载体</sup>展示出增加的自动聚集表型(图16B)。EPS<sup>比较</sup>的聚集性低于EPS<sup>阴性</sup>和EPS<sup>载体</sup>,但其自动聚集似乎与MRx0004相比有所增加,表明这种菌株可能未完全恢复至野生型EPS表型。

[0336] 使用透射电子显微术(TEM)研究MRx0004和EPS<sup>阴性</sup>的EPS表型。与MRx0004相比在EPS<sup>阴性</sup>菌株不存在EPS示于图10A和图10B中。使用体外IEC模型分析野生型MRx0004及其衍生菌株的粘附能力。EPS<sup>阴性</sup>与IEC的粘附性为MRx0004的两倍以上(分别为47.5%粘附性相对于18.7%, $p=0.006$ ) (图10C),表明EPS的缺失增加EPS<sup>阴性</sup>的粘附能力。用EPS<sup>载体</sup>维持在EPS<sup>阴性</sup>中所见增加的粘附表型(40.1%粘附,相对于MRx0004, $p=0.03$ ),但当与任何其他菌株比较时,EPS<sup>比较</sup>的粘附(34.1%)并无显著不同,进一步暗示EPS<sup>比较</sup>逆转为野生型表型是不完全的。

[0337] MRx0004中的EPS耗尽暴露参与宿主刺激的表面蛋白质

[0338] EPS<sup>阴性</sup>对IEC的粘附增加表明EPS的耗尽可能导致表面相关蛋白质的暴露增加或“未屏蔽”。在MRx0004和EPS<sup>阴性</sup>表面相关蛋白质与IEC接触后分析其组成。在与HT29-MTX细胞接触3h后,如先前所述用胰蛋白酶刮取细菌细胞,并且通过LC-MS/MS分析所得的刮取和脱落的蛋白质级分。与IEC接触后的MRx0004细胞刮取产生55种刮取蛋白质(预测其中34种为表面锚定)和24种脱落蛋白质(图11A)。与IEC接触后,EPS<sup>阴性</sup>细胞的刮取含有比MRx0004多得多的蛋白质,刮取蛋白质级分中有101种蛋白质,而脱落蛋白质级分中有45种蛋白质(图

11B)。除了三种在MRx0004脱落蛋白质级分中鉴定出的蛋白质(参与碳水化合物、脂质和蛋白质代谢的酶)之外,所有鉴定的蛋白质都存在于两种菌株的刮取蛋白质级分中。

[0339] MRx0004和EPS<sup>阴性</sup>刮取蛋白质级分的比较鉴定出54种存在于两个样品中的蛋白质和47种对EPS<sup>阴性</sup>菌株特异的蛋白质(图11C)。在MRx0004刮取蛋白质数据集中独特鉴定的唯一蛋白质是NlpC/P60家族蛋白质。对于EPS<sup>阴性</sup>菌株,通过细胞刮取收获的蛋白质的数目高于MRx0004,推断EPS耗尽促进更好地获取用于胰蛋白酶切割的表面蛋白质。另外,已知参与双歧杆菌和其他属中宿主相互作用的蛋白质在EPS<sup>阴性</sup>刮取蛋白质级分中比在MRx0004的刮取蛋白质级分中更丰富(如通过所鉴定肽的数目/ $\mu\text{g}$ 总蛋白质所评估)(表4)。这些结果进一步增加EPS耗尽导致未屏蔽效应,从而暴露表面蛋白质和原本被MRx0004EPS遮蔽的潜在MRx0004免疫原的假设的可信度。

[0340] 还通过LC-MS/MS分析EPS<sup>阴性</sup>培养上清液的蛋白质含量,并且确认EPS的缺乏导致EPS<sup>阴性</sup>菌株在细胞外环境中可能脱落和分泌的蛋白质数目增加(图17)。在EPS<sup>阴性</sup><sub>SN</sub>中鉴定出总共146种蛋白质,相比之下,在MRx0004<sub>SN</sub>中仅鉴定出64种蛋白质,其中87种仅在EPS<sup>阴性</sup><sub>SN</sub>中检测到,而59种在两个样品中都检测到。除GAPDH之外,在MRx0004<sub>SN</sub>中鉴定和上面讨论的兼职蛋白质都在EPS<sup>阴性</sup><sub>SN</sub>中以较高丰度检测到,所述GAPDH在两个样品之间相当(MRx0004<sub>SN</sub>和EPS<sup>阴性</sup><sub>SN</sub>中为 $30 \pm 3.61$ 和 $28.33 \pm 0.58$ )。有趣的是,在EPS<sup>阴性</sup><sub>SN</sub>中排他性地检测到已显示在乳酸乳球菌和长双歧杆菌中的人类纤溶酶原结合中起作用的胆酰甘氨酸(choloylglycine)水解酶(胆盐水解酶)和EfTu[80,87]。胆盐水解酶也可保护共生物种免受肠中的环境应力[90]。与MRx0004<sub>SN</sub>相比,在EPS<sup>阴性</sup><sub>SN</sub>中的蛋白质的检测增加表明,在缺失EPS的情况下未屏蔽可导致MRx0004表面相关蛋白质的脱落或分泌增加。

#### [0341] 结论

[0342] 比较基因组分析证实,MRx0004中负责EPS合成的基因座在遗传上不同于其他短双歧杆菌菌株。在该区域中观测到的遗传变异数可能有助于增强MRx0004和相关菌株的效力和治疗效用。

[0343] EPS作为MRx0004:宿主相互作用的介体和作为免疫反应的效应物的潜在重要性受到其与IEC接触后其pGTF表达的相对增加的支持。除pGTF外,qPCR分析中大多数其他显著上调的基因也已预测在与IEC的粘附中的作用,暗示这可能是MRx0004的重要功能性质。MRx0004的IV型菌毛相关基因tadA在体外培养中表达,由于先前观测到短双歧杆菌UCC2003的Tad菌毛不在体外条件下产生,因此这是有趣的[91]。丝氨酸蛋白酶抑制剂的表达也响应于IEC而显著增加。最近已报道来自长双歧杆菌NCC2705的丝氨酸蛋白酶抑制剂减少体内腹腔疾病模型的小肠内上皮内淋巴细胞的浸润[92],从而诱导免疫刺激和保护作用,这表明短双歧杆菌并且特别是MRx0004的丝氨酸蛋白酶抑制剂可能具有相似的免疫调节作用。

[0344] 上清液和细胞刮取物的蛋白质组学分析检测到大量在碳水化合物代谢中具有预测作用的蛋白质。有趣的是,淀粉分解酶支链淀粉酶(细胞刮取数据集中最丰富的蛋白质)是兼职蛋白质,已报道其可能参与化脓性链球菌与糖蛋白和宿主细胞的体外粘附[85,86]。另外,已报道来自动物双歧杆菌乳酸亚种的DnaK和烯醇酶[82,83]和来自长双歧杆菌的EfTu[87]体外粘附至纤溶酶原。此外,两歧双歧杆菌A8的糖酵解酶转醛醇酶在乳酸乳球菌中的重组表达增加这种菌株对粘蛋白的粘附性[84]。MRx0004生产这些兼职蛋白质表明其可能在MRx0004的粘附能力中起作用,从而促进与宿主细胞表面的相互作用。这些双歧杆菌

兼职蛋白质可能对介导MRx0004对免疫系统的增强作用的特定宿主细胞受体和信号通路具有特定作用。

[0345] MRx0004诱导活化CD8<sup>+</sup>子集的显著增加,这似乎与EPS的存在部分地相关。

[0346] 与MRx0004相比,EPS<sup>阴性</sup>处理显著增加Treg。这表明EPS的去除暴露了另一种能够与宿主细胞相互作用并促进Treg反应的细菌表面组分。CD8<sup>+</sup>群体和Treg群体二者中的波动都很明显。EPS<sup>阴性</sup>诱导向Treg反应的显著偏斜,如通过与基线相比显著增加的Treg/CD8比率所示。这暗示EPS<sup>阴性</sup>中细胞表面的未屏蔽引起抗炎作用,并且MRx0004中存在EPS支持其免疫刺激效力。

[0347] 发现MRx0004的EPS直接参与IL-12p70的分泌。此外,所有三种测试的Th1细胞因子(IL-12p70、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ )的分泌都被MRx0004<sub>HK</sub>显著上调,表明这种菌株诱导向Th1反应的偏斜,所述Th1反应部分地通过MRx0004<sub>HK</sub>的EPS介导。MRx0004<sub>HK</sub>也显著诱导Th2细胞因子IL-4,并且上调IL-10、IL-1 $\beta$ 和IL-17 $\alpha$ ,但不显著,从而推断这种菌株可诱导T辅助细胞微环境的转变。Th1的诱导可改善体内肠障壁稳定性并且有益于维持免疫稳态。

[0348] MRx0004的EPS可具有特异性免疫调控作用,即调控CD8<sup>+</sup>、Treg和Th1反应,并且这些作用可提供增强的效力和治疗功效。

[0349] 实施例3-细菌接种物在小鼠癌症模型中的功效

[0350] 概述

[0351] 如前述实施例中所述,本发明人已鉴定出短双歧杆菌并且尤其MRX004菌株的新的免疫刺激作用。鉴于上文所呈现的新数据,包含短双歧杆菌并且特别是MRX004菌株的组合物预期有效刺激免疫系统并且治疗与免疫系统活性降低或受益于免疫系统活性增加相关的疾病。

[0352] 癌症是可受益于攻击肿瘤的免疫系统活性增加的疾病。与上文所呈现的新数据和MRX004的新免疫刺激作用一致,MRX004在下面的研究中显示有效降低小鼠肿瘤模型中的肿瘤体积,这证实施用MRX004有效治疗疾病。

[0353] 该研究在四种肿瘤模型中测试包含根据本发明的细菌菌株的组合物的功效,并且与抗CTLA抗体比较了功效。

[0354] 材料

[0355] 测试物质-细菌菌株#MRX004,短双歧杆菌。

[0356] 参考物质-抗CTLA-4抗体(克隆:9H10,目录:BE0131,同种型:叙利亚仓鼠(Syrian Hamster) IgG1,Bioxcell)。

[0357] 测试和参考物质媒介物-细菌培养基(酵母提取物-酪胺-脂肪酸培养基(YCFA))。每天注射给小鼠,用PBS稀释抗体(参考:BE14-516F,Lonza,France)。

[0358] 处理剂量-细菌:200 $\mu$ L中 $2 \times 10^8$ 个。以10mg/kg/注射来注射抗CTLA-4。根据小鼠最近体重,以10mL/kg/施用的剂量体积施用抗CTLA-4(即,对于一只称重为20g的小鼠,将施用200 $\mu$ L测试物质)。

[0359] 施用途径-通过经口管饲(经口,PO)经由插管施用细菌接种物。每天将插管除污。将抗CTLA-4注射至小鼠的腹膜腔中(腹膜内,IP)。

[0360] 细菌菌株的培养条件-细菌菌株的培养条件如下:

[0361] • 移取10mL YCFA(从制备的10mL E&O实验室瓶中)至Hungate管中

- [0362] • 将管密封并使用注射器输入和排气系统用CO<sub>2</sub>冲洗
- [0363] • 对Hungate管进行高压灭菌
- [0364] • 在冷却时,用1mL甘油储备液接种Hungate管
- [0365] • 将管置于37℃静态温育箱中持续约16小时。
- [0366] • 第二天,取1mL这种继代培养物并接种10mL YCFA(再次预热冲洗的Hungate管,全部一式两份)
- [0367] • 将其于37℃的静态温育箱中放置5至6h
- [0368] 癌细胞系和培养条件-
- [0369] 所用细胞系详述于下表中:

| 细胞系         | 类型   | 小鼠品系    | 来源               |
|-------------|------|---------|------------------|
| EMT-6       | 乳腺癌  | BALB/c  | ATCC             |
| LL/2 (LLC1) | 肺癌   | C57BL/6 | ATCC CRL1642     |
| Hepa1-6     | 肝细胞癌 | C57BL/6 | IPSEN INNOVATION |

[0371] 由可移植鼠类乳腺癌建立EMT-6细胞系,在BALB/cCRGL小鼠中植入增生性乳腺小泡结节后出现所述鼠类乳腺癌[93]。

[0372] 由C57BL小鼠的带有肿瘤的肺建立LL/2 (LLC1) 细胞系,所述肿瘤是由原发性Lewis肺癌的植入引起[94]。

[0373] Hepa 1-6细胞系是在C57/L小鼠中产生的BW7756小鼠肝细胞瘤的衍生物[95]。

[0374] 细胞培养条件-所有细胞系都在37℃下在加湿气氛(5%CO<sub>2</sub>、95%空气)中作为单层生长。培养基和补充剂示于下表中:

| 细胞系         | 培养基                                              | 补充剂                                                               |
|-------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| EMT6        | 含有 2 mM L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 (参考: BE12-702F, Lonza) | 10%胎牛血清(参考: #3302, Lonza)                                         |
| LL/2 (LLC1) | 含有 2 mM L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 (参考: BE12-702F, Lonza) | 10%胎牛血清(参考: #3302, Lonza)                                         |
| Hepa1-6     | DMEM (参考: 11960-044, Gibco)                      | 10%胎牛血清(参考: #3302, Lonza)<br>2 mM L-谷氨酰胺<br>青霉素-链霉素(Sigma G-6784) |

[0376] 对于实验使用,通过在不含钙或镁并且通过添加完全培养基中和的汉克氏培养基(参考:BE10-543F, Lonza)中用胰蛋白酶-维耳新(versene)(参考:BE17-161E, Lonza)处理5分钟,从培养瓶中分离粘附肿瘤细胞。在血球计中对细胞进行计数并通过0.25%台盼蓝排除测定评估其活力。

[0377] 动物使用-

[0378] 从CHARLES RIVER(L'Arbresles)获得匹配重量和年龄的健康雌性Balb/C(BALB/cByJ)小鼠用于EMT6模型实验。

[0379] 从CHARLES RIVER(L'Arbresles)获得匹配重量和年龄的健康雌性C57BL/6(C57BL16J)小鼠用于LL/2(LLC1)和Hepa1-6模型实验。

[0380] 根据FELASA准则,使动物维持SPF健康状态,并且遵循根据法国和欧洲法规(French and European Regulations)的动物饲养和实验程序以及NRC实验动物照护和使用指南(Care and Use of Laboratory Animals) [96,97]。将动物维持在饲养室中受控环境条件下:温度:22±2℃,湿度55±10%,光周期(12h光照/12h黑暗),HEPA过滤空气,每小时15次空气交换,无再循环。动物围栏具有无菌且足够的空间,所述空间有如所述的垫铺材料、食物和水、环境和社群丰富化(成群饲养):通风架中的900cm<sup>2</sup>笼(参考:绿色,Tecniplast)、Epicea垫料(SAFE)、10kGy辐照饮食(A04-10,SAFE)、用于免疫活性啮齿类动物的完整食品-R/M-H挤出物、来自水瓶的水。

[0381] 实验设计和治疗

[0382] 抗肿瘤活性,EMT6模型

[0383] 治疗时间表-首次给药的开始视为D0。在D0,使用Vivo manager® 软件(Biosystemes,Couternon,France)将未植入小鼠根据其个体体重随机分组,每组9只/8只。在D0,小鼠接受媒介物(培养基)或细菌菌株。在D14,如下文所述,向所有小鼠植入EMT-6肿瘤细胞。在D24,来自阳性对照组的小鼠接受抗CTLA-4抗体治疗。

[0384] 治疗时间表汇总于下表中:

| 组        | 动物数目 | 处理       | 剂量                    | 途径 | 治疗时间表  |
|----------|------|----------|-----------------------|----|--------|
| 1        | 8    | 未处理      | -                     | -  | -      |
| 2        | 8    | 媒介物(培养基) | -                     | PO | Q1Dx42 |
| 3        | 9    | 细菌菌株#1   | 2×10 <sup>8</sup> 个细菌 | PO | Q1Dx42 |
| (MRX004) |      |          |                       |    |        |
| 4        | 8    | 抗CTLA4   | 10 mg/kg              | IP | TWx2   |

[0387] 如下文所述进行动物监测。

[0388] 在动物中诱导EMT6肿瘤-在D14,通过将于200μL RPMI 1640中的1×10<sup>6</sup>个EMT-6细胞皮下注射至小鼠的右侧腹中来诱导肿瘤。

[0389] 安乐死-当每只小鼠达到如下文所述的人道终点时,或在开始给药后最多6周后,对每只小鼠实施安乐死。

[0390] 抗肿瘤活性,LL/2(LLC1)模型

[0391] 治疗时间表-首次给药的开始视为D0。在D0,使用Vivo manager® 软件(Biosystemes,Couternon,France)将未植入小鼠根据其个体体重随机分成7组,每组9只/8只。在D0,小鼠将接受媒介物(培养基)或细菌菌株。在D14,如下文所述,向所有小鼠植入LL/2肿瘤细胞。在D27,来自阳性对照组的小鼠接受抗CTLA-4抗体治疗。

[0392] 治疗时间表汇总于下表中:

| [0393] | 组 | 动物数目 | 处理              | 剂量                    | 途径 | 治疗时间表  |
|--------|---|------|-----------------|-----------------------|----|--------|
|        | 1 | 8    | 未处理             | -                     | -  | -      |
|        | 2 | 9    | 媒介物(培养基)        | -                     | PO | Q1Dx42 |
|        | 3 | 9    | 细菌菌株#1 (MRX004) | 2×10 <sup>8</sup> 个细菌 | PO | Q1Dx42 |
|        | 4 | 8    | 抗 CTLA4         | 10 mg/kg              | IP | TWx2   |

[0394] 如下文所述进行动物监测。

[0395] 在动物中诱导LL/2 (LLC1) 肿瘤-在D14,通过将于200μL RPMI1640中的1×10<sup>6</sup>个LL/2 (LLC1) 细胞皮下注射至小鼠的右侧腹中来诱导肿瘤。

[0396] 安乐死-当每只小鼠达到如下文所述的人道终点时,或在开始给药后最多6周后,对每只小鼠实施安乐死。

[0397] 抗肿瘤活性,Hepa1-6模型

[0398] 治疗时间表-首次给药的开始视为D0。在D0,使用Vivo manager® 软件(Biosystemes,Couternon,France)将未植入小鼠根据其个体体重随机分成7组,每组9只。在D0,小鼠接受媒介物(培养基)或细菌菌株。在D14,如下文所述,向所有小鼠植入Hepa1-6肿瘤细胞。在D16,来自阳性对照组的小鼠接受抗CTLA-4抗体治疗。

[0399] 治疗时间表汇总于下表中:

| [0400] | 组 | 动物数目 | 处理              | 剂量                    | 途径 | 治疗时间表  |
|--------|---|------|-----------------|-----------------------|----|--------|
|        | 1 | 9    | 未处理             | -                     | -  | -      |
|        | 2 | 9    | 媒介物(培养基)        | -                     | PO | Q1Dx42 |
|        | 4 | 9    | 细菌菌株#2 (MRX004) | 2×10 <sup>8</sup> 个细菌 | PO | Q1Dx42 |
|        | 7 | 9    | 抗 CTLA4         | 10 mg/kg              | IP | TWx2   |

[0401] 如下文所述进行动物监测。

[0402] 通过脾内注射在动物中原位诱导Hepa 1-6肿瘤细胞-在D14,经由脾内注射将于50 μL RPMI 1640培养基中的一百万(1×10<sup>6</sup>)个Hepa1-6肿瘤细胞移植至小鼠中。简言之,制成左肋下侧腹小切口并且从腹内取出脾脏。将脾脏暴露于无菌纱布垫上,并且在视觉控制下用27号针头注射细胞悬浮液。在细胞接种后,切除脾脏。

[0403] 安乐死-当每只小鼠达到如以下部分中所述的人道终点时,或在开始给药后最多6周后,对每只小鼠实施安乐死。

[0404] 评价安乐死时的肿瘤负荷-在终止时,收集肝脏并称重。

[0405] 动物监测

[0406] 临床监测-每周两次用卡尺测量肿瘤的长度和宽度,并且通过下式估计肿瘤的体积[98]:

$$[0407] \quad \text{肿瘤体积} = \frac{\text{宽度}^2 \times \text{长度}}{2}$$

[0408] 人道终点[99]:疼痛、痛苦或困苦的象征:疼痛姿势、疼痛面罩、行为;超过正常体重的10%、但不超过2000mm<sup>3</sup>的肿瘤;干扰行走或营养的肿瘤;溃疡性肿瘤或组织侵蚀;连续3天保持体重减轻20%;身体状况差、消瘦、恶病质、脱水;长期缺乏对外部刺激的自主性反应;呼吸急促困难(Rapid laboured breathing)、贫血、大量出血;神经系统征象:绕圈、抽搐、麻痹;体温持续下降;腹胀。

[0409] 麻醉-异氟烷气体麻醉用于所有程序:手术或肿瘤接种、静脉内注射、血液采集。氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉用于立体定向(stereotaxia)外科手术。

[0410] 止痛-卡普洛芬(carprofen)或多模式卡普洛芬/丁丙诺啡(buprenorphine)止痛方案适应于外科手术的严重程度。为所有疼痛性程序提供非药理学照护。另外,在主治兽医的建议下,提供不干扰研究的药理学照护(主题治疗)。

[0411] 安乐死-通过过剂量气体麻醉(异氟烷)、接着进行颈椎脱位或放血进行动物安乐死。

[0412] 结果

[0413] 抗肿瘤活性, EMT6模型

[0414] 结果示于图1中。用本发明的细菌菌株处理使得肿瘤体积相对于两种阴性对照明显减小。如所预期,已知激活免疫系统的阳性对照也使得肿瘤体积减小

[0415] 抗肿瘤活性, LL/2 (LLC1) 模型

[0416] 结果示于图2中。阴性对照和阳性对照表达不如所预期的,这是因为用阳性对照治疗的小鼠的肿瘤体积大于阴性对照组。然而,用本发明的细菌菌株治疗的小鼠中的肿瘤体积与阳性对照组相当,这与有用的治疗和免疫刺激作用一致。

[0417] 抗肿瘤活性, Hepa1-6模型

[0418] 结果示于图3中。未处理阴性对照表现不如所预期的,这是因为该组中的肝脏重量低于其他组。然而,媒介物阴性对照和阳性对照组都表现为如所预期的,这是因为单独用媒介物处理的小鼠比用抗CTLA4抗体处理的小鼠具有更大的肝脏,反映了媒介物阴性对照组中更大的肿瘤负荷。用本发明的细菌菌株处理使得肝脏重量(和因此肿瘤负荷)相对于媒介物阴性对照组中的小鼠明显降低。

[0419] 这些数据证实MRX004有效治疗癌症,并且鉴于实施例1和2中的数据,这些数据支持菌株MRX004可用于治疗或预防与免疫系统活性降低相关的其他疾病。

[0420] 实施例4-酶促活性的表征

[0421] 分析概况指数 (Analytical Profile Index) (**API®**) 测试系统由含有测定细菌菌种中的酶促活性的小型化生化测试的条带组成。使用两种API测试系统对MRX004 (以登录号 NCIMB 42380保藏的细菌) 进行表征: Rapid ID 32A-该系统专门设计用于厌氧物种,并且涵盖用于碳水化合物、氨基酸和硝酸盐代谢以及碱性磷酸酶活性的测试;和**API®** 50 CH-该系统测试49种碳水化合物源的发酵,并且可与**API®** CHL Medium结合用于分析厌氧物种。

[0422] 依照制造商的说明书对细菌菌落实施Rapid ID 32A测试。简言之,将细菌在厌氧操作台中在37°C下在YCFA琼脂上培养24小时。使用无菌的5μl接种环从板中移出菌落,并且

将其重悬于2ml的 **API®**悬浮培养基安瓿中,直至达到与McFarland标准4号的密度大致相当的密度。向Rapid ID 32A条带上的各杯状凹(cupule)中添加55微升细菌悬浮液,并且用两滴矿物油覆盖尿素酶测试物。用塑料盖覆盖条带并在37℃下有氧温育4小时,接着使用以下试剂使底行杯状凹显色:NIT:NIT1和NIT2各1滴;IND:1滴詹姆斯试剂(James reagent);所有剩余的杯状凹:1滴坚牢蓝(FastBlue)试剂。将条带在室温下温育5分钟,接着记录各杯状凹的颜色并指定阴性值、中间阳性值或阳性值。

[0423] Rapid ID 32A分析结果示于图4中。MRX004对几种碳水化合物源(即 $\alpha$ -半乳糖苷酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\alpha$ -阿拉伯糖、甘露糖和棉子糖)、以及氨基酸(精氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、酪氨酸、甘氨酸和组氨酸)的发酵测试呈阳性。

[0424] 在MRX004和四种短双歧杆菌型菌株之间实施比较Rapid ID 32A分析,所述四种菌株在图4B中注释为短双歧杆菌参考1(DSM20091)、短双歧杆菌参考2(DSM 20213)、短双歧杆菌参考6(JCM7017)和短双歧杆菌参考7(UCC2003)。该分析证实,MRX004是经测试使多糖棉子糖发酵的唯一菌株,这可能有重大意义,因为棉子糖参与例如胞外多糖的细菌组分的产生,并且据报道棉子糖发酵也可对宿主产生例如以下的作用:增加盲肠丁酸盐,增加胃肠道增殖和减轻体重。

[0425] 实施**API®**50 CH测试以进一步检查MRX004中的碳水化合物代谢。依照制造商的说明书,将细菌在厌氧操作台中在37℃下在10ml YCFA肉汤中培养16-18小时。将该培养物在10ml **API®** CHL培养基中稀释,以达到与McFarland标准2号大致相当的密度,并且将110 $\mu$ l的该混合物用于接种一组**API®**50 CH测试条上的各杯状凹。将测试条在厌氧操作台中在加湿温育箱中在37℃下温育48小时,接着记录各杯状凹的颜色并指定阴性值、中间阳性值、阳性值或可疑值。

[0426] 使用**API®**50,MRX004对于以下碳水化合物源的利用测试呈阳性:淀粉(amidon/starch)、苦杏仁苷、熊果苷、纤维二糖、七叶苷、半乳糖、龙胆二糖、葡萄糖、糖原、果糖、岩藻糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、甘露糖醇、蜜二糖、松三糖、甲基 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷、N-乙酰氨基葡萄糖、核糖、蔗糖(saccharose/sucrose)、水杨苷、山梨糖醇、海藻糖、松二糖和木糖醇(图5)。这些结果与针对Rapid ID 32A测试获得的结果相关,这是因为MRX004在两种测试系统中都表现出对半乳糖、葡萄糖、甘露糖和棉子糖的发酵。

[0427] 实施例5-在YCFA培养基中附着至人类细胞

[0428] 概述

[0429] 在YCFA培养基中的3个不同时间点确定菌株MRX004和多个其他短双歧杆菌菌株与人类细胞的结合水平。将附着至人类细胞的细菌重悬于培养基中,并且然后分析培养基的光密度,光密度越高,细菌细胞数越高,因此细菌细胞与人类细胞的结合水平越高。发现MRX004菌株与短双歧杆菌参考菌株相比,展示出对人类细胞的附着降低。

[0430] 结果和分析

[0431] 实验结果示于图6中。

[0432] 如图6中所示,参考短双歧杆菌菌株在所有时间点都显示出对人类细胞的高水平附着。另一方面,MRX004菌株对人类细胞的附着水平显著降低。因此,菌株MRX004对人类细胞的低粘附性可增加本发明组合物对免疫系统的有益作用。

#### [0433] 实施例6-稳定性测试

[0434] 在25℃或4℃下将含有至少一种本文中所述的细菌菌株的本文中所述的组合物储存在密封容器中并且将所述容器置于具有30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或95%相对湿度的气氛中。在1个月、2个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年后,至少50%、60%、70%、80%或90%的细菌菌株应残留,如以通过标准方案测定的菌落形成单位测量。

#### [0435] 实施例7-抗微生物活性

#### [0436] 引言

[0437] 该实验的目的是测试几种来源于人类婴儿的短双歧杆菌菌株针对各种指示菌株的抗微生物活性潜力,以及评估它们是否在体外产生细菌素。

#### [0438] 方法

[0439] 选择一组菌株作为指示菌株(表5),其包括密切相关的革兰氏阳性细菌、其他革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌,先前已显示这些细菌受双歧杆菌属物种抑制[错误!未定义书签。]。

#### [0440] 共培养测定

[0441] 使菌株在37℃(对于枯草芽孢杆菌,为30℃)下在厌氧条件(对于大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌,为好氧条件)下,从研究细胞库(Research Cell Bank)(对于短双歧杆菌测试和参考菌株)或从珠粒储备液(对于指示菌株)生长16h。在YCFA板(E&O Labs, UK)上制得指示菌株菌苔(lawn),使其干燥,并且将10μl测试菌株培养物点样于菌苔顶部上。将板在厌氧条件下于37℃下温育48h(对于大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌,在厌氧条件下在37℃下温育24h,接着在好氧条件下于37℃下温育24h)。以一式三份进行各测定(除了以下为一式两份:枯草芽孢杆菌NCIMB8045与MRx0004、测试1、测试2、测试3、测试4、测试5、测试6、测试7和测试8,以及短双歧杆菌DSM20213、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) NCIMB8826、生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*) ATCC3584和金黄色葡萄球菌NCIMB9518与所有短双歧杆菌菌株)。

[0442] 通过测量观测到的抑制区的宽度来评估抗微生物活性,所述抑制区是测试菌株斑点周围的透明区(图22)。对于各生物学重复,对各菌株给出0至3之间的评分。

#### [0443] 培养上清液

[0444] 使用琼脂扩散法来测试培养上清液的抗微生物潜力。简言之,将100μl经过滤无细胞上清液点样于预先接种有指示菌株菌苔(如上所述)的YCFA琼脂上,至穿孔至琼脂中的孔中。将板静置1h以使其扩散,然后在厌氧条件(对于大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌为好氧条件)下于37℃下温育48h。进行三个生物学重复。

#### [0445] 结果

#### [0446] 共培养

[0447] 大多数测试的短双歧杆菌菌株展现出针对大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和枯草芽孢杆菌的拮抗活性(表6)。短双歧杆菌DSM 20091是抑制短双歧杆菌DSM20213生长的唯一测试菌株。MRx0004和其他测试短双歧杆菌菌株展示出针对大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和枯草芽孢杆菌的抗微生物活性(表6),所观测到的总体抑制活性高于短双歧杆菌参考菌株。MRx0004、测试1、测试2、测试3、测试7、测试8、测试11和

测试12展现出特别有效的抗微生物活性。在测试条件下未检测到针对金黄色葡萄球菌、生孢梭菌和植物乳杆菌的拮抗活性。

[0448] 这些数据表明MRX0004和相关测试菌株可用于治疗细菌感染。

[0449] 培养上清液

[0450] 针对同一组指示菌株测试无细胞上清液的抗微生物活性。对于所有针对任何指示菌株测试的短双歧杆菌菌株都未观测到抑制(数据未示出,  $n=3$ )。这表明在共培养测定中观测到的抑制并非归因于抗微生物分子的分泌。

[0451] 实施例8-酶促活性的进一步表征

[0452] 实施例4中所述的API 32A测试系统用于表征实施例7中测试的短双歧杆菌菌株。依照制造商的说明书对细菌菌落实施Rapid ID 32A测试。简言之,将细菌在厌氧操作台中在37°C下在YCFA琼脂上培养24小时。使用无菌的5 $\mu$ l接种环从板移出菌落,并且将其重悬于2ml的API®悬浮培养基安瓿中,直至达到与McFarland标准4号的密度大致相当的密度。向Rapid ID 32A条带上的各杯状凹中添加55微升细菌悬浮液,并且用两滴矿物油覆盖尿素酶测试物。用塑料盖覆盖条带并且在37°C下有氧温育4小时,接着使用以下试剂使底行杯状凹显色:NIT:NIT1和NIT2各1滴;IND:1滴詹姆斯试剂;所有剩余的杯状凹:1滴坚牢蓝试剂。将条带在室温下温育5分钟,接着记录各杯状凹的颜色并指定阴性值、中间阳性值或阳性值。

[0453] Rapid ID 32A分析结果示于图23中。如实施例4中所见,MRX004对几种碳水化合物源(即 $\alpha$ -半乳糖苷酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\alpha$ -阿拉伯糖、甘露糖和棉子糖)、以及氨基酸(精氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、酪氨酸、甘氨酸和组氨酸)的发酵测试呈阳性。

[0454] 也对在实施例7中研究的其他测试短双歧杆菌菌株(测试1-测试12)和短双歧杆菌参考菌株(DSM 20091、DSM 20213、JCM 7017和NCIMB 8807/UCC2003)进行了Rapid ID 32A分析。测试菌株通常显示出比参考菌株更大的抗微生物活性,并且显示出与MRX004相似的代谢模式。

[0455] 有趣的是,MRX004和测试菌株使多糖棉子糖发酵,而四种参考菌株则不会。如上所述,棉子糖参与例如胞外多糖的细菌组分的产生。

[0456] 此外,MRX004和测试3都具有有效的抗微生物活性,并且都展现出 $\beta$ -葡萄糖苷酶和 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵。

[0457] MRX004和测试2都具有有效的抗微生物活性,并且都未展现出N-乙酰基- $\beta$ -氨基葡萄糖苷酶的阳性发酵。

[0458] MRX004和测试8都具有有效的抗微生物活性,并且都展现出 $\alpha$ -半乳糖苷酶和 $\alpha$ -阿拉伯糖的中间发酵。

[0459] 测试11和测试12都具有有效的抗微生物活性,并且都使丝氨酸芳基酰胺酶发酵,而不使亮氨酸甘氨酸芳基酰胺酶和丙氨酸芳基酰胺酶发酵。

[0460] 测试3和测试7都具有有效的抗微生物活性,并且都展现出丝氨酸芳基酰胺酶的中间发酵。

[0461] 实施例9-脉冲场凝胶电泳

[0462] 脉冲场凝胶电泳(PFGE)用于表征实施例7中测试的短双歧杆菌菌株。结果示于图24中。发现展现出大于参考短双歧杆菌菌株的抗微生物活性的测试短双歧杆菌菌株以相似

的模式分组在一起并且可与参考菌株区分开。

[0463] 实施例10-脉冲场凝胶电泳

[0464] 对MRx004和参考短双歧杆菌菌株进行进一步的脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 研究。PFGE 常规地用作用于临床实验室中菌株分型的“金标准”[100], 并且据报道为区分人类粪便双歧杆菌分离物的有效方法[101]。实际上, 许多研究已使用PFGE解析的用XbaI或SpeI限制酶消化的基因组DNA片段的指纹分析探索了双歧杆菌属分离物的关系[102,103]。已证实SpeI特别可用于短双歧杆菌的质粒剖析和种内基因分型[104,105]。

[0465] PFGE栓的制备

[0466] 根据公布的方案[106]制备用于PFGE的高分子量DNA的琼脂糖凝胶栓。

[0467] PFGE栓的限制

[0468] 在室温下, 在1ml 10mM Tris.Cl、0.1mM EDTA (pH 8.0) 中将单一切片 (2mm×2mm) 洗涤三次, 持续15分钟。将各切片与250μl推荐用于酶的限制缓冲液在4℃下预温育30分钟, 然后用250μl含有20单位限制酶SmaI的新鲜缓冲液替换。根据供应商 (New England Biolabs (UK) Ltd) 的建议, 在25℃下实施限制性消化过夜。

[0469] PFGE

[0470] 在以下条件下检查经处理 (限制酶) 和未处理的基因组DNA (gDNA) 栓。将λ梯 (ladder) 在45℃下加热, 接着将其装载至凝胶中。操作条件是在14℃下在0.5×TBE缓冲液中以6.0V/cm持续20h, 脉冲时间从1s斜升至20s。使用λDNA梯 (Bio-Rad) 作为大小标志物。将栓置于用0.5xTBE (1M Tris-硼酸盐, 0.5M EDTA, pH 8.5) 制成的1.0%琼脂糖凝胶 (Bio-Rad) 的孔中, 用相同琼脂糖密封。使用CHEF-DR III脉冲场系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 将DNA片段在维持在14℃的0.5×TBE电泳缓冲液中以6V/cm解析18h。选择线性斜坡脉冲时间。采用1s-15s的线性斜坡脉冲时间来分离片段。在光限制条件下, 将凝胶在含有0.5μg/ml溴化乙锭的蒸馏水中染色120分钟。

[0471] PFGE条带图谱分析

[0472] 使用[107]概述的准则手动评估条带图谱。在BioNumerics 7.6 (Applied Maths) 中处理PFGE影像以产生各菌株的条带指纹。使用Jaccard相似性系数 (推荐用于指纹型分析) 和有算术平均值的未加权成组配对法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) 实施对指纹的集群分析 (Cluster analysis)。

[0473] 结果

[0474] 先前已显示用于该研究中的DNA消化和电泳条件可有效用于对短双歧杆菌菌株进行亚分型[104], 并且发现提供足够分辨率 (超过10个可观测带) 以在亚种层面下区分短双歧杆菌菌株。4/5菌株的限制片段是不同的并且被充分解析 (图25)。集群分析 (图26) 表明, 与该研究中分析的其他短双歧杆菌菌株相比, 菌株MRx0004的基因型与短双歧杆菌参考7的基因型更密切相关。

[0475] 实施例11-T细胞分化

[0476] 在外周血单核细胞 (PBMC, Stemcell, 目录: 70025) 上体外探索MRx0004诱导T细胞分化的能力。简言之, 将PBMC以每孔50μl cRPMI培养基中400,000个/孔接种在涂铺有抗CD3 (Ebioscience, CD3单克隆抗体 (OKT3克隆), 功能级, 目录号16-0037-81) 的96孔板中 (cRPMI 含有RPMI 1640 (+L-谷氨酰胺, 21875-034) 2mM最终浓度储备液200mM; 10%HI FBS (Gibco

life technologies,10082-147);50μm巯基乙醇(Gibco life technologies,21985-023);和1%青霉素/链霉素(P4333,10mg/ml))。接着将热杀灭的MRx0004(通过以下方式制备:在80℃下温育30分钟,接着将培养物用PBS洗涤并重悬于适当细胞培养基中并通过涂铺确认活菌计数)以每孔于100μl中的4,000,000个添加至各孔中。在37℃温育箱中3天后,移出细胞并将其重悬于含有PMA-(Sigma,目录号P8139)、离子霉素(Ionomycin)(Sigma,目录号I3909)和GolgiSTOP(BD,目录号554724)的培养基中持续5小时。PMA储备液为在DMSO中1mg/ml,其进一步以100ug/ml稀释(各样品需要于cRPMI中50ng/ml),离子霉素储备液为在DMSO中1mM(使用在cRPMI中1μM),并且GolgiStop浓度以4μl/6ml使用。使上清液通过0.22μm过滤器并在共培养基中适当稀释。

[0477] 然后使细胞经历流式细胞术染色:

[0478] 洗涤后,在室温下在黑暗中将细胞与活力染料(来自Miltenyi biotec的Viobility 405/520可固定染料,1μl/样品)+于PBS中的人类Fc阻断剂(block)(目录564219)(1μl/样品)温育10分钟。然后将表面抗体(各2μl)-CD3-APC-Vio 770(Miltenyi,目录号130-113-136)、CD4-VioBlue(Miltenyi,目录号130-114-534)和CD25-VioBright FITC(Miltenyi,目录号130-113-283)直接添加至孔中,在室温下在黑暗中持续10分钟。然后将细胞在PBS中洗涤两次并以300g/5分钟/室温快速离心。

[0479] 然后使用eBioscience FoxP3转录因子染色缓冲液来固定和透化细胞(目录号00-5523号)。遵循eBioscience方案,使用1×浓缩物和3份稀释剂制备透化/固定缓冲液。将细胞在室温下固定1h,接着在1×透化洗涤液中洗涤2次,并且以300g/5分钟/室温快速离心。将以下细胞内染色或转录因子抗体添加至于透化洗涤液(1×)中的样品中持续45分钟/黑暗/室温或于冰箱中的样品中过夜(至多18h),接着使用透化洗涤液(300μl)将抗体洗涤2次并且重悬于PBS(250μl)中以在细胞计数器上获得:

|        |                    |                    |
|--------|--------------------|--------------------|
| [0480] | 细胞内标志物             | 转录因子               |
|        | 2ul IL10-PE        | 5.5ul FoxP3-PE-Cy7 |
|        | 2ul IFNγ-PE Vio770 | 9ul Tbet-APC       |
|        | 10ul IL17a-APC     | 9ul RoRyt-PE       |

[0481] • 抗IFN γ -PE Vio770人类抗体(Miltenyi,目录号130-114-025)

[0482] • 抗IL10-PE人类抗体(Miltenyi,目录号130-112-728)

[0483] • 抗IL17a-APC人类抗体(Miltenyi,目录号130-099-202)

[0484] • 抗RoRyt-PE人类抗体(Miltenyi,目录号130-103-837)

[0485] • 抗Tbet-APC人类抗体(Miltenyi,目录号130-098-655)

[0486] • Foxp3单克隆抗体(236A/E7),Pe cy7(ebioscience)目录号25-4777-41

[0487] 在图27和图28中可以看出,MRx0004(SP 4)和热杀灭的MRx0004(HK 4)的上清液都能够分别诱导T辅助细胞和细胞毒性T细胞的分化,即使在不存在诱导分化的细胞因子(无细胞因子)下也如此。

[0488] 表格

[0489] 表1.该研究中的菌株产生所用的菌株、质粒和引物

|        | 菌株                                                | 说明                                                                          | 参考                                 |
|--------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|        | <b>短双歧杆菌菌株</b>                                    |                                                                             |                                    |
|        | MRx0004                                           | 短双歧杆菌人类分离物                                                                  | 该研究                                |
|        | MRx0004 <i>pGTF::pORI19</i>                       | MRx0004 pGTF 插入突变体                                                          | 该研究                                |
|        | MRx0004 <i>pGTF::pORI19</i><br><i>pBC1.2</i>      | 带有空 pBC1.2 载体的 MRx0004<br>pGTF 插入突变体                                        | 该研究                                |
|        | MRx0004 <i>pGTF::pORI19</i><br><i>pGTF-pBC1.2</i> | 互补 MRx0004 pGTF 插入突变体                                                       | 该研究                                |
|        | <b>大肠杆菌菌株</b>                                     |                                                                             |                                    |
|        | X11 Blue                                          | 克隆宿主, $tet^r$                                                               | Stratgene,<br>La Jolla,<br>CA, USA |
|        | EC101                                             | 克隆宿主, $repA^+ km^r$                                                         | [108]                              |
|        | EC101<br><i>pWSK29-MRx-M+S</i>                    | 用于通过 MRx0004 I 型甲基化酶进<br>行体外甲基化的大肠杆菌菌株                                      | 该研究                                |
| [0490] | <b>质粒</b>                                         |                                                                             |                                    |
|        | <i>pORI19</i>                                     | 乳球菌 $ORI^+$ RepA <sup>-</sup> 表达载体                                          | [108]                              |
|        | <i>pWSK29</i>                                     | $Amp^r$ , 低拷贝数大肠杆菌克隆质粒                                                      | [109]                              |
|        | <i>pNZ8048</i>                                    | $Cm^r$ , 乳酸链球菌肽诱导型翻译融<br>合因子                                                | [110]                              |
|        | <i>pAM5</i>                                       | <i>pBC1-pUC19-Tc<sup>r</sup></i>                                            | [111]                              |
|        | <i>pPKCM</i>                                      | 带有 <i>rep pCIBA089</i> 的 <i>pblueCm</i>                                     | [112]                              |
|        | <i>pSKEM</i>                                      | 带有 <i>rep pCIBA089</i> 的 <i>pblueEm</i>                                     | [112]                              |
|        | <i>pNZEM</i>                                      | $EM^r$ , 乳酸链球菌肽诱导型                                                          | Margolles ,<br>未公布                 |
|        | <i>pDM1</i>                                       | 含有奇霉素抗性盒的 <i>pAM5</i> 衍生物                                                   | [113]                              |
|        | <i>pDM2</i>                                       | 含有奇霉素抗性盒的 <i>pDG7</i> 衍生物                                                   | [113]                              |
|        | <b>引物</b>                                         |                                                                             |                                    |
|        | 引物名称                                              | 序列(5'-3')                                                                   | 参考                                 |
|        | PWSK_MRxM+SFxbaI                                  | CGTCCGCTCTAGAATAAGGAGGC<br>ACTCACCATGAATAAGCAGCAG                           | 该研究                                |
|        | PWSK_MRxM+SFxhoI                                  | CTTGC (SEQ ID NO:2)<br>GCTCTACTCGAGGCGATATGAG<br>GCGAGCTTCACG (SEQ ID NO:3) | 该研究                                |
| [0491] | TetWconfirm F2                                    | CAGGCATTGAAGGAATCG (SEQ<br>ID NO:4)                                         | 该研究                                |
|        | TetWconfirm<br>+MRx-pGTF-比较                       | F2 CTGGCTAAGCTTGTGCATGGGC<br>TCAGTCCTTC (SEQ ID NO:5)                       | 该研究                                |

[0492] 表2. 如通过纳米LC-MS/MS鉴定的在MRx0004对数后期培养上清液中鉴定的20种具有最高肽谱匹配 (PSM) 值的蛋白质的列表。

[0493] 该表列出了在三个生物学重复中鉴定的PSM值 $\geq 5$ 的所有蛋白质。

| 注释                                 | 归一化 PSM 值 <sup>a</sup> |       | 功能类别 <sup>b</sup> | 预测定位<br>(评分) <sup>c</sup> | MW<br>(kDa)<br><sub>d</sub> | pI <sup>d</sup> |
|------------------------------------|------------------------|-------|-------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|
|                                    | 平均值                    | SD    |                   |                           |                             |                 |
| 支链淀粉酶                              | 351.33                 | 33.62 | 碳水化合物             | E (9.98)                  | 181.9                       | 4.77            |
| NlpC/P60 家族蛋<br>白质                 | 82.00                  | 15.62 | n.a.              | E (9.72)                  | 33.5                        | 8.18            |
| NlpC/P60 家族蛋<br>白质                 | 71.67                  | 13.61 | n.a.              | n.d.(3.33)                | 24.9                        | 6.18            |
| ABC 转运蛋白系<br>统的可能溶质结<br>合蛋白        | 56.00                  | 7.00  | n.a.              | n.d.(3.33)                | 32.8                        | 4.69            |
| 细胞分裂蛋白质<br>FtsI                    | 56.00                  | 4.36  | 细胞分裂和<br>细胞周期     | CM (9.68)                 | 63.4                        | 5.39            |
| 多重糖 ABC 转运<br>蛋白, 底物结合<br>蛋白       | 54.67                  | 4.16  | 碳水化合物             | n.d.(3.33)                | 49.3                        | 5.01            |
| 木酮糖-5-磷酸磷<br>酸酮醇酶                  | 45.33                  | 7.02  | n.a.              | n.d.(2.5)                 | 92.3                        | 5.26            |
| 甲硫氨酸 ABC 转<br>运蛋白底物结合<br>蛋白        | 38.67                  | 2.08  | 氨基酸和衍<br>生物       | CM (9.51)                 | 35.2                        | 5.17            |
| 假设蛋白                               | 35.67                  | 8.33  | n.a.              | n.d.(2.5)                 | 34.6                        | 7.47            |
| 转醛醇酶                               | 32.67                  | 3.79  | 碳水化合物             | C (7.5)                   | 39.7                        | 4.97            |
| 麦芽糖/麦芽糊精<br>ABC 转运蛋白               | 30.00                  | 6.08  | 碳水化合物             | n.d.(3.33)                | 43.9                        | 4.48            |
| NAD 依赖性甘油<br>醛-3-磷酸脱氢酶             | 30.00                  | 3.61  | 碳水化合物             | C (9.97)                  | 37.8                        | 5.44            |
| 假设蛋白                               | 29.67                  | 4.93  | n.a.              | CW (9.21)                 | 47.1                        | 5.48            |
| 用于肽的 ABC 转<br>运蛋白系统的溶<br>质结合蛋白     | 26.67                  | 1.15  | n.a.              | CW (9.2)                  | 58.7                        | 5.45            |
| 结合二肽的 ABC<br>转运蛋白, 周质<br>底物结合组分    | 24.00                  | 4.58  | 膜转运               | n.d. (5.13)               | 59.1                        | 5.31            |
| NlpC/P60 家族蛋<br>白质                 | 21.00                  | 1.00  | n.a.              | E (9.73)                  | 24.5                        | 6.30            |
| FKBP 型肽基-脯<br>胺酰基顺反异构<br>酶 FkpA 前体 | 20.00                  | 2.65  | 钾代谢               | n.d. (5.15)               | 33.4                        | 5.83            |
| 葡萄糖-6-磷酸异<br>构酶                    | 18.67                  | 3.21  | 碳水化合物             | C (9.97)                  | 62.9                        | 4.97            |
| 多模式转肽酶-转<br>糖苷酶                    | 18.00                  | 2.65  | 细胞壁和荚<br>膜        | CM (10)                   | 81.9                        | 5.72            |
| 伴侣蛋白 DnaK                          | 17.67                  | 3.21  | 蛋白质代谢             | C (9.97)                  | 66.9                        | 4.87            |

[0496] <sup>a</sup>来自3个生物学重复的相对于 $1 \times 10^9$ cfu归一化的平均肽谱匹配值和相应标准差值。

[0497] <sup>b</sup>如由RAST注释的子系统类别分配[114,115]。n.a.未指定。

[0498] <sup>c</sup>如使用PSORTb v3.0预测的细胞定位(Yu等人,2010a)。C:细胞质,CM:细胞质膜,CW:细胞壁,E:细胞外,n.d.:未确定。

[0499] <sup>d</sup>由Proteome Discoverer(Thermo Scientific,Waltham,MA,USA)计算的参数。MW:分子量,pI:等电点。

[0500] 表3.如通过纳米LC-MS/MS鉴定的在MRx0004细胞刮取物中鉴定的前20种具有最高肽谱匹配(PSM)值的蛋白质的列表。

[0501] 该表列出了62种在MRx0004刮取和脱落蛋白质级分两者中鉴定的蛋白质以及44种排他性地在MRx0004刮取蛋白质级分中鉴定的蛋白质。在PSM值 $\geq 5$ 下和三个生物学重复中检测到列出的蛋白质。

| [0502] | 注释 | 经刮取蛋白质 |    | 脱落蛋白质 |    | 功能类别 <sup>b</sup> | 预测定位(评分) <sup>c</sup> |
|--------|----|--------|----|-------|----|-------------------|-----------------------|
|        |    | 平均     | SD | 平均    | SD |                   |                       |

|        | PSM <sup>a</sup>                  |        | PSM <sup>a</sup> |       |       |                     |
|--------|-----------------------------------|--------|------------------|-------|-------|---------------------|
|        | 支链淀粉酶                             | 136.67 | 17.47            | 79.00 | 10.54 | 碳水化合物 E (9.98)      |
|        | I 型聚酮合酶                           | 54.67  | 10.69            | 11.67 | 6.43  | 未指定 CM (9.78)       |
|        | 木酮糖-5-磷酸磷酸酮醇酶                     | 49.67  | 2.89             | 52.00 | 9.17  | 未指定 n.a.(2.5)       |
|        | 细胞分裂蛋白质 FtsI                      | 34.33  | 9.24             | 33.00 | 10.00 | 细胞分裂和细胞周期 CM (9.68) |
|        | 葡萄糖-6-磷酸异构酶                       | 32.33  | 2.31             | 30.33 | 5.86  | 碳水化合物 C (9.97)      |
|        | 翻译延伸因子 Tu                         | 32.00  | 5.00             | 24.33 | 8.39  | 蛋白质代谢 C (9.97)      |
|        | 麦芽糖/麦芽糊精 ABC 转运蛋白, 底物结合周质蛋白质 MalE | 32.00  | 7.94             | 18.67 | 5.13  | 碳水化合物 n.a.(3.33)    |
|        | 糖原磷酸化酶                            | 31.00  | 3.00             | 34.33 | 5.69  | 碳水化合物 C (7.5)       |
|        | 转醛醇酶                              | 31.00  | 2.65             | 33.33 | 2.08  | 碳水化合物 C (7.5)       |
|        | 多重糖 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白              | 30.00  | 6.93             | 36.00 | 11.79 | 碳水化合物 n.a.(3.33)    |
| [0503] | 丙酮酸甲酸裂解酶                          | 26.67  | 8.33             | 21.67 | 7.77  | 碳水化合物 C (9.97)      |
|        | 用于肽的 ABC 转运蛋白系统的溶质结合蛋白            | 26.00  | 0.00             | 12.67 | 2.89  | 未指定 CW (9.2)        |
|        | 转酮醇酶                              | 24.00  | 6.08             | 23.67 | 3.79  | 碳水化合物 C (7.5)       |
|        | 甲硫氨酸 ABC 转运蛋白底物结合蛋白               | 23.33  | 2.52             | 22.33 | 4.04  | 氨基酸和衍生物 CM (9.51)   |
|        | 翻译延伸因子 G                          | 23.00  | 13.89            | 15.67 | 8.02  | 蛋白质代谢 C (9.97)      |
|        | 聚核糖核苷酸核糖核苷酸转移酶                    | 22.67  | 5.03             | 12.33 | 5.69  | 未指定 C (9.97)        |
|        | PTS 系统, $\beta$ -葡萄糖苷特异性 IIB 组分   | 21.67  | 4.62             | 6.67  | 2.89  | 未指定 CM (10)         |
|        | FKBP 型肽基-脯氨酸顺反异构酶 FkpA 前体         | 21.33  | 5.86             | 7.67  | 3.06  | 钾代谢 n.a. (5.15)     |
|        | 伴侣蛋白 DnaK                         | 21.00  | 6.24             | 10.00 | 3.61  | 蛋白质代谢 C (9.97)      |
|        | ABC 转运蛋白系统的可能溶质结                  | 20.33  | 4.04             | 19.67 | 2.08  | 未指定 n.a. (3.33)     |
| [0504] | 合蛋白                               |        |                  |       |       |                     |

[0505] <sup>a</sup>来自3个生物学重复的平均肽谱匹配值和相应标准差值。n.d.:未检测到。

[0506] <sup>b</sup>如由RAST注释的子系统类别分配[116,114]。n.a.未指定。

[0507] <sup>c</sup>如使用PSORTb v3.0预测的细胞定位[117]。C:细胞质,CM:细胞质膜,CW:细胞壁,E:细胞外,n.a.:未指定。

[0508] 表4.在MRx0004和EPS<sup>阴性</sup>菌株刮取蛋白质级分中鉴定的宿主相互作用蛋白质的比较。

[0509] 该表列出了通过纳米LC-MS/MS在经刮取蛋白质级分中在三个生物学重复中并且PSM值 $\geq 5$ 的情况下鉴定的所选蛋白质。

| 说明                    | MRx0004 <sup>a</sup> |      | EPS <sup>阴性</sup> <sup>a</sup> |      | 功能类别 <sup>b</sup> |
|-----------------------|----------------------|------|--------------------------------|------|-------------------|
|                       | 平均归一化 PSM            | SD   | 平均归一化 PSM                      | SD   |                   |
| I 型聚酮合酶               | 28.04                | 4.47 | 57.06                          | 2.17 | n.a.              |
| 转醛醇酶                  | 17.33                | 1.44 | 24.70                          | 0.60 | 碳水化合物             |
| 转酮醇酶                  | 14.18                | 2.50 | 25.40                          | 0.60 | 碳水化合物             |
| [0510] 翻译延伸因子 Tu      | 13.23                | 1.64 | 26.10                          | 4.55 | 蛋白质代谢             |
| 伴侣蛋白 DnaK             | 12.29                | 4.33 | 21.92                          | 2.09 | 蛋白质代谢             |
| NAD 依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶    | 11.97                | 3.32 | 16.35                          | 1.59 | 碳水化合物             |
| 热休克蛋白 60 家族伴侣蛋白 GroEL | 11.66                | 6.29 | 13.92                          | 2.17 | 蛋白质代谢             |
| 烯醇酶                   | 5.04                 | 3.04 | 8.70                           | 1.59 | 碳水化合物             |
| 磷酸甘油酸变位酶              | n.d.                 | n.d. | 5.22                           | 1.04 | 碳水化合物             |

[0511] <sup>a</sup>来自3个生物学重复的每 $\mu\text{g}$ 总蛋白质归一化的平均肽谱匹配值和相应标准差值(SD)。n.d.:未检测到肽。

[0512] <sup>b</sup>如由RAST注释的子系统类别分配[116,114]。n.a.未指定子类别。

[0513] 表5.实施例7中使用的指示菌株的列表

| 菌株名称                    | 革兰氏染色 | 说明             |
|-------------------------|-------|----------------|
|                         |       |                |
| 大肠杆菌 ATCC 11775         | 阴性    | 人类肠道共生         |
| 肺炎克雷伯氏菌 NCIMB 10197     | 阴性    | 人类肠道共生的肺病原体    |
| 鼠伤寒沙门氏菌 NCIMB 10248     | 阴性    | 人类肠道共生的机会性病原体  |
| [0514] 植物乳杆菌 NCIMB 8826 | 阳性    | 人类肠道共生的密切相关的细菌 |
| 生孢梭菌 ATCC 3584          | 阳性    | 遍在的人类肠道共生      |
| 枯草芽孢杆菌 NCIMB 8045       | 阳性    | 人类肠道共生         |
| 金黄色葡萄球菌 NCIMB 9518      | 阳性    | 人类共生的机会性病原体    |
| 短双歧杆菌 DSM20213          | 阳性    | 短双歧杆菌型菌株       |

[0515] 表6.测试和参考短双歧杆菌菌株针对一组指示菌株的抗微生物活性 (n=3)

[0516]

| 菌株             | 大肠杆菌<br>ATCC<br>11775 | 肺炎克雷<br>伯氏菌<br>NCIMB<br>10197 | 鼠伤寒沙<br>门氏菌<br>NCIMB<br>10248 | 枯草芽<br>孢杆菌<br>NCIMB<br>8045 | 短双歧<br>杆菌<br>DSM<br>20213* | 金黄色葡<br>萄球菌<br>NCIBM<br>9518* | 生孢梭<br>菌<br>ATCC<br>3584* | 植物乳<br>杆菌<br>NCIMB<br>8826* |
|----------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| MRx0<br>004    | 3                     | 2                             | 2                             | 2*                          | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试 1           | 1                     | 2                             | 1                             | 2*                          | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试 2           | 2                     | 2                             | 2                             | 2*                          | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试 3           | 2                     | 2                             | 2                             | 2*                          | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试 4           | 1                     | 2                             | 0                             | 1*                          | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试 5           | 1                     | 1                             | 1                             | 1*                          | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试 6           | 1                     | 1                             | 1                             | 1*                          | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试 7           | 2                     | 2                             | 2                             | 1*                          | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试 8           | 2                     | 1                             | 1                             | 2*                          | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试 9           | 1                     | 1                             | 1                             | 1                           | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试<br>10       | 1                     | 1                             | 1                             | 1                           | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试<br>11       | 2                     | 2                             | 2                             | 2                           | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 测试<br>12       | 2                     | 2                             | 2                             | 2                           | 0                          | 0                             | 0                         | 0                           |
| 短双<br>歧杆<br>菌参 | 1                     | 1                             | 1                             | 1                           | 1                          | 0                             | 0                         | 0                           |

|        |                                                              |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|--------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| [0517] | 考 1<br>(DSM<br>20091<br>)                                    |   |   |   |   |   |   |   |
|        | 短双<br>歧杆<br>菌参<br>考 2<br>(DSM<br>20213<br>)                  | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
|        | 短双<br>歧杆<br>菌参<br>考 6<br>(JCM<br>7017)                       | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
|        | 短双<br>歧杆<br>菌参<br>考 7<br>(NCI<br>MB<br>8807/<br>UCC2<br>003) | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |

[0518] 实施例12-MRx004在脾中具有免疫刺激作用。

[0519] 概述

[0520] 该研究的目的是表征MRx0004在脾中的体外免疫刺激性质。

[0521] 材料与方法

[0522] 处理：未处理、10%YCFA和10%短双歧杆菌菌株MRx0004。

[0523] 脾细胞的制备

[0524] 从6至8周龄的雌性C57BL/6小鼠分离的脾新鲜制备脾细胞。简言之，将脾细胞于具有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺和100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、55μMB-巯基乙醇的RPMI 1640中以900,000个细胞/孔平铺于96孔板中，静置或用10%细菌培养基YCFA+（空白培养基）或用来自静止MRx0518培养物的10%无细胞细菌上清液刺激，然后在CO2温育箱中于37℃下温育72h。此后收集无细胞上清液，在4℃下以500g快速离心5分钟。然后将样品收集并储存在-80℃下用于细胞因子分析。

[0525] MTT测定

[0526] MTT测定试剂盒购自Merck Millipore（目录号CT01）。在温育72小时后，向各孔中添加10μl MTT溶液，将细胞在CO2温育箱中温育4h。此后向各孔中添加100μl异丙醇/0.04M HCL溶液并且在560nm波长和655nm参考波长下测量吸光度。

[0527] 细胞因子分析

[0528] 依照制造商建议(Thermo Fischer Scientific),使用26重小鼠ProcartaPlex多重免疫测定,进行细胞因子定量。简言之,将50 $\mu$ l无细胞的共培养上清液用于使用MAGPIX® MILLIPLEX®系统(Merck),利用xPONENT软件(Luminex,Austin,TX,USA)进行细胞因子定量。使用MILLIPLEX®分析软件(Merck),利用5参数逻辑曲线和背景扣除将平均荧光强度转换成pg/ml值来分析数据。

#### [0529] 流式细胞术

[0530] 首先在室温下在黑暗中用Viobility 405/520可固定染料(Miltenyi Biotec Ltd.,Bergisch Gladbach,Germany)将细胞染色10分钟,以区分活细胞和死细胞。接着将其用CD3、CD4、CD8和IFN- $\gamma$ 的抗体混合物染色以确定细胞表型(Miltenyi REA抗体)并且在室温下再温育10分钟。然后洗涤细胞并将其重悬于PBS中,并且立即经由流式细胞术分析进行分析。同种型用于第一实验期间的所有抗体以帮助设定门控,并且在所有实验中都包括FMO对照。使用BD FACS Aria II进行所有实验,其中使用FACSDiva软件(BD Biosciences, Reading,UK)在“活”门控中对100,000个细胞设定用于采集的停止门。所述分析是使用Flowjo 10.4.2版软件(FlowJo LLC,Oregon,USA)进行,并且基于用活力染料鉴定的活细胞。

#### [0531] 结果

[0532] 使用测量代谢活性的MTT测定来评估脾细胞在处理后的活力。图29显示脾细胞在用MRx0004处理后是可存活的。

[0533] 图30显示用MRx0004处理导致脾中多种促炎细胞因子(包括IL-6、IL-17a IL-22、TNF- $\alpha$ 、RANTES、IFN- $\gamma$ 、CCL3、CCL4和CXCL2)的增加。这些数据表明活短双歧杆菌对免疫系统具有刺激作用。MRx0004激活CD8+和CD4+T细胞以产生IFN $\gamma$ 的能力示于图31中。

[0534] 与实施例2和11中讨论的PBMC数据组合,这些数据支持来自短双歧杆菌菌种的细菌菌株通过激活T细胞和增加促炎细胞因子的水平在多种组织中刺激免疫系统的能力。

#### [0535] 序列

[0536] SEQ ID NO:1(以登录号NCIMB 42380保藏的短双歧杆菌菌株的共有16S rRNA序列)

[0537] GGGACAGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCCATCGGGCTT  
TGCCTGGTGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGAAAA  
CGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCATCACACCGCATGGTGTGTTGGGAAAGCCTTTGCGGCATGGGATGGGGTCGCGT  
CCTATCAGCTTGATGGCGGGGTAACGGCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACAT  
TGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA  
GCGACGCCGCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTGTAGGGAGCAAGGCACTTTGTGTTGAGTG  
TACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATT  
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCCGCGCCGG  
GTACGGGCGGGCTTGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCCGGTGTAACGGTGAATGTGTAGATATCGGGAAGAA  
CACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT  
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCCACGGGTTCGTGTGCGAGCTAACGC  
GTTAAGCATCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGCGG  
AGCATGCGGATTAATTTCATGCAACGCGAAGAACCCTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACGATCCAGAGATGGGG

TTTCCCTTCGGGGCGGGTTACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
AACGAGCGCAACCCTCGCCCCGTGTTGCCAGCGGATTGTGCCGGGAACTCACGGGGGACCGCCGGGGTTAACTCGGA  
GGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCTTACGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACG  
GGATGCGACAGCGCGAGCTGGAGCGGATCCCTGAAAACCGGTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGT  
GAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCGCCGGGCCCTTGACACACCGCCCGT  
CAAGTCATGAAAGTGGGCAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCTGCGGGAGGGAGCCKC

[0538] SEQ ID NO:2-5-参见表1

[0539] 参考文献

[0540] [1]Spor et al.(2011)Nat Rev Microbiol.9(4):279-90.

[0541] [2]Eckburg et al.(2005)Science.10;308(5728):1635-8.

[0542] [3]Macpherson et al.(2001)Microbes Infect.3(12):1021-35

[0543] [4]Macpherson et al.(2002)Cell Mol Life Sci.59(12):2088-96.

[0544] [5]Mazmanian et al.(2005)Cell 15;122(1):107-18.

[0545] [6]Frank et al.(2007)PNAS 104(34):13780-5.

[0546] [7]Scanlan et al.(2006)J Clin Microbiol.44(11):3980-8.

[0547] [8]Kang et al.(2010)Inflamm Bowel Dis.16(12):2034-42.

[0548] [9]Machiels et al.(2013)Gut.63(8):1275-83.

[0549] [10]WO 2013/050792

[0550] [11]WO 03/046580

[0551] [12]WO 2013/008039

[0552] [13]WO 2014/167338

[0553] [14]Goldin and Gorbach(2008)Clin Infect Dis.46 Suppl 2:S96-100.

[0554] [15]Azad et al.(2013)BMJ.347:f6471.

[0555] [16]Olivares et al.,(2014)British Journal of Nutrition 112(1),30-40.

[0556] [17]Pinto-Sánchez et al.,(2017)Journal of Clinical Gastroenterology  
51(9),814-817.

[0557] [18]Miraglia Del Giudice et al.,(2017)Italian Journal of Pediatrics  
43(1),25.

[0558] [19]Groeger et al.,(2013)Gut Microbes 4(4),325-339.doi:10.4161/  
gmic.25487.

[0559] [20]KR20100135612

[0560] [21]Coakley et al.,(2006)Nutrition and Cancer,56(1):95-102

[0561] [22]W02010/143940

[0562] [23]W02017/209156

[0563] [24]Matsuda et al.,(2011)Vaccine,29:1855-1858

[0564] [25]Masco et al.(2003)Systematic and Applied Microbiology,26:557-563.

[0565] [26]Srůtková et al.(2011)J.Microbiol.Methods,87(1):10-6.

[0566] [27]<https://www.immunology.org/policy-and-public-affairs/briefings-and-position-statements/immunodeficiency>

- [0567] [28]Marciano and Holland(2017) Review article,Front.Immunol.,<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00937>
- [0568] [29]Ren and Torres(2009)Brain Res Rev.;60(1):57-64
- [0569] [30]Martinon et al.(2002)Mol Cell.;10(2):417-26.
- [0570] [31]Gaur and Aggarwal(2003).Biochem Pharmacol.;66(8):1403-8.
- [0571] [32]Wang and Lin(2008)Acta Pharmacol Sin.;29(11):1275-1288.
- [0572] [33]Bloch et al.(2016)Eur Cytokine Netw.;27(3):63-67
- [0573] [34]Dowling and Mansell(2016)Clin Transl Immunology.2016 May;5(5):e85.
- [0574] [35]Weinberger(2018)Curr Opin Pharmacol,41,34-41.
- [0575] [36]Lim(2015)Aging Cell 14,907-915
- [0576] [37]Li et al,(2007)J Immunol,178(8),5271-5276
- [0577] [38]Park et al.,(2002)J Immunol,169(3),1433-1443
- [0578] [39]Berthoud et al.(2009)J Immunol Methods 340(1)33-41
- [0579] [40]Mori et al.(2012),Eur J Immunol 42,2709-2719
- [0580] [41]Lai et al.(2018)Leukemia,32(3):801-808.
- [0581] [42]Barnes et al.(2015)J Immunother Cancer.2015;3:1..
- [0582] [43]Glenn and Whartenby(2014)World J Stem Cells.;6(5):526-539.
- [0583] [44]Heng et al.(2004)Cardiovasc Res.2004 Apr 1;62(1):34-42.
- [0584] [45]Rashidi et al.(2018)Biology of Blood and Marrow Transplantation 24,Issue 6,Pages 1260-1263
- [0585] [46]Fulop et al(2013)Crit Rev Oncog.2013;18(6):489-513.
- [0586] [47]Bektas et al.(2017)J Leukoc Biol.;102(4):977-988.
- [0587] [48]Fulop et al(2016)Rev Invest Clin.;68(2):84-91.
- [0588] [49]Fulop et al.(2018)Front Immunol.;8:1960.
- [0589] [50]Miyamoto-Shinohara et al.(2008)J.Gen.Appl.Microbiol.,54,9-24.
- [0590] [51]Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols,ed.by Day and McLellan,Humana Press.
- [0591] [52]Leslie et al.(1995)Appl.Environ.Microbiol.61,3592-3597.
- [0592] [53]Mitropoulou et al.(2013)J Nutr Metab.(2013)716861.
- [0593] [54]Kailasapathy et al.(2002)Curr Issues Intest Microbiol.3(2):39-48.
- [0594] [55]Handbook of Pharmaceutical Excipients,2nd Edition,(1994),Edited by A Wade and PJ Weller
- [0595] [56]Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.(A.R.Gennaro edit.1985)
- [0596] [57]US 2016/0067188
- [0597] [58]Handbook of Microbiological Media,Fourth Edition(2010)Ronald Atlas,CRC Press.
- [0598] [59]Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry(1996)Jennie

C.Hunter-Cevera,Academic Press

[0599] [60]Strobel (2009)Methods Mol Biol.581:247-61.

[0600] [61]Gennaro (2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy.20th edition,ISBN:0683306472.

[0601] [62]Molecular Biology Techniques:An Intensive Laboratory Course,(Ream et al.,eds.,1998,Academic Press).

[0602] [63]Methods In Enzymology (S.Colowick and N.Kaplan,eds.,Academic Press,Inc.)

[0603] [64]Handbook of Experimental Immunology,Vols.I-IV (D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds,1986,Blackwell Scientific Publications)

[0604] [65]Sambrook et al.(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press).

[0605] [66]Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi,K.S.ed.,CRC Press,1997)

[0606] [67]Ausubel et al.(eds) (2002)Short protocols in molecular biology,5th edition(Current Protocols).

[0607] [68]PCR(Introduction to Biotechniques Series),2nd ed.(Newton&Graham eds.,1997,Springer Verlag)

[0608] [69]Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel et al.,eds., 1987)Supplement 30

[0609] [70]Smith&Waterman (1981)Adv.Appl.Math.2:482-489

[0610] [71]Sambrook et al.,1989

[0611] [72]Untergasser et al.,(2007)Nucleic Acids Res 35(Web Server issue), W71-74.doi:10.1093/nar/gkm306.

[0612] [73]Heberle et al.,(2015)BMC Bioinformatics 16(1),169.doi:10.1186/s12859-015-0611-3.

[0613] [74]Ruiz et al.(2016)Front Microbiol 7,1193.doi:10.3389/fmicb.2016.01193.

[0614] [75]Fanning et al.(2012)Proc Natl Acad Sci U S A 109(6),2108-2113

[0615] [76]Christiaen et al.,(2014)PLoS One 9(5),e98111.doi:10.1371/journal.pone.0098111

[0616] [77]McCarville et al.,(2017)Applied and Environmental Microbiology 83 (19),e01323-01317,doi:10.1128/AEM.01323-17.

[0617] [78]Cummings et al.,(2014)Fems Microbiology Letters 351(2),116-125.doi:10.1111/1574-6968.12365.

[0618] [79]Bergonzelli et al.,(2006)Infect Immun 74(1),425-434.doi:10.1128/IAI.74.1.425-434.2006.

[0619] [80]Candela et al.,(2007)J Bacteriol 189(16),5929-5936.doi:10.1128/JB.00159-07

- [0620] [81]Kinoshita et al.,(2008) J Appl Microbiol 104(6),1667-1674.doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03679.x.
- [0621] [82]Candela et al.,(2009) Microbiology 155(Pt 10),3294-3303.doi:10.1099/mic.0.028795-0.
- [0622] [83]Candela et al.,(2010) Microbiology 156(6),1609-1618.
- [0623] [84]Gonzalez-Rodriguez et al.,(2012) Appl Environ Microbiol 78(11),3992-3998.doi:10.1128/AEM.08024-11.
- [0624] [85]Hytönen et al.,(2003) Infection and Immunity 71(2),784-793.
- [0625] [86]Hytönen et al.,(2006) BMC Microbiol 6,18.doi:10.1186/1471-2180-6-18
- [0626] [87]Wei et al.,(2014) J Proteomics 108,89-98.doi:10.1016/j.jprot.2014.04.038.
- [0627] [88]O'Connell Motherway et al.,(2009) Microbial Biotechnology 2(3),321-332.doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00071.
- [0628] [89]Bottacini et al.,(2018) Scientific Reports 8(1),10633.doi:10.1038/s41598-018-28919-4
- [0629] [90]Begley et al.,(2006) Applied and Environmental Microbiology 72(3),1729-1738.
- [0630] [91]O'Connell Motherway et al.,(2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108(27),11217-11222.
- [0631] [92]McCarville et al.,(2017) Applied and Environmental Microbiology 83(19),e01323-01317.
- [0632] [93]Rockwell et al.,(1972) J Natl Cancer Inst.49:735-49.
- [0633] [94]Bertram and Janik(1980) Cancer Lett.11:63-73.
- [0634] [95]Darlington(1987) Meth Enzymol.151:19-38.
- [0635] [96]Principe d'éthique de l'expérimentation animale, Directive n°2010/63 CEE 22nd September 2010, **Décret** n°2013-118 1st February 2013.
- [0636] [97]Guide for the Care and Use of Laboratory Animals:Eighth Edition.The National Academies Press;2011
- [0637] [98]Simpson-Herren and Lloyd(1970) Cancer Chemother Rep.54:143-74.
- [0638] [99]Workman et al. (2010) Br.J.Cancer.102:1555-77.
- [0639] [100]Goering(2010) Infect Genet Evol 10,866-875.
- [0640] [101]McCartney et al.,(1996) Appl Environ Microbiol 62,4608-4613.
- [0641] [102]Roy(1996) Int J Food Microbiol 29,11-29.
- [0642] [103]Simpson,et al.,(2003) J Clin Microbiol 33,2233-2239.
- [0643] [104]Bourget et al.,(1993) FEMS Microbiol Lett 110,11-20.
- [0644] [105]Bottacini et al.,(2015) Appl Environ Microbiol 81,166-176
- [0645] [106]Li et al.(2007) J Bacteriol 189,6128-6139
- [0646] [107]Tenover et al.(1995) J Clin Microbiol 33,2233-2239
- [0647] [108]Law et al.,(1995) Journal of Bacteriology 177(24),7011-7018.

- [0648] [109]Wang and Kushner, (1991) Gene 100,195-199.
- [0649] [110]de Ruyter et al., (1996) Applied and Environmental Microbiology 62 (10),3662-3667.
- [0650] [111]Alvarez-Martín et al., (2007) Applied Microbiology and Biotechnology 76 (6),1395.
- [0651] [112]Cronin et al., (2007) Applied and Environmental Microbiology 73 (24),7858-7866.
- [0652] [113]O'Connell Motherway et al., (2013) Microbial Biotechnology 6 (1),67-79.
- [0653] [114]Aziz et al., 2008 BMC Genomics 9,75.doi:10.1186/1471-2164-9-75.
- [0654] [115]Zheng et al., (2014) PLoS One 9 (5),e95441.doi:10.1371/journal.pone.0095441.
- [0655] [116]Overbeek et al., (2005) Nucleic Acids Research 33 (17),5691-5702.
- [0656] [117]Yu et al., (2010) Bioinformatics 26 (13),1608-1615.

## 序列表

<110> 4D制药研究有限公司(4D PHARMA RESEARCH LIMITED)

<120> 包含细菌菌株的组合物

<130> P073654W0

<140>

<141> 2019-08-19

<150> EP18189521.0

<151> 2018-08-17

<150> GB1817648.7

<151> 2018-10-29

<150> GB1900335.9

<151> 2019-01-10

<150> GB1901203.8

<151> 2019-01-29

<160> 5

<170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1

<211> 1439

<212> DNA

<213> 短双歧杆菌(Bifidobacterium breve)

<400> 1

```
gggacaggct caggatgaac gccggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg aacgggatcc 60
atcgggcttt gcctggtggt gagagtggcg aacgggtgag taatgctga cgcacctgcc 120
ccatgcaccg gaatagctcc tggaaacggg tggtaatgcc ggatgctcca tcacaccgca 180
tggtgtgttg ggaaagcctt tgcggcatgg gatggggctcg cgtcctatca gcttgatggc 240
ggggtaacgg cccaccatgg cttcgacggg tagccggcct gagagggcga ccggccacat 300
tgggactgag atacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg 360
ggcgcaagcc tgatgcagcg acgccgcgtg agggatggag gccttcgggt tgtaaacctc 420
ttttgttagg gagcaaggca ctttgtgttg agtgtacctt tcgaataagc accggctaac 480
tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gtgcaagcgt tatccggaat tattgggcgt 540
aaagggtcgt taggcggttc gtcgcgtccg gtgtgaaagt ccatcgctta acggtggatc 600
cgcgccgggt acgggcgggc ttgagtgcgg taggggagac tggaattccc ggtgtaacgg 660
tggaatgtgt agatatcggg aagaacacca atggcgaagg caggtctctg ggccgttact 720
gacgtgagg agcgaaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc 780
gtaaacggtg gatgctggat gtggggcccc ttccacgggt tccgtgtcgg agctaacgcg 840
ttaagcatcc cgcttgggga gtacggccgc aaggctaaaa ctcaaagaaa ttgacggggg 900
cccgcacaaag cggcggagca tgcggattaa ttcgatgcaa cgcgaagaac cttacctggg 960
cttgacatgt tcccagcatg cccagagatg gggtttcctt tcggggcggg ttcacaggtg 1020
```

gtgcatggtc gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca 1080  
accctcgccc cgtgttgcca gcggattgtg ccgggaactc acgggggacc gccggggtta 1140  
actcggagga aggtggggat gacgtcagat catcatgccc cttacgtcca gggcttcacg 1200  
catgctacaa tggccggtac aacgggatgc gacagcgca gctggagcgg atccctgaaa 1260  
accggtctca gttcggatcg cagtctgcaa ctcgactcgc tgaaggcgga gtcgctagta 1320  
atcgcgaaatc agcaacgtcg cggatgaatgc gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca 1380  
agtcatgaaa gtgggcagca cccgaagccg gtggcctaac ccctgcggga gggagcckc 1439

<210> 2

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 2

cgtccgtcta gaataaggag gcactcacca tgaataagca gcagcttgc 49

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 3

gctctactcg aggcgatatg aggcgagctt cacg 34

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 4

caggcattga aggaatcg 18

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 5

ctggctaagc ttgtgcatgg gtcagtcct tc 32

关于微生物保藏の説明

|                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| 申请人或代理人档案号 21C80286CN | 国际申请号 PCT/EP2019/072181 |
|-----------------------|-------------------------|

关于微生物保藏の説明  
(专利合作条约实施细则 13 之 2)

|                                                         |                 |
|---------------------------------------------------------|-----------------|
| 微生物保藏の説明                                                |                 |
| A.对说明书第 11 页, 第 24 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的説明               |                 |
| B. 保藏事项 更多的保藏在附加页説明 <input checked="" type="checkbox"/> |                 |
| 保藏单位名称NCIMB-国家工业、食品和海洋微生物保藏中心                           |                 |
| 保藏单位地址<br>(包括邮政编码和国名)<br>英国                             |                 |
| 保藏日期 2015-03-12                                         | 保藏号 NCIMB 42380 |
| C.补充説明 (必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>         |                 |
| 无                                                       |                 |
| D.本説明是为下列指定国作的 (如果説明不是为所有指定国而作的)                        |                 |
| 无                                                       |                 |
| E.补充説明 (必要时)                                            |                 |
| 下列説明将随后向国际局提供 (写出説明的类别, 例如: “保藏的编号”)                    |                 |
| 无                                                       |                 |

[0001]

|                                        |
|----------------------------------------|
| 由受理局填写                                 |
| <input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到 |
| 授权官员                                   |

|                                    |
|------------------------------------|
| 由国际局填写                             |
| <input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期 |
| 授权官员                               |

[0002]

|                                                                                          |                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 微生物保藏(2)                                                                                 |                 |
| A.对说明书第 12 页, 第 1, 2, 3, 4, 5, 6 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明                                  |                 |
| B. 保藏事项 <span style="float:right">更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/></span> |                 |
| 保藏单位名称NCIMB-国家工业、食品和海洋微生物保藏中心                                                            |                 |
| 保藏单位地址<br>(包括邮政编码和国名)<br>英国                                                              |                 |
| 保藏日期 2015-03-12                                                                          | 保藏号 NCIMB 42380 |
| C.补充说明(必要时) <span style="float:right">更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/></span>          |                 |
| 无                                                                                        |                 |
| D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)                                                          |                 |
| 无                                                                                        |                 |
| E.补充说明(必要时)                                                                              |                 |
| 下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)<br>无                                                   |                 |

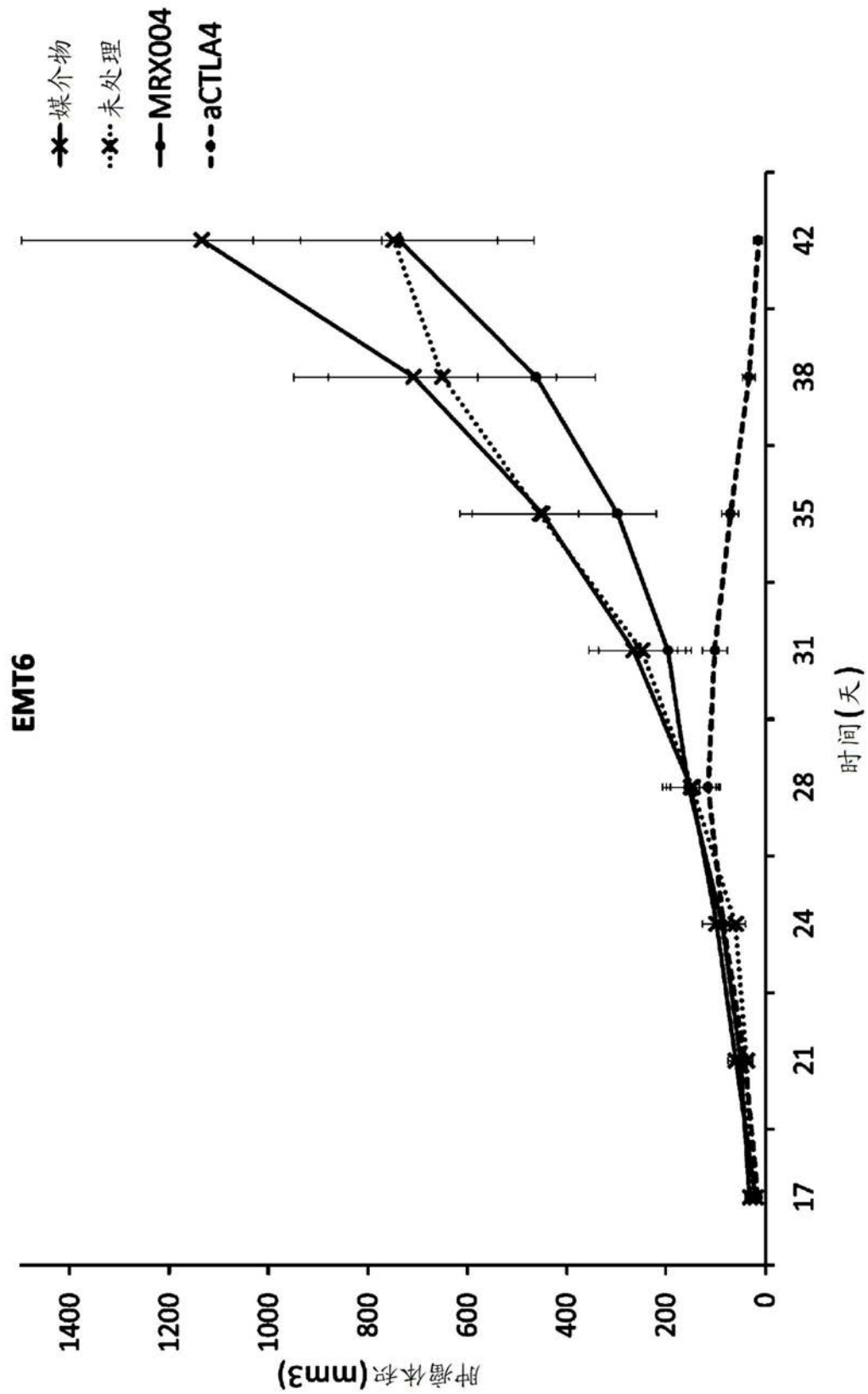


图1

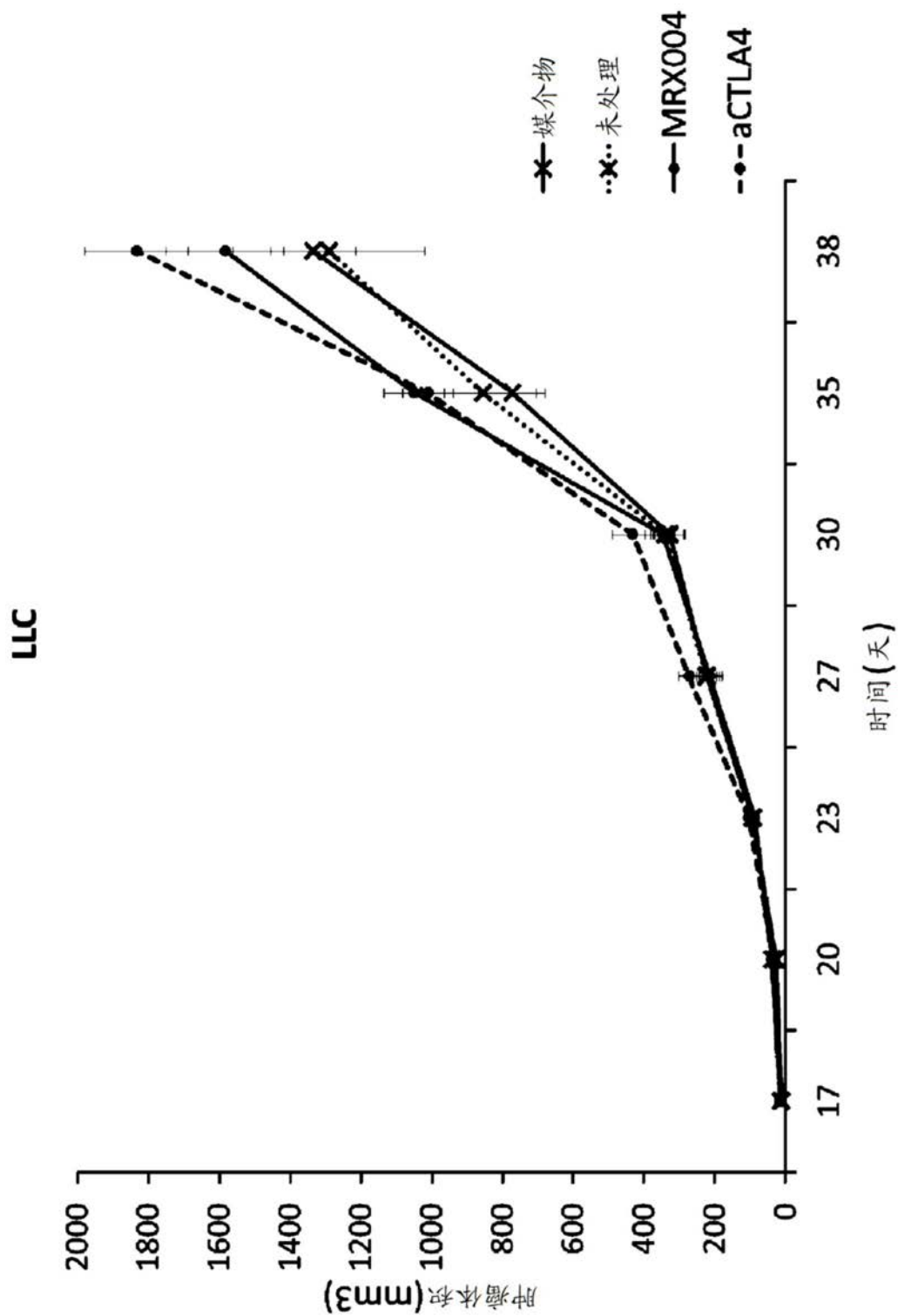


图2

安乐死时的肝脏重量(g)

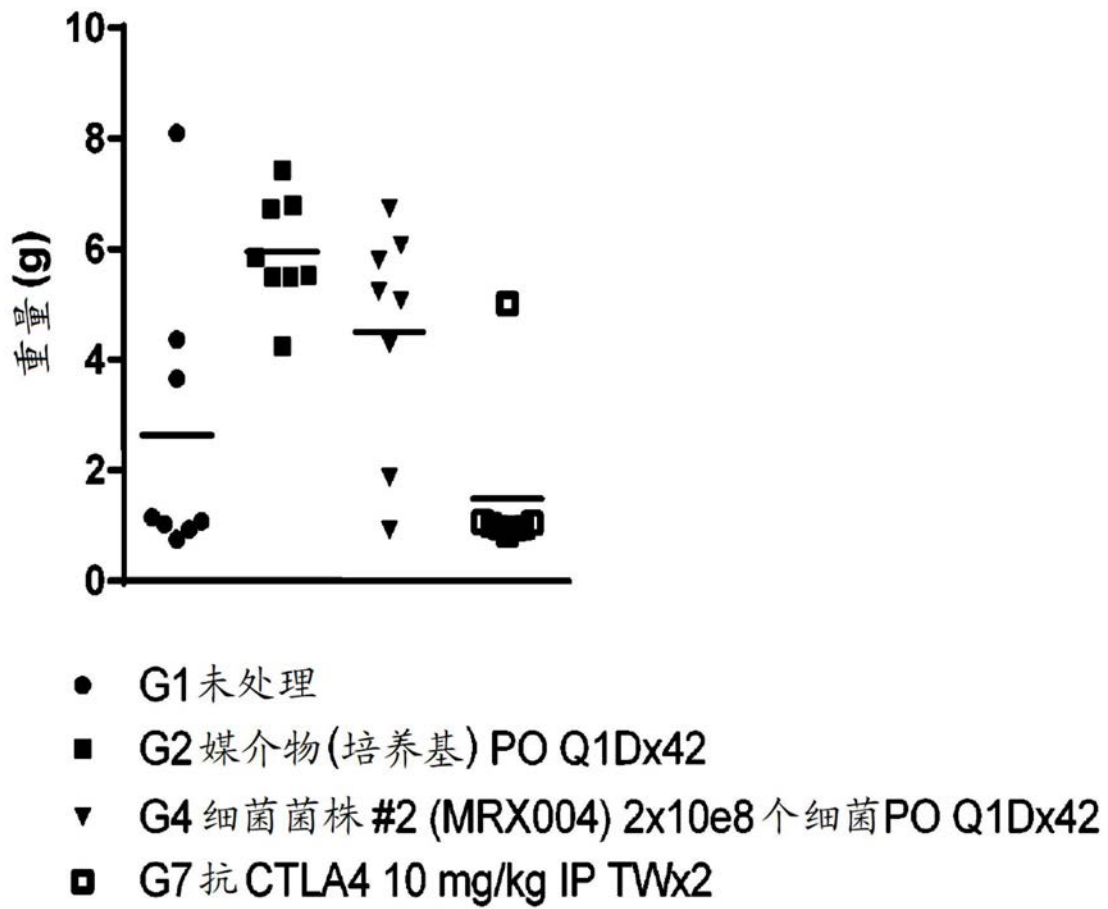


图3

## MRX004 相对于短双歧杆菌型菌株的 Rapid ID 32 A 谱

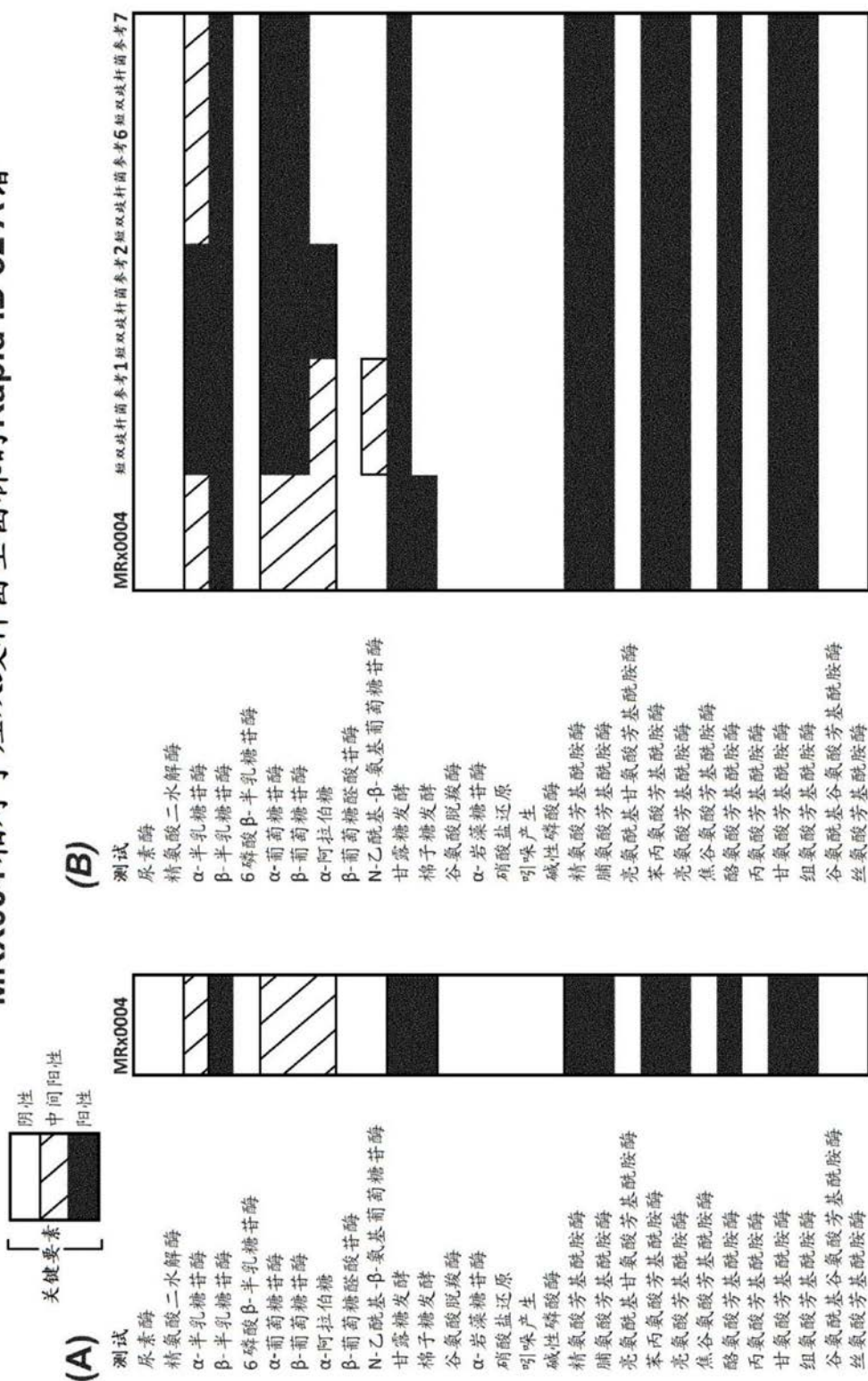


图4

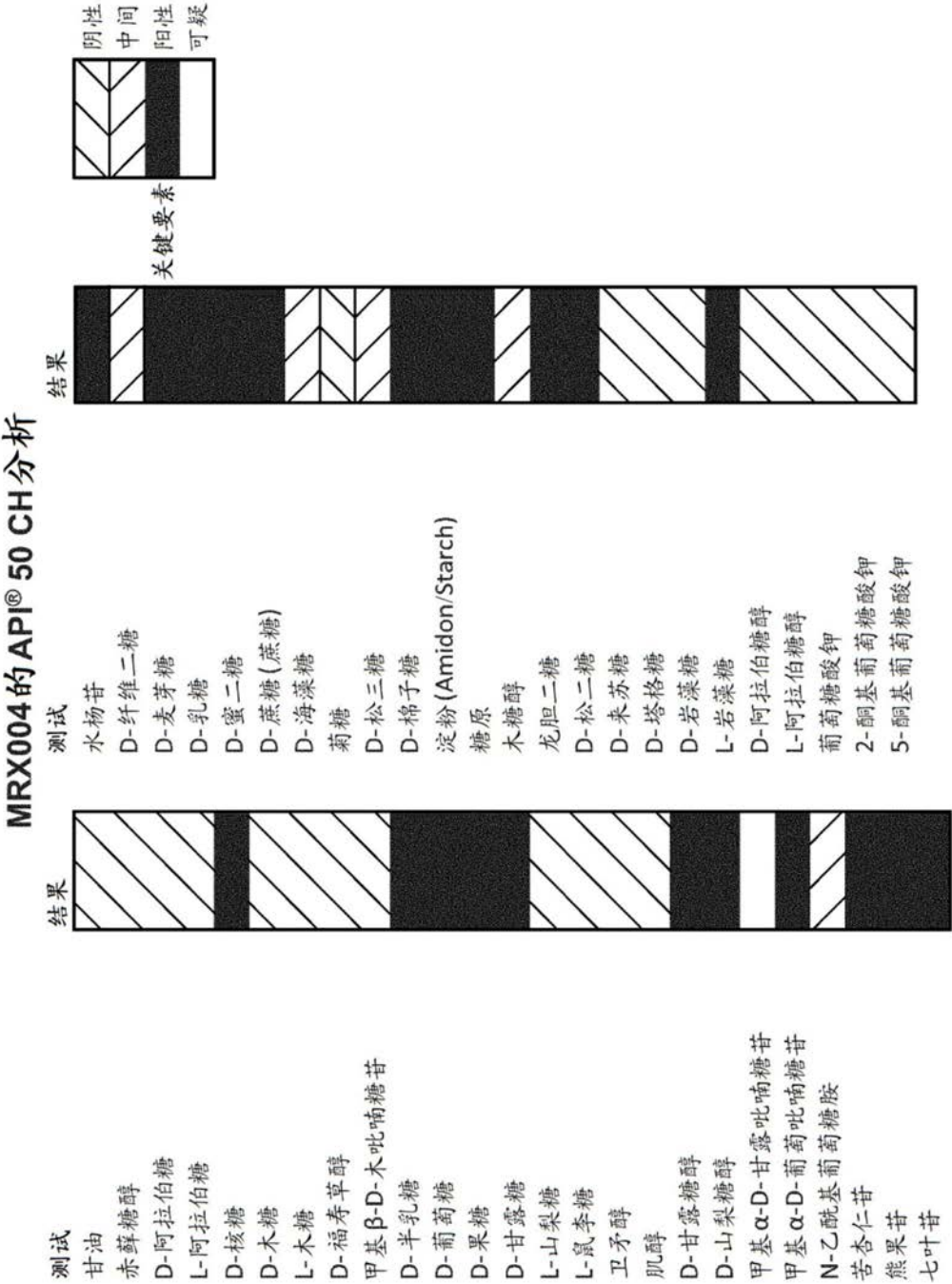


图5

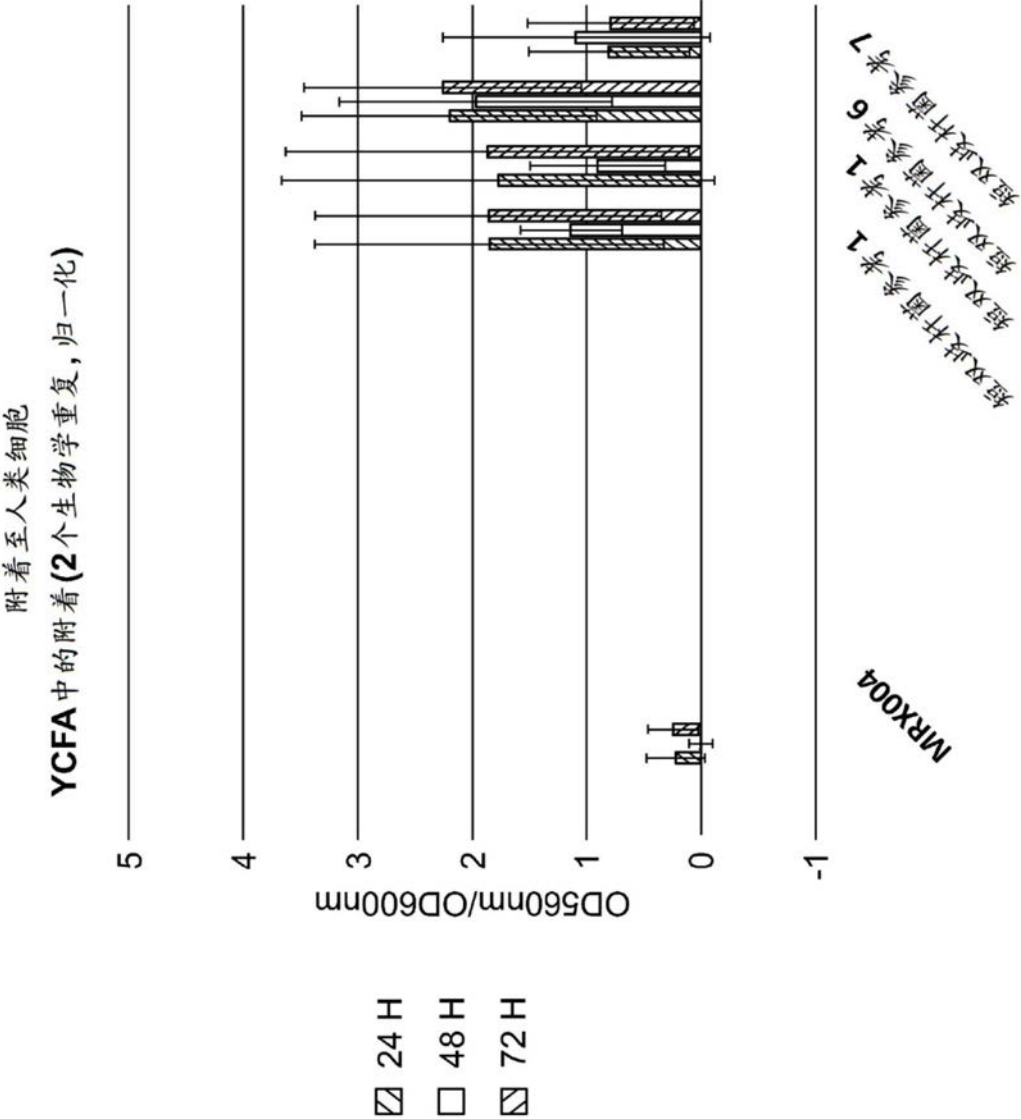


图6

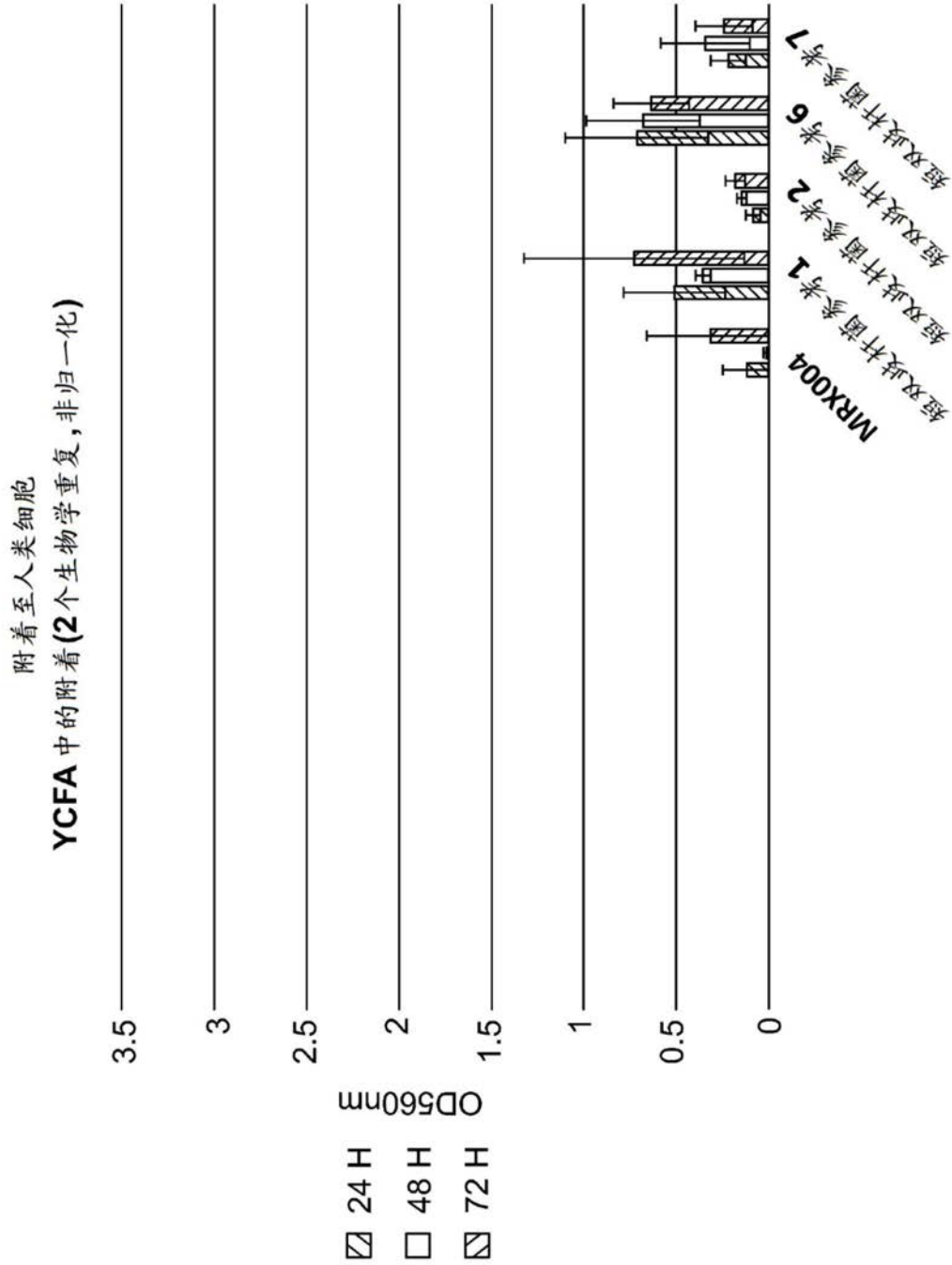


图6(续)

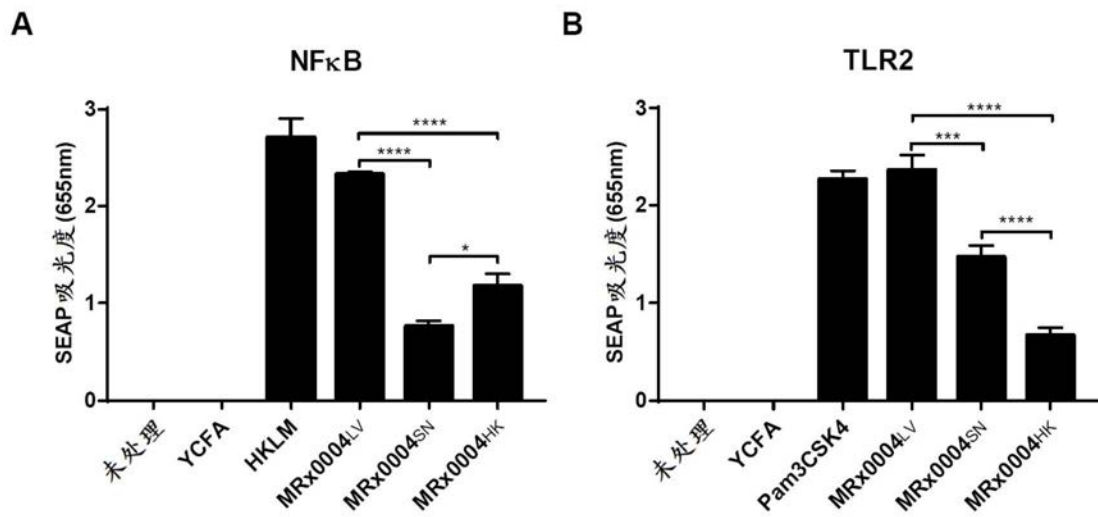


图7

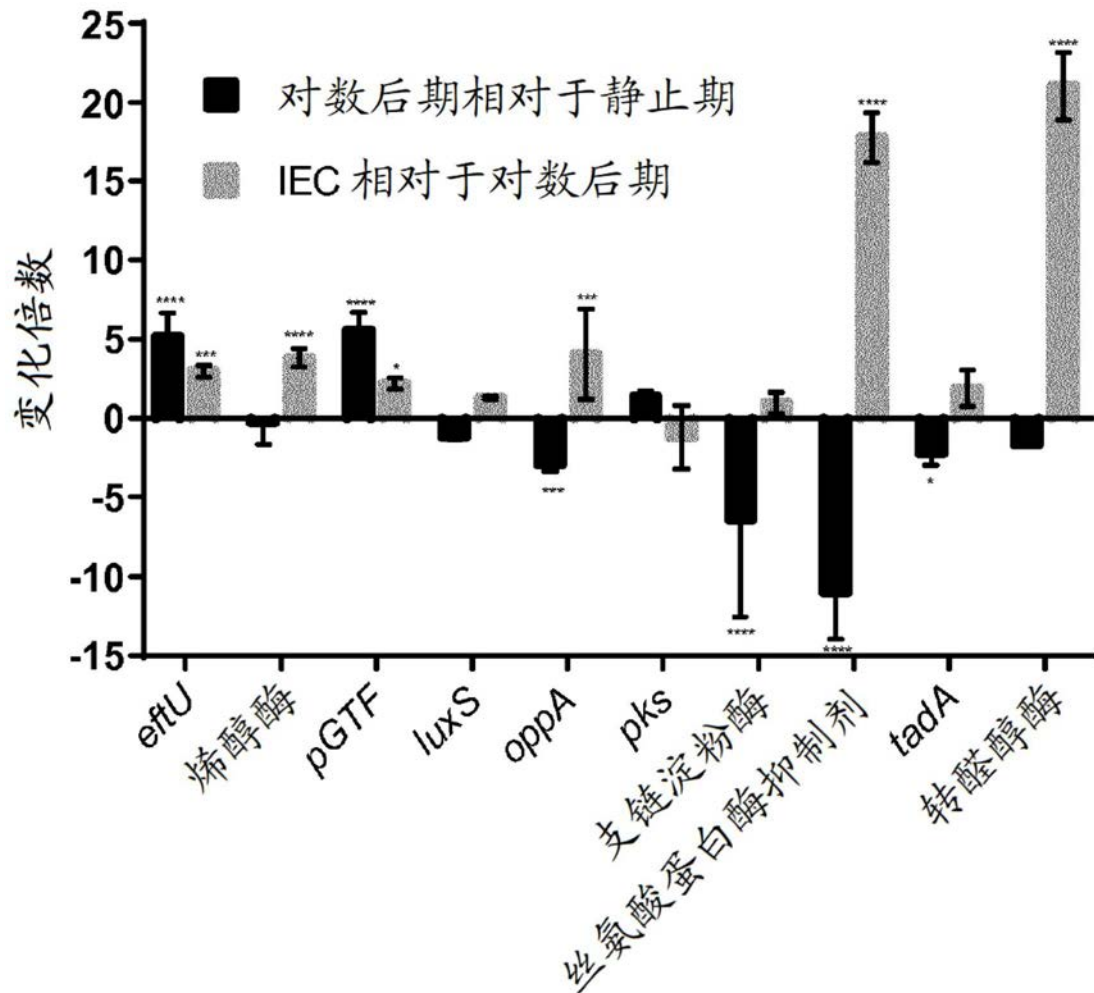


图8

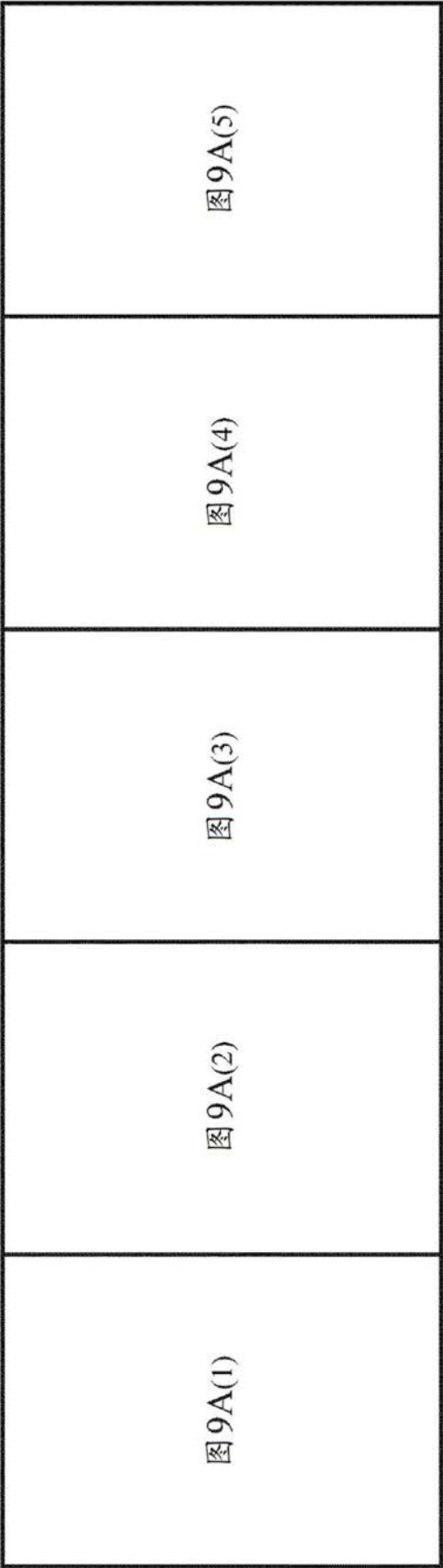


图9A



图9A (1)

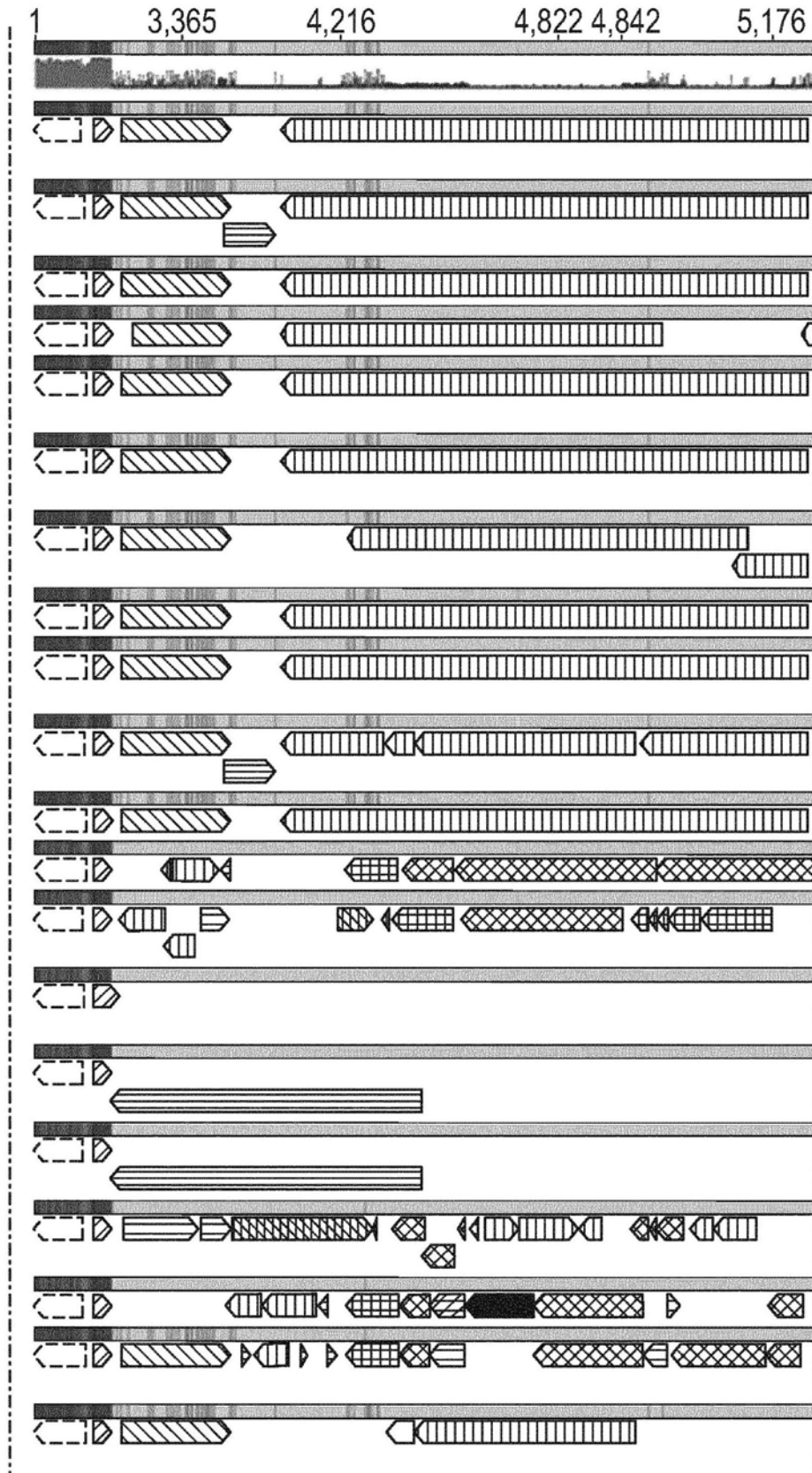


图9A(2)

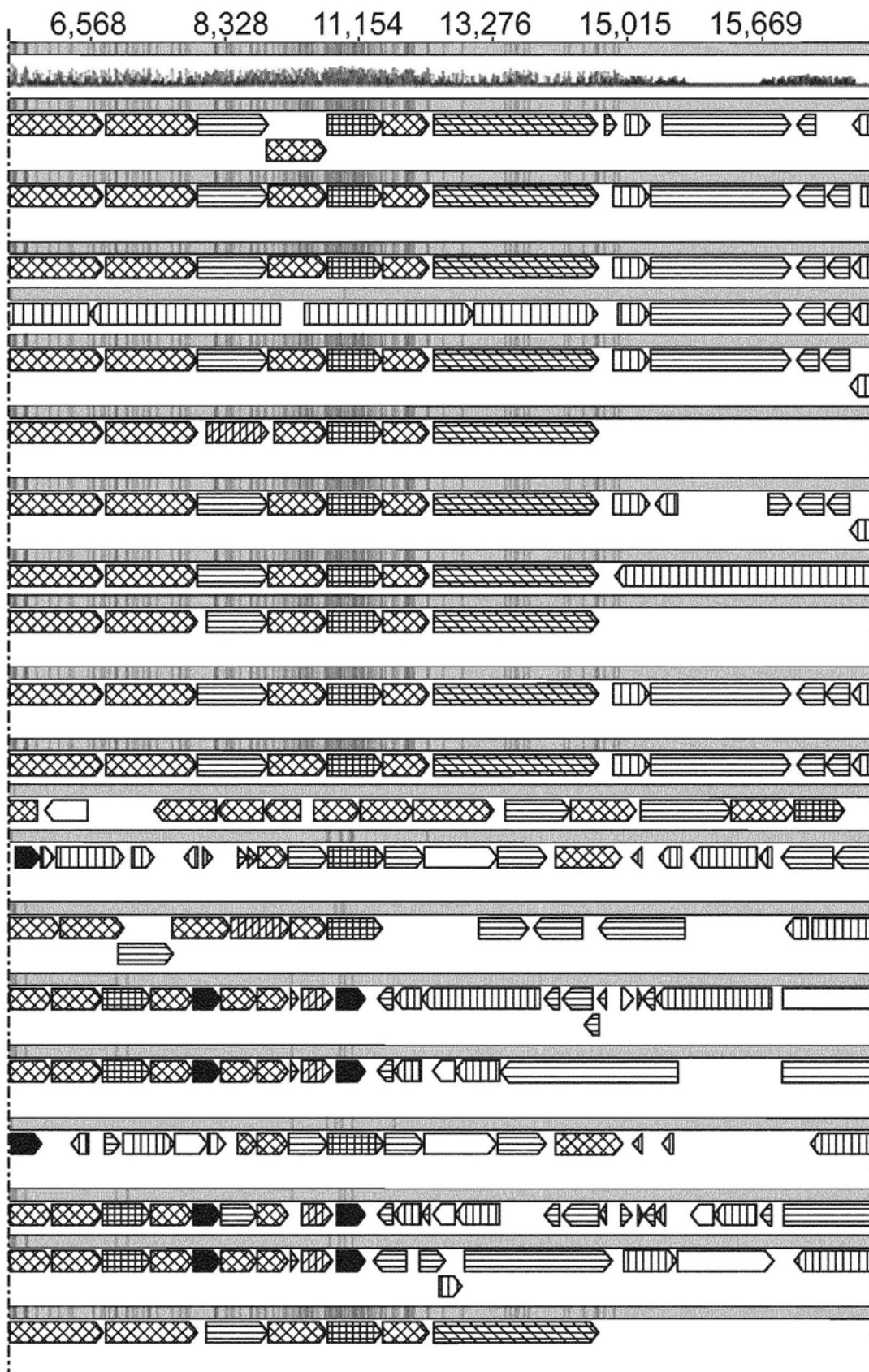


图9A(3)

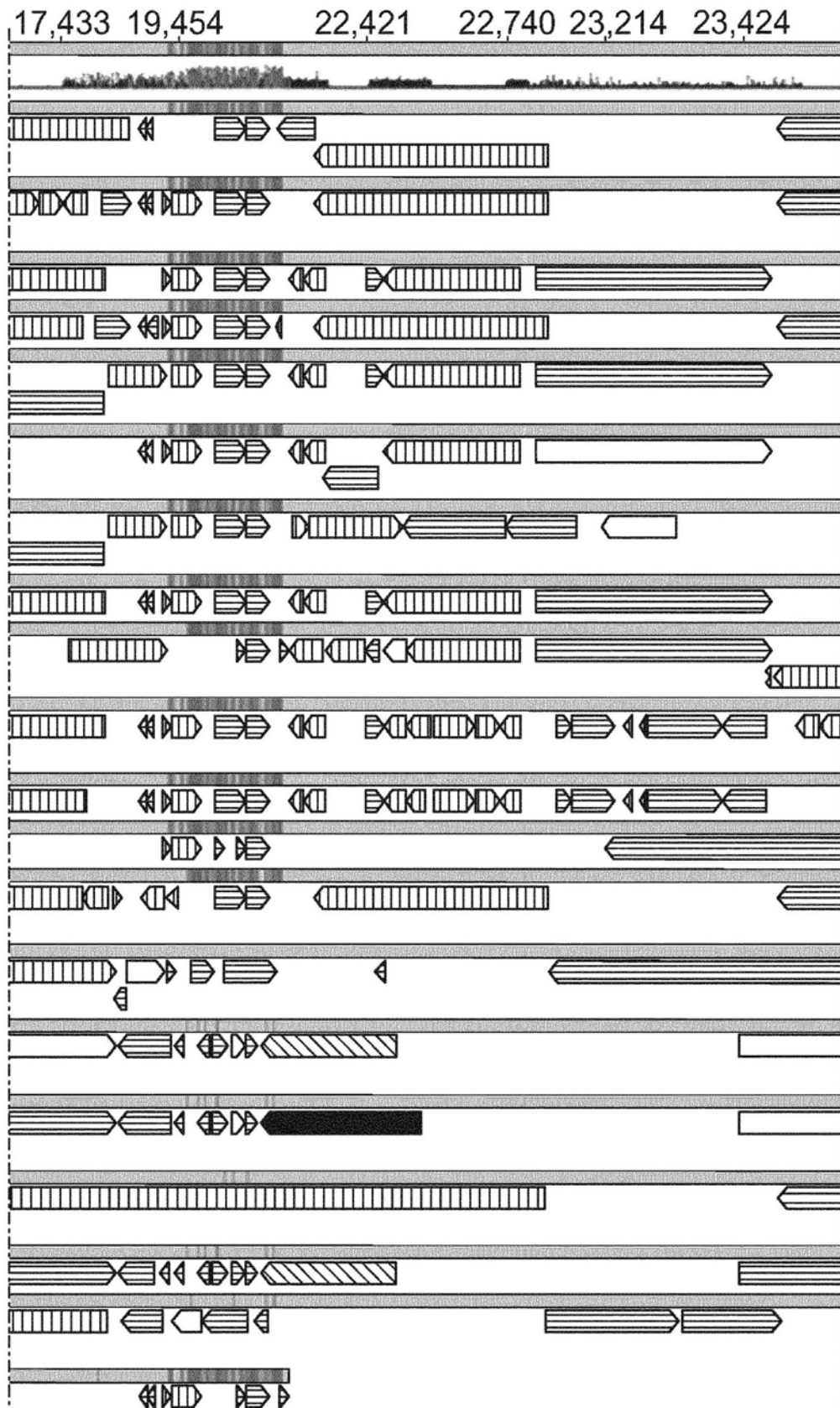


图9A (4)

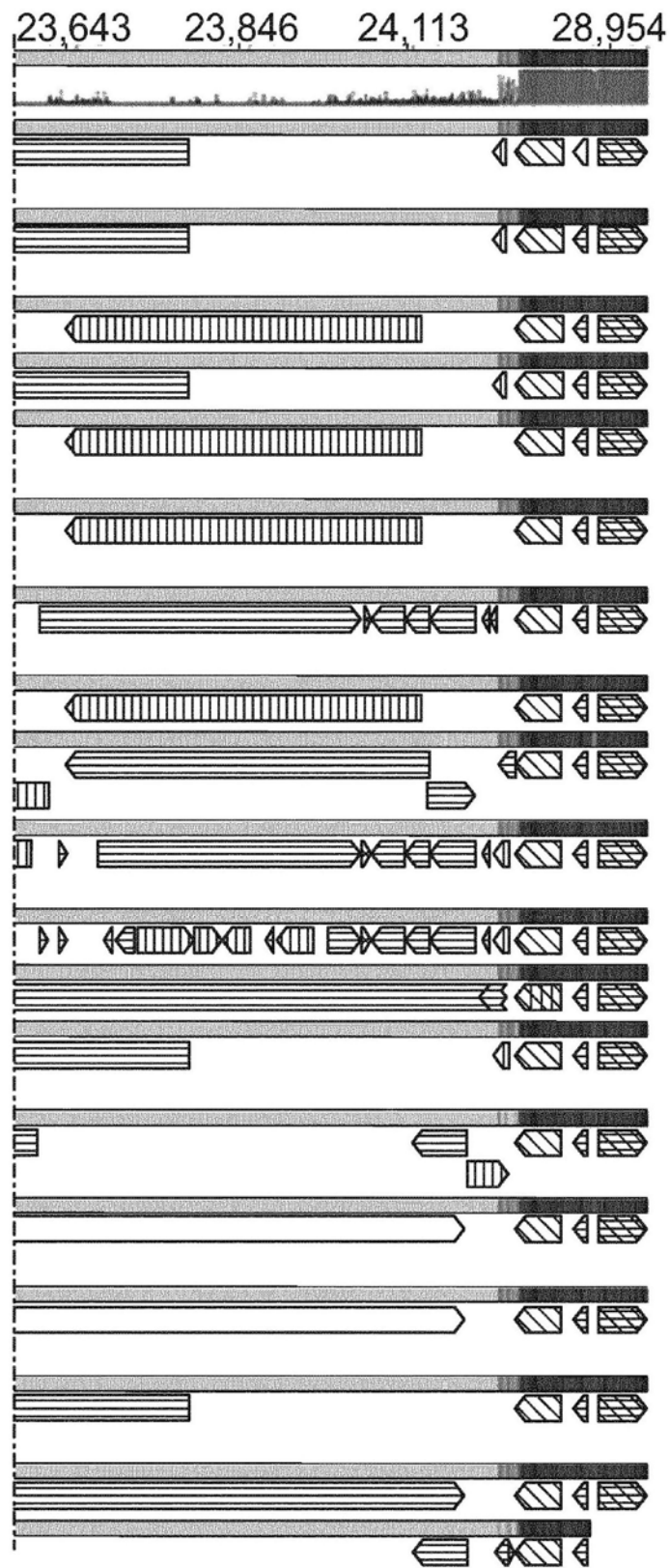


图9A(5)

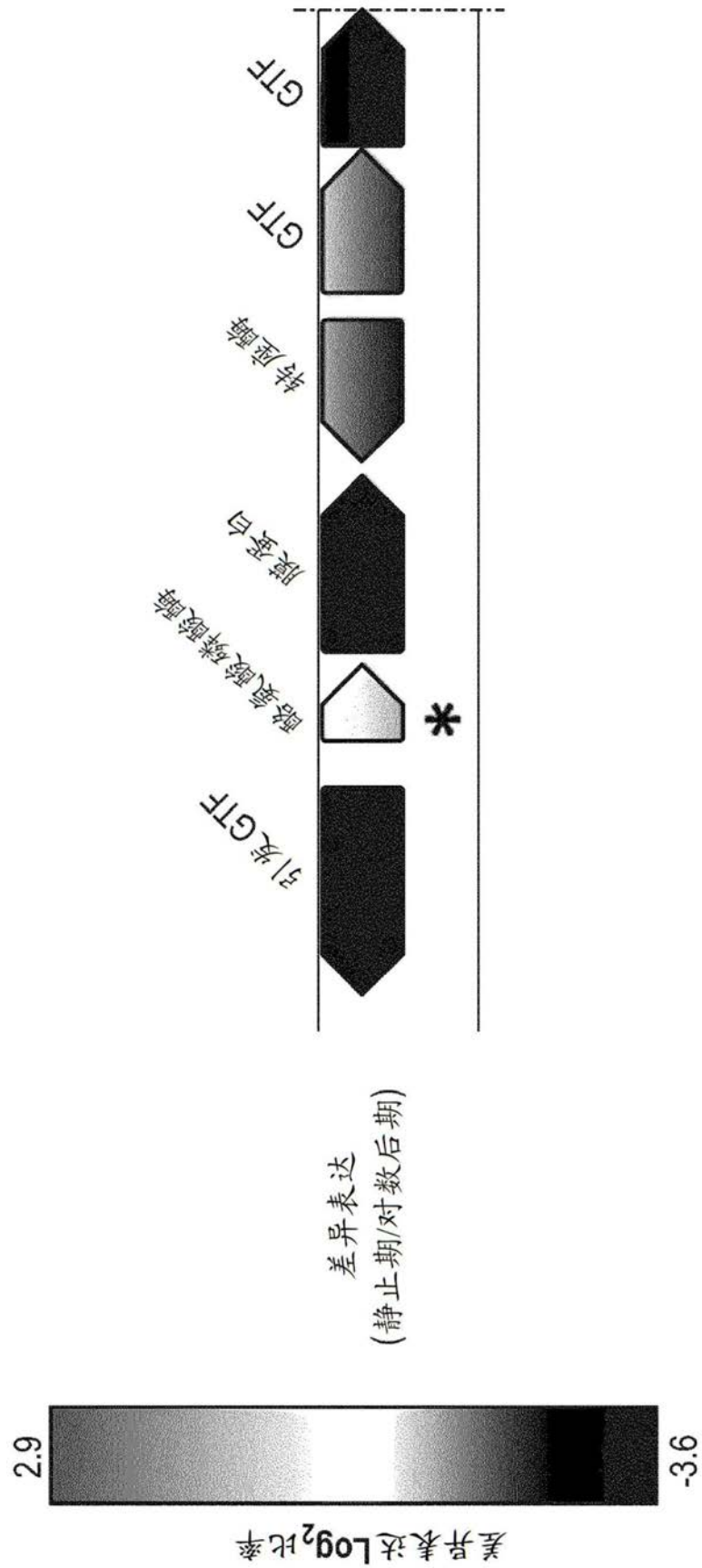


图9B

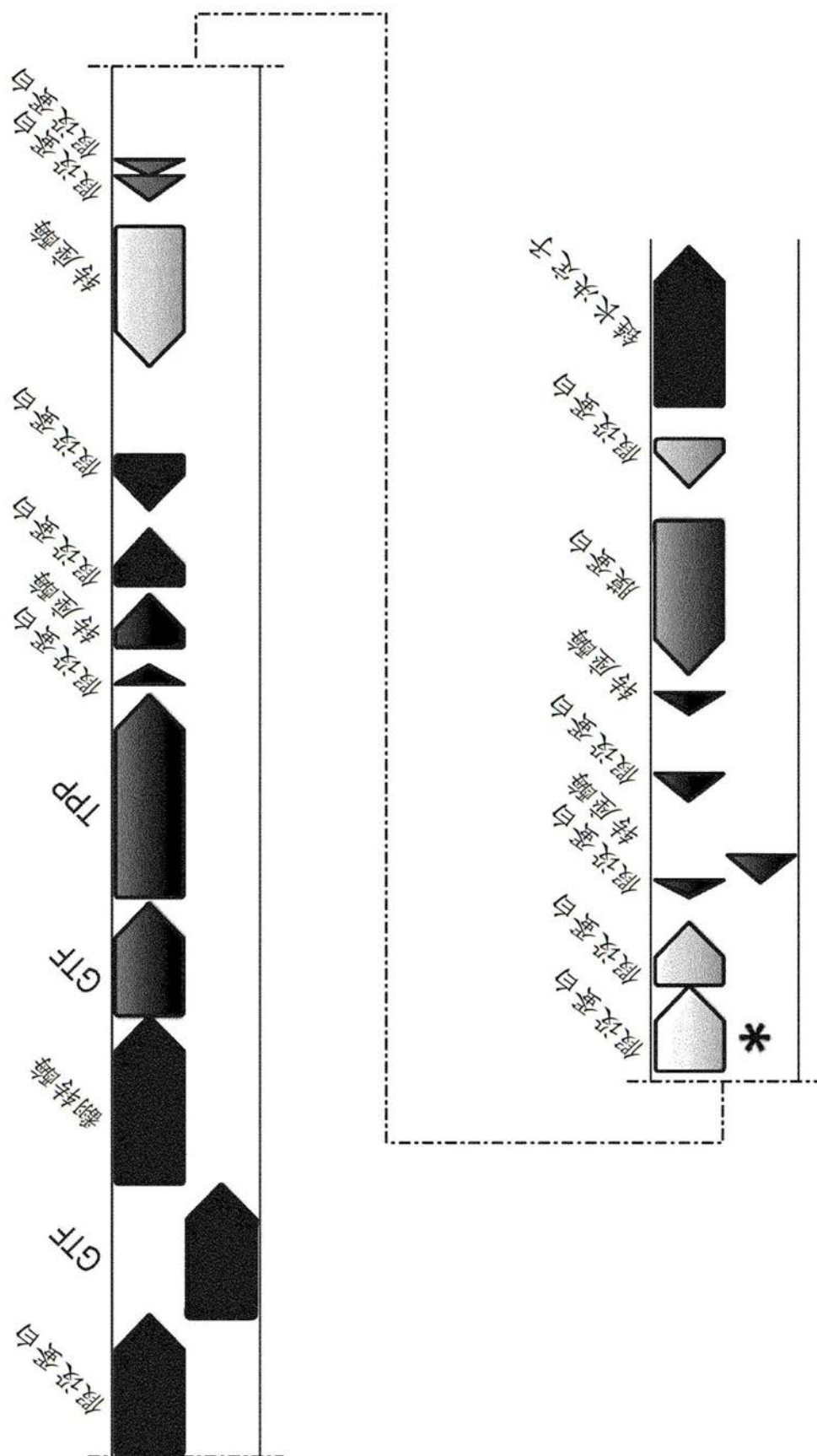


图9B (续)

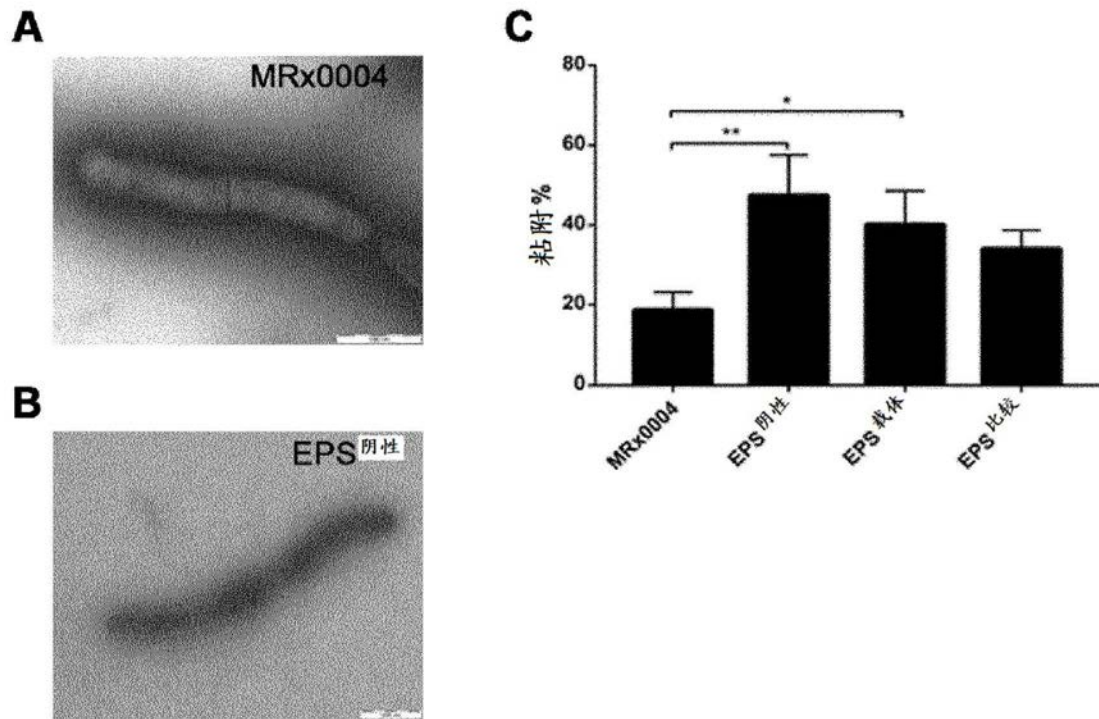


图10

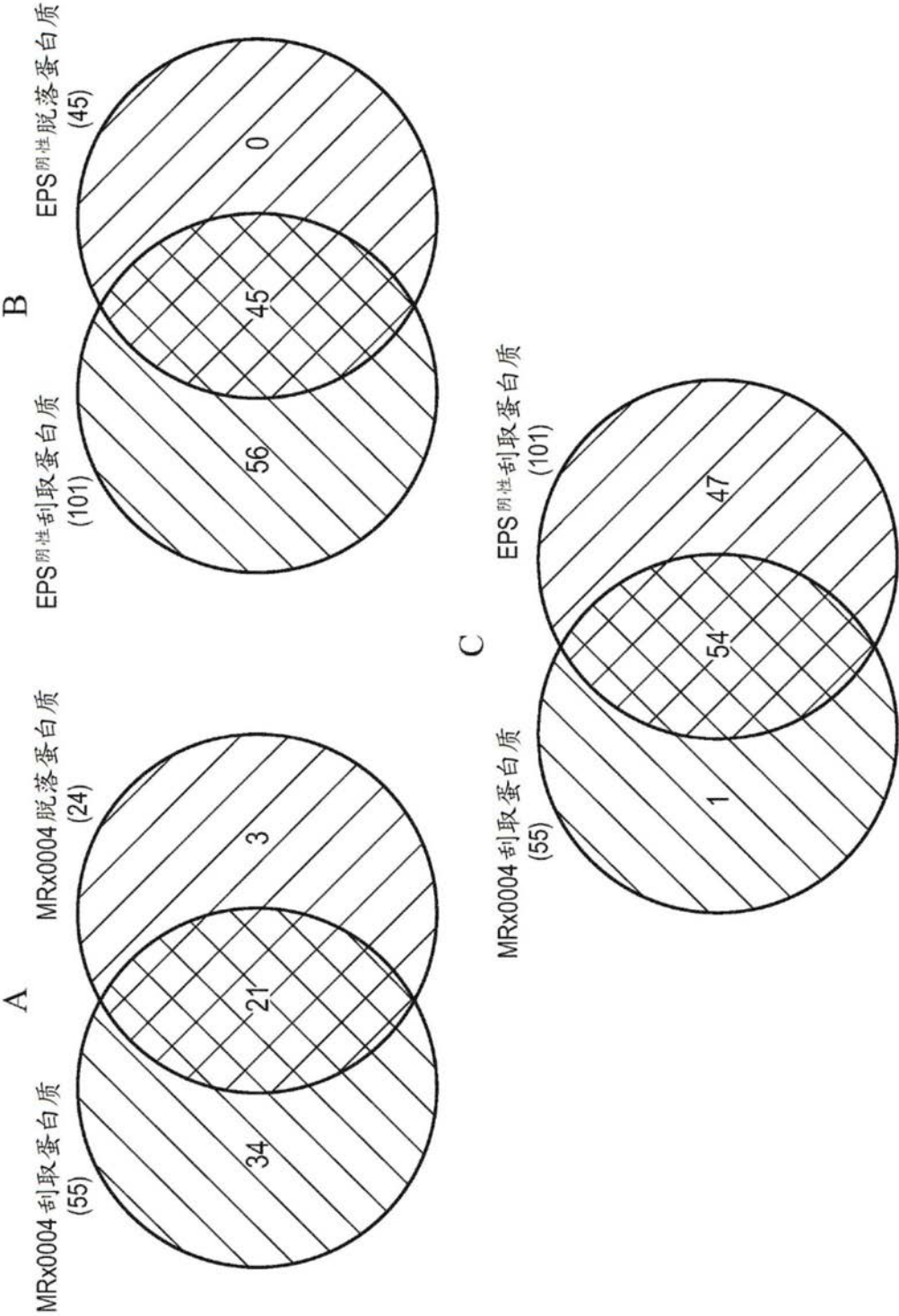


图11

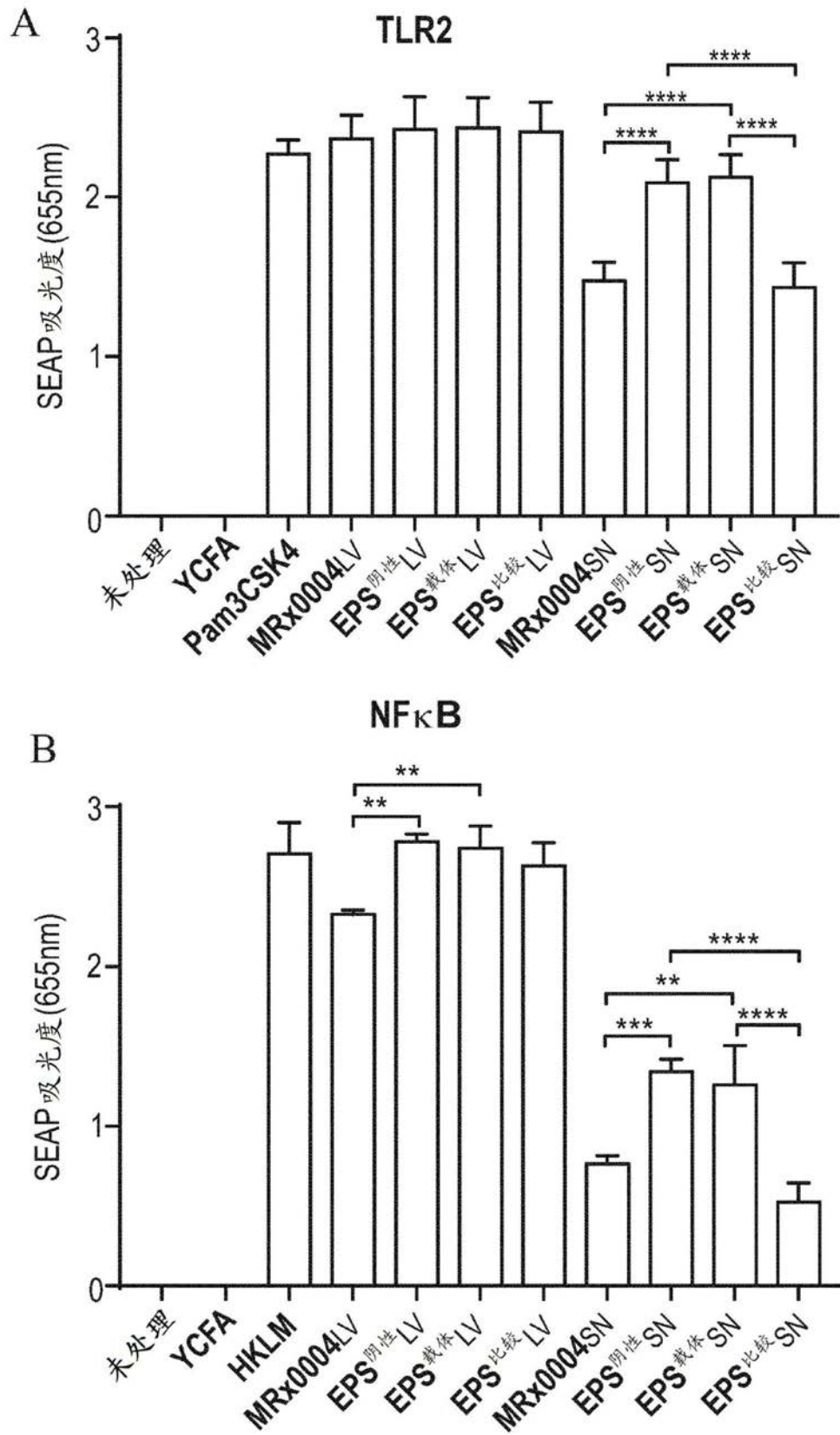


图12

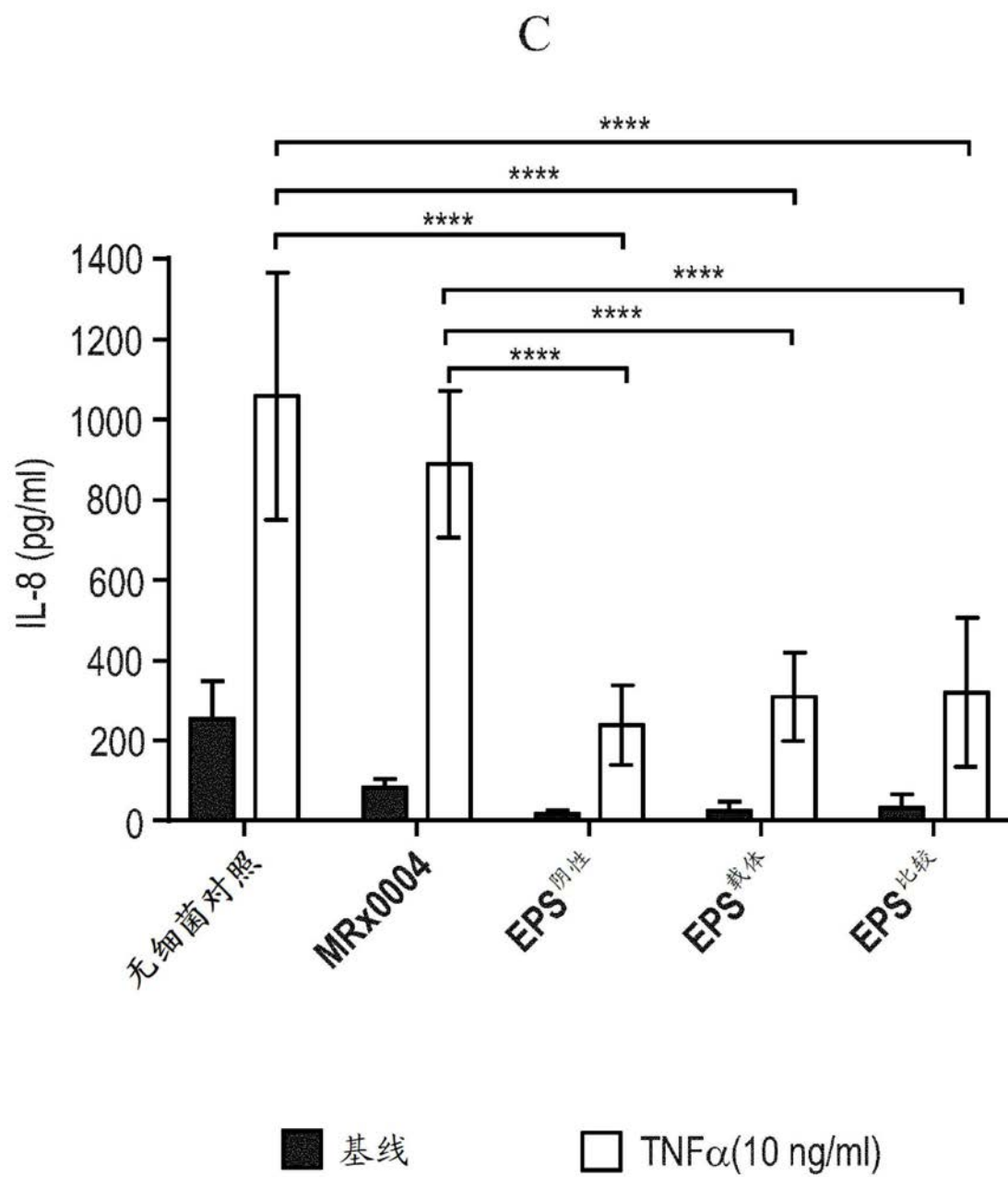


图12

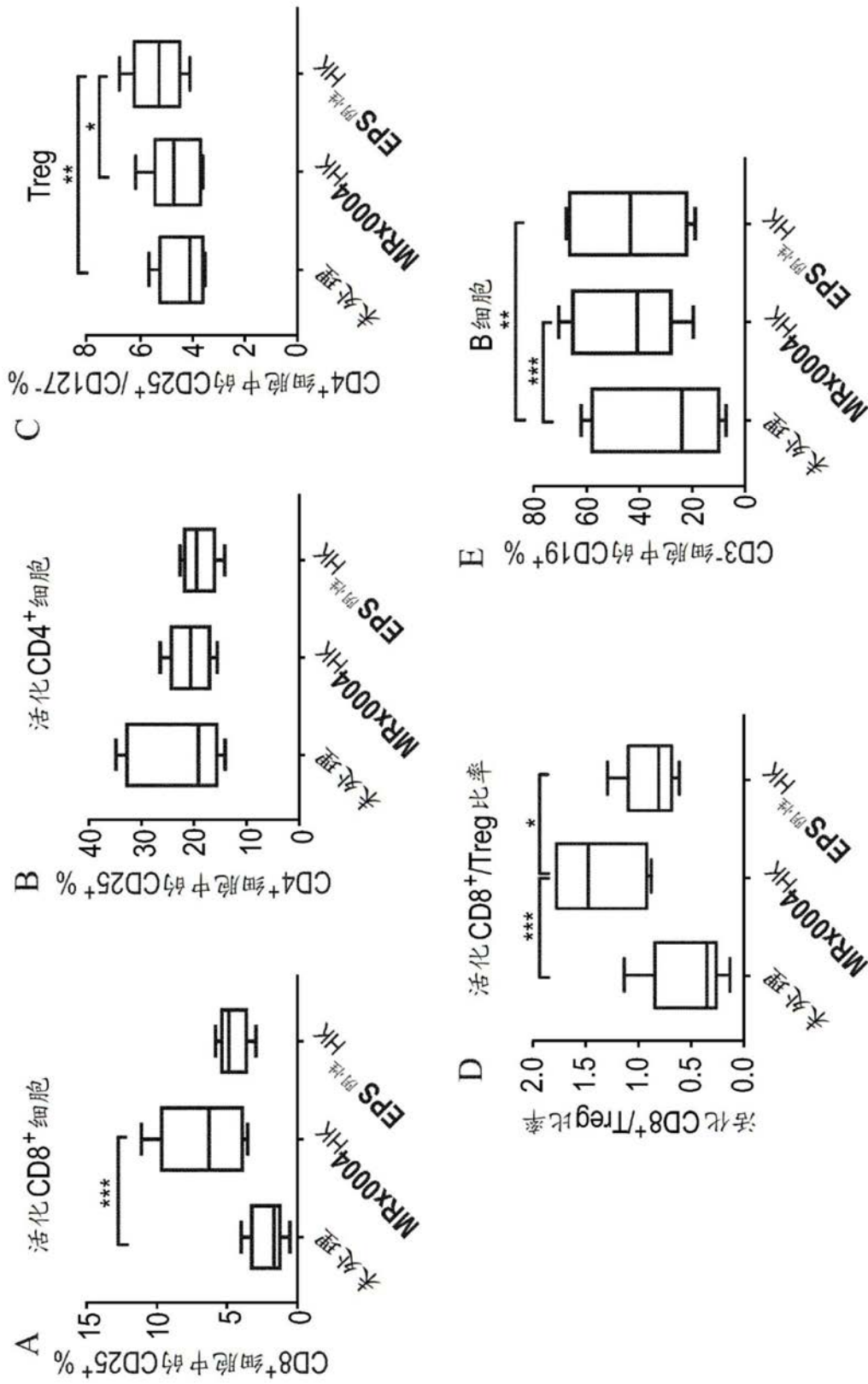


图13

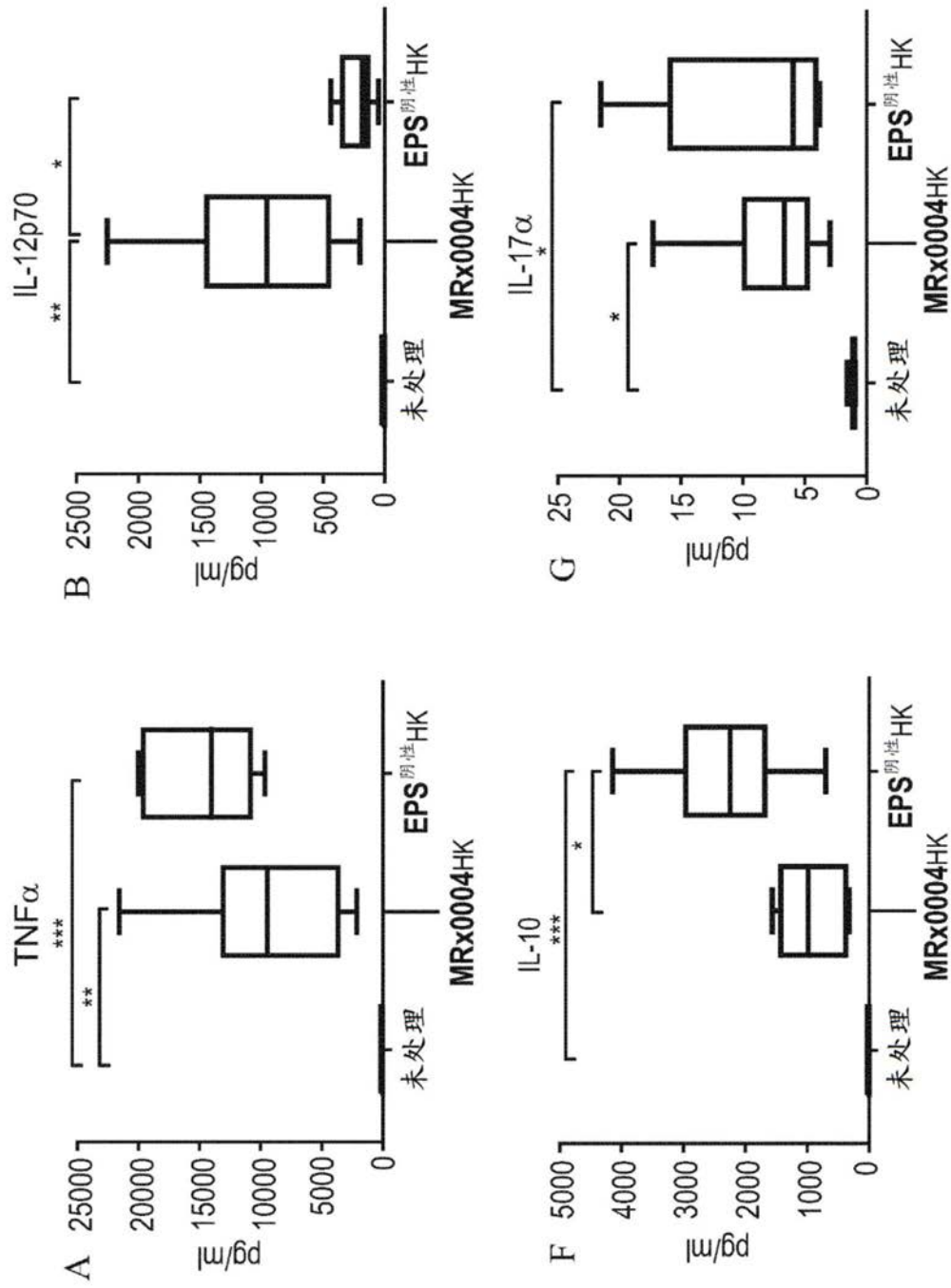


图14

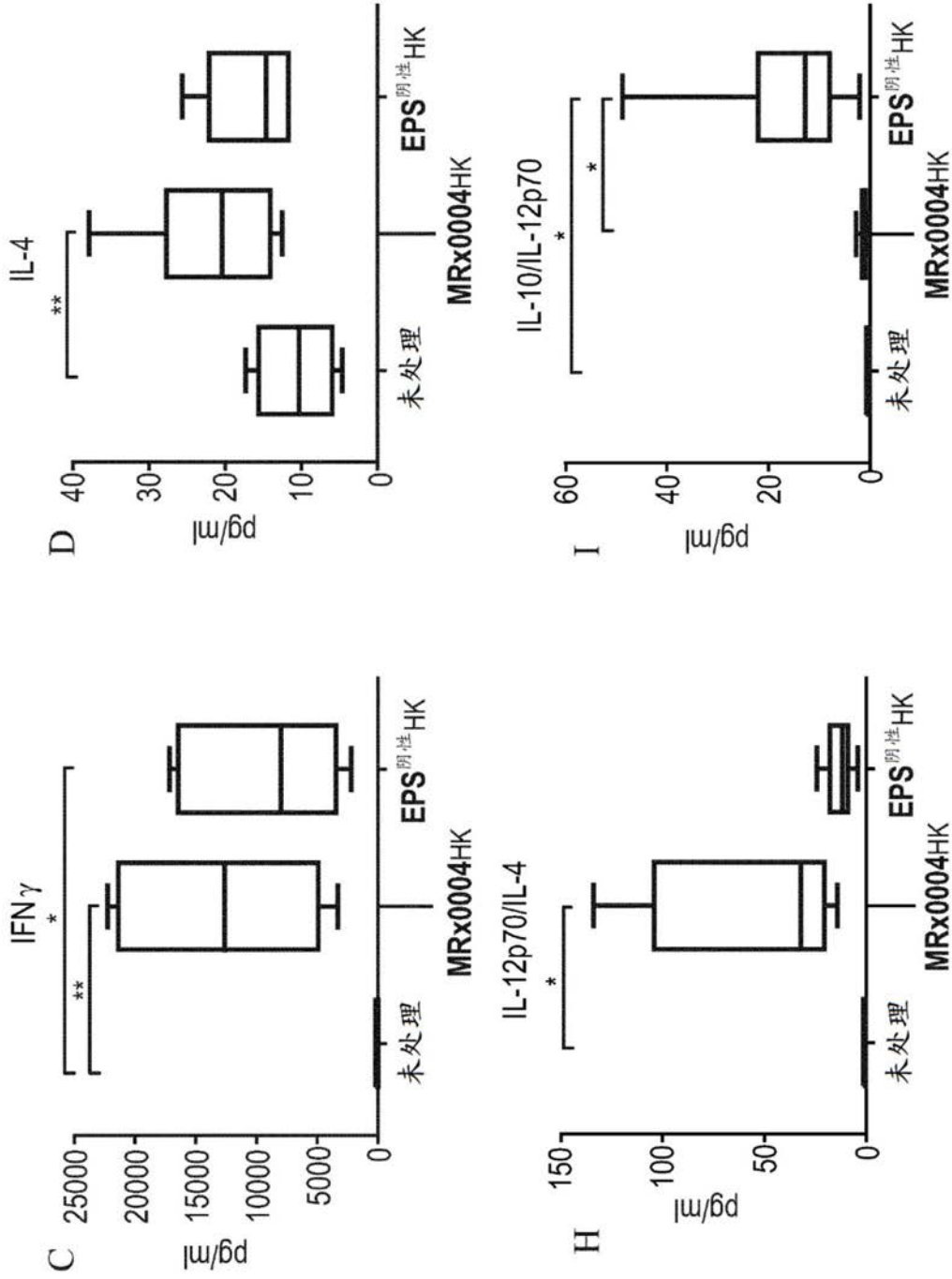


图14(续)

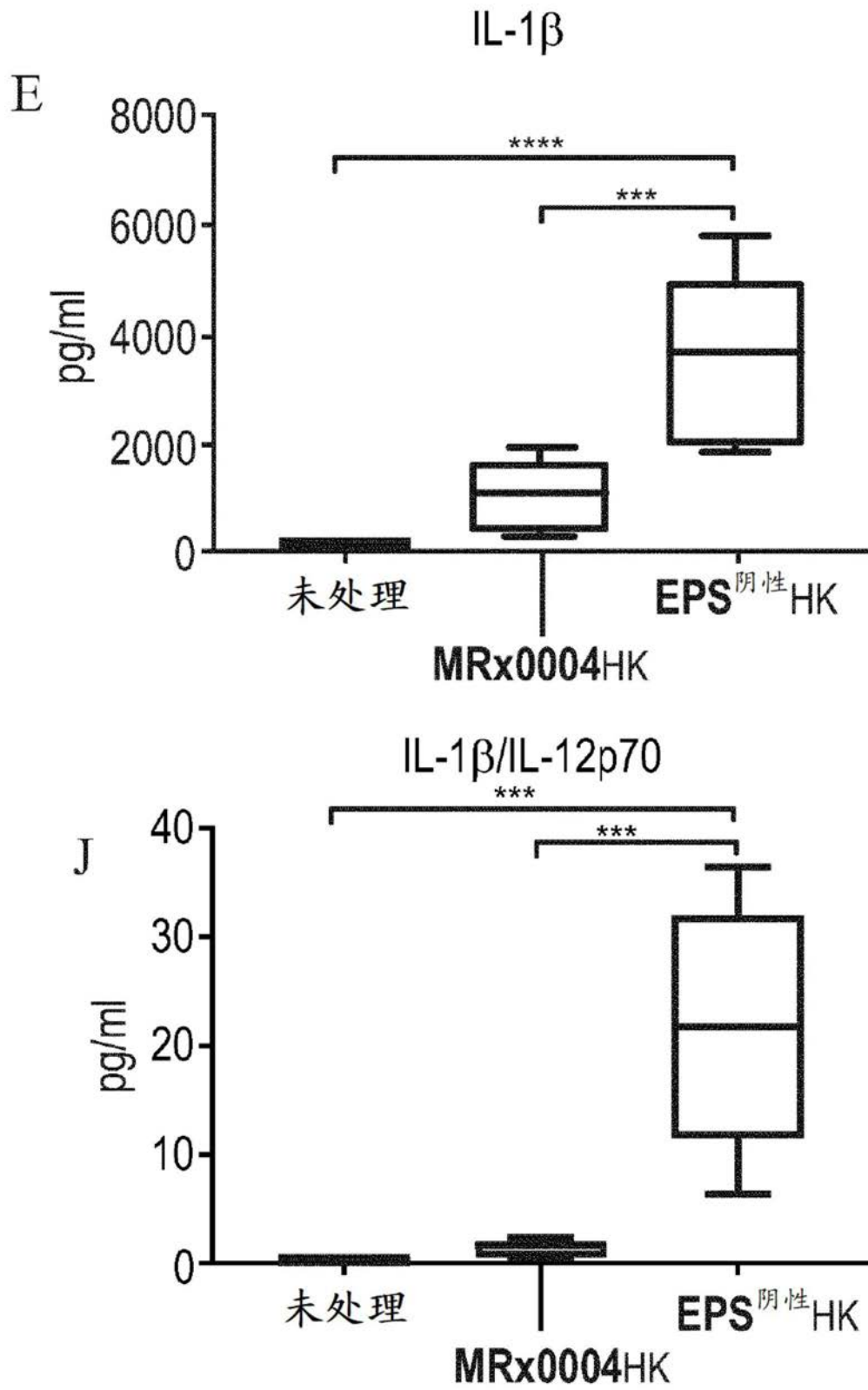


图14(续)

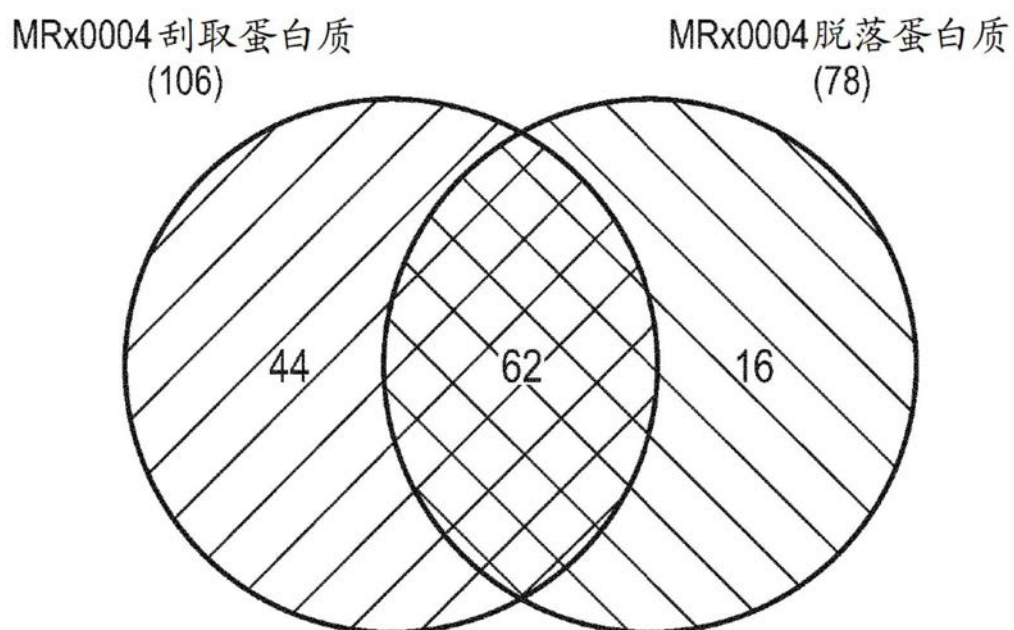


图15

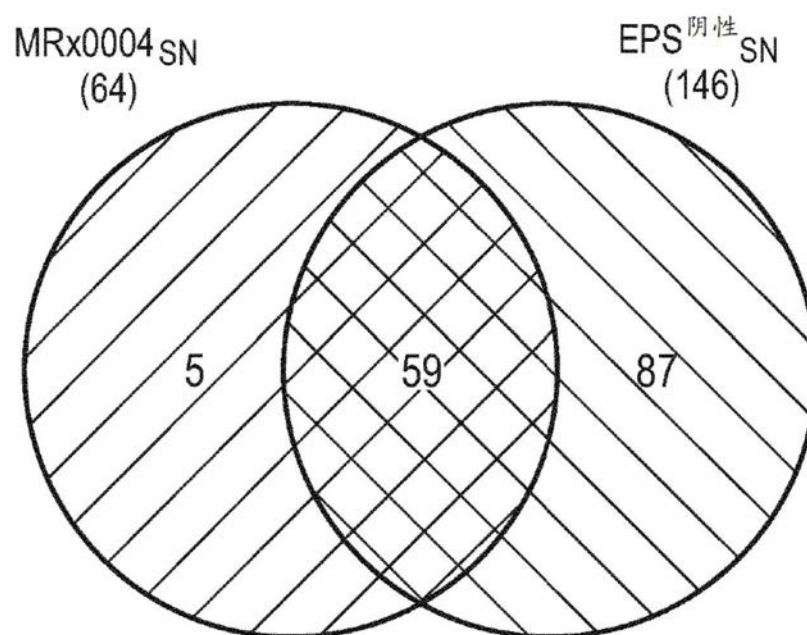


图17

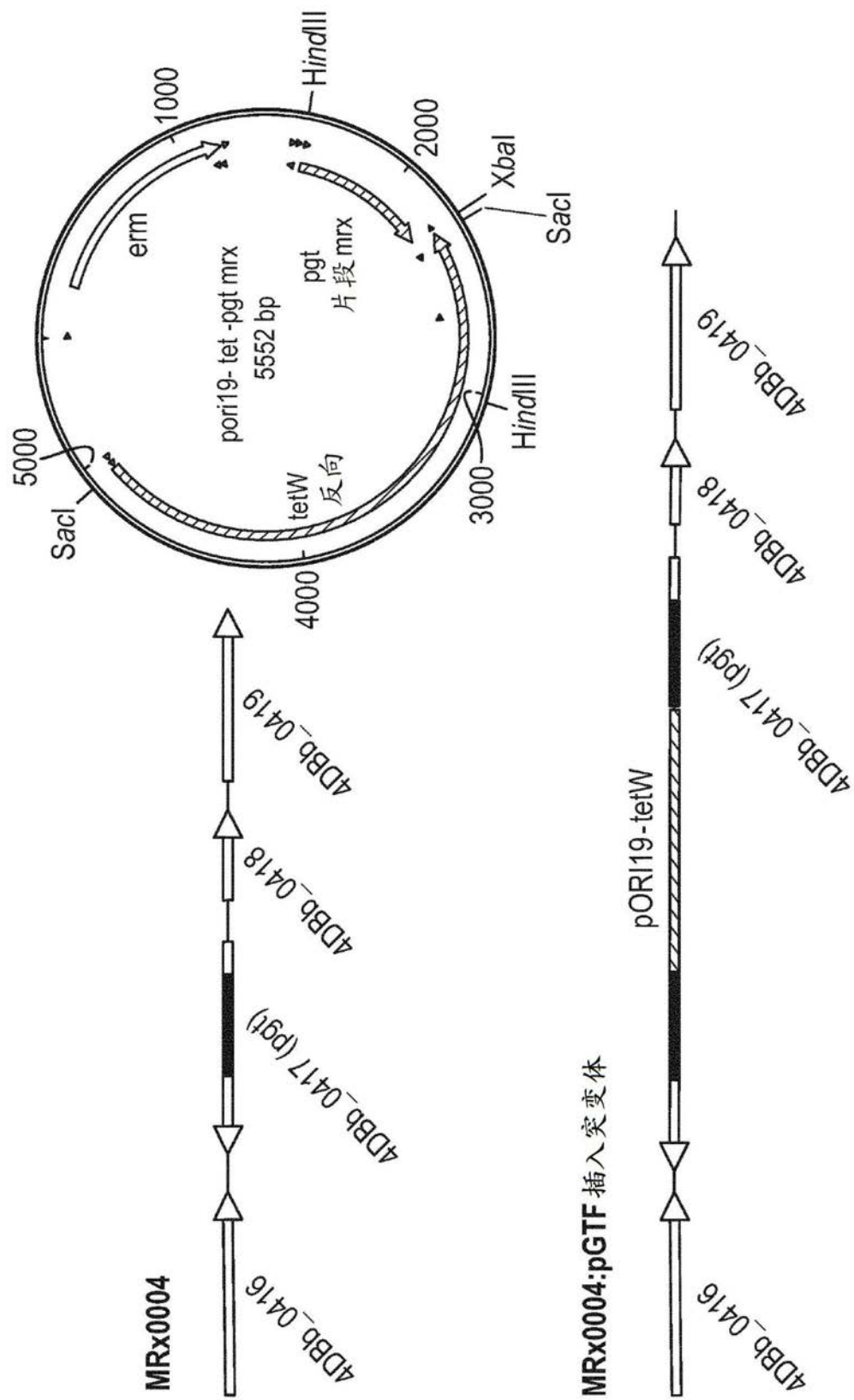


图16A

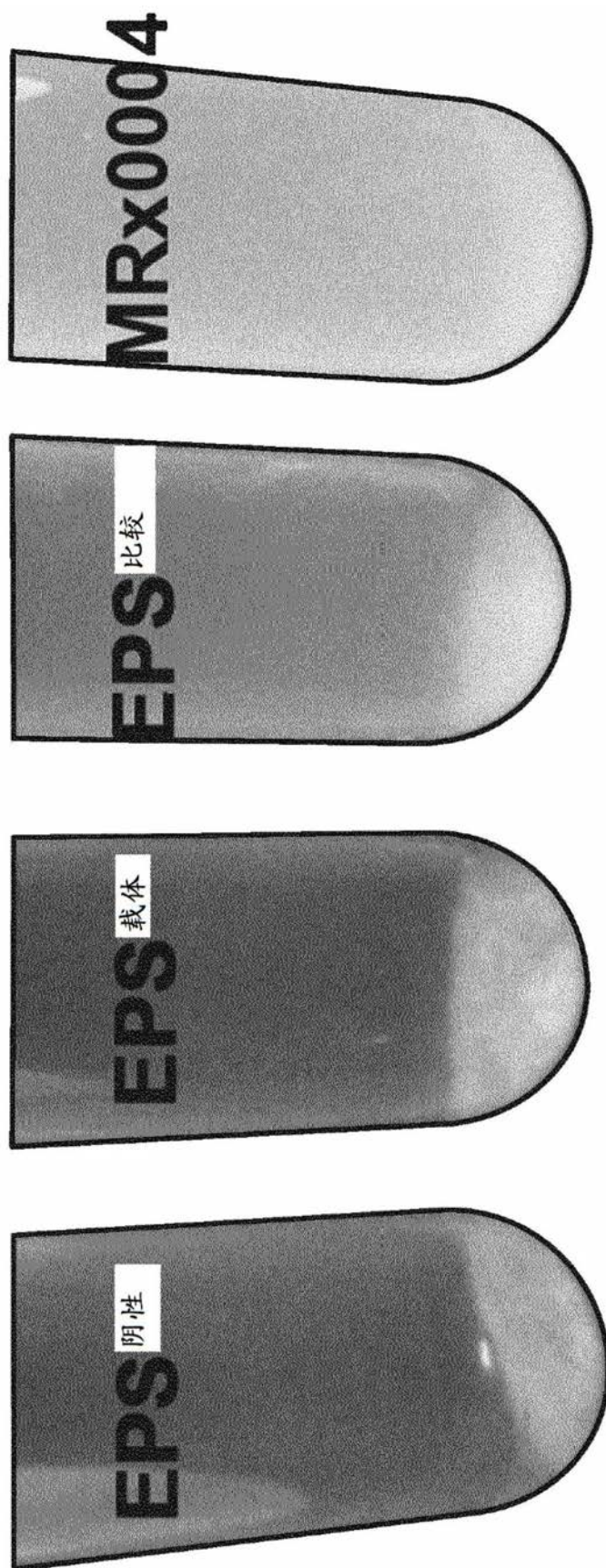


图16B

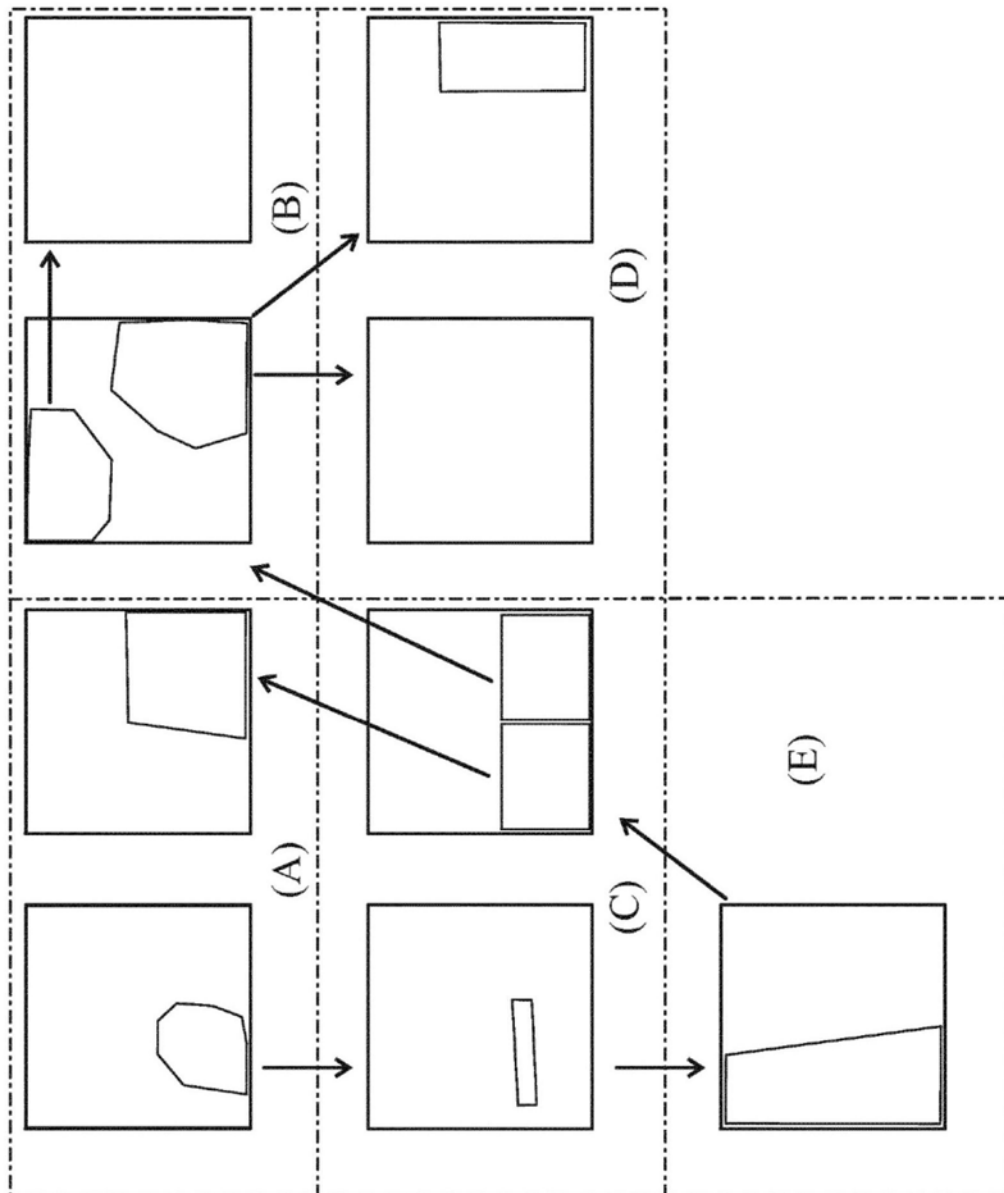


图18

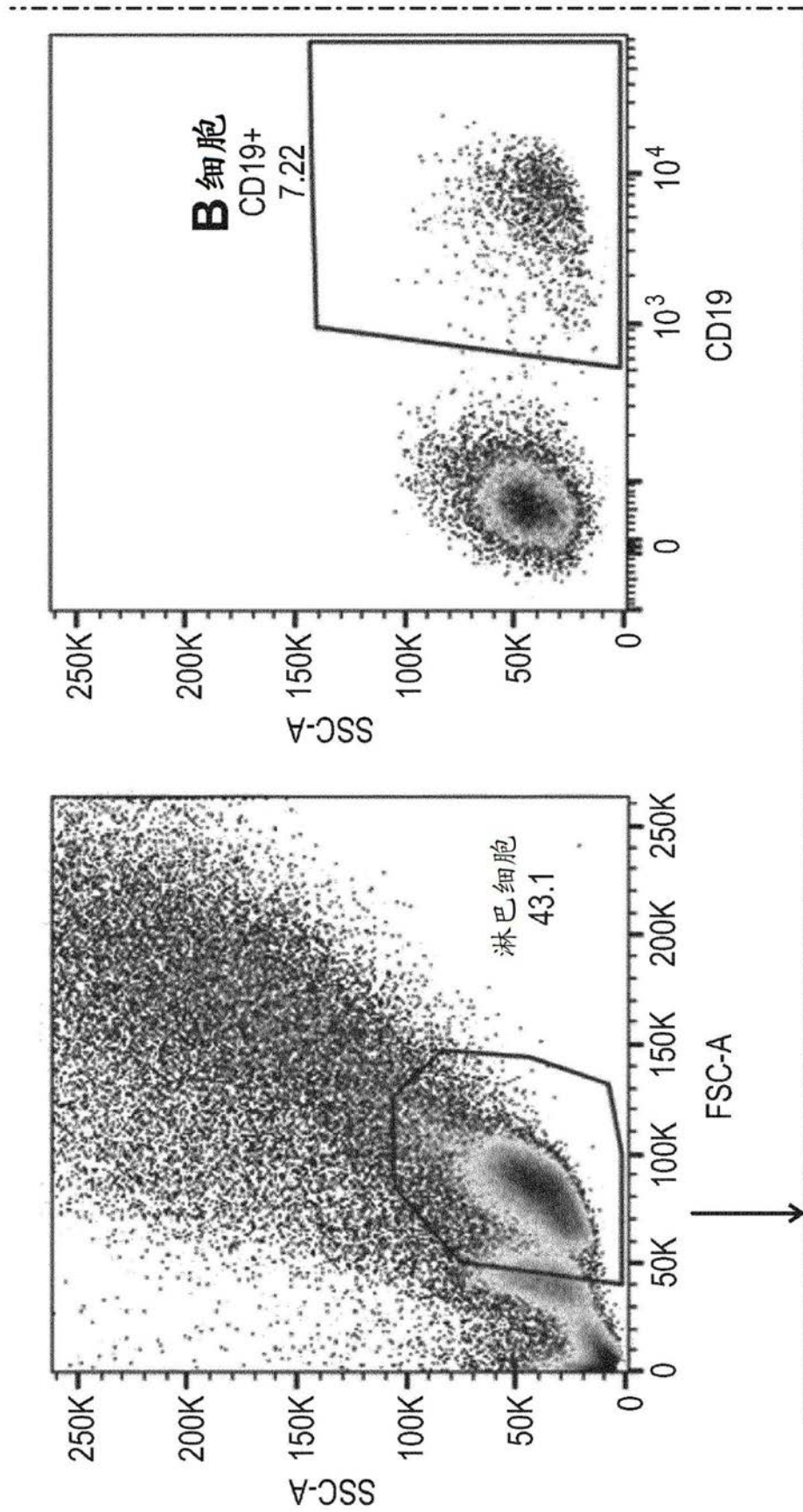


图18(A)

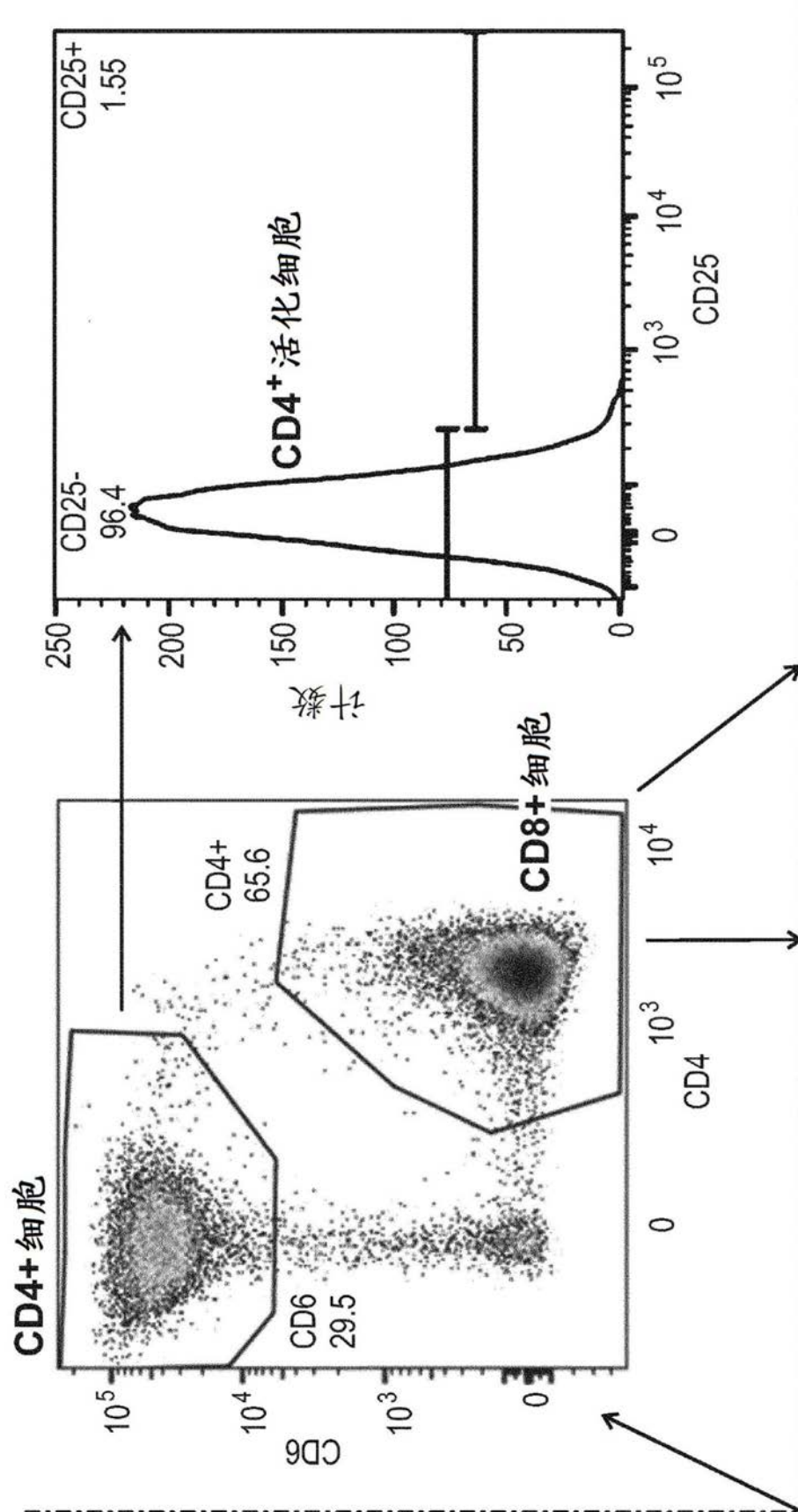


图18(B)

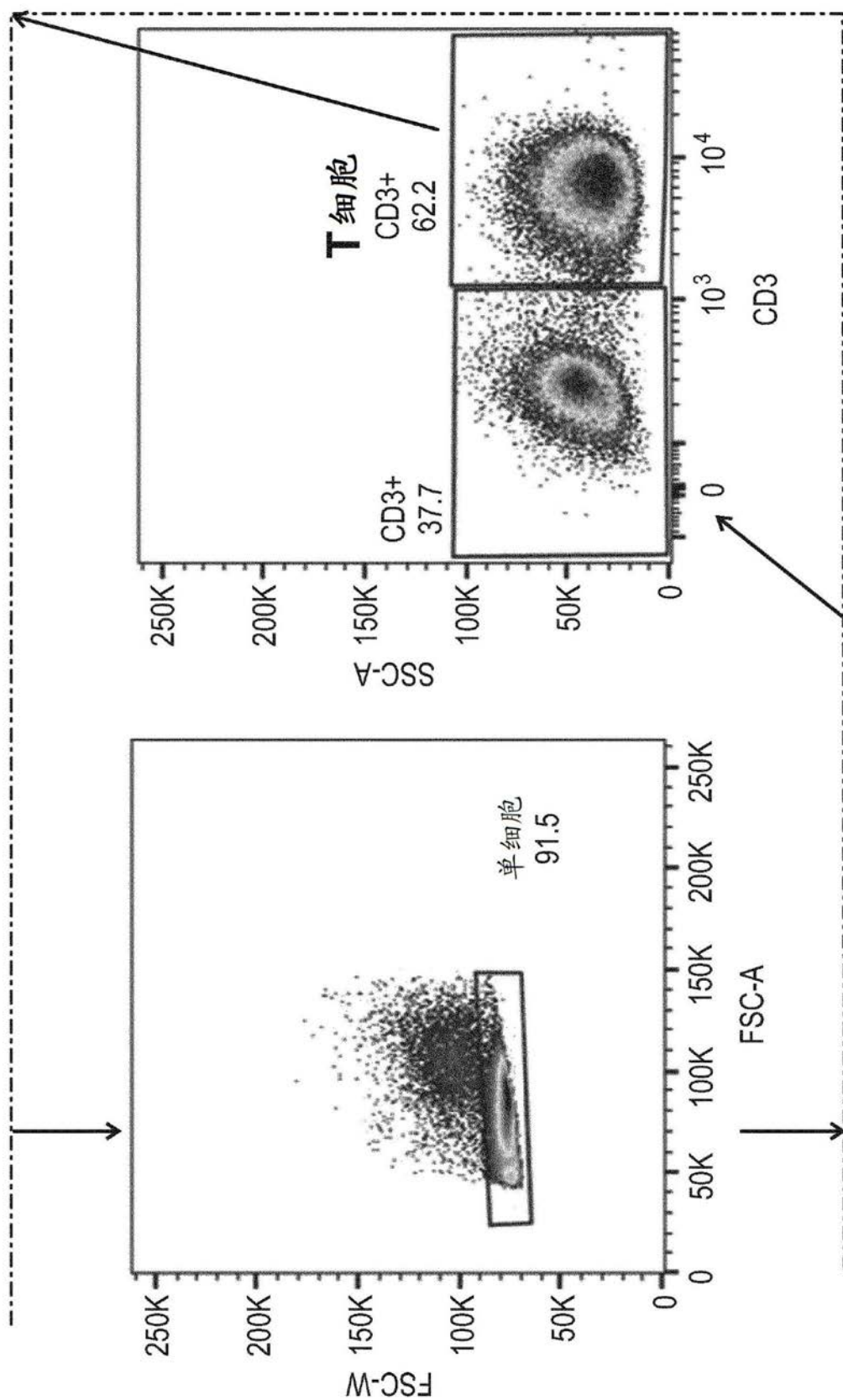


图18(C)

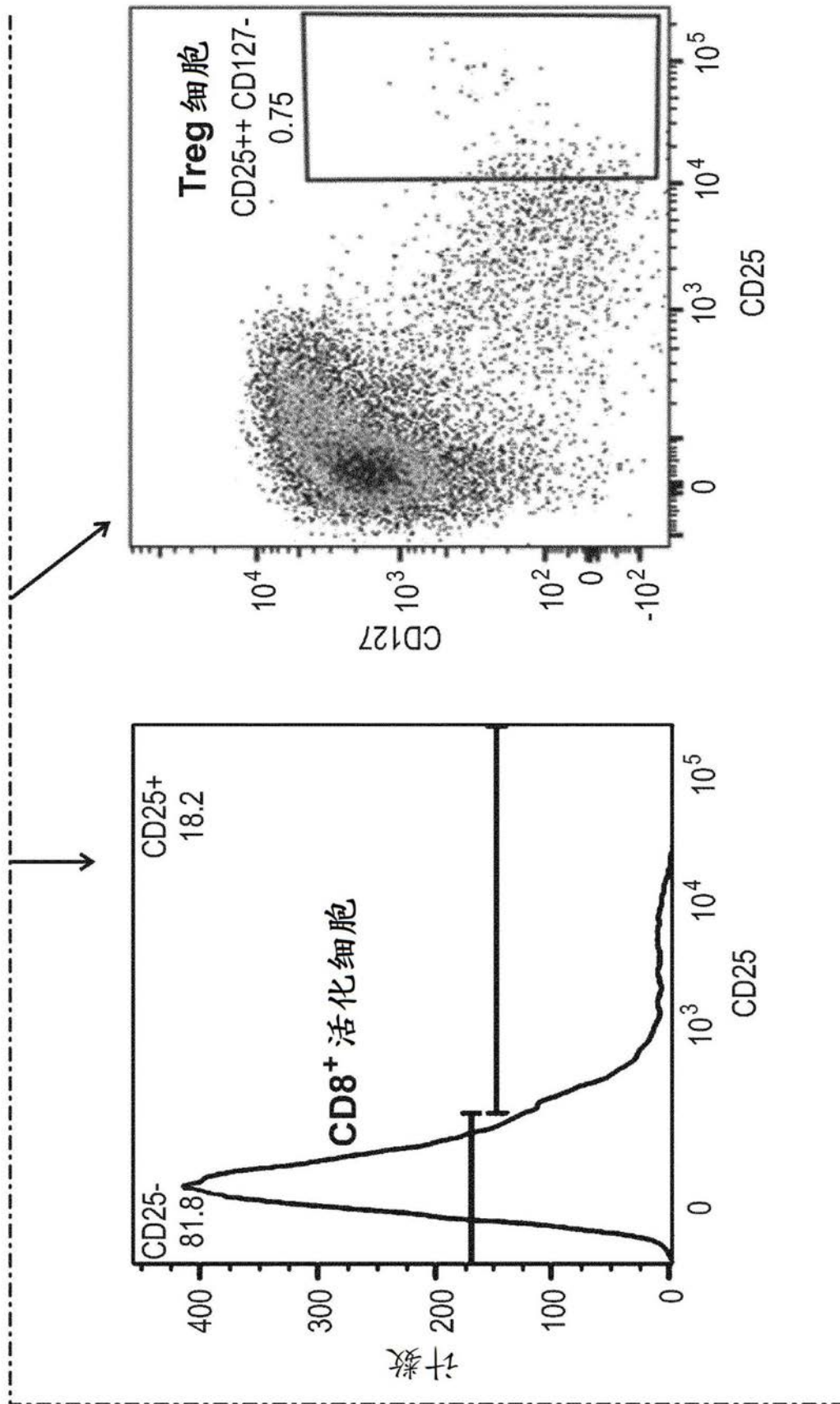


图18(D)

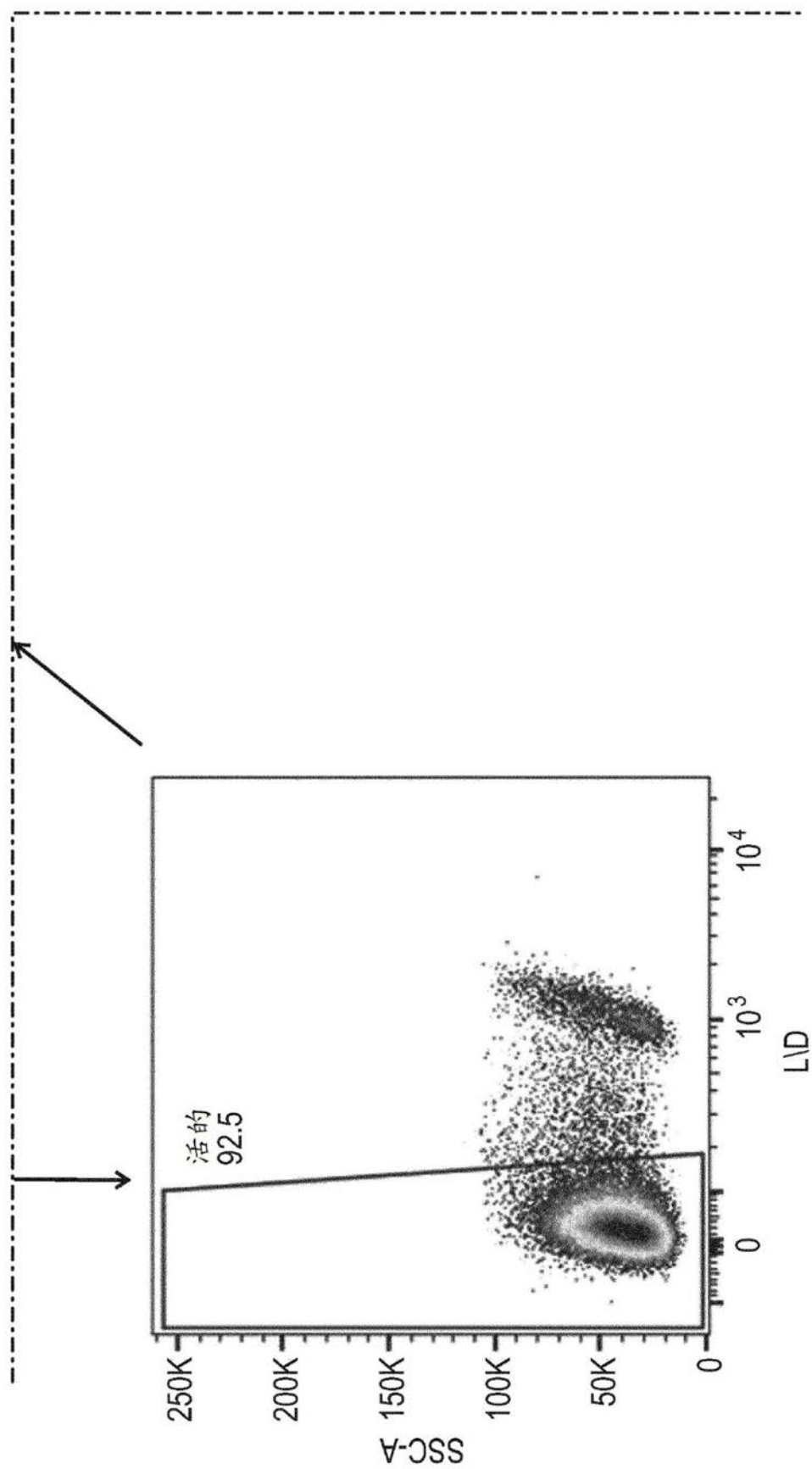


图18(E)

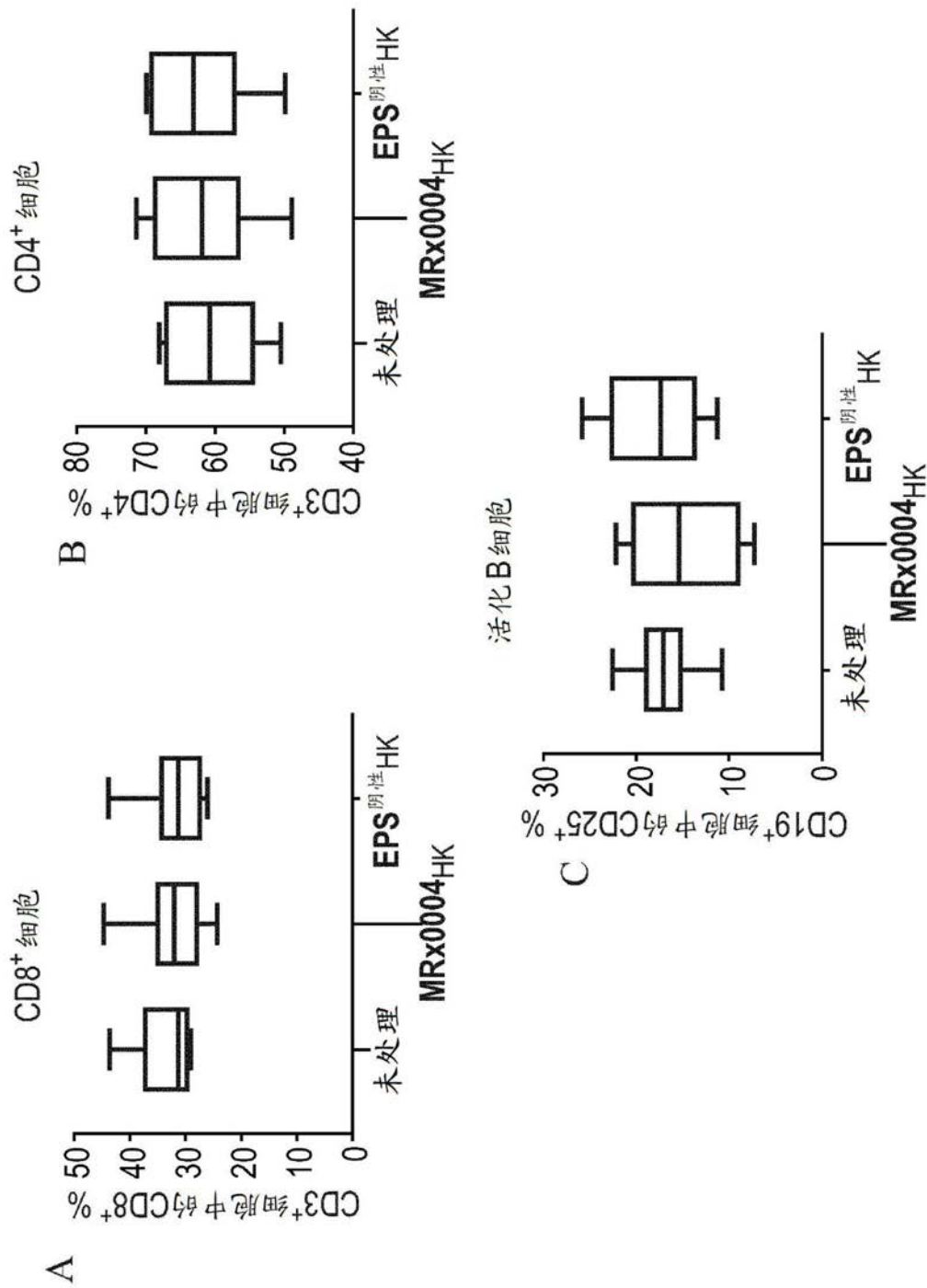


图19

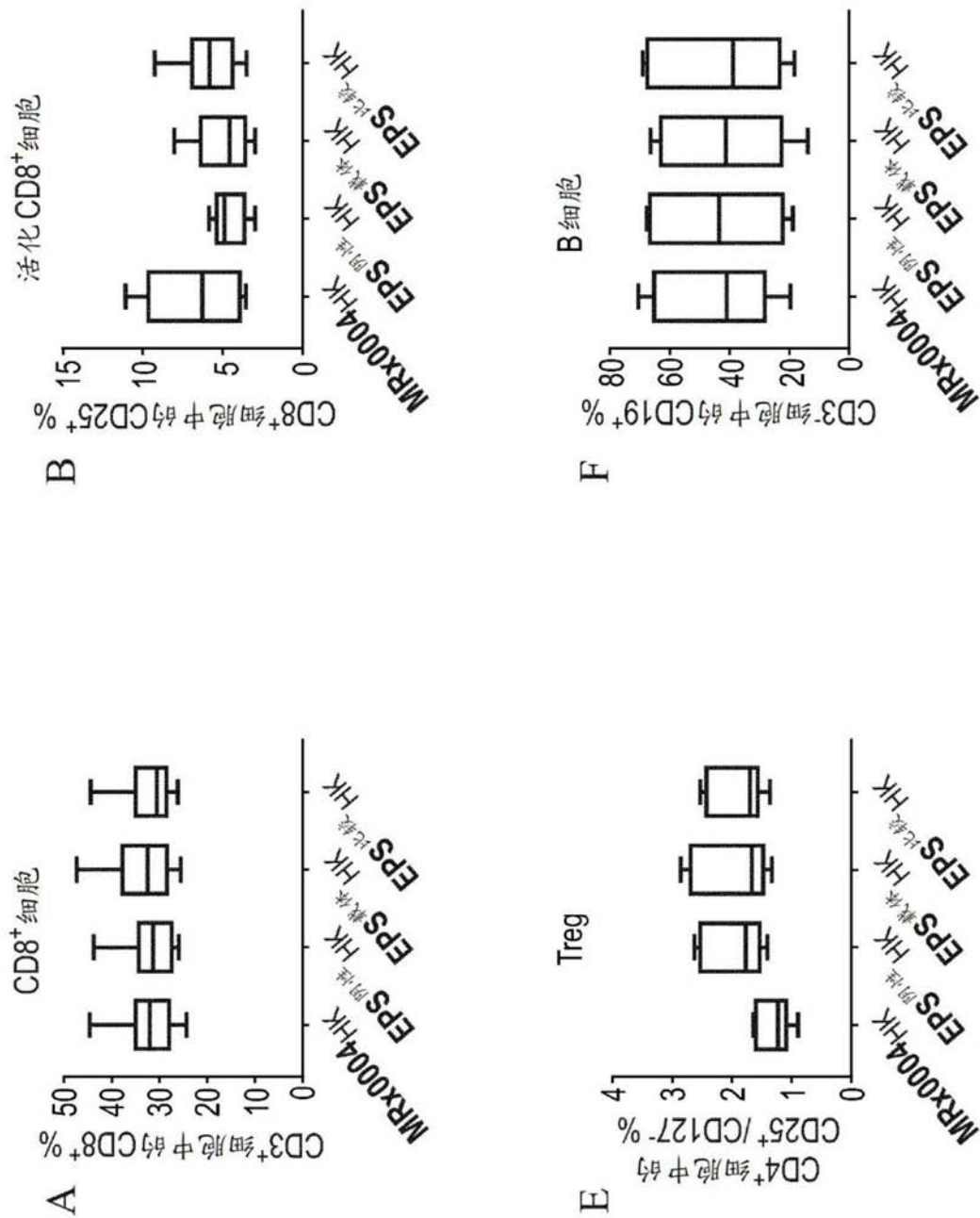


图20

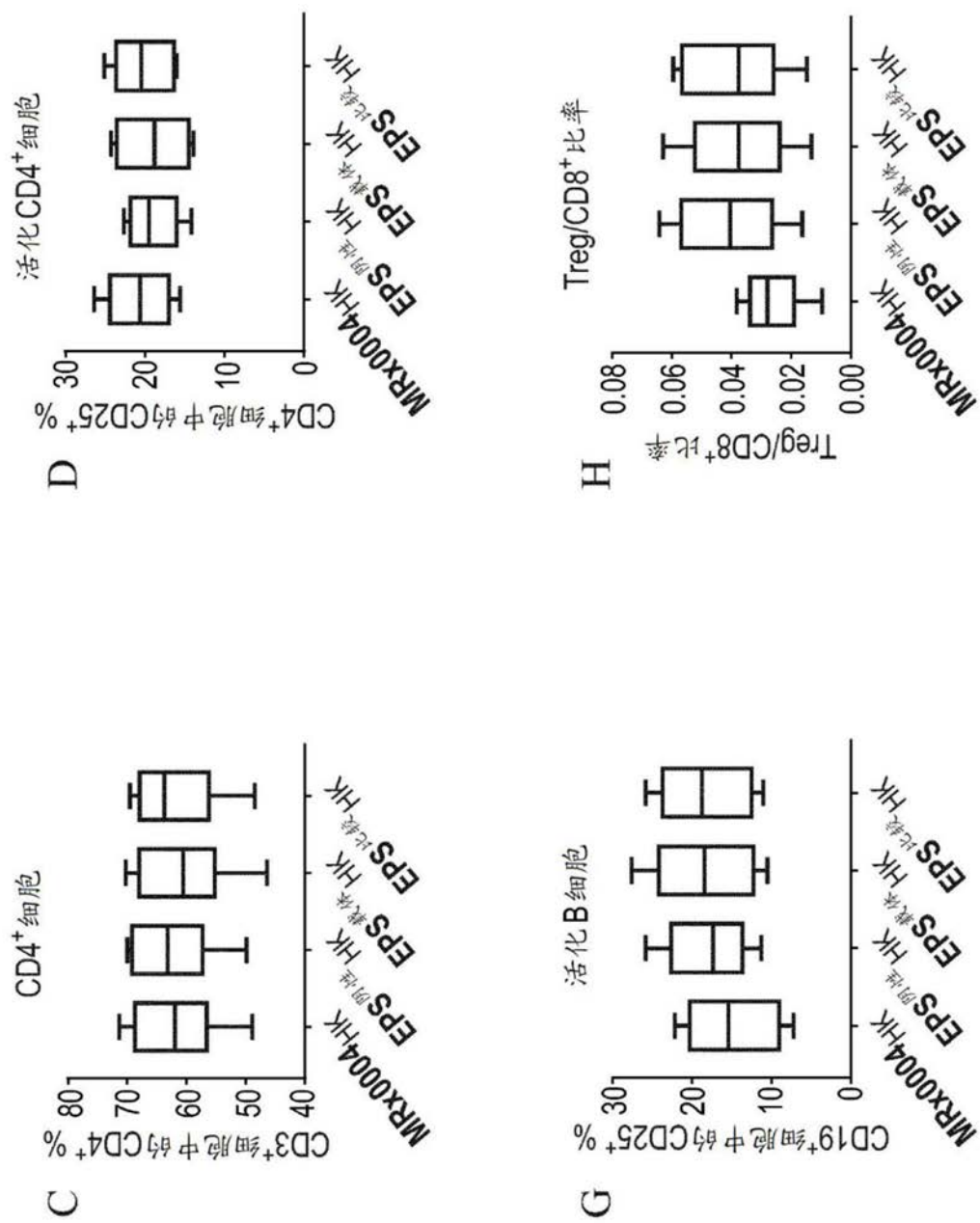


图20 (续)

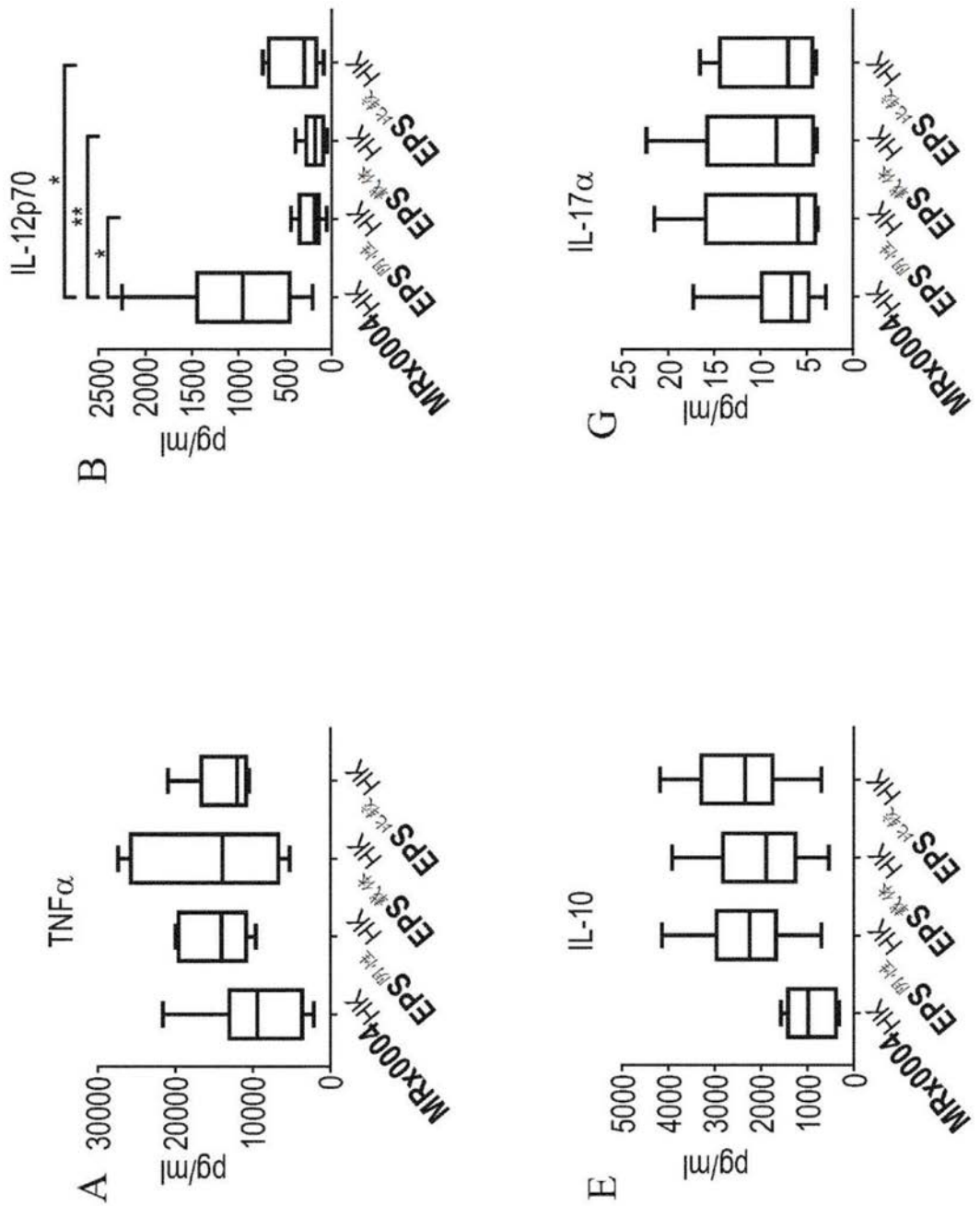


图21

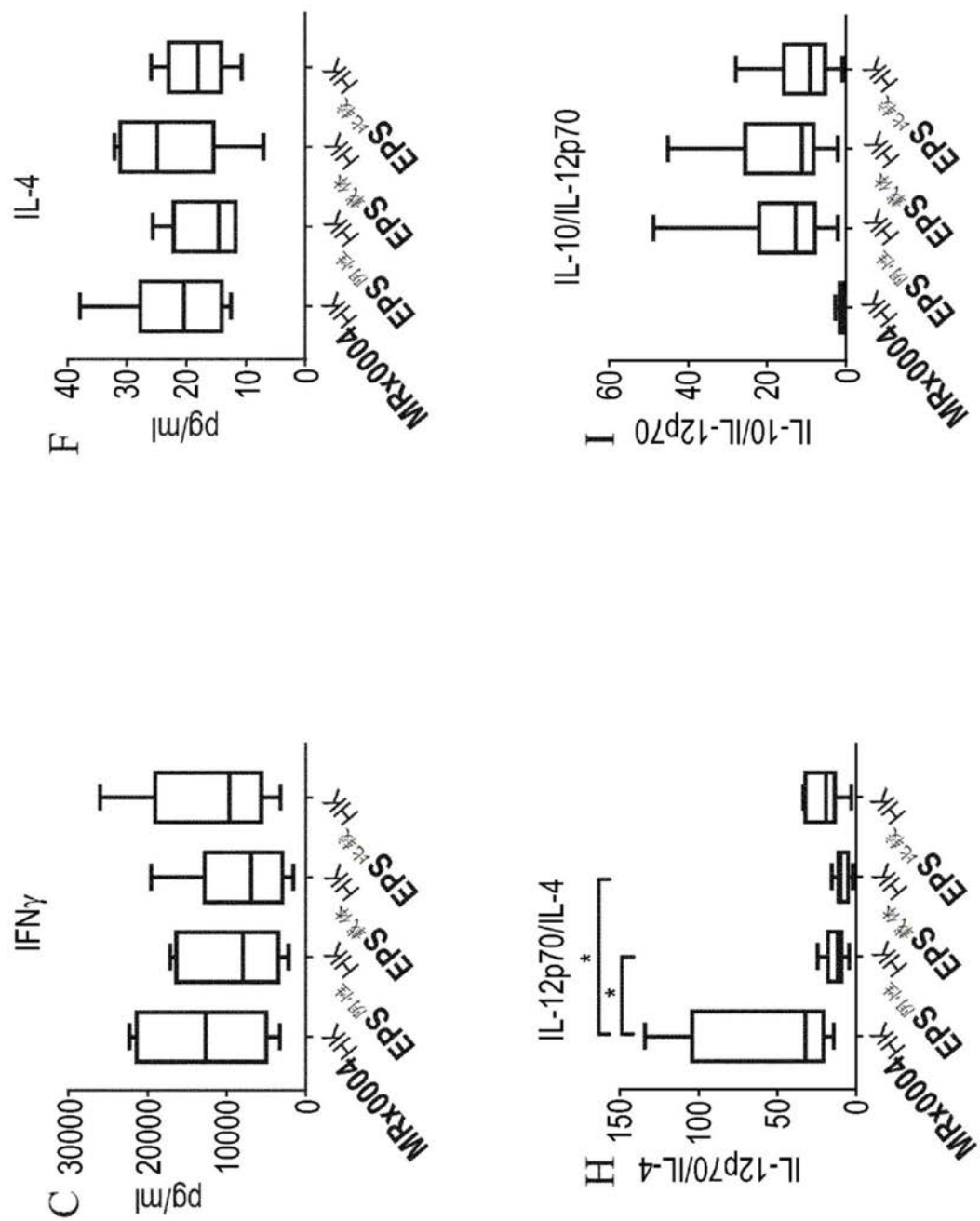


图21 (续)

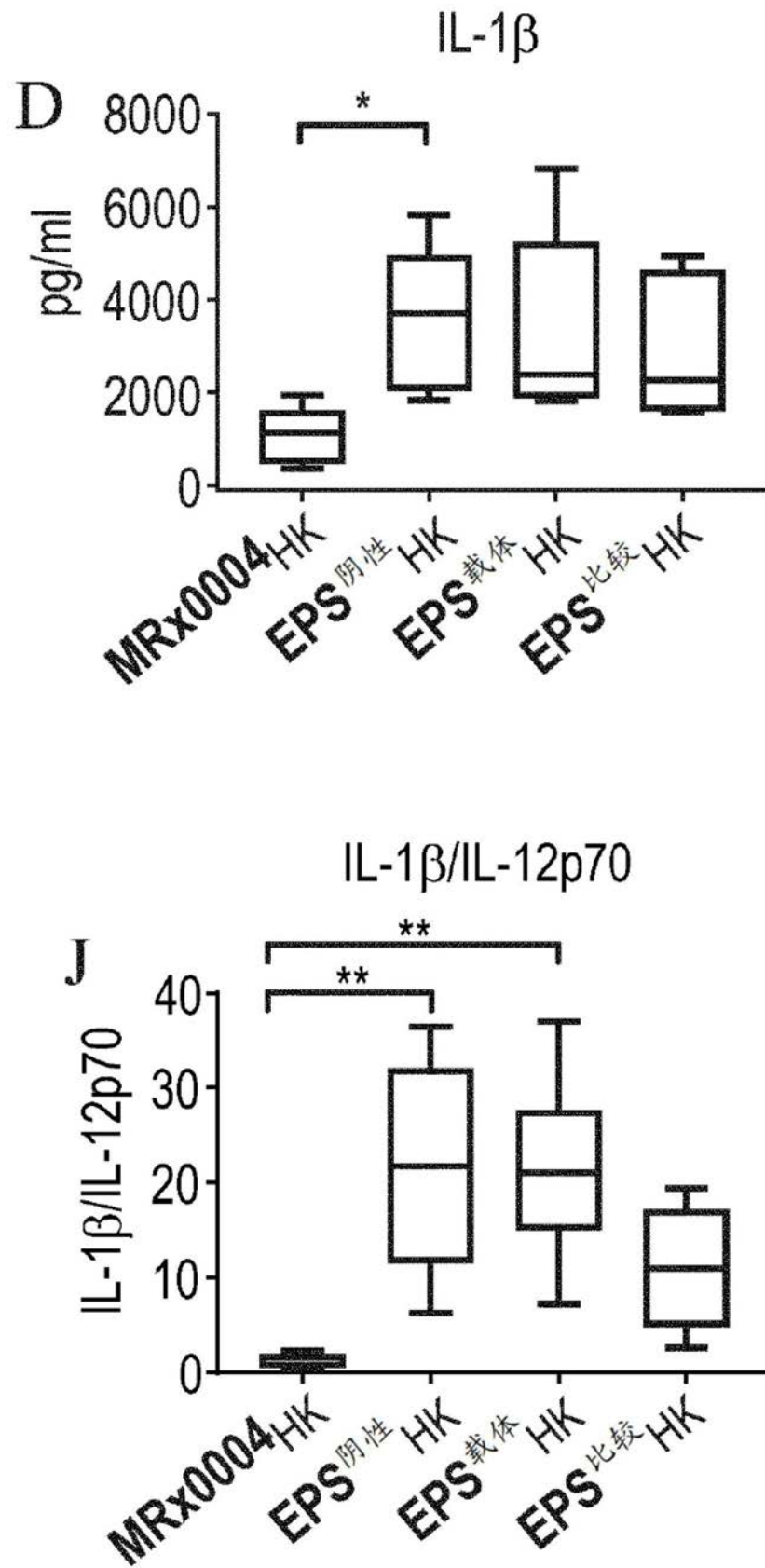


图21 (续)



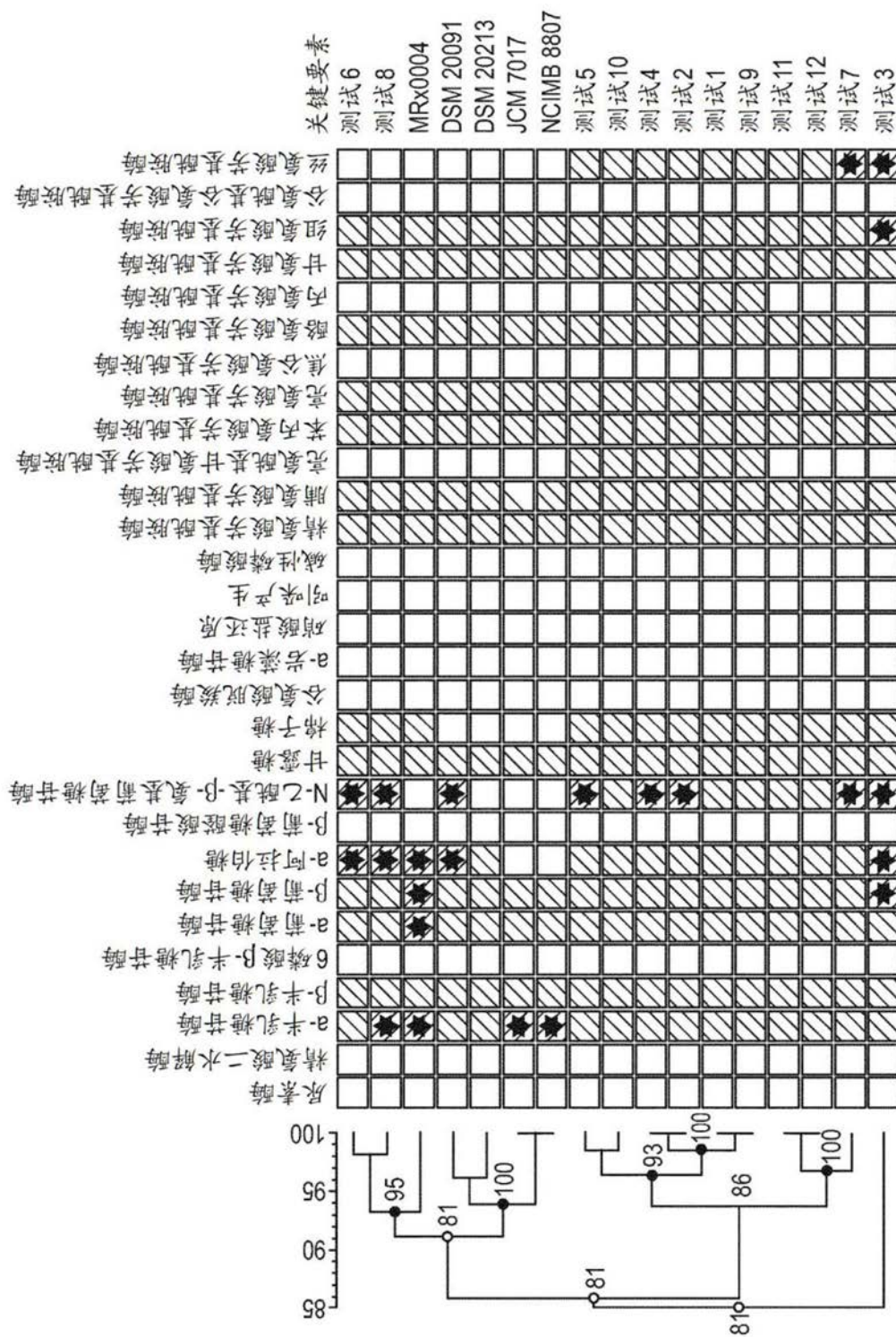


图23

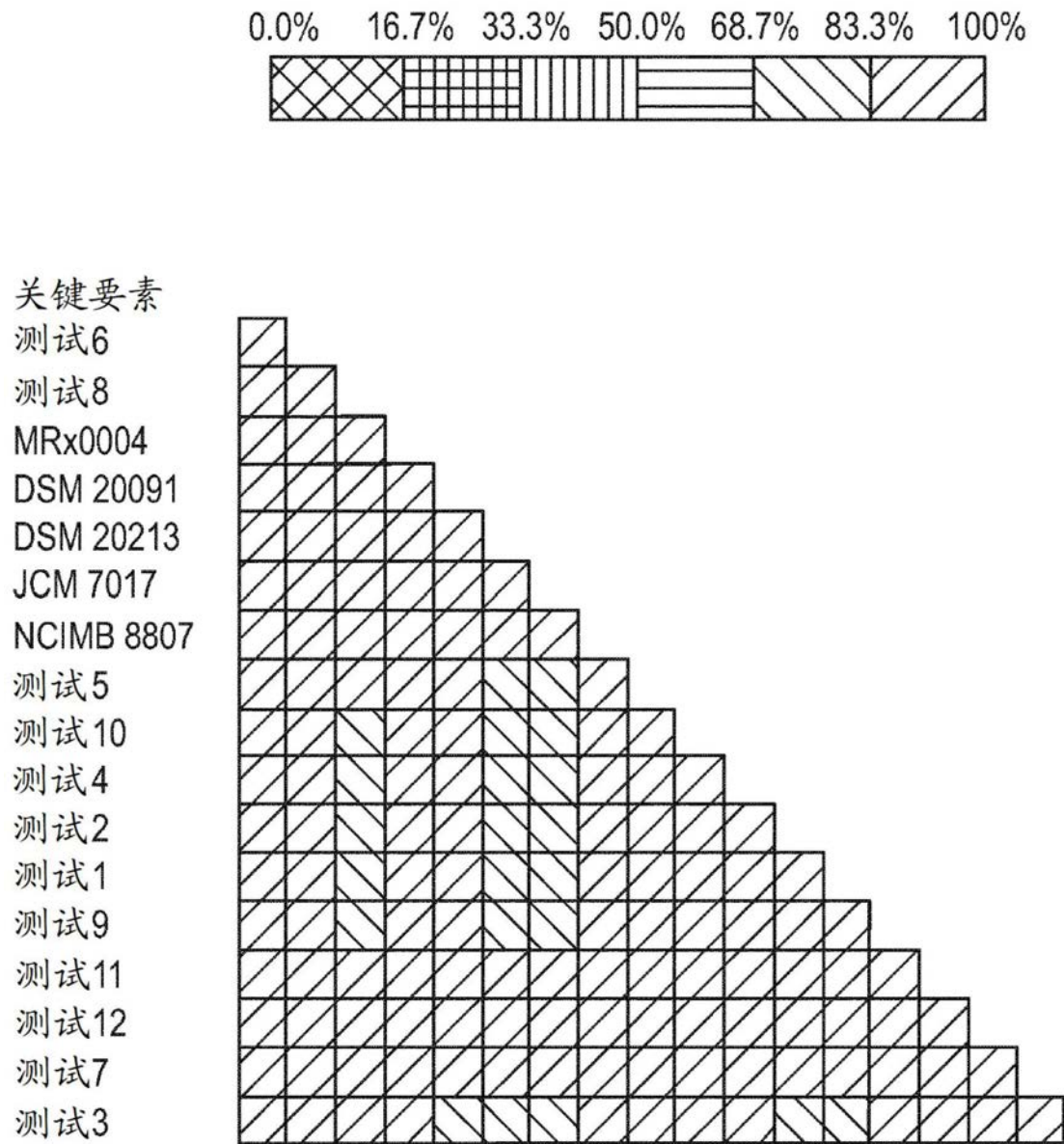


图23 (续)

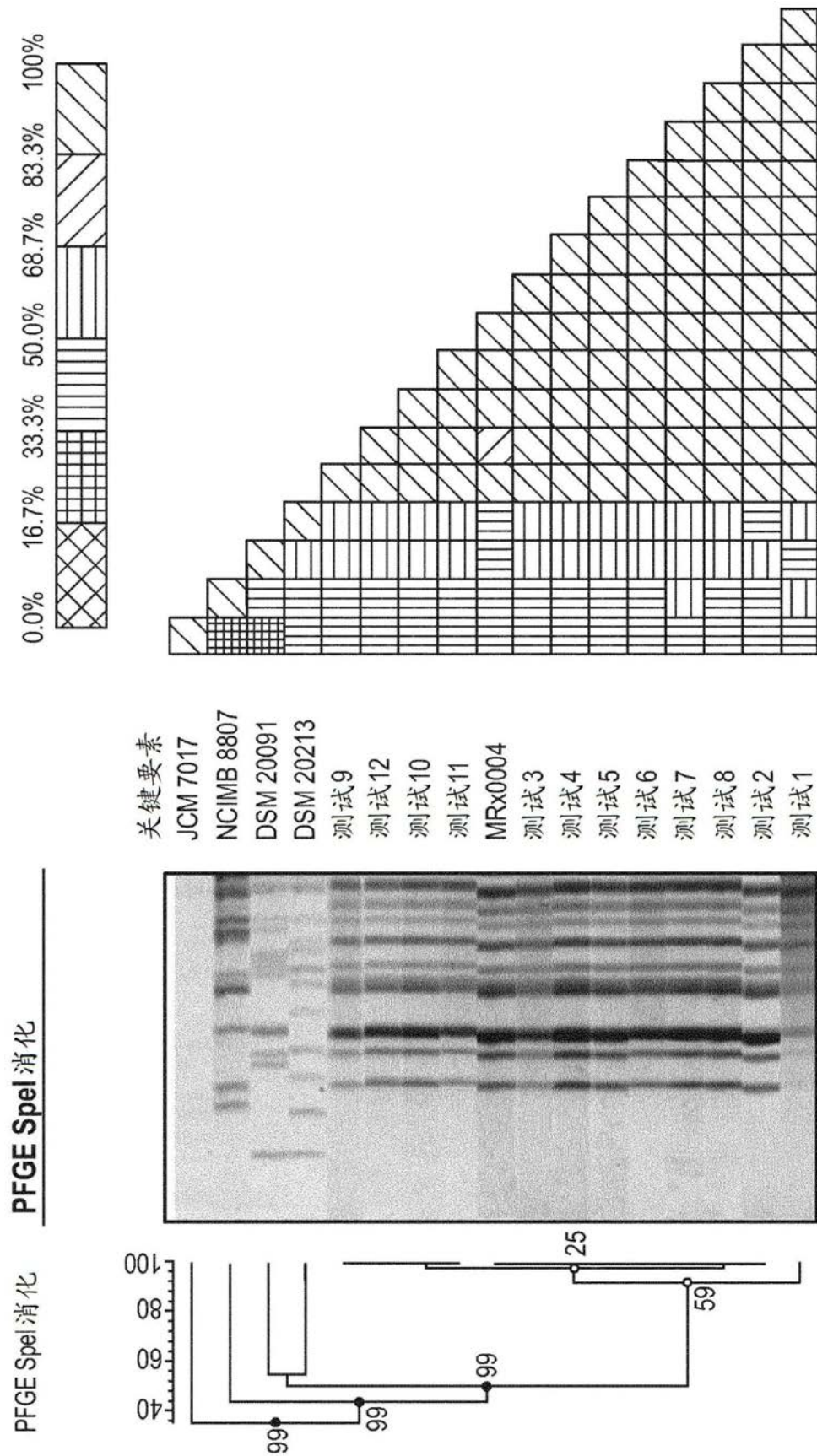


图24

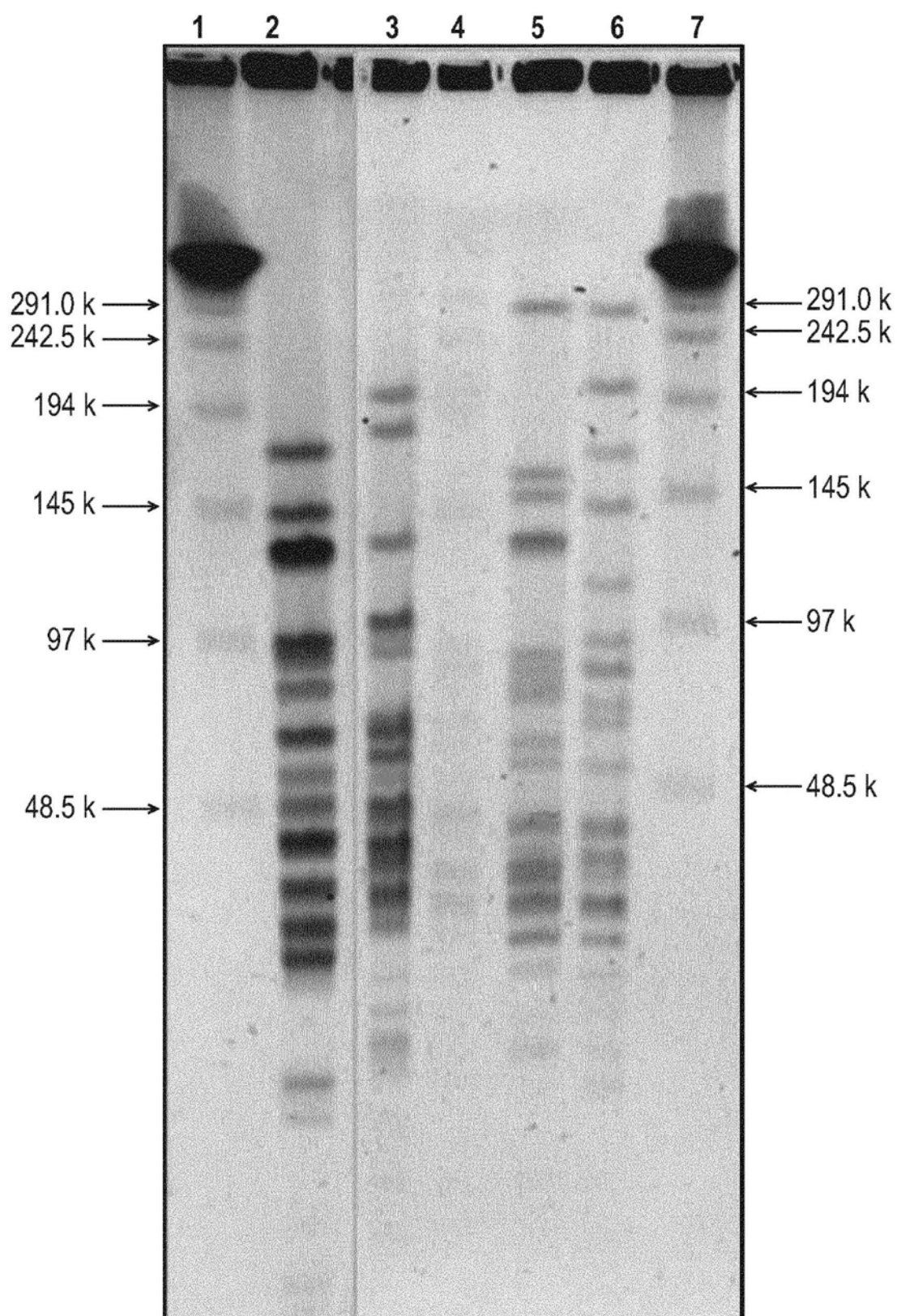


图25

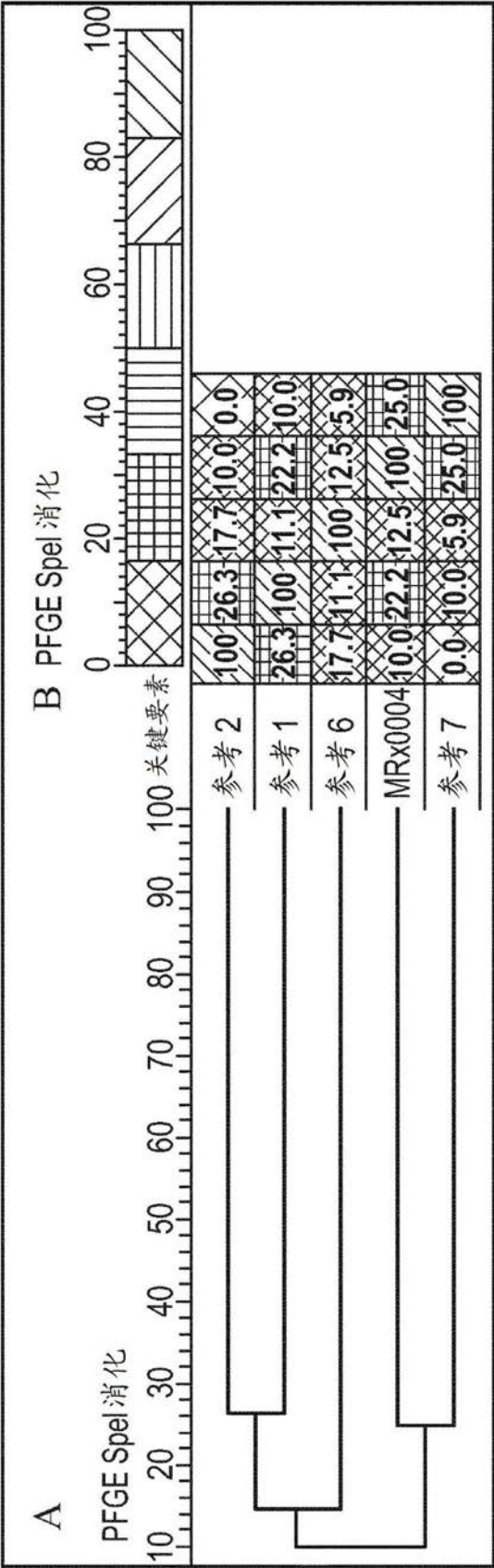


图26

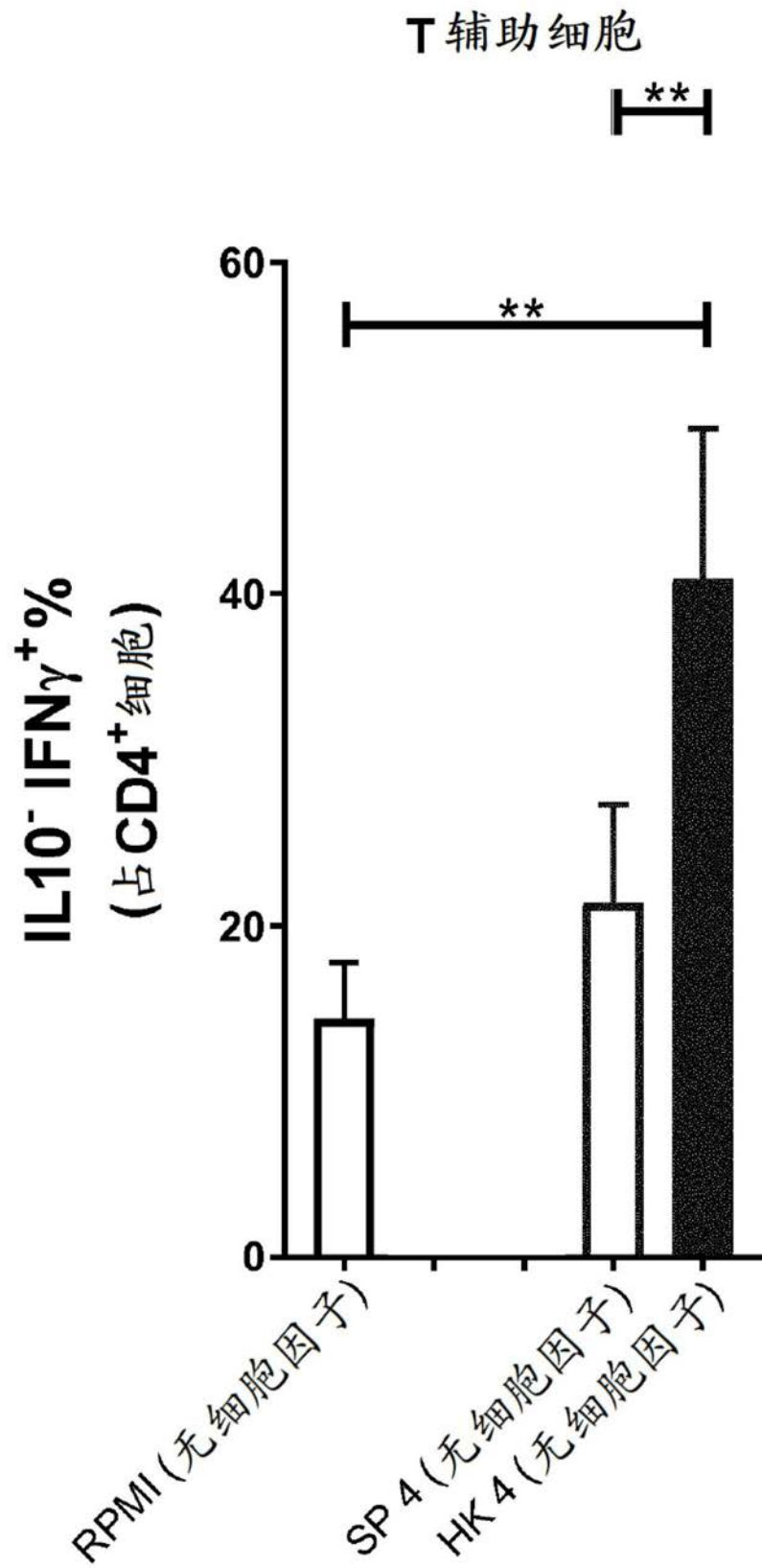


图27

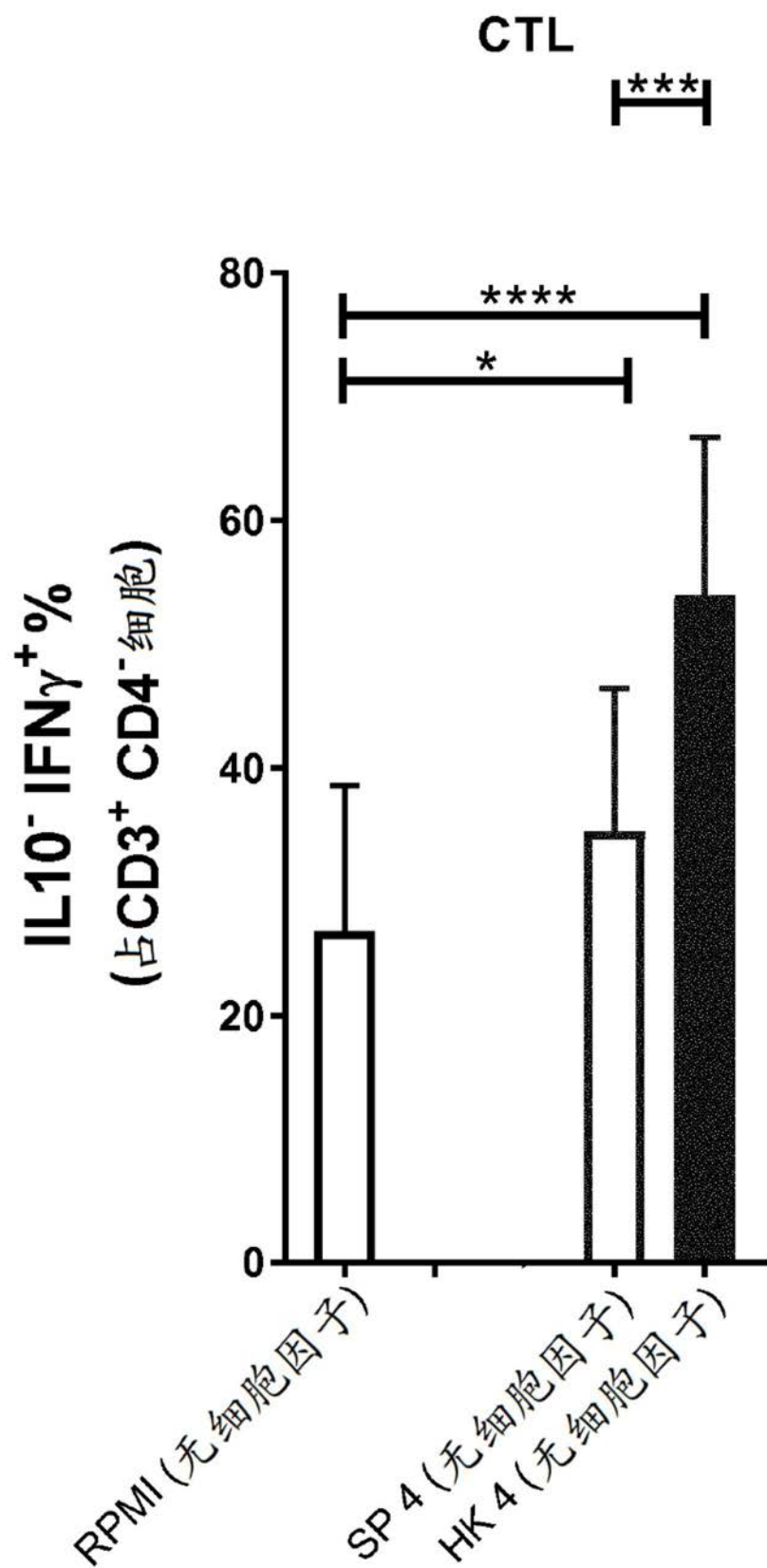


图28

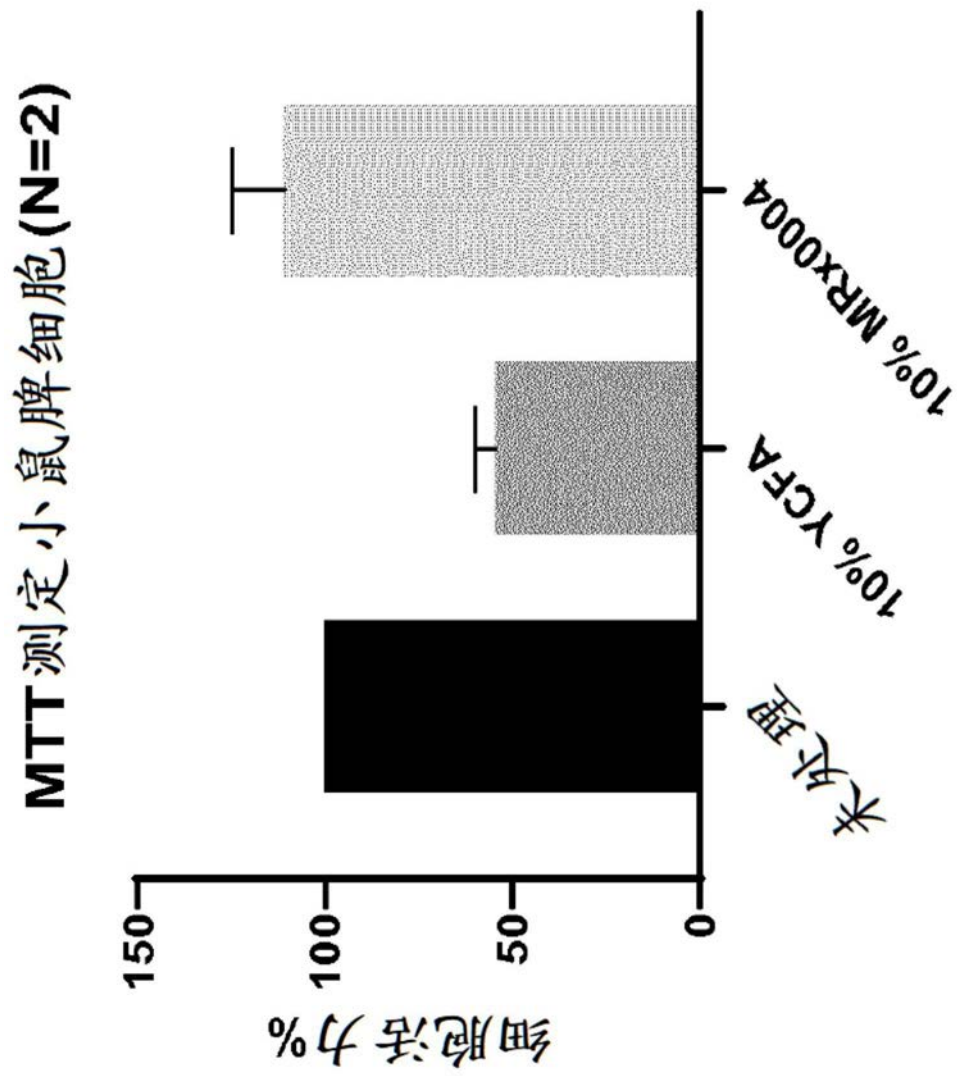


图29

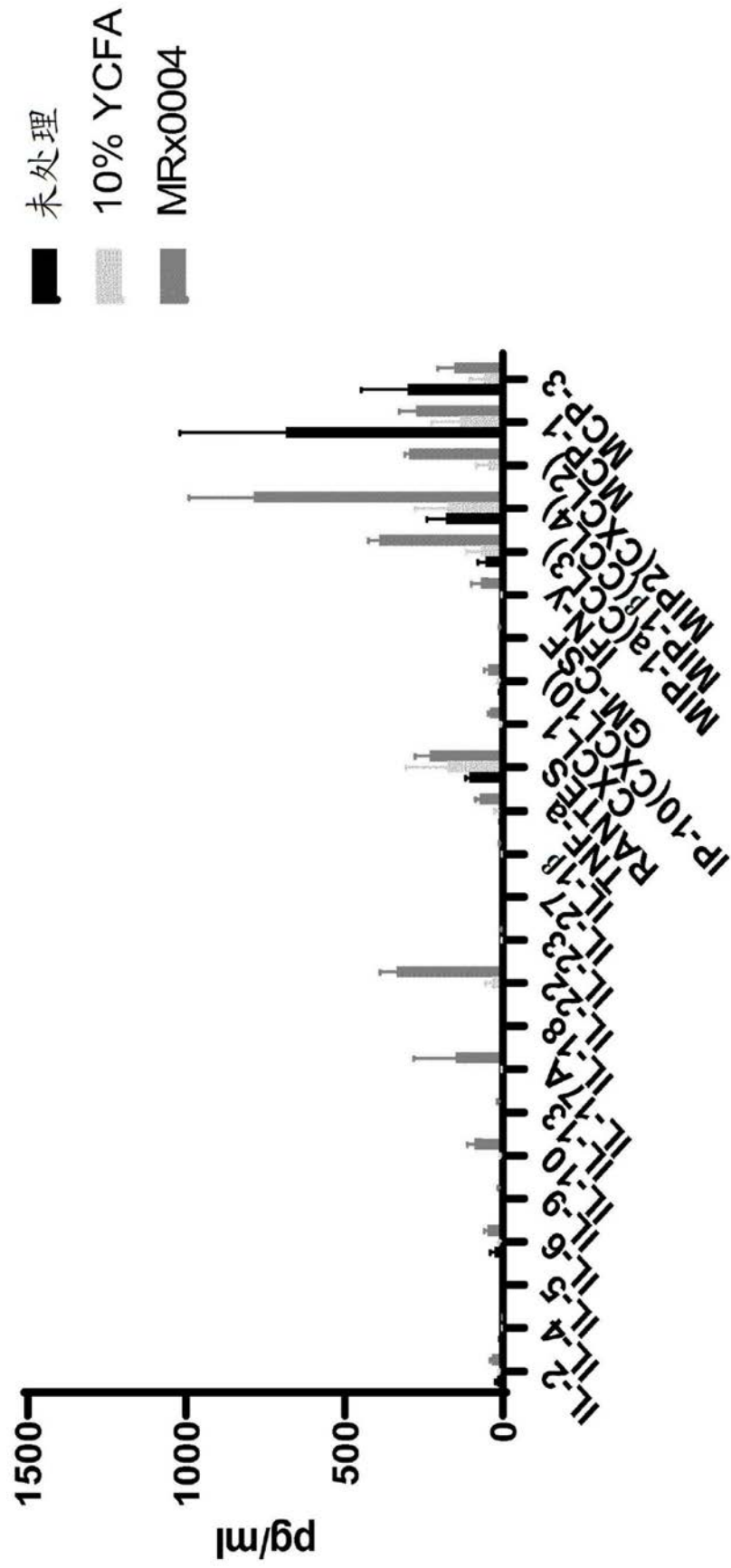


图30

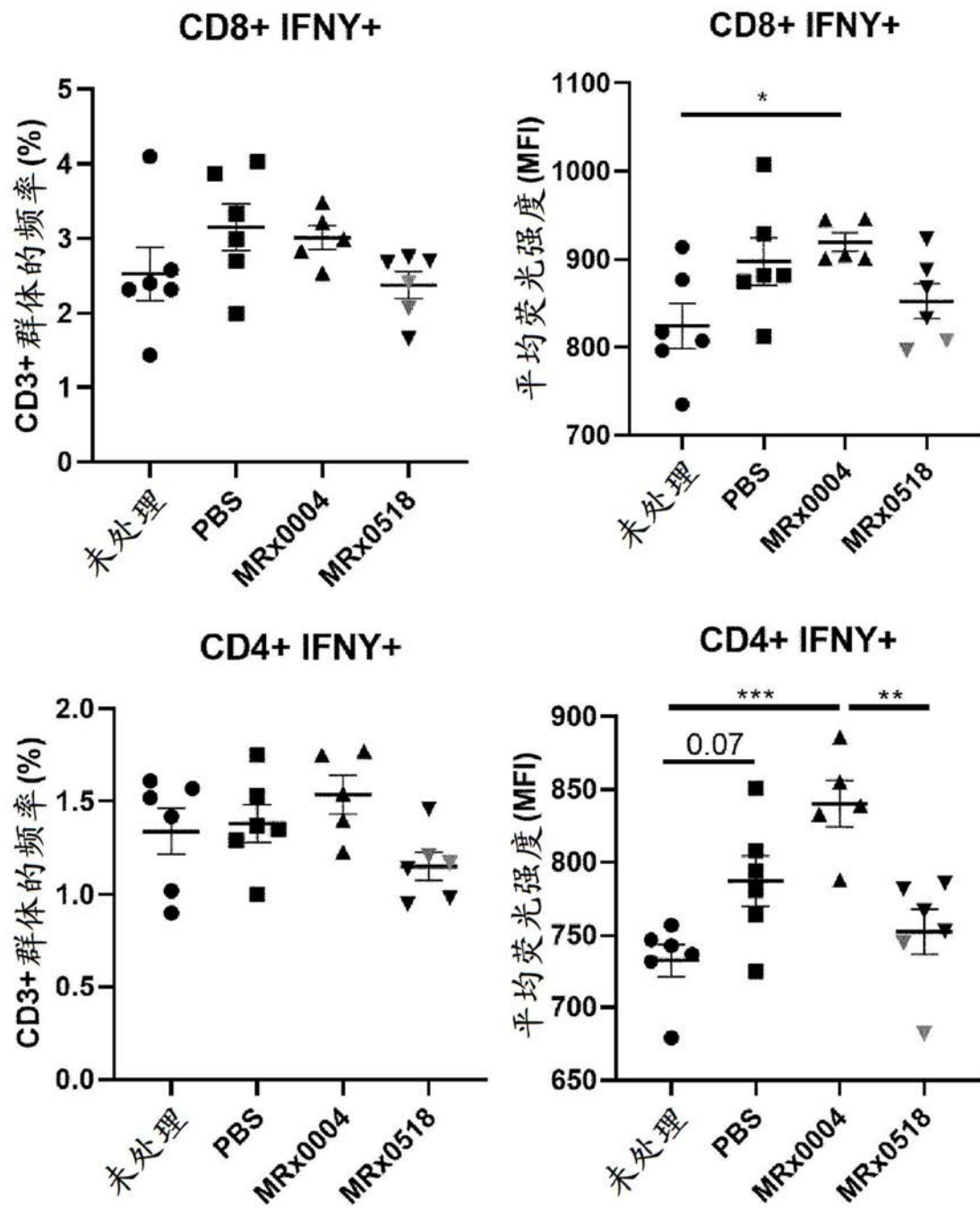


图31