202114718

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202114718 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：109119717　(22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 06 月 11 日

(51)Int. Cl.：　*A61K35/74* *(2015.01)*　*A61K9/127* *(2006.01)*

C12N15/64 *(2006.01)*　*A61P3/00* *(2006.01)*

A61P35/00 *(2006.01)*　*A61P37/00* *(2006.01)*

(30)優先權：2019/06/11　美國　62/860,029

2019/06/11　美國　62/860,049

2020/02/21　美國　62/979,545

2020/03/19　美國　62/991,767

(71)申請人：美商艾弗洛生物科技股份有限公司 (美國) EVELO BIOSCIENCES, INC.　(US) 美國

(72)發明人：柏德默　馬克 BODMER, MARK (GB)；波西　邦多納 BOSE, BAUNDAUNA (US)；卡爾頓　蘇菲亞　M　R CARLTON, SOFIA M. R. (PT)；柯麥克　泰勒　A CORMACK, TAYLOR A. (US)；大衛特　克里斯多夫　J　H DAVITT, CHRISTOPHER J. H. (IE)；弗朗西斯科　安德森　路易斯 FRANCISCO-ANDERSON, LOISE (US)；古德曼　布萊恩 GOODMAN, BRIAN (US)；義塔諾　安德烈 ITANO, ANDREA (US)；波尼奇特拉　霍莉 PONICHTERA, HOLLY (US)；特洛伊　艾琳　B TROY, ERIN B. (US)；羅曼諾　切爾納克　法比安　B ROMANO-CHERNAC, FABIAN B. (AR)；席偌瓦　瑪麗亞 SIZOVA, MARIA (US)；巴魯克　艾利希亞 BALLOK, ALICIA (US)；歐肯　尼哈爾 OKAN, NIHAL (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：75 項　圖式數：34　共 404 頁

(54)名稱

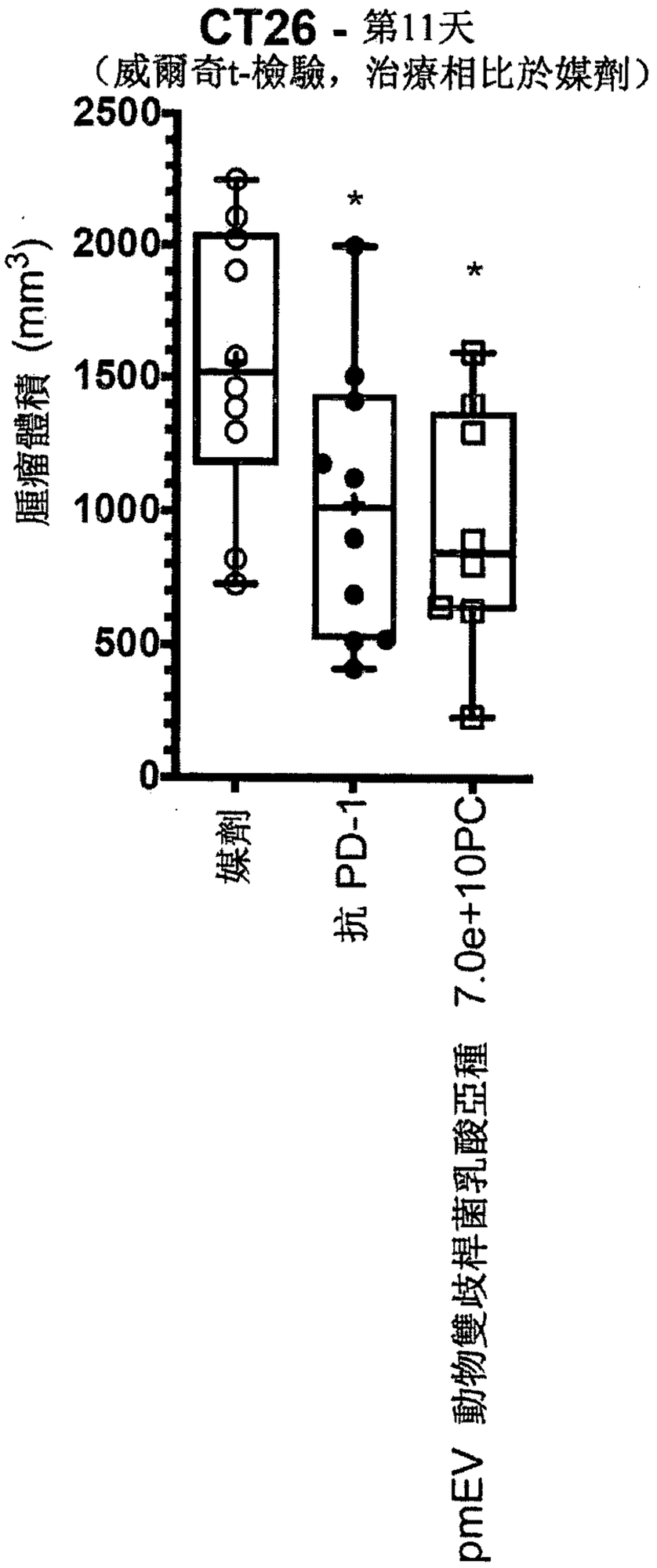
經加工的微生物胞外囊泡

(57)摘要

本文提供了與可用作治療劑的經加工的微生物胞外囊泡(pmEV)相關之方法及藥物組成物。

Provided herein are methods and pharmaceutical compositions related to processed microbial extracellular vesicles (pmEVs) that can be useful as therapeutic agents.

指定代表圖：


CT26 - 第11天
（威爾奇t-檢驗，治療相比於媒劑）
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
*
媒劑
抗 PD-1
pmEV 動物雙歧桿菌 乳酸亞種 7.0e+10PC

【圖1】

202114718

【發明摘要】

【中文發明名稱】　經加工的微生物胞外囊泡

【英文發明名稱】　Processed Microbial Extracellular Vesicles

【中文】

本文提供了與可用作治療劑的經加工的微生物胞外囊泡（pmEV）相關之方法及藥物組成物。

【英文】

Provided herein are methods and pharmaceutical compositions related to processed microbial extracellular vesicles (pmEVs) that can be useful as therapeutic agents.

【指定代表圖】　圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　經加工的微生物胞外囊泡

【英文發明名稱】　Processed Microbial Extracellular Vesicles

相關申請之交叉引用

【0001】 本申請要求以下的權益：於2019年6月11日提交的美國臨時專利申請案號62/860,029；2019年6月11日提交的美國臨時專利申請案號62/860,049；2020年2月21日提交的美國臨時專利申請案號62/979,545；以及於2020年3月19日提交的美國臨時專利申請案號62/991,767，其中每個的全文藉由引用結合於此。

【技術領域】

【先前技術】

【發明內容】

【0002】 如本文所揭露的，某些類型的微生物胞外囊泡（mEV），例如從微生物（例如細菌）獲得的經加工的微生物胞外囊泡（pmEV）具有治療效果，並且可用於治療和/或預防疾病和/或健康障礙。

【0003】 在一些實施方式中，本文提供的藥物組成物可包含來自一種或多種微生物源，例如一種或多種細菌菌株的mEV（例如pmEV）。在一些實施方式中，本文提供的藥物組成物可以包含來自一種微生物源，例如一種細菌菌株的mEV。可基於細菌的特性（例如，生長特徵、產量、在測定或受試者中調節免疫反應的能力）來選擇用作mEV來源的細菌菌株。包含mEV之藥物組成物可以包含pmEV。該藥物組成物可包含藥學上可接受的賦形劑。

【0004】 在一些實施方式中，本文提供的包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物可例如在受試者（例如人）中用於治療或預防疾病和/或健康障礙。

【0005】 在一些實施方式中，本文提供的包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物可以製備為粉末（例如用於再懸浮）或固體劑型，例如片劑、微型片劑、膠囊、丸劑或粉末；或該等形式的組合（例如，包含在膠囊中的微型片劑）。固體劑型可以包括包衣（例如腸溶包衣）。

【0006】 在一些實施方式中，本文提供的藥物組成物可包含凍乾的mEV（例如pmEV）。凍乾的mEV（如pmEV）可配製成固體劑型，如片劑、微型片劑、膠囊、丸劑或粉末；也可以在溶液中重新懸浮。

【0007】 在一些實施方式中，本文提供的藥物組成物可包含γ照射的mEV（例如pmEV）。經γ照射mEV（如pmEV）可製成固體劑型，如片劑、微型片劑、膠囊、丸劑或粉末；也可以在溶液中重新懸浮。

【0008】 在一些實施方式中，本文提供的包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物可以口服投與。

【0009】 在一些實施方式中，本文提供的包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物可以靜脈內投與。

【0010】 在一些實施方式中，本文提供的包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物可以瘤內或瘤下地例如投與給患有腫瘤的受試者。

【0011】 在某些方面，本文提供了包含用於治療和/或預防疾病或健康障礙（例如，不利的健康障礙）（例如癌症、自體免疫性疾病、炎性疾病、菌群失調或代謝性疾病）的mEV（例如pmEV）的藥物組成物，以及製備和/或鑒定此類mEV之方法，和使用此類藥物組成物之方法（例如，單獨或與其他治療劑組合用於治療癌症、自體免疫性疾病、炎性疾病、菌群失調或代謝性疾病）。在一些實施方式中，藥物組成物包含mEV和從其獲得mEV的完整微生物，例如

細菌（例如，活細菌、被殺死的細菌、減毒細菌）。在一些實施方式中，藥物組成物在不存在從其獲得mEV的微生物（例如細菌）的情況下包含mEV（例如，藥物組成物的微生物源含量的約95%以上（或約99%以上）包含mEV）。

【0012】 在一些實施方式中，藥物組成物包含來自表1、表2和/或表3中列舉的細菌菌株或物種中的一種或多種的mEV。

【0013】 在一些實施方式中，藥物組成物包含分離的mEV（例如，來自一種或多種細菌菌株（例如，目的細菌）（例如，其治療有效量）。例如，其中藥物組成物的至少50%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的含量係分離的mEV的細菌（例如目的細菌）。

【0014】 在一些實施方式中，藥物組成物包含分離的mEV（例如，來自一種細菌菌株（例如，目的細菌）（例如，其治療有效量）。例如，其中藥物組成物的至少50%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的含量係分離的mEV的細菌（例如目的細菌）。

【0015】 在一些實施方式中，藥物組成物包括經處理的mEV（pmEV）。

【0016】 在一些實施方式中，藥物組成物包含pmEV，並且pmEV由已經被γ照射、UV照射、熱滅活、酸處理或噴氧的細菌產生。

【0017】 在一些實施方式中，藥物組成物包含pmEV，並且pmEV由活細菌產生。

【0018】 在一些實施方式中，藥物組成物包含pmEV，並且pmEV由死細菌產生。

【0019】 在一些實施方式中，藥物組成物包含pmEV，並且pmEV由非複製性細菌產生。

【0020】 在一些實施方式中，藥物組成物包含mEV，並且mEV來自一種細菌菌株。

【0021】 在一些實施方式中，藥物組成物包含mEV，並且mEV來自一種細菌菌株。

【0022】 在一些實施方式中，mEV被凍乾（例如，凍乾的產物進一步包含藥學上可接受的賦形劑）。

【0023】 在一些實施方式中，mEV被γ照射。

【0024】 在一些實施方式中，mEV被UV照射。

【0025】 在一些實施方式中，mEV被熱滅活（例如，在50°C下兩小時或在90°C下兩小時）。

【0026】 在一些實施方式中，mEV被酸處理。

【0027】 在一些實施方式中，mEV被噴氧（例如，以0.1 vvm持續兩小時）。

【0028】 在一些實施方式中，mEV來自革蘭氏陽性細菌。

【0029】 在一些實施方式中，mEV來自革蘭氏陰性細菌。

【0030】 在一些實施方式中，革蘭氏陰性細菌屬於Negativicutes綱。

【0031】 在一些實施方式中，mEV來自需氧細菌。

【0032】 在一些實施方式中，mEV來自厭氧細菌。

【0033】 在一些實施方式中，mEV來自嗜酸細菌。

【0034】 在一些實施方式中，mEV來自嗜鹼細菌。

【0035】 在一些實施方式中，mEV來自嗜中性細菌。

【0036】 在一些實施方式中，mEV來自難養細菌。

【0037】 在一些實施方式中，mEV來自非難養細菌。

【0038】 在一些實施方式中，mEV來自表1、表2或表3中列出的細菌菌株。

【0039】 在一些實施方式中，革蘭氏陰性細菌屬於*Negativicutes*綱。

【0040】 在一些實施方式中，革蘭氏陰性細菌屬於韋榮氏球菌科（*Veillonellaceae*）、*月形單孢菌科（Selenomonadaceae）*、*胺基酸球菌科（Acidaminococcaceae*）或*Sporomusaceae*。

【0041】 在一些實施方式中，mEV來自以下屬的細菌：巨球型菌屬（*Megasphaera*）、月形單胞菌屬（*Selenomonas*）、*Propionospora*、或胺基酸球菌屬（Acidaminococcus）。

【0042】 在一些實施方式中，mEV係巨球型菌屬物種（*Megasphaera sp.*）、菲利克斯新月形單胞菌（*Selenomonas felix*）、腸胺基酸球菌（*Acidaminococcus intestine*）、或*Propionospora*屬物種細菌。

【0043】 在一些實施方式中，mEV來自乳球菌屬、普雷沃菌屬、雙歧桿菌屬、或韋榮氏球菌屬的細菌。

【0044】 在一些實施方式中，mEV來自乳酸乳球菌乳脂亞種細菌。

【0045】 在一些實施方式中，mEV來自棲組織普雷沃菌（*Prevotella histicola*）細菌。

【0046】 在一些實施方式中，mEV來自動物雙歧桿菌細菌。

【0047】 在一些實施方式中，mEV來自小韋榮氏球菌細菌。

【0048】 在一些實施方式中，mEV來自乳酸乳球菌乳脂亞種細菌。在一些實施方式中，該乳酸乳球菌乳脂亞種細菌來自與乳酸乳球菌乳脂亞種菌株A（ATCC指定編號PTA-125368）的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該乳球菌屬細菌來自與乳酸乳球菌乳脂亞種菌株A（ATCC指定編號PTA-125368）的核苷酸序列具有至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該乳球菌屬細菌來自乳酸乳球菌乳脂亞種菌株A（ATCC指定編號PTA-125368）。

【0049】 在一些實施方式中，mEV來自普雷沃菌屬細菌。在一些實施方式中，該普雷沃菌屬細菌來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329 （NRRL登錄號B 50329）的核苷酸序列有至少90%（或至少97%）基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該普雷沃菌屬細菌來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329 （NRRL登錄號B 50329）的核苷酸序列有至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該普雷沃菌屬細菌來自普雷沃菌菌株B 50329 （NRRL登錄號B 50329）。

【0050】 在一些實施方式中，mEV來自雙歧桿菌細菌。在一些實施方式中，該雙歧桿菌屬細菌來自與雙歧桿菌屬細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-125097）的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該雙歧桿菌屬細菌來自與雙歧桿菌屬細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-125097）的核苷酸序列具有至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該雙歧桿菌屬細菌來自雙歧桿菌屬細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-125097）。

【0051】 在一些實施方式中，mEV來自韋榮氏球菌屬細菌。在一些實施方式中，該韋榮氏球菌屬細菌來自與韋榮氏球菌屬細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-125691）的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該韋榮氏球菌屬細菌來自與韋榮氏球菌屬細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-125691）的核苷酸序列具有至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該韋榮氏球菌屬細菌來自韋榮氏球菌屬細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-125691）。

【0052】 在一些實施方式中，mEV來自活潑瘤胃球菌細菌。在一些實施方式中，該活潑瘤胃球菌細菌來自與活潑瘤胃球菌細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126695）的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因組、16S和/或CRISPR

序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該活潑瘤胃球菌細菌來自與活潑瘤胃球菌細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126695）的核苷酸序列具有至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該活潑瘤胃球菌細菌來自活潑瘤胃球菌細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126695）。

【0053】 在一些實施方式中，mEV來自巨型球菌屬物種細菌。在一些實施方式中，該巨型球菌屬物種細菌來自與巨型球菌屬物種細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126770）的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該巨型球菌屬物種細菌來自與巨型球菌屬物種細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126770）的核苷酸序列具有至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該巨型球菌屬物種細菌來自巨型球菌屬物種細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126770）。

【0054】 在一些實施方式中，mEV來自*Fournierella massiliensis*細菌。在一些實施方式中，該*Fournierella massiliensis*細菌來自與*Fournierella massiliensis*細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126694）的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該*Fournierella massiliensis*細菌來自與*Fournierella massiliensis*細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126694）的核苷酸序列具有至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該*Fournierella massiliensis*細菌來自*Fournierella massiliensis*細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126694）。

【0055】 在一些實施方式中，mEV來自*Harryflintia acetispora*細菌。在一些實施方式中，該*Harryflintia acetispora*細菌來自與*Harryflintia acetispora*細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126696）的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該*Harryflintia*

*acetispora*細菌來自與*Harryflintia acetispora*細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126696）的核苷酸序列具有至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，該*Harryflintia acetispora*細菌來自*Harryflintia acetispora*細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-126696）。

【0056】 在一些實施方式中，mEV來自以下屬的細菌：阿克曼氏菌屬、克裡斯滕森氏菌屬、布勞特氏菌屬、腸球菌屬、真桿菌屬、拜瑞氏菌屬、擬桿菌屬、副擬桿菌屬或Erysipelatoclostridium。

【0057】 在一些實施方式中，mEV來自產氫營養型布勞特氏菌、*排泄物布勞特氏菌*、*韋氏布勞特氏菌*、*糞真桿菌*、*扭曲真桿菌*、*直腸真桿菌*、*糞腸球菌*、*耐久腸球菌*、*Enterococcus villorum*、*鶉雞腸球菌*；*乳酸雙歧桿菌*、*兩歧雙歧桿菌*、*長雙歧桿菌*、*動物雙歧桿菌或短雙歧桿菌細菌*。

【0058】 在一些實施方式中，mEV來自*BCG（卡介苗）*，*副擬桿菌屬*、*布勞特氏菌屬*、*韋榮氏球菌屬*、*唾液乳桿菌*、*阿加薩桿菌屬（Agathobaculum）*、*活潑瘤胃球菌*、*解苯副梭菌*、*Turicibacter sanguinus*、*伯克霍爾德菌屬*、*類肺炎克雷白氏菌擬肺炎亞種*、*催產克雷白氏菌*、*納西利斯泰澤菌（Tyzerella nexilis）或奈瑟菌屬細菌*。

【0059】 在一些實施方式中，mEV來自產氫營養型布勞特氏菌（*Blautia hydrogenotrophica*）細菌。

【0060】 在一些實施方式中，mEV來自排泄物布勞特氏菌（*Blautia stercoris*）細菌。

【0061】 在一些實施方式中，mEV來自韋氏布勞特氏菌（*Blautia wexlerae*）細菌。

【0062】 在一些實施方式中，mEV來自鶉雞腸球菌（*Enterococcus gallinarum*）細菌。

【0063】 在一些實施方式中，mEV來自屎腸球菌（*Enterococcus faecium*）細菌。

【0064】 在一些實施方式中，mEV來自兩歧雙歧桿菌（*Bifidobacterium bifidium*）細菌。

【0065】 在一些實施方式中，mEV來自短雙歧桿菌(*Bifidobacterium breve*)細菌。

【0066】 在一些實施方式中，mEV來自長雙歧桿菌（*Bifidobacterium longum*）細菌。

【0067】 在一些實施方式中，mEV來自人羅斯拜瑞氏菌（*Roseburia hominis*）細菌。

【0068】 在一些實施方式中，mEV來自多形擬桿菌（*Bacteroides thetaiotaomicron*）細菌。

【0069】 在一些實施方式中，mEV來自糞居擬桿菌(*Bacteroides coprocola*)細菌。

【0070】 在一些實施方式中，mEV來自*Erysipelatoclostridium ramosum*細菌。

【0071】 在一些實施方式中，mEV來自馬賽巨型球菌（*Megasphera massiliensis*）細菌。

【0072】 在一些實施方式中，mEV來自真桿菌屬（*Eubacterium*）細菌。

【0073】 在一些實施方式中，mEV來自狄氏副擬桿菌（*Parabacteroides distasonis*）細菌。

【0074】 在某些方面，mEV（如pmEV）係從已經基於某些所需特性選擇的細菌中獲得的，該特性係降低的毒性和不利影響（例如，藉由去除或缺失脂多糖（LPS）），增強的口服遞送（例如藉由改善酸抗性、黏膜黏附性和/或滲

透性和/或針對膽汁酸的抗性、針對抗微生物肽和/或抗體中和的抗性），靶向所希望的細胞類型（例如M細胞、杯狀細胞、腸上皮細胞、樹突細胞、巨噬細胞）全身性的或在適當生態位中的改善的生體可用率（例如腸系膜淋巴結、派伊爾結、固有層、腫瘤引流淋巴結和/或血液），增強的免疫調節和/或治療作用（例如，單獨或與另一種治療劑組合），增強的免疫活化和/或製造屬性（例如，生長特徵、產率、更高的穩定性，改善的凍融耐受性，更短的生成時間）。

【0075】 在某些方面中，mEV來自工程改造的細菌，該工程改造的細菌經修飾以增強某些所需性質。在一些實施方式中，對工程改造的細菌進行修飾，使得由其產生的mEV（例如pmEV）將具有降低的毒性和不利影響（例如，藉由去除或缺失脂多糖（LPS）），增強的口服遞送（例如藉由改善酸抗性、黏膜黏附性和/或滲透性和/或針對膽汁酸的抗性、針對抗微生物肽和/或抗體中和的抗性），靶向所希望的細胞類型（例如M細胞、杯狀細胞、腸上皮細胞、樹突細胞、巨噬細胞）全身性的或在適當生態位中的改善的生體可用率（例如腸系膜淋巴結、派伊爾結、固有層、腫瘤引流淋巴結和/或血液），增強的免疫調節和/或治療作用（例如，單獨或與另一種治療劑組合），增強的免疫活化和/或製造屬性（例如，生長特徵、產率、更高的穩定性，改善的凍融耐受性，更短的生成時間）。在一些實施方式中，本文提供製造此mEV（例如pmEV）之方法。

【0076】 在某些方面，本文提供了包含用於治療和/或預防疾病或健康障礙（例如癌症，自體免疫性疾病，炎性疾病或代謝性疾病）的mEV（例如pmEV）的藥物組成物，以及製備和/或鑒定此類mEV之方法，和單獨或與一種或多種其他治療劑組合地使用此類藥物組成物之方法（例如，用於治療癌症、自體免疫性疾病、炎性疾病或代謝性疾病）。

【0077】 含有mEV（此pmEV）的藥物組成物可提供與含有從其獲得mEV的完整微生物的藥物組成物相當或更大的效力。例如，在相同劑量的mEV（例

如，基於顆粒計數或蛋白質含量）下，含有mEV的藥物組成物可提供與含有從其獲得mEV的同一細菌菌株的完整微生物的可比藥物組成物相當或更大的效力。這樣的含有mEV的藥物組成物可以允許更高劑量的投與，並引起與含有從其獲得mEV的同一細菌菌株的完整微生物的可比藥物組成物所觀察到的相當或更大（例如，更有效）的反應。

【0078】 作為另一個實例，在相同劑量下（例如，基於顆粒計數或蛋白質含量），與含有從其獲得mEV的同一細菌菌株的完整微生物的藥物組成物相比，包含mEV的藥物組成物可以包含更少的微生物衍生材料（基於顆粒計數或蛋白質含量），同時為接受這種藥物組成物的受試者提供相當或更大的治療益處。

【0079】 作為另一個實例，mEV可以以例如約$1x10^{7}$-約$1x10^{15}$個顆粒的劑量投與，例如由NTA測量。

【0080】 作為另一個實例，mEV可以以例如約5 mg至約900 mg總蛋白的劑量投與，例如藉由布拉德福德（Bradford）測定測量。作為另一個實例，mEV可以以例如約5 mg至約900 mg總蛋白的劑量投與，例如藉由BCA測定測量。

【0081】 在某些實施方式中，本文提供治療患有癌症的受試者之方法，該等方法包括向該受試者投與本文描述之藥物組成物。在某些實施方式中，本文提供治療患有免疫障礙（例如，自體免疫性疾病、炎性疾病、過敏）之受試者，該等方法包括向該受試者投與本文描述之藥物組成物。在某些實施方式中，本文提供治療患有代謝性疾病的受試者之方法，該等方法包括向該受試者投與本文描述之藥物組成物。在某些實施方式中，本文提供治療患有神經疾病的受試者之方法，該等方法包括向該受試者投與本文描述之藥物組成物。

【0082】 在一些實施方式中，該方法進一步包括向受試者投與抗生素。在一些實施方式中，該方法還包括向該受試者投與一種或多種其他癌症治療（例如，手術移除腫瘤、投與化學治療劑、投與放射療法和/或投與癌症免疫療法，

諸如免疫檢查點抑制劑、癌症特異性抗體、癌症疫苗、經引發的抗原呈現細胞（primed antigen presenting cell）、癌症特異性T細胞、癌症特異性嵌合抗原受體（CAR）T細胞、免疫活化蛋白和/或佐劑）。在一些實施方式中，該方法還包括投與另一種治療性細菌和/或來自一種或多種其他細菌菌株（例如，治療性細菌）的mEV（例如pmEV）。在一些實施方式中，該方法還包括投與免疫抑制劑和/或抗炎劑。在一些實施方式中，該方法進一步包括投與代謝性疾病治療劑。

【0083】 在某些方面，本文提供了包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物，用於單獨或與一種或多種其他治療劑組合治療和/或預防疾病（例如癌症、自體免疫性疾病、炎性疾病、菌群失調或代謝性疾病）或健康障礙。

【0084】 在某些實施方式中，本文提供包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物，用於治療和/或預防受試者（例如人）中的癌症。該藥物組成物可以單獨使用或與一種或多種其他治療劑組合用於治療癌症。在某些實施方式中，本文提供包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物，用於治療和/或預防受試者（例如人）中的免疫障礙（例如自體免疫性疾病、炎性疾病、過敏）。該藥物組成物可以單獨使用或與一種或多種其他治療劑組合用於治療免疫障礙。在某些實施方式中，本文提供包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物，用於治療和/或預防受試者（例如人）中的菌群失調。該藥物組成物可以單獨使用或與治療劑組合用於治療菌群失調。在某些實施方式中，本文提供包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物，用於治療和/或預防受試者（例如人）中的代謝性疾病。該藥物組成物可以單獨使用或與治療劑組合用於治療代謝性疾病。在某些實施方式中，本文提供包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物，用於治療和/或預防受試者（例如人）中的神經疾病。該藥物組成物可以單獨使用或與一種或多種其他治療劑組合用於治療神經障礙。

【0085】 在一些實施方式中，包含mEV的藥物組成物可與抗生素組合使用。在一些實施方式中，包含mEV的藥物組成物可用於與一種或多種其他癌症療法（例如，手術移除腫瘤、使用化學治療劑、使用放射療法和/或使用癌症免疫療法，諸如免疫檢查點抑制劑、癌症特異性抗體、癌症疫苗、經引發的抗原呈現細胞（primed antigen presenting cell）、癌症特異性T細胞、癌症特異性嵌合抗原受體（CAR）T細胞、免疫活化蛋白和/或佐劑）組合使用。在一些實施方式中，包含mEV的藥物組成物可與另一種治療性細菌和/或從一種或多種其他細菌菌株（例如治療性細菌）獲得的mEV組合使用。在一些實施方式中，包含mEV的藥物組成物可與一種或多種免疫抑制劑和/或抗炎劑組合使用。在一些實施方式中，包含mEV的藥物組成物可與一種或多種其他代謝性疾病治療劑組合使用。

【0086】 在某些方面，本文提供了包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物用於製備藥物之用途，該藥物用於單獨地或與另一種治療劑組合地治療和/或預防疾病（例如癌症、自體免疫性疾病、炎性疾病、菌群失調或代謝性疾病）。在一些實施方式中，該用途與另一種治療性細菌和/或從一種或多種其他細菌菌株（例如，治療性細菌）獲得的mEV組合使用。

【0087】 在某些實施方式中，本文提供了包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物用於製備用於治療和/或預防受試者（例如人）中的癌症的藥物之用途。對於癌症，該藥物組成物可以單獨使用或與另一種治療劑組合使用。在某些實施方式中，本文提供了包含mEV的藥物組成物之用途（用於製備用於治療和/或預防受試者（例如，人）中的免疫障礙（例如，自體免疫性疾病、炎性疾病、過敏）的藥物）。對於免疫障礙，該藥物組成物可以單獨使用或與另一種治療劑組合使用。在某些實施方式中，本文提供了包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物用於製備用於治療和/或預防受試者（例如人）中的菌群失調的藥物之用途。對於菌群失調，該藥物組成物可以單獨使用或與另一種治療劑組合使用。在某

些實施方式中，本文提供了包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物用於製備用於治療和/或預防受試者（例如人）中的代謝性疾病的藥物的用途。對於代謝性疾病，該藥物組成物可以單獨使用或與另一種治療劑組合使用。在某些實施方式中，本文提供了包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物用於製備用於治療和或預防受試者（例如人）中的神經疾病的藥物的用途。對於神經障礙，該藥物組成物可以單獨使用或與另一種治療劑組合使用。

【0088】 在一些實施方式中，包含mEV的藥物組成物可與抗生素組合使用。在一些實施方式中，包含mEV的藥物組成物可用於與一種或多種其他癌症療法（例如，手術移除腫瘤、使用化學治療劑、使用放射療法和/或使用癌症免疫療法，諸如免疫檢查點抑制劑、癌症特異性抗體、癌症疫苗、經引發的抗原呈現細胞（primed antigen presenting cell）、癌症特異性T細胞、癌症特異性嵌合抗原受體（CAR）T細胞、免疫活化蛋白和/或佐劑）組合使用。在一些實施方式中，包含mEV的藥物組成物可與另一種治療性細菌和/或從一種或多種其他細菌菌株（例如治療性細菌）獲得的mEV組合使用。在一些實施方式中，包含mEV的藥物組成物可與一種或多種其他免疫抑制劑和/或抗炎劑組合使用。在一些實施方式中，該藥物組成物可與一種或多種其他代謝性疾病治療劑組合使用。

【0089】 如本文所述，包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物可向受試者例如人提供治療有效量的mEV。

【0090】 如本文所述，包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物可向受試者例如人提供非天然量的治療有效成分（例如存在於mEV（例如pmEV）中）。

【0091】 如本文所述，包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物可向受試者例如人提供非天然量的治療有效成分（例如存在於mEV（例如pmEV）中）。

【0092】 如本文所述，包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物可以給受試者（例如人）帶來一種或多種改變，以治療或預防疾病或健康障礙。

【0093】 如本文所述，包含mEV（例如pmEV）的藥物組成物具有潛在的顯著效用，例如影響受試者（例如人），例如治療或預防疾病或健康障礙。

【圖式簡單說明】

【0094】 [**圖1**]顯示了第11天在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自動物雙歧桿菌乳酸亞種的經加工的微生物胞外囊泡（pmEV）之功效。

【0095】 [**圖2**]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自丁酸厭氧棒桿菌的pmEV之功效。

【0096】 [**圖3**]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自釀膿鏈球菌的pmEV之功效。

【0097】 [**圖4**]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自解苯副梭菌的pmEV之功效。

【0098】 [**圖5**]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自Hungatella屬物種的pmEV之功效。

【0099】 [**圖6**]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自金黃色葡萄球菌的pmEV之功效。

【0100】 [**圖7**]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自潑瘤胃球菌的pmEV之功效。

【0101】 [**圖8**]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自動物雙歧桿菌乳酸亞種和馬賽巨型球菌的pmEV之功效。

【0102】 [圖9]顯示在第9天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與腹膜內（i.p.）投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自潑瘤胃球菌的pmEV之功效。

【0103】 [圖10]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自潑瘤胃球菌的pmEV之功效。

【0104】 [圖11]顯示在第9天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與抗PD-1（單獨）或媒劑相比，i.v.投與單獨的來自動物雙歧桿菌乳酸亞種的pmEV或與抗PD-1組合之功效。

【0105】 [圖12]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與抗PD-1（單獨）或媒劑相比，i.v.投與單獨的來自動物雙歧桿菌乳酸亞種的pmEV或與抗PD-1組合之功效。

【0106】 [圖13]顯示在第9天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自狄氏副擬桿菌的pmEV之功效。

【0107】 [圖14]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自狄氏副擬桿菌的pmEV之功效。

【0108】 [圖15]顯示了與地塞米松相比，經口強飼來自狄氏副擬桿菌的pmEV之功效。來自狄氏副擬桿菌的pmEV在低（6.0E+07）、中（6.0E+09）和高（6.0E+11）劑量下進行測試。

【0109】 [圖16]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自小韋榮氏球菌的smEV之功效。

【0110】 [圖17]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自小韋榮氏球菌的smEV之功效。來自小韋榮氏球菌的smEV以2ug/劑量、5ug/劑量和10ug/劑量進行測試。

【0111】 [**圖18**]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自非典型韋榮氏球菌的smEV之功效。來自非典型韋榮氏球菌的smEV以2.0e+11PC、7.0e+10PC和1.5e+10PC進行測試。

【0112】 [**圖19**]顯示在第11天，在小鼠大腸直腸癌模型中，與i.p.投與的抗PD-1或媒劑相比，i.v.投與來自當別町韋榮氏球菌（Veillonella tobetsuensis）的smEV之功效。來自當別町韋榮氏球菌的smEV以2ug/劑量、5ug/劑量和10ug/劑量進行測試。

【0113】 [**圖20**]顯示了在基於KLH的遲發型超敏反應模型中在抗原激發後，與媒劑（陰性對照）和地塞米松（dexamethasone）（陽性對照）相比，口服投與的高（6.0e+11顆粒計數）、中（6.0e+9顆粒計數）和低（6.0e+7顆粒計數）濃度的來自棲組織普雷沃菌的smEV和凍乾smEV在24小時處減少抗原特異性耳腫脹（耳厚度）方面之功效。

【0114】 [**圖21**]顯示在DTH模型中，在24小時時間點處，來自棲組織普雷沃菌（*Prevotella histicola*，*P. histicola*）菌株的pmEV和凍乾pmEV的三種劑量（低、中和高）與來自相同棲組織普雷沃菌菌株的粉末的功效相比，在減少耳朵厚度方面的功效（藉由24小時耳部測量確定）。地塞米松用作陽性對照。

【0115】 [**圖22**]顯示在DTH模型中，在24小時時間點處，來自小韋榮氏球菌（*Veillonella parvula*，*V. parvula*）菌株的smEV以及來自相同小韋榮氏球菌菌株的pmEV和γ輻照（GI）的pmEV的三種劑量（低、中和高）與來自相同小韋榮氏球菌菌株的γ照射（GI）的粉末的功效相比，在減少耳朵厚度方面的功效（藉由24小時耳部測量確定）。地塞米松用作陽性對照。

【0116】 [**圖23**]顯示了來自巨型球菌屬物種菌株A的兩種劑量（低劑量和高劑量）的smEV之效力（如藉由24小時耳部測量確定）。

【0117】 [**圖24**]顯示了來自巨型球菌屬物種菌株B的兩種劑量（低劑量和高劑量）的smEV之效力（如藉由24小時耳部測量確定）。

【0118】 [**圖25**]顯示了來自菲利克斯新月形單胞菌的兩種劑量（低劑量和高劑量）的smEV之效力（如藉由24小時耳部測量確定）。

【0119】 [**圖26**]顯示了來自巨型球菌屬物種菌株A的smEV誘導PMA分化的U937細胞產生細胞介素。用1 x 10^6-1 x 10^9濃度的smEV以及TLR2(FSL)和TLR4(LPS)促效劑對照處理U937細胞24小時，並且測量細胞介素的產生。「空白」表示培養基對照。

【0120】 [**圖27A和27B**]顯示了巨型球菌屬物種菌株A smEV（2e11）與陰性對照（載劑PBS）和陽性對照（抗PD-1）比較的第22天腫瘤體積匯總（圖27A）和腫瘤體積曲線（圖27B）。

【0121】 [**圖28A和28B**]顯示了巨型球菌屬物種菌株A smEV（以3個劑量（2e11、2e9和2e7））BID以及巨型球菌屬物種smEV（2e11）QD與陰性對照（載劑PBS）和陽性對照（抗PD-1）比較的第23天腫瘤體積匯總（圖28A）和腫瘤體積曲線（圖28B）。

【0122】 [**圖29**]顯示了d10腫瘤用來自鶉雞腸球菌菌株A和B的pmEV每天給藥一次，持續14天後之腫瘤體積。

【0123】 [**圖30**]顯示了來自巨型球菌屬物種菌株A的EV誘導PMA分化的U937細胞產生細胞介素。藉由MSD ELISA測量細胞介素釋放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)促效劑作為對照。空白表示培養基對照。

【0124】 [**圖31**]顯示了來自巨型球菌屬物種菌株B的EV誘導PMA分化的U937細胞產生細胞介素。藉由MSD ELISA測量細胞介素釋放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)促效劑作為對照。空白表示培養基對照。

【0125】 [**圖32**]顯示了來自菲利克斯新月形單胞菌的EV誘導PMA分化的U937細胞產生細胞介素。藉由MSD ELISA測量細胞介素釋放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)促效劑作為對照。空白表示培養基對照。

【0126】 [**圖33**]顯示了來自腸胺基酸球菌的EV誘導PMA分化的U937細胞產生細胞介素。藉由MSD ELISA測量細胞介素釋放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)促效劑作為對照。空白表示培養基對照。

【0127】 [**圖34**]顯示了來自*Propionospora*屬物種的EV誘導PMA分化的U937細胞產生細胞介素。藉由MSD ELISA測量細胞介素釋放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)促效劑作為對照。空白表示培養基對照。

【實施方式】

定義

【0128】 「佐劑」或「輔助療法」在廣義上係指影響患者或受試者（例如人）中的免疫學或生理學反應的藥劑。例如，佐劑可增加抗原隨時間或在目的區域（如腫瘤）中的存在，幫助吸收抗原呈遞細胞抗原，活化巨噬細胞及淋巴細胞並且支持細胞介素的產生。藉由改變免疫反應，佐劑可允許使用較小劑量的免疫相互作用劑以增加特定劑量的免疫相互作用劑的有效性或安全性。例如，佐劑可預防T細胞耗竭且由此增加特定免疫相互作用劑的有效性或安全性。

【0129】 「投與」廣義上係指將組成物（例如，藥物組成物）投與給受試者的途徑。投與途徑的實例包含口服投與、直腸投與、局部投與、吸入（經鼻）或注射。注射投與包含靜脈內（IV）、肌內（IM）、腫瘤內（IT）及皮下（SC）投與。本文描述之藥物組成物可以任何形式藉由任何有效途徑投與，包括（但不限於）瘤內、經口、非經腸、腸內、靜脈內、腹膜內、局部、經皮（例如，

使用任何標準貼劑）、皮內、經眼、經鼻（鼻內）、局部、非經口（諸如噴霧）、吸入、皮下、肌內、頰、舌下、（經）直腸、陰道、動脈內及鞘內、經黏膜（例如，舌下、經舌、（經）頰、（經）尿道、陰道（例如，經陰道及陰道周圍）、植入、膀胱內、肺內、十二指腸內、胃內及支氣管內。在較佳的實施方式中，藉由以下形式投與本文所述之藥物組成物：經口、經直腸、經腫瘤內、經局部、經膀胱內、藉由注射至引流淋巴結中或毗鄰引流淋巴結處、經靜脈內、藉由吸入或氣溶膠或經皮下。在另一個較佳的實施方式中，本文所述之藥物組成物口服、瘤內或靜脈內投與。

【0130】 如本文中所使用，術語「抗體」可指完整抗體及其抗原結合片段二者。完整抗體係包含由二硫鍵相互連接的至少兩條重（H）鏈及兩條輕（L）鏈的糖蛋白。每條重鏈包含重鏈可變區（在本文中縮寫為V_H）及重鏈恒定區。每條輕鏈包含輕鏈可變區（在本文中縮寫為V_L）及輕鏈恒定區。V_H及V_L區可進一步細分成超變區（稱為互補決定區（CDR））及更保守區（稱為框架區（FR）），二者散佈排列。每個V_H及V_L由三個CDR及四個FR構成，其自胺基-末端至羧基-末端按下列順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈的可變區含有與抗原相互作用的結合結構域。術語「抗體」包含（例如）單株抗體、多株抗體、嵌合抗體、人源化抗體、人抗體、多特異性抗體（例如雙特異性抗體）、單鏈抗體及抗原結合抗體片段。

【0131】 如本文中所使用，術語抗體的「抗原結合片段」及「抗原結合部分」係指抗體中保留結合抗原的能力的一個或多個片段。術語抗體的「抗原結合片段」內所涵蓋結合片段的實例包含Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、scFv、二硫化物連接的Fv、Fd、雙抗體、單鏈抗體、NANOBODIES®、經分離CDRH3及其他保留完整抗體的至少一部分可變區的抗體片段。該等抗體片段可使用常規重組和/或酶促技術來獲得且可以與完整抗體相同的方式針對抗原結合進行篩選。

【0132】 「癌症」在廣義上係指宿主自有細胞的不受控、異常生長，其會侵襲宿主中的環繞組織及潛在地遠離異常細胞生長初始位點的組織。主要種類包含係上皮組織（例如皮膚、鱗狀細胞）癌症的癌瘤；係結締組織（例如骨、軟骨、脂肪、肌肉、血管等）癌症的肉瘤；係血液形成組織（例如骨髓組織）癌症的白血病；係免疫細胞癌症的淋巴瘤及骨髓瘤；及包含腦及脊柱組織癌症的中樞神經系統癌症。「一種或多種癌症」和「一種或多種贅瘤」在本文中可互換使用。如本文中所使用，「癌症」係指所有類型的新或復發癌症或贅瘤或惡性腫瘤，包含白血病、上皮癌及肉瘤。癌症的具體實例係：上皮癌、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤及混合型腫瘤。癌症的非限制性實例係以下新或復發癌症：腦癌、黑色素瘤、膀胱癌、乳腺癌、子宮頸癌、大腸癌、頭頸癌、腎癌、肺癌、非小細胞肺癌、間皮瘤、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宮癌及髓母細胞瘤。在一些實施方式中，癌症包括實性瘤。在一些實施方式中，癌症包括轉移。

【0133】 「碳水化合物」係指糖或糖聚合物。術語「糖」、「多糖」、「碳水化合物」及「寡糖」可互換使用。大部分碳水化合物係具有許多羥基的醛或酮，通常在分子的每一碳原子上具有一個羥基。碳水化合物通常具有分子式$C_nH_{2n}O_n$。碳水化合物可為單糖、二糖、三糖、寡糖或多糖。最基本的碳水化合物係單糖，例如葡萄糖、半乳糖、甘露糖、核糖、阿拉伯糖、木糖及果糖。二糖係兩個接合的單糖。示例性二糖包含蔗糖、麥芽糖、纖維二糖及乳糖。通常，寡糖包含3至6個單糖單元（例如棉子糖、水蘇糖），且多糖包含6個或更多個單糖單元。示例性多糖包含澱粉、糖原及纖維素。碳水化合物可含有經修飾糖單元，例如2’-去氧核糖，其中去除羥基，2’-氟核糖，其中羥基經氟代替；或N-乙醯基葡萄糖胺，其為葡萄糖的含氮形式（例如2’-氟核糖、去氧核糖及己糖）。

碳水化合物可以許多不同形式存在，例如構象異構物、環狀形式、非環狀形式、立體異構物、互變異構物、端基差向異構物及異構物。

【0134】 「細胞增強」廣泛地指細胞的流入或細胞在環境中的擴增，該等細胞在投與組成物之前大體上不存在於該環境中且不存在於所述組成物本身中。增強環境的細胞包括免疫細胞、基質細胞、細菌及真菌細胞。特別受關注的環境係其中癌細胞駐留或定位的微環境。在一些實例中，該微環境係腫瘤微環境或腫瘤引流淋巴結。在其他實例中，該微環境係癌前組織位點或組成物的局部投與位點或其中該組成物在遠端投與後將積聚的位點。

【0135】 「進化枝」指系統發育樹的OTU或成員，它們係系統發育樹中的統計有效節點的下游。進化枝包含系統發育樹中的一組末端葉，其係不同的單系進化單元且在某種程度上共用序列相似性。

【0136】 來自兩個或更多個微生物菌株的mEV（例如smEV）的「組合」包括從其獲得mEV（例如smEV）的微生物在同一材料或產品中或在物理相連的產品中物理共存，以及來自兩個菌株的mEV（例如smEV）在時間上共同投與或共同定位。

【0137】 「菌群失調」係指腸道或其它身體區域的微生物群或微生物組的狀態，包括，例如，黏膜或皮膚表面（或任何其它微生物組生態位），在該狀態下宿主腸道微生物組生態網路「微生物組」的正常的多樣性和/或功能被破壞。菌群失調可能導致疾病狀態，或者僅在某些條件下或僅長期存在時可能是不健康的。菌群失調可能是由於多種因素引起的，包括環境因素、傳染原、宿主基因型、宿主飲食和/或壓力。菌群失調可能導致：一個或多個細菌類型（例如，厭氧菌）、物種和/或菌株的普遍度發生變化（例如，增加或減少），宿主微生物組群體組成的多樣性發生變化（例如，增加或減少）；導致一個或多個有益效應減少或喪失的一個或多個共生生物群體的變化（例如，增加或減少）；一

個或多個病原體（例如，病原細菌）群體的過度生長；和/或僅在某些情況下引起疾病的共生生物的存在、和/或過度生長。

【0138】 術語「降低」或「消耗」意指變化，從而取決於治療後狀態與治療前狀態相比的差異為至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1/100、1/1000、1/10,000、1/100,000、1/1,000,000或不可檢測。可能降低的特性包括免疫細胞、細菌細胞、基質細胞、髓樣來源的抑制細胞、成纖維細胞、代謝物的數量；細胞介素的水平；或其他物理參數（例如耳厚度（例如，在DTH動物模型中）或腫瘤的大小（例如，在動物腫瘤模型中））。

【0139】 術語「生態聚生體（ecological consortium）」係交換代謝物且彼此正性共調控的一組細菌，這與經由活化互補宿主通路來誘導宿主協同作用以改進功效的兩種細菌形成對比。

【0140】 如本文中所使用，「工程改造的細菌」係藉由人為活動已在遺傳上自天然狀態改變的任何細菌及任何這類細菌的繼代。工程改造的細菌包括（例如）靶向遺傳修飾的產物、隨機誘變篩選的產物及定向演化的產物。

【0141】 術語「表位」意指可特異性結合至抗體或T細胞受體的蛋白質決定子。表位通常由如胺基酸或糖側鏈等分子的化學活性表面分組組成。某些表位可藉由抗體能夠結合的胺基酸的特定序列來定義。

【0142】 術語「基因」在廣義上用於指與生物功能有關的任一核酸。術語「基因」適用於特定基因組序列以及由該基因組序列編碼的cDNA或mRNA。

【0143】 兩種核酸分子的核酸序列之間「同一性」可使用已知電腦演算法（例如「FASTA」程式）使用（例如）如Pearson等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA[美國國家科學院院刊] 85:2444中的預設參數測定為同一性百分比（其他套裝程式含GCG套裝程式（Devereux, J.等人，Nucleic Acids Research[核酸研究] 12(I):387 (1984)）、BLASTP、BLASTN、FASTA Atschul, S. F.等人, J Molec Biol[分

子生物學雜誌] 215:403 (1990)；Guide to Huge Computers [巨型電腦指南], Mrtin J. Bishop編輯, Academic Press [學術出版社], San Diego [聖地牙哥], 1994及Carillo等人(1988) SIAM J Applied Math [工業和應用數學學會應用數學雜誌] 48:1073）。例如，可使用國家生物技術資訊中心數據庫（National Center for Biotechnology Information database）的BLAST功能來測定同一性。其他可商業或公開獲得的套裝程式含DNAStar「MegAlign」程式（威斯康辛州麥迪森市（Madison, Wis.））及威斯康辛大學遺傳學電腦集團（University of Wisconsin Genetics Computer Group）（UWG）「Gap」程式（威斯康辛州麥迪森市（Madison, Wis.））。

【0144】 如本文中所使用，術語「免疫障礙」係指由免疫系統的活動引起的任何疾病、障礙或疾病症狀，包括自體免疫性疾病、炎性疾病及過敏。免疫障礙包括（但不限於）自體免疫性疾病（例如，牛皮癬、特應性皮炎、狼瘡、硬皮病、溶血性貧血、血管炎、一型糖尿病、格雷夫病（Grave's disease）、類風濕性關節炎、多發性硬化、古德帕斯雷綜合症（Goodpasture's syndrome）、惡性貧血和/或肌病）、炎性疾病（例如，尋常型痤瘡、氣喘、乳糜瀉、慢性前列腺炎、腎小球性腎炎、炎性腸病、盆腔炎、再灌注損傷、類風濕性關節炎、肉狀瘤病、移植排斥、血管炎和/或間質性膀胱炎），和/或過敏（例如，食物過敏、藥物過敏和/或環境過敏）。

【0145】 「免疫療法」係使用受試者的免疫系統以治療疾病（例如，免疫疾病、炎性疾病、代謝性疾病、癌症）的治療且包括（例如）檢查點抑制劑、癌症疫苗、細胞介素、細胞療法、CAR-T細胞及樹突細胞療法。

【0146】 術語「增加」意指變化，從而取決於治療後狀態大於治療前狀態至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、4倍、10倍、100倍、10^3倍、10^4倍、10^5倍、10^6倍和/或10^7倍的差別。可能增加的特性包括免疫細胞、細菌細胞、基質細胞、髓樣來源的抑制細胞、成纖維細胞、代

謝物的數量；細胞介素的水平；或其他物理參數（例如耳厚度（例如，在DTH動物模型中）或腫瘤的大小（例如，在動物腫瘤模型中））。

【0147】 「先天免疫促效劑」或「免疫佐劑」係特異性靶向先天免疫受體（包括Toll樣受體（TLR）、NOD受體、RLR、C型凝集素受體、STING-cGAS通路組分、發炎體複合物）的小分子、蛋白質或其他藥劑。例如，LPS係細菌源的或合成的TLR-4促效劑且可使用鋁作為免疫刺激佐劑。免疫佐劑係特定種類的較寬泛佐劑或輔助療法。STING促效劑的實例包括（但不限於）2'3'-cGAMP、3'3'-cGAMP、c-di-AMP、c-di-GMP、2'2'-cGAMP及2'3'-cGAM(PS)2 （Rp/Sp）（2'3'-cGAMP的雙硫代磷酸酯類似物的Rp、Sp異構物）。TLR促效劑的實例包括（但不限於）TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10及TLR11。NOD促效劑的實例包括（但不限於）：N-乙醯基胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸（胞壁醯二肽（MDP））、γ-D-穀胺醯基-內消旋-二胺基庚二酸（iE-DAP）及去胞壁醯肽（desmuramylpeptide；DMP）。

【0148】 「內轉錄間隔區」或「ITS」係位於通常用於識別真核物種（特別地，真菌）的共同先質轉錄本上的結構核糖體RNA（rRNA）之間的一段非功能性RNA。形成核糖體的核的真菌的rRNA經轉錄為信號基因且由8S、5.8S及28S區域及分別在8S與5.8S之間及5.8S與28S區域之間的ITS4及5組成。如先前描述，在18S與5.8S之間及5.8S與28S區域之間的這類兩個雙譯基因嵌段（intercistronic segment）藉由剪接移除且出於條碼的目的在物種之間含有顯著變化（Schoch等人，Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.[核糖體內轉錄間隔區（ITS）係真菌的通用DNA條碼標記]PNAS[美國國家科學院院刊] 109:6241-6246.2012）。18S rDNA傳統上用於系統發育重建，然而ITS可發揮此功能，因為其通常是高度保守的，但含有高變區，該等高變區具有足夠的核苷酸多樣性來區分大多數真菌的屬及物種。

【0149】 術語「分離的」或「富集的」涵蓋具有以下特徵的微生物、mEV（例如smEV）或其他實體或物質：(1) 與在最初產生（不論在自然界中或在實驗環境中）時與其締合的至少一些組分分離，和/或 (2) 人工產生、製備、純化和/或製造。分離的微生物或mEV可與至少約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或更多的其最初關聯的其他組分分離。在一些實施方式中，分離的微生物或mEV係大於約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或大於約99%純的，例如基本上不含其他組分。術語「純化（purify）」、「進行純化（purifying）」及「純化的（purified）」係指已與在最初產生或生成（例如不論在自然界中或在實驗環境中）時或在其初始產生之後的任一時間期間與其締合的至少一些組分分離的微生物或mEV或其他材料。如果在產生時或在產生之後（例如）自含有微生物或微生物群體或mEV的材料或環境分離，則該微生物或微生物群體或mEV可視為純化的，且純化的微生物或微生物群體或mEV群體可含有最高約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或高於約90%的其他材料且仍視為「分離的」。在一些實施方式中，經純化微生物或mEV或微生物群體係大於約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或大於約99%純的。在本文所提供微生物組成物的情況下，存在於該組成物中的一種或多種微生物類型可與獨立於一種或多種產生和/或存在於含有該微生物類型的材料或環境中的其他微生物來純化。微生物組成物及其微生物組分（例如或mEV）通常純化自殘餘生境產物。

【0150】 如本文中所使用，「脂質」包括脂肪、油、三酸甘油酯、膽固醇、磷脂質、任何形式的脂肪酸（包括游離脂肪酸）。脂肪、油及脂肪酸可為飽和、不飽和（順式或反式）或部分不飽和（順式或反式）。

【0151】 術語「LPS突變體或脂多糖突變體」廣泛地指包含LPS喪失的選定細菌。LPS喪失可能是由於與脂質A生物合成相關的基因如*lpxA*、*lpxC*和*lpxD*的突變或破壞所致。包含LPS突變體的細菌可對胺基糖苷類和多黏菌素（多黏菌素B和黏菌素）係抗性的。

【0152】 如本文中所使用的「代謝物」係指在任何細胞或微生物代謝反應中用作底物或作為產物化合物、組成物、分子、離子、輔助因子、催化劑或營養素產生自任何細胞或微生物代謝反應的任何及所有分子化合物、組成物、分子、離子、輔助因子、催化劑或營養素。

【0153】 「微生物」係指表徵為古生物、寄生蟲、細菌、真菌、微觀藻類、原生動物及與該生物體相關的發育階段或生命週期階段（例如，植物、孢子（包括孢子形成、休眠及萌發）、潛伏、生物膜）的任何天然或經改造的生物體。腸道微生物的實例包括：葛氏放線菌（*Actinomyces graevenitzii*）、齲齒放線菌（*Actinomyces odontolyticus*）、嗜黏蛋白阿克曼氏菌（*Akkermansia muciniphila*）、糞擬桿菌（*Bacteroides caccae*）、脆弱擬桿菌（*Bacteroides fragilis*）、腐敗擬桿菌（*Bacteroides putredinis*）、多形擬桿菌（*Bacteroides thetaiotaomicron*）、普通擬桿菌（*Bacteroides vultagus*）、青春雙歧桿菌（*Bifidobacterium adolescentis*）、兩歧雙歧桿菌（*Bifidobacterium bifidum*）、對沃氏嗜膽菌（*Bilophila wadsworthia*）、布勞特氏菌屬（*Blautia*）、丁酸弧菌屬（*Butyrivibrio*）、纖細彎曲桿菌（*Campylobacter gracilis*）、梭菌群III（*Clostridia cluster III*）、梭菌群IV（*Clostridia cluster IV*）、梭菌群IX（*Clostridia cluster IX*）（胺基酸球菌科群（*Acidaminococcaceae group*））、梭菌群XI（*Clostridia cluster XI*）、梭菌群XIII（*Clostridia cluster XIII*）（消化鏈球菌群（*Peptostreptococcus group*））、梭菌群XIV（*Clostridia cluster XIV*）、梭菌群XV（*Clostridia cluster XV*）、產氣柯林斯菌（*Collinsella aerofaciens*）、糞球菌屬（*Coprococcus*）、桑氏棒狀桿菌

（*Corynebacterium sunsvallense*）、豬脫硫單胞菌（*Desulfomonas pigra*）、產甲酸多爾氏菌（*Dorea formicigenerans*）、長鏈多爾氏菌（*Dorea longicatena*）、大腸桿菌（*Escherichia coli*）、龐大真桿菌（*Eubacterium hadrum*）、直腸真桿菌（*Eubacterium rectale*）、普拉梭菌（*Faecalibacteria prausnitzii*）、孿生球菌屬（*Gemella*）、乳球菌屬（*Lactococcus*）、蘭氏螺菌屬（*Lanchnospira*）、柔膜細菌群XVI（*Mollicutes cluster XVI*）、柔膜細菌群XVIII（*Mollicutes cluster XVIII*）、普雷沃菌屬（*Prevotella*）、黏滑羅氏菌（*Rothia mucilaginosa*）、伶俐瘤胃球菌（*Ruminococcus callidus*）、活潑瘤胃球菌（*Ruminococcus gnavus*）、扭鏈瘤胃球菌（*Ruminococcus torques*）及鏈球菌屬（*Streptococcus*）。

【0154】「微生物胞外囊泡」（mEV）可從微生物如細菌、古生菌、真菌、微藻、原生動物和寄生蟲獲得。在一些實施方式中，mEV從細菌獲得。mEV包括分泌型微生物胞外囊泡（smEV）和經加工的微生物胞外囊泡（pmEV）。「分泌型微生物胞外囊泡」（smEV）係來源於微生物的自然產生的囊泡。smEV由微生物脂質和/或微生物蛋白質和/或微生物核酸和/或微生物碳水化合物部分構成，並從培養上清液中分離。該等囊泡的自然產生可以藉由操縱細菌細胞正在培養的環境（例如，藉由培養基或溫度改變）來人為地增強（例如，增加）或減少。此外，smEV組成物可以被修飾以減少，增加，添加或去除微生物成分或外來物質，以改變功效、免疫刺激、穩定性、免疫刺激能力、穩定性、器官靶向性（例如，淋巴結）、吸收（例如，胃腸道）和/或產率（例如，由此改變功效）。如本文所用，術語「純化的smEV組成物」或「smEV組成物」係指smEV的製劑，其已經從源材料中發現的至少一種相關聯物質（例如，從至少一種其他微生物組分分離）或用於製備該製劑的任何方法中與smEV相關聯的任何材料分離。也可指針對特定組分已顯著富集的組成物。「經加工的微生物胞外囊泡」（pmEV）係從人工裂解的微生物（例如，細菌）純化的微生物膜組分（例如，

已與其他胞內微生物細胞組分分離的微生物膜組分）的非天然存在的集合，並且其可包含根據純化方法而具有變化的或選定的尺寸範圍的顆粒。藉由化學破壞（例如，藉由溶菌酶和/或溶葡萄球菌素）和/或物理破壞（例如，藉由機械力）微生物細胞並藉由離心和/或超速離心或其他方法將微生物膜組分與胞內組分分離來獲得pmEV池。所得pmEV混合物含有富集的微生物膜及其組分（例如，外周締合的或完整的膜蛋白、脂質、聚糖、多糖、碳水化合物、其他聚合物），使得相對於完整微生物，微生物膜組分的濃度增加，並且胞內內容物的濃度降低（例如，稀釋）。對於革蘭氏陽性細菌，pmEV可以包括細胞膜或細胞質膜。對於革蘭氏陰性細菌，pmEV可以包括內膜和外膜。革蘭氏陰性菌可能屬於陰性菌類。pmEV可以被修飾以增加純度，調節組成物中顆粒的尺寸，和/或被修飾以減少、增加、添加或去除微生物組分或外來物質，以改變功效、免疫刺激、穩定性、免疫刺激能力、穩定性、器官靶向性（例如淋巴結）、吸收（例如胃腸道）和/或產率（例如由此改變功效）。pmEV可以藉由添加、去除、富集或稀釋特定組分（包括來自相同或其他微生物的細胞內組分）被修飾。如本文所用，術語「純化的pmEV組成物」或「pmEV組成物」係指pmEV的製劑，其已經從源材料中發現的至少一種相關聯物質（例如，從至少一種其他微生物組分分離）或用於製備該製劑的任何方法中與pmEV相關聯的任何材料分離。也可指針對特定組分已顯著富集的組成物。

【0155】 「微生物組」廣泛地指棲居於受試者或患者的身體部位上或中的微生物。微生物組中的微生物可包括細菌、病毒、真核微生物和/或病毒。微生物組中的個別微生物可為代謝活性、休眠、潛伏或作為孢子存在，可以浮游形式存在或存在於生物膜中，或可以可持續或短暫的方式存在於該微生物組中。該微生物組可為共生或健康狀態微生物組或疾病狀態微生物組。該微生物組對受試者或患者而言可為天然的，或該微生物組的組分可因健康狀態（例如，癌

前狀態或癌狀態）或處理條件（例如，抗生素治療、暴露於不同微生物）的變化而經調整、引入或消耗。在一些方面中，該微生物組出現於黏膜表面。在一些方面中，該微生物組係腸道微生物組。在一些方面中，該微生物組係腫瘤微生物組。

【0156】 組織或樣本的「微生物組譜（microbiome profile）」或「微生物組特徵（microbiome signature）」係指微生物組的細菌組成的至少部分表徵。在一些實施方式中，微生物組譜指示是否至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多個細菌菌株存在於微生物組中或不存在於微生物組中。在一些實施方式中，微生物組譜指示是否至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多個癌症相關細菌菌株存在於樣本中。在一些實施方式中，微生物組譜指示樣本中檢測的各細菌菌株的相對量或絕對量。在一些實施方式中，微生物組譜係癌症相關微生物組譜。癌症相關微生物組譜係以比一般群體更大的頻率出現於患有癌症的受試者中的微生物組譜。在一些實施方式中，相較於正常存在於取自未患癌症的個體的在其他方面當量的組織或樣本的微生物組中的細菌，該癌症相關微生物組譜包含更大數量或量的癌症相關細菌。

【0157】 關於細菌的「經修飾的」廣泛地指自野生型形式已經變化的細菌。細菌修飾可以產生自工程菌。細菌修飾的實例包括遺傳修飾、基因表現修飾、表型修飾、配製修飾、化學修飾及劑量或濃度。經改善的性質的實例描述於整個說明書中且包括（例如）減毒、營養缺陷、歸巢或抗原性。表型修飾可包括（以實例說明的）細菌於修飾細菌的表型的培養基中生長使得其增加或降低毒力。

【0158】 如本文中所使用的「腫瘤生物群系（oncobiome）」包含致瘤和/或癌症相關微生物區，其中該微生物區包含病毒、細菌、真菌、原生生物、寄生蟲或其他微生物中的一種或多種。

【0159】 「腫瘤營養性（Oncotrophic）」或「嗜腫瘤（oncophilic）」微生物及細菌係與癌症微環境高度相關聯的微生物或存在於癌症微環境中的微生物。它們可被優先選擇用於該環境中，優先在癌症微環境中生長或適應該環境。

【0160】 「運算分類單元」及「OTU」係指系統發生樹中的末端葉且藉由核酸序列（例如整個基因組或特定基因序列及所有與此核酸序列在物種層面共用序列同一性的序列）來定義。在一些實施方式中，特定基因序列可為16S序列或16S序列的一部分。在其他實施方式中，對兩種實體的整個基因組進行定序並進行比較。在另一個實施方式中，可以基因方式比較所選區域（例如多基因座序列標籤（MLST）、特定基因或基因集）。對於16S而言，整個16S或一些16S可變區中共有 ≥ 97%平均核苷酸同一性的OTU可視為相同OTU。參見，例如Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, 和O'Toole PW.2010.Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions[使用串聯可變16S rRNA基因區解析高度複雜的微生物群組成的兩種下一代定序技術的比較].Nucleic Acids Res[核酸研究] 38: e200.Konstantinidis KT, Ramette A及Tiedje JM.2006.The bacterial species definition in the genomic era[基因組時代的細菌種類定義].Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci[倫敦皇家學會B輯：生物科學哲學學報] 361: 1929-1940。對於完整基因組、MLST、特定基因（除16S外）或基因集而言，共有 ≥ 95%平均核苷酸同一性的OTU可視為相同OTU。例如參見Achtman M及Wagner M. 2008.Microbial diversity and the genetic nature of microbial species[微生物多樣性和微生物物種的遺傳性質].Nat. Rev. Microbiol.[微

生物自然評論] 6: 431-440.Konstantinidis KT, Ramette A及Tiedje JM.2006.The bacterial species definition in the genomic era[基因組時代的細菌種類定義].Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci[倫敦皇家學會B輯：生物科學哲學學報] 361: 1929-1940。通常藉由比較生物體之間的序列來定義OTU。通常，具有小於95%序列同一性的序列並不視為形成相同OTU的一部分。還可藉由核苷酸標誌或基因、尤其高度保守基因（例如「管家」基因）或其組合的任一組合來表徵OTU。本文提供可分配（例如）屬、物種及系統發育進化枝的運算分類單元（OTU）。

【0161】 如本文中所使用，如果基因在至少一些條件下在工程改造的細菌中的表現程度高於相同物種的野生型細菌在相同條件下的表現程度，則該基因在細菌中「過度表現」。類似地，如果基因在至少一些條件下在工程改造的細菌中的表現程度低於相同物種的野生型細菌在相同條件下的表現程度，則該基因在細菌中「表現不足」。

【0162】 術語「多核苷酸」及「核酸」可互換使用。它們係指任何長度的核苷酸的聚合形式（去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸）或其類似物。多核苷酸可具有任何三維結構，且可實施任何功能。多核苷酸的非限制性實例如下：基因或基因片段的編碼或非編碼區域、定義自連鎖分析的基因座（loci）（基因座（locus））、外顯子、內含子、信使RNA（mRNA）、微小RNA（miRNA）、緘默RNA （siRNA）、轉移RNA、核糖體RNA、核糖酶、cDNA、重組多核苷酸、分支多核苷酸、質體、載體、任何序列的經分離的DNA、任何序列的經分離的RNA、核酸探針及引子。多核苷酸可包括經修飾核苷酸，例如甲基化核苷酸及核苷酸類似物。如果存在，則可在組裝聚合物之前或之後賦予對核苷酸結構的修飾。多核苷酸可藉由（例如）與標記組分軛合而經進一步修飾。在本文提供的所有核酸序列中，U核苷酸可與T核苷酸互換。

【0163】 如本文中所使用，物質基本上不含其他組分時係「純的」。術語「純化（purify）」或「進行純化（purifying）」及「純化的（purified）」係指mEV（例如smEV）製劑或其他材料已與最初產生或形成（例如，無論在自然中或在實驗環境中）時或在初始產生後的任何時間期間與的相關聯的至少一些組分分離。若如果mEV（例如smEV）製劑或組成物在產生時或產生後與（諸如）一種或多種其他細菌組分分離，則該mEV（例如smEV）製劑或組成物可被視為純化的，並且純化的微生物或微生物群體可含有其他材料多達約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或超過約90%且仍被視為「純化的」。在一些實施方式中，純化的mEV（例如smEV）超過約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或超過約99%純。mEV（例如smEV）組成物（或製劑）例如從殘餘生境產物純化。

【0164】 如本文中所使用，術語「純化的EV組成物」或「EV組成物」係指如下的製劑：其包括已與源材料或在用以產生該製劑的任何方法中與mEV（例如smEV）相關聯的任何材料中發現的至少一種相關聯物質分離（例如，與至少一種其他細菌組分分離）的mEV（例如smEV）。它還指已經顯著富集或濃縮的組成物。在一些實施方式中，mEV（例如smEV）被濃縮2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、100倍、1000倍、10,000倍或超過10,000倍。

【0165】 「殘餘生境產物」係指自受試者內或受試者上的微生物群生境衍生的材料。例如，微生物的發酵培養物可以含有污染物，例如其他微生物菌株或形式（例如細菌、病毒、支原體和/或真菌）。例如，微生物生存於胃腸道的糞便中、皮膚本身上、唾液中、呼吸道的黏液中或泌尿生殖道的分泌物中（即，與微生物群落相關聯的生物物質）。大體上不含殘餘生境產物意指該微生物組成物不再含有與培養物或人或動物受試者上或人或動物受試者中的微生物環境

相關聯的生物物質且是100%不含、99%不含、98%不含、97%不含、96%不含或95%不含與該微生物群落相關聯的任何污染生物物質。殘餘生境產物可包括非生物材料（包括未經消化的食物）或其可包括非所需的微生物。大體上不含殘餘生境產物亦可意指該微生物組成物不含有來自培養物污染物或人或動物的可檢測細胞且意指僅微生物細胞係可檢測的。在一項實施方式中，大體上不含殘餘生境產物亦可意指該微生物組成物不含有可檢測的病毒（包括細菌、病毒（例如，噬菌體））、真菌、支原體污染物。在另一個實施方式中，這意味著與微生物細胞相比，微生物組成物中少於$1 x 10^{-2}$%、$1 x 10^{-3}$%、$1 x 10^{-4}$%、$1 x 10^{-5}$%、$1 x 10^{-6}$%、$1 x 10^{-7}$%、$1 x 10^{-8}$%的活細胞係人或動物。達到此純度之方法有很多，該等方法中無任何一者係限制性的。因此，污染物可經由藉由在固體培養基上對單菌落進行多個畫線步驟，直至來自系列性單菌落的複製（諸如但不限於兩個）畫線已顯示僅單一菌落形態來分離所需成分而減少。可替代地，污染物的減少可藉由多輪連續稀釋至單一所需細胞（例如，10^{-8}或10^{-9}的稀釋），諸如藉由多個10倍連續稀釋完成。此可藉由顯示多個經分離的菌落具有相似細胞形狀及革蘭氏染色行為進一步證實。用於證實足夠的純度的其他方法包括遺傳分析（例如，PCR、DNA定序）、血清學及抗原分析、酶及代謝分析及使用儀器之方法，諸如使用自污染物區分所需成分的試劑的流動式細胞測量術。

【0166】 如本文中所使用，「特異性結合」係指抗體能夠結合至預定抗原或多肽能夠結合至其預定結合配偶體。通常，抗體或多肽以對應於約10^{-7} M或更小K_D的親和力特異性結合至其預定抗原或結合配偶體，且以相對於結合至非特異性及不相關抗原/結合配偶體（例如BSA、酪蛋白）小至少10倍、小至少100倍或小至少1000倍的其親和力的親和力（如藉由K_D所表示）結合至預定抗原/結合配偶體。可替代地，特異性結合更廣泛地適用於二組分系統，其中一種組分

係蛋白質、脂質或碳水化合物或其組合且與係蛋白質、脂質、碳水化合物或其組合的第二組分以特定方式接合。

【0167】 「菌株」係指具有基因印記的細菌物種的成員，從而其可與相同細菌物種的密切相關成員區分開來。基因特徵可為不存在至少一種基因的全部或一部分、不存在至少一個調控區（例如啟動子、終止子、核糖開關、核糖體結合位點）的全部或一部分、不存在（「消除」）至少一種天然質體、存在至少一種重組基因、存在至少一種突變基因、存在至少一種外來基因（衍生自另一物種的基因）、存在至少一種突變調控區（例如啟動子、終止子、核糖開關、核糖體結合位點）、存在至少一種非天然質體、存在至少一種抗生素抗性盒或其組合。可藉由PCR擴增且視需要隨後進行一個或多個目的基因組區域或全基因組的DNA定序來鑒別不同菌株之間的基因特徵。如果一種菌株（與相同物種的另一種菌株相比）已獲得或失去抗生素抗性或獲得或失去生物合成能力（例如營養缺陷型菌株），則可藉由選擇或反選擇分別使用抗生素或營養物/代謝物來區分菌株。

【0168】 術語「受試者」或「患者」係指任何哺乳動物。描述為「有需要」的受試者或患者係指需要治療（或預防）疾病的人。哺乳動物（即哺乳類動物）包括人、實驗室動物（例如靈長類動物、大鼠、小鼠）、家畜（例如牛、綿羊、山羊、豬）及家庭寵物（例如狗、貓、齧齒類動物）。受試者可為人。受試者可為非人哺乳動物，包括但不限於：狗、貓、牛、馬、豬、驢、山羊、駱駝、小鼠、大鼠、天竺鼠、綿羊、駱馬、猴、大猩猩或黑猩猩。受試者可為健康的，或可患有任一發展階段的癌症，其中任一階段由癌症相關或致病病原體引起或伺機性地支持該病原體，或受試者可處於發生癌症或向其他受試者傳播癌症相關或癌症致病病原體的風險中。在一些實施方式中，受試者患有肺癌、膀胱癌、前列腺癌、漿細胞瘤、大腸直腸癌、直腸癌、默克爾細胞癌、唾液腺癌、卵巢

癌和/或黑色素瘤。受試者可以具有腫瘤。受試者可以具有展示增強的大型胞飲作用的腫瘤，其中此過程的潛在基因組學包含Ras活化。在其他實施方式中，受試者患有另一種癌症。在一些實施方式中，受試者已經接受癌症療法。

【0169】 如本文中所使用，術語「治療」受試者疾病或「治療」患有或懷疑患有疾病的受試者係指對受試者投與醫藥治療（例如投與一種或多種藥劑），從而降低至少一種疾病症狀或預防其惡化。因此，在一個實施方式中，「治療」尤其是指延遲進展、促進緩解、誘導緩解、增大緩解、加速恢復、增加功效或降低替代治療的抗性，或其組合。如本文所用，術語「預防」受試者中的疾病係指對受試者投與藥物治療，例如，投與一種或多種藥劑，使得疾病的至少一個症狀的發作被延遲或預防。

細菌

【0170】 在某些方面，本文提供了包含從細菌獲得的mEV（例如smEV）的藥物組成物。

【0171】 在一些實施方式中，對獲得mEV（如smEV）的細菌進行修飾以降低毒性或其他不利影響；提高mEV（如smEV）的遞送（例如口服遞送）（例如，藉由改良耐酸性、黏液黏著性和/或滲透性和/或對膽汁酸、消化酶的抗性、對抗微生物肽的抗性和/或抗體中和）；靶向所需細胞類型（例如，M細胞、杯狀細胞、腸上皮細胞、樹突細胞、巨噬細胞）；增強mEV（如smEV）的免疫調節和/或治療效果（例如單獨或與另一治療劑組合）；和/或藉由mEV（如smEV）（例如藉由修飾地產生多糖、纖毛、繳毛、黏附素）增強免疫活化或抑制。在一些實施方式中，本文描述之工程改造的細菌被修飾以改善mEV（例如smEV）製造（例如，更高的耐氧性、穩定性、改善的凍融耐受性、較短的產生時間）。例如，在一些實施方式中，本文描述之工程改造的細菌包括具有一種或多種遺傳改變的細菌，此改變包含於細菌染色體或內源性質體和/或一或多個外源性質

體上的一或多個核苷酸的插入、刪除、易位或取代，或其任何組合，其中該遺傳改變可導致一或多個基因的過表現和/或低表現。工程改造的細菌可使用本領域中已知的任何技術產生，包括（但不限於）定點誘變、轉座子誘變、敲除、敲入、聚合酶鏈反應誘變、化學誘變、紫外線誘變、轉形（化學或藉由電穿孔）、噬菌體轉導、定向演化或其任何組合。

【0172】 可用作本文描述之mEV（例如smEV）來源的細菌物種和/或菌株的實例在表1、表2和/或表3和整個說明書的其他地方提供。在一些實施方式中，細菌菌株係具有與表1、表2和/或表3中列舉的菌株具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的基因組的細菌菌株。在一些實施方式中，mEV來自腫瘤營養性細菌。在一些實施方式中，mEV來自免疫刺激性細菌。在一些實施方式中，mEV來自免疫抑制性細菌。在一些實施方式中，mEV來自免疫調節性細菌。在某些實施方式中，mEV產生自本文提供的細菌菌株的組合。在一些實施方式中，該組合係至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45或50個細菌菌株的組合。在一些實施方式中，該組合包括來自以下的mEV：表1、表2和/或表3中列舉的細菌菌株和/或具有與表1、表2和/或表3中列舉的菌株具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的基因組的細菌菌株。

【0173】 在一些實施方式中，mEV從革蘭氏陰性細菌獲得。

【0174】 在一些實施方式中，革蘭氏陰性細菌屬於*Negativicutes*綱。Negativicutes代表微生物的獨特綱，因為它們係厚壁菌門中唯一的雙膜（diderm）成員。該等厭氧生物可以在環境中發現，並且是人口腔和胃腸道的正常共生體。由於該等生物體具有外膜，因此對該綱的smEV產率進行了研究。發現在以每個

細胞為基礎，該等微生物產生大量的囊泡（10-150 EV/細胞）。來自該等生物的smEV在體外測定中具有廣泛的刺激性和高效力。對其在幾種腫瘤學和炎症體內模型中治療性應用的研究顯示了其治療性潛力。Negativicutes綱包括以下科：韋榮氏球菌科，月形單孢菌科，胺基酸球菌科和*Sporomusaceae*。Negativicutes包括巨型球菌屬、月形單胞菌屬、*Propionospora*屬和胺基酸球菌屬。示例性Negativicutes物種包括但不限於巨型球菌屬物種、菲利克斯新月形單胞菌、腸胺基酸球菌、和*Propionospora* 屬物種。

【0175】 在一些實施方式中，mEV從革蘭氏陽性細菌獲得。

【0176】 在一些實施方式中，mEV從需氧細菌獲得。

【0177】 在一些實施方式中，mEV從厭氧細菌獲得。

【0178】 在一些實施方式中，mEV從嗜酸細菌獲得。

【0179】 在一些實施方式中，mEV從嗜鹼細菌獲得。

【0180】 在一些實施方式中，mEV從嗜中性細菌獲得。

【0181】 在一些實施方式中，mEV從難養細菌獲得。

【0182】 在一些實施方式中，mEV從非難養細菌獲得。

【0183】 在一些實施方式中，從其獲得mEV的細菌被凍乾。

【0184】 在一些實施方式中，從其獲得mEV的細菌被γ照射（例如，在17.5或25 kGy下）。

【0185】 在一些實施方式中，從其獲得mEV的細菌被UV照射。

【0186】 在一些實施方式中，從其獲得mEV的細菌被熱滅活（例如，在50°C下兩小時或在90°C下兩小時）。

【0187】 在一些實施方式中，從其獲得mEV的細菌被酸處理。

【0188】 在一些實施方式中，從其獲得mEV的細菌被噴氧（例如，在0.1 vm下持續兩小時）。

【0189】 在一些實施方式中，凍乾mEV。

【0190】 在一些實施方式中，mEV被γ照射（例如，在17.5或25 kGy下）。

【0191】 在一些實施方式中，mEV被UV照射。

【0192】 在一些實施方式中，mEV被熱滅活（例如，在50°C下兩小時或在90°C下兩小時）。

【0193】 在一些實施方式中，mEV被酸處理。

【0194】 在一些實施方式中，mEV被噴氧（例如，以0.1 vvm持續兩小時）。

【0195】 生長階段會影響細菌和/或細菌產生的smEV的數量或性質。例如，在本文提供的smEV製備方法中，可以例如在對數生長期開始時、在對數生長期的中間時、和/或一旦達到穩定生長期時從培養物中分離smEV。

[表1]：示例性細菌菌株

OTU	**公開DB登錄號**
缺陷乏養菌	ACIN02000016
副吡鄰乏養菌	AB022027
乏養菌屬口腔殖株P4PA_155 P1	AY207063
延長厭氧醋菌	NR_042930
解纖維醋弧菌	NR_025917
產乙醇醋弧菌	FR749897
醋化醋酸桿菌	NR_026121
可可豆醋酸桿菌	NR_042678
羅旺醋酸桿菌	NR_040832
蘋果醋酸桿菌	NR_025513
東方醋酸桿菌	NR_028625
巴氏醋酸桿菌	NR_026107
果實醋桿菌	NR_042112
蒲桃醋酸桿菌	NR_040868

熱帶醋酸桿菌	NR_036881
醋酸桿菌科細菌AT_5844	AGEZ01000040
萊氏無膽黴漿菌	NR_074448
反硝化無色桿菌	NR_042021
皮氏無色桿菌	ADMS01000149
木糖氧化無色桿菌	ACRC01000072
發酵胺基酸球菌	CP001859
腸胺基酸球菌	CP003058
胺基酸球菌屬D21	ACGB01000071
食糖酸葉菌	AY350586
食鐵嗜酸硫桿菌	NR_074660
食酸菌屬98_63833	AY258065
鮑曼氏不動桿菌	ACYQ01000014
乙酸鈣不動桿菌	AM157426
不動桿菌屬複合群C1	AY278636
溶血性不動桿菌	ADMT01000017
約氏不動桿菌	ACPL01000162
瓊氏不動桿菌	ACPM01000135
魯氏不動桿菌	ACPN01000204
小不動桿菌	AIEB01000124
抗輻射不動桿菌	ACVR01000010
申氏不動桿菌	NR_025412
不動桿菌屬56A1	GQ178049
不動桿菌屬CIP 101934	JQ638573
不動桿菌屬物種CIP 102143	JQ638578
不動桿菌屬物種CIP 53.82	JQ638584
不動桿菌屬物種M16_22	HM366447

不動桿菌屬物種RUH2624	ACQF01000094
不動桿菌屬物種SH024	ADCH01000068
伴放線放線桿菌	AY362885
小放線桿菌	ACFT01000025
胸膜肺炎放線桿菌	NR_074857
產琥珀酸放線桿菌	CP000746
腺放線桿菌	AEVG01000167
馬西裡氏放線棒菌	AF487679
夏氏放線棒菌	AY957507
放線棒菌屬BM#101342	AY282578
放線棒菌屬P2P_19 P1	AY207066
加地夫放線菌	GU470888
歐洲放線菌	NR_026363
芬氏放線菌	HQ906497
放線菌屬複合群C1	AY278610
放線菌屬複合群C2	AY278611
放線菌屬複合群P1口腔殖株MB6_C03	DQ003632
喬氏放線菌	GU561319
以色列放線菌	AF479270
馬賽放線菌	AB545934
邁耶放線菌	GU561321
納士放線菌	X81062
鼻放線菌	AJ508455
紐氏放線菌	X71862
齲齒放線菌	ACYT01000123
山地放線菌	NR_025559
人口腔放線菌	AJ575186

口腔放線菌	BABV01000070
放線菌屬物種7400942	EU484334
放線菌屬物種c109	AB167239
放線菌屬物種CCUG 37290	AJ234058
放線菌屬物種ChDC B197	AF543275
放線菌屬物種GEJ15	GU561313
放線菌屬物種HKU31	HQ335393
放線菌屬物種ICM34	HQ616391
放線菌屬物種ICM41	HQ616392
放線菌屬物種ICM47	HQ616395
放線菌屬物種ICM54	HQ616398
放線菌屬物種M2231_94_1	AJ234063
放線菌屬物種口腔殖株GU009	AY349361
放線菌屬物種口腔殖株GU067	AY349362
放線菌屬物種口腔殖株IO076	AY349363
放線菌屬物種口腔殖株IO077	AY349364
放線菌屬物種口腔殖株IP073	AY349365
放線菌屬物種口腔殖株IP081	AY349366
放線菌屬物種口腔殖株JA063	AY349367
放線菌屬物種口腔分類群170	AFBL01000010
放線菌屬物種口腔分類群171	AECW01000034
放線菌屬物種口腔分類群178	AEUH01000060
放線菌屬物種口腔分類群180	AEPP01000041
放線菌屬物種口腔分類群848	ACUY01000072
放線菌屬物種口腔分類群C55	HM099646
放線菌屬物種TeJ5	GU561315
泌尿生殖放線菌	ACFH01000038

黏性放線菌	ACRE01000096
產雌馬酚阿德勒氏菌	AB306661
棲血氣球菌	AY837833
脲氣球菌	CP002512
馬脲氣球菌	NR_043443
綠色氣球菌	ADNT01000041
海洋氣微菌	NR_025681
氣微菌屬JC14	JF824798
異常嗜糖氣單胞菌	S39232
腸棕氣單胞菌	X71121
嗜水氣單胞菌	NC_008570
簡氏氣單胞菌	X60413
殺鮭氣單胞菌	NC_009348
易損氣單胞菌	X60415
維羅氏氣單胞菌	NR_044845
阿菲波菌屬複合群4	EU117385
伴放線凝聚桿菌	CP001733
嗜沫凝聚桿菌	CP001607
惰性凝聚桿菌	AEPS01000017
放射形土壤桿菌	CP000628
根癌土壤桿菌	AJ389893
耶納膿球菌	NR_026275
嗜黏蛋白阿克曼氏菌	CP001071
糞產鹼桿菌	AB680368
產鹼桿菌屬CO14	DQ643040
產鹼桿菌屬物種S3	HQ262549
酸熱脂環酸芽孢桿菌	NR_074721

酸土脂環酸芽孢桿菌	NR_040844
污染脂環酸芽孢桿菌	NR_041475
產環庚酸性脂環酸芽孢桿菌	NR_024754
草脂環酸芽孢桿菌	NR_024753
果實脂環酸芽孢桿菌	NR_024801
脂環酸芽孢桿菌屬CCUG 53762	HE613268
芬戈爾德氏另枝菌	NR_043064
不明顯另枝菌	AB490804
奧登多克氏另枝菌	NR_043318
腐敗另枝菌	ABFK02000017
沙氏另枝菌	FP929032
另枝菌屬HGB5	AENZ01000082
另枝菌屬物種JC50	JF824804
另枝菌屬RMA 9912	GQ140629
金屬還原嗜鹼菌	AY137848
奧倫蘭氏嗜鹼菌	NR_043674
廣棲別樣斯卡多維氏菌	NR_042583
別樣斯卡多維氏菌屬OB7196	AB425070
產氫厭氧菌	ACJX02000009
產琥珀酸厭氧螺菌	NR_026075
湯瑪斯厭氧螺菌	AJ420985
氫化厭氧球菌	ABXA01000039
解乳厭氧球菌	ABYO01000217
八迭厭氧球菌	NR_026360
普氏厭氧球菌	CP001708
厭氧球菌屬8404299	HM587318
厭氧球菌屬物種8405254	HM587319

厭氧球菌屬物種9401487	HM587322
厭氧球菌屬物種9403502	HM587325
厭氧球菌屬gpac104	AM176528
厭氧球菌屬物種gpac126	AM176530
厭氧球菌屬物種gpac155	AM176536
厭氧球菌屬物種gpac199	AM176539
厭氧球菌屬物種gpac215	AM176540
四聯厭氧球菌	ACGC01000107
陰道厭氧球菌	ACXU01000016
人糞厭氧棒形菌	ABIL02000005
孿生厭氧球形菌	AGCJ01000054
運動厭氧孢桿菌	NR_042953
糞厭氧棒狀菌	ABAX03000023
厭氧棒狀菌屬3_2_56FAA	ACWB01000002
黑羅特克斯歐裡何米尼斯菌	ABGD02000021
邊緣邊蟲	ABOR01000019
嗜吞噬細胞邊蟲	NC_007797
解硫胺素硫胺素芽孢桿菌	AB101592
丹麥解硫胺素芽孢桿菌	NR_028657
米氏解硫胺素芽孢桿菌	NR_036799
嗜熱嗜氣解硫胺素芽孢桿菌	NR_042271
嗜熱氣解硫胺素芽孢桿菌	NR_029303
污染厭氧芽孢桿菌	NR_029006
黃色嗜熱厭氧芽孢桿菌	NR_074667
溶血隱秘桿菌	NR_025347
化膿隱秘桿菌	GU585578
布氏弓形桿菌	AEPT01000071

嗜低溫弓形桿菌	NR_025905
運動節桿菌	NR_026198
阿氏節桿菌	NR_074608
貝熱爾氏節桿菌	NR_025612
球形節桿菌	NR_026187
煙草節桿菌	NR_026190
微小奇異菌	HM007583
極小奇異菌	CP001721
齦裂奇異菌	ACFE01000007
奇異菌屬BS2	HQ616367
奇異菌屬物種F0209	EU592966
奇異菌屬物種ICM42b10	HQ616393
奇異菌屬物種ICM57	HQ616400
陰道奇異菌	AEDQ01000024
殺珊瑚橙色單胞菌	AY065627
阿爾塔米拉洞橙色單胞菌	FN658986
Auritibacter ignavus	FN554542
達爾豪斯艾弗裡菌	DQ481464
風化芽孢桿菌	NR_025557
嗜氣芽孢桿菌	NR_042339
艾氏芽孢桿菌	GQ980243
嗜鹼芽孢桿菌	X76436
解澱粉芽孢桿菌	NR_075005
炭疽芽孢桿菌	AAEN01000020
萎縮芽孢桿菌	NR_075016
栗褐芽孢桿菌	NR_036893
蠟樣芽孢桿菌	ABDJ01000015

環狀芽孢桿菌	AB271747
克勞氏芽孢桿菌	FN397477
凝結芽孢桿菌	DQ297928
堅韌芽孢桿菌	NR_025842
彎曲芽孢桿菌	NR_024691
福氏芽孢桿菌	NR_025786
明膠芽孢桿菌	NR_025595
鹽沼芽孢桿菌	NR_026144
耐鹽芽孢桿菌	AY144582
黑佈施泰因芽孢桿菌	NR_042286
霍爾氏芽孢桿菌	NR_036860
病研所芽孢桿菌	NR_043268
遲緩芽孢桿菌	NR_040792
地衣芽孢桿菌	NC_006270
巨大芽孢桿菌	GU252124
尼氏芽孢桿菌	NR_044546
農研所芽孢桿菌	NR_043334
菸酸芽孢桿菌	NR_024695
抱川芽孢桿菌	NR_041377
短小芽孢桿菌	NR_074977
沙福芽孢桿菌	JQ624766
單純芽孢桿菌	NR_042136
索諾氏芽孢桿菌	NR_025130
芽孢桿菌屬10403023 MM10403188	CAET01000089
芽孢桿菌屬2_A_57_CT2	ACWD01000095
芽孢桿菌屬2008724126	GU252108
芽孢桿菌屬物種2008724139	GU252111

芽孢桿菌屬物種7_16AIA	FN397518
芽孢桿菌屬物種9_3AIA	FN397519
芽孢桿菌屬物種AP8	JX101689
芽孢桿菌屬B27（2008）	EU362173
芽孢桿菌屬物種BT1B_CT2	ACWC01000034
芽孢桿菌屬物種GB1.1	FJ897765
芽孢桿菌屬物種GB9	FJ897766
芽孢桿菌屬物種HU19.1	FJ897769
芽孢桿菌屬物種HU29	FJ897771
芽孢桿菌屬物種HU33.1	FJ897772
芽孢桿菌屬物種JC6	JF824800
芽孢桿菌屬口腔分類群F26	HM099642
芽孢桿菌屬口腔分類群F28	HM099650
芽孢桿菌屬口腔分類群F79	HM099654
芽孢桿菌屬物種SRC_DSF1	GU797283
芽孢桿菌屬物種SRC_DSF10	GU797292
芽孢桿菌屬物種SRC_DSF2	GU797284
芽孢桿菌屬物種SRC_DSF6	GU797288
芽孢桿菌屬物種tc09	HQ844242
芽孢桿菌屬物種zh168	FJ851424
球形芽孢桿菌	DQ286318
產孢芽孢桿菌	NR_026010
枯草芽孢桿菌	EU627588
嗜熱澱粉芽孢桿菌	NR_029151
蘇雲金芽孢桿菌	NC_008600
魏氏芽孢桿菌	NR_074926
擬桿菌目細菌ph8	JN837494

擬桿菌屬複合群P1	AY341819
擬桿菌屬複合群P2口腔殖株MB1_G13	DQ003613
擬桿菌屬複合群P3口腔殖株MB1_G34	DQ003615
擬桿菌屬複合群P4口腔殖株MB2_G17	DQ003617
擬桿菌屬複合群P5口腔殖株MB2_P04	DQ003619
擬桿菌屬複合群P6口腔殖株MB3_C19	DQ003634
擬桿菌屬複合群P7口腔殖株MB3_P19	DQ003623
擬桿菌屬複合群P8口腔殖株MB4_G15	DQ003626
生酸擬桿菌	NR_028607
巴氏桿菌擬桿菌	NR_041446
人糞擬桿菌	EU136686
解纖維素擬桿菌	ACCH01000108
克拉氏擬桿菌	AFBM01000011
凝固擬桿菌	AB547639
糞居擬桿菌	ABIY02000050
嗜糞擬桿菌	ACBW01000012
多裡氏擬桿菌	ABWZ01000093
埃氏擬桿菌	ACWG01000065
糞便擬桿菌	GQ496624
芬戈爾德氏擬桿菌	AB222699
麩黴擬桿菌	AFBN01000029
脆弱擬桿菌	AP006841
半乳糖醛酸擬桿菌	DQ497994
潰瘍擬桿菌	CP002352
解肝素擬桿菌	JN867284
腸擬桿菌	ABJL02000006
馬賽擬桿菌	AB200226

諾德擬桿菌	NR_043017
擬南芥擬桿菌（Bacteroides oleiciplenus）	AB547644
卵形擬桿菌	ACWH01000036
果膠擬桿菌	ABVQ01000036
平常擬桿菌	AB200218
化膿性擬桿菌	NR_041280
Bacteroides salanitronis	CP002530
薩利爾斯氏擬桿菌（Bacteroides salyersiae）	EU136690
擬桿菌屬1_1_14	ACRP01000155
擬桿菌屬1_1_30	ADCL01000128
擬桿菌屬1_1_6	ACIC01000215
擬桿菌屬2_1_22	ACPQ01000117
擬桿菌屬2_1_56FAA	ACWI01000065
擬桿菌屬2_2_4	ABZZ01000168
擬桿菌屬20_3	ACRQ01000064
擬桿菌屬3_1_19	ADCJ01000062
擬桿菌屬3_1_23	ACRS01000081
擬桿菌屬物種3_1_33FAA	ACPS01000085
擬桿菌屬物種3_1_40A	ACRT01000136
擬桿菌屬3_2_5	ACIB01000079
擬桿菌屬315_5	FJ848547
擬桿菌屬物種31SF15	AJ583248
擬桿菌屬物種31SF18	AJ583249
擬桿菌屬物種35AE31	AJ583244
擬桿菌屬物種35AE37	AJ583245
擬桿菌屬物種35BE34	AJ583246
擬桿菌屬物種35BE35	AJ583247

擬桿菌屬4_1_36	ACTC01000133
擬桿菌屬物種4_3_47FAA	ACDR02000029
擬桿菌屬物種9_1_42FAA	ACAA01000096
擬桿菌屬物種AR20	AF139524
擬桿菌屬物種AR29	AF139525
擬桿菌屬物種B2	EU722733
擬桿菌屬物種D1	ACAB02000030
擬桿菌屬物種D2	ACGA01000077
擬桿菌屬物種D20	ACPT01000052
擬桿菌屬物種D22	ADCK01000151
擬桿菌屬物種F_4	AB470322
擬桿菌屬物種NB_8	AB117565
擬桿菌屬物種WH2	AY895180
擬桿菌屬物種XB12B	AM230648
擬桿菌屬物種XB44A	AM230649
排泄物擬桿菌	ABFZ02000022
多形擬桿菌	NR_074277
單形擬桿菌	AB050110
解尿素擬桿菌	GQ167666
普通擬桿菌	CP000139
木聚糖酶擬桿菌	ADKP01000087
擬桿菌門細菌口腔分類群D27	HM099638
擬桿菌門細菌口腔分類群F31	HM099643
擬桿菌門細菌口腔分類群F44	HM099649
腸道巴氏桿菌	AB370251
腸居巴氏桿菌	NR_041508
桿菌狀巴爾通氏體	NC_008783

格氏巴爾通氏體	CP001562
漢氏巴爾通氏體	NC_005956
五日熱巴爾通氏體	BX897700
泰咪爾巴爾通氏體	EF672728
華氏巴爾通氏體	FJ719017
布德樓弧菌屬MPA	AY294215
雙歧桿菌屬複合群CI	AY278612
青春雙歧桿菌	AAXD02000018
角雙歧桿菌	ABYS02000004
動物雙歧桿菌	CP001606
兩歧雙歧桿菌	ABQP01000027
短雙歧桿菌	CP002743
鏈狀雙歧桿菌	ABXY01000019
牙雙歧桿菌	CP001750
沒食子雙歧桿菌	ABXB03000004
嬰兒雙歧桿菌	AY151398
卡氏雙歧桿菌	AB491757
長雙歧桿菌	ABQQ01000041
假鏈狀雙歧桿菌	ABXX02000002
偽長雙歧桿菌	NR_043442
斯氏雙歧桿菌	AJ307005
雙歧桿菌屬HM2	AB425276
雙歧桿菌屬物種HMLN12	JF519685
雙歧桿菌屬物種M45	HM626176
雙歧桿菌屬物種MSX5B	HQ616382
雙歧桿菌屬物種TM_7	AB218972
嗜熱雙歧桿菌	DQ340557

尿雙歧桿菌	AJ278695
對沃氏嗜膽菌	ADCP01000166
比斯加德分類群	AY683487
比斯加德分類群	AY683489
比斯加德分類群	AY683491
比斯加德分類群	AY683492
泳池芽單胞菌	NR_040824
球形布勞特氏菌	AB571656
格魯氏布勞特氏菌（Blautia glucerasea）	AB588023
格魯斯布勞特氏菌（Blautia glucerasei）	AB439724
漢森布勞特氏菌	ABYU02000037
產氫營養型布勞特氏菌	ACBZ01000217
盧氏布勞特氏菌	AB691576
生產性布勞特氏菌	AB600998
申克布勞特氏菌	NR_026312
布勞特氏菌屬M25	HM626178
排泄物布勞特氏菌	HM626177
韋氏布勞特氏菌	EF036467
支氣管炎鮑特氏菌	NR_025949
霍爾氏鮑特氏菌	AB683187
副百日咳鮑特氏菌	NR_025950
百日咳鮑特氏菌	BX640418
阿氏螺旋體	ABCU01000001
伯氏螺旋體	ABGI01000001
麝鼠勾螺旋體	DQ057990
達頓螺旋體	NC_011229
伽氏螺旋體	ABJV01000001

赫氏螺旋體	AY597657
西班牙螺旋體	DQ057988
伊朗包柔氏螺旋體	HM161645
回歸熱包柔氏螺旋體	AF107367
螺旋體屬NE49	AJ224142
斯皮爾曼螺旋體	ABKB01000002
墨西哥包柔氏螺旋體	NC_008710
法雷斯螺旋體	ABCY01000002
食物短桿菌	NR_026269
凝聚短桿菌	AB537169
乳酪發酵短桿菌	NR_026272
阿爾博氏短螺菌	FM178386
毛腸短螺菌	NR_075069
短螺菌屬HIS3	FM178387
短螺菌屬物種HIS4	FM178388
短螺菌屬物種HIS5	FM178389
土壤短桿菌	NR_040983
短短桿菌	NR_041524
中孢短桿菌	NR_043414
橋石短桿菌	NR_040980
短桿菌污染短桿菌	NR_041836
側孢短桿菌	NR_037005
類短短桿菌	NR_040981
羅伊氏短桿菌	NR_040982
短桿菌屬phR	JN837488
嗜熱短桿菌	NR_026514
橙黃短桿菌	NR_044854

乳酪短桿菌	JF951998
表皮短桿菌	NR_029262
冷藏短桿菌	NR_042639
亞麻短桿菌	AJ315491
麥克布瑞德氏短桿菌	ADNU01000076
少食短桿菌	EU086796
血短桿菌	NR_028016
短桿菌屬H15	AB177640
短桿菌屬物種JC43	JF824806
近弧狀短波單胞菌	CP002102
流產布氏桿菌	ACBJ01000075
犬布氏桿菌	NR_044652
鯨種布氏桿菌	ACJD01000006
地中海熱布氏桿菌	AE009462
田鼠布氏桿菌	NR_042549
綿羊布氏桿菌	NC_009504
布氏桿菌屬83_13	ACBQ01000040
布氏桿菌屬BO1	EU053207
豬布氏桿菌	ACBK01000034
需甲酸鹽布瑞特氏菌	ACCL02000018
蚜蟲初級內共生菌	NR_074609
緩慢佈雷德菌	ADFR01000011
須芒草伯克霍爾德菌	AAUZ01000009
新洋蔥伯克霍爾德菌	AAHI01000060
洋蔥伯克霍爾德菌	NR_041719
鼻疽伯克霍爾德菌	CP000547
多食伯克霍爾德菌	NC_010086

俄克拉何馬伯克霍爾德菌	DQ108388
類鼻疽伯克霍爾德菌	CP001408
產根黴素伯克霍爾德菌	HQ005410
伯克霍爾德菌屬383	CP000151
食異生素伯克霍爾德菌	U86373
伯克霍爾德菌細菌1_1_47	ADCQ01000066
普利卡柯倫丁酸球菌	HH793440
維羅薩丁酸單胞菌	AB443949
穗狀丁酸弧菌	ABWN01000012
溶纖維丁酸弧菌	U41172
錳氧化暖單胞菌	NR_040787
生孢卡米尼希拉菌	NR_025485
結腸彎曲桿菌	AAFL01000004
簡要彎曲桿菌	CP000792
曲形彎曲桿菌	NC_009715
胎兒彎曲桿菌	ACLG01001177
纖細彎曲桿菌	ACYG01000026
人彎曲桿菌	NC_009714
空腸彎曲桿菌	AL139074
紅嘴鷗彎曲桿菌	CP000932
直腸彎曲桿菌	ACFU01000050
昭和彎曲桿菌	ACVQ01000030
彎曲桿菌屬FOBRC14	HQ616379
彎曲桿菌屬物種FOBRC15	HQ616380
彎曲桿菌屬口腔殖株BB120	AY005038
生痰彎曲桿菌	NR_044839
烏普薩拉彎曲桿菌	AEPU01000040

分節絲狀菌屬SFB_小鼠_Yit	NR_074460
葉蟬內共生菌	CP002163
犬咬嗜二氧化碳噬纖細菌	CP002113
嗜二氧化碳噬纖細菌屬複合群C1	AY278613
牙齦嗜二氧化碳噬纖細菌	ACLQ01000011
顆粒嗜二氧化碳噬纖細菌	X97248
黃褐嗜二氧化碳噬纖細菌	AEOH01000054
嗜二氧化碳噬纖細菌屬GEJ8	GU561335
嗜二氧化碳噬纖細菌屬口腔殖株AH015	AY005074
嗜二氧化碳噬纖細菌屬物種口腔殖株ASCH05	AY923149
嗜二氧化碳噬纖細菌屬物種口腔殖株ID062	AY349368
嗜二氧化碳噬纖細菌屬口腔菌株A47ROY	AY005077
嗜二氧化碳噬纖細菌屬物種口腔菌株S3	AY005073
嗜二氧化碳噬纖細菌屬口腔分類群338	AEXX01000050
嗜二氧化碳噬纖細菌屬物種S1b	U42009
生痰嗜二氧化碳噬纖細菌	ABZV01000054
人心桿菌	ACKY01000036
瓣膜心桿菌	NR_028847
廣布肉桿菌	NR_044706
產乳酸菌素肉桿菌	NC_019425
香港海鷗菌	AB671763
光岡鏈型桿菌	AB030224
卡托氏菌屬複合群P1口腔殖株MB5_P12	DQ003629
痰卡托氏菌	ACIL02000016
卡托氏菌屬口腔殖株FL037	AY349369
戴氏西地西菌	AF493976
芬氏纖維菌	AY501364

索拉鯨桿菌	AJ438155
鼠衣原體	AE002160
鸚鵡熱衣原體	NR_036864
沙眼衣原體	U68443
衣原體目細菌NS11	JN606074
衣原體目細菌NS13	JN606075
衣原體目細菌NS16	JN606076
獸類衣原體	D88317
肺炎衣原體	NC_002179
鸚鵡熱嗜性衣原體	D85712
綠彎菌屬複合群P1	AY331414
小克裡斯滕森氏菌	AB490809
紫色色桿菌	NC_005085
人金黃色桿菌	AM982793
黏金黃色桿菌	ACKQ02000003
人型金黃色桿菌	NR_042517
無丙二酸檸檬酸桿菌	FR870441
布氏檸檬酸桿菌	NR_028687
法氏檸檬酸桿菌	AF025371
弗氏檸檬酸桿菌	NR_028894
吉利檸檬酸桿菌	AF025367
柯氏檸檬酸桿菌	NC_009792
莫林檸檬酸桿菌	AF025369
鼠檸檬酸桿菌	NR_074903
塞氏檸檬酸桿菌	AF025364
檸檬酸桿菌屬30_2	ACDJ01000053
檸檬酸桿菌屬KMSI_3	GQ468398

沃克曼檸檬酸桿菌	AF025373
楊氏檸檬酸桿菌	ABWL02000011
埃夫裡桿菌	GQ258966
梭菌科細菌END_2	EF451053
梭菌科細菌JC13	JF824807
梭菌屬細菌1_7_47FAA	ABQR01000074
梭菌屬細菌9400853	HM587320
梭菌屬細菌9403326	HM587324
梭菌屬細菌口腔殖株P4PA_66 P1	AY207065
梭菌屬細菌口腔分類群093	GQ422712
梭菌屬細菌口腔分類群F32	HM099644
梭菌屬細菌ph2	JN837487
梭菌屬細菌SY8519	AB477431
梭菌屬複合群BVAB3	CP001850
梭菌屬SM4_1	FP929060
梭菌屬物種SS3_4	AY305316
梭菌屬物種SSC_2	FP929061
丙酮丁醇梭酸	NR_074511
耐氧梭酸	X76163
阿爾登氏梭菌	NR_043680
奧德里奇氏梭菌	NR_026099
藻狀梭菌	NR_041746
解藻木聚糖梭菌	NR_028726
胺基戊酸梭菌	NR_029245
苦杏仁梭菌	AY353957
阿根廷梭菌	NR_029232
天門冬形梭菌	ACCJ01000522

巴氏梭菌	NR_029229
巴特氏梭菌	ABEZ02000012
拜氏梭菌	NR_074434
雙酵素梭菌	X73437
鮑氏梭菌	ABCC02000039
肉毒梭菌	NC_010723
丁酸梭菌	ABDT01000017
屍毒梭菌	AB542932
食氧化碳梭菌	FR733710
肉梭菌	NR_044716
隱藏梭菌	X77844
速生梭菌	JQ246092
纖維素梭菌	NR_044624
肖沃氏梭菌	EU106372
香茅梭菌	ADLJ01000059
澄清梭菌	NR_041235
梭狀梭菌	M59089
梭形梭菌	NR_044715
球形梭菌	EF025906
匙形梭菌	NR_044717
耳蝸形梭菌	NR_026495
犬腸梭菌	FJ957863
鷓鴣梭菌	NR_026151
難辨梭菌	NC_013315
雙孢梭菌	NR_026491
酯化梭菌	NR_042153
福氏梭菌	NR_044714

Clostridium favososporum	X76749
費新尼亞梭菌	AF270502
寒冷梭菌	NR_024919
產氣梭菌	NR_024945
戈氏梭菌	AB542933
乙二醇梭菌	FJ384385
人糞梭菌	AB233029
溶血梭菌	NR_024749
哈氏梭菌	AY552788
平野氏梭菌	AB023970
溶組織梭菌	HF558362
海氏梭菌	AB023973
吲哚梭菌	AF028351
無害梭菌	M23732
不規則梭菌	NR_029249
板藍根梭菌	NR_026347
克氏梭菌	NR_074165
發酵乳糖梭菌	NR_025651
拉瓦勒塞梭菌	EF564277
柔嫩梭菌	AJ305238
泥渣梭菌	FR870444
大梭菌	X77835
惡名梭菌	FR749893
馬約貝梭菌	FR733682
甲基戊糖梭菌	ACEC01000059
系結梭菌	X73443
諾維氏梭菌	NR_074343

酪酸梭菌	Y18187
乳清酸梭菌	FR749922
副腐敗梭菌	AB536771
產氣莢膜梭菌	ABDW01000023
植物發酵梭菌	NR_074652
毛髮狀梭菌	D14639
腐敗梭菌	NR_024995
奎尼梭菌	NR_026149
多枝梭菌	M23731
直腸梭菌	NR_029271
噬糖梭菌	DQ100445
化糖梭菌	CP002109
薩丁島梭菌	NR_041006
煎盤梭菌	NR_026490
裂解梭菌	AF262238
敗血梭菌	NR_026020
索氏梭菌	AB448946
梭菌屬7_2_43FAA	ACDK01000101
梭菌屬物種D5	ADBG01000142
梭菌屬物種HGF2	AENW01000022
梭菌屬物種HPB_46	AY862516
梭菌屬物種JC122	CAEV01000127
梭菌屬物種L2_50	AAYW02000018
梭菌屬LMG 16094	X95274
梭菌屬物種M62_1	ACFX02000046
梭菌屬物種MLG055	AF304435
梭菌屬MT4 E	FJ159523

梭菌屬物種NMBHI_1	JN093130
梭菌屬NML 04A032	EU815224
梭菌屬物種SS2_1	ABGC03000041
梭菌屬物種SY8519	AP012212
梭菌屬物種TM_40	AB249652
梭菌屬物種YIT 12069	AB491207
梭菌屬物種YIT 12070	AB491208
楔樣梭菌	X73449
螺狀梭菌	X73441
生孢梭菌	ABKW02000003
球孢梭菌	NR_044835
糞堆梭菌	NR_025100
斯蒂克蘭德氏梭菌	L04167
斯特拉文斯梭菌	NR_024829
近端梭菌	NR_041795
產硫梭菌	NR_044161
共生梭菌	ADLQ01000114
第三梭菌	Y18174
破傷風梭菌	NC_004557
嗜熱纖維梭菌	NR_074629
酪丁酸梭菌	NR_044718
綠色梭菌	NR_026204
解木聚糖梭菌	NR_037068
產氣柯林斯菌	AAVN02000007
腸柯林斯菌	ABXH02000037
排泄物柯林斯菌	ABXJ01000150
田中氏柯林斯菌	AB490807

叢毛單胞菌科細菌NML000135	JN585335
叢毛單胞菌科細菌NML790751	JN585331
叢毛單胞菌科細菌NML910035	JN585332
叢毛單胞菌科細菌NML910036	JN585333
叢毛單胞菌科細菌口腔分類群F47	HM099651
叢毛單胞菌屬NSP5	AB076850
奎尼氏康曲奉菌	NR_041821
鏈型糞芽孢菌	AB030218
糞芽孢菌屬29_1	ADKX01000057
糞芽孢菌屬D7	ACDT01000199
靈巧糞球菌	EU266552
陪伴糞球菌	ABVR01000038
一致糞球菌	EF031543
糞球菌屬ART55_1	AY350746
紅蝽菌科細菌BV3Ac1	JN809768
紅蝽菌科細菌JC110	CAEM01000062
紅蝽菌科細菌phI	JN837493
擁擠棒狀桿菌	ACGD01000048
產氨棒狀桿菌	ADNS01000011
無枝菌酸棒狀桿菌	ABZU01000033
闌尾棒狀桿菌	NR_028951
銀色棒狀桿菌	EF463055
Corynebacterium atypicum	NR_025540
金色黏液棒狀桿菌	ACLH01000041
牛棒狀桿菌	AF537590
犬棒狀桿菌	GQ871934
乳酪棒狀桿菌	NR_025101

混雜棒狀桿菌	Y15886
科伊爾棒狀桿菌	X96497
白喉棒狀桿菌	NC_002935
硬棒狀桿菌	Z97069
高效棒狀桿菌	ACLI01000121
福氏棒狀桿菌	Y13024
微黃棒狀桿菌	NR_037040
生殖器棒狀桿菌	ACLJ01000031
灰棒狀桿菌	NR_028971
解葡萄糖苷棒狀桿菌	ABYP01000081
麩胺酸棒狀桿菌	BA000036
漢森棒狀桿菌	AM946639
模仿棒狀桿菌	AF537597
傑氏棒狀桿菌	ACYW01000001
克羅彭施泰特氏棒狀桿菌	NR_026380
黃色嗜脂棒狀桿菌	ACHJ01000075
麥氏棒狀桿菌	AB359393
乳腺炎棒狀桿菌	AB359395
馬氏棒狀桿菌	ACSH02000003
微細棒狀桿菌	X82064
產黏棒狀桿菌	NR_026396
丙酸棒狀桿菌	NR_037038
假白喉棒狀桿菌	X84258
假生殖道棒狀桿菌	ABYQ01000237
假結核棒狀桿菌	NR_037070
產丙酮酸棒狀桿菌	FJ185225
腎棒狀桿菌	NR_037069

抗棒狀桿菌	ADGN01000058
裡氏棒狀桿菌	EU848548
模擬棒狀桿菌	AF537604
單側棒狀桿菌	NR_026394
棒狀桿菌屬1 ex綿羊	Y13427
棒狀桿菌屬L_2012475	HE575405
棒狀桿菌屬NML 93_0481	GU238409
棒狀桿菌屬NML 97_0186	GU238411
棒狀桿菌屬NML 99_0018	GU238413
紋帶棒狀桿菌	ACGE01000001
桑氏棒狀桿菌	Y09655
結核硬脂酸棒狀桿菌	ACVP01000009
托氏桿菌棒狀桿菌	AY677186
潰瘍棒狀桿菌	NR_074467
解脲棒狀桿菌	X81913
快速食尿棒狀桿菌	AM397636
可變棒狀桿菌	NR_025314
乾燥棒狀桿菌	FN179330
貝納特氏立克次體	CP000890
丙二酸鹽克羅諾桿菌	GU122174
阪崎克羅諾桿菌	NC_009778
圖列茨克羅諾桿菌	FN543093
銼隱小桿菌	GQ422741
耐金屬貪銅菌	GU230889
解木聚糖噬細胞菌	FR733683
脫鐵桿菌屬口腔殖株JV001	AY349370
脫鐵桿菌屬物種口腔殖株JV006	AY349371

脫鐵桿菌屬物種口腔殖株JV023	AY349372
耐輻射異常球菌	AE000513
異常球菌屬R_43890	FR682752
食酸代爾夫特菌	CP000884
人皮膚桿菌	FJ263375
皮生球菌屬Ellin185	AEIQ01000090
活躍鏈孢子菌	AM940019
鏈孢菌子屬8437	AFHT01000143
弗氏脫硫桿菌	AJ276701
哈氏脫硫桿菌	NR_074996
脫硫球莖菌屬口腔殖株CH031	AY005036
致黑脫硫腸狀菌	NR_044832
脫硫脫硫弧菌	DQ092636
費爾韋德脫硫弧菌	U42221
Desulfovibrio piger	AF192152
脫硫弧菌屬3_1_syn3	ADDR01000239
尋常型脫硫弧菌	NR_074897
渾濁戴阿利斯特菌	ACIM02000001
微好氣戴阿利斯特菌	AFBB01000028
微嗜氣戴阿利斯特菌	AENT01000008
侵肺戴阿利斯特菌	HM596297
產丙酸戴阿利斯特菌	NR_043231
戴阿利斯特菌屬口腔分類群502	GQ422739
嗜琥珀酸戴阿利斯特菌	AB370249
鹼湖迪茨氏菌	GQ870426
迪茨氏菌屬BBDP51	DQ337512
迪茨氏菌屬物種CA149	GQ870422

帝汶迪茨氏菌	GQ870424
產甲酸多爾氏菌	AAXA02000006
長鏈多爾氏菌	AJ132842
嘉德營發酵單胞菌	ADLV01000001
莫斯氏營發酵單胞菌	ADLW01000023
遲鈍愛德華菌	CP002154
遲緩埃格特菌	AF292375
中華埃格特菌	AY321958
埃格特菌屬1_3_56FAA	ACWN01000099
埃格特菌屬物種HGA1	AEXR01000021
埃格特菌屬物種YY7918	AP012211
查菲艾利希體	AAIF01000035
齧蝕艾肯氏菌	ACEA01000028
氣囊棲水菌	ACYI01000081
產氣腸桿菌	AJ251468
阿氏腸桿菌	NR_024640
生癌腸桿菌	Z96078
陰溝腸桿菌	FP929040
考氏腸桿菌	NR_025566
霍氏腸桿菌	AFHR01000079
腸桿菌屬247BMC	HQ122932
腸桿菌屬638	NR_074777
腸桿菌屬物種JC163	JN657217
腸桿菌屬SCSS	HM007811
腸桿菌屬物種TSE38	HM156134
腸桿菌科細菌9_2_54FAA	ADCU01000033
腸桿菌科細菌CF01Ent_1	AJ489826

腸桿菌科細菌Smarlab 3302238	AY538694
鳥腸球菌	AF133535
人糞腸球菌	AY943820
酪黃腸球菌	AEWT01000047
耐久腸球菌	AJ276354
糞腸球菌	AE016830
屎腸球菌	AM157434
鶉雞腸球菌	AB269767
灰黃腸球菌	AY033814
夏威夷腸球菌	AY321377
希氏腸球菌	AF061011
義大利腸球菌	AEPV01000109
蒙氏腸球菌	NR_024906
棉子糖腸球菌	FN600541
腸球菌屬BV2CASA2	JN809766
腸球菌屬物種CCRI_16620	GU457263
腸球菌屬物種F95	FJ463817
腸球菌屬物種RfL6	AJ133478
泰國腸球菌	AY321376
陰道孤獨球菌	AENN01000008
意外丹毒絲菌	NR_025594
豬紅斑丹毒絲菌	ACLK01000021
扁桃體丹毒絲菌	NR_040871
丹毒絲菌科細菌3_1_53	ACTJ01000113
丹毒絲菌科細菌5_2_54FAA	ACZW01000054
艾伯氏大腸桿菌	ABKX01000012
大腸桿菌	NC_008563

弗格森氏大腸桿菌	CU928158
赫爾曼氏大腸桿菌	HQ407266
大腸桿菌屬1_1_43	ACID01000033
大腸桿菌屬4_1_40B	ACDM02000056
大腸桿菌屬物種B4	EU722735
傷口埃希菌	NR_041927
哈爾濱產乙醇桿菌	AY675965
真桿菌科細菌P4P_50 P4	AY207060
巴克氏真桿菌	NR_044661
兩形真桿菌	ABYT01000002
短真桿菌	U13038
布氏真桿菌	NR_024682
卡氏真桿菌	NR_026330
溶纖維素真桿菌	AY178842
扭曲真桿菌	FR749946
產糞甾醇真桿菌	HM037995
圓柱狀真桿菌	FP929041
鏈狀真桿菌	NR_044644
細長真桿菌	L34682
挑剔真桿菌	CP001104
斷鏈真桿菌	FR749935
龐大真桿菌	FR749933
霍氏真桿菌	L34621
嬌弱真桿菌	U13039
淤泥真桿菌	CP002273
串珠狀真桿菌	HF558373
多形真桿菌	NR_024683

產亞硝酸真桿菌	NR_024684
糾纏真桿菌	U13041
細枝真桿菌	AJ011522
直腸真桿菌	FP929042
反芻真桿菌	NR_024661
口臭真桿菌	AB525414
隱枝真桿菌	NR_026031
惰性真桿菌	ABCA03000054
真桿菌屬3_1_31	ACTL01000045
真桿菌屬AS15b	HQ616364
真桿菌屬物種OBRC9	HQ616354
真桿菌屬口腔殖株GI038	AY349374
真桿菌屬物種口腔殖株IR009	AY349376
真桿菌屬物種口腔殖株JH012	AY349373
真桿菌屬物種口腔殖株JI012	AY349379
真桿菌屬物種口腔殖株JN088	AY349377
真桿菌屬物種口腔殖株JS001	AY349378
真桿菌屬物種口腔殖株OH3A	AY947497
真桿菌屬WAL 14571	FJ687606
纖細真桿菌	M59118
多曲真桿菌	NR_044648
凸腹真桿菌	L34421
嗜木聚糖真桿菌	L34628
尤氏真桿菌	AEES01000073
美洲愛文氏菌	JN175329
乙醯微小桿菌	FJ970034
人費克藍姆菌	Y10772

普氏糞桿菌	ACOP02000011
齦溝產線菌	CP002390
絨毛產線菌	NR_041928
大芬戈爾德菌	ACHM02000001
黃桿菌科基因屬C1	AY278614
黃桿菌屬NF2_1	FJ195988
普氏梭桿菌	AY724678
拉氏彎螺菌	AY126479
紅海灣揉桿菌	NR_074881
新兇手法蘭西斯菌	ABSS01000002
蜃樓法蘭西斯氏菌	AY928394
土拉法蘭西斯氏菌	ABAZ01000082
黃腐病菌屬NML 060897	EF589680
犬貓科梭桿菌	AY162222
梭桿菌屬複合群C1	AY278616
梭桿菌屬複合群C2	AY278617
微生子梭桿菌	ACET01000043
死亡梭桿菌	ACDB02000034
舟形梭桿菌	HQ223106
壞疽梭桿菌	X55408
壞死梭桿菌	AM905356
核粒梭桿菌	ADVK01000034
牙周梭桿菌	ACJY01000002
拉氏梭桿菌	NR_044687
梭桿菌屬1_1_41FAA	ADGG01000053
梭桿菌屬11_3_2	ACUO01000052
梭桿菌屬物種12_1B	AGWJ01000070

梭桿菌屬2_1_31	ACDC02000018
梭桿菌屬3_1_27	ADGF01000045
梭桿菌屬3_1_33	ACQE01000178
梭桿菌屬物種3_1_36A2	ACPU01000044
梭桿菌屬物種3_1_5R	ACDD01000078
梭桿菌屬物種AC18	HQ616357
梭桿菌屬物種ACB2	HQ616358
梭桿菌屬物種AS2	HQ616361
梭桿菌屬物種CM1	HQ616371
梭桿菌屬物種CM21	HQ616375
梭桿菌屬物種CM22	HQ616376
梭桿菌屬物種D12	ACDG02000036
梭桿菌屬口腔殖株ASCF06	AY923141
梭桿菌屬物種口腔殖株ASCF11	AY953256
潰瘍梭桿菌	ACDH01000090
變形梭桿菌	ACIE01000009
陰道加德納菌	CP001849
溶血孿生球菌	ACDZ02000012
麻疹孿生球菌	NR_025904
麻疹孿生球菌	ACRX01000010
血孿生球菌	ACRY01000057
孿生球菌屬口腔殖株ASCE02	AY923133
孿生球菌屬物種口腔殖株ASCF04	AY923139
孿生球菌屬物種口腔殖株ASCF12	AY923143
孿生球菌屬WAL 1945J	EU427463
甲酸芽殖菌	GU562446
地桿菌嗜熱地桿菌	NR_074989

地桿菌屬E263	DQ647387
地桿菌屬物種WCH70	CP001638
嗜熱脂肪地桿菌	NR_040794
熱鏈型地桿菌	NR_043020
熱反硝化地桿菌	NR_074976
熱葡萄糖苷地桿菌	NR_043022
食熱油地桿菌	NR_074931
貝米吉格地桿菌	CP001124
無類囊體藍藻	NR_074282
固氮葡糖醋桿菌	NR_028767
內生固氮葡糖醋桿菌	NR_074292
恩氏葡糖醋桿菌	NR_028909
歐洲葡糖醋桿菌	NR_026513
漢森葡糖醋桿菌	NR_026133
約翰尼葡糖醋桿菌	NR_024959
溫馴葡糖醋桿菌	NR_041295
木糖葡糖醋桿菌	NR_074338
支氣管戈登氏菌	NR_027594
食聚異戊二烯戈登氏菌	DQ385609
戈登氏菌屬KTR9	DQ068383
痰液戈登氏菌	FJ536304
土地戈登氏菌	GQ848239
潘蜜拉戈登氏桿菌	AM886059
潘蜜拉戈登氏桿菌	FP929047
耐熱纖細桿菌	NR_043559
福塞蒂黃桿菌	NR_074707
毗鄰顆粒鏈菌	ACKZ01000002

苛養顆粒鏈菌	AB252689
副毗鄰顆粒鏈菌	AY879298
顆粒鏈菌屬M658_99_3	AJ271861
顆粒鏈菌屬口腔殖株ASC02	AY923126
顆粒鏈菌屬物種口腔殖株ASCA05	DQ341469
顆粒鏈菌屬物種口腔殖株ASCB09	AY953251
顆粒鏈菌屬物種口腔殖株ASCG05	AY923146
霍利斯格裡蒙菌	ADAQ01000013
血球桿菌屬BC14248	GU396991
埃及嗜血桿菌	AFBC01000053
杜克雷氏嗜血桿菌	AE017143
嗜血桿菌屬複合群P2口腔殖株MB3_C24	DQ003621
嗜血桿菌屬複合群P3口腔殖株MB3_C38	DQ003635
溶血性嗜血桿菌	JN175335
流感嗜血桿菌	AADP01000001
副溶血嗜血桿菌	GU561425
副流感嗜血桿菌	AEWU01000024
副溶血性嗜沫嗜血桿菌	M75076
副豬嗜血桿菌	GU226366
睡眠嗜血桿菌	NC_008309
嗜血桿菌屬70334	HQ680854
嗜血桿菌屬HK445	FJ685624
嗜血桿菌屬口腔殖株ASCA07	AY923117
嗜血桿菌屬物種口腔殖株ASCG06	AY923147
嗜血桿菌屬物種口腔殖株BJ021	AY005034
嗜血桿菌屬物種口腔殖株BJ095	AY005033
嗜血桿菌屬物種口腔殖株JM053	AY349380

嗜血桿菌屬口腔分類群851	AGRK01000004
唾液嗜血桿菌	AFNK01000005
蜂房哈佛尼亞菌	DQ412565
細長鹽單胞菌	NR_074782
詹森鹽單胞菌	FR775979
解脂鹽紅菌	AB477978
膽型螺桿菌	ACDN01000023
加拿大螺桿菌	ABQS01000108
同性戀螺桿菌	ABQT01000054
幼禽螺桿菌	ABQU01000097
幽門螺桿菌	CP000012
螺桿菌屬物種None	U44756
溫哈門螺桿菌	ACDO01000013
嗜中溫日光桿菌	NR_074517
固氮內生草螺菌	CP002039
草螺菌屬JC206	JN657219
睡眠嗜組織菌	AF549387
纖維狀霍爾德菌	Y11466
食糖厭氧產氫桿菌	NR_044425
丁酸高溫熱菌	CP000493
食磺酸生絲微菌	AY468372
海王生絲單胞菌	NR_074092
印度型依格納季氏菌	HQ823562
依格納季氏菌屬NML 95_0260	HQ823559
冰島燃球菌	X99562
淤泥固氮螺菌	NR_029046
淤泥兩面神菌	NR_026362

甜瓜兩面神菌	EF063716
細長桿菌屬SY12	EF455530
懶惰約翰森菌（Johnsonella ignava）	X87152
Jonquetella anthropi	ACOO02000004
豬腿克斯特氏菌	NR_025669
脫氮金氏桿菌	AEWV01000047
金氏桿菌屬複合群P1口腔殖株MB2_C20	DQ003616
金蝶金氏桿菌	AFHS01000073
口金氏桿菌	ACJW02000005
金氏桿菌屬口腔殖株ID059	AY349381
催產克雷白氏菌	AY292871
肺炎克雷白氏菌	CP000647
克雷白氏菌屬AS10	HQ616362
克雷白氏菌屬物種Co9935	DQ068764
克雷白氏菌屬富集培養殖株SRC_DSD25	HM195210
克雷白氏菌屬物種OBRC7	HQ616353
克雷白氏菌屬SP_BA	FJ999767
克雷白氏菌屬物種SRC_DSD1	GU797254
克雷白氏菌屬物種SRC_DSD11	GU797263
克雷白氏菌屬物種SRC_DSD12	GU797264
克雷白氏菌屬物種SRC_DSD15	GU797267
克雷白氏菌屬物種SRC_DSD2	GU797253
克雷白氏菌屬物種SRC_DSD6	GU797258
變異克雷白氏菌	CP001891
抗壞血酸克呂沃爾菌	NR_028677
棲冷克呂沃爾菌	NR_028803
海考克氏菌	GQ260086

沼澤考克氏菌	EU333884
嗜根考克氏菌	AY030315
玫瑰色考克氏菌	X87756
變異考克氏菌	AF542074
牛毛桿菌	GU324407
多產毛螺菌	FR733699
裂果膠毛螺菌	L14675
毛螺菌科細菌1_1_57FAA	ACTM01000065
毛螺菌科細菌1_4_56FAA	ACTN01000028
毛螺菌科細菌2_1_46FAA	ADLB01000035
毛螺菌科細菌2_1_58FAA	ACTO01000052
毛螺菌科細菌3_1_57FAA_CT1	ACTP01000124
毛螺菌科細菌4_1_37FAA	ADCR01000030
毛螺菌科細菌5_1_57FAA	ACTR01000020
毛螺菌科細菌5_1_63FAA	ACTS01000081
毛螺菌科細菌6_1_63FAA	ACTV01000014
毛螺菌科細菌8_1_57FAA	ACWQ01000079
毛螺菌科細菌9_1_43BFAA	ACTX01000023
毛螺菌科細菌A4	DQ789118
毛螺菌科細菌DJF VP30	EU728771
毛螺菌科細菌ICM62	HQ616401
毛螺菌科細菌MSX33	HQ616384
毛螺菌科細菌口腔分類群107	ADDS01000069
毛螺菌科細菌口腔分類群F15	HM099641
毛螺菌科複合群C1	AY278618
酸魚乳桿菌	NR_024718
嗜酸乳桿菌	CP000033

食品乳桿菌	NR_044701
解澱粉乳桿菌	ADNY01000006
嗜澱粉乳桿菌	CP002338
胃寶乳桿菌	ACLL01000037
短乳桿菌	EU194349
布赫內氏乳桿菌	ACGH01000101
乾酪乳桿菌	CP000423
鏈狀乳桿菌	M23729
人陰道乳桿菌	ACOH01000030
棒狀乳桿菌	NR_044705
捲曲乳桿菌	ACOG01000151
彎曲乳桿菌	NR_042437
戴耳布呂克氏乳桿菌	CP002341
糊精乳桿菌	NR_036861
香腸乳桿菌	NR_044707
發酵乳桿菌	CP002033
加氏乳桿菌	ACOZ01000018
胃乳桿菌	AICN01000060
乳桿菌屬複合群C1	AY278619
乳桿菌屬複合群C2	AY278620
瑞士乳桿菌	ACLM01000202
希氏乳桿菌	ACGP01000200
人乳桿菌	FR681902
惰性乳桿菌	AEKJ01000002
詹氏乳桿菌	ACQD01000066
約氏乳桿菌	AE017198
卡裡乳桿菌	NR_029083

馬乳酒樣乳桿菌	NR_042440
高加索乳桿菌	NR_042230
泡菜乳桿菌	NR_025045
萊希曼氏乳桿菌	JX986966
黏膜乳桿菌	FR693800
鼠乳桿菌	NR_042231
諾登西絲乳桿菌	NR_041629
酒類乳桿菌	NR_043095
口乳桿菌	AEKL01000077
類短乳桿菌	NR_042456
類布氏乳桿菌	NR_041294
副乾酪乳桿菌	ABQV01000067
類高加索乳桿菌	NR_029039
戊糖乳桿菌	JN813103
惡味乳桿菌	NR_029360
植物乳桿菌	ACGZ02000033
腦橋乳桿菌	HM218420
羅伊乳桿菌	ACGW02000012
鼠李糖乳桿菌	ABWJ01000068
羅氏乳桿菌	GU269544
瘤胃乳桿菌	ACGS02000043
清酒乳桿菌	DQ989236
唾液乳桿菌	AEBA01000145
健男乳桿菌（Lactobacillus saniviri）	AB602569
老年乳桿菌	AB602570
乳桿菌屬66c	FR681900
乳桿菌屬物種BT6	HQ616370

乳桿菌屬KLDS 1.0701	EU600905
乳桿菌屬物種KLDS 1.0702	EU600906
乳桿菌屬物種KLDS 1.0703	EU600907
乳桿菌屬物種KLDS 1.0704	EU600908
乳桿菌屬物種KLDS 1.0705	EU600909
乳桿菌屬物種KLDS 1.0707	EU600911
乳桿菌屬物種KLDS 1.0709	EU600913
乳桿菌屬物種KLDS 1.0711	EU600915
乳桿菌屬物種KLDS 1.0712	EU600916
乳桿菌屬物種KLDS 1.0713	EU600917
乳桿菌屬物種KLDS 1.0716	EU600921
乳桿菌屬物種KLDS 1.0718	EU600922
乳桿菌屬物種KLDS 1.0719	EU600923
乳桿菌屬口腔殖株HT002	AY349382
乳桿菌屬物種口腔殖株HT070	AY349383
乳桿菌屬口腔分類群052	GQ422710
臘腸乳桿菌	NR_042194
烏蘭乳桿菌	ACGU01000081
陰道乳桿菌	ACGV01000168
酒乳桿菌	NR_042196
犢乳桿菌	NR_041305
玉米乳桿菌	NR_037122
格氏乳球菌	AF061005
乳酸乳球菌	CP002365
棉子糖乳球菌	NR_044359
長卵形內酯桿菌	DQ100449
香港海鷗型菌	CP001154

奇異勞特羅普氏菌	AEQP01000026
勞特羅普氏菌屬口腔殖株AP009	AY005030
哈開裡軍團菌	M36028
長灘軍團菌	M36029
嗜肺軍團菌	NC_002942
軍團菌屬D3923	JN380999
軍團菌屬物種D4088	JN381012
軍團菌屬物種H63	JF831047
軍團菌屬NML 93L054	GU062706
斯蒂氏軍團菌	HQ398202
格氏勒米諾菌	AJ233421
理氏勒米諾菌	HF558368
博氏鉤端螺旋體	NC_008508
布魯氏鉤端螺旋體	NR_043200
問號鉤端螺旋體	NC_005823
黎氏鉤端螺旋體	EF612284
頰纖發菌	CP001685
纖發菌屬複合群C1	AY278621
古氏纖發菌	ADAD01000110
霍夫氏纖發菌	ACVB02000032
沙氏纖發菌	AY029806
纖發菌屬中性粒細胞減少症患者物種	AF189244
纖發菌屬口腔殖株GT018	AY349384
纖發菌屬物種口腔殖株GT020	AY349385
纖發菌屬物種口腔殖株HE012	AY349386
纖發菌屬物種口腔殖株IK040	AY349387
纖發菌屬口腔殖株P2PB_51 P1	AY207053

纖發菌屬口腔分類群223	GU408547
肉明串珠菌	NR_040811
嗜檸檬酸明串珠菌	AM157444
伴氣明串珠菌	FN822744
仁荷明串珠菌	NR_025204
泡菜明串珠菌	NR_075014
乳酸明串珠菌	NR_040823
腸膜明串珠菌	ACKV01000113
假腸膜明串珠菌	NR_040814
格雷氏李斯特氏菌	ACCR02000003
無毒李斯特氏菌	JF967625
伊氏李斯特氏菌	X56151
單核球增多性李斯特氏菌	CP002003
威氏李斯特氏菌	AM263198
血黃球菌	NR_025507
嗜熱污泥孢菌	NR_041236
梭形離胺酸桿菌	FN397522
球形離胺酸桿菌	NR_074883
溶酪大球菌	NR_074941
溶血曼海姆菌	ACZX01000102
需鉀酸鹽馬文布萊恩特氏菌	AJ505973
馬賽菌屬CCUG 43427A	FR773700
漏斗巨單胞菌	AB300988
超巨巨單胞菌	AJ420107
埃氏巨球型菌	AY038996
巨球型菌屬複合群C1	AY278622
巨球型菌屬複合群類型_1	ADGP01000010

微核巨球形菌	AECS01000020
巨球型菌屬BLPYG_07	HM990964
巨球型菌屬UPII 199_6	AFIJ01000040
勤奮金屬球菌	D26491
甲酸甲烷桿菌	NR_025028
抗酸甲烷短桿菌	NR_028779
嗜樹木甲烷短桿菌	NR_042783
彎曲甲烷短桿菌	NR_044796
表皮甲烷短桿菌	NR_044776
絲狀甲烷短桿菌	NR_044801
哥特甲烷短桿菌	NR_044789
米氏甲烷短桿菌	NR_042785
奧利亞甲烷短桿菌	NR_043024
口腔甲烷桿菌	HE654003
反芻動物甲烷短桿菌	NR_042784
史密斯甲烷短桿菌	ABYV02000002
索氏甲烷短桿菌	NR_044787
韋氏甲烷短桿菌	NR_044788
沃爾氏甲烷短桿菌	NR_044790
斯氏甲烷球形菌	AY196684
扭脫甲基桿菌	NC_010172
足甲基桿菌	AY468363
耐輻射甲基桿菌	GU294320
甲基桿菌屬1sub	AY468371
甲基桿菌屬物種MM4	AY468370
森林甲基細胞菌	NR_074237
嗜甲基菌屬ECd5	AY436794

巧克力微桿菌	NR_037045
黃色微桿菌	EU714363
古本微桿菌	NR_025098
乳酸微桿菌	EU714351
食油微桿菌	EU714381
氧化微桿菌	EU714348
副氧化微桿菌	AJ491806
葉球形微桿菌	EU714359
雪萊微桿菌	NR_044936
微桿菌屬768	EU714378
微桿菌屬口腔菌株C24KA	AF287752
磚紅色微桿菌	EU714365
南極微球菌	NR_025285
藤黃微球菌	NR_075062
里拉微球菌	NR_026200
微球菌屬185	EU714334
銅綠微囊藻	NC_010296
賈氏光岡菌	NR_028840
多酸光岡菌	ABWK02000005
光岡菌屬口腔分類群521	GU413658
光岡菌屬口腔分類群G68	GU432166
柯氏動彎桿菌	AEPZ01000013
羞怯動彎桿菌	ACKW01000035
威斯康辛米勒氏菌	JN175344
分生艱難桿菌	NR_027191
難養艱難桿菌	NR_027203
短小艱難桿菌	NR_028608

膽怯鞭難桿菌	Z36296
柔膜細菌pACH93	AY297808
熱醋莫爾氏菌	NR_075001
卡他莫拉菌	CP002005
林肯莫拉菌	FR822735
奧斯陸莫拉菌	JN175341
莫拉菌屬16285	JF682466
莫拉菌屬GM2	JF837191
摩根摩根氏菌	AJ301681
摩根氏菌屬JB_T16	AJ781005
腦桑椹狀球菌	JN175352
莫亞拉產吲哚菌	AF527773
膿腫分枝桿菌	AGQU01000002
非洲分枝桿菌	AF480605
Mycobacterium alsiensis	AJ938169
鳥分枝桿菌	CP000479
龜分枝桿菌	AB548610
哥倫比亞分枝桿菌	AM062764
象皮病分枝桿菌	AF385898
戈登分枝桿菌	GU142930
胞內分枝桿菌	GQ153276
堪薩斯分枝桿菌	AF480601
拉克絲分枝桿菌	NR_025175
麻風分枝桿菌	FM211192
彌漫型麻風分枝桿菌	EU203590
麥氏分枝桿菌	FR798914
曼氏分枝桿菌	FJ042897

海分枝桿菌	NC_010612
田鼠分枝桿菌	NR_025234
新金分枝桿菌	AF268445
副瘰鬚分枝桿菌	ADNV01000350
副土分枝桿菌	EU919229
草分枝桿菌	GU142920
恥垢分枝桿菌	DQ536403
包皮垢分枝桿菌	CP000480
分枝桿菌屬1761	EU703150
分枝桿菌屬物種1776	EU703152
分枝桿菌屬物種1781	EU703147
分枝桿菌屬物種1791	EU703148
分枝桿菌屬物種1797	EU703149
分枝桿菌屬AQ1GA4	HM210417
分枝桿菌屬物種B10_07.09.0206	HQ174245
分枝桿菌屬物種GN_10546	FJ497243
分枝桿菌屬物種GN_10827	FJ497247
分枝桿菌屬物種GN_11124	FJ652846
分枝桿菌屬物種GN_9188	FJ497240
分枝桿菌屬物種GR_2007_210	FJ555538
分枝桿菌屬物種HE5	AJ012738
分枝桿菌屬物種NLA001000736	HM627011
分枝桿菌屬W	DQ437715
結核分枝桿菌	CP001658
潰瘍分枝桿菌	AB548725
脆弱分枝桿菌	EU834055
無乳支原體	AF010477

兩形支原體	AY531656
關節炎支原體	NC_011025
牛眼支原體	NR_025987
咽支原體	NR_024983
發酵支原體	CP002458
絮狀支原體	X62699
生殖器支原體	L43967
人型支原體	AF443616
口腔支原體	AY796060
綿羊肺炎支原體	NR_025989
穿透支原體	NC_004432
肺炎支原體	NC_000912
腐敗支原體	U26055
唾液支原體	M24661
支原體科複合群P1口腔殖株MB1_G23	DQ003614
香味類香菌	NR_042354
類香味菌屬MY15	GU253339
桿狀奈瑟菌	AFAY01000058
灰色奈瑟菌	ACDY01000037
長形奈瑟菌	ADBF01000003
淺黃奈瑟菌	ACQV01000025
奈瑟菌屬複合群P2口腔殖株MB5_P15	DQ003630
淋病奈瑟菌	CP002440
乳糖奈瑟菌	ACEQ01000095
獼猴奈瑟菌	AFQE01000146
腦膜炎奈瑟菌	NC_003112
黏膜奈瑟菌	ACDX01000110

咽奈瑟菌	AJ239281
多糖奈瑟菌	ADBE01000137
乾燥奈瑟菌	ACKO02000016
奈瑟菌屬KEM232	GQ203291
奈瑟菌屬口腔殖株AP132	AY005027
奈瑟菌屬物種口腔殖株JC012	AY349388
奈瑟菌屬口腔菌株B33KA	AY005028
奈瑟菌屬口腔分類群014	ADEA01000039
奈瑟菌屬物種SMC_A9199	FJ763637
奈瑟菌屬物種TM10_1	DQ279352
淡黃色奈瑟菌	ACEO01000067
裡氏新立克次氏體	CP001431
腺熱新立克次氏體	NC_007798
巴西諾卡菌	AIHV01000038
蓋爾森基興諾卡菌	HQ009486
皮疽諾卡菌	NC_006361
膿性諾卡菌	NR_028994
諾卡菌屬01_Je_025	GU574059
達松維爾類諾卡菌	CP002041
食芳烴新鞘胺醇菌	AAAV03000008
卡尼海洋桿菌	NR_041533
海洋桿菌屬Ndiop	CAER01000083
人蒼白桿菌	NC_009667
中間蒼白桿菌	ACQA01000001
假中間蒼白桿菌	DQ365921
紋臭桿菌	AB490805
內臟臭桿菌	CP002544

奧卡德拉胃球菌	HQ699465
解脲寡源桿菌	NR_041998
尿道寡源桿菌	NR_041753
奧爾森菌屬複合群C1	AY278623
普惠生奧爾森菌	FN178466
奧爾森菌屬F0004	EU592964
奧爾森菌屬口腔分類群809	ACVE01000002
烏氏奧爾森菌	CP002106
土豐佑菌	NR_074978
鼻竇口腔桿菌	ACKX01000142
口腔桿菌屬ACB1	HM120210
口腔桿菌屬物種ACB7	HM120211
口腔桿菌屬物種CM12	HQ616374
口腔桿菌屬物種ICM51	HQ616397
口腔桿菌屬物種OBRC12	HQ616355
口腔桿菌屬口腔分類群078	ACIQ02000009
口腔桿菌屬物種口腔分類群102	GQ422713
口腔桿菌屬物種口腔分類群108	AFIH01000001
恙蟲病東方體	AP008981
巴伐利亞鳥胺酸桿菌	NR_044923
鳥胺酸桿菌屬7_10AIA	FN397526
顫桿菌屬G2	HM626173
產戊酸顫桿菌	NR_074793
克魯斯顫螺菌	AB040495
產甲酸草酸桿菌	ACDQ01000020
巴賽隆納類芽孢桿菌	NR_042272
巴倫葛茲類芽孢桿菌	NR_042756

千葉類芽孢桿菌	NR_040885
庫氏類芽孢桿菌	NR_025372
堅韌類芽孢桿菌	NR_037017
解葡聚糖類芽孢桿菌	D78470
乳酸類芽孢桿菌	NR_025739
燦爛類芽孢桿菌	NR_040882
飼料類芽孢桿菌	NR_040853
多黏類芽孢桿菌	NR_037006
金龜子類芽孢桿菌	NR_040888
類芽孢桿菌屬CIP 101062	HM212646
類芽孢桿菌屬HGF5	AEXS01000095
類芽孢桿菌屬物種HGF7	AFDH01000147
類芽孢桿菌屬物種JC66	JF824808
類芽孢桿菌屬口腔分類群F45	HM099647
類芽孢桿菌屬物種R_27413	HE586333
類芽孢桿菌屬物種R_27422	HE586338
蒂蒙氏類芽孢桿菌	NR_042844
成團泛菌	AY335552
鳳梨泛菌	CP001875
布氏泛菌	EU216735
檸檬泛菌	EF688008
不平常泛菌	EU216737
敗血泛菌	EU216734
食肉桿酸乳頭桿菌	NR_025025
狄氏副擬桿菌	CP000140
古氏副擬桿菌	AY974070
戈登氏副擬桿菌	AB470344

約氏副擬桿菌	ABYH01000014
屎副擬桿菌	EU136685
副擬桿菌屬D13	ACPW01000017
副擬桿菌屬物種NS31_3	JN029805
副衣原體屬UWE25	BX908798
反硝化副球菌	CP000490
馬氏副球菌	NR_044922
克拉副普雷沃菌	AFFY01000068
嗜木聚糖副普雷沃菌	AFBR01000011
居齒副斯卡爾維氏菌	ADEB01000020
人排泄物副薩特氏菌	AFBP01000029
次要副薩特氏菌	AB491209
微小微單胞菌	AB729072
微單胞菌屬口腔分類群110	AFII01000002
貝氏巴氏桿菌	L06088
咬傷巴氏桿菌	ACZR01000003
多殺性巴氏桿菌	NC_002663
乳酸片球菌	ACXB01000026
戊糖片球菌	NR_075052
黑色消化球菌	NR_029221
消化球菌屬口腔殖株JM048	AY349389
消化球菌屬口腔分類群167	GQ422727
不解糖嗜胨菌	D14145
杜爾丹尼氏嗜胨菌	EU526290
海氏嗜胨菌	NR_026358
吲哚嗜胨菌	AY153431
艾弗嗜胨菌	Y07840

淚腺嗜胰菌	ADDO01000050
嗜胰菌屬gpac007	AM176517
嗜胰菌屬物種gpac018A	AM176519
嗜胰菌屬物種gpac077	AM176527
嗜胰菌屬物種gpac148	AM176535
嗜胰菌屬物種JC140	JF824803
嗜胰菌屬口腔分類群386	ADCS01000031
嗜胰菌屬物種口腔分類群836	AEAA01000090
消化鏈球菌科細菌ph1	JN837495
厭氧消化鏈球菌	AY326462
微小消化鏈球菌	AM176538
消化鏈球菌屬9succ1	X90471
消化鏈球菌屬口腔殖株AP24	AB175072
消化鏈球菌屬物種口腔殖株FJ023	AY349390
消化鏈球菌屬P4P_31 P3	AY207059
口炎消化鏈球菌	ADGQ01000048
屎考拉桿菌	NR_026111
考拉桿菌屬YIT 12068	AB490812
琥珀酸考拉桿菌	AB490811
Phenylobacterium zucineum	AY628697
非共生光桿菌	Z76752
Pigmentiphaga daeguensi	JN585327
韓國遊動微菌	NR_025011
類志賀毗鄰單胞菌	X60418
卟啉單胞菌科細菌NML 060648	EF184292
不解糖卟啉單胞菌	AENO01000048
牙髓卟啉單胞菌	ACNN01000021

牙齦卟啉單胞菌	AE015924
利氏卟啉單胞菌	NR_025907
獼猴卟啉單胞菌	NR_025908
索拉卟啉單胞菌	AB547667
卟啉單胞菌屬口腔殖株BB134	AY005068
卟啉單胞菌屬物種口腔殖株F016	AY005069
卟啉單胞菌屬口腔殖株P2PB_52 P1	AY207054
卟啉單胞菌屬物種口腔殖株P4GB_100 P2	AY207057
卟啉單胞菌屬UQD 301	EU012301
上野卟啉單胞菌	ACLR01000152
阿爾伯斯普雷沃菌	NR_025300
安氏普雷沃菌	AB547670
伯氏普雷沃菌	ACKS01000100
二路普雷沃菌	ADFO01000096
短雷沃菌	NR_041954
頰普雷沃菌	ACRB01000001
口頰普雷沃菌	JN867261
糞便普雷沃菌	ACBX02000014
人體普雷沃菌	L16465
牙普雷沃菌	AB547678
棲牙普雷沃菌	CP002589
解糖胨普雷沃菌	AEDO01000026
普雷沃菌屬複合群C1	AY278624
普雷沃菌屬複合群C2	AY278625
普雷沃菌屬複合群P7口腔殖株MB2_P31	DQ003620
普雷沃菌屬複合群P8口腔殖株MB3_P13	DQ003622
普雷沃菌屬複合群P9口腔殖株MB7_G16	DQ003633

解肝素普雷沃菌	GQ422742
棲組織普雷沃菌	JN867315
中間普雷沃菌	AF414829
洛氏普雷沃菌	JN867231
斑狀普雷沃菌	AGEK01000035
馬氏普雷沃菌	AEEI01000070
產黑色素普雷沃菌	CP002122
彩虹普雷沃菌	AGWK01000061
多形普雷沃菌	AEWX01000054
食多糖普雷沃菌	AFJE01000016
南錫普雷沃菌	JN867228
變黑普雷沃菌	AFPX01000069
口腔普雷沃菌	AEPE01000021
口普雷沃菌	ADDV01000091
齦炎普雷沃菌	L16472
蒼白普雷沃菌	AFPY01000135
棲瘤胃普雷沃菌	CP002006
唾液普雷沃菌	AB108826
普雷沃菌屬BI_42	AJ581354
普雷沃菌屬物種CM38	HQ610181
普雷沃菌屬物種ICM1	HQ616385
普雷沃菌屬物種ICM55	HQ616399
普雷沃菌屬JCM 6330	AB547699
普雷沃菌屬口腔殖株AA020	AY005057
普雷沃菌屬物種口腔殖株ASCG10	AY923148
普雷沃菌屬物種口腔殖株ASCG12	DQ272511
普雷沃菌屬物種口腔殖株AU069	AY005062

普雷沃菌屬物種口腔殖株CY006	AY005063
普雷沃菌屬物種口腔殖株DA058	AY005065
普雷沃菌屬物種口腔殖株FL019	AY349392
普雷沃菌屬物種口腔殖株FU048	AY349393
普雷沃菌屬物種口腔殖株FW035	AY349394
普雷沃菌屬物種口腔殖株GI030	AY349395
普雷沃菌屬物種口腔殖株GI032	AY349396
普雷沃菌屬物種口腔殖株GI059	AY349397
普雷沃菌屬物種口腔殖株GU027	AY349398
普雷沃菌屬物種口腔殖株HF050	AY349399
普雷沃菌屬物種口腔殖株ID019	AY349400
普雷沃菌屬物種口腔殖株IDR_CEC_0055	AY550997
普雷沃菌屬物種口腔殖株IK053	AY349401
普雷沃菌屬物種口腔殖株IK062	AY349402
普雷沃菌屬口腔殖株P4PB_83 P2	AY207050
普雷沃菌屬口腔分類群292	GQ422735
普雷沃菌屬物種口腔分類群299	ACWZ01000026
普雷沃菌屬物種口腔分類群300	GU409549
普雷沃菌屬物種口腔分類群302	ACZK01000043
普雷沃菌屬物種口腔分類群310	GQ422737
普雷沃菌屬物種口腔分類群317	ACQH01000158
普雷沃菌屬物種口腔分類群472	ACZS01000106
普雷沃菌屬物種口腔分類群781	GQ422744
普雷沃菌屬物種口腔分類群782	GQ422745
普雷沃菌屬口腔分類群F68	HM099652
普雷沃菌屬物種口腔分類群G60	GU432133
普雷沃菌屬物種口腔分類群G70	GU432179

普雷沃菌屬物種口腔分類群G71	GU432180
普雷沃菌屬物種SEQ053	JN867222
普雷沃菌屬物種SEQ065	JN867234
普雷沃菌屬物種SEQ072	JN867238
普雷沃菌屬物種SEQ116	JN867246
普雷沃菌屬物種SG12	GU561343
普雷沃菌屬物種sp24	AB003384
普雷沃菌屬物種sp34	AB003385
糞普雷沃菌	AB244774
譚氏普雷沃菌	ACIJ02000018
蒂蒙斯普雷沃菌	ADEF01000012
真口普雷沃菌	ACVA01000027
空腸普雷沃菌、桔紅色普雷沃菌、巴羅尼亞普雷沃菌、科羅納普雷沃菌、人體普雷沃菌、齒狀普雷沃菌、埃諾普雷沃菌、福氏普雷沃菌、深黑色普雷沃菌、解肝素普雷沃菌、洛氏普雷沃菌、食多糖普雷沃菌、南錫普雷沃菌、米普雷沃菌、帕拉迪普雷沃菌、胸膜炎普雷沃菌、棲瘤胃普雷沃菌、解糖普雷沃菌、靶心普雷沃菌、沙氏普雷沃菌、動膠普雷沃菌	
普雷沃菌科細菌P4P_62 P1	AY207061
海洋原綠球藻	CP000551
丙酸桿菌科細菌NML 02_0265	EF599122
產丙酸丙酸桿菌	NC_019395
痤瘡丙酸桿菌	ADJM01000010
貪婪丙酸桿菌	AJ003055
費氏丙酸桿菌	NR_036972
顆粒丙酸桿菌	FJ785716

詹森丙酸桿菌	NR_042269
丙酸丙酸桿菌	NR_025277
丙酸桿菌屬434_HC2	AFIL01000035
丙酸桿菌屬物種H456	AB177643
丙酸桿菌屬LG	AY354921
丙酸桿菌屬口腔分類群192	GQ422728
丙酸桿菌屬物種S555a	AB264622
特恩氏丙酸桿菌	NR_042270
奇異變形桿菌	ACLE01000013
羽狀變形桿菌	ABVP01000020
變形桿菌屬HS7514	DQ512963
普通變形桿菌	AJ233425
產鹼普羅威登斯菌	ABXW01000071
雷氏普羅威登斯菌	AM040492
拉氏普羅威登斯菌	AM040489
斯氏普羅威登斯菌	AF008581
帝蒙氏假棍狀菌	FJ375951
假毛蘚菌	AY136666
銅綠假單胞菌	AABQ07000001
螢光假單胞菌	AY622220
蓋氏假單胞菌	FJ943496
門多薩假單胞菌	AAUL01000021
蒙氏假單胞菌	NR_024910
草假單胞菌	GU188951
類產鹼假單胞菌	NR_037000
惡臭假單胞菌	AF094741
假單胞菌屬2_1_26	ACWU01000257

假單胞菌屬G1229	DQ910482
假單胞菌屬物種NP522b	EU723211
施氏假單胞菌	AM905854
托拉假單胞菌	AF320988
綠黃假單胞菌	NR_042764
非解乳糖假枝桿菌	AB036759
北極嗜冷桿菌	CP000082
養料嗜冷桿菌	HQ698586
鹽晶嗜冷桿菌	CP000323
冀嗜冷桿菌	HQ698566
海雪嗜冷桿菌	HQ698587
肺炎嗜冷桿菌	HQ698582
嗜冷桿菌屬13983	HM212668
魚腥味錐形桿菌（Pyramidobacter piscolens）	AY207056
皮氏羅爾斯通氏菌	NC_010682
羅爾斯通氏菌屬5_7_47FAA	ACUF01000076
解烏胺酸拉烏爾菌	AB364958
植生拉烏爾菌	AF129443
土生拉烏爾菌	NR_037085
紅桿菌屬口腔分類群C30	HM099648
球形紅桿菌	CP000144
類棒狀紅球菌屬	X80615
馬紅球菌	ADNW01000058
紅串紅球菌	ACNO01000030
聚集紅球菌	NR_037021
沼澤紅假單胞菌	CP000301
小蛛立克次氏體	CP000847

康氏立克次氏體	AE008647
普氏立克次氏體	M21789
立克氏立克次氏體	NC_010263
斯洛伐克立克次氏體	L36224
地方性斑疹傷寒立克次氏體	AE017197
Robinsoniella peoriensis	AF445258
盲腸羅斯拜瑞氏菌	GU233441
糞羅斯拜瑞氏菌	AY804149
糞便羅斯拜瑞氏菌	AY305310
人羅斯拜瑞氏菌	AJ270482
腸道羅斯拜瑞氏菌	FP929050
食菊糖羅斯拜瑞氏菌	AJ270473
羅斯拜瑞氏菌屬11SE37	FM954975
羅斯拜瑞氏菌屬物種11SE38	FM954976
光合玫瑰菌	CP000804
頸玫瑰單胞菌	ADVL01000363
黏膜玫瑰單胞菌	NR_028857
玫瑰單胞菌屬NML94_0193	AF533357
玫瑰單胞菌屬物種NML97_0121	AF533359
玫瑰單胞菌屬物種NML98_0009	AF533358
玫瑰單胞菌屬物種NML98_0157	AF533360
天空羅氏菌	DQ673320
齲齒羅氏菌	ADDW01000024
黏滑羅氏菌	ACVO01000020
鼠鼻羅氏菌	NR_025310
羅氏菌屬口腔分類群188	GU470892
嗜澱粉反芻桿菌	NR_026450

瘤胃球菌科細菌D16	ADDX01000083
白色瘤胃球菌	AY445600
布氏瘤胃球菌	EU266549
伶俐瘤胃球菌	NR_029160
Ruminococcus champanellensis	FP929052
生黃瘤胃球菌	NR_025931
活潑瘤胃球菌	X94967
漢森瘤胃球菌	M59114
乳酸瘤胃球菌	ABOU02000049
卵瘤胃球菌	AY169419
瘤胃球菌屬18P13	AJ515913
瘤胃球菌屬物種5_1_39BFAA	ACII01000172
瘤胃球菌屬物種9SE51	FM954974
瘤胃球菌屬物種ID8	AY960564
瘤胃球菌屬物種K_1	AB222208
扭鏈瘤胃球菌	AAVP02000002
綠色糖單胞菌	X54286
邦戈爾沙門氏菌	NR_041699
腸炎沙門氏菌	NC_011149
腸炎沙門氏菌	NC_011205
腸炎沙門氏菌	DQ344532
腸炎沙門氏菌	ABEH02000004
腸炎沙門氏菌	ABAK02000001
腸炎沙門氏菌	NC_011080
腸炎沙門氏菌	EU118094
腸炎沙門氏菌	NC_011094
腸炎沙門氏菌	AE014613

腸炎沙門氏菌	ABFH02000001
腸炎沙門氏菌	ABEM01000001
腸炎沙門氏菌	ABAM02000001
鼠傷寒沙門氏菌	DQ344533
鼠傷寒沙門氏菌	AF170176
胃八迭球菌	NR_026146
罕見斯卡多維氏菌	AB029087
韋格斯卡多維氏菌	AY278626
圓形慢反應脂肪酸菌	CP001958
褶皺慢反應脂肪酸菌	ACZI01000025
蛛形月形單胞菌	HM596274
魚月形單胞菌	GQ422719
福氏月形單胞菌	AF287803
月形單胞菌屬複合群C1	AY278627
月形單胞菌屬複合群C2	AY278628
月形單胞菌屬複合群P5	AY341820
月形單胞菌屬複合群P6口腔殖株MB3_C41	DQ003636
月形單胞菌屬複合群P7口腔殖株MB5_C08	DQ003627
月形單胞菌屬複合群P8口腔殖株MB5_P06	DQ003628
損傷新月形單胞菌	AF287802
有害月形單胞菌	GU470909
反芻動物月形單胞菌	NR_075026
月形單胞菌屬FOBRC9	HQ616378
月形單胞菌屬口腔殖株FT050	AY349403
月形單胞菌屬物種口腔殖株GI064	AY349404
月形單胞菌屬物種口腔殖株GT010	AY349405
月形單胞菌屬物種口腔殖株HU051	AY349406

月形單胞菌屬物種口腔殖株IK004	AY349407
月形單胞菌屬物種口腔殖株IQ048	AY349408
月形單胞菌屬物種口腔殖株JI021	AY349409
月形單胞菌屬物種口腔殖株JS031	AY349410
月形單胞菌屬物種口腔殖株OH4A	AY947498
月形單胞菌屬口腔殖株P2PA_80 P4	AY207052
月形單胞菌屬口腔分類群137	AENV01000007
月形單胞菌屬物種口腔分類群149	AEEJ01000007
生痰月形單胞菌	ACKP02000033
居泉沙雷菌	NR_025339
液化沙雷菌	NR_042062
黏質沙雷菌	GU826157
臭味沙雷菌	ADBY01000001
變形班沙雷菌	AAUN01000015
腐敗希瓦菌	CP002457
波伊德氏志賀氏菌	AAKA01000007
痢疾志賀氏菌	NC_007606
福氏志賀氏菌	AE005674
宋內志賀氏菌	NC_007384
衛星肖特沃思氏菌	ACIP02000004
肖特沃思氏菌屬MSX8B	HQ616383
肖特沃思氏菌屬口腔分類群G69	GU432167
米氏西蒙斯菌	ADCY01000105
產雌馬酚斯奈克氏菌	EU377663
弱生斯奈克氏菌	ACUX01000029
犬糞斯奈克氏菌	NR_042220
還原天芥菜鹼斯奈克氏菌	NR_074439

異黃酮化合物斯奈克氏菌	AB566418
梨形斯奈克氏菌	AB490806
斯奈克氏菌屬NATTS	AB505075
莫氏細小桿菌	AECQ01000039
糞鞘胺醇桿菌	NR_025537
水氏鞘胺醇桿菌	JF708889
多食鞘胺醇桿菌	NR_040953
食神鞘胺醇桿菌	ACHA02000013
刺狀鞘胺醇單胞菌	NR_024700
鞘胺醇單胞菌屬口腔殖株FI012	AY349411
鞘胺醇單胞菌屬物種口腔殖株FZ016	AY349412
鞘胺醇單胞菌屬口腔分類群A09	HM099639
鞘胺醇單胞菌屬物種口腔分類群F71	HM099645
阿拉斯加鞘胺醇盒菌	CP000356
異常螺原體屬	NR_025705
白蟻生孢菌	NR_044972
菊糖芽孢乳桿菌	NR_040962
中山芽孢桿菌	NR_042247
新約克芽胞八迭球菌	AFPZ01000142
芽胞八迭球菌屬2681	GU994081
葡萄球菌科細菌NML 92_0017	AY841362
金黃色葡萄球菌	CP002643
耳葡萄球菌	JQ624774
頭狀葡萄球菌	ACFR01000029
山羊葡萄球菌	ACRH01000033
肉葡萄球菌	NR_075003
科氏葡萄球菌	JN175375

香料葡萄球菌	NR_029345
表皮葡萄球菌	ACHE01000056
馬胃葡萄球菌	NR_027520
弗氏葡萄球菌	NR_041326
溶血性葡萄球菌	NC_007168
人葡萄球菌	AM157418
路鄧葡萄球菌	AEQA01000024
巴氏葡萄球菌	FJ189773
假中間葡萄球菌	CP002439
解糖葡萄球菌	NR_029158
腐生性葡萄球菌	NC_007350
松鼠葡萄球菌	NR_025520
葡萄球菌屬殖株bottae7	AF467424
葡萄球菌屬H292	AB177642
葡萄球菌屬物種H780	AB177644
琥珀酸葡萄球菌	NR_028667
小牛葡萄球菌	NR_024670
瓦氏葡萄球菌	ACPZ01000009
木糖葡萄球菌	AY395016
嗜麥芽寡養單胞菌	AAVZ01000005
寡養單胞菌屬FG_6	EF017810
念珠狀鏈桿菌	NR_027615
無乳鏈球菌	AAJO01000130
非解乳鏈球菌	NR_041781
咽峽炎鏈球菌	AECT01000011
澳大利亞鏈球菌	AEQR01000024
牛鏈球菌	AEEL01000030

犬鏈球菌	AJ413203
星座鏈球菌	AY277942
脊鏈球菌	AEVC01000028
道恩鏈球菌	AEKN01000002
停乳鏈球菌	AP010935
馬鏈球菌	CP001129
馬腸鏈球菌	AEVB01000043
解沒食子酸鏈球菌	FR824043
鏈球菌屬複合群C1	AY278629
鏈球菌屬複合群C2	AY278630
鏈球菌屬複合群C3	AY278631
鏈球菌屬複合群C4	AY278632
鏈球菌屬複合群C5	AY278633
鏈球菌屬複合群C6	AY278634
鏈球菌屬複合群C7	AY278635
鏈球菌屬複合群C8	AY278609
戈登氏鏈球菌	NC_009785
小兒鏈球菌	ABJK02000017
嬰兒鏈球菌	AFNN01000024
中間鏈球菌	NR_028736
巴黎鏈球菌	NR_037096
馬賽鏈球菌	AY769997
米勒鏈球菌	X81023
緩症鏈球菌	AM157420
突變鏈球菌	AP010655
寡發酵鏈球菌	AY099095
口腔鏈球菌	ADMV01000001

副血鏈球菌	AEKM01000012
巴氏鏈球菌	AP012054
泛口腔鏈球菌	AEVF01000016
肺炎鏈球菌	AE008537
豕鏈球菌	EF121439
假性肺炎鏈球菌	FJ827123
假豕鏈球菌	AENS01000003
釀膿鏈球菌	AE006496
鼠鏈球菌	X58304
唾液鏈球菌	AGBV01000001
血鏈球菌	NR_074974
中華鏈球菌	AF432857
鏈球菌屬16362	JN590019
鏈球菌屬2_1_36FAA	ACOI01000028
鏈球菌屬2285_97	AJ131965
鏈球菌屬物種69130	X78825
鏈球菌屬物種AC15	HQ616356
鏈球菌屬物種ACS2	HQ616360
鏈球菌屬物種AS20	HQ616366
鏈球菌屬物種BS35a	HQ616369
鏈球菌屬物種C150	ACRI01000045
鏈球菌屬物種CM6	HQ616372
鏈球菌屬物種CM7	HQ616373
鏈球菌屬物種ICM10	HQ616389
鏈球菌屬物種ICM12	HQ616390
鏈球菌屬物種ICM2	HQ616386
鏈球菌屬物種ICM4	HQ616387

鏈球菌屬物種ICM45	HQ616394
鏈球菌屬物種M143	ACRK01000025
鏈球菌屬物種M334	ACRL01000052
鏈球菌屬物種OBRC6	HQ616352
鏈球菌屬物種口腔殖株ASB02	AY923121
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCA03	DQ272504
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCA04	AY923116
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCA09	AY923119
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCB04	AY923123
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCB06	AY923124
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCC04	AY923127
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCC05	AY923128
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCC12	DQ272507
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCD01	AY923129
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCD09	AY923130
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCD10	DQ272509
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCE03	AY923134
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCE04	AY953253
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCE05	DQ272510
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCE06	AY923135
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCE09	AY923136
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCE10	AY923137
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCE12	AY923138
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCF05	AY923140
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCF07	AY953255
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCF09	AY923142
鏈球菌屬物種口腔殖株ASCG04	AY923145

鏈球菌屬物種口腔殖株BW009	AY005042
鏈球菌屬物種口腔殖株CH016	AY005044
鏈球菌屬物種口腔殖株GK051	AY349413
鏈球菌屬物種口腔殖株GM006	AY349414
鏈球菌屬口腔殖株P2PA_41 P2	AY207051
鏈球菌屬物種口腔殖株P4PA_30 P4	AY207064
鏈球菌屬口腔分類群071	AEEP01000019
鏈球菌屬口腔分類群G59	GU432132
鏈球菌屬物種口腔分類群G62	GU432146
鏈球菌屬物種口腔分類群G63	GU432150
鏈球菌屬物種SHV515	Y07601
豬鏈球菌	FM252032
嗜熱鏈球菌	CP000419
乳房鏈球菌	HQ391900
尿鏈球菌	DQ303194
前庭鏈球菌	AEKO01000008
綠色鏈球菌	AF076036
白色鏈黴菌	AJ697941
灰鏈黴菌	NR_074787
鏈黴菌屬1 AIP_2009	FJ176782
鏈黴菌屬SD 511	EU544231
鏈黴菌屬物種SD 524	EU544234
鏈黴菌屬物種SD 528	EU544233
鏈黴菌屬物種SD 534	EU544232
嗜熱鏈黴菌	NR_027616
變異罕見小球菌	AJ518869
希佩氏琥鉑酸單胞菌	AEVO01000027

莫比利尼薩特菌	AJ832129
帕維魯布拉柴維爾特菌	AB300989
血根薩特菌	AJ748647
薩特菌屬YIT 12072	AB491210
犬糞薩特菌	NR_025600
華德薩特菌	ADMF01000048
互養菌屬複合群C1	AY278615
互養菌屬RMA 14551	DQ412722
互養菌門細菌ADV897	GQ258968
互養菌門細菌LBVCM1157	GQ258969
互養菌門細菌口腔分類群362	GU410752
互養菌門細菌口腔分類群D48	GU430992
蔗糖互營鏈球菌	NR_036869
互營單胞菌科複合群P1	AY341821
福賽斯坦納菌	CP003191
坦納菌屬6_1_58FAA_CT1	ACWX01000068
麥克達德埃特洛克菌	M36032
痰塔特姆氏菌	NR_025342
四球菌屬口腔分類群F04	HM099640
嗜鹽四聯球菌	NR_075020
韓國四聯球菌	NR_043113
假乙醇熱厭氧桿菌	CP000924
嗜熱放線菌	NC_007333
花葵中慢升根瘤菌	X14835
水棲熱菌	NR_025900
極尖泰氏菌	NR_044860
關島特布林西菌	AY373830

牙密螺旋體	ADEC01000002
密螺旋體複合群P1	AY341822
密螺旋體複合群P4口腔殖株MB2_G19	DQ003618
密螺旋體複合群P5口腔殖株MB3_P23	DQ003624
密螺旋體複合群P6口腔殖株MB4_G11	DQ003625
解卵磷脂密螺旋體	NR_026247
梅毒螺旋體	CP001752
微小密螺旋體	AF302937
潰蝕齒密螺旋體	AEFH01000172
惡臭密螺旋體	AJ543428
曲折密螺旋體	AF426101
索氏密螺旋體	NR_024868
密螺旋體屬6:H:D15A_4	AY005083
密螺旋體屬殖株DDKL_4	Y08894
密螺旋體屬口腔殖株JU025	AY349417
密螺旋體屬物種口腔殖株JU031	AY349416
密螺旋體屬口腔殖株P2PB_53 P3	AY207055
密螺旋體屬口腔分類群228	GU408580
密螺旋體屬物種口腔分類群230	GU408603
密螺旋體屬物種口腔分類群231	GU408631
密螺旋體屬物種口腔分類群232	GU408646
密螺旋體屬物種口腔分類群235	GU408673
密螺旋體屬物種口腔分類群239	GU408738
密螺旋體屬物種口腔分類群247	GU408748
密螺旋體屬物種口腔分類群250	GU408776
密螺旋體屬物種口腔分類群251	GU408781
密螺旋體屬物種口腔分類群254	GU408803

密螺旋體屬物種口腔分類群265	GU408850
密螺旋體屬物種口腔分類群270	GQ422733
密螺旋體屬物種口腔分類群271	GU408871
密螺旋體屬物種口腔分類群508	GU413616
密螺旋體屬物種口腔分類群518	GU413640
密螺旋體屬口腔分類群G85	GU432215
密螺旋體屬綿羊腐蹄病	AJ010951
奮森氏密螺旋體	ACYH01000036
惠普普利菌	BX251412
化膿隱秘菌	NR_044858
微變塚村氏菌	X80628
耐酪胺酸塚村氏菌	AB478958
Turicibacter sanguinis	AF349724
微小脲原體	AE002127
解脲脲原體	AAYN01000002
複雜脲芽孢桿菌	NR_043746
蘇雲脲芽孢桿菌	NR_043232
特倫斯脲芽孢桿菌	NR_025394
嗜熱性脲芽孢桿菌	NR_043747
嗜熱球形脲芽孢桿菌	NR_040961
河流漫遊球菌	NR_026489
非典型韋榮氏球菌	AEDS01000059
殊異韋榮氏球菌	ACIK02000021
韋榮氏球菌屬複合群P1口腔殖株MB5_P17	DQ003631
蒙皮立韋榮氏球菌	AF473836
小韋榮氏球菌	ADFU01000009
韋榮氏球菌屬3_1_44	ADCV01000019

韋榮氏球菌屬6_1_27	ADCW01000016
韋榮氏球菌屬ACP1	HQ616359
韋榮氏球菌屬物種AS16	HQ616365
韋榮氏球菌屬物種BS32b	HQ616368
韋榮氏球菌屬物種ICM51a	HQ616396
韋榮氏球菌屬物種MSA12	HQ616381
韋榮氏球菌屬NVG 100cf	EF108443
韋榮氏球菌屬物種OK11	JN695650
韋榮氏球菌屬口腔殖株ASCA08	AY923118
韋榮氏球菌屬物種口腔殖株ASCB03	AY923122
韋榮氏球菌屬物種口腔殖株ASCG01	AY923144
韋榮氏球菌屬物種口腔殖株ASCG02	AY953257
韋榮氏球菌屬物種口腔殖株OH1A	AY947495
韋榮氏球菌屬口腔分類群158	AENU01000007
韋榮氏球菌科細菌口腔分類群131	GU402916
韋榮氏球菌科細菌口腔分類群155	GU470897
霍亂弧菌	AAUR01000095
河流弧菌	X76335
弗氏弧菌	CP002377
擬態弧菌	ADAF01000001
副溶血性弧菌	AAWQ01000116
弧菌屬RC341	ACZT01000024
創傷弧菌	AE016796
食物穀菌科細菌NML 080035	FJ394915
瓦達食穀菌	ABDE02000010
普羅米維桿菌	NR_025308
貝尼氏魏斯氏菌	EU439435

食竇魏斯氏菌	NR_036924
混淆魏斯氏菌	NR_040816
赫倫魏斯氏菌	AB680902
坎氏魏斯氏菌	NR_044659
韓國魏斯氏菌	NR_075058
類腸膜魏斯氏菌	ACKU01000017
魏斯氏菌屬KLDS 7.0701	EU600924
產琥珀酸沃林氏菌	BX571657
黃單胞菌科細菌NML 03_0222	EU313791
野油菜黃單胞菌	EF101975
黃單胞菌屬kmd_489	EU723184
Xenophilus aerolatus	JN585329
阿氏耶爾森氏菌	AJ871363
阿裡克謝耶爾森氏菌	AJ627597
貝氏耶爾森氏菌	AF366377
小腸結腸炎耶爾森菌	FR729477
弗氏耶爾森氏菌	AF366379
中間耶爾森氏菌	AF366380
克裡斯滕耶爾森氏菌	ACCA01000078
莫氏耶爾森氏菌	NR_027546
鼠疫耶爾森氏菌	AE013632
假結核耶爾森氏菌	NC_009708
羅氏耶爾森氏菌	ACCD01000071
雷金斯堡約克氏菌	AB273739
二歧齊默爾曼氏菌	AB012592
運動發酵單胞菌	NR_074274

[表2]：示例性嗜腫瘤細菌

屬	物種	腫瘤相關
支原體	*豬鼻支原體*	胃癌
丙酸桿菌	*痤瘡丙酸桿菌*	前列腺癌
支原體	*生殖器支原體*	前列腺癌
嗜甲基菌屬	*物種*	前列腺癌
衣原體	*沙眼衣原體*	前列腺癌
螺桿菌	*幽門螺桿菌*	胃MALT
李斯特氏菌	*威氏李斯特氏菌*	腎癌
鏈球菌	*肺炎鏈球菌*	淋巴瘤及白血病
嗜血桿菌	*流感嗜血桿菌*	淋巴瘤及白血病
葡萄球菌	*金黃色葡萄球菌*	乳腺癌
李斯特氏菌	*單核球增多性李斯特氏菌*	乳腺癌
甲基桿菌	*耐輻射甲基桿菌*	乳腺癌
鞘胺醇單胞菌	*矢野鞘胺醇單胞菌*	乳腺癌
梭桿菌屬	*物種*	喉癌
普羅維特利斯（Provetelis）屬	*物種*	喉癌
鏈球菌	*肺炎鏈球菌*	喉癌
孿生球菌屬	*物種*	喉癌
鮑特氏菌	*百日咳鮑特氏菌*	喉癌
棒狀桿菌	*結核硬脂酸棒狀桿菌*	口腔鱗狀細胞癌
微球菌	*藤黃微球菌*	口腔鱗狀細胞癌
普雷沃菌	*產黑色素普雷沃菌*	口腔鱗狀細胞癌
微小桿菌	*耐氧化微小桿菌*	口腔鱗狀細胞癌

梭桿菌	*舟形梭桿菌*	口腔鱗狀細胞癌
韋榮氏球菌	*小韋榮氏球菌*	口腔鱗狀細胞癌
鏈球菌	*唾液鏈球菌*	口腔鱗狀細胞癌
鏈球菌	*緩症/口腔鏈球菌*	口腔鱗狀細胞癌
韋榮氏球菌	*殊異韋榮氏球菌*	口腔鱗狀細胞癌
消化鏈球菌	*口炎消化鏈球菌*	口腔鱗狀細胞癌
鏈球菌	*戈登氏鏈球菌*	口腔鱗狀細胞癌
孿生球菌	*溶血孿生球菌*	口腔鱗狀細胞癌
孿生球菌	*麻疹孿生球菌*	口腔鱗狀細胞癌
Johnsonella	*ignava*	口腔鱗狀細胞癌
鏈球菌	*副血鏈球菌*	口腔鱗狀細胞癌
顆粒鏈菌	*毗鄰顆粒鏈菌*	口腔鱗狀細胞癌
分枝桿菌	*海分枝桿菌*	肺感染
彎曲桿菌	*簡要彎曲桿菌*	巴雷特氏食道症
彎曲桿菌	*直腸彎曲桿菌*	巴雷特氏食道症
口腔桿菌屬	*物種*	食道腺癌
卡托氏菌屬	*物種*	食道腺癌
消化鏈球菌屬	*物種*	食道腺癌
真桿菌屬	*物種*	食道腺癌
戴阿利斯特菌屬	*物種*	食道腺癌
韋榮氏球菌屬	*物種*	食道腺癌
厭氧球形菌屬	*物種*	食道腺癌
巨球型菌屬	*物種*	食道腺癌
奇異菌屬	*物種*	食道腺癌

細小桿菌屬	*物種*	食道腺癌
羅氏菌屬	*物種*	食道腺癌
放線菌屬	*物種*	食道腺癌
梭桿菌屬	*物種*	食道腺癌
纖毛菌屬	*物種*	食道腺癌
纖發菌屬	*物種*	食道腺癌
嗜二氧化碳噬纖細菌屬	*物種*	食道腺癌
普雷沃菌屬	*物種*	食道腺癌
卟啉單胞菌屬	*物種*	食道腺癌
彎曲桿菌屬	*物種*	食道腺癌
嗜血桿菌屬	*物種*	食道腺癌
奈瑟菌屬	*物種*	食道腺癌
TM7	*物種*	食道腺癌
顆粒鏈菌屬	*物種*	食道腺癌
貪噬菌屬	*物種*	腹膜假性黏液瘤
大腸桿菌屬	*志賀氏菌屬*	腹膜假性黏液瘤
假單胞菌屬	*物種*	腹膜假性黏液瘤
四球菌屬	*物種*	腹膜假性黏液瘤
不動桿菌屬	*物種*	腹膜假性黏液瘤
螺桿菌	*肝螺桿菌*	乳腺癌
衣原體	*鸚鵡熱衣原體*	MALT淋巴瘤
螺旋體	*伯氏螺旋體*	B細胞淋巴瘤皮膚
大腸桿菌	*大腸桿菌NC101*	大腸直腸癌

沙門氏菌	*鼠傷寒沙門氏菌*	糞便
腸球菌	*糞腸球菌*	血液
鏈球菌	*緩症鏈球菌*	血液
鏈球菌	*血鏈球菌*	血液
鏈球菌	*咽峽炎鏈球菌*	血液
鏈球菌	*唾液鏈球菌*	血液
葡萄球菌	*表皮葡萄球菌*	血液
鏈球菌	*解沒食子酸鏈球菌*	大腸直腸癌
彎曲桿菌	*昭曲彎曲桿菌CC57C*	大腸直腸癌
纖發菌屬	*物種*	大腸直腸癌

【0196】 在某些實施方式中，本文描述之mEV（例如smEV）從專性厭氧細菌獲得。專性厭氧細菌的實例包括革蘭氏陰性桿菌（包括擬桿菌、普雷沃菌、卟啉單胞菌、梭桿菌、嗜膽菌及薩特氏菌屬物種的屬）、革蘭氏陽性球菌（主要為消化鏈球菌屬）、革蘭氏陽性孢子形成菌（梭菌屬）、非孢子形成桿菌（放線菌、丙酸桿菌、真桿菌、乳桿菌及雙歧桿菌屬）及革蘭氏陰性球菌（主要為韋榮氏球菌屬）。在一些實施方式中，該等專性厭氧細菌係選自由以下組成之群組的屬的細菌：阿加薩桿菌屬、奇異菌屬（Atopobium）、布勞特氏菌屬（Blautia）、伯克霍爾德菌屬（Burkholderia）、迪爾莫菌屬（Dielma）、長鏈菌屬（Longicatena）、副梭菌屬（Paraclostridium）、蘇黎世桿菌屬（Turicibacter）及泰澤菌屬（Tyzzerella）。

【0197】 在一些實施方式中，本文描述之mEV（例如smEV）獲得自選自由以下組成之群組的屬的細菌：埃希氏桿菌屬、克雷白氏菌屬、乳桿菌屬、志賀氏菌屬及葡萄球菌屬。

【0198】 在一些實施方式中，本文描述之mEV（例如smEV）獲得自選自由以下組成之群組的物種：馬賽布勞特氏菌（*Blautia massiliensis*）、解苯副梭菌（*Paraclostridium benzoelyticum*）、苛求迪爾莫菌（*Dielma fastidiosa*）、*Longicatena caecimuris*、乳酸乳球菌乳脂亞種（*Lactococcus lactis cremoris*）、納西利斯泰澤菌（*Tyzerella nexilis*）、*Hungatella effluvia*、類肺炎克雷白氏菌擬肺炎亞種（*Klebsiella quasipneumoniae subsp. Similipneumoniae*）、催產克雷白氏菌（*Klebsiella oxytoca*）、和當別町韋榮氏球菌（*Veillonella tobetsuensis*）。

【0199】 在一些實施方式中，本文描述之mEV（例如smEV）獲得自普雷沃菌屬細菌，該普雷沃菌屬細菌選自由以下組成之群組：阿爾伯普雷沃菌、羊水普雷沃菌、貝根普雷沃菌、二路普雷沃菌、短普雷沃菌、布氏普雷沃菌、頰普雷沃菌、口頰普雷沃菌、糞便普雷沃菌、牙普雷沃菌、棲牙普雷沃菌、解糖胨普雷沃菌、棲組織普雷沃菌、中間普雷沃菌、小斑點普雷沃菌、馬斯普雷沃菌、產黑普雷沃菌、彩虹普雷沃菌、多形普雷沃菌、變黑普雷沃菌、口腔普雷沃菌、口普雷沃菌、齦炎普雷沃菌、蒼白普雷沃菌、唾液普雷沃菌、斯特塞拉普雷沃菌、坦納普雷沃菌、蒂莫普雷沃菌、空腸普雷沃菌、橙色普雷沃菌、保氏普雷沃菌、著色普雷沃菌、人體普雷沃菌、丹塔普雷沃菌、棲居普雷沃菌、斐氏普雷沃菌、深黑色普雷沃菌、解肝素普雷沃菌、洛氏普雷沃菌、嗜糖普雷沃菌、南錫普雷沃菌、稻普雷沃菌、沼澤普雷沃菌、胸膜炎普雷沃菌、棲瘤胃普雷沃菌、解糖普雷沃菌、靶心普雷沃菌、賽赫普雷沃菌、動膠普雷沃菌和真空腔普雷沃菌。

【0200】 在一些實施方式中，本文描述之mEV（例如smEV）獲得自細菌菌株，該細菌菌株包含基因組序列，該基因組序列與表3中提供的以ATCC保藏號保藏的細菌菌株的基因組序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性（例

如至少99.5%序列同一性、至少99.6%序列同一性、至少99.7%序列同一性、至少99.8%序列同一性、至少99.9%序列同一性）。在一些實施方式中，本文描述之mEV（例如smEV）獲得自細菌菌株，該細菌菌株包含16S序列，該16S序列與表3中提供的16S序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性（例如，至少99.5%序列同一性、至少99.6%序列同一性、至少99.7%序列同一性、至少99.8%序列同一性、至少99.9%序列同一性）。

[表3]示例性細菌菌株

SEQ ID No.	菌株	保藏號	16S序列
	古氏副擬桿菌菌株A		
	動物雙歧桿菌乳酸亞種菌株A	PTA-125097	
	動物雙歧桿菌乳酸亞種菌株B		
	動物雙歧桿菌乳酸亞種菌株C		
	馬賽布勞特氏菌菌株A	PTA-125134	
	普雷沃菌屬菌株B	NRRL登錄號B 50329	
	棲組織普雷沃菌菌株A		
	產黑色素普雷沃菌菌株A		
	布勞特氏菌菌株A	PTA-125346	
	乳酸乳球菌乳脂亞種菌株A	PTA-125368	
	乳酸乳球菌乳脂亞種菌株B		

	活潑瘤胃球菌菌株	PTA-125706	
	納西利斯泰澤菌菌株	PTA-125707	
	共生梭菌S10-19		>S10-19-重疊群 CAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTC GGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAA ATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG GGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTA AAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAGTCTGAA GTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGGACTGC TTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTCGGAGAG GTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGA AGGCGACTTACTGGACGATAACTGACGTTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG AATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCG GTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCT GGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAA GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA ACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCCGACGGG GGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAG AAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC GAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGT TCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTGCCAGGG ATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA ATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACACA CGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGAGAAGCA AGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTCAAAAATA ACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCG CCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC GAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG GGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG

			AGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCCAAC CGCAAGG
	共生梭菌S6-202		>S6-202-重疊群 GATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTA TTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAGTCT GAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGGAC TGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTCGGA GAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA TGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTC GGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCAC CTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCCGACG GGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGG AGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCCAGC GGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTGCCA GGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTAC ACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGAGAA GCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTCAAAA ATAACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAAC TCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC GCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCC CGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG GGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCCA

			ACCGCAAGGAGGG
	共生梭菌S10-257		>共有序列 TGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGT TATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGT AGACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCC GCGGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACT GTTTAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT TAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTA CTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG TAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGT GTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGC AAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTAC GTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGAC GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA GGTCTTGACATCGATCCGACGGGGGAGTAAC GTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAGG TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGG GAACTCTTGGGAGACTGCCAGGGATAACCTG GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTAC AATGGCGTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGCG AGGTGGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCA GTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACG AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA ATGTCGC GGTGAATACGTTCCC
	共生梭菌S10-552		>10-552 共有序列 CGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTA CTAGCGATTCCAGCTTCGTGCAGGCGAGTTGC AGCCTGCAGTCCGAACTGAGACGTTATTTTTG AGATTTGCTCCACCTCGCGGTCTTGCTTCTCTT

			TGTTTACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA GATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC CCCACCTTCCTCCAGGTTATCCCTGGCAGTCT CCCAAGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCTACT TAGAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA ACCATGCACCACCTGTCTTCTCCGCCCCGAAG GGAAGGGGACGTTACTCCCCCGTCGGATCGA TGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT TCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC GGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTT GCGAACGTACTCCCCAGGTGGAATACTTACTG CGTTTGCGACGGCACCGAAGAGCTTTGCTCCC CAACACCTAGTATTCATCGTTTACGGCGTGGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA CGCTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTATCGTCCA GTAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTA ATATCTACGCATTTCACCGCTACACTAGGAAT TCCACTTACCTCTCCGACACTCCAGTTAAACA GTTTCCAAAGCAGTCCCGCAGTTGAGCCGCG GGCTTTCACTTCAGACTTGCTTTACCGTCTAC GCTCCCTTTACACCCAGTAAATCCGGATAACG CTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC ACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTTAGT
	共生梭菌S10-551		>10-511_共有_序列2讀段 從10至511 ACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTA TCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGC GGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACTGTT TAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGAATT CCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTA GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTACT GGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCG TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTT

			GGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAA CGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTC GCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC TTGACATCGATCCGACGGGGGAGTAACGTCC CCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAGGTGGT GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATG TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT ATTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGGGAAC TCTTGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCC CTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATG GCGTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGCGAGGT GGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTC GGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAG CTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATG TCGCGGTGAATACGTTCCC
	共生梭菌S10-530		>10-530GAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAG CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAG CAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACT GCGGGACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAG TGTCGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACA CCAGTGGCGAAGGCGACTTACTGGACGATAA CTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCA AAGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAA GTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAAT GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC GATCCGACGGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTT

			CGGGGCGGA
	共生梭菌S10-533		>10-533_共有_序列2讀段 從10至 533GAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGC GATTACTAGCGATTCCAGCTTCGTGCAGGCGA GTTGCAGCCTGCAGTCCGAACTGAGACGTTAT TTTTGAGATTTGCTCCACCTCGCGGTCTTGCTT CTCTTTGTTTACGCCATTGTAGCACGTGTGTA GCCCAGATCATAAGGGGCATGATGATTTGAC GTCATCCCCACCTTCCTCCAGGTTATCCCTGG CAGTCTCCCAAGAGTTCCCGGCCGAACCGCTG GCTACTTAGAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG ACGACAACCATGCACCACCTGTCTTCTCCGCC CCGAAGGGAAGGGGACGTTACTCCCCCGTCG GATCGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC GTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGC TTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT CATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGAATA CTTACTGCGTTTGCGACGGCACCGAAGAGCTT TGCTCCCCAACACCTAGTATTCATCGTTTACG GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG CTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTA TCGTCCAGTAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTT CCTCCTAATATCTACGCATTTCACCGCTACAC TAGGAATTCCACTTACCTCTCCGACACTCCAG TTAAACAGTTTCCAAAGCAGTCCCGCAGTTGA GCCGCGGGCTTTCACTTCAGACTTGCTTTACC GTCTACGCTCCCTTTACACCCAGTAAATCCGG ATAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCT GCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTTAG
	共生梭菌S10-537		>10-537_共有_序列2讀段 從10至 537ACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGT TATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGT AGACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCC GCGGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACT

			GTTTAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT TAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTA CTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG TAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGT GTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGC AAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTAC GTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGAC GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA GGTCTTGACATCGATCCGACGGGGGAGTAAC GTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAGG TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGG GAACTCTTGGGAGACTGCCAGGGATAACCTG GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTAC AATGGCGTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGCG AGGTGGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCA GTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACG AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA ATGTCGCGGTGAATACGTT
	共生梭菌S10-544		>10-544ATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTG GGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAG TCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGG GACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTC GGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAG TGGCGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTGA CGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGC

			TCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATT CCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAA CTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCC GACGGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGG GCGGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCC AGCGGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTG CCAGGGATAACCTG
	共生梭菌S10-547		>10-547GGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTA AGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCG GATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGG TAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCT CAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACTGTTTAAC TGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTA GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAG GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTACTGGAC GATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGG GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC ACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGG GAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGC AGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCA AGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACC CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG ACATCGATCCGACGGGGGAGTAACGTCCCCT TCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAGGTGGTGCA TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATT CTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGGGAACTC
	共生梭菌S10-548		>10-548_共有_序列2讀段 從10至 548AAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTAT

			CCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGA CGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGCG GCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACTGTTT AACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGAATTC CTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTACTG GACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGT GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTG GGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAAC GCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCG CAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGA CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT GACATCGATCCGACGGGGGAGTAACGTCCCC TTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAGGTGGTGC ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTA TTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGGGAACTC TTGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAA GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT ATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGC GTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGCGAGGTG GAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCG GACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGC TGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGT CGCGGTGAATACGTT
	梭菌屬 （Clostridium）物種 S7-203		>S7-203-357F TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGT ATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAA GAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCG GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGG GTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAGT CTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGG ACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTCG

			GAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGT GGCGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTGAC GTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC GATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTC TTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCC ACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACT CAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCCGA CGGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCG GAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCCAG CGGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTGCC AGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACG TCAAATCATCATGCCCCT
	梭菌屬物種 36A7-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA GCGTAGACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAA GCCCGCGGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGA AACTGTTTAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAG TGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG ACTTACTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACT AGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCG TCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGA GTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATG TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT

			ACCAGGTCTTGACATCGATCCGACGGGGGAG TAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGAC AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG CAACCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGTTC
	梭菌屬物種S4-31		>4-31-重疊群 GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGA AGTATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGG GAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCC CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACT GGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAA GTCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCG GGACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGT CGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTG ACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAG CTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTAT TCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATC CGACGGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGG GCGGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCC AGCGGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTG CCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGA CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGC TACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGA GAAGCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTCA AAAATAACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTG CAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAG

			TAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATAC GTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACA CCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTG ACCCAACCGCAAGGAGGGAGCTG
	梭菌屬物種 S210-133		>210-133-重疊群 TTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAGTCT GAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGGAC TGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTCGGA GAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA TGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTC GGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCAC CTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCCGACG GGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGG AGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCCAGC GGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTGCCA GGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGGATGACG TCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTA CACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGAGA AGCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTCAAA AATAACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCA ACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTA ATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGT TCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACC

			ATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGAC CCA
	共生梭菌S10-534		>10-534_共有_序列2讀段 從10至 534ACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGT TATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGT AGACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCC GCGGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACT GTTTAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAAGTGG AATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT ATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT TACTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAA AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAG GTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCG CAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTA CGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGA CGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC AGGTCTTGACATCGATCCGACGGGGGAGTAA CGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCG GGAACTCTTGGGAGACTGCCAGGGATAACCT GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA TGCCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGCGTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGC GAGGTGGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTC AGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAC GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG AATGTCGCGGTGAATACGTTCC
	梭菌屬物種S4-44		>4-44-重疊群 CTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAG TAGTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGG AAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCC

			CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACT GGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAA GTCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCG GGACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGT CGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTG ACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAG CTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTAT TCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATC CGACGGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGG GCGGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCC AGCGGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTG CCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGGATG ACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGG CTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAG AGAAGCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTC AAAAATAACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCT GCAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATA CGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGT GACCCAACCGCAAGGAGGGAGCTGCCGA
	Hungatella hathewayi或 [Clostridium] hathewayi 34D2-1004		GAAGTATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCA GGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAG CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTTTAG

			CAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACC CCGGTACTGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAG TGCAGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACA CCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAA CTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAATACTAGGTGTCGGGGGGCA AAGCCCTTCGGTGCCGCCGCAAACGCAATAA GTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAAT GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC AACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATC
	Hungatella hathewayi或[00Clostridium] hathewayi 34H6-1004		TTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGTTTAGCAAGTCT GAAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTAC TGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGGA GAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAACTGACGTT GAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT GAATACTAGGTGTCGGGGGGCAAAGCCCTTC GGTGCCGCCGCAAACGCAATAAGTATTCCAC CTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAAGTCTTGACATCCCA
	Hungatella effluvia 36B10-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA

			GCGTAGACGGTTAAGCAAGTCTGAAGTGAAA GCCCGGGGCTCAACCCCGGTACTGCTTTGGAA ACTGTTTGACTTGAGTGCAGGAGAGGTAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTA GGTGTCGGGGGACAAAGTCCTTCGGTGCCGC CGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAG TACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGTCTTGACATCCCATTGAAAATCATTTA ACCG
			GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA GCGTAGACGGTTAAGCAAGTCTGAAGTGAAA GCCCGGGGCTCAACCCCGGTACTGCTTTGGAA ACTGTTTGACTTGAGTGCAGGAGAGGTAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTA GGTGTCGGGGGACAAAGTCCTTCGGTGCCGC CGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAG TACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGTCTTGACATCCCATTGAAAA
	Hungatella effluvia 36C4-1014		
	Hungatella effluvii 36F7- 1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG

			TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA GCGTAGACGGTTAAGCAAGTCTGAAGTGAAA GCCCGGGGCTCAACCCCGGTACTGCTTTGGAA ACTGTTTGACTTGAGTGCAGGAGAGGTAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTA GGTGTCGGGGGACAAAGTCCTTCGGTGCCGC CGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAG TACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGTCTTGACATCCCATTGAA
	毛螺菌科物種或奇特龍梭菌（[Clostridium] Citroniae）39A7-1014		GACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG GGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAA GGGAGCGTAGACGGCGAAGCAAGTCTGGAGT GAAAACCCAGGGCTCAACCCTGGGACTGCTT TGGAAACTGTTTTGCTAGAGTGTCGGAGAGGT AAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAG GCGGCTTACTGGACGATAACTGACGTTGAGG CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAAT GCTAGGTGTTGGGGGG
	毛螺菌科物種或奇特龍梭菌（[Clostridium] citroniae）39A8-1014		GACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG GGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAA GGGAGCGTAGACGGCGAAGCAAGTCTGGAGT GAAAACCCAGGGCTCAACCCTGGGACTGCTT TGGAAACTGTTTTGCTAGAGTGTCGGAGAGGT AAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC

			GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAG GCGGCTTACTGGACGATAACTGACGTTGAGG CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAAT GCTAGGTGTTGGGGGG
	毛螺菌科物種或奇特龍梭菌（[Clostridium] citroniae）36A6-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAACTGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA GCGTAGACGGCGAAGCAAGTCTGGAGTGAAA ACCCAGGGCTCAACCCTGGGACTGCTTTGGA AACTGTTTTGCTAGAGTGTCGGAGAGGTAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTA GGTGTTGGGGGGCAAAGCCCTTC
	毛螺菌科物種或[梭菌屬]物種 36C9-1014		GAAGTATTTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCA GGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAG CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGCAGTG CAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACC CCGGGACTGCTTTGGAAACTGTGCAGCTAGA GTGTCGGAGAGGCAAGCGGAATTCCTAGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACGATG ACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGATGACTACTAGGTGTCGGGGAGC AAAGCTCTTCGGTGCCGCAGCCAACGCAATA AGTAGTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGA ATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA

			GCAACGCGAAGAACCTTACCTGCTCTTGACAT CCCTCTGACCG
	鮑氏梭菌 （[Clostridium] bolteae）S10-21		>S10-121-重疊群 GATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTA TTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGCGAAGCAAGTCT GAAGTGAAAACCCAGGGCTCAACCCTGGGAC TGCTTTGGAAACTGTTTTGCTAGAGTGTCGGA GAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGGCTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA TGAATGCTAGGTGTTGGGGGGCAAAGCCCTT CGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGCATTCCA CCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTC AAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGT GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA AGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCTCTTGAC CGGCGTGTAACGGCGCCTTCCCTTCGGGGCAG GAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATCCTTAGTAGCCAGCA GGTAAAGCTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCA GGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTAC ACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAA GCAAGACAGTGATGTGGAGCAAATCCCAAAA ATAACGTCCCAGTTCGGACTGTAGTCTGCAAC CCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT CGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTC CCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT GGGAGTCAGCAACGCCCGAAGTCAGTGACCC

			AACTCGCAAGAGAGGG
	活潑瘤胃球菌菌株A	PTA-126695	CCTTAGCGGTTGGGTCACTGACTTCGGGCGTT ACTGACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA CAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGACATT CTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCA TGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACTG AGACGTTATTTTTGGGATTTGCTCCCCCTCGC GGGCTCGCTTCCCTTTGTTTACGCCATTGTAG CACGTGTGTAGCCCTGGTCATAAGGGGCATG ATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGG TTATCCCTGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCCATC CTAAATGCTGGCTACTAAAGATAGGGGTTGC GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG TCTCCTCTGTCCCGAAGGAAAGCTCCGATTAA AGAGCGGTCAGAGGGATGTCAAGACCAGGTA AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACA TGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATT CCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTCCC CAGGTGGAATACTTATTGCGTTTGCTGCGGCA CCGAATGGCTTTGCCACCCGACACCTAGTATT CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTC AACGTCAGTCATCGTCCAGAAAGCCGCCTTCG CCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTT CACCGCTACACTAGGAATTCCGCTTTCCTCTC CGACACTCTAGCCTGACAGTTCCAAATGCAGT
	納西利斯泰澤菌菌株A		>納西利斯泰澤菌S10-231共有序列 GGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGG GTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTTGTGTAAGT CTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGG ACTGCATTGGAAACTATGTAACTAGAGTGTCG GAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGT GGCGAAGGCGGCTTACTGGACGATCACTGAC

			GTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC GATGACTACTAGGTGTCGGGGAGCAAAGCTC TTCGGTGCCGCAGCAAACGCAATAAGTAGTC CACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCCTCTG ACCGCTCTTTAATCGGAGTTTTCCTTCGGGAC AGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTATCTTCAGTAGCCA GCATTTAAGGTGGGCACTCTGGAGAGACTGC CAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGAC GTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCAGGGCT ACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG AAGCGAACCTGTGAGGGGAAGCAAATCTCAA AAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCA ACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTA ATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTT CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTC
	當別町韋榮氏球菌		>S11-19-357F AGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGCCTTCG GGTTGTAAAGCTCTGTTAATCGGGACGAAAG GCCTTCTTGCGAATAGTTAGAAGGATTGACGG TACCGGAATAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC GCGCAGGCGGATCGGTCAGTCTGTCTTAAAA GTTCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGATGGAA ACTGCTGATCTAGAGTATCGGAGAGGAAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGA CTTTCTGGACGAAAACTGACGCTGAGGCGCG AAAGCCAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACC CCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGGTACT

			AGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCG GAGTTAACGCAATAAGTACCCCGCCTGGGGA GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATG TGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA CCAGGTCTTGACATTGATGGACAGAACTAGA GATAGTTCCTCTTCTTCGGAAGCCAGAAAACA GGTGGTGCACGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCCCTATCTTATGTTGCCAGCACTTCGGGT GGGAACTCAT
			>S14-201重疊群 GAGTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCT GTTAATCGGGACGAAAGGCCTTCTTGCGAAT AGTGAGAAGGATTGACGGTACCGGAATAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGATA GGTCAGTCTGTCTTAAAAGTTCGGGGCTTAAC CCCGTGATGGGATGGAAACTGCCAATCTAGA GTATCGGAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACGAAA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGC GAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGC CGTAAACGATGGGTACTAGGTGTAGGAGGTA TCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACGCAATA AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGG TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC ACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAC GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA TTGATGGACAGAACCAGAGATGGTTCCTCTTC TTCGGAAGCCAGAAAACAGGTGGTGCACGGT TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTAT GTTGCCAGCACTTTGGGTGGGGACTCATGAG
		小韋榮氏球菌	

			AGACTGCCGCAGACAATGCGGAGGAAGGCGG GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGAC CTGGGCTACACACGTACTACAATGGGAGTTA ATAGACGGAAGCGAGATCGCGAGATGGAGCA AACCCGAGAAACACTCTCTCAGTTCGGATCGT AGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGTCGGAAT CGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGT GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC GTCACACCACGAAAGTCGGAAGTGCCCAAAG CCGGTGGGGTAACCTTC
	小韋榮氏球菌		>S14-205重疊群 GAGTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCT GTTAATCGGGACGAAAGGCCTTCTTGCGAAT AGTGAGAAGGATTGACGGTACCGGAATAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGATA GGTCAGTCTGTCTTAAAAGTTCGGGGCTTAAC CCCGTGATGGGATGGAAACTGCCAATCTAGA GTATCGGAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACGAAA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGC GAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGC CGTAAACGATGGGTACTAGGTGTAGGAGGTA TCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACGCAATA AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGG TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC ACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAC GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA TTGATGGACAGAACCAGAGATGGTTCCTCTTC TTCGGAAGCCAGAAAACAGGTGGTGCACGGT TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTAT GTTGCCAGCACTTTGGGTGGGGACTCATGAG

			AGACTGCCGCAGACAATGCGGAGGAAGGCGG GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGAC CTGGGCTACACACGTACTACAATGGGAGTTA ATAGACGGAAGCGAGATCGCGAGATGGAGCA AACCCGAGAAACACTCTCTCAGTTCGGATCGT AGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGTCGGAAT CGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGT GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC GTCACACCACGAAAGTCGGAAGTGCCCAAAG CCGGTG
	非典型韋榮氏球菌菌株A	PTA-125709	
	非典型韋榮氏球菌菌株B	PTA-125711	
	殊異韋榮氏球菌		
	小韋榮氏球菌菌株A	PTA-125691	
	小韋榮氏球菌菌株B	PTA-125711	
	當別町韋榮氏球菌菌株A	PTA-125708	
	當別町韋榮氏球菌菌株B		
	唾液乳桿菌菌株A		ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTC TTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGA ACACGAGTGAGAGTAACTGTTCATTCGATGA CGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGG GAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAA AGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGA AACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG TGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCG GCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGTTCG

			AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCT AGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCG CAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGA GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGA GATTAGGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACA GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCCTTGTTGTCAGTTGCCAGCATTAAGTTG GGCACTCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACC GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCA TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAGACCGC GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCA GTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATG AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGC ATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAA CACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCGCAAGGAG CCAGCCG
	阿加薩桿菌 （Agathobaculum） 菌株A		CCGCGTGATTGAAGAAGGCCTNTCGGGTTGT AAAGATCTTTAATTCGGGACGAAAAATGACG GTACCGAAAGAATAAGCTCCGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGAGCA AGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGC GCGCAGGCGGGCTGGCAAGTTGGAAGTGAAA TCTAGGGGCTTAACCCCTAAACTGCTTTCAAA ACTGCTGGTCTTGAGTGATGGAGAGGCAGGC GGAATTCCGTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATACGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CCTGCTGGACATTAACTGACGCTGAGGCGCG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACT

			AGGTGTGGGAGGTATTGACCCCTTCCGTGCCG CAGTTAACACAATAAGTATCCCACCTGGGGA GTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAGCAGTGGAGTATG TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGCCTTGACATCCCGATGACCGGTCTAG AGATAGACCTTCTCTTCGGAGCATCGGTGACA GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCCTTACGGTTAGTTGATACGCAAGATCAC TCTAGCCGGACTGCCGTTGACAAAACGGAGG AAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCC CTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATG GCAGTCATACAGAGGGAAGCAAAGCTGTGAG GCGGAGCAAATCCCTAAAAGCTGTCCCAGTT CAGATTGCAGGCTGCAACCCGCCTGCATGAA GTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA CACCGCCCGTCACACCATGAGAGCCGTCAAT ACCCGAAGTCCGTAGCCTAACCGCAAG
	解苯副梭菌（Paraclostridium benzoelyticum）菌株A		GAATTACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGTGG TTTTTTAAGTCAGAAGTGAAAGGCTACGGCTC AACCGTAGTAAGCTTTTGAAACTAGAGAACTT GAGTGCAGGAGAGGAGAGTAGAATTCCTAGT GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGA ATACCAGTAGCGAAGGCGGCTCTCTGGACTG TAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGA GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAGTACTAGGTGTCGGGGG TTACCCCCCTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTA AGTACTCCGCCTGGGAAGTACGCTCGCAAGA GTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC ACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA GCAACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACA TCCCACTGACCTCTCCCTAATCGGAGATTTCC CTTCGGGGACAGTGGTGACAGGTGGTGCATG

			GTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTT TAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAG GGACTGCCGAGGATAACTCGGAGGAAGGTGG GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGCT TAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTA CAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTA ATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTA GGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTT ACTAGTAATCGCAGATCAGAATGCTGCGGTG AATGCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG TCACACCATGGAAGTTGGGGGCGCCCGAAGC CGGTTAGCTAACCTTTTAGGAAGCGGCCGT
	Turicibacter sanguinis菌株A		ATGGCTAGAGTGTGACGGTACCTTATGAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGAGCGCGCAGGTGGTTG ATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTTAAC CGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGTCAACTTG AGTGCAGAAGAGGGAAGTGGAATTCCATGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTCCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGGGTC GAACCTCAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGC ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATAC CAGTGACCGTCCTAGAGATAGGATTTTCCCT TCGGGGACAATGGATACAGGTGGTGCATGGT TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTT AGTTGCCAGCATTCAGTTGGGGACTCTAACGA GACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGTGGG

			GATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACC TGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACA AAGAGAAGCGAAGCGGTGACGTGGAGCAAA CCTCATAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGTAG GCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGC TAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAA TACGTT
	類鼻疽伯克霍爾德菌		
	類肺炎克雷白氏菌擬肺炎亞種		
	催產克雷白氏菌菌株A		
	巨球型菌屬物種菌株A	PTA-126770	TATCAATTCGAGTGGCAAACGGGTGAGTAAC GCGTAAGCAACCTGCCCTTCAGATGGGGACA ACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGAATAC GTTCTTTCCGCCGCATGACGGGATGAAGAAA GGGAGGCCTTCGGGCTTTCGCTGGAGGAGGG GCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAA CGGCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGT CTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGGACTGA GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT GACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGACGGC CTTCGGGTTGTAAAGTTCTGTTATATGGGACG AACAGGATAGCGGTCAATACCCGTTATCCCTG ACGGTACCGTAAGAGAAAGCCACGGCTAACT ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA GGGCGCGCAGGCGGCATCGCAAGTCGGTCTT AAAAGTGCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGAC CGAAACTGTGAAGCTCGAGTGTCGGAGAGGA AAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAA

			GCGGCTTTCTGGACGACAACTGACGCTGAGG CGCGAAAGCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGA TACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGAT ACTAGGTGTAGGAGGTATCGACTCCTTCTGTG CCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGG GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGG AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGT ATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAAC CTTACCAAGCCTTGACATTGATTGCTACGGAA AGAGATTTCCGGTTCTTCTTCGGAAGACAAGA AAACAGGTGGTGCACGGCTGTCGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG AGCGCAACCCCTATCTTCTGTTGCCAGCACTA AGGGTGGGGACTCAGAAGAGACTGCCGCAGA CAATGCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAG TCATCATGCCCCTTATGGCTTGGGCTACACAC GTACTACAATGGCTCTTAATAGAGGGAAGCG AAGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCAAAAACA GAGTCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCG CCTGCATGAAGCAGGAATCGCTAGTAATCGC AGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA AAGTCATTCACACCCGAAGCCGGTGAGGCAA CCGCAAGGAACCAGCCGTCGAAGGTGGGGGC GATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGC CGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT T
	巨球型菌屬物種菌株B		ATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAC GCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGA ACGAGAAGAGATGAGAAGCTTGCTTCTTATC AATTCGAGTGGCAAACGGGTGAGTAACGCGT AAGCAACCTGCCCTTCAGATGGGGACAACAG CTGGAAACGGCTGCTAATACCGAATACGTTCT TTCCGCCGCATGACGGGATGAAGAAAGGGAG GCCTTCGGGCTTTCGCTGGAGGAGGGGCTTGC

			GTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCC CACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGTCTGAG AGGATGAACGGCCACATTGGGACTGAGACAC GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG AGCAACGCCGCGTGAACGATGACGGCCTTCG GGTTGTAAAGTTCTGTTATATGGGACGAACAG GATAGCGGTCAATACCCGTTATCCCTGACGGT ACCGTAAGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCG CGCAGGCGGCATCGCAAGTCGGTCTTAAAAG TGCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGACCGAAA CTGTGAAGCTCGAGTGTCGGAGAGGAAAGCG GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA TATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGCGGC TTTCTGGACGACAACTGACGCTGAGGCGCGA AAGCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCC CGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGATACTA GGTGTAGGAGGTATCGACTCCTTCTGTGCCGG AGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAG TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGT GGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGCCTTGACATTGATTGCTACGGAAAGA GATTTCCGGTTCTTCTTCGGAAGACAAGAAAA CAGGTGGTGCACGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC GCAACCCCTATCTTCTGTTGCCAGCACTAAGG GTGGGGACTCAGAAGAGACTGCCGCAGACAA TGCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCA TCATGCCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTA CTACAATGGCTCTTAATAGAGGGAAGCGAAG GAGCGATCCGGAGCAAACCCCAAAAACAGAG TCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCT GCATGAAGCAGGAATCGCTAGTAATCGCAGG

			TCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC TTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTC ATTCACACCCGAAGCCGGTGAGGCAACCGCA AGGAACCAGCCGTCGAAGGTGGGGGCGATGA TTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAT CGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
	菲利克斯新月形單胞菌		GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACG ATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCC ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAA TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGT GAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTC TGTTGACGGGGACGAACGTGCGGAGTGCGAA TAGCGCTTTGTAATGACGGTACCTGTCGAGGA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAA TCATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCGGGCC GGTAAGTCTTACTTAAAAGTGCGGGGCTCAA CCCCGTGATGGGAGAGAAACTATCGGTCTTG AGTACAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCCAGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAA CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGC AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCCAGGGGAG CGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGG CCGTAAACGATGGATACTAGGTGTGGGAGGT ATCGACCCCTACCGTGCCGGAGTTAACGCAAT AAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG GCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG CACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGA AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGAC ATTGACTGAAAGCACTAGAGATAGTGCCCTCT CTTCGGAGACAGGAAAACAGGTGGTGCATGG CTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCTT TGTTGCCATCAGGTAAAGCTGGGCACTCAAA

			GGAGACTGCCGCGGAGAACGCGGAGGAAGG CGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTAT GGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGAAC GGACAGAGAGCAGCGAACCCGCGAGGGCAA GCGAACCTCAAAAACCGTTTCCCAGTTCGGAT TGCAGGCTGCAACCCGCCTGCATGAAGTCGG AATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGC GGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCG CCCGTCACACCACGGAAGTCATTCACACCCG AAGCCGGCGCAGCCGTCTAAGGTGGGGAAGG TGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCG TATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
	鶉雞腸球菌菌株A		CTGACCGAGCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG TTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAA GAACAAGGATGAGAGTAAAACGTTCATCCCT TGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA AGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG AGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA GGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGG CTCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT GCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTG CTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGG AATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC CTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCT AGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGT GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA

			GCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTA GTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACA AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT GCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAG TCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCT CTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT CAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC TTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT TGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT
	鶉雞腸球菌 菌株B		CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA AACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAG AGTAGAACGTTCATCCCTTGACGGTATCTAAC CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGC TCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAG ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGG TCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTG GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAAC GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACC GCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC TTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGC TTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTG CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT ATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTC

			TAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGG AAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTA AGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGA TTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGC GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG CCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCG AAGTCGGTGAGGTAACCTTTTNGGAGCCAGC CGC
Fournierella massiliensis	PTA-126694		Fournierella massiliensis
Harryflintia acetispora	PTA-126696		Harryflintia acetispora

【0201】 在一些實施方式中，mEV來自以下細菌中的一種或多種：

o *阿克曼氏菌屬、克裡斯滕森氏菌屬、布勞特氏菌屬、腸球菌屬、真桿菌屬、拜瑞氏菌屬、擬桿菌屬、副擬桿菌屬或Erysipelatoclostridium*

o *產氫營養型布勞特氏菌、排泄物布勞特氏菌、韋氏布勞特氏菌、糞真桿菌、扭曲真桿菌、直腸真桿菌、糞腸球菌、耐久腸球菌、Enterococcus villorum、鶏雞腸球菌；乳酸雙歧桿菌、兩歧雙歧桿菌、長雙歧桿菌、動物雙歧桿菌或短雙歧桿菌*

o *BCG、副擬桿菌屬、布勞特氏菌屬、韋榮氏球菌屬、唾液乳桿菌、阿加薩桿菌屬、活潑瘤胃球菌、解苯副梭菌、Turicibacter sanguinus、伯克霍爾德菌*

屬、類肺炎克雷白氏菌擬肺炎亞種、催產克雷白氏菌、納西利斯泰澤菌或奈瑟菌屬

- o *產氫營養型布勞特氏菌*
- o *排泄物布勞特氏菌*
- o *韋氏布勞特氏菌*
- o *鶉雞腸球菌*
- o *屎腸球菌*
- o *兩歧雙歧桿菌*
- o *短雙歧桿菌*
- o *長雙歧桿菌*
- o *人羅斯拜瑞氏菌*
- o *多形擬桿菌*
- o *糞居擬桿菌*
- o *Erysipelatoclostridium ramosum*
- o *巨型球菌屬，包括馬賽巨型球菌（Megasphera massiliensis）*
- o *狄氏副擬桿菌*
- o *扭曲真桿菌*
- o *霍氏真桿菌*
- o *Intestimonas butyriciproducens*
- o *澳大利亞鏈球菌*
- o *挑剔真桿菌*
- o *普氏糞桿菌*
- o *糞厭氧棒狀菌*
- o *丹毒絲菌科*

- *理研菌科*
- *乳球菌屬、普雷沃菌屬、雙歧桿菌屬、韋榮氏球菌屬*
- *乳酸乳球菌乳脂亞種*
- *棲組織普雷沃菌*
- *動物雙歧桿菌乳酸亞種*
- *小韋榮氏球菌*

【0202】 在一些實施方式中，mEV來自乳酸乳球菌乳脂亞種細菌，例如來自與乳酸乳球菌乳脂亞種菌株A（ATCC指定編號PTA-125368）的核苷酸序列具有至少90%或至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，mEV來自乳球菌屬細菌，例如來自ATCC指定編號PTA-125368的乳酸乳球菌乳脂亞種菌株A。

【0203】 在一些實施方式中，mEV來自普雷沃菌屬細菌，例如來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329（NRRL登錄號B 50329）的核苷酸序列有至少90%或至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，mEV來自普雷沃菌屬細菌，例如來自NRRL登錄號B 50329的普雷沃菌菌株B 50329。

【0204】 在一些實施方式中，mEV來自雙歧桿菌屬細菌，例如來自與雙歧桿菌屬細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-125097）的核苷酸序列具有至少90%或至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式中，mEV來自雙歧桿菌屬細菌，例如來自保藏為ATCC指定編號PTA-125097的雙歧桿菌屬細菌。

【0205】 在一些實施方式中，mEV來自韋榮球氏菌屬細菌，例如來自與韋榮球氏菌屬細菌（保藏為ATCC指定編號PTA-125691）的核苷酸序列具有至少90%或至少99%基因組、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些實施方式

中，mEV來自韋榮氏球菌屬細菌，例如來自保藏為ATCC指定編號PTA-125691的韋榮氏球菌屬細菌。

經修飾mEV

【0206】 在一些方面，本文描述之mEV（例如smEV）被修飾，使得它們包含、連接至和/或結合治療性部分。

【0207】 在一些實施方式中，該治療性部分係癌症特異性部分。在一些實施方式中，該癌症特異性部分對癌細胞具有結合特異性（例如對癌症特異性抗原具有結合特異性）。在一些實施方式中，該癌症特異性部分包含抗體或其抗原結合片段。在一些實施方式中，該癌症特異性部分包含T細胞受體或嵌合抗原受體（CAR）。在一些實施方式中，該癌症特異性部分包含表現於癌細胞表面上受體的配位基或其受體結合片段。在一些實施方式中，該癌症特異性部分係二分（bipartite）融合蛋白，其具有兩個部分：結合至和/或連接至細菌的第一部分及可結合至癌細胞（例如藉由對癌症特異性抗原具有結合特異性）的第二部分。在一些實施方式中，該第一部分係全長肽聚糖識別蛋白（諸如PGRP）的片段或全長肽聚糖識別蛋白。在一些實施方式中，該第一部分對mEV具有結合特異性（例如藉由對細菌抗原具有結合特異性）。在一些實施方式中，該第一和/或第二部分包含抗體或其抗原結合片段。在一些實施方式中，該第一和/或第二部分包含T細胞受體或嵌合抗原受體（CAR）。在一些實施方式中，該第一和/或第二部分包含表現於癌細胞表面上受體的配位基或其受體結合片段。在某些實施方式中，癌症特異性部分及mEV的共投與（組合投與或分開投與）增加mEV靶向癌細胞。

【0208】 在一些實施方式中，本文描述之mEV經修飾使得它們包含、連接至和/或結合磁性和/或順磁性部分（例如磁珠）。在一些實施方式中，該磁性和/或順磁性部分包含細菌和/或直接連接至細菌。在一些實施方式中，該磁性和/

或順磁性部分連接至結合至mEV的mEV結合部分的一部分和/或為結合至mEV的mEV結合部分的一部分。在一些實施方式中，該mEV結合部分係全長肽聚糖識別蛋白（諸如PGRP）的片段或全長肽聚糖識別蛋白。在一些實施方式中，該mEV結合部分具有對mEV的結合特異性（例如藉由對細菌抗原具有結合特異性）。在一些實施方式中，該mEV結合部分包含抗體或其抗原結合片段。在一些實施方式中，該mEV結合部分包含T細胞受體或嵌合抗原受體（CAR）。在一些實施方式中，該mEV結合部分包含表現於癌細胞表面上受體的配位基或其受體結合片段。在某些實施方式中，磁性和/或順磁性部分及mEV的共投與（一起投與或分開投與）可用以增加mEV靶向例如癌症細胞和/或受試者存在癌細胞的一部分。

分泌型微生物胞外囊泡（smEV）的產生

【0209】 在某些方面，本文描述之smEV可以使用本領域已知的任何方法製備。

【0210】 在一些實施方式中，在沒有smEV純化步驟的情況下製備smEV。例如，在一些實施方式中，本文描述之細菌藉由使用讓smEV保持完整之方法被殺死且將所得的細菌組分（包括smEV）用於本文描述之方法及組成物中。在一些實施方式中，該等細菌藉由使用抗生素（例如，使用本文描述之抗生素）被殺死。在一些實施方式中，該等細菌藉由使用UV照射被殺死。在一些實施方式中，細菌被熱殺死。

【0211】 在一些實施方式中，本文所述之smEV純化自一種或多種其他細菌組分。用於自細菌純化smEV之方法為本領域中已知。在一些實施方式中，smEV藉由使用S. Bin Park等人, PLoS ONE. 6(3):e17629 (2011)或G. Norheim等人, PLoS ONE.[公共科學圖書館·綜合] 10(9): e0134353 (2015)或Jeppesen等人 Cell[細胞]177:428 (2019)中描述之方法製備自細菌培養物，該等文獻的各者以全文引用

的方式併入本文中。在一些實施方式中，該等細菌經培養至高光密度及然後經離心以使細菌沈澱（例如，在4°C下以10,000 x g離心30 min，在4°C下以15,500 x g離心15 min）。在一些實施方式中，然後使培養上清液通過過濾器以排除完整細菌細胞（例如，0.22 μm過濾器）。在一些實施方式中，然後對上清液進行切向流過濾，在此過程中，將上清液濃縮，除去小於100 kDa的物質，並用PBS對培養基進行部分交換。在一些實施方式中，經過濾的上清液經離心以使細菌smEV沈澱（例如，在4°C下以100,000至150,000 x g離心1至3小時，在4°C下以200,000 x g離心1至3小時）。在一些實施方式中，該等smEV藉由重新懸浮所得smEV沈澱物（例如，於PBS中），並將重新懸浮的smEV施用至Optiprep（碘克沙醇）梯度或梯度（例如30%至60%不連續的梯度、0-45%不連續的梯度），接著離心（例如，在4°C下以200,000 x g離心4至20小時）加以進一步純化。可以收集smEV帶，用PBS稀釋並離心以使smEV沈澱（例如，在4°C下以150,000 x g離心3小時，在4°C下以200,000 x g離心1小時）。純化的smEV可經儲存（例如，在-80°C或-20°C下）直至使用。在一些實施方式中，該等smEV藉由用DNA酶和/或蛋白酶K處理加以進一步純化。

【0212】 例如，在一些實施方式中，細菌的培養物可在4°C下以11,000 x g離心20至40分鐘以使細菌沈澱。可使培養上清液通過0.22 μm過濾器以排除完整細菌細胞。然後可使用可包括但不限於硫酸銨沈澱、超離心或過濾之方法濃縮經過濾的上清液。例如，就硫酸銨沈澱而言，可將1.5-3 M硫酸銨緩慢添加至經過濾的上清液，同時在4°C下攪拌。可在4°C下將沈澱培養8至48小時及然後在4°C下以11,000 x g離心20至40分鐘。所得沈澱物含有細菌smEV及其他碎片。可使用超離心，經過濾的上清液在4°C下以100,000至200,000 x g離心1至16小時。此離心的沈澱物含有細菌smEV和其他碎片（例如大蛋白複合物）。在一些實施方式

中，使用過濾技術，如藉由使用Amicon超自旋過濾器或藉由切向流過濾，上清液可經過濾以便於保留分子量 > 50或100 kDa的物質。

【0213】 可替代地，例如藉由將生物反應器連接至細胞培養交替切向流（ATF）系統（例如來自Repligen的XCell ATF），可在生長期間或在生長期間的選定時間點，從細菌培養物連續獲得smEV。該ATF系統保留完整細胞（> 0.22 um）於生物反應器中，及容許較小組分（例如，smEV、游離蛋白質）通過過濾器以供收集。例如，該系統可經結構設計使得 < 0.22 um濾液然後通過100 kDa的第二過濾器，容許收集如在0.22 μm與100 kDa之間的smEV的物質，並將小於100 kDa的種類泵送回生物反應器中。可替代地，該系統可經結構設計以容許生物反應器中的培養基在培養物的生長期間得到補充和/或修飾。藉由此方法收集的smEV可藉由如上文描述用於經過濾的上清液的超離心或過濾進行進一步純化和/或濃縮。

【0214】 藉由本文提供之方法獲得的smEV可藉由基於尺寸的柱層析法、藉由親和層析法、藉由離子交換層析法及藉由梯度超離心，使用可包括但不限於使用蔗糖梯度或Optiprep梯度之方法加以進一步純化。簡言之，在使用蔗糖梯度方法時，如果使用硫酸銨沈澱或超離心來濃縮經過濾上清液，將沈澱物重新懸浮於60%蔗糖、30 mM pH 8.0 Tris中。如果使用過濾來濃縮經過濾上清液，則使用Amicon Ultra柱將濃縮物緩衝液交換至60%蔗糖、30 mM pH 8.0 Tris中。將樣本施加至35%-60%不連續蔗糖梯度中並在4°C下以200,000 × g離心持續3-24小時。簡而言之，在使用Optiprep梯度方法時，如果使用硫酸銨沈澱或超離心來濃縮經過濾上清液，則將沈澱物懸浮於PBS中並向樣本中添加3體積的60% Optiprep。在一些實施方式中，如果使用過濾來濃縮經過濾上清液，則使用60% Optiprep將濃縮物稀釋至最終濃度為35% Optiprep。將樣本施加至0-45%不連續的

Optiprep梯度，並在4°C下以200,000 x g離心3至24小時，例如，在4°C下離心4至24小時。

【0215】 在一些實施方式中，為證實smEV製劑的無菌性及分離，將smEV連續稀釋至瓊脂培養基（其用於測試中的細菌的例行培養）上，並使用例行條件進行培養。使未經滅菌的製劑通過0.22 um過濾器以去除完整細胞。為進一步增加純度，分離的smEV可用DNA酶或蛋白酶K處理。

【0216】 在一些實施方式中，為製備用於體內注射的smEV，純化的smEV如先前描述進行處理（G. Norheim等人, *PLoS ONE*. [公共科學圖書館·綜合]10(9): e0134353 (2015)）。簡而言之，在蔗糖梯度離心後，將含有smEV的帶於含有3%蔗糖的溶液中或熟悉該項技術者已知的適用於體內注射的其他溶液中重新懸浮至50 μg/mL的終濃度。此溶液還可含有濃度為0-0.5%（w/v）的佐劑（例如氫氧化鋁）。在一些實施方式中，為了製備用於體內注射的smEV，將PBS中的smEV無菌過濾至 < 0.22 um。

【0217】 在某些實施方式中，為製備與其他測試（例如用以在TEM成像或體外分析之前去除蔗糖）相容的樣本，使用過濾（例如Amicon Ultra柱）將樣本進行緩衝液交換至PBS或30 mM pH 8.0 Tris中，透析，或超離心（200,000 × g，≥ 3小時，4°C）並再懸浮。

【0218】 在一些實施方式中，smEV製劑的無菌性可藉由將一部分smEV接種至瓊脂培養基（其用於用以產生smEV的細菌的標準培養）上及使用標準條件進行培養加以證實。

【0219】 在一些實施方式中，藉由層析法及smEV上的結合表面部分來分離所選smEV並富集。在其他實施方式中，所選smEV藉由螢光細胞分選藉由使用親和試劑、化學染料、重組蛋白之方法或熟悉該項技術者已知的其他方法分離和/或富集。

【0220】 可以對smEV進行分析，例如，如Jeppesen等人 Cell[細胞] 177:428 (2019)所述。

【0221】 在一些實施方式中，凍乾smEV。

【0222】 在一些實施方式中，smEV被γ照射（例如，在17.5或25 kGy下）。

【0223】 在一些實施方式中，smEV被UV照射。

【0224】 在一些實施方式中，smEV被熱滅活（例如，在50°C下兩小時或在90°C下兩小時）。

【0225】 在一些實施方式中，smEV被酸處理。

【0226】 在一些實施方式中，smEV被噴氧（例如，以0.1 vvm持續兩小時）。

【0227】 生長階段會影響細菌和/或細菌產生的smEV的數量或性質。例如，在本文提供的smEV製備方法中，可以例如在對數生長期開始時、在對數生長期的中間時、和/或一旦達到穩定生長期時從培養物中分離smEV。

【0228】 生長環境（如培養條件）可影響細菌產生smEV的量。例如，smEV誘導因子可以增加smEV的產率，如表4所示。

[表4]：增加smEV產率的培養技術

smEV誘導	smEV誘導因子	作用於
溫度		
	加熱	應激反應
	RT至37°C溫度變化	模擬感染
	37°C至40°C溫度變化	熱性感染
ROS		
	白花丹素	氧化應激反應
	氫過氧化物異丙苯	氧化應激反應
	過氧化氫	氧化應激反應
抗生素		
	環丙沙星	細菌SOS反應
	建它黴素	蛋白質合成
	多黏菌素B	外膜

	D-環絲胺酸	細胞壁
滲壓劑		
	NaCl	滲透應激
金屬離子應激		
	鐵螯合 EDTA 低氯化血紅素	鐵水平 去除二價陽離子 鐵水平
培養基添加劑或去除		
	乳酸鹽 胺基酸剝奪 十六烷 葡萄糖 碳酸氫鈉 PQS 二胺+DFMO 高營養素 低營養素	生長 應激 應激 生長 ToxT誘導 水泡劑（vesiculator）（來自細菌） 膜錨定（僅negativicutes） 增強的生長
其他機制	氧 無半胱胺酸 誘導生物膜或絮凝 兩階段生長 噬菌體 尿素	厭氧生物中的氧應激 厭氧生物中的氧應激

【0229】 在本文提供的製備smEV之方法中，該方法可視需要包括在從細菌培養物中分離smEV之前，將細菌培養物暴露於smEV誘導因子。細菌培養物可以在對數生長期開始時、在對數生長期的中間時、和/或一旦達到穩定生長期時暴露於smEV誘導因子。

藥物組成物

【0230】 在某些實施方式中，本文提供包含mEV（例如smEV）的藥物組成物（例如，mEV組成物（例如，smEV組成物））。在一些實施方式中，mEV組成物包含mEV（例如smEV）和/或本文所述之mEV（例如smEV）和藥學上可接受的載劑的組合。在一些實施方式中，smEV組成物包含smEV和/或本文描述之smEV和藥學上可接受的載劑的組合。

【0231】 在一些實施方式中，藥物組成物包含基本上或完全不含完整細菌（例如活細菌，被殺死的細菌，減毒細菌）的mEV（例如smEV）。在一些實施方式中，藥物組成物包含mEV及完整細菌（例如，活細菌、被殺死的細菌、減毒細菌）。在一些實施方式中，藥物組成物包含來自表1、表2和/或表3中列舉的細菌菌株或物種中的一種或多種（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多種）的mEV。在一些實施方式中，藥物組成物包含來自表1、表2和/或表3中列舉的細菌菌株或物種中的一種的mEV。在一些實施方式中，藥物組成物包含凍乾的mEV（例如smEV）。在一些實施方式中，藥物組成物包含γ照射的mEV（例如smEV）。mEV（例如smEV）可以在mEV被分離（如製備）之後進行γ照射。

【0232】 在一些實施方式中，為定量細菌樣本中存在的mEV（例如smEV）和/或細菌的數量，可使用電子顯微術（例如，超薄冷凍切片的EM）以觀測mEV（例如smEV）和/或細菌並計數它們的相對數量。可替代地，可使用奈米顆粒跟蹤分析（NTA）、庫爾特計數或動態光散射（DLS）或這類技術的組合。NTA及庫爾特計數器計數顆粒並顯示它們的尺寸。DLS給出顆粒的粒度分佈，而非濃度。細菌通常具有1至2 um（微米）的直徑。完整範圍係0.2至20 um。來自庫爾特計數及NTA的組合結果可揭示給定樣本中的細菌和/或mEV（如smEV）數量。庫爾特計數揭示具有0.7至10 um的直徑的顆粒的數量。對於大多數細菌和/或mEV（如smEV）樣本，僅庫爾特計數器就可以顯示樣本中細菌和/或mEV（如smEV）的數量。對於NTA，可以從瑪律文泛分析公司（Malvern Pananlytical）

獲得Nanosight儀器。例如，NS300可以在10-2000nm範圍內視覺化和測量懸浮液中的顆粒。NTA允許計數例如直徑為50-1000 nm的顆粒的數目。DLS揭示具有於1 nm至3 um的近似範圍內的不同直徑的顆粒的分佈。

【0233】 mEV可以藉由本領域已知的分析方法（例如Jeppesen等人 Cell[細胞]177:428 (2019)）來表徵。

【0234】 在一些實施方式中，可以基於顆粒計數來量化mEV。例如，可以使用NTA測量mEV製劑的總蛋白含量。

【0235】 在一些實施方式中，可以基於蛋白質、脂質或碳水化合物的量來定量mEV。例如，mEV製劑的總蛋白含量可以使用布拉德福德測定進行測量。

【0236】 在一些實施方式中，mEV與源細菌的一種或多種其他細菌組分分離。在一些實施方式中，該藥物組成物進一步包含其他細菌組分。

【0237】 在某些實施方式中，從源細菌獲得的mEV製劑可基於亞群的物理特性（例如，大小、密度、蛋白含量、結合親和力）被分級成亞群。然後可以將mEV亞群中的一個或多個併入到本發明之藥物組成物中。

【0238】 在某些方面，本文提供了包含用於治療和/或預防疾病（例如癌症，自體免疫性疾病，炎性疾病或代謝性疾病）的mEV（例如smEV）的藥物組成物，以及製備和/或鑒定此類mEV之方法，和使用此類藥物組成物之方法（例如，單獨或與其他治療劑組合用於治療癌症、自體免疫性疾病、炎性疾病或代謝性疾病）。在一些實施方式中，藥物組成物包含mEV（例如smEV）及完整細菌（例如，活細菌、被殺死的細菌、減毒細菌）。在一些實施方式中，藥物組成物包含在不存在細菌的情況下的mEV（例如smEV）。在一些實施方式中，該等藥物組成物包含來自表1、表2和/或表3中列舉的細菌菌株或物種中的一種或多種的mEV（例如smEV）和/或細菌。在一些實施方式中，藥物組成物包含來自表

1、表2和/或表3中列舉的細菌菌株或物種中的一種的mEV（例如smEV）和/或細菌。

【0239】 在某些方面中，本文提供用於向受試者（例如人受試者）投與的藥物組成物。在一些實施方式中，該等藥物組成物與另外的活性和/或非活性材料組合以產生最終產品，其可呈單劑量單位或以多劑量形式。在一些實施方式中，藥物組成物與佐劑如免疫佐劑（例如STING促效劑、TLR促效劑或NOD促效劑）組合。

【0240】 在一些實施方式中，藥物組成物包含至少一種碳水化合物。

【0241】 在一些實施方式中，藥物組成物包含至少一種脂質。在一些實施方式中，脂質包括至少一種選自以下的脂肪酸：月桂酸（12:0）、肉豆蔻酸（14:0）、棕櫚酸（16:0）、棕櫚油酸（16:1）、珍珠酸（17:0）、十七碳烯酸（17:1）、硬脂酸（18:0）、油酸（18:1）、亞油酸（18:2）、亞麻酸（18:3）、十八碳四烯酸（18:4）、花生酸（20:0）、二十碳烯酸（20:1）、二十碳二烯酸（20:2）、二十碳四烯酸（20:4）、二十碳五烯酸（20:5）（EPA）、二十二烷酸（22:0）、二十二碳烯酸（22:1）、二十二碳五烯酸（22:5）、二十二碳六烯酸（22:6）（DHA）及二十四烷酸（24:0）。

【0242】 在一些實施方式中，藥物組成物包括至少一種補充礦物質或礦物質源。礦物質的實例包括但不限於：氯化物、鈉、鈣、鐵、鉻、銅、碘、鋅、鎂、錳、鉬、磷、鉀及硒。任一前述礦物質的合適形式包含可溶性礦物質鹽、微溶性礦物質鹽、不溶性礦物質鹽、螯合礦物質、礦物質複合物、非反應性礦物質（例如羰基礦物質及經還原礦物質）及其組合。

【0243】 在一些實施方式中，藥物組成物包括至少一種補充維生素。至少一種維生素可為脂肪可溶性或水可溶性維生素。合適維生素包括但不限於維生素C、維生素A、維生素E、維生素B12、維生素K、核黃素、菸酸（niacin）、維

生素D、維生素B6、葉酸、吡哆醇（pyridoxine）、硫胺素、泛酸及生物素。任一前述物質的合適形式係維生素鹽、維生素衍生物、與維生素具有相同或類似活性的化合物及維生素代謝物。

【0244】 在一些實施方式中，藥物組成物包含賦形劑。合適賦形劑的非限制性實例包含緩衝劑、防腐劑、穩定劑、黏合劑、壓實劑、潤滑劑、分散增強劑、崩解劑、矯味劑、甜味劑及著色劑。

【0245】 在一些實施方式中，賦形劑係緩衝劑。合適緩衝劑的非限制性實例包含檸檬酸鈉、碳酸鎂、碳酸氫鎂、碳酸鈣及碳酸氫鈣。

【0246】 在一些實施方式中，賦形劑包括防腐劑。合適防腐劑的非限制性實例包含抗氧化劑（例如α-生育酚及抗壞血酸鹽）及抗微生物劑（例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇及苯酚）。

【0247】 在一些實施方式中，藥物組成物包含作為賦形劑的黏合劑。合適黏合劑的非限制性實例包含澱粉、預膠凝澱粉、明膠、聚乙烯基吡咯啶酮、纖維素、甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素、聚丙烯醯胺、聚乙烯基噁唑烷酮、聚乙烯醇、C_{12}-C_{18}脂肪酸醇、聚乙二醇、多元醇、糖、寡糖及其組合。

【0248】 在一些實施方式中，藥物組成物包含作為賦形劑的潤滑劑。合適潤滑劑的非限制性實例包含硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、硬脂酸鋅、氫化植物油、sterotex（氫化蓖麻油）、聚氧乙烯單硬脂酸酯、滑石粉、聚乙二醇、苯甲酸鈉、月桂基硫酸鈉、月桂基硫酸鎂及輕質礦物油。

【0249】 在一些實施方式中，藥物組成物包含作為賦形劑的分散增強劑。合適分散劑的非限制性實例包含澱粉、海藻酸、聚乙烯基吡咯啶酮、瓜爾膠、高嶺土、膨潤土、經純化木質纖維素、羥乙酸澱粉鈉、異非晶形矽酸鹽及微晶纖維素（作為高HLB乳化劑表面活性劑）。

【0250】 在一些實施方式中，藥物組成物包含作為賦形劑的崩解劑。在一些實施方式中，崩解劑係非泡騰崩解劑。合適非泡騰崩解劑的非限制性實例包含澱粉（例如玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、其預膠凝及改性澱粉）、甜味劑、黏土（例如膨潤土）、微晶纖維素、海藻酸鹽、羥乙酸澱粉鈉、樹膠（例如瓊脂、瓜爾膠、刺槐豆膠、刺梧桐膠、果膠及黃蓍膠）。在一些實施方式中，崩解劑係泡騰崩解劑。合適泡騰崩解劑的非限制性實例包含碳酸氫鈉與檸檬酸的組合，以及碳酸氫鈉與酒石酸的組合。

【0251】 在一些實施方式中，藥物組成物係食物產品（例如食物或飲料），例如健康食物或飲料、嬰兒用食物或飲料、用於孕婦、運動員、老年人或其他特定人群的食物或飲料、功能食物、飲料、用於指定健康應用的食物或飲料、膳食補充劑、患者用食物或飲料或動物飼料。食物及飲料的具體實例包含多種飲料，例如果汁、清涼飲料、茶飲料、飲料製劑、果凍飲料及功能飲料；酒精性飲料，例如啤酒；含有碳水化合物的食物，例如粳米食物產品、麵條、麵包及麵團；膏產品，例如魚火腿、香腸、海鮮膏產品；蒸煮袋產品，例如咖喱、敷有厚澱粉醬的食品及中國燉湯；湯；乳製產品，例如乳液、乳製飲料、冰淇淋、乳酪及酸乳；發酵產品，例如發酵豆瓣醬膏、酸乳、發酵飲料及泡菜；豆產品；多種糖果產品，包含餅乾、曲奇等；冰糖、口香糖、軟糖；冷甜點，包含果膠、焦糖布丁及速凍點心；速熟食物，例如即溶湯料及即溶大豆湯料；可微波食物；等等。另外，實例還包含以粉劑、粒劑、錠劑、膠囊、液體、膏及果膠的形式製得的健康食物及飲料。

【0252】 在一些實施方式中，藥物組成物係用於動物（包括人）的食物產品。除人外的動物無特定限制，且該組成物可用於各種牲畜、家禽、寵物、實驗動物，及類似物。動物的具體實例包括豬、牛、馬、綿羊、山羊、雞、野鴨、

鴕鳥、家鴨、狗、貓、兔、倉鼠、小鼠、大鼠、猴，及類似物，但該等動物不限於此。

劑型

【0253】 包含mEV（例如smEV）的藥物組成物可以配製為固體劑型，例如用於口服投與。固體劑型可包含一種或多種賦形劑，例如藥學上可接受的賦形劑。固體劑型中的mEV可為分離的mEV。視需要，固體劑型中的mEV可以被凍乾。視需要，固體劑型中的mEV被γ照射。固體劑型可以包括片劑、微型片劑、膠囊、丸劑或粉末；或該等形式的組合（例如，包含在膠囊中的微型片劑）。

【0254】 固體劑型可以包括片劑（例如，> 4 mm）。

【0255】 固體劑型可以包括微型片劑（例如，1-4 mm大小的微型片劑，例如，2mm微型片劑或3mm微型片劑）。

【0256】 固體劑型可以包括膠囊，例如大小00、大小0、大小1、大小2、大小3、大小4或大小5的膠囊；例如大小0的膠囊。

【0257】 固體劑型可以包括包衣。固體劑型可以包括單層包衣，例如腸溶包衣，例如基於Eudragit的包衣，例如EUDRAGIT L30 D-55、檸檬酸三乙酯和滑石。固體劑型可以包括兩層包衣。例如，內包衣可以包括例如EUDRAGIT L30 D-55、檸檬酸三乙酯、滑石、無水檸檬酸和氫氧化鈉，並且外包衣可以包括例如EUDRAGIT L30 D-55、檸檬酸三乙酯和滑石。EUDRAGIT係各種各樣聚甲基丙烯酸酯基共聚物的品牌名稱。它包括基於甲基丙烯酸和甲基丙烯酸/丙烯酸酯或其衍生物的陰離子、陽離子和中性共聚物。Eudragit係玻璃化轉變溫度在9°C至 > 150°C之間的無定形聚合物。Eudragit係不可生物降解的、不可吸收的、並且無毒的。陰離子型Eudragit L在pH > 6時溶解，並且用於腸溶包衣，而在pH > 7時溶解的Eudragit S用於結腸靶向。具有季銨基團的Eudragit RL和RS係水不溶性

的，但可溶脹/可滲透的聚合物，其適用於緩釋薄膜包衣應用。陽離子型Eudragit E（在pH ≥ 5時不溶解）能阻止藥物在唾液中的釋放。

【0258】 固體劑型（例如膠囊）可以包括單層包衣，例如非腸溶包衣，例如HPMC（羥基丙基甲基纖維素）或明膠。

【0259】 包含mEV（例如smEV）的藥物組成物可以配製為懸浮液，例如用於口服投與或用於注射。注射投與包含靜脈內（IV）、肌內（IM）、腫瘤內（IT）及皮下（SC）投與。對於懸浮液，mEV可以在緩衝液中，例如藥學上可接受的緩衝液，例如生理鹽水或PBS。懸浮液可以包含一種或多種賦形劑，例如藥學上可接受的賦形劑。懸浮液可以包含例如蔗糖或葡萄糖。懸浮液中的mEV可為分離的mEV。視需要，懸浮液中的mEV可以被凍乾。視需要，懸浮液中的mEV可以被γ照射。

劑量

【0260】 對於人受試者的口服投與，mEV（例如smEV）的劑量可為例如約$2x10^6$-約$2x10^{16}$個顆粒。劑量可為例如約1×10^7-約1×10^{15}、約1×10^8-約1×10^{14}、約1×10^9-約1×10^{13}、約1×10^{10}-約1×10^{14}、或約1×10^8-約1×10^{12}個顆粒。劑量可為例如約2×10^6、約2×10^7、約2×10^8、約2×10^9、約1×10^{10}、約2×10^{10}、約2×10^{11}、約2×10^{12}、約2×10^{13}、約2×10^{14}或約1×10^{15}個顆粒。劑量可為例如約2×10^{14}個顆粒。劑量可為例如約2×10^{12}個顆粒。劑量可為例如約2×10^{10}個顆粒。劑量可為例如約1×10^{10}個顆粒。顆粒計數可以例如藉由NTA來確定。

【0261】 對於人受試者的口服投與，mEV（例如smEV）的劑量可以例如基於總蛋白。劑量可為例如約5 mg至約900 mg總蛋白。劑量可為例如約20 mg至約800 mg、約50 mg至約700 mg、約75 mg至約600 mg、約100 mg至約500 mg、約250 mg至約750 mg、或約200 mg至約500 mg總蛋白。劑量可為例如約10 mg、約25 mg、約50 mg、約75 mg、約100 mg、約150 mg、約200 mg、約250 mg、約

300 mg、約400 mg、約500 mg、約600 mg或約750 mg總蛋白。總蛋白可以例如藉由布拉德福德測定來確定。

【0262】 對於藉由注射（例如，靜脈內投與）投與給人受試者，mEV（例如smEV）的劑量可為例如約1 x 10^6-約1 x 10^{16}個顆粒。劑量可為例如約1 x 10^7-約1 x 10^{15}、約1 x 10^8-約1 x 10^{14}、約1 x 10^9-約1 x 10^{13}、約1 x 10^{10}-約1 x 10^{14}、或約1 x 10^8-約1 x 10^{12}個顆粒。劑量可為例如約2 x 10^6、約2 x 10^7、約2 x 10^8、約2 x 10^9、約1 x 10^{10}、約2 x 10^{10}、約2 x 10^{11}、約2 x 10^{12}、約2 x 10^{13}、約2 x 10^{14}或約1 x 10^{15}個顆粒。劑量可為例如約1 x 10^{15}個顆粒。劑量可為例如約2 x 10^{14}個顆粒。劑量可為例如約2 x 10^{13}個顆粒。顆粒計數可以例如藉由NTA來確定。

【0263】 對於注射投與（例如靜脈內投與），mEV（例如smEV）的劑量可為例如約5 mg至約900 mg總蛋白。劑量可為例如約20 mg至約800 mg、約50 mg至約700 mg、約75 mg至約600 mg、約100 mg至約500 mg、約250 mg至約750 mg、或約200 mg至約500 mg總蛋白。劑量可為例如約10 mg、約25 mg、約50 mg、約75 mg、約100 mg、約150 mg、約200 mg、約250 mg、約300 mg、約400 mg、約500 mg、約600 mg或約750 mg總蛋白。劑量可為例如約700 mg總蛋白。劑量可為例如約350 mg總蛋白。劑量可為例如約175 mg總蛋白。總蛋白可以例如藉由布拉德福德測定來確定。

γ照射

【0264】 粉末（例如mEV（如smEV）的粉末）可以在環境溫度下以17.5 Gy照射單位進行γ照射。

【0265】 冰凍生物量（例如mEV（如smEV）的冰凍生物量）可以在乾冰存在的情況下以25 kGy照射單位進行γ照射。

另外的治療劑

【0266】 在某些方面，本文提供之方法包括向受試者單獨地或與另外的治療劑組合地投與本文所述之藥物組成物。在一些實施方式中，另外的治療劑係免疫抑制劑、抗炎劑、類固醇和/或癌症治療劑。

【0267】 在一些實施方式中，在投與另外的治療劑之前（例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小時之前或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之前）向受試者投與包含mEV（例如smEV）的藥物組成物。在一些實施方式中，在投與另外的治療劑之後（例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小時之後或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之後）向受試者投與包含mEV（例如smEV）的藥物組成物。在一些實施方式中，包含mEV（例如smEV）的藥物組成物和另外的治療劑同時或幾乎同時投與給受試者（例如投與彼此在一小時內發生）。

【0268】 在一些實施方式中，在將包含mEV（例如smEV）的藥物組成物投與給受試者之前（例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小時之前或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之前）給受試者投與抗生素。在一些實施方式中，在將包含mEV（例如smEV）的藥物組成物投與給受試者之後（例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小時之後或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之後）給受試者投與抗生素。在一些實施方式中，包含mEV（例如smEV）的藥

物組成物和抗生素同時或幾乎同時投與給受試者（例如投與彼此在一小時內發生）。

【0269】 在一些實施方式中，另外的治療劑係癌症治療劑。在一些實施方式中，癌症治療劑係化學治療劑。該等化學治療劑的實例包含（但不限於）烷基化劑，例如噻替哌（thiotepa）及環磷醯胺（cyclosphosphamide）；磺酸烷基酯，例如白消安（busulfan）、英丙舒凡（improsulfan）及哌泊舒凡（piposulfan）；氮丙啶，例如苯并多巴（benzodopa）、卡波醌（carboquone）、米得哌（meturedopa）及烏得哌（uredopa）；乙撐亞胺及甲基密胺，包含六甲密胺（altretamine）、三乙撐密胺（triethylenemelamine）、三乙撐磷醯胺、三乙撐硫化磷醯胺及三羥甲基密胺（trimethylolomelamine）；番荔枝內酯（acetogenin）（尤其布拉他辛（bullatacin）及布拉他辛酮（bullatacinone））；喜樹鹼（camptothecin）（包含合成類似物托泊替康（topotecan））；苔蘚蟲素（bryostatin）；卡利抑制素（callystatin）；CC-1065（包含其合成類似物阿多來新（adozelesin）、卡折來新（carzelesin）及比折來新（bizelesin））；念珠藻素（cryptophycin）（尤其念珠藻素1及念珠藻素8）；朵拉司他汀（dolastatin）；多卡米星（duocarmycin）（包含合成類似物KW-2189及CB1-TM1）；艾榴塞洛素（eleutherobin）；水鬼蕉鹼（pancratistatin）；匍枝珊瑚醇（sarcodictyin）；海綿抑制素（spongistatin）；氮芥（nitrogen mustard），例如苯丁酸氮芥（chlorambucil）、萘氮芥（chlornaphazine）、氯磷醯胺（cholophosphamide）、雌氮芥（estramustine）、異環磷醯胺（ifosfamide）、氮芥（mechlorethamine）、鹽酸甲氧氮芥、美法侖（melphalan）、新氮芥（novembichin）、苯乙酸氮芥膽甾醇酯（phenesterine）、潑尼莫司汀（prednimustine）、曲磷胺（trofosfmaide）、尿嘧啶氮芥；亞硝基脲，例如卡莫司汀（carmustine）、氯脲菌素（chlorozotocin）、福莫司汀（fotemustine）、洛莫司汀（lomustine）、尼莫司汀（nimustine）及雷莫司汀（ranimnustine）；

抗生素，例如烯二炔抗生素（例如卡奇黴素（calicheamicin），尤其卡奇黴素γlI及卡奇黴素Ωl1；達內黴素（dynemicin），包含達內黴素A；雙膦酸鹽類，例如氯膦酸鹽（clodronate）；埃斯培拉黴素（esperamicin）；以及新製癌菌素發色團（neocarzinostatin chromophore）及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團）、阿克拉黴素（aclacinomysin）、放線菌素（actinomycin）、安麯黴素（authramycin）、氮雜絲胺酸、博來黴素（bleomycin）、放線菌素C（cactinomycin）、卡拉黴素（carabicin）、洋紅黴素（caminomycin）、嗜癌素（carzinophilin）、色黴素（chromomycin）、放線菌素D（dactinomycin）、柔紅黴素（daunorubicin）、地托比星（detorubicin）、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、多柔比星（doxorubicin）（包含味啉基-多柔比星、氰味啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星及去氧多柔比星）、表柔比星（epirubicin）、依索比星（esorubicin）、伊達比星（idarubicin）、麻西羅黴素（marcellomycin）、絲裂黴素（mitomycin）（例如絲裂黴素C）、黴酚酸（mycophenolic acid）、諾拉黴素（nogalamycin）、橄欖黴素（olivomycin）、培洛黴素（peplomycin）、泊非黴素（potfiromycin）、嘌呤黴素（puromycin）、三鐵阿黴素（quelamycin）、羅多比星（rodorubicin）、鏈黑菌素（streptonigrin）、鏈脲菌素（streptozocin）、殺結核菌素（tubercidin）、烏苯美司（ubenimex）、淨司他丁（zinostatin）、佐柔比星（zorubicin）；抗代謝物，例如胺甲喋呤（methotrexate）及5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）；葉酸類似物，例如二甲葉酸（denopterin）、胺甲喋呤、蝶羅呤（pteropterin）、曲美沙特（trimetrexate）；嘌呤類似物，例如氟達拉濱（fludarabine）、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤（thiamiprine）、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，例如安西他濱（ancitabine）、阿紮胞苷（azacitidine）、6-阿紮尿苷（6-azauridine）、卡莫氟（carmofur）、阿糖胞苷（cytarabine）、二去氧尿苷、去氧氟尿苷（doxifluridine）、依諾他濱（enocitabine）、氟尿苷（floxuridine）；雄激素，例如卡普睾酮（calusterone）、丙酸屈他雄酮

（dromostanolone propionate）、環硫雄醇（epitiostanol）、美雄烷（mepitiostane）、睾內酯酮（testolactone）；抗腎上腺素，例如胺魯米特（aminoglutethimide）、米托坦（mitotane）、曲洛司坦（trilostane）；葉酸補充劑，例如亞葉酸；乙醯葡醛酸內酯（aceglatone）；醛磷醯胺糖苷（aldophosphamide glycoside）；胺基乙醯丙酸（aminolevulinic acid）；恩尿嘧啶（eniluracil）；安吖啶（amsacrine）；百思布希（bestrabucil）；比生群（bisantrene）；依達曲沙（edatraxate）；地磷醯胺（defofamine）；秋水仙胺（demecolcine）；地吖醌（diaziquone）；依氟鳥胺酸（eflornithine）；依利乙銨（elliptinium acetate）；埃博黴素（epothilone）；依託格魯（etoglucid）；硝酸鎵；羥基脲；蘑菇多糖（lentinan）；氯尼達明（lonidainine）；類美坦辛（maytansinoid），例如美坦辛（maytansine）及柄型菌素（ansamitocin）；米托胍腙（mitoguazone）；米托蒽醌（mitoxantrone）；莫哌達醇（mopidanmol）；尼群克林（nitraerine）；噴司他汀（pentostatin）；蛋胺氮芥（phenamet）；吡柔比星（pirarubicin）；洛索蒽醌（losoxantrone）；鬼臼酸（podophyllinic acid）；2-乙基醯肼；丙卡巴肼（procarbazine）；PSK多糖複合物；雷佐生（razoxane）；根黴素（rhizoxin）；西佐喃（sizofuran）；鍺螺胺（spirogermanium）；細交鏈孢菌酮酸（tenuazonic acid）；三亞胺醌（triaziquone）；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯（trichothecene）（尤其T-2毒素、疣孢菌素（verrucarin）A、桿孢菌素（roridin）A及蛇形菌素（anguidine））；烏拉坦（urethan）；長春地辛（vindesine）；達卡巴啡（dacarbazine）；甘露莫司汀（mannomustine）；二溴甘露醇（mitobronitol）；二溴衛矛醇（mitolactol）；哌泊溴烷（pipobroman）；噶薩托辛（gacytosine）；阿拉伯糖苷（arabinoside）（「Ara-C」）；環磷醯胺；噻替派；紫杉烷（taxoid），例如太平洋紫杉醇（paclitaxel）及多西紫杉醇（doxetaxel）；苯丁酸氮芥；吉西他濱（gemcitabine）；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；胺甲喋呤；鉑配位錯合物，例如順鉑（cisplatin）、奧沙利鉑

（oxaliplatin）及卡鉑（carboplatin）；長春花鹼（vinblastine）；鉑；依託泊苷（etoposide）（VP-16）；異環磷醯胺；米托蒽醌（mitoxantrone）；長春新鹼（vincristine）；長春瑞濱（vinorelbine）；諾安托（novantrone）；替尼泊苷（teniposide）；依達曲沙；道諾黴素（daunomycin）；胺蝶呤（aminopterin）；希羅達（xeloda）；伊班膦酸鹽（ibandronate）；伊立替康（irinotecan）（例如CPT-11）；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸（DMFO）；類視黃醇，例如視黃酸；卡培他濱（capecitabine）；以及上述任何一種的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物。

【0270】 在一些實施方式中，癌症治療劑係癌症免疫療法藥劑。免疫療法係指使用受試者的免疫系統來治療癌症的治療，例如檢查點抑制劑、癌症疫苗、細胞介素、細胞療法、CAR-T細胞及樹突細胞療法。檢查點抑制劑免疫療法的非限制性實例包含尼沃魯單抗（Nivolumab）（BMS，抗PD-1）、派姆單抗（Pembrolizumab）（Merck，抗PD-1）、伊匹單抗（Ipilimumab）（BMS，抗CTLA-4）、MEDI4736（阿斯利康公司（AstraZeneca），抗PD-L1）及MPDL3280A（羅氏公司（Roche），抗PD-L1）。其他免疫療法可為腫瘤疫苗，例如Gardail、Cervarix、BCG、西普賽爾-T（sipulencel-T）、Gp100:209-217、AGS-003、DCVax-L、阿爾土賽爾-L（Algenpantucel-L）、特爾土賽爾-L（Tergenpantucel-L）、TG4010、ProstAtak、Prostvac-V/R-TRICOM、林多莫爾（Rindopepimul）、E75乙酸肽、IMA901、POL-103A、貝拉土賽爾-L（Belagenpumatucel-L）、GSK1572932A、MDX-1279、GV1001及替西泰德（Tecemotide）。免疫療法藥劑可經由注射（例如經靜脈內、經腫瘤內、經皮下或注射至淋巴結中）來投與，但還可經口、經局部或經由氣溶膠來投與。免疫療法可包括佐劑（例如細胞介素）。

【0271】 在一些實施方式中，免疫療法藥劑係免疫檢查點抑制劑。免疫檢查點抑制在廣義上係指抑制癌細胞可產生的檢查點以預防或下調免疫反應。免

疫檢查點蛋白的實例包括但不限於CTLA4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、KIR、LAG3、TIM-3或VISTA。免疫檢查點抑制劑可為結合至並抑制免疫檢查點蛋白的抗體或其抗原結合片段。免疫檢查點抑制劑的實例包括但不限於尼沃魯單抗、派姆單抗、匹利珠單抗（pidilizumab）、AMP-224、AMP-514、STI-A1110、TSR-042、RG-7446、BMS-936559、MEDI-4736、MSB-0010718C（阿維魯單抗）、AUR-012及STI-A1010。

【0272】 在一些實施方式中，本文提供之方法包括投與本文描述之藥物組成物與一種或多種另外的治療劑的組合。在一些實施方式中，本文揭示之方法包括投與兩種免疫療法藥劑（例如，免疫檢查點抑制劑）。例如，本文提供之方法包括將本文描述之藥物組成物與PD-1抑制劑（例如派姆單抗或尼沃魯單抗或匹利珠單抗）或CLTA-4抑制劑（例如伊匹單抗）或PD-L1抑制劑（例如阿維魯單抗）組合投與。

【0273】 在一些實施方式中，免疫療法藥劑係（例如）結合至癌症相關抗原的抗體或其抗原結合片段。癌症相關抗原的實例包括但不限於親脂素（adipophilin）、AIM-2、ALDH1A1、α-輔肌動蛋白-4、α-胎蛋白（「AFP」）、ARTC1、B-RAF、BAGE-1、BCLX（L）、BCR-ABL融合蛋白b3a2、β-鏈蛋白、BING-4、CA-125、CALCA、癌胚抗原（「CEA」）、CASP-5、CASP-8、CD274、CD45、Cdc27、CDK12、CDK4、CDKN2A、CEA、CLPP、COA-1、CPSF、CSNK1A1、CTAG1、CTAG2、細胞週期蛋白D1、細胞週期蛋白-A1、dek-can融合蛋白、DKK1、EFTUD2、延長因子2、ENAH（hMena）、Ep-CAM、EpCAM、EphA3、上皮腫瘤抗原（「ETA」）、ETV6-AML1融合蛋白、EZH2、FGF5、FLT3-ITD、FN1、G250/MN/CAIX、GAGE-1,2,8、GAGE-3,4,5,6,7、GAS7、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3、GnTV、gp100/Pmel17、GPNMB、HAUS3、海普森（Hepsin）、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、

IL13Rα2、腸羧基酯酶、K-ras、激肽釋放素4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1（又稱為CCDC110）、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、萊格西因（Lengsin）、M-CSF、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-C1、MAGE-C2、蘋果酸酶、乳腺珠蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、Melan-A/MART-1、Meloe、中期因子、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、黏蛋白、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌凝蛋白、I類肌凝蛋白、N-raw、NA88-A、新-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RARα融合蛋白、多態上皮黏蛋白（「PEM」）、PPP1R3B、PRAME、PRDX5、PSA、PSMA、PTPRK、RAB38/NY-MEL-1、RAGE-1、RBAF600、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、SAGE、分離蛋白1、SIRT2、SNRPD1、SOX10、Sp17、SPA17、SSX-2、SSX-4、STEAP1、存活蛋白、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF-βRII、TPBG、TRAG-3、磷酸丙糖異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶（「TYR」）、VEGF、WT1、XAGE-1b/GAGED2a。在一些實施方式中，抗原係新抗原。

【0274】 在一些實施方式中，免疫療法藥劑係癌症疫苗和/或癌症疫苗的組分（例如抗原性肽和/或蛋白質）。癌症疫苗可為蛋白質疫苗、核酸疫苗或其組合。例如，在一些實施方式中，癌症疫苗包括含有癌症相關抗原的表位的多肽。在一些實施方式中，癌症疫苗包括編碼癌症相關抗原的表位的核酸（例如DNA或RNA（例如mRNA））。癌症相關抗原的實例包括但不限於親脂素（adipophilin）、AIM-2、ALDH1A1、α-輔肌動蛋白-4、α-胎蛋白（「AFP」）、ARTC1、B-RAF、BAGE-1、BCLX（L）、BCR-ABL融合蛋白b3a2、β-鏈蛋白、BING-4、CA-125、CALCA、癌胚抗原（「CEA」）、CASP-5、CASP-8、CD274、CD45、Cdc27、CDK12、CDK4、CDKN2A、CEA、CLPP、COA-1、CPSF、CSNK1A1、

CTAG1、CTAG2、細胞週期蛋白D1、細胞週期蛋白-A1、dek-can融合蛋白、DKK1、EFTUD2、延長因子2、ENAH（hMena）、Ep-CAM、EpCAM、EphA3、上皮腫瘤抗原（「ETA」）、ETV6-AML1融合蛋白、EZH2、FGF5、FLT3-ITD、FN1、G250/MN/CAIX、GAGE-1,2,8、GAGE-3,4,5,6,7、GAS7、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3、GnTV、gp100/Pmel17、GPNMB、HAUS3、海普森（Hepsin）、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13Rα2、腸羧基酯酶、K-ras、激肽釋放素4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1（又稱為CCDC110）、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、萊格西因（Lengsin）、M-CSF、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-C1、MAGE-C2、蘋果酸酶、乳腺珠蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、Melan-A/MART-1、Meloe、中期因子、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、黏蛋白、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌凝蛋白、I類肌凝蛋白、N-raw、NA88-A、新-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RARα融合蛋白、多態上皮黏蛋白（「PEM」）、PPP1R3B、PRAME、PRDX5、PSA、PSMA、PTPRK、RAB38/NY-MEL-1、RAGE-1、RBAF600、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、SAGE、分離蛋白1、SIRT2、SNRPD1、SOX10、Sp17、SPA17、SSX-2、SSX-4、STEAP1、存活蛋白、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF-βRII、TPBG、TRAG-3、磷酸丙糖異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶（「TYR」）、VEGF、WT1、XAGE-1b/GAGED2a。在一些實施方式中，抗原係新抗原。在一些實施方式中，將癌症疫苗與佐劑一起投與。佐劑的實例包括但不限於免疫調節蛋白、佐劑65、α-GalCer、磷酸鋁、氫氧化鋁、磷酸鈣、β-葡聚糖肽、CpG ODN DNA、GPI-0100、脂質A、脂多糖、利波夫（Lipovant）、蒙塔尼（Montanide）、

N-乙醯基-胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸、Pam3CSK4、quil A、霍亂毒素（CT）及來自腸毒性大腸桿菌（*Escherichia coli*）的不耐熱毒素（LT），包括這類的衍生物（CTB、mmCT、CTA1-DD、LTB、LTK63、LTR72、dmLT）及海藻糖二黴菌酸酯。

【0275】 在一些實施方式中，免疫療法藥劑係用於受試者的免疫調節蛋白。在一些實施方式中，該免疫調節蛋白係細胞介素或趨化因子。免疫調節蛋白的實例包括但不限於B淋巴細胞化學引誘物（「BLC」）、C-C模體趨化因子11（「嗜酸性粒細胞趨化因子（Eotaxin）-1」）、嗜酸性粒細胞趨化蛋白2（「嗜酸性粒細胞趨化因子-2」）、粒細胞群落刺激因子（「G-CSF」）、粒細胞巨噬細胞群落刺激因子（「GM-CSF」）、1-309、細胞間黏附分子1（「ICAM-1」）、干擾素α（「IFN-α」）、干擾素β（「IFN-β」）、干擾素γ（「IFN-γ」）、白細胞介素-1α（「IL-1α」）、白細胞介素-1β（「IL-1β」）、白細胞介素1受體拮抗劑（「IL-1 ra」）、白細胞介素-2（「IL-2」）、白細胞介素-4（「IL-4」）、白細胞介素-5（「IL-5」）、白細胞介素-6（「IL-6」）、白細胞介素-6可溶性受體（「IL-6 sR」）、白細胞介素-7（「IL-7」）、白細胞介素-8（「IL-8」）、白細胞介素-10（「IL-10」）、白細胞介素-11（「IL-11」）、白細胞介素-12的亞基β（「IL-12 p40」或「IL-12 p70」）、白細胞介素-13（「IL-13」）、白細胞介素-15（「IL-15」）、白細胞介素-16（「IL-16」）、白細胞介素17A-F（「IL-17A-F」）、白細胞介素-18（「IL-18」）、白細胞介素-21（「IL-21」）、白細胞介素-22(「IL-22」)、白細胞介素-23(「IL-23」)、白細胞介素-33(「IL-33」)、趨化因子(C-C模體)配位基2(「MCP-1」)、巨噬細胞群落刺激因子(「M-CSF」)、由γ干擾素誘導的單核因子(「MIG」)、趨化因子(C-C模體)配位基2(「MIP-1α」)、趨化因子(C-C模體)配位基4(「MIP-1β」)、巨噬細胞炎症蛋白-1-δ(「MIP-1δ」)、血小板源生長因子亞基B（「PDGF-BB」）、趨化因子（C-C模體）配位基5、

調控活化正常T細胞表現及分泌蛋白（「RANTES」）、TIMP金屬肽酶抑制劑1（「TIMP-1」）、TIMP金屬肽酶抑制劑2（「TIMP-2」）、腫瘤壞死因子、淋巴毒素-α（「TNFα」）、腫瘤壞死因子、淋巴毒素-β（「TNFβ」）、1型可溶性TNF受體（「sTNFRI」）、sTNFRIIAR、腦源神經營養因子（「BDNF」）、鹼性成纖維細胞生長因子（「bFGF」）、骨成形性蛋白4（「BMP-4」）、骨成形性蛋白5(「BMP-5」)、骨成形性蛋白7(「BMP-7」)、神經生長因子(「b-NGF」)、表皮生長因子（「EGF」）、表皮生長因子受體（「EGFR」）、內分泌腺源血管內皮生長因子（「EG-VEGF」）、成纖維細胞生長因子4（「FGF-4」）、角質細胞生長因子（「FGF-7」）、生長分化因子15（「GDF-15」）、神經膠細胞源神經營養因子（「GDNF」）、生長激素、結合肝素的EGF樣生長因子（「HB-EGF」）、肝細胞生長因子（「HGF」）、胰島素樣生長因子結合蛋白1（「IGFBP-1」）、胰島素樣生長因子結合蛋白2（「IGFBP-2」）、胰島素樣生長因子結合蛋白3(「IGFBP-3」)、胰島素樣生長因子結合蛋白4(「IGFBP-4」)、胰島素樣生長因子結合蛋白6(「IGFBP-6」)、胰島素樣生長因子1(「IGF-1」)、胰島素、巨噬細胞群落刺激因子（「M-CSF R」）、神經生長因子受體（「NGF R」）、神經營養因子-3（「NT-3」）、神經營養因子-4（「NT-4」）、破骨細胞發生抑制因子（「護骨素（Osteoprotegerin）」）、血小板源生長因子受體（「PDGF-AA」）、磷脂醯肌醇-聚糖生物合成蛋白（「PIGF」）、Skp、Cullin、含有F-盒的複合物（「SCF」）、幹細胞介素受體（「SCF R」）、轉形生長因子α（「TGFα」）、轉形生長因子β-1（「TGFβ 1」）、轉形生長因子β-3（「TGFβ 3」）、血管內皮生長因子(「VEGF」)、血管內皮生長因子受體2(「VEGFR2」)、血管內皮生長因子受體3（「VEGFR3」）、VEGF-D 6Ckine、酪胺酸蛋白激酶受體UFO（「Axl」）、β細胞素（Betacellulin）（「BTC」）、黏膜相關上皮趨化因子（「CCL28」）、趨化因子（C-C模體）配位基27（「CTACK」）、趨

化因子（C-X-C模體）配位基16（「CXCL16」）、C-X-C模體趨化因子5（「ENA-78」）、趨化因子（C-C模體）配位基26（「嗜酸性粒細胞趨化因子-3」）、粒細胞趨化蛋白2（「GCP-2」）、GRO、趨化因子（C-C模體）配位基14（「HCC-l」）、趨化因子（C-C模體）配位基16（「HCC-4」）、白細胞介素-9（「IL-9」）、白細胞介素-17 F（「IL-17F」）、白細胞介素- 18結合蛋白（「IL-18 BPa」）、白細胞介素-28 A（「IL-28A」）、白細胞介素29（「IL-29」）、白細胞介素31（「IL-31」）、C-X-C模體趨化因子10（「IP-10」）、趨化因子受體CXCR3（「I-TAC」）、白血病抑制因子（「LIF」）、Light、趨化因子（C模體）配位基（「淋巴細胞趨化因子（Lymphotactin）」）、單核細胞化學吸引蛋白2（「MCP-2」）、單核細胞化學吸引蛋白3（「MCP-3」）、單核細胞化學吸引蛋白4（「MCP-4」）、巨噬細胞源趨化因子（「MDC」）、巨噬細胞遷移抑制因子（「MIF」）、趨化因子（C-C模體）配位基20（「MIP-3α」）、C-C模體趨化因子19（「MIP-3β」）、趨化因子（C-C模體）配位基23（「MPIF-1」）、巨噬細胞刺激蛋白α鏈（「MSPα」）、核小體組裝蛋白1樣4（「NAP-2」）、分泌磷蛋白1（「骨橋蛋白（Osteopontin）」）、肺及活化調控細胞介素（「PARC」）、血小板因子4（「PF4」）、基質細胞源因子- 1α（「SDF-1α」）、趨化因子（C-C模體）配位基17（「TARC」）、胸腺表現的趨化因子（「TECK」）、胸腺基質淋巴生成素（「TSLP 4- IBB」）、CD 166抗原（「ALCAM」）、分化簇80（「B7-1」）、腫瘤壞死因子受體超家族成員17（「BCMA」）、分化簇14（「CD14」）、分化簇30（「CD30」）、分化簇40（「CD40配位基」）、癌胚抗原相關細胞黏附分子1（膽管糖蛋白）（「CEACAM-1」）、死亡受體6（「DR6」）、去氧胸苷激酶（「Dtk」）、1型膜糖蛋白（「內皮糖蛋白（Endoglin）」）、受體酪胺酸蛋白激酶erbB-3（「ErbB3」）、內皮-白血球黏附分子1（「E-選擇素（Selectin）」）、細胞凋亡抗原1（「Fas」）、Fms樣酪胺酸激酶3（「Flt-3L」）、

腫瘤壞死因子受體超家族成員1（「GITR」）、腫瘤壞死因子受體超家族成員14（「HVEM」）、細胞間黏附分子3（「ICAM-3」）、IL-1 R4、IL-1 RI、IL-10 Rβ、IL-17R、IL-2Rγ、IL-21R、溶酶體膜蛋白2（「LIMPII」）、中性粒細胞明膠酶相關脂質運載蛋白（「脂質運載蛋白-2」）、CD62L（「L-選擇素」）、淋巴內皮（「LYVE-1」）、I類MHC多肽相關序列A（「MICA」）、I類MHC多肽相關序列B（「MICB」）、NRG1-β1、β-型血小板源生長因子受體（「PDGF Rβ」）、血小板內皮細胞黏附分子（「PECAM-1」）、RAGE、A型肝炎病毒細胞受體1（「TIM-1」）、腫瘤壞死因子受體超家族成員IOC（「TRAIL R3」）、特拉平（Trappin）蛋白轉麩醯胺酸酶結合結構域（「特拉平-2」）、尿激酶受體（「uPAR」）、血管細胞黏附蛋白1（「VCAM-1」）、XEDAR活化素A、野鼠色相關蛋白（「AgRP」）、核糖核酸酶5（「血管生成素（Angiogenin）」）、血管生成素（Angiopoietin）1、血管抑素（Angiostatin）、卡層析因（Catheprin）S、CD40、隱藏家族蛋白IB（「Cripto-1」）、DAN、Dickkopf相關蛋白1（「DKK-1」）、E-鈣黏蛋白、上皮細胞黏附分子（「EpCAM」）、Fas配位基（FasL或CD95L）、Fcg RIIB/C、卵泡抑素、半乳糖凝集素-7、細胞間黏附分子2（「ICAM-2」）、IL-13 Rl、IL-13R2、IL-17B、IL-2 Ra、IL-2 Rb、IL-23、LAP、神經元細胞黏附分子（「NrCAM」）、纖維蛋白溶酶原活化抑制劑- 1（「PAI-1」）、血小板源生長因子受體（「PDGF-AB」）、抵抗素（Resistin）、基質細胞源因子1（「SDF-1β」）、sgpl30、分泌型捲曲相關蛋白2（「ShhN」）、唾液酸結合免疫球蛋白型凝集素（「Siglec-5」）、ST2、轉形生長因子-β2（「TGFβ 2」）、Tie-2、血小板生成素（「TPO」）、腫瘤壞死因子受體超家族成員10D（「TRAIL R4」）、表現於骨髓性細胞上的觸發受體1（「TREM-1」）、血管內皮生長因子C（「VEGF-C」）、VEGFRl脂聯素、脂素（Adipsin）（「AND」）、α-胎蛋白（「AFP」）、血管生成素樣4（「ANGPTL4」）、β-2-微球蛋白（「B2M」）、基底細胞黏附分子

（「BCAM」）、碳水化合物抗原125（「CA125」）、癌症抗原15-3（「CA15-3」）、癌胚抗原（「CEA」）、cAMP受體蛋白（「CRP」）、人表皮生長因子受體2（「ErbB2」）、濾泡抑素、濾泡刺激素（「FSH」）、趨化因子（C-X-C模體）配位基1（「GROα」）、人絨毛膜促性腺激素（「βHCG」）、胰島素樣生長因子1受體（「IGF-1 sR」）、IL-1 sRII、IL-3、IL-18 Rb、IL-21、瘦素（Leptin）、基質金屬蛋白酶-1（「MMP-1」）、基質金屬蛋白酶-2（「MMP-2」）、基質金屬蛋白酶-3（「MMP-3」）、基質金屬蛋白酶-8（「MMP-8」）、基質金屬蛋白酶-9（「MMP-9」）、基質金屬蛋白酶-10（「MMP-10」）、基質金屬蛋白酶-13（「MMP-13」）、神經細胞黏附分子（「NCAM-1」）、巢蛋白（Entactin）（「巢蛋白（Nidogen）-1」）、神經元特異性烯醇酶（「NSE」）、抑瘤素（Oncostatin）M（「OSM」）、原降鈣素（Procalcitonin）、泌乳素（Prolactin）、前列腺特異性抗原（「PSA」）、結合唾液酸的Ig樣凝集素9（「Siglec-9」）、ADAM 17內肽酶（「TACE」）、甲狀腺球蛋白（Thyroglobulin）、金屬蛋白酶抑制劑4（「TIMP-4」）、TSH2B4、含有去整合素（Disintegrin）及金屬蛋白酶結構域的蛋白質9（「ADAM-9」）、血管生成素2、腫瘤壞死因子配位基超家族成員13/富酸性白胺酸核磷蛋白32家族成員B（「APRIL」）、骨成形性蛋白2（「BMP-2」）、骨成形性蛋白9（「BMP-9」）、補體組分5a（「C5a」）、細胞自溶酶L、CD200、CD97、趨化素（Chemerin）、腫瘤壞死因子受體超家族成員6B（「DcR3」）、脂肪酸結合蛋白2（「FABP2」）、成纖維細胞活化蛋白、α（「FAP」）、成纖維細胞生長因子19（「FGF-19」）、半乳糖凝集素-3、肝細胞生長因子受體（「HGF R」）、IFN-γα/β R2、胰島素樣生長因子2（「IGF-2」）、胰島素樣生長因子2受體（「IGF-2 R」）、白細胞介素-1受體6（「IL-1R6」）、白細胞介素24（「IL-24」）、白細胞介素33（「IL-33」）、激肽釋放素（Kallikrein）14、天門冬醯胺醯基內肽酶（「天門冬醯胺內肽酶（Legumain）」）、氧化型低密度脂蛋白受體1

（「LOX-1」）、甘露糖結合凝集素（「MBL」）、腦啡肽酶（Neprilysin）（「NEP」）、Notch同系物1、易位相關（果蠅（Drosophila））（「Notch-1」）、腎胚細胞瘤過度表現的蛋白（「NOV」）、骨活化素（Osteoactivin）、計劃化細胞死亡蛋白1（「PD-1」）、N-乙醯基胞壁醯基--L-丙胺酸醯胺酶（「PGRP-5」）、絲胺酸蛋白酶抑制劑（Serpin）A4、分泌型捲曲相關蛋白3（「sFRP-3」）、血栓調節蛋白（Thrombomodulin）、Toll樣受體2（「TLR2」）、腫瘤壞死因子受體超家族成員10A（「TRAIL Rl」）、運鐵蛋白（「TRF」）、WIF-lACE-2、白蛋白、AMICA、血管生成素4、B細胞活化因子（「BAFF」）、碳水化合物抗原19-9（「CA19-9」）、CD 163、叢生蛋白（Clusterin）、CRT AM、趨化因子（C-X-C模體）配位基14（「CXCL14」）、胱抑素（Cystatin）C、核心蛋白聚糖（Decorin）（「DCN」）、Dickkopf相關蛋白3（「Dkk-3」）、δ樣蛋白質1（「DLL1」）、胎球蛋白（Fetuin）A、肝素結合生長因子1（「aFGF」）、葉酸受體α（「FOLR1」）、弗林蛋白酶（Furin）、GPCR相關分選蛋白1（「GASP-1」）、GPCR相關分選蛋白2（「GASP-2」）、粒細胞群落刺激因子受體（「GCSF R」）、絲胺酸蛋白酶海普森（「HAI-2」）、白細胞介素-17B受體（「IL-17B R」）、白細胞介素27（「IL-27」）、淋巴細胞活化基因3（「LAG-3」）、缺脂脂蛋白A-V（「LDL R」）、胃蛋白酶原I、視黃醇結合蛋白4（「RBP4」）、SOST、類肝素硫酸蛋白聚糖（「共結合蛋白聚糖-1（Syndecan-1）」）、腫瘤壞死因子受體超家族成員13B（「TACI」）、組織因子通路抑制劑（「TFPI」）、TSP-1、腫瘤壞死因子受體超家族成員10b（「TRAIL R2」）、TRANCE、肌鈣蛋白I（Troponin I）、尿激酶纖維蛋白溶酶原活化劑（「uPA」）、鈣黏蛋白5、2型或VE-鈣黏蛋白（血管內皮）（還稱為CD144，「VE-鈣黏蛋白」）、WNT1可誘導型信號傳導通路蛋白1（「WISP-1」）及核因子κ B的受體活化劑（「RANK」）。

【0276】 在一些實施方式中，癌症治療劑係抗癌症化合物。示例性抗癌症化合物包括但不限於阿侖單抗（Campath®）、阿利維A酸（Panretin®）、阿那曲唑（Arimidex®）、貝伐單抗（Avastin®）、貝沙羅汀（Targretin®）、硼替佐米（Velcade®）、博舒替尼（Bosulif®）、本妥昔單抗（Adcetris®）、卡巴坦尼（Cometriq®）、卡菲佐米（Kyprolis®）、西妥昔單抗（Erbitux®）、克裡唑蒂尼（Xalkori®）、達沙替尼（Sprycel®）、地尼介白素（Ontak®）、鹽酸埃羅替尼（Tarceva®）、依維莫司（Afinitor®）、依西美坦（Aromasin®）、氟維司群（Faslodex®）、吉非替尼（Iressa®）、替坦異貝莫單抗（Zevalin®）、甲磺酸伊馬替尼（Gleevec®）、伊匹單抗（Yervoy®）、二對甲苯磺酸拉帕替尼（Tykerb®）、來曲唑(Femara®)、尼洛替尼(Tasigna®)、奧法木單抗(Arzerra®)、帕尼單抗（Vectibix®）、鹽酸帕唑帕尼（Votrient®）、帕妥珠單抗（Perjeta®）、普拉曲沙（Folotyn®）、瑞戈非尼（Stivarga®）、利妥昔單抗（Rituxan®）、羅米地辛(Istodax®)、甲苯磺酸索拉非尼(Nexavar®)、蘋果酸舒尼替尼(Sutent®)、他莫昔芬、西羅莫司（Torisel®）、托瑞米芬（Fareston®）、托西莫單抗及131I-托西莫單抗（Bexxar®）、曲妥珠單抗（Herceptin®）、維甲酸（Vesanoid®）、凡德他尼（Caprelsa®）、威羅菲尼（Zelboraf®）、伏立諾他（Zolinza®）及阿柏西普（Zaltrap®）。

【0277】 修飾調節基因表現及其他細胞功能的蛋白質的功能的示例性抗癌症化合物（例如，HDAC抑制劑，類視黃醇受體配位基）係伏立諾他（Zolinza®）、貝沙羅汀（Targretin®）及羅米地辛（Istodax®）、阿利維A酸（Panretin®）及維甲酸（Vesanoid®）。

【0278】 誘導細胞凋亡的示例性抗癌症化合物（例如，蛋白酶體抑制劑，葉酸拮抗劑）係硼替佐米（Velcade®）、卡菲佐米（Kyprolis™）及普拉曲沙（Folotyn®）。

【0279】 增加抗腫瘤免疫反應的示例性抗癌化合物（例如抗CD20、抗CD52；抗細胞毒性T淋巴細胞相關抗原-4）為利妥昔單抗（Rituxan®）、阿侖單抗（Campath®）、奧法木單抗（Arzerra®）及伊匹單抗（Yervoy™）。

【0280】 將毒劑遞送至癌細胞的示例性抗癌症化合物（例如，抗CD20-放射性核素融合物；IL-2-白喉毒素融合物；抗CD30-單甲基澳瑞他汀E（MMAE）-融合物）係托西莫單抗及131I-托西莫單抗（Bexxar®）及替坦異貝莫單抗（Zevalin®）、地尼介白素（Ontak®）及本妥昔單抗（Adcetris®）。

【0281】 其他示例性抗癌症化合物係小分子抑制劑及其結合物，例如，Janus激酶、ALK、Bcl-2、PARP、PI3K、VEGF受體、Braf、MEK、CDK及HSP90。

【0282】 示例性基於鉑的抗癌症化合物包括（例如）順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、賽特鉑、吡鉑、奈達鉑、三鉑（Triplatin）及脂鉑（Lipoplatin）。適用於治療的其他基於金屬的藥物包括但不限於基於釕的化合物、二茂鐵衍生物、基於鈦的化合物及基於鎵的化合物。

【0283】 在一些實施方式中，癌症治療劑係包括放射性核素的放射性部分。示例性放射性核素包括但不限於Cr-51、Cs-131、Ce-134、Se-75、Ru-97、I-125、Eu-149、Os-189m、Sb-119、I-123、Ho-161、Sb-117、Ce-139、In-111、Rh-103m、Ga-67、Tl-201、Pd-103、Au-195、Hg-197、Sr-87m、Pt-191、P-33、Er-169、Ru-103、Yb-169、Au-199、Sn-121、Tm-167、Yb-175、In-113m、Sn-113、Lu-177、Rh-105、Sn-117m、Cu-67、Sc-47、Pt-195m、Ce-141、I-131、Tb-161、As-77、Pt-197、Sm-153、Gd-159、Tm-173、Pr-143、Au-198、Tm-170、Re-186、Ag-111、Pd-109、Ga-73、Dy-165、Pm-149、Sn-123、Sr-89、Ho-166、P-32、Re-188、Pr-142、Ir-194、In-114m/In-114及Y-90。

【0284】 在一些實施方式中，癌症治療劑係抗生素。例如，如果根據本文提供之方法來檢測癌症相關細菌和/或癌症相關微生物組特徵的存在，則可投與

抗生素以從受試者消除癌症相關細菌。「抗生素」在廣義上係指能夠抑制或預防細菌感染的化合物。抗生素可以諸多方式（包含根據其用於特定感染之用途、其作用機制、其生物可用性或其靶微生物範圍（例如革蘭氏陰性細菌對革蘭氏陽性細菌、好氧細菌對厭氧細菌等））進行分類且可使用該等方式來殺死宿主的特定區域（「生態位」）中的特定細菌（Leekha等人，2011.General Principles of Antimicrobial Therapy[抗微生物療法的一般原則].Mayo Clin Proc.[梅歐醫院院刊] 86(2): 156-167）。在某些實施方式中，可使用抗生素來選擇性靶向特定生態位的細菌。在一些實施方式中，可使用已知治療包含癌症生態位的特定感染的抗生素來靶向癌症相關微生物（包含該生態位中非癌症相關細菌）。在其他實施方式中，在包含mEV（例如smEV）的藥物組成物之後投與抗生素。在一些實施方式中，在包含mEV（例如smEV）的藥物組成物之前投與抗生素。

【0285】 在一些方面，可基於殺細菌或細菌抑制性質來選擇抗生素。殺細菌抗生素包含破壞細胞壁（例如β-內醯胺）、細胞膜（例如達托黴素（daptomycin））或細菌DNA（例如氟喹喏酮（fluoroquinolone））的作用機制。細菌抑制劑抑制細菌複製且包含磺醯胺、四環素（tetracycline）及巨環內酯並藉由抑制蛋白質合成來發揮作用。另外，儘管一些藥物可在某些生物體中具有殺細菌性且在其他生物體中具有細菌抑制性，但知曉靶生物體使得熟悉該項技術者可選擇具有適當性質的抗生素。在某些治療條件中，細菌抑制抗生素抑制殺細菌抗生素的活性。因此，在某些實施方式中，並不組合殺細菌抗生素及細菌抑制抗生素。

【0286】 抗生素包括但不限於胺基糖苷、安莎黴素（ansamycin）、碳頭孢烯（carbacephem）、碳青黴烯（carbapenem）、頭孢菌素（cephalosporin）、糖肽、林可醯胺（lincosamide）、脂肽、巨環內酯、單醯胺菌素（monobactam）、硝基呋喃、噁唑烷酮、青黴素（penicillin）、多肽抗生素、喹喏酮（quinolone）、氟喹喏酮、磺醯胺、四環素及抗分枝桿菌化合物及其組合。

【0287】 胺基糖苷包括但不限於阿米卡星（Amikacin）、建它黴素（Gentamicin）、康黴素（Kanamycin）、新黴素（Neomycin）、奈替米星（Netilmicin）、妥布黴素（Tobramycin）、巴龍黴素（Paromomycin）及大觀黴素（Spectinomycin）。胺基糖苷可有效抵抗（例如）革蘭氏陰性細菌（例如大腸桿菌、克雷伯氏菌（Klebsiella）、銅綠假單胞菌（Pseudomonas aeruginosa）及土倫病法蘭西斯氏菌（Francisella tularensis））且抵抗某些好氧細菌，但對於專性/兼性厭氧菌具有較小有效性。據信，胺基糖苷結合至細菌30S或50S核糖體亞基，由此抑制細菌蛋白合成。

【0288】 安莎黴素包括但不限於格爾德黴素（Geldanamycin）、除莠黴素（Herbimycin）、利福黴素（Rifamycin）及曲張鏈菌素（Streptovaricin）。據信，格爾德黴素及除莠黴素抑制或改變熱休克蛋白90的功能。

【0289】 碳頭孢烯包括但不限於氯碳頭孢（Loracarbef）。據信，碳頭孢烯抑制細菌細胞壁合成。

【0290】 碳青黴烯包括但不限於厄他培南（Ertapenem）、多尼培南（Doripenem）、亞胺培南（Imipenem）/西司他丁（Cilastatin）及美羅培南（Meropenem）。碳青黴烯作為寬譜抗生素對革蘭氏陽性細菌及革蘭氏陰性細菌均具有殺細菌性。據信，碳青黴烯抑制細菌細胞壁合成。

【0291】 頭孢菌素包括但不限於頭孢羥胺苄（Cefadroxil）、頭孢唑啉（Cefazolin）、頭孢噻吩（Cefalotin）、頭孢金素（Cefalothin）、頭孢胺苄（Cefalexin）、頭孢克洛（Cefaclor）、頭孢孟多（Cefamandole）、頭孢西丁（Cefoxitin）、頭孢丙烯（Cefprozil）、頭孢呋辛（Cefuroxime）、頭孢克肟（Cefixime）、頭孢地尼（Cefdinir）、頭孢托侖（Cefditoren）、頭孢哌酮（Cefoperazone）、頭孢噻肟（Cefotaxime）、頭孢泊肟（Cefpodoxime）、頭孢他啶（Ceftazidime）、頭孢布烯（Ceftibuten）、頭孢唑肟（Ceftizoxime）、頭

孢曲松（Ceftriaxone）、頭孢吡肟（Cefepime）、頭孢他洛林酯（Ceftaroline fosamil）及頭孢比普（Ceftobiprole）。所選頭孢菌素可效抵抗（例如）革蘭氏陰性細菌及革蘭氏陽性細菌（包含假單胞菌（Pseudomonas）），某些頭孢菌素可有效抵抗甲氧西林（methicillin）抗性金黃色葡萄球菌（Staphylococcus aureus）（MRSA）。據信，頭孢菌素藉由破壞細菌細胞壁的肽聚糖層的合成來抑制細菌細胞壁合成。

【0292】 糖肽包括但不限於替考拉寧（Teicoplanin）、萬古黴素（Vancomycin）及特拉萬星（Telavancin）。糖肽可有效抵抗（例如）好氧及厭氧革蘭氏陽性細菌（包含MRSA及艱難梭菌（*Clostridium difficile*））。據信，糖肽藉由破壞細菌細胞壁的肽聚糖層的合成來抑制細菌細胞壁合成。

【0293】 林可醯胺包括但不限於克林達黴素（Clindamycin）及林可黴素（Lincomycin）。林可醯胺可有效抵抗（例如）厭氧細菌以及葡萄球菌屬（Staphylococcus）及鏈球菌屬（Streptococcus）。據信，林可醯胺結合至細菌50S核糖體亞基，由此抑制細菌蛋白合成。

【0294】 脂肽包括但不限於達托黴素。脂肽可有效抵抗（例如）革蘭氏陽性細菌。據信，脂肽結合至細菌膜並引起快速去極化。

【0295】 巨環內酯包括但不限於阿奇黴素（Azithromycin）、克拉黴素（Clarithromycin）、地紅黴素（Dirithromycin）、紅黴素（Erythromycin）、羅紅黴素（Roxithromycin）、醋竹桃黴素（Troleandomycin）、泰利黴素（Telithromycin）及螺旋黴素（Spiramycin）。巨環內酯可有效抵抗（例如）鏈球菌及支原體（Mycoplasma）。據信，巨環內酯結合至細菌或50S核糖體亞基，由此抑制細菌蛋白合成。

【0296】 單醯胺菌素包括但不限於胺曲南（Aztreonam）。單醯胺菌素可有效抵抗（例如）革蘭氏陰性細菌。據信，單醯胺菌素藉由破壞細菌細胞壁的肽聚糖層的合成來抑制細菌細胞壁合成。

【0297】 硝基呋喃包括但不限於呋喃唑酮（Furazolidone）及呋喃妥因（Nitrofurantoin）。

【0298】 噁唑烷酮包括但不限於利奈唑胺（Linezolid）、潑斯唑來（Posizolid）、雷得唑來（Radezolid）及特地唑胺（Torezolid）。據信，噁唑烷酮係蛋白質合成抑制劑。

【0299】 青黴素包括但不限於阿莫西林（Amoxicillin）、安比西林（Ampicillin）、阿洛西林（Azlocillin）、羧苄青黴素（Carbenicillin）、氯噻青黴素（Cloxacillin）、二氯噻青黴素（Dicloxacillin）、氟氯西林（Flucloxacillin）、美洛西林（Mezlocillin）、甲氧西林、萘夫西林（Nafcillin）、苯唑西林（Oxacillin）、青黴素G、青黴素V、哌拉西林（Piperacillin）、替莫西林（Temocillin）及替凱西林（Ticarcillin）。青黴素可有效抵抗（例如）革蘭氏陽性細菌、兼性厭氧菌（例如鏈球菌、疏螺旋體（Borrelia）及密螺旋體（Treponema））。據信，青黴素藉由破壞細菌細胞壁的肽聚糖層的合成來抑制細菌細胞壁合成。

【0300】 青黴素組合包括但不限於阿莫西林/克拉維酸鹽（clavulanate）、安比西林/舒巴坦（sulbactam）、哌拉西林/三唑巴坦（tazobactam）及替凱西林/克拉維酸鹽。

【0301】 多肽抗生素包括但不限於桿菌肽（Bacitracin）、黏菌素（Colistin）及多黏菌素（Polymyxin）B及E。多肽抗生素可有效抵抗（例如）革蘭氏陰性細菌。據信，某些多肽抗生素抑制涉及細菌細胞壁的肽聚糖層的合成的焦磷酸異戊二烯基酯，而其他多肽抗生素藉由置換細菌相對離子來去穩定細菌外膜。

【0302】 喹噁酮及氟喹噁酮包括但不限於環丙沙星（Ciprofloxacin）、依諾沙星（Enoxacin）、加替沙星（Gatifloxacin）、吉米沙星（Gemifloxacin）、左氧氟沙星（Levofloxacin）、洛美沙星（Lomefloxacin）、莫西沙星（Moxifloxacin）、萘啶酮酸（Nalidixic acid）、諾氟沙星（Norfloxacin）、氧氟沙星（Ofloxacin）、

曲伐沙星（Trovafloxacin）、格帕沙星（Grepafloxacin）、司帕沙星（Sparfloxacin）及替馬沙星（Temafloxacin）。喹喏酮/氟喹喏酮可有效抵抗（例如）鏈球菌屬及奈瑟菌屬（*Neisseria*）。據信，喹喏酮/氟喹喏酮抑制細菌DNA旋轉酶或拓撲異構酶IV，由此抑制DNA複製及轉錄。

【0303】 磺醯胺包括但不限於磺胺米隆（Mafenide）、磺胺醋醯（Sulfacetamide）、磺胺嘧啶（Sulfadiazine）、磺胺嘧啶銀、磺胺地索辛（Sulfadimethoxine）、磺胺甲噻二唑（Sulfamethizole）、磺胺甲噁唑（Sulfamethoxazole）、磺胺亞胺基（Sulfanilimide）、柳氮磺胺吡啶（Sulfasalazine）、磺胺異噁唑（Sulfisoxazole）、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑（Trimethoprim-Sulfamethoxazole）（複方磺胺甲噁唑（Co-trimoxazole））及磺醯胺基柯衣汀（Sulfonamidochrysoidine）。據信，磺醯胺藉由競爭性抑制二氫蝶酸合成酶來抑制葉酸合成，由此抑制核酸合成。

【0304】 四環素類包括但不限於地美環素（Demeclocycline）、強力黴素（Doxycycline）、米諾環素（Minocycline）、土黴素（Oxytetracycline）及四環素。四環素類可有效抵抗（例如）革蘭氏陰性細菌。據信，四環素結合至細菌30S核糖體亞基，由此抑制細菌蛋白合成。

【0305】 抗分枝桿菌化合物包括但不限於氯法齊明（Clofazimine）、胺苯碸（Dapsone）、卷麴黴素（Capreomycin）、環絲胺酸（Cycloserine）、乙胺丁醇（Ethambutol）、乙硫異菸醯胺（Ethionamide）、異菸酸肼（Isoniazid）、吡哄醯胺（Pyrazinamide）、利福平（Rifampicin）、利福布汀（Rifabutin）、利福噴丁（Rifapentine）及鏈黴素（Streptomycin）。

【0306】 合適的抗生素還包含胂凡納明（arsphenamine）、氯黴素（chloramphenicol）、磷黴素（fosfomycin）、夫西地酸（fusidic acid）、甲硝唑（metronidazole）、莫匹羅星（mupirocin）、平板黴素（platensimycin）、奎奴

普汀（quinupristin）/達福普汀（dalfopristin）、替吉環素（tigecycline）、替硝唑（tinidazole）、甲氧苄啶-阿莫西林（trimethoprim amoxicillin）/克拉維酸鹽、安比西林/舒巴坦、安福黴素-利托菌素（amphomycin ristocetin）、阿奇黴素、桿菌肽、卜福林（buforin）II、卡波黴素（carbomycin）、殺菌肽（cecropin）Pl、克拉黴素、紅黴素、呋喃唑酮、夫西地酸、夫西地鈉、短桿菌素（gramicidin）、亞胺培南、吲哚菌素（indolicidin）、交沙黴素（josamycin）、馬蓋納尼（magainan）II、甲硝唑（metronidazole）、硝基咪唑、米卡黴素（mikamycin）、變鏈素（mutacin）B-Ny266、變鏈素B-JHl 140、變鏈素J-T8、乳鏈球菌素（nisin）、乳鏈球菌素A、新生黴素（novobiocin）、竹桃黴素（oleandomycin）、奧斯立星（ostreogrycin）、哌拉西林/三唑巴坦、普那黴素（pristinamycin）、雷莫拉寧（ramoplanin）、牛蛙皮膚抗菌肽（ranalexin）、羅伊氏素（reuterin）、利福昔明（rifaximin）、薔薇黴素（rosamicin）、羅沙米星（rosaramicin）、大觀黴素、螺旋黴素、葡萄黴素（staphylomycin）、鏈黴殺陽素（streptogramin）、鏈黴殺陽素A、協同菌素（synergistin）、牛磺羅定（taurolidine）、替考拉寧、泰利黴素、替凱西林/克拉維酸（clavulanic acid）、三乙醯基竹桃黴素（triacetyloleandomycin）、泰洛星（tylosin）、短桿菌酪肽（tyrocidin）、短桿菌素（tyrothricin）、萬古黴素、維馬黴素（vemamycin）及維吉黴素（virginiamycin）。

【0307】 在一些實施方式中，另外的治療劑係免疫抑制劑、DMARD、止痛藥、類固醇、非類固醇抗炎藥（NSAID）或細胞介素拮抗劑，及其組合。代表性藥劑包括但不限於環孢素、類視黃醇、皮質類固醇、丙酸衍生物、乙酸衍生物、烯醇酸衍生物、芬那酸衍生物、Cox-2抑制劑、魯美昔布（lumiracoxib）、伊布洛芬（ibuprophen）、水楊酸膽鹼鎂（cholin magnesium salicylate）、非諾洛芬（fenoprofen）、雙水楊酯（salsalate）、二氟苯水楊酸（difunisal）、托美汀（tolmetin）、酮洛芬（ketoprofen）、氟比洛芬（flurbiprofen）、奧沙普秦

（oxaprozin）、吲哚美辛（indomethacin）、舒林酸（sulindac）、依託度酸（etodolac）、酮咯酸（ketorolac）、萘丁美酮（nabumetone）、萘普生（naproxen）、伐地考昔（valdecoxib）、依託考昔（etoricoxib）、MK0966；羅非昔布（rofecoxib）、對乙醯胺基酚（acetominophen）、塞來昔布（Celecoxib）、雙氯芬酸（Diclofenac）、曲馬多（tramadol）、吡羅昔康（piroxicam）、美洛昔康（meloxicam）、替諾昔康（tenoxicam）、屈昔康（droxicam）、氯諾昔康（lornoxicam）、伊索昔康（isoxicam）、甲芬那酸（mefanamic acid）、甲氯芬那酸（meclofenamic acid）、氟芬那酸（flufenamic acid）、托芬那酸（tolfenamic）、伐地考昔（valdecoxib）、帕瑞昔布（parecoxib）、依託度酸（etodolac）、吲哚美辛（indomethacin）、阿司匹林（aspirin）、伊布洛芬（ibuprophen）、非羅考昔（firocoxib）、胺甲喋呤（methotrexate（MTX））、抗瘧疾藥物（例如，羥基氯喹（hydroxychloroquine）及氯喹（chloroquine））、柳氮磺胺吡啶（sulfasalazine）、來氟米特（Leflunomide）、硫唑嘌呤（azathioprine）、環孢素（cyclosporin）、金鹽（gold salt）、米諾環素（minocycline）、環磷醯胺（cyclophosphamide）、D-青黴胺（D-penicillamine）、米諾環素（minocycline）、金諾芬（auranofin）、他克莫司（tacrolimus）、硫代苯酸金鈉（myocrisin）、苯丁酸氮芥（chlorambucil）、TNF α拮抗劑（例如，TNF α拮抗劑或TNF α受體拮抗劑），例如，阿達木單抗（Humira®）、依那西普（Enbrel®）、英夫利昔單抗（Remicade®；TA-650）、聚乙二醇賽妥珠單抗（Cimzia®；CDP870）、戈利木單抗（Simpom®；CNTO 148）、阿那白滯素（Kineret®）、利妥昔單抗（Rituxan®；MabThera®）、阿巴西普（Orencia®）、托珠單抗（RoActemra /Actemra®）、整合素拮抗劑（TYSABRI®（那他珠單抗））、IL-1拮抗劑（ACZ885（Ilaris））、阿那白滯素（Kineret®））、CD4拮抗劑、IL-23拮抗劑、IL-20拮抗劑、IL-6拮抗劑、BLyS拮抗劑（例如，阿塞西普、Benlysta®/LymphoStat-B®（貝利木單抗））、p38抑制劑、CD20拮抗劑（奧瑞珠單抗

（Ocrelizumab）、奧法木單抗（Arzerra®））、干擾素γ拮抗劑（芳妥珠單抗（Fontolizumab））、潑尼松龍（prednisolone）、強的松（Prednisone）、地塞米松（dexamethasone）、皮質醇（Cortisol）、可的松（cortisone）、氫化可的松（hydrocortisone）、甲基潑尼松龍（methylprednisolone）、倍他米松（betamethasone）、曲安奈德（triamcinolone）、倍氯米松（beclometasome）、氟氫可的松（fludrocortisone）、去氧皮質酮（deoxycorticosterone）、醛固酮（aldosterone）、強力黴素（Doxycycline）、萬古黴素（vancomycin）、吡格列酮（pioglitazone）、SBI-087、SCIO-469、Cura-100、Oncoxin + Viusid、TwHF、甲氧沙林（Methoxsalen）、維生素D-麥角鈣化醇（Vitamin D - ergocalciferol）、米那普侖（Milnacipran）、紫杉醇（Paclitaxel）、羅西格塔松（rosig tazone）、他克莫司（Tacrolimus）（Prograf®）、RADOOl、拉帕蒙（rapamune）、雷帕黴素（rapamycin）、福斯馬替尼（fostamatinib）、芬太尼（Fentanyl）、XOMA 052、福斯馬替尼二鈉（Fostamatinib disodium）、羅格列酮（rosightazone）、薑黃素（Curcumin）（Longvida™）、瑞舒伐他汀（Rosuvastatin）、馬拉韋羅（Maraviroc）、雷米普利（ramipnl）、米那普侖（Milnacipran）、考前列酮（Cobiprostone）、生長激素（somatropin）、tgAAC94基因治療媒劑、MK0359、GW856553、埃索美拉唑（esomeprazole）、依維莫司（everolimus）、曲妥珠單抗（trastuzumab）、JAKI及JAK2抑制劑、泛JAK抑制劑，例如，四環吡啶酮6（P6）、325、PF-956980、狄諾塞麥（denosumab）、IL-6拮抗劑、CD20拮抗劑、CTLA4拮抗劑、IL-8拮抗劑、IL-21拮抗劑、IL-22拮抗劑、整合素拮抗劑（Tysarbri®（那他珠單抗））、VGEF拮抗劑、CXCL拮抗劑、MMP拮抗劑、防禦素拮抗劑、IL-1拮抗劑（包括IL-1 β拮抗劑），及IL-23拮抗劑（例如，受體誘捕物、拮抗性抗體等）。

【0308】 在一些實施方式中，另外的治療劑係免疫抑制劑。免疫抑制劑的實例包括但不限於皮質類固醇激素、美沙拉啡（mesalazine）、美沙拉明（mesalamine）、柳氮磺胺吡啶（sulfasalazine）、柳氮磺胺吡啶衍生物、免疫抑制藥物、環孢素A、巯基嘌呤、硫唑嘌呤（azathiopurine）、強的松、胺甲喋呤、抗組胺藥、糖皮質激素、腎上腺素、茶鹼、色甘酸鈉、抗白三烯、用於鼻炎的抗膽鹼能藥物、TLR拮抗劑、發炎體抑制劑、抗膽鹼能解充血劑、肥大細胞穩定劑、單株抗IgE抗體、疫苗（例如，用於其中使過敏原的量逐漸增加的接種疫苗的疫苗）、細胞介素抑制劑（如抗IL-6抗體）、TNF抑制劑（如英夫利昔單抗、阿達木單抗、聚乙二醇賽妥珠單抗、戈利木單抗或依那西普及其組合）。

投與

【0309】 在某些方面中，本文提供向受試者遞送本文描述之藥物組成物（例如，包含mEV（例如smEV）的藥物組成物）之方法。在本文所提供方法的一些實施方式中，投與藥物組成物且聯合投與另外的治療劑。在一些實施方式中，藥物組成物包含與另外的治療劑共配製的mEV（例如smEV）。在一些實施方式中，包含mEV（例如smEV）的藥物組成物與另外的治療劑共同投與。在一些實施方式中，另外的治療劑在投與包含mEV（例如smEV）的藥物組成物之前（例如，約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50或55分鐘之前，約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小時之前，或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天之前）向受試者投與。在一些實施方式中，另外的治療劑在投與包含mEV（例如smEV）的藥物組成物之後（例如，約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50或55分鐘之後，約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小時之後，或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天之後）

向受試者投與。在一些實施方式中，相同的遞送模式用於遞送包含mEV（例如smEV）的藥物組成物和另外的治療劑兩者。在一些實施方式中，使用不同遞送模式以投與包含mEV（例如smEV）的藥物組成物及另外的治療劑。例如，在一些實施方式中，包含mEV（例如smEV）的藥物組成物經口投與，而另外的治療劑經由注射投與（例如，靜脈內、肌內和/或瘤內注射）。

【0310】 在一些實施方式中，本文所述之藥物組成物每天投與一次。在一些實施方式中，本文所述之藥物組成物每天投與兩次。在一些實施方式中，本文所述之藥物組成物被配製成每日劑量。在一些實施方式中，本文所述之藥物組成物配製為每天兩次劑量，其中每次劑量為每日劑量的一半。

【0311】 在某些實施方式中，本文所述之藥物組成物及劑型可與任一其他常規抗癌治療（例如放射療法及腫瘤手術切除術）聯合投與。該等治療可在需要和/或指示時施加且可發生於投與包含本文所述之mEV（例如smEV）及劑型的藥物組成物之前、同時或之後。

【0312】 劑量方案可為各種方法及量中的任一者，且可藉由熟悉該項技術者根據已知臨床因素來確定。如醫學技術中已知，任一患者的劑量可取決於許多因素，包含受試者物種、大小、體表面積、年齡、性別、免疫活性及總體健康狀況、有待投與的特定微生物、持續時間及投與途徑、疾病種類及階段（例如腫瘤大小）及其他化合物（例如同時或近乎同時投與的藥物）。除上述因素外，該等水平可受微生物感染性及微生物性質影響，如可由熟悉該項技術者所測定。在本發明之方法中，微生物的適當最小劑量程度可為足夠使微生物存活、生長及複製的程度。可根據劑型、投與途徑、靶疾病的程度或階段等來適當地設定或調節包含本文所述之mEV（例如smEV）的藥物組成物的劑量。例如，藥劑的一般有效劑量範圍可為0.01 mg/kg體重/天至1000 mg/kg體重/天、0.1 mg/kg體重/天至1000 mg/kg體重/天、0.5 mg/kg體重/天至500 mg/kg體重/天、1 mg/kg體

重/天至100 mg/kg體重/天或5 mg/kg體重/天至50 mg/kg體重/天。有效劑量可為0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500或1000 mg/kg體重/天或更高，但劑量並不限於此。

【0313】 在一些實施方式中，向受試者投與的劑量足以預防疾病（例如，自體免疫病、炎性疾病、代謝性疾病或癌症）、延遲其發作或減緩或停止其進展，或減輕疾病的一個或多個症狀。熟悉該項技術者將認識到，劑量將取決於多種因素，包含所採用特定藥劑（例如治療劑）的強度以及受試者的年齡、物種、病症及體重。還根據以下因素來確定劑量大小：投與途徑、時機及頻率以及可伴隨投與特定治療劑的任何不良副作用的存在、性質及程度及期望的生理學效果。

【0314】 可藉由熟悉該項技術者已知的常規範圍探測技術來確定合適的劑量及劑量方案。通常，以較小劑量開始治療，該劑量小於化合物的最佳劑量。然後，以小增量增加劑量直至達到該狀況下的最佳效果為止。有效劑量及治療方案可藉由常規及常規方式來確定，例如，其中在實驗室動物中以低劑量開始且然後增加劑量，同時監測效果，且還系統地改變劑量方案。通常使用動物研究來測定每公斤重量的生物活性藥劑的最大可耐受劑量（「MTD」）。熟悉該項技術者通常在其他物種（包含人）中外推劑量以達到功效，同時避免毒性。

【0315】 根據上文，在治療應用中，與影響所選劑量的其他因素相比，用於本發明之治療劑的劑量尤其取決於以下因素有所變化：活性劑、年齡、體重及接受患者的臨床狀況及投與療法的臨床醫師或從業人員的經歷及判斷。例如，對於癌症治療，劑量應足以導致減緩腫瘤的生長，較佳的是使腫瘤的生長消退，並且最較佳的是導致癌症的完全消退，或者轉移的大小或數目的減小。作為另一個實例，劑量應足以導致減緩受試者正在治療的疾病的進展，較佳的是改善受試者正在治療的疾病的一個或多個症狀。

【0316】 分開投與可包括任何數量的兩次或更多次投與，包括二、三、四、五或六次投與。熟悉該項技術者可容易地根據本領域中已知的用於監測治療方法之方法及本文提供的其他監測方法確定進行投與的次數或進行一或多次額外投與的期望。因此，本文提供之方法包括向受試者提供藥物組成物的一或多次投與之方法，其中投與次數可藉由監測受試者確定，且基於監測的結果，判定是否需提供一或多次另外投與。可基於各種監測結果決定是否需提供一或多次另外投與。

【0317】 投與間的時間段可為各個時間段中的任一者。投與間的時間段可隨各種因素中的任一者而變化，包括監測步驟（如關於投與數量所描述）、受試者建立免疫反應的時間段。在一個實例中，時間段可隨受試者建立免疫反應的時間段而變化；例如，時間段可大於受試者建立免疫反應的時間段，例如大於約一週、大於約10天、大於約兩週或大於約一個月；在另一個實例中，時間段可小於受試者建立免疫反應的時間段，例如小於約一週、小於約10天、小於約兩週或小於約一個月。

【0318】 在一些實施方式中，另外的治療劑與本文描述之藥物組成物的組合的遞送減少另外的治療劑的不良反應和/或改善另外的治療劑之功效。

【0319】 本文所述之另外的治療劑的有效劑量係針對特定受試者、組成物及投與模式有效達成所需治療劑反應且對受試者的毒性最小的另外的治療劑的量。可使用本文所述之方法來鑒別有效劑量水平且將取決於多種藥物動力學因素，包含所投與特定組成物或藥劑的活性、投與途徑、投與時間、所採用特定化合物的排泄速率、治療持續時間、與所採用特定組成物組合使用的其他藥物、化合物和/或材料、所治療受試者的年齡、性別、體重、病症、總體健康狀況及先前醫學史以及醫學技術中熟知的類似因素。一般而言，另外的治療劑的有效

劑量將是該另外的治療劑的量，其為有效產生治療效應的最低劑量。通常這樣的有效劑量將取決於上文所述之該等因素。

【0320】 另外的治療劑的毒性係受試者在治療期間及治療之後經受的不利效應的程度。與另外的治療劑毒性相關的不良事件可以包括但不限於：腹痛、酸消化不良、酸回流、過敏反應、禿髮、全身性過敏反應、貧血、焦慮、食欲不振、關節痛、乏力、運動失調、氮質血症、失去平衡、骨痛、出血、血凝塊、低血壓、血壓升高、呼吸困難、支氣管炎、淤血、白血球計數降低、紅血球計數降低、血小板計數降低、心臟毒性、膀胱炎、出血性膀胱炎、心律不整、心瓣膜疾病、心肌病、冠狀動脈疾病、白內障、中樞神經毒性、認知障礙、意識模糊、結膜炎、便秘、咳嗽、痙攣、膀胱炎、深層靜脈栓塞、脫水、抑鬱、腹瀉、眩暈、口乾、皮膚乾燥、消化不良、呼吸困難（dyspnea）、水腫、電解質不平衡、食道炎、疲乏、生育力喪失、發燒、胃腸積氣、面紅、胃逆流、胃食道逆流病、生殖器疼痛、粒細胞減少症、男子女乳症、青光眼、脫髮、手足綜合症、頭痛、聽覺損失、心臟衰竭、心悸、胃灼熱、血腫、出血性膀胱炎、肝毒性、高澱粉酶血症、高鈣血症、高氯血症、高糖血症、高鉀血症、高脂血症、高鎂血症、高鈉血症、高磷酸鹽血症、色素過多、高三酸甘油酯血症、高尿酸血症、低白蛋白血症、低鈣血症、低氯血症、低血糖症、低鉀血症、低鎂血症、低鈉血症、低磷酸鹽血症、陽萎、感染、注射部位反應、失眠、缺鐵、瘙癢、關節痛、腎衰竭、白血球減少症、肝功能障礙、失憶、閉經、口瘡、黏膜炎、肌肉痛、肌痛、骨髓抑制、心肌炎、嗜中性白血球減少性發燒、噁心、腎毒性、嗜中性白血球減少症、流鼻血、麻木、耳毒性、疼痛、手足綜合症（palmar-plantar erythrodysesthesia）、全部血球減少症、心包炎、周邊神經病變、咽炎、畏光、光敏感、肺炎（pneumonia）、局限性肺炎（pneumonitis）、蛋白尿、肺血栓、肺性纖維化、肺毒性、皮疹、心跳加快、直腸出血、坐立不安、鼻炎、癲癇、

呼吸短促、鼻竇炎、血小板減少症、耳鳴、泌尿道感染、陰道出血、陰道乾燥、眩暈、水滯留(water retention)、無力、體重減輕、體重增加及口乾症(xerostomia)。一般而言，如果經由療法所達到的受試者益處勝過受試者因療法所經歷的不良事件，則毒性係可接受的。

免疫障礙

【0321】 在一些實施方式中，本文所述之方法及藥物組成物關於治療或預防與病理學免疫反應相關的疾病或障礙（如自體免疫性疾病、過敏反應和/或炎性疾病）。在一些實施方式中，疾病或障礙係炎性腸病（例如，克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎）。在一些實施方式中，疾病或障礙係牛皮癬。在一些實施方式中，疾病或障礙係特應性皮炎。

【0322】 本文所述之方法可用以治療有需要的任何受試者。如本文中所使用，「有需要的受試者」包括患有與病理學免疫反應相關的疾病或障礙（例如，炎性腸病）的任何受試者，及具有增加獲得此疾病或障礙的可能性的任何受試者。

【0323】 本文所述之藥物組成物可（例如）用作預防或治療（部分或完全減少以下疾病的不利影響）自體免疫性疾病，如慢性炎性腸病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、穆-韋二氏綜合症、類風濕性關節炎、多發性硬化或橋本病（Hashimoto's disease）；過敏性疾病，如食物過敏、花粉熱或氣喘；傳染性疾病，如艱難梭菌感染；炎性疾病，如TNF介導的炎性疾病（例如，胃腸道炎性疾病，如結腸袋炎（pouchitis）；心血管炎性疾病，如動脈粥樣硬化；或炎性肺病，如慢性阻塞性肺疾病）的藥物組成物；用作用於抑制器官移植中的排斥或其中可能發生組織排斥的其他情況的藥物組成物；用作用於改善免疫功能的補充物、食物或飲料；或用作用於抑制免疫細胞的增殖或功能的試劑。

【0324】 在一些實施方式中，本文提供之方法適用於治療炎症。在某些實施方式中，身體的任何組織及器官的炎症，包括肌肉骨骼炎症、血管炎症、神經炎症、消化系統炎症、眼部炎症、生殖系統炎症及其他炎症，如下文討論。

【0325】 肌肉骨骼系統的免疫障礙包括但不限於那些影響骨骼關節（包括手、手腕、肘部、肩部、下巴、脊柱、頸部、臀部、膝蓋、踝部及足部的關節）的病症，及影響將肌肉連接至骨頭的組織（如肌腱）的病症。可用本文所述之方法及組成物治療的這類免疫障礙的實例包括但不限於關節炎（包括，例如，骨關節炎、類風濕性關節炎、牛皮癬關節炎、強直性脊柱炎、急性及慢性感染性關節炎、與痛風和假痛風相關的關節炎及幼年特發性關節炎）、肌腱炎、滑膜炎、腱鞘炎、滑囊炎、纖維組織炎（纖維肌痛）、上髁炎、肌炎及骨炎（包括，例如，佩吉特氏病（Paget's disease）、恥骨炎及囊性纖維性骨炎）。

【0326】 眼部免疫障礙係指影響眼睛的任何結構（包括眼瞼）的免疫障礙。可用本文所述之方法及組成物治療的眼部免疫障礙的實例包括但不限於瞼緣炎、眼瞼皮膚松垂症、結膜炎、淚腺炎、角膜炎、乾燥性角膜結膜炎（乾眼症）、葡膜炎、倒睫及眼色素層炎。

【0327】 可用本文所述之方法及組成物治療的神經系統免疫障礙的實例包括但不限於腦炎、格林-巴厘綜合症（Guillain-Barre syndrome）、腦膜炎、神經性肌強直、發作性睡病、多發性硬化、脊髓炎及精神分裂症。可用本文所述之方法及組成物治療的脈管系統或淋巴系統炎症的實例包括但不限於關節硬化、關節炎、靜脈炎、血管炎及淋巴管炎。

【0328】 可用本文所述之方法及藥物組成物治療的消化系統免疫障礙的實例包括但不限於膽管炎、膽囊炎、腸炎、小腸結腸炎、胃炎、腸胃炎、炎性腸病、回腸炎及直腸炎。炎性腸病包括（例如）一組相關病症的某些本領域公認的形式。已知炎性腸病的幾種主要形式，這類障礙中最常見的為克羅恩氏病

（區域性腸病，例如，非活性及活性形式）及潰瘍性結腸炎（例如，非活性及活性形式）。另外，炎性腸病涵蓋腸易激綜合症、顯微鏡下結腸炎、淋巴細胞性-漿細胞性腸炎、乳糜瀉、膠原性結腸炎、淋巴細胞性結腸炎及嗜酸性小腸結腸炎。IBD的其他不常見形式包括不確定性結腸炎、假膜性結腸炎（壞死性結腸炎）、缺血性炎性腸病、白塞氏病（Behcet's disease）、類肉瘤病、硬皮病、IBD相關性發育不良、與發育不良相關的腫塊或病變及原發性硬化性膽管炎。

【0329】 可用本文所述之方法及藥物組成物治療的生殖系統免疫障礙的實例包括但不限於子宮頸炎、絨毛膜羊膜炎、子宮內膜炎、附睾炎、臍炎、卵巢炎、睾丸炎、輸卵管炎、輸卵管卵巢膿腫、尿道炎、陰道炎、外陰炎及外陰痛。

【0330】 本文所述之方法及藥物組成物可用以治療具有發炎成分的自體免疫性疾病。此病症包括但不限於全身性急性播散性禿頭症、白塞氏病、恰加斯氏病（Chagas' disease）、慢性疲勞綜合症、自主神經失調、腦脊髓炎、強直性脊柱炎、再生障礙性貧血、化膿性汗腺炎、自體免疫性肝炎、自體免疫性卵巢炎、乳糜瀉、克羅恩氏病、1型糖尿病、巨細胞動脈炎、古德帕斯丘綜合症、格雷夫斯病、格林-巴厘綜合症、橋本病、亨諾-許蘭二氏紫斑症（Henoch-Schonlein purpura）、川崎病（Kawasaki's disease）、紅斑狼瘡、顯微鏡下結腸炎、顯微鏡下多動脈炎、混合結締組織病、穆-韋二氏綜合症（Muckle-Wells syndrome）、多發性硬化、重症肌無力、眼陣攣肌陣攣綜合症、視神經炎、奧德氏甲狀腺炎、天皰瘡、結節性多動脈炎、多肌痛、類風濕性關節炎、萊特爾氏綜合症（Reiter's syndrome）、休葛籣氏綜合症（Sjogren's syndrome）、顳動脈炎、韋格納肉芽腫病（Wegener's granulomatosis）、溫熱自體免疫性溶血性貧血、間質性膀胱炎、萊姆病（Lyme disease）、局限性硬皮病、牛皮癬、類肉瘤病、硬皮病、潰瘍性結腸炎及白斑病。

【0331】 本文所述之方法及藥物組成物可用以治療具有發炎成分的T細胞介導的超敏性疾病。此類病症包括但不限於接觸性超敏反應、接觸性皮炎（包括由於毒葛引起的接觸性皮炎）、蕁麻疹、皮膚過敏、呼吸道過敏（花粉熱、過敏性鼻炎、屋塵蟎過敏）及麩膠敏感性腸病（乳糜瀉）。

【0332】 可用本發明之方法及藥物組成物治療的其他免疫障礙包括（例如）闌尾炎、皮炎、皮肌炎、心內膜炎、纖維組織炎、齒齦炎、舌炎、肝炎、化膿性汗腺炎、虹膜炎、喉炎、乳腺炎、心肌炎、腎炎、耳炎、胰臟炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎（peritonoitis）、咽炎、胸膜炎、局限性肺炎、前列腺增生症（prostatistis）、腎盂腎炎及口炎（stomatisi）、移植排斥（涉及如腎、肝、心臟、肺、胰臟（例如，胰島細胞）、骨髓、角膜、小腸的器官，同種異體皮膚移植、皮膚同種移植物及心臟瓣膜異種移植、血清病及移植物抗宿主病）、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、急性呼吸窘迫綜合症、西紮利氏綜合症（Sexary's syndrome）、先天性腎上腺增生、非化膿性甲狀腺炎、高鈣血症相關癌症、天皰瘡、大皰性皰疹樣皮炎、重度多形紅斑、剝脫性皮炎、脂溢性皮炎、季節性或常年性過敏性鼻炎、支氣管氣喘、接觸性皮炎、特應性皮炎、藥物超敏反應、過敏性結膜炎、角膜炎、眼帶狀皰疹、虹膜炎及虹膜睫狀體炎、脈絡膜視網膜炎、視神經炎、類肉瘤病性類肉瘤病、暴發性或散播性肺結核化學療法、成人特發性血小板減少性紫癜、成人繼發性血小板減少症、獲得性（自體免疫性）溶血性貧血症、成人白血病及淋巴瘤、兒童急性白血病、局限性腸炎、自體免疫性血管炎、多發性硬化、慢性阻塞性肺疾病、實體器官移植排斥反應、敗血症。較佳的治療包括以下的治療：移植排斥、類風濕性關節炎、牛皮癬關節炎、多發性硬化、1型糖尿病、氣喘、炎性腸病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、慢性阻塞性肺疾病及伴隨感染病症的炎症（例如，敗血症）。

代謝失調

【0333】 在一些實施方式中，本文所述之方法和藥物組成物關於治療或預防代謝性疾病或障礙，例如II型糖尿病、糖耐量受損、胰島素抵抗、肥胖、高血糖、高胰島素血症、脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、高膽固醇血症、高血壓、高脂蛋白血症、高脂血症、高甘油三酯血症、酮酸中毒、低血糖、血栓性疾病、血脂異常、非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）或相關疾病。在一些實施方式中，相關疾病係心血管疾病、動脈粥樣硬化、腎臟疾病、腎病、糖尿病性神經病、糖尿病性視網膜病變、性功能障礙、皮膚病、消化不良或水腫。在一些實施方式中，本文所述之方法和藥物組成物關於非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）和非酒精性脂肪性肝炎（NASH）的治療。

【0334】 本文所述之方法可用以治療有需要的任何受試者。如本文所使用的，「有需要的受試者」包括具有代謝性疾病或障礙的任何受試者，以及具有獲得這種疾病或障礙的增加的可能性的任何受試者。

【0335】 本文所述之藥物組成物可用於例如預防或治療代謝性疾病（部分或完全地減少代謝性疾病的不利影響），該代謝性疾病係例如II型糖尿病、糖耐量受損、胰島素抵抗、肥胖、高血糖、高胰島素血症、脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、高膽固醇血症、高血壓、高脂蛋白血症、高脂血症、高甘油三酯血症、酮酸中毒、低血糖、血栓性疾病、血脂異常、非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）或相關疾病。在一些實施方式中，相關疾病係心血管疾病、動脈粥樣硬化、腎臟疾病、腎病、糖尿病性神經病、糖尿病性視網膜病變、性功能障礙、皮膚病、消化不良或水腫。

癌症

【0336】 在一些實施方式中，本文所述之方法及藥物組成物關於癌症治療。在一些實施方式中，任何癌症可使用本文所述之方法治療。可藉由本文所述之方法及藥物組成物治療的癌症的實例包括但不限於來自以下的癌細胞：膀

胱、血液、骨頭、骨髓、腦、乳房、結腸、食道、胃腸、牙齦、頭、腎、肝、肺、鼻咽、頸、卵巢、前列腺、皮膚、胃、睾丸、舌頭或子宮。另外，該癌症可特定地是下列組織學類型，但其不限於這類類型：贅瘤，惡性；癌；癌，未分化；巨大及梭細胞癌；小細胞癌；乳頭狀癌；鱗狀細胞癌；淋巴上皮癌；基底細胞癌（basal cell carcinoma）；毛髮基質（pilomatrix）癌；移行細胞癌；乳頭狀移行細胞癌；腺癌；胃泌素瘤，惡性；膽管癌；肝細胞癌；肝細胞癌合併膽管癌；小梁腺癌；腺樣囊性癌；腺瘤息肉的腺癌；腺癌，家族性結腸息肉；實體癌；類癌瘤，惡性；細支氣管肺泡（branchiolo-alveolar）腺癌；乳頭狀腺癌；嫌色細胞癌；嗜酸性細胞癌；嗜酸性腺癌；嗜鹼性粒細胞癌；透明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾泡性腺癌；乳頭狀及濾泡性腺癌；非包膜性硬化性癌；腎上腺皮質癌；子宮內膜樣癌；皮膚附器癌；頂漿（apocrine）腺癌；皮脂腺癌；耵聹（ceruminous）腺癌；黏液表皮樣癌；囊腺癌；乳頭狀囊腺癌；乳頭狀漿液性囊腺癌；黏液性囊腺癌；黏液性腺癌；戒環細胞癌；浸潤性管狀癌；髓樣癌；小葉癌；發炎癌；佩吉特氏病，乳房；腺泡細胞癌；腺鱗癌；腺癌與鱗狀轉移瘤（adenocarcinoma w/squamous metaplasia）；胸腺瘤，惡性；卵巢間質瘤，惡性；卵泡膜細胞瘤（thecoma），惡性；粒層細胞瘤，惡性；及成釉細胞瘤，惡性；賽特利氏（sertoli）細胞癌；睾丸間質細胞（leydig cell）瘤，惡性；脂質細胞瘤，惡性；副神經節瘤，惡性；乳房外副神經節瘤，惡性；嗜鉻細胞瘤；血管球肉瘤（glomangiosarcoma）；惡性黑色素瘤；無色素性黑色素瘤；淺表擴散黑色素瘤；巨大色素痣中的惡性黑色素瘤；上皮樣細胞黑色素瘤；藍痣，惡性；肉瘤；纖維肉瘤；纖維組織細胞瘤，惡性；黏液肉瘤；脂肉瘤（liposarcoma）；平滑肌肉瘤；橫紋肌肉瘤；胚胎性橫紋肌肉瘤；肺泡橫紋肌肉瘤；基質肉瘤；混合瘤，惡性；苗勒氏混合瘤（mullerian mixed tumor）；腎母細胞瘤；肝母細胞瘤；癌肉瘤；間質瘤，惡性；布倫納瘤（brenner tumor），惡性；葉狀瘤，惡性；滑膜

肉瘤；間皮瘤，惡性；無性細胞瘤；胚胎性癌；畸胎瘤，惡性；卵巢甲狀腺瘤，惡性；絨毛膜癌；中腎瘤，惡性；血管肉瘤；血管內皮瘤，惡性；卡波西氏肉瘤（kaposi's sarcoma）；血管外皮細胞瘤，惡性；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；近皮質骨肉瘤；軟骨肉瘤；軟骨胚細胞瘤，惡性；間葉細胞軟骨肉瘤；骨巨細胞瘤；尤因肉瘤（ewing's sarcoma）；齒源性腫瘤，惡性；釉質母細胞齒源性瘤；釉質母細胞瘤，惡性；釉質母細胞纖維肉瘤；松果體瘤，惡性；脊索瘤；神經膠質瘤，惡性；室管膜瘤；星形細胞瘤；原漿性星形細胞瘤；纖維性星形細胞瘤；星形母細胞瘤；膠質母細胞瘤；少突神經膠質瘤；少突膠質母細胞瘤；原始神經外胚葉腫瘤；小腦肉瘤；節細胞母細胞瘤；神經母細胞瘤；視網膜母細胞瘤；嗅神經源性腫瘤；腦膜瘤，惡性；神經纖維肉瘤；神經鞘瘤，惡性；顆粒細胞瘤，惡性；惡性淋巴瘤；霍奇金病（Hodgkin’s Disease）；何杰金氏淋巴瘤；副肉芽腫；小淋巴細胞性惡性淋巴瘤；彌漫性大細胞惡性淋巴瘤；濾泡型惡性淋巴瘤；蕈樣真菌病；其他指定非何杰金氏淋巴瘤；惡性組織細胞增生症；多發性骨髓瘤；肥大細胞肉瘤；免疫增殖性小腸病；白血病；淋巴樣白血病；漿細胞白血病；紅白血病；淋巴肉瘤細胞白血病；髓樣白血病；嗜鹼性白血病；嗜酸性粒細胞白血病；單核細胞白血病；肥大細胞白血病；巨核細胞性白血病；髓樣肉瘤；及毛細胞白血病。

【0337】 在一些實施方式中，本文提供之方法及藥物組成物關於白血病的治療。術語「白血病」在廣義上包括造血器官/系統的進展性、惡性疾病且其特徵通常在於白血球及其先質在血液及骨髓中的異常增殖及發育。白血病疾病的非限制性實例包含急性非淋巴細胞性白血病、慢性淋巴細胞性白血病、急性粒細胞性白血病、慢性粒細胞性白血病、急性前骨髓細胞性白血病、成人T細胞白血病、非白血性白血病、白血球增多性白血病、嗜鹼粒細胞白血病、胚細胞白血病、牛白血病、慢性骨髓細胞性白血病、皮膚白血病、胚細胞性白血病、嗜

酸性粒細胞性白血病、格羅斯氏白血病（Gross' leukemia）、裡德爾細胞白血病（Rieder cell leukemia）、希林氏白血病（Schilling's leukemia）、幹細胞白血病、亞白血病性白血病、未分化細胞白血病、毛細胞白血病、成血細胞性白血病（hemoblastic leukemia）、成血胚細胞性白血病（hemocytoblastic leukemia）、組織細胞性白血病、幹細胞白血病、急性單核細胞性白血病、白血球減少性白血病、淋巴性白血病、淋巴母細胞性白血病、淋巴細胞性白血病、淋巴源性白血病、淋巴樣白血病、淋巴肉瘤細胞白血病、肥大細胞白血病、巨核細胞性白血病、小骨髓母細胞性白血病、單核細胞性白血病、骨髓母細胞性白血病、骨髓細胞性白血病、骨髓性粒細胞性白血病、骨髓單核細胞性白血病、內格利白血病（Naegeli leukemia）、漿細胞白血病、漿細胞性白血病及前骨髓細胞性白血病。

【0338】 在一些實施方式中，本文提供之方法及藥物組成物關於癌治療。術語「癌」係指上皮細胞的惡性生長，該等上皮細胞往往浸潤環繞組織和/或抑制生理學及非生理學細胞死亡信號並產生轉移。癌的非限制性示例性類型包含腺泡癌、腺泡樣癌、腺囊樣癌、腺樣囊性癌、腺癌（carcinoma adenomatosum）、腎上腺皮質癌、肺泡癌、肺泡細胞癌、基底細胞癌（basal cell carcinoma）、基底細胞癌（carcinoma basocellulare）、基底細胞樣癌、基底鱗狀細胞癌、支氣管肺泡癌、細支氣管癌、支氣管癌、腦狀癌、膽管細胞癌、絨毛膜癌、膠狀癌、粉刺癌、子宮體癌、篩狀癌、鎧甲狀癌、皮膚癌、柱狀癌、柱狀細胞癌、導管癌、硬癌（carcinoma durum）、胚胎性癌、腦狀癌（encephaloid carcinoma）、表皮樣癌、腺樣上皮細胞癌、外植癌、潰瘍性癌、纖維癌、膠狀癌（gelatiniform carcinoma）、膠樣癌（gelatinous carcinoma）、巨細胞癌（giant cell carcinoma）、印戒細胞癌（signet-ring cell carcinoma）、單純癌、小細胞癌、馬鈴薯狀癌、球狀細胞癌、梭形細胞癌、髓狀癌、鱗狀癌、鱗狀細胞癌、繩捆癌（string carcinoma）、

毛細管擴張癌（carcinoma telangiectaticum）、毛細管擴張性癌（carcinoma telangiectodes）、移行細胞癌、塊狀癌、結節性皮癌、疣狀癌、絨毛狀癌、巨細胞癌（carcinoma gigantocellulare）、腺體癌（glandular carcinoma）、粒層細胞癌、毛基質細胞癌（hair-matrix carcinoma）、血樣癌、肝細胞癌、許特耳細胞癌（Hurthle cell carcinoma）、玻質狀癌、腎上腺樣癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮內癌、上皮內癌、克羅姆佩柯赫爾氏腫瘤（Krompecher's carcinoma）、庫爾契茨基氏細胞癌（Kulchitzky-cell carcinoma）、大細胞癌、豆狀癌（lenticular carcinoma）、豆樣癌（carcinoma lenticulare）、脂瘤樣癌、淋巴上皮癌、髓樣癌、髓質癌、黑色素癌、軟癌、黏液性癌（mucinous carcinoma）、黏液癌（carcinoma muciparum）、黏液細胞癌（carcinoma mucocellulare）、黏液表皮樣癌、黏膜癌（carcinoma mucosum）、黏膜性癌（mucous carcinoma）、黏液瘤樣癌、鼻咽癌、燕麥狀細胞癌、骨化性癌、骨質癌（osteoid carcinoma）、乳頭狀癌、門靜脈周癌、浸潤前癌、棘細胞癌、糜爛性癌、腎臟的腎細胞癌、儲備細胞癌、肉瘤樣癌、施奈德氏癌（schneiderian carcinoma）、硬性癌（scirrhous carcinoma）及陰囊癌（carcinoma scroti）。

【0339】 在一些實施方式中，本文提供之方法及藥物組成物關於肉瘤的治療。術語「肉瘤」通常是指如胚胎結締組織等物質組成的腫瘤且通常由包埋於原纖維、異質或均質物質中的緊密堆積細胞構成。肉瘤包括但不限於軟骨肉瘤、纖維肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、黏液肉瘤、骨肉瘤、子宮內膜肉瘤、基質肉瘤、尤文氏肉瘤（Ewing' s sarcoma）、筋膜肉瘤、成纖維細胞性肉瘤、巨細胞肉瘤、艾伯內西氏肉瘤（Abemethy's sarcoma）、脂肪肉瘤、脂肉瘤、軟組織腺泡狀肉瘤、釉質母細胞肉瘤、葡萄形肉瘤、綠色肉瘤、絨毛膜癌、胚胎性肉瘤、維爾姆斯氏腫瘤肉瘤（Wilms' tumor sarcoma）、粒細胞肉瘤、何傑金氏肉瘤（Hodgkin's sarcoma）、特發性多發性色素沈著出血性肉瘤、B細胞免疫母細

胞肉瘤、淋巴瘤、T細胞免疫母細胞肉瘤、晏森氏肉瘤（Jensen's sarcoma）、卡波西氏肉瘤（Kaposi's sarcoma）、庫普弗細胞肉瘤（Kupffer cell sarcoma）、血管肉瘤、白血病性肉瘤、惡性間葉瘤肉瘤、骨周肉瘤、網狀細胞肉瘤、勞斯肉瘤（Rous sarcoma）、漿液囊性肉瘤、滑膜肉瘤及毛細血管擴張性肉瘤。

【0340】 可使用本文描述之方法及藥物組成物治療的另外的示例性腫瘤包括霍奇金病（Hodgkin's Disease）、非何杰金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、神經母細胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、橫紋肌肉瘤、原發性血小板增多症、原發性巨球蛋白血症、小細胞肺腫瘤、原發性腦腫瘤、胃癌、大腸癌、惡性胰臟胰島素瘤、惡性類癌、癌前皮膚病變、睪丸癌、淋巴瘤、甲狀腺癌、神經母細胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、惡性高鈣血症、宮頸癌、子宮內膜癌、漿細胞瘤、大腸直腸癌、直腸癌及腎上腺皮質癌。

【0341】 在一些實施方式中，所治療的癌症係黑色素瘤。術語「黑色素瘤」意指源自皮膚及其他器官的黑色素細胞系統的腫瘤。黑色素瘤的非限制性實例係哈-巴二氏黑色素瘤（Harding-Passey melanoma）、幼年型黑色素瘤、惡性小痣性痣黑色素瘤、惡性黑色素瘤、肢端小痣性黑色素瘤、無黑色素性黑色素瘤、良性幼年型黑色素瘤、克勞德曼氏黑色素瘤（Cloudman's melanoma）、S91黑色素瘤、結節性黑色素瘤甲下黑色素瘤及淺表擴展性黑色素瘤。

【0342】 在一些實施方式中，癌症包括乳腺癌（例如三陰性乳腺癌）。

【0343】 在一些實施方式中，癌症包括大腸直腸癌（例如，微衛星穩定（MSS）大腸直腸癌）。

【0344】 在一些實施方式中，癌症包括腎細胞癌。

【0345】 在一些實施方式中，癌症包括肺癌（例如，非小細胞肺癌）。

【0346】 在一些實施方式中，癌症包括膀胱癌。

【0347】 在一些實施方式中，癌症包括胃食管癌。

【0348】 可使用本文所述之方法及藥物組成物治療的腫瘤的特定類別包括淋巴組織增生性疾病、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、宮頸癌、子宮內膜癌、骨癌、肝癌、胃癌、大腸癌、胰臟癌、甲狀腺癌、頭頸癌、中樞神經系統的癌症、外周神經系統的癌症、皮膚癌、腎癌、及所有上述的轉移。特定類型的腫瘤包含肝細胞癌、肝細胞瘤、肝母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、食管癌、甲狀腺癌、惡性神經節瘤、纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肉瘤、軟骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、尤文氏腫瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌內皮肉瘤、侵襲性導管癌、乳頭狀腺癌、黑色素瘤、肺鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌（充分分化、中等分化、分化不良或未分化）、支氣管肺泡癌、腎細胞癌、腎上腺樣瘤、腎上腺樣腺癌、膽管癌、絨毛膜癌、精原細胞瘤、胚胎性癌、維爾姆斯氏腫瘤、睾丸腫瘤、肺癌（包含小細胞肺癌、非小細胞肺癌及大細胞肺癌）、膀胱癌、神經膠質瘤、星形細胞瘤、髓母細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、視網膜母細胞瘤、神經母細胞瘤、大腸癌、直腸癌、血液系統惡性腫瘤（包含所有類型的白血病及淋巴瘤，包含：急性髓性白血病、急性髓細胞性白血病、急性淋巴細胞性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴球性白血病、肥大細胞白血病、多發性骨髓瘤、髓樣淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、漿細胞瘤、大腸直腸癌及直腸癌。

【0349】 某些實施方式中所治療的癌症還包含癌症前期病灶，例如光化性角化病（日光性角化病）、莫耳痣（發育異常痣）、光化性唇炎（農夫唇）、皮角、巴瑞特氏食管症（Barrett's esophagus）、萎縮性胃炎、先天性角化不良、缺鐵性咽下困難、扁平苔蘚、口腔黏膜下纖維化、光化性（日光性）彈性組織變性及子宮頸發育不良。

【0350】 一些實施方式中所治療的癌症包含非癌性或良性腫瘤，例如內胚層、外胚層或間質起源的腫瘤，包括但不限於膽管瘤、結腸息肉、腺瘤、乳頭

瘤、囊腺瘤、肝細胞腺瘤、葡萄胎、腎小管腺瘤、鱗狀細胞乳頭瘤、胃息肉、血管瘤、骨瘤、軟骨瘤、脂肪瘤、纖維瘤、淋巴管瘤、平滑肌瘤、橫紋肌瘤、星形細胞瘤、痣、腦膜瘤及神經節瘤。

其他疾病及障礙

【0351】 在一些實施方式中，本文描述之方法及藥物組成物關於肝疾病的治療。此疾病包括（但不限於）阿拉吉爾綜合症（Alagille Syndrome）、酒精相關肝病、α-1抗胰蛋白酶缺乏症、自體免疫性肝炎、良性肝腫瘤、膽管閉鎖、肝硬化、半乳糖血症、吉伯特綜合症、血色素沈著病、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝性腦病、妊娠期肝內膽汁淤積症（ICP）、溶酶體酸脂肪酶缺乏症（LAL-D）、肝囊腫、肝癌、新生兒黃疸、原發性膽汁性膽管炎（PBC）、原發性硬化性膽管炎（PSC）、雷氏綜合症（Reye Syndrome）、I型糖原貯積病及威爾森病（Wilson Disease）。

【0352】 本文所述之方法及藥物組成物可用以治療神經退化性及神經性疾病。在某些實施方式中，神經退化性和/或神經性疾病係巴金森氏病、阿爾茲海默症、普里昂疾病、亨廷頓病、運動神經元疾病（MND）、脊髓小腦共濟失調、脊髓性肌萎縮症、肌張力障礙、特發性顱內高壓、癲癇、神經系統疾病、中樞神經系統疾病、運動障礙、多發性硬化、腦病、周圍神經病變或術後認知功能障礙。

菌群失調

【0353】 腸道微生物組（也稱為「腸道微生物群」）可藉由微生物對宿主的免疫細胞和其它細胞的活性以及影響（局部和/或遠端）對個體健康產生顯著影響（Walker, W.A., Dysbiosis[菌群失調]. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology[胃腸道病理生理學中的微生物.] 第二十五章. 2017；Weiss和Thierry, Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis [腸道菌群失調的機制

和後果]. Cellular and Molecular Life Sciences [細胞與分子生命科學]. (2017) 74(16):2959-2977. Zurich Open Repository and Archive [蘇黎世開放存儲庫和檔案館], doi: https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x)）。

【0354】 健康的宿主腸道微生物組穩態有時被稱為「生態平衡」或「正常微生物」，而宿主微生物組的組成和/或其多樣性的有害變化可能導致微生物組的不健康失衡，或「菌群失調」（Hooks和O'Malley. Dysbiosis and its discontents[菌群失調及其不滿]. American Society for Microbiology[美國微生物學會]. 2017年10月. 第8卷. 第5期. mBio 8:e01492-17. https://doi.org/10.1128/mBio.01492-17）。當微生物組穩態喪失或減弱時，可能會發生菌群失調以及相關的局部或遠端宿主發炎或免疫效應，從而導致：對病原體的敏感性增加；宿主細菌代謝活性改變；誘導宿主促炎活性和/或降低宿主抗炎活性。此類效應部分地由宿主免疫細胞(例如,T細胞、樹突細胞、肥大細胞、NK細胞、腸上皮淋巴細胞（IEC）、巨噬細胞和吞噬細胞）和細胞介素，以及由此類細胞和其它宿主細胞釋放的其他物質之間的相互作用介導。

【0355】 菌群失調可能發生在胃腸道內（「胃腸道菌群失調」或「腸道菌群失調」），或者可能發生在胃腸道內腔外（「遠端菌群失調」）。胃腸菌群失調通常與腸上皮屏障完整性降低、緊密連接完整性降低和腸通透性增加有關。Citi, S. Intestinal Barriers protect against disease[腸屏障可預防疾病], Science[科學] 359:1098-99 (2018); Srinivasan 等人., TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems[用於體外屏障模型系統的TEER測量技術]. J. Lab. Autom.[實驗室自動化雜誌] 20:107-126 (2015)。胃腸道菌群失調可以在胃腸道內外產生生理和免疫作用。

【0356】 菌群失調的存在可與多種疾病和病症相關，包括：感染，癌症，自體免疫性疾病（例如全身性紅斑狼瘡（SLE））或炎性疾病（例如功能性胃腸

疾病如炎症性腸病（IBD），潰瘍性結腸炎和克羅恩氏病），神經炎性疾病（例如多發性硬化症），移植性疾病（例如移植物抗宿主病），脂肪性肝病，I型糖尿病，類風濕性關節炎，乾燥綜合症，乳糜瀉，囊性纖維化，慢性阻塞性肺疾病（COPD）和其他與免疫功能障礙相關的疾病和條件。Lynch等人, The Human Microbiome in Health and Disease[健康與疾病中的人微生物組], N. Engl. J. Med .375:2369-79 (2016)，Carding等人, Dysbiosis of the gut microbiota in disease[疾病中腸道微生物的菌群失調].Microb. Ecol. Health Dis.[微生物生態與健康疾病] (2015); 26: 10: 3402/mehd.v26.2619; Levy等人, Dysbiosis and the Immune System[菌群失調和免疫系統], Nature Reviews Immunology[自然評論免疫學] 17:219 (2017年4月)。

【0357】 在某些實施方式中，本文所揭露的示例性藥物組成物可以藉由修飾存在於菌群失調部位的免疫活性來治療菌群失調及其影響。如本文所述，此類組成物可藉由對宿主免疫細胞的作用（導致例如抗炎細胞介素的分泌增加和/或促炎細胞介素的分泌減少，從而減輕受試接受者的炎症）或藉由代謝產物生產的變化來修飾菌群失調。

【0358】 本文揭露的可用於治療與菌群失調相關的障礙的示例性藥物組成物包含一種或多種類型的衍生自免疫調節細菌（例如抗炎細菌）的mEV（微生物胞外囊泡）。這樣的組成物能夠影響接受者宿主在胃腸道中的免疫功能，和/或在受試者胃腸道外的遠端部位產生全身性效應。

【0359】 本文揭露的可用於治療與菌群失調相關的失調症的示例性藥物組成物包含單一細菌物種（例如，單一菌株）的免疫調節細菌（例如，抗炎細菌）的群體和/或衍生自單一細菌物種（例如，單一菌株）的免疫調節細菌（例如，抗炎細菌）的mEV群體。這樣的組成物能夠影響接受者宿主在胃腸道中的免疫功能，和/或在受試者胃腸道外的遠端部位產生全身性效應。

【0360】 在一個實施方式中，將包含經分離的衍生自免疫調節細菌（例如抗炎細菌細胞）的mEV群體的藥物組成物以有效治療哺乳動物接受者的菌群失調和其一種或多種影響的量投與（例如口服）給該接受者。該菌群失調可為胃腸道菌群失調或遠端菌群失調。

【0361】 在另一個實施方式中，本發明之藥物組成物可以治療胃腸道菌群失調及其對宿主免疫細胞的一種或多種影響，導致抗炎細胞介素的分泌增加和/或促炎細胞介素的分泌減少，從而減輕受試接受者的炎症。

【0362】 在另一個實施方式中，藥物組成物可以藉由以下來治療胃腸道菌群失調及其一種或多種影響：經由細胞和細胞介素調節來調節接受者的免疫反應，以藉由增加腸上皮屏障的完整性來降低腸道通透性。

【0363】 在另一個實施方式中，藥物組成物可以藉由以下來治療遠端菌群失調及其一種或多種影響：經由調節宿主免疫細胞來調節菌群失調部位的接受者免疫反應。

【0364】 其他示例性藥物組成物可用於治療與菌群失調有關的失調症，該等組成物包含一種或多種類型的細菌或mEV，該等細菌或mEV能夠改變接受者中的宿主免疫細胞亞群（例如T細胞、免疫淋巴樣細胞、樹突細胞、NK細胞和其他免疫細胞的亞群）相對比例或其功能。

【0365】 其他示例性藥物組成物可用於治療與菌群失調有關的障礙，該等組成物包含單一免疫調節細菌（例如抗炎細菌細胞）物種（例如單一菌株）的mEV群體，其能夠改變接受者中免疫細胞亞群（例如T細胞亞群、免疫淋巴樣細胞、NK細胞和其他免疫細胞）的相對比例或其功能。

【0366】 在一個實施方式中，本發明提供了藉由以下來治療胃腸道菌群失調及其一種或多種影響之方法：向有需要的受試者口服投與藥物組成物，該藥物組成物改變存在於菌群失調部位的微生物組群體。藥物組成物可包含一種或

多種類型的來自免疫調節細菌的mEV或單一免疫調節細菌物種（例如抗炎細菌細胞）（例如單一菌株）的mEV群體。

【0367】 在一個實施方式中，本發明提供了藉由以下來治療遠端菌群失調及其一種或多種影響之方法：向有需要的受試者口服投與藥物組成物，該藥物組成物改變受試者的胃腸道外的免疫反應。藥物組成物可包含一種或多種類型的來自免疫調節細菌（例如，抗炎細菌細胞）的mEV或單一免疫調節細菌（例如抗炎細菌細胞）物種（例如單一菌株）的mEV群體。

【0368】 在示例性實施方式中，可用於治療與菌群失調有關的失調症的藥物組成物刺激宿主免疫細胞分泌一種或多種抗炎細胞介素。抗炎細胞介素包括但不限於IL-10、IL-13、IL-9、IL-4、IL-5、TGFβ及其組合。在其他示例性實施方式中，可用於治療與菌群失調有關的失調症的藥物組成物減少（例如抑制）宿主免疫細胞分泌一種或多種促炎細胞介素。促炎細胞介素包括但不限於IFNγ、IL-12p70、IL-1α、IL-6、IL-8、MCP1、MIP1α、MIP1β、TNFα及其組合。其他示例性細胞介素係本領域已知的並且在本文中描述。

【0369】 另一方面，本發明提供了在有需要的受試者中治療或預防與菌群失調有關的障礙之方法，該方法包括向受試者投與（例如口服投與）益生菌食品或醫療食品形式的治療組成物，該治療組成物包含的細菌或mEV的數量足以改變菌群失調部位的微生物組，從而治療與菌群失調有關的障礙。

【0370】 在另一個實施方式中，益生菌食品或醫療食品形式的本發明之治療組成物可用於預防或延遲處於發展為菌群失調風險的受試者中菌群失調的發作。

製造增強的細菌之方法

【0371】 在某些方面中，本文提供製造用於產生本文描述之mEV（例如smEV）的工程改造的細菌之方法。在一些實施方式中，該等工程改造的細菌經

修飾以增強某些所需性質。例如，在一些實施方式中，對工程改造的細菌進行修飾以增強mEV（例如smEV）的免疫調節作用和/或治療作用（例如，單獨或與另一種治療劑組合），以降低毒性和/或改善細菌和/或細菌和/或mEV（例如smEV）製造（例如更高的耐氧性，更高的抗凍融性，更短的產生時間）。工程改造的細菌可使用本領域中已知的任何技術產生，包括（但不限於）定點誘變、轉座子誘變、敲除、敲入、聚合酶鏈反應誘變、化學誘變、紫外線誘變、轉形（化學或藉由電穿孔）、噬菌體轉導、定向演化、CRISPR/Cas9或其任何組合。

【0372】 在本文提供之方法的一些實施方式中，細菌藉由定向演化進行修飾。在一些實施方式中，該定向演化包含將細菌暴露於環境條件並選擇在環境條件下具有經改善的存活和/或生長的細菌。在一些實施方式中，該方法包括使用識別增強的細菌的分析篩選誘變細菌。在一些實施方式中，該方法還包括誘變細菌（例如，藉由暴露於化學誘變劑和/或UV輻射），或將它們暴露於治療劑（例如抗生素），接著進行分析以檢測具有所需表型的細菌（例如，體內分析、離體分析或體外分析）。

實例

實例1：從細菌中純化和製備膜以獲得經加工的微生物胞外囊泡（pmEV）

純化

【0373】 使用熟悉該項技術者已知之方法從細菌培養物（例如表1、表2和/或表3中列出的細菌）中純化和製備經加工的微生物胞外囊泡（pmEV）（Thein等人，2010.Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies.[用於蛋白質組學研究的革蘭氏陰性菌的高效亞分級]J.Proteome Res.[蛋白質組研究雜誌]2010年12月3日；9(12): 6135-47. Doi: 10.1021/pr1002438. 2010年10月28日電子公佈；Sandrini等人 2014.Fractionation by Ultracentrifugation of Gram negative cytoplasmic and membrane proteins.[用超速離心法分級革蘭氏陰性

細胞質和膜蛋白] Bio-Protocol.[生物方案]卷4 (21) Doi: 10.21769/BioProtoc.1287）。

【0374】 可替代地，pmEV可以藉由Thein等人之方法進行純化。例如，細菌培養物在10,000-15,500 x g下在室溫或4°C下離心10-30分鐘。丟棄上清液，並將細胞沈澱物在-80°C冷凍。細胞沈澱物在冰上解凍並在pH 7.5的100 mM Tris-HCl中重新懸浮，並且可以補充1 mg/mL DNA酶I和/或100 mM NaCl。將解凍的細胞在500 ug/ml溶菌酶、40ug/ml溶葡萄球菌素（lyostaphin）和/或1mg/ml DNA酶I中孵育40分鐘以促進細胞裂解。可以使用其他酶來促進裂解過程（例如，EDTA（5 mM），PMSF（西格瑪奧德里奇公司（Sigma Aldrich））和/或苯甲脒（西格瑪奧德里奇公司）。然後在製造商建議的條件下使用Emulsiflex C-3（奧維斯丁公司（Avestin, Inc.））裂解細胞。另外，也可以在-80°C冷凍沈澱物並在裂解之前再次解凍。碎片和未裂解細胞在4°C下以10,000-12,500 x g離心15分鐘沈澱。然後將上清液在4°C下以120,000 x g離心1小時。將沈澱物重新懸浮在冰冷的100 mM碳酸鈉，pH 11中，在4°C下攪拌孵育1小時。可替代地，將沈澱物在再懸浮後立即在碳酸鈉中以120,000 x g在4°C離心1小時。將沈澱物重新懸浮在補充有100 mM NaCl的pH 7.5的100 mM Tris-HCl中，在4°C下以120,000 x g再離心20分鐘，然後重新懸浮在補充有多達或約100 mM NaCl的pH 7.5的100 mM Tris-HCl或重新懸浮在PBS中。樣本儲存在-20°C。為了在冷凍/解凍步驟期間保護pmEV製劑，可向最終製劑中添加250 mM蔗糖和多達500 mM NaCl以穩定pmEV製劑中的囊泡。

【0375】 可替代地，pmEV係藉由改編自Sandrini等人（2014年）之方法獲得的。然後，細菌培養物在室溫或4°C下以10,000-15,500 x g離心10-15分鐘，細胞沈澱物在-80°C冷凍，並且棄去上清液。然後，將細胞沈澱物在冰上解凍，並重懸於10 mM Tris-HCl（pH 8.0）、補充有0.1 mg/mL溶菌酶的1 mM EDTA中。

然後將樣本在室溫或37°C下混合孵育30分鐘。在一個視需要步驟中，將樣本在-80°C下重新冷凍，然後再次在冰上解凍。添加DNA酶I至終濃度為1.6 mg/mL，並添加MgCl2至終濃度為100mM。使用QSonica Q500超音波儀以30秒開啟和30秒關閉的7個循環對樣本進行超音波處理。藉由在4°C下以10,000 x g離心15分鐘來沈澱碎片和未裂解的細胞。然後將上清液在4°C下以110,000 x g離心15分鐘。將沈澱物重新懸浮在10 mM Tris-HCl（pH 8.0）中，並在室溫下混合孵育30-60分鐘。將樣本在4°C下以110,000 x g離心15分鐘。將沈澱物重懸於PBS中並儲存在-20°C。

【0376】 視需要，pmEV可以使用本領域已知之方法與其他細菌組分和碎片分離。尺寸排阻層析法（FPLC）或快速蛋白液相層析法可用於pmEV純化。可以使用的其他分離方法包括場流分級、微流過濾、無接觸分選和/或免疫親和富集層析。可替代地，高解析度密度梯度分級可用於基於密度分離pmEV顆粒。

製備

【0377】 細菌培養物在10,000-15,500 x g下在室溫或4°C下離心10-30分鐘。棄去上清液，並且將細胞沈澱物在-80°C冷凍。將細胞沈澱物在冰上解凍並在以下中重新懸浮：100 mM Tris-HCl（pH7.5）、100 mM NaCl、500 ug/ml溶菌酶和/或40 ug/ml溶葡萄球菌素（以促進細胞裂解）；多達0.5 mg/ml DNA酶I（以減小基因組DNA大小）、EDTA（5 mM）、PMSF（1 mM，西格瑪奧德里奇公司）和苯甲脒（1 mM，西格瑪奧德里奇公司）（以抑制蛋白酶）。然後在製造商建議的條件下使用Emulsiflex C-3（奧維斯丁公司（Avestin, Inc.））裂解細胞。另外，也可以在-80°C冷凍沈澱物並在裂解之前再次解凍。碎片和未裂解物藉由以10,000-12,500 x g在4°C下離心15分鐘沈澱。使用FPLC儀器（AKTA Pure 150，通用健康醫療集團（GE Healthcare））（其中使用PBS和補充有多達0.3M NaCl的運行緩衝液）對上清液進行尺寸排阻層析（Sepharose 4 FF，通用健康醫療集

團）。將純pmEV收集到柱空隙體積中，濃縮並保存在-20°C。濃縮可以藉由多種方法進行。例如，可以使用超離心（140l x g，1小時，4°C，然後在小體積PBS中再懸浮）。為了在冷凍-解凍步驟期間保護pmEV製劑，可向最終製劑中添加250 mM蔗糖和多達500 mM NaCl以穩定pmEV製劑中的囊泡。可以使用的其他分離方法包括場流分級、微流過濾、無接觸分選和/或免疫親和富集層析。使用本領域已知之方法可以採用的其他技術包括鞭打膜蒸發（Whipped Film Evaporation）、分子蒸餾、短程蒸餾和/或切向流過濾。

【0378】 在某些情況下，對pmEV進行稱重，並以不同的劑量（以ug/ml）投與。視需要，使用本領域已知之方法，使用奈米顆粒跟蹤分析（NTA）來評估pmEV的顆粒計數和尺寸分佈。例如，Malvern NS300儀器可以根據製造商的說明或如Bachurski等人2019. Journal of Extracellular Vesicles.[胞外囊泡雜誌] 卷8(1)所描述的那樣使用。可替代地，對於pmEV，可以使用Bio-rad測定法（Cat# 5000205）測量總蛋白（按照製造商的說明執行）並基於蛋白含量/劑量以不同劑量投與。

【0379】 對於以下所述之所有研究，pmEV可以在投與之前被照射、加熱和/或凍乾（如實例49所述）。

實例2：大腸直腸癌模型

【0380】 為了研究pmEV在腫瘤模型中的功效，可以根據本領域已知的齧齒動物腫瘤模型使用許多癌細胞系中的一種。

【0381】 例如，從泰康利公司（Taconic）（日爾曼敦（Germantown），紐約州））或其他供應商獲得雌性6-8週齡Balb/c小鼠。將100,000個CT-26結直腸腫瘤細胞（ATCC CRL-2638）重新懸浮於無菌PBS中並在50%基質膠（Matrigel）存在下接種。將CT-26腫瘤細胞經皮下注射至每隻小鼠的一個後側腹中。當腫瘤體積達到平均100mm^3時（腫瘤細胞接種後約10-12天），將動物分配到各種治療

組（例如，媒劑；韋榮氏球菌屬pmEV，雙歧桿菌屬pmEV，具有或不具有抗PD-1抗體）。起始自第1天，每隔四天將抗體以200 μg/小鼠（最終體積為100 μl）藉由腹膜內（i.p.）投與一次，共3次（Q4Dx3），並且pmEV口服或靜脈內並且以不同劑量和時間投與。例如，起始自第1天，每隔三天將pmEV（5 μg）靜脈內（i.v.）注射一次，共4次（Q3Dx4），並對小鼠進行腫瘤生長評估。

【0382】 可替代地，在腫瘤體積平均達到100 mm^3時（在腫瘤細胞接種後大約10-12天），將動物分配至下列各組中：1) 媒劑；2) 分離自Bexsero®疫苗的腦膜炎奈瑟菌pmEV；及3) 抗PD-1抗體。起始自第1天，每隔四天，以200 ug/小鼠（100 ul最終體積）腹膜內（i.p.）投與抗體，及起始自第1天直至研究結束，腹膜內（i.p.）每天投與腦膜炎奈瑟菌pmEV。

【0383】 在腫瘤體積平均達到100 mm^3時（在腫瘤細胞接種後大約10-12天），將動物分配至下列各組中：1) 媒劑；2) 抗PD-1抗體；3) pmEV動物雙歧桿菌乳酸亞種（7.0 e+10顆粒計數）；4) pmEV丁酸厭氧棒桿菌（7.0 e+10顆粒計數）；5) pmEV釀膿鏈球菌（3.0 e+10顆粒計數）；6) pmEV解苯副梭菌（3.0 e+10顆粒計數）；7) pmEV *Hungatella屬物種*（7.0 e+10顆粒計數）；8) pmEV*金黃色葡萄球菌*（7.0 e+10顆粒計數）；和9) pmEV活潑瘤胃球菌（7.0 e+10 顆粒計數）。起始自第1天，每隔四天，以200 μg/小鼠（100 μl最終體積）腹膜內（i.p.）投與抗體，並且起始自第1天直至研究結束，靜脈內（i.v.）每天注射pmEV並測量腫瘤生長。在第11天，所有pmEV組顯示腫瘤生長抑制（**圖1-7**）。pmEV動物雙歧桿菌乳酸亞種（**圖1**）、pmEV丁酸厭氧棒桿菌（**圖2**）、pmEV釀膿鏈球菌（**圖3**）、pmEV解苯副梭菌（**圖4**）和pmEV Hungatella屬物種（**圖5**）組均顯示出與抗PD-1組相當的腫瘤生長抑制，而pmEV*金黃色葡萄球菌*和pmEV活潑瘤胃球菌組顯示出比抗PD-1組更好的腫瘤生長抑制（**圖6和7**）。在一項類似的劑量-反應研究中，pmEV動物雙歧桿菌乳酸亞種的最高劑量顯示出最大的功效，儘管pmEV馬賽巨

型球菌在較低劑量下顯示出顯著的功效（**圖8**）。針對治療組相比於媒劑組進行威爾奇（Welch）檢驗。

【0384】 另一項研究顯示，pmEV早於第11天有顯著功效。pmEV活潑瘤胃球菌7.0E+10（**圖9和圖10**）、pmEV動物雙歧桿菌乳酸亞種2.0E+11（**圖11和圖12**）和pmEV狄氏副擬桿菌組7.0E+10（**圖13和圖14**）早在第9天就顯示出功效。

實例3：投與pmEV組成物治療小鼠腫瘤模型

【0385】 如實例2所述，癌症的小鼠模型係藉由皮下注射腫瘤細胞系或患者衍生的腫瘤樣本並容許將其移植至健康小鼠內而產生。本文提供之方法可以使用幾種不同的腫瘤細胞系中的一種進行，該腫瘤細胞系包括但不限於：B16-F10或B16-F10-SIY細胞（作為黑色素瘤的原位模型）、Panc02細胞（作為胰臟癌的原位模型）（Maletzki等人, 2008, Gut[腸道] 57:483-491）、LLC1細胞（作為肺癌的原位模型）、以及RM-1（作為前列腺癌的原位模型）。作為實例，而非限制，本文深入提供了用於研究B16-F10模型中pmEV的功效之方法。

【0386】 使用具有極高轉移頻率的自發性黑色素瘤的同基因小鼠模型以測試細菌減少腫瘤生長及轉移的擴散的能力。經選擇用於此分析的pmEV可為顯示增強活化免疫細胞亞群並刺激增強殺死體外腫瘤細胞的組成物。小鼠黑色素瘤細胞系B16-F10獲得自ATCC。將細胞作為單層在37°C及5% CO2/空氣的氣氛下體外培養於RPMI培養基中，該RPMI培養基用10%熱滅活的胎牛血清及1%青黴素/鏈黴素補充。指數生長的腫瘤細胞係藉由胰蛋白酶化獲取，用冷1x PBS清洗三次，並製備5E6個細胞/ml的懸浮液用於投與。此實驗使用雌性C57BL/6小鼠。該等小鼠係6至8週齡且重約16至20 g。就腫瘤發展而言，於各小鼠的脅腹內皮下注射100 μl的B16-F10細胞懸浮液。該等小鼠係在細胞移植之前藉由克他命（ketamine）及甲苯噻啡麻醉。實驗中使用的動物可經由自第2天至第5天滴注康黴素（0.4 mg/ml）、建它黴素（0.035 mg/ml）、黏菌素（850 U/ml）、甲硝唑

（0.215 mg/ml）及萬古黴素（0.045 mg/ml）於飲用水中的混合物，並在腫瘤注射後第7天腹膜內注射克林達黴素（10 mg/kg）而開始抗生素治療。

【0387】 原發性胰腹腫瘤的尺寸係用卡尺每隔2至3天量測及腫瘤體積係使用下式計算：腫瘤體積= 腫瘤寬度 × 腫瘤長度 × 0.5。在原發性腫瘤達到約100 mm3後，基於動物的體重將它們分選成陣列。然後，自各組隨機挑選小鼠並分配至治療組。如前所述製備pmEV組成物。用大約7.0e+09 至3.0e+12 pmEV顆粒強飼給小鼠口服接種。可替代地，靜脈內投與pmEV。每天、每週、每兩週、每月、每兩個月或在整個治療週期的任何其他給藥時間表小鼠接受pmEV。小鼠可以經IV於尾靜脈中注射pmEV或直接注射於腫瘤內。小鼠可以注射pmEV（具有或不具有活細菌，具有或不具有滅活/減弱或被殺死的細菌）。小鼠可每週或每月一次注射或經口強飼。小鼠可接受純化的pmEV及活細菌的組合以最大化腫瘤殺死潛力。所有小鼠係在無特定病原體的條件下遵循經批准的方案飼養。每隔3至4天監測腫瘤尺寸、小鼠體重及體溫並在B16-F10小鼠黑色素瘤細胞注射後6週內或當原發性腫瘤體積達到1000 mm3時人道處死該等小鼠。每週抽血並在方案終止時在無菌條件下進行完全屍檢。

【0388】 可在小鼠B16-F10黑色素瘤模型中輕易地觀測到癌細胞，因為其產生黑色素。遵循標準方案，收集來自淋巴結的組織樣本及來自頸部及胸部區域的器官且使用下列分類規則分析微轉移及巨轉移的存在。若在每個淋巴結或器官中發現至少兩個微轉移及一個巨轉移病變，則將器官歸類為轉移陽性。微轉移係藉由用蘇木精-曙紅遵循熟悉該項技術者已知的標準方案染色石蠟包埋的淋巴組織切片 進行檢測。轉移的總數量係與原發性腫瘤的體積相關且發現腫瘤體積與腫瘤生長時間及淋巴結及內臟器官中巨轉移及微轉移的數量及亦與所有可見轉移的總數顯著相關。如先前所述鑒別出二十五個不同轉移部位（Bobek V. 等人, Syngeneic lymph-node-targeting model of green fluorescent protein-expressing

Lewis lung carcinoma[表現綠色螢光蛋白的Lewis肺癌的同基因淋巴結靶向模型], Clin. Exp. Metastasis[臨床與實驗轉移], 2004;21(8):705-8）。

【0389】 進一步分析腫瘤組織樣本的腫瘤浸潤性淋巴細胞。可藉由FACS分離CD8+細胞毒性T細胞，且可隨後使用定製p/MHC I類微陣列對該等細胞進行進一步分析以展現其抗原特異性（參見例如，Deviren G.等人, Detection of antigen-specific T cells on p/MHC microarrays[在p/MHC微陣列上檢測抗原特異性T細胞], J. Mol. Recognit.[分子識別雜誌], 2007年1月至2月;20(1):32-8）。CD4+ T細胞可使用定製p/MHC II類微陣列進行分析。

【0390】 在各種時間點下，將小鼠處死且可移除腫瘤、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體流動式細胞測量術分析。例如，使用Miltenyi腫瘤解離酶混合劑根據製造商說明書來解離腫瘤。記錄腫瘤重量且將腫瘤短切，然後置於含有酶混合劑的15 ml管中並置於冰上。然後將樣本置於37°C輕微振盪器上保持45分鐘並使用最多15 ml完整RPMI驟冷。經由70 μm過濾器將每一細胞懸浮液過濾至50 ml falcon管中並在1000 rpm下離心10分鐘。將細胞重新懸浮於FACS緩衝液中並洗滌以去除剩餘碎片 。視需要，經由第二70 μm過濾器將樣本再次過濾至新管中。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌包含pan-免疫細胞標誌CD45、T細胞標誌（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Rorγt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/骨髓性標誌（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNγ、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，

和/或在離體獲得的經純化的CD45+腫瘤-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對腫瘤切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0391】 對多發性肺黑色素瘤轉移的小鼠模型亦進行相同實驗。小鼠黑色素瘤細胞系B16-BL6獲得自ATCC且細胞係如上文描述體外培養。此實驗使用雌性C57BL/6小鼠。該等小鼠係6至8週齡且重約16至20 g。就腫瘤發展而言，將100 μl的2E6個細胞/ml B16-BL6細胞懸浮液注射於各小鼠的尾靜脈中。IV注射後植入的腫瘤細胞最終進入肺中。

【0392】 9天後將小鼠人道殺死。將肺稱重並分析肺表面上的肺結節的存在。經提取的肺係用費可特溶液（Fekete's solution）漂白，該溶液因為B16細胞中的黑色素而不漂白腫瘤結節，雖然一小部分結節係無黑色素的（即，白色）。仔細計數腫瘤結節的數量以確定小鼠中的腫瘤負荷。通常，在對照組小鼠（即，PBS強飼）的肺上發現200至250個肺結節。

【0393】 針對三個治療組計算腫瘤負荷百分比。將腫瘤負荷百分比定義為屬於治療組的小鼠的肺表面上的肺結節的平均數量除以對照組小鼠的肺表面上的肺結節的平均數量。

【0394】 藉由LCMS技術或本領域已知的其他方法提交腫瘤活檢和血液樣本用於代謝分析。測試組之間的胺基酸、糖、乳酸鹽及其他代謝物的不同濃度證實微生物組成物破壞腫瘤代謝狀態的能力。

RNA定序以確定作用機制

【0395】 樹突細胞純化自腫瘤、伊爾氏斑（Peyers patch）及腸系膜淋巴結。進行RNAseq分析並根據熟悉該項技術者已知的標準技術進行分析（Z. Hou. *Scientific Reports.[科技報告]* 5(9570):doi:10.1038/srep09570 (2015)）。在該分析

中，特別關注先天性發炎通路基因，它們包括TLR、CLR、NLR及STING、細胞介素、趨化因子、抗原處理及呈遞通路、交叉呈遞及T細胞共刺激。

【0396】 一些小鼠可未處死，而是使用注射至對側的側腹（或其他區域）中的腫瘤細胞再攻擊以測定免疫系統的記憶反應對腫瘤生長的影響。

實例4：投與pmEV與PD-1或PD-L1抑制的組合以治療小鼠腫瘤模型

【0397】 為了確定pmEV與PD-1或PD-L1抑制組合在腫瘤小鼠模型中的功效，可以如上所述使用小鼠腫瘤模型。

【0398】 針對小鼠腫瘤模型中單獨或與完整細菌細胞組合的pmEV且在存在或不存在抗PD-1或抗PD-L1下的功效對其進行測試。在不同時間點且以不同劑量投與pmEV、細菌細胞和/或抗PD-1或抗PD-L1。例如，在腫瘤注射之後第10天或腫瘤體積達至100 mm^3之後，用單獨或與抗PD-1或抗PD-L1組合的pmEV處理小鼠。

【0399】 小鼠可以口服、靜脈內或瘤內投與pmEV。例如，一些小鼠靜脈內注射7.0e+09至3.0e+12之間的pmEV顆粒。雖然一些小鼠藉由i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（pmEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（pmEV：細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0400】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受$1x10^4$至$5x10^9$個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或

熱滅活。一些組的小鼠亦可注射有效劑量的檢查點抑制劑。例如，小鼠接受於100 μl PBS中的100 μg抗PD-L1 mAB（殖株10f.9g2, 欣博盛公司（BioXCell））或另一抗PD-1或抗PD-L1 mAB，及一些小鼠接受媒劑和/或其他適當的對照（例如，對照抗體）。在初始注射後的第3、6及9天，對小鼠注射mAB。為評估檢查點抑制及pmEV免疫療法是否具有額外的抗腫瘤效應，將接受抗PD-1或抗PD-L1 mAB的對照小鼠計入標準對照組。評估原發性（腫瘤尺寸）及繼發性（腫瘤浸潤性淋巴細胞及細胞介素分析）端點，及一些組的小鼠可為經後續腫瘤細胞接種再激發以評估治療對記憶反應的影響。

實例5：遲發型超敏反應（DTH）的小鼠模型中的pmEV

【0401】 遲發型超敏反應（DTH）為異位性皮膚炎（或過敏性接觸性皮炎）的動物模式，如Petersen等人綜述（In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery.[牛皮癬和特應性皮炎的體內藥理疾病模型在藥物開發中的應用] Basic & Clinical Pharm & Toxicology.[基礎臨床藥理學和毒理學] 2006. 99(2): 104-115；還參見Irving C. Allen（編）Mouse models of Innate Immunity: Methods and Protocols[先天免疫的小鼠模型：方法和實驗室手冊], Methods in Molecular Biology[分子生物學方法], 2013.，第1031卷，DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13）。已使用DTH模型的幾種變化且它們為本領域中熟知（Irving C. Allen（編）. *Mouse models of Innate Immunity: Methods and Protocols*[先天免疫的小鼠模型：方法和實驗室手冊], Methods in Molecular Biology.[分子生物學方法]，第1031卷，DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13, Springer Science + Business Media, LLC [施普林格科學與商業媒體公司] 2013）。

【0402】 DTH可使用各種半抗原或抗原（例如，用佐劑乳化的抗原）在各種小鼠及大鼠品系中誘導。DTH的特徵在於敏化作用及抗原特異性T細胞介導的

反應，其導致紅斑、浮腫及細胞浸潤®尤其抗原呈現細胞（APC）、嗜酸性粒細胞、經活化的CD4+ T細胞及表現細胞介素的Th2細胞的浸潤。

【0403】 通常，小鼠係用在佐劑（例如，完全弗氏佐劑）的情況下投與的抗原誘發以誘導藉由腫脹及抗原特異性抗體滴定度衡量的繼發（或記憶）免疫反應。

【0404】 地塞米松（皮質類固醇）係已知抗炎劑，其改善小鼠中的DTH反應，並充當陽性對照用於在此模型中抑制炎症（Taube及Carlsten, Action of dexamethasone in the suppression of delayed-type hypersensitivity in reconstituted SCID mice.[地塞米松在抑制SCID小鼠遲發型超敏反應中的作用] Inflamm Res.[炎症研究] 2000. 49(10) : 548-52）。就陽性對照組而言，在第0天藉由將6.8 mg地塞米松稀釋於400 μL 96%乙醇中製備17 mg/mL地塞米松的儲備溶液。就給藥的每天而言，藉由將儲備溶液100x稀釋於無菌PBS中以在隔膜小瓶中獲得0.17 mg/mL的最終濃度製備用於腹膜內給藥的工作溶液。經地塞米松治療的小鼠i.p.接受100 μL地塞米松（5 mL/kg的0.17 mg/mL溶液）。冷凍蔗糖充當陰性對照（媒劑）。在下面描述的研究中，每天給予媒劑、地塞米松（陽性對照）和pmEV。

【0405】 測試pmEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在DTH的小鼠模型中的效力。例如，6至8週齡C57Bl/6小鼠獲得自泰康利公司（日爾曼敦，紐約州）或其他供應商。對各組小鼠背部四個位置（上方及下方）四次皮下（s.c.）注射有效劑量（例如每個位置50 ul總體積）的抗原（例如，卵白蛋白（OVA）或匙孔血藍蛋白（KLH））。就DTH反應而言，在克他命/甲苯噻咁麻醉下（分別約50 mg/kg及5 mg/kg），對動物耳朵進行皮內（i.d.）注射。一些小鼠充當對照動物。第8天，一些組的小鼠以每隻耳朵10 ul（左耳媒劑對照（0.01% DMSO於生理鹽水中）及右耳抗原（21.2 ug（12 nmol））激發。為量測耳炎，使用Mitutoyo千分尺量測人工限制的動物的耳厚度。耳厚度係在皮

內激發之前作為各個別動物的基線水平進行量測。接著，耳厚度係在皮內激發後，在約24小時及48小時（即，第9天及第10天）時量測兩次。

【0406】 pmEV治療係在一些時間點（在引發的時間附近或在DTH激發的時間附近）下開始。例如，pmEV可在皮下注射（第0天）的同時投與，或可將它們在皮內注射之前或皮內注射後投與。pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg pmEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 pmEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠將藉由i.v.注射接受pmEV，但另一些小鼠可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與、經口強飼、局部投與、皮內（i.d.）注射或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第0天）接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1（pmEV : 細菌細胞）至1-1 x 10^{12} : 1（pmEV : 細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0407】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0408】 就pmEV而言，總蛋白質係使用遵循製造商的使用說明進行的伯樂公司（Bio-rad）測定（目錄號5000205）進行量測。

【0409】 匙孔血藍蛋白（KLH）及完全弗氏佐劑（CFA）的乳化液係在免疫當天（第0天）新鮮製備。為此，將8 mg KLH粉末稱重並完全重新懸浮於16 mL生理鹽水中。乳化液係藉由使用注射器及魯爾鎖連接器（luer lock connector）混

合KLH/生理鹽水及等體積的CFA溶液（例如，10 mL KLH/生理鹽水 + 10 mL CFA溶液）進行製備。將KLH及CFA用力混合幾分鐘以形成白色乳化液以獲得最大穩定性。進行跌落試驗以檢查是否獲得均質乳化液。

【0410】 在第0天，C57Bl/6J雌性小鼠（約7週齡）係用含於CFA中的KLH抗原藉由皮下免疫（4個位置，每個位置50 μL）引發。經口強飼的狄氏副擬桿菌pmEV在低（6.0E+07）、中（6.0E+09）和高（6.0E+11）劑量下進行測試。

【0411】 在第8天，用含於生理鹽水（以10 μL的體積）中的10 μg KLH皮內（i.d.）激發小鼠的左耳。耳廓厚度係在抗原激發後的24小時進行量測（**圖15**）。如耳厚度確定的，狄氏副擬桿菌pmEV在抑制炎症方面有效。

【0412】 對於進一步的炎症研究，一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用抗炎劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯劑）或其他治療），和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0413】 在各種時間點下，可以採集血清樣本。可以將其他組的小鼠處死且可移除淋巴結、脾臟、腸系膜淋巴結（MLN）、小腸、結腸及其他組織用以使用本領域中已知之方法進行組織學研究、離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。一些小鼠係在O2/CO2麻醉下自眼血管叢抽血並進行ELISA分析。

【0414】 組織可使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Rory-γ-t、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，

它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0415】 自經處死的小鼠移除耳朵並放置於冷無EDTA的蛋白酶抑制劑混合物(羅氏公司(Roche))中。使用珠破壞將耳朵均質化並藉由Lumine套組(kit)（EMD密理博公司（EMD Millipore））遵循製造商的使用說明分析上清液中的各種細胞介素。另外，頸部淋巴結係藉由細胞過濾器解離，清洗，並針對FoxP3（PE-FJK-16s）及CD25（FITC-PC61.5）使用本領域中已知之方法進行染色。

【0416】 為了檢驗DTH保護的影響和壽命，一些小鼠可以在稍後用激發抗原再次激發而不是處死，並分析小鼠對DTH的敏感性和反應的嚴重程度。

實例6：實驗性自體免疫性腦脊髓炎（EAE）的小鼠模型中的pmEV

【0417】 EAE係經充分研究的多發性硬化動物模型，如由Constantinescu等人評審（Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis（MS）.[實驗性自體免疫性腦脊髓炎（EAE）作為多發性硬化（MS）的模型] Br J Pharmacol.[英國藥理學雜誌] 2011年10月; 164(4): 1079-1106）。其可使用不同髓磷脂相關肽，藉由經活化的致腦炎T細胞的過繼轉移，或使用易受EAE影響的TCR轉基因小鼠在各種小鼠及大鼠品系中誘導，如於Mangalam等人（Two discreet subsets of CD8+ T cells modulate PLP_{91-110} induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice[CD8 + T細胞的兩個離散亞群調節HLA-DR3轉基因小鼠中PLP_{91-110}誘導的實驗性自體免疫性腦脊髓炎]. J Autoimmun.[自體免疫性雜誌] 2012年6月; 38(4): 344-353）中討論。

【0418】 測試pmEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在EAE的齧齒動物模型中之功效。此外，pmEV可以口服投與或靜脈內投與。例如，雌性6至8週齡C57Bl/6小鼠獲得自Taconic（日爾曼敦，紐約州）。對各組小鼠的背部兩個位置（上方及下方）投與兩次皮下（s.c.）注射0.1 ml髓磷脂少突膠質細胞糖蛋白35-55（MOG35-55；每次注射100ug；每隻小鼠200ug（每隻小鼠總計0.2 ml）），其乳化於完全弗氏佐劑中（CFA；2-5 mg經殺滅的結核分枝桿菌H37Ra/ml乳劑）。在上文發生後約1至2小時，對小鼠腹膜內（i.p.）注射含於0.1 ml PBS（2ug/ml）中的200 ng百日咳毒素（PTx）。PTx的另外IP注射係在第2天投與。可替代地，使用適當量的代替髓磷脂肽（例如，蛋白脂質蛋白（PLP））以誘導EAE。一些動物充當未經治療的對照（naïve control）。評估EAE嚴重程度並自第4天開始根據本領域中已知之方法每天分配殘疾分數（Mangalam等人，2012）。

【0419】 pmEV治療係在一些時間點（在免疫的時間附近或在EAE免疫之後）下開始。例如，pmEV可在免疫（第1天）的同時投與，或可將它們在出現殘疾的第一跡象（例如，跛尾）後投與，或在嚴重的EAE期間投與。pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg pmEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 pmEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1（pmEV : 細菌細胞）至1-1x10^{12} : 1（pmEV : 細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0420】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受$1x10^4$至$5x10^9$個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0421】 一些組的小鼠可在各種時間點及有效劑量下，用額外抗炎劑或EAE治療劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯劑）、維生素D、類固醇、抗炎劑或其他一種或多種治療）和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0422】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0423】 在各種時間點下，將小鼠處死並可移除發炎的位置（例如，腦及脊髓）、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，組織係使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、

M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或在離體獲得的經純化的CD45+中樞神經系統（CNS）-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片 進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0424】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物（例如，經活化的致腦炎T細胞或EAE誘導肽的回注）再激發。分析小鼠在再激發後對疾病及EAE嚴重程度的易感性。

實例7：膠原誘導的關節炎（CIA）的小鼠模型中的pmEV

【0425】 膠原誘導的關節炎（CIA）為研究類風濕性關節炎（RA）常用的動物模型，如Caplazi等人（Mouse models of rheumatoid arthritis.[類風濕關節炎的小鼠模型] Veterinary Pathology.[獸醫病理學] 2015年9月1日. 52(5): 819-826）所述（還參見Brand等人 Collagen-induced arthritis.[膠原誘導的關節炎] Nature Protocols.[自然實驗手冊] 2007. 2: 1269-1275； Pietrosimone等人 Collagen-induced arthritis: a model for murine autoimmune arthritis.[膠原誘導的關節炎：小鼠自體免疫性關節炎的模型] Bio Protoc.[生物實驗手冊] 2015年10月20日; 5(20): e1626）。

【0426】 在CIA齧齒動物模型的其他版本中，一種模型關於用小雞II型膠原使HLA-DQ8 Tg小鼠免疫，如由Taneja等人,（J. Immunology.[免疫學雜誌] 2007. 56: 69-78；亦參見Taneja等人, J. Immunology [免疫學雜誌] 2008. 181: 2869-2877；及Taneja等人, Arthritis Rheum.[關節炎與風濕病], 2007. 56: 69-78）描述。小雞CII的純化已由Taneja等人,（Arthritis Rheum.[關節炎與風濕病], 2007. 56: 69-78）所述。監測小鼠在免疫後的CIA疾病發作及進展，及評估疾病的嚴重程度並如由Wooley, J. Exp. Med.[實驗醫學雜誌] 1981. 154: 688-700描述進行「評級」。

【0427】 針對CIA誘導使小鼠免疫並將小鼠分為各種治療組。測試pmEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在CIA中之功效。

【0428】 pmEV治療係在用膠原免疫的時間附近或在免疫之後開始。例如，在一些組中，pmEV可在免疫（第1天）的同時投與，或pmEV可在出現疾病的第一跡象後投與，或在嚴重症狀發作後投與。pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg pmEV//小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 pmEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（pmEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（pmEV：細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0429】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受1x10^4至5x10^9個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0430】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外一種或多種抗炎劑或一種或多種CIA治療劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯劑）、維生素D、一種或多種類固醇、一種或多種抗炎劑和/或其他治療），和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0431】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）

添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0432】 在各種時間點下，獲得血清樣本以使用標準ELISA評估抗小雞及抗小鼠CII IgG抗體的濃度（Batsalova等人，Comparative analysis of collagen type II-specific immune responses during development of collagen-induced arthritis in two B10 mouse strains.[兩種B10小鼠品系膠原誘導的關節炎發展過程中II型膠原特異性免疫反應的比較分析] Arthritis Res Ther.[關節炎研究與治療] 2012. 14(6): R237）。同樣地，將一些小鼠處死且可移除發炎的位置（例如，滑膜）、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。使用本領域中已知的技術分析滑膜及滑液中的漿細胞浸潤及抗體的存在。另外，使用解離酶根據製造商的使用說明解離組織以檢查細胞浸潤物譜。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+滑膜-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0433】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物（例如，CIA誘導的肽的活化回注）再激發。分析小鼠在再激發後對疾病及CIA嚴重程度的易感性。

實例8：結腸炎的小鼠模型中的pmEV

【0434】 葡聚糖硫酸鈉（DSS）誘導的結腸炎係經充分研究的結腸炎動物模型，如由Randhawa等人綜述（A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents.[化學誘導的齧齒類動物炎性腸病模型綜述] Korean J Physiol Pharmacol.[韓國生理學和藥理學雜誌] 2014. 18(4): 279-288；還參見Chassaing等人，Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice.[硫酸葡聚糖鈉（DSS）誘導的小鼠結腸炎] Curr Protoc Immunol.[免疫學實驗指南] 2014年2月4日; 104: 15.25單元）。

【0435】 測試pmEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎劑）在DSS誘導的結腸炎的小鼠模型中之功效。

【0436】 如本領域中已知，各組小鼠係用DSS處理以誘導結腸炎（Randhawa等人，2014；Chassaing等人，2014；還參見Kim等人，Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD.[在DSS誘導的IBD模型中調查腸道炎症] J Vis Exp.[可視實驗雜誌] 2012. 60: 3678）。例如，雄性6至8週齡C57Bl/6小鼠獲得自查理斯河實驗室（Charles River Labs），泰康利公司或其他供應商。結腸炎係藉由將3% DSS （MP生物化學公司（MP Biomedicals），目錄號0260110）添加至飲用水來誘導。一些小鼠不接受含於飲用水中的DSS且充當天然對照。一些小鼠接受水，歷時五（5）天。一些小鼠可接受DSS，歷時較短的持續時間或長於五（5）天。監測小鼠並使用本領域中已知的殘疾活動指數基於重量損失進行評分（例如，無體重減輕（0分）；1%至5%體重減輕（1分）；5%至10%體重減輕（2分））；糞便稠度（例如，正常（0分）；大便稀溏（2分）；

腹瀉（4分））及出血（例如，未出血（0分）、潛血陽性（1分）；潛血陽性及視神經沈澱出血（2分）；肛門周圍的血液，大出血（4分）。

【0437】 pmEV治療係在一些時間點（在DSS投與的第1天，或在之後的某一時刻）下開始。例如，pmEV可在DSS開始（第1天）時同時投與，或可將它們在出現疾病的第一跡象（例如，體重減輕或腹瀉）後投與，或在嚴重的結腸炎的整個階段期間投與。每天觀察小鼠的重量、發病率、存活、腹瀉和/或血便的存在。

【0438】 pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠接受7.0e+09和3.0e+12之間的pmEV顆粒。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（pmEV：細菌細胞）至1-1x10^{12}：1（pmEV：細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0439】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受1x10^{4}至5x10^{9}個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0440】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外的抗炎劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯劑）或其他治療），和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0441】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些小鼠接受DSS而未預先接受抗生素。

【0442】 在各種時間點下，使用小動物內視鏡(卡爾史托斯公司(Karl Storz Endoskipe）德國）在異氟烷麻醉下使小鼠經歷視訊內視鏡檢查。記錄靜止影像及視訊以評估結腸炎的程度及對治療的反應。使用本領域中已知的標準對結腸炎進行評分。收集糞便材料用於研究。

【0443】 在各種時間點下，將小鼠處死並收集結腸、小腸、脾臟及淋巴結（例如，腸系膜淋巴結）。另外，將血液收集至血清分離管內。組織損傷係藉由組織學研究評估，該等組織學研究評估（但不限於）隱窩結構、發炎細胞浸潤程度及杯狀細胞消耗。

【0444】 可移除胃腸（GI）道、淋巴結和/或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，獲取組織且可使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+ GI

道-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0445】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物再激發。分析小鼠在再激發後對結腸炎的易感性。

實例9：1型糖尿病（T1D）的小鼠模型中的pmEV

【0446】 1型糖尿病（T1D）係一種自體免疫性疾病，其中免疫系統靶向胰臟的胰島，藉此破壞身體產生胰島素的能力。

【0447】 存在T1D的動物模型的不同模型，如Belle等人綜述（Mouse models for type 1 diabetes.[1型糖尿病的小鼠模型] Drug Discov Today Dis Models.[今日藥物發現：疾病模型] 2009; 6(2): 41-45；還參見Aileen JF King. The use of animal models in diabetes research.[動物模型在糖尿病研究中的應用] Br J Pharmacol.[英國藥理學雜誌] 2012年6月；166(3): 877-894。存在用於化學誘導的T1D、病原體誘導的T1D的模型及其中小鼠自發發展T1D的模型。

【0448】 測試pmEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在T1D的小鼠模型中的效力。

【0449】 取決於T1D誘導之方法和/或T1D發展是否為自發性的，pmEV治療係在一些時間點（在誘導的時間附近或在誘導後，或在自發出現T1D發作之前（或發作後））下開始。pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg pmEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 pmEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本

發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（pmEV：細菌細胞）至1-1x10^{12}：1（pmEV：細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0450】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受1x10^{4}至5x10^{9}個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0451】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外的治療和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0452】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0453】 血糖係在實驗開始前兩週一次進行監測。在此後的各種時間點下，量測非空腹血糖。在各種時間點下，將小鼠處死且可移除胰臟、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，組織係使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、

IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的組織-浸潤性免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。抗體產生亦可藉由ELISA進行評估。

【0454】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物再激發，或針對復發的易感性進行評估。分析小鼠在再激發（或自發出現復發）對糖尿病發作及嚴重程度的易感性。

實例10：原發性硬化性膽管炎（PSC）的小鼠模型中的pmEV

【0455】 原發性硬化性膽管炎（PSC）係緩慢損害膽管並導致末期肝硬化的慢性肝疾病。它與炎性腸病（IBD）相關。

【0456】 存在用於PSC的各種動物模型，如由Fickert等人，（Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC).[原發性硬化性膽管炎(PSC)動物模型的表徵] J Hepatol.[肝病學雜誌] 2014年6月 60(6): 1290-1303；還參見Pollheimer及Fickert.Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis.[原發性膽汁性肝硬化和原發性硬化性膽管炎的動物模型]Clin Rev Allergy Immunol.[過敏與免疫學臨床評論] 2015年6月 48(2-3): 207-17）。PSC模型中疾病的誘導包括化學誘導（例如，3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氫可力丁（DDC）誘導的膽管炎）、病原體誘導（例如，小球隱孢子蟲）、實驗性膽管梗阻（例如，膽總管結紮術（CBDL））及抗原驅動的膽管損傷的轉基因小鼠模型（例如，Ova-Bil轉基因小鼠）。例如，膽管結紮術係如由Georgiev等人，（Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation.[實驗性膽管結紮後與時間相關的變化] Br J Surg.[英國外科學雜誌] 2008. 95(5): 646-56）描述進行，或疾病係藉由DCC暴露如由Fickert等人，（A new

xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis.[一種新的異種生物誘導的硬化性膽管炎和膽汁纖維化小鼠模型] Am J Path.[美國病理學雜誌]，第171(2)卷: 525-536描述誘導。

【0457】 測試pmEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加一些其他治療劑）在PSC的小鼠模型中之功效。

DCC誘導的膽管炎

【0458】 例如，6至8週齡C57bl/6小鼠獲得自Taconic或其他供應商。給小鼠餵食0.1% DCC補充飲食，持續各種持續時間。一些組接受DCC補充食物，歷時1週，其他歷時4週，其他歷時8週。一些組的小鼠可在一段時間內接受DCC補充飲食及然後容許恢復，此後接受正常飲食。可研究這類小鼠自疾病恢復的能力和/或它們的一經後續暴露於DCC則復發的易感性。使用pmEV的治療係在某一時間點（在DCC餵養的時間附近或在開始暴露於DCC之後）開始。例如，pmEV可在第1天投與，或可將它們在此後的某一時刻投與。pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射pmEV。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09和3.0e+12之間的pmEV顆粒。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（pmEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（pmEV：細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0459】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等

細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0460】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用另外的藥劑和/或適當的對照（例如，媒劑或抗體）進行處理。

【0461】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。在各種時間點下，分析血清樣本中的ALT、AP、膽紅素及血清膽汁酸（BA）濃度。

【0462】 在各種時間點下，將小鼠處死，記錄體重及肝重量，且移除發炎的位置（例如，肝、小腸及大腸、脾臟）、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織形態學表徵、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析（參見，Fickert等人，Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis（PSC））.[原發性硬化性膽管炎（PSC）動物模型的表徵] J Hepatol.[肝病學雜誌] 2014. 60(6): 1290-1303）。例如，針對ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1的表現染色膽管。一些組織係經染色用於組織學檢查，而其他組織係使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80），及黏附分子表現（ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、

IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+膽管-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。

【0463】 製備肝組織以用於組織學分析，例如，使用天狼星紅染色，接著對纖維化區域定量。在治療結束時，收集血液用於肝酶（例如，AST或ALT）的血漿分析，及用以測定膽紅素濃度。羥脯胺酸的肝含量可使用預定方案量測。炎症及纖維化標誌物的肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證的引子進行。這類標誌物可包括但不限於MCP-1、α-SMA、Col1a1及TIMP。血漿、組織及糞便樣本中的代謝物量測可使用預定代謝組學方法進行。最後，對肝切片進行免疫組織化學以量測中性粒細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0464】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可稍後用DCC再激發。分析小鼠在再激發後對膽管炎及膽管炎嚴重程度的易感性。

BDL誘導的膽管炎

【0465】 可替代地，測試pmEV在BDL誘導的膽管炎中之功效。例如，6至8週齡C57Bl/6J小鼠獲得自泰康利公司或其他供應商。在適應期後，使該等小鼠經受手術程序以進行膽管結紮術（BDL）。一些對照動物接受假手術。BDL程序在7至21天內導致肝損傷、炎症及纖維化。

【0466】 使用pmEV的治療係在某一時間點（在手術的時間附近或在手術後的某一時刻）下開始。pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg pmEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 pmEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受pmEV。一

些小鼠每天（例如，起始自第1天）接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（pmEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（pmEV：細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0467】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受1x10^{4}至5x10^{9}個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0468】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用另外的藥劑和/或適當的對照（例如，媒劑或抗體）進行處理。

【0469】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。在各種時間點下，分析血清樣本中的ALT、AP、膽紅素及血清膽汁酸（BA）濃度。

【0470】 在各種時間點下，將小鼠處死，記錄體重及肝重量，且移除發炎的位置（例如，肝、小腸及大腸、脾臟）、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織形態學表徵、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析（參見，Fickert等人，Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis（PSC））.[原發性硬化性膽管炎（PSC）動物模型的表徵] J Hepatol.[肝病學雜誌] 2014. 60(6): 1290-1303）。例如，針對ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1的表現染色膽管。一些組織係經染色用於組織學檢查，而其他組織係使用解離酶根

據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80），及黏附分子表現（ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+膽管-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。

【0471】 製備肝組織以用於組織學分析，例如，使用天狼星紅染色，接著對纖維化區域定量。在治療結束時，收集血液用於肝酶（例如，AST或ALT）的血漿分析，及用以測定膽紅素濃度。羥脯胺酸的肝含量可使用預定方案量測。炎症及纖維化標誌物的肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證的引子進行。這類標誌物可包括但不限於MCP-1、α-SMA、Coll1a1及TIMP。血漿、組織及糞便樣本中的代謝物量測可使用預定代謝組學方法進行。最後，對肝切片進行免疫組織化學以量測中性粒細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0472】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可針對恢復進行分析。

實例11：非酒精性脂肪性肝炎（NASH）的小鼠模型中的pmEV

【0473】 非酒精性脂肪性肝炎（NASH）係非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）的嚴重形式，其中肝脂肪（脂肪變性）及炎症的逐步發展導致肝損傷及肝細胞細胞死亡（鼓脹）。

【0474】 存在不同NASH動物模型，如Ibrahim等人綜述（Animal models of Nonalcoholic steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflame.[非酒精性脂肪性肝炎的動物模型：進食，刪除和發炎] Dig Dis Sci.[消化疾病與科學] 2016年5月. 61(5): 1325-1336；還參見Lau等人, Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances[非酒精性脂肪肝疾病的動物模型：當前觀點和最新進展] 2017年1月 241(1): 36-44）。

【0475】 測試pmEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加另一治療劑）在NASH的小鼠模型中的效力。例如，將8至10週齡C57Bl/6J小鼠（獲得自Taconic（紐約州日爾曼敦（Germantown, NY））或其他供應商）放置於缺乏甲硫胺酸膽鹼（MCD）的飲食上，歷時4至8週的週期，在此期間NASH特徵發展，包括脂肪變性、炎症、鼓脹及纖維化。

【0476】 測試棲組織普雷沃菌pmEV（單獨或彼此結合，以不同比例，添加或未添加另一治療劑）在NASH的小鼠模型中之功效。例如，使8週齡C57Bl/6J小鼠（獲得自查理斯河（Charles River）（法國）或其他供應商）適應5天的週期，基於體重隨機分為10隻小鼠的組，並放置於缺乏甲硫胺酸膽鹼（MCD）的飲食上，例如來自研究用飲食公司（Research Diets）（USA）的A02082002B，歷時4週的週期，在此期間NASH特徵發展，包括脂肪變性、炎症、鼓脹及纖維化。給對照食物小鼠餵養正常食物飲食，例如，來自SDS飲食公司（SDS Diets）（英國）的RM1（E）801492。隨意提供對照食物、MCD飲食及水。

【0477】 使用自Kleiner等人,（Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.[非酒精性脂肪肝疾病組織學評分系統的

設計和驗證] Hepatology.[肝臟病學] 2005年6月 41(6): 1313-1321）調適的NAS評分系統以確定脂肪變性的程度（0至3分）、小葉炎症（0至3分）、肝細胞鼓脹（0至3分）及纖維化（0至4分）。個別小鼠NAS分數係藉由針對脂肪變性、炎症、鼓脹及纖維化的分數（0至13分）求和進行計算。另外，血漿AST及ALT的濃度係使用來自堀場公司（Horiba ）（美國）的Pentra 400儀器，根據製造商的使用說明進行測定。肝總膽固醇、三酸甘油酯、脂肪酸、丙胺酸胺基轉移酶及天冬胺酸胺基轉移酶的濃度也是使用本領域中已知之方法進行測定。

【0478】 在其他研究中，炎症、纖維化、脂肪變性、ER應激或氧化應激標誌物的肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證的引子進行。這類標誌物可包括（但不限於）IL-1β、TNF-α、MCP-1、α-SMA、Col11a1、CHOP及NRF2。

【0479】 在其他研究中，炎症、纖維化、脂肪變性、ER應激或氧化應激標誌物的肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證的引子進行。這類標誌物可包括（但不限於）IL-1β、TNF-α、MCP-1、α-SMA、Col11a1、CHOP及NRF2。

【0480】 pmEV治療係在一些時間點（在飲食開始時，或在飲食開始後的某一時刻（例如，一週後））下開始。例如，pmEV可在開始MCD飲食的同一天投與。pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg pmEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 pmEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（pmEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（pmEV：細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0481】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^4至5 x 10^9個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0482】 一些組的小鼠可在各種時間點及有效劑量下，用一種或多種另外的NASH治療劑（例如，FXR促效劑、PPAR促效劑、CCR2/5拮抗劑或其他治療）和/或適當的對照進行處理。

【0483】 在各種時間點下和/或在治療結束時，將小鼠處死並可移除肝、腸、血液、排泄物或其他組織用於使用本領域中已知之方法進行離體組織學、生物化學、分子或細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，稱重並製備肝組織用於組織學分析，其可包含用H&E、天狼星紅染色，及測定NASH活動分數（NAS）。在各種時間點下，收集血液用於肝酶（例如，AST或ALT）的血漿分析，使用標準分析。另外，膽固醇、三酸甘油酯或脂肪酸的肝含量可使用預定方案進行量測。炎症、纖維化、脂肪變性、ER應激或氧化應激標誌物的肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證的引子進行。這類標誌物可包括但不限於IL-6、MCP-1、α-SMA、Coll1a1、CHOP及NRF2。血漿、組織及糞便樣本中的代謝物量測可使用預定的基於生物化學及質譜的代謝組學方法進行。可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+膽管-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對肝或腸切片進行免疫組織化學以量測中性粒細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0484】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可針對恢復進行分析。

實例12：牛皮癬的小鼠模型中的pmEV

【0485】 牛皮癬係T細胞介導的慢性炎症皮膚疾病。所謂的「斑塊型」牛皮癬係牛皮癬的最常見形式且特徵係乾鱗、紅色斑塊、及皮膚因免疫細胞浸潤至真皮及表皮內而增厚。數種動物模型有助於瞭解此疾病，如由Gudjonsson等人，（Mouse models of psoriasis.[牛皮癬的小鼠模型] J Invest Derm.[皮膚病學研究雜誌] 2007. 127: 1292-1308；還參見van der Fits等人，Imiquimod-induced psoriasis -like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis.[咪喹莫特誘導的小鼠牛皮癬樣皮膚炎症係藉由IL-23/IL-17軸介導的] J. Immunol.[免疫學雜誌] 2009年5月1日. 182(9): 5836-45）。

【0486】 牛皮癬可於各種小鼠模型中誘導，包括那些使用轉基因、敲除或異種移植模型，並局部施用咪喹莫特（IMQ）（一種TLR7/8配位基）模型。

【0487】 測試pmEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在牛皮癬的小鼠模型中的效力。例如，6至8週齡C57Bl/6或Balb/c小鼠獲得自Taconic（日爾曼敦，紐約州）或其他供應商。將小鼠的背部及右耳剃光。各組小鼠接受每天62.5 mg局部劑量的市售IMQ乳膏（5%）（咪喹莫特（Aldara）；3M藥物公司（3M Pharmaceuticals））。將該劑量施用至經剃毛的區域，歷時連續5或6天。每隔一定時間，對小鼠的紅斑、結垢及增厚按自0至4的標度進行評分，如由der Fits等人，(2009)描述。使用Mitutoyo千分尺監測小鼠的耳厚度。

【0488】 使用pmEV的治療係在某一時間點（在第一次施用IMQ的時間附近，或之後的某一時刻）開始。例如，pmEV可在皮下注射（第0天）的同時投與，或可將它們在投與之前或在投與後投與。pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射pmEV。其

他小鼠可接受25、50或100 mg pmEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 pmEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第0天）接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1（pmEV : 細菌細胞）至1-1 x 10^{12} : 1（pmEV : 細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0489】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0490】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用抗炎劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯劑）或其他治療），和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0491】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0492】 在各種時間點下，採集來自背部及耳朵皮膚的樣本用於使用本領域中已知之方法進行冰凍切片染色分析。將其他組的小鼠處死且可移除淋巴結、脾臟、腸系膜淋巴結（MLN）、小腸、結腸及其他組織用以使用本領域中已知之方法進行組織學研究、離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分

析。一些組織可使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。冰凍切片樣本、組織樣本或離體獲得的細胞係經染色用於藉由流動式細胞測量術使用本領域中已知的技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+皮膚-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0493】 為檢查牛皮癬保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可經研究以評估恢復，或可將它們用IMQ再激發。分析經再激發的小鼠對牛皮癬及反應的嚴重程度的易感性。

實例13：肥胖症（DIO）的小鼠模型中的pmEV

【0494】 存在多種DIO的動物模型，如Tschop等人（A guide to analysis of mouse energy metabolism[小鼠能量代謝分析指南]. Nat. Methods.[自然方法] 2012; 9(1):57-63）和Ayala等人（Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice[描述和執行小鼠葡萄糖體內穩態代謝測試的標準操作程序]. Disease Models and Mechanisms.[疾病模型和機制] 2010; 3:525-534）所綜述的並且由Physiogenex公司提供。

【0495】 測試pmEV（單獨或與其他完整細菌細胞（活的、被殺死的、被照射的和/或滅活的等）組合，添加或未添加其他抗炎治療）在DIO的小鼠模型中的效力。

【0496】 取決於DIO誘導之方法和/或DIO發展是否為自發性的，pmEV治療係在一些時間點（在誘導的時間附近或在誘導後，或在自發出現T1D發作之前（或發作後））下開始。pmEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg pmEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 pmEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受pmEV。一些小鼠可每天接受pmEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受pmEV。可給小鼠組投與包含pmEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（pmEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（pmEV：細菌細胞）的pmEV顆粒和完整細菌。

【0497】 可替代地，一些組的小鼠可以與pmEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與pmEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與pmEV之前經照射或熱滅活。

【0498】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外的治療和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0499】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）

添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0500】 血糖係在實驗開始前兩週一次進行監測。在此後的各種時間點下，量測非空腹血糖。在各種時間點下，將小鼠處死且可移除胰臟、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，組織係使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的組織-浸潤性免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。抗體產生亦可藉由ELISA進行評估。

【0501】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物再激發，或針對復發的易感性進行評估。分析小鼠在再激發（或自發出現復發）對糖尿病發作及嚴重程度的易感性。

實例14：標記細菌的pmEV

【0502】 pmEV可以被標記，以便跟蹤其在體內的生物分佈，並在各種製劑和用哺乳動物細胞進行的測定中定量和跟蹤細胞定位。例如，pmEV可為放射

性標記的、與染料一起孵育、螢光標記的、發光標記的或用包含金屬和金屬同位素的軛合物標記的。

【0503】 例如，pmEV可以與軛合至官能基（如NHS-酯、點擊化學基團、鏈黴親和素或生物素）的染料一起孵育。標記反應可以在多種溫度下進行數分鐘或數小時，並且可以進行或不進行攪拌或旋轉。然後可以根據方案藉由添加試劑（例如牛血清白蛋白（BSA）或類似試劑）來終止反應，並藉由超速離心、過濾、離心過濾、柱親和純化或透析除去游離或未結合的染料分子。可以採用包含洗滌緩衝液和渦旋或攪拌的另外洗滌步驟以確保完全去除游離染料分子，例如在Su Chul Jang等人, Small.11, 第4期, 456-461(2017)中所述。

【0504】 視需要，pmEV可濃縮至5.0 E12個顆粒/ml（300ug），並使用2X濃縮的PBS緩衝液（pH 8.2）稀釋至1.8mo，並使用臺式超速離心機在4℃下以165,000 x g離心沈澱。將沈澱重新懸浮在300ul 2X PBS（pH 8.2）中，從10 mM染料母液（溶解於DMSO中）以0.2mM的終濃度添加NHS-酯螢光染料。樣本在24°C溫和攪拌1.5小時，然後在4°C孵育過夜。藉由上述稀釋/沈澱的2個重複步驟去除游離的未反應染料，使用1X PBS緩衝液，並在300ul最終體積中重新懸浮。

【0505】 藉由共聚焦顯微鏡、奈米顆粒跟蹤分析、流式細胞儀、螢光激活細胞分選（FAC）或螢光成像系統（例如Odyssey CLx LICOR），在細胞或器官中，或在體外和/或離體樣本中檢測螢光標記的pmEV（參見例如 Wiklander等人 2015. J. Extracellular Vesicles[胞外囊泡雜誌]. 4:10.3402/jev.v4.26316）。另外，使用儀器，諸如H-I. Choi等人 *Experimental & Molecular Medicine*[實驗與分子醫學]. 49: e330 (2017)中的IVIS光譜CT（珀金埃爾默公司（Perkin Elmer））或Pearl Imager在完整動物和/或經剝離的器官及組織中檢測經螢光標記的pmEV。

【0506】 也可以使用上述方案用含有金屬和金屬同位素的軛合物標記pmEV。金屬軛合的pmEV可以體內給動物投與。然後可以在不同的時間點從器

官中獲取細胞，並進行離體分析。可替代地，來源於動物、人或永生化細胞系的細胞可以用金屬標記的pmEV在體外處理，並且細胞隨後用金屬軛合的抗體標記並使用飛行時間流動式細胞測量術（CyTOF）儀器（例如Helios CyTOF（富魯達公司(Fluidigm)））進行表型分析或使用成像質量細胞術儀器(例如Hyperion成像系統（富魯達公司））進行成像和分析。另外，pmEV可以用放射性同位素標記以跟蹤pmEV的生物分佈(參見，例如，Miller等人, Nanoscale[奈米尺度].2014年5月7日; 6(9):4928-35)。

實例15：透射電子顯微鏡以視覺化細菌pmEV

【0507】 pmEV係從細菌分批培養中製備的。透射電子顯微鏡（TEM）可用於視覺化純化的細菌pmEV（S. Bin Park等人 PLoS ONE[公共科學圖書館·綜合]. 6(3):e17629 (2011)）。將pmEV載入於300-或400-目-尺寸碳塗覆銅網（電子顯微科學公司（Electron Microscopy Sciences），美國）上歷時2分鐘並用去離子水清洗。pmEV使用2% （w/v）乙酸鈾醯負染色20秒至1分鐘。銅網用無菌水清洗並乾燥。影像使用透射電子顯微鏡以100至120 kV加速電壓獲取。經染色的pmEV在直徑20 nm-600 nm之間出現且為電子緻密的。對各網篩選10至50個視野。

實例16：圖譜分析pmEV組成及內容物

【0508】 pmEV可藉由包括（但不限於）以下的各種方法中的任一者來表徵：NanoSight表徵、SDS-PAGE凝膠電泳、蛋白質印跡、ELISA、液相層析-質譜法及質譜、動態光散射、脂質水平、總蛋白、脂質與蛋白質比、核酸分析和/或ζ電位。

pmEV的NanoSight表徵

【0509】 奈米顆粒跟蹤分析（NTA）用以表徵經純化的細菌pmEV的粒度分佈。於NanoSight機器（瑪律文儀器公司（Malvern Instruments））上運行純化的pmEV製劑以評估pmEV尺寸及濃度。

SDS-PAGE凝膠電泳

【0510】 為了鑒定純化的pmEV的蛋白質組分，將樣本使用標準技術在凝膠上運行，例如Bolt Bis-Tris Plus 4-12%凝膠（賽默飛世爾科技公司（Thermo-Fisher Scientific））。將樣本於1x SDS樣本緩衝液中煮沸10分鐘，冷卻至4°C，及然後在16,000 x g下離心1分鐘。然後，將樣本於SDS-PAGE凝膠上運行並使用幾種標準技術（例如，銀染色、考馬斯藍、凝膠代碼藍）中的任何一者進行染色以使條帶視覺化。

蛋白質印跡分析

【0511】 為鑒定及定量純化的pmEV的特定蛋白質組分，pmEV蛋白藉由如上文描述的SDS-PAGE分離及經受蛋白質印跡分析（Cvjetkovic等人，*Sci. Rep.*[科學報告]**6**, 36338 (2016)）並經由ELISA定量。

pmEV蛋白質組學與液相層析-質譜法（LC-MS/MS）及質譜法（MS）

【0512】 存在於pmEV中的蛋白質藉由質譜法技術鑒定及定量。可以使用標準技術製備pmEV蛋白用於LC-MS/MS，該標準技術包括使用二硫蘇糖醇溶液（DTT）進行蛋白還原以及使用酶（例如LysC和胰蛋白酶）進行蛋白消化（如在Erickson等人, 2017（Molecular Cell[分子細胞], 第65卷, 第2期, 第361-370頁, 2017年1月19日）中所述）。另一方面，肽係如Liu等人.2010 (JOURNAL OF BACTERIOLOGY[細菌學雜誌], 2010年6月, 第2852-2860頁 第192卷, 第11期)，Kieselbach和Oscarsson 2017（Data Brief[數據摘要].2017年2月; 10: 426-431.），Vildhede等人, 2018（Drug Metabolism and Disposition[藥物代謝與處置] 2018年2月8日）中所述製備。消化後，直接在液相層析和質譜儀上運行肽製劑，用於在單個樣本中鑒定蛋白質。為了相對定量樣本之間的蛋白質，使用iTRAQ 試劑-8plex多重套組（應用生物系統公司（Applied Biosystems），福斯特城，加利福尼亞州）或TMT 10plex和11plex標記試劑（賽默飛世爾科技公司（Thermo Fischer

Scientific），聖約瑟，加利福尼亞州，USA）將來源於不同樣本的肽消化物用同量異位元素標籤進行標記。每個肽消化物都用不同的同量異位元素標籤標記，然後將經標記的消化物合組合進入一個樣本混合物。藉由LC-MS/MS分析組合的肽混合物，以進行鑒定和定量。使用LC-MS/MS數據進行數據庫搜索，以鑒定經標記的肽和相應的蛋白質。在同量異位元素標記的情況下，附著標籤的片段產生低分子量的報告離子，該離子用於獲得每個pmEV中存在的肽和蛋白質的相對定量。

【0513】 另外，代謝內容物使用液體層析法與質譜法的組合進行確定。存在測定各種樣本的代謝內容物且為熟悉該項技術者已知的各種技術，該等技術關於溶劑萃取、層析分離及耦合至質量測定的各種電離技術（Roberts等人，2012 Targeted Metabolomics.[靶向代謝組學]Curr Protoc Mol Biol.[當代分子生物學方案] 30: 1-24；Dettmer等人，2007, Mass spectrometry-based metabolomics.[基於質譜的代謝組學]Mass Spectrom Rev.[質譜綜述] 26(1):51-78）。作為一項非限制性實例，LC-MS系統包括與1100系列泵（安捷倫公司（Agilent））及HTS PAL自動進樣器（Leap科技公司（Leap Technologies））組合的4000 QTRAP三重四級桿質譜儀（AB SCIEX）。培養基樣本或其他複雜代謝混合物（約10 μL）係使用九體積的含有穩定的同位素標記內標物（纈胺酸-d8，Isotec；及苯丙胺酸-d8，劍橋同位素實驗室（Cambridge Isotope Laboratories））的74.9 : 24.9 : 0.2（v/v/v）乙腈/甲醇/甲酸進行萃取。標準物可取決於受關注的代謝物進行調整或修飾。樣本係經離心（10分鐘，9,000g，4°C），及上清液（10 μL）係藉由將溶液注射於HILIC管柱（150 × 2.1 mm, 3 μm粒度）上而呈遞至LCMS。管柱藉由使5%流動相[10 mM甲酸銨，0.1%甲酸於水中]以250uL/分鐘的速率流動1分鐘，接著線性梯度歷時10分鐘至40%流動相的溶液[具有0.1%甲酸的乙腈]進行洗脫。將離子噴霧電壓設定至4.5 kV及源溫度係450°C。

【0514】 數據係使用市售軟體（諸如來自AB SCIEX的Multiquant 1.2）進行分析以用於質譜峰積分。受關注的峰應手動控制並與標準進行比較來證實該峰的同一性。用適當的標準物進行定量以確定在細菌調節（bacterial conditioning）後及在腫瘤細胞生長後，初始培養基中存在的代謝物的量。也可以使用代謝物數據庫（例如但不限於NIST數據庫）將非靶向代謝組學方法用於峰鑒定。

動態光散射（DLS）

【0515】 DLS量測（包括不同尺寸的顆粒在不同pmEV製劑中的分佈）係使用儀器諸如DynaPro NanoStar （懷雅特技術公司（Wyatt Technology））及Zetasizer Nano ZS （瑪律文儀器公司（Malvern Instruments））進行。

脂質水平

【0516】 脂質水平係使用FM4-64（生命科技公司（Life Technologies）），藉由類似於那些由A.J. McBroom等人，*J Bacteriol*[*細菌學雜誌*] 188:5385-5392. 及A. Frias等人，*Microb Ecol.*[微生物生態學] 59:476-486 (2010)描述者之方法進行定量。樣本係用FM4-64培養（3.3 μg/mL於PBS中，在37°C下在黑暗中培養10分鐘）。在515 nm下激發後，在635 nm下的發射係使用Spectramax M5平板閱讀器（分子儀器公司（Molecular Devices））量測。絕對濃度係藉由將未知樣本與已知濃度的標準物（諸如棕櫚醯油酸磷脂醯甘油（POPG）囊泡）進行比較而測定。脂質組學可用於鑒定pmEV中存在的脂質。

總蛋白質

【0517】 蛋白質水平係藉由標準分析（諸如布拉德福德及BCA分析）定量。該等布拉德福德分析係使用Quick Start布拉德福德1x染料試劑（伯樂公司（Bio-Rad）），根據製造商的方案運行。BCA分析係使用Pierce BCA蛋白質分析套組（賽默飛世爾科技公司（Thermo-Fisher Scientific））運行。絕對濃度係藉由與產生自已知濃度的BSA的標準曲線進行比較而測定。可替代地，蛋白質

濃度可以使用比爾-朗伯（Beer-Lambert）方程使用如在奈米滴分光光度計（賽默飛世爾科技公司）上測量的樣本在280nm（A280）處的吸光度來計算。此外，蛋白質組學可以用於鑒定樣本中的蛋白質。

脂質: 蛋白質比率

【0518】 脂質: 蛋白質比率係藉由脂質濃度除以蛋白質濃度產生。相較於各製劑中的游離蛋白質，這類提供囊泡的純度的量度。

核酸分析

【0519】 核酸提取自pmEV並使用Qubit螢光計定量。粒度分佈係使用生物分析儀評估並將材料定序。

ζ電位

【0520】 不同製劑的ζ電位係使用諸如Zetasizer ZS （Malvern Instruments）的儀器量測。

實例17：體外篩選用於增強活化樹突細胞的pmEV

【0521】 體外免疫反應被認為係模擬體內誘導免疫反應（例如對癌症微環境的反應）的機制。簡而言之，PBMC係藉由梯度離心使用淋巴細胞分離劑（奈科明公司（Nycomed），奧斯陸，挪威）分離自來自健康供體的肝素化靜脈血或使用基於磁珠的人血樹突細胞分離套組（美天旎生物技術公司（Miltenyi Biotech），坎布裡奇，麻塞諸塞州）分離自小鼠脾臟或骨髓。使用抗人CD14 mAb，單核細胞係藉由Moflo純化並在cRPMI中以5e5個細胞/ml的細胞密度於96孔板（科斯塔公司（Costar Corp））中在37°C下培養7天。就樹突細胞的成熟而言，培養物以0.2 ng/mL IL-4及1000 U/ml GM-CSF在37°C下刺激一週。可替代地，藉由與重組GM-CSF孵育一週或使用本領域已知的其他方法實現成熟。小鼠DC可使用珠富集直接獲取自脾臟或分化自造血幹細胞。簡而言之，骨髓可以獲得自小鼠的股骨。回收細胞並裂解紅血球。幹細胞在細胞培養基在20 ng/ml小鼠

GMCSF中培養4天。添加含有20 ng/ml小鼠GM-CSF的另外培養基。在第6天，將培養基及非黏附細胞移除並用含有20 ng/ml GMCSF的新鮮細胞培養基置換。具有20 ng/ml GM-CSF的細胞培養基的最終添加係在第7天添加。在第10天，獲取非黏附細胞並接種於細胞培養板中過夜並視需要進行刺激。然後用不同劑量的pmEV（用或不用抗生素）處理樹突細胞。例如，25-75 ug/mL pmEV與抗生素24小時。測試的pmEV組成物可包括來自單一細菌物種或菌株的pmEV，或來自一個或多個屬、1個或多個物種、或1個或多個菌株（例如，一個物種內的一個或多個菌株）的pmEV的混合物。包括作為陰性對照的PBS並且來自雙歧桿菌屬物種的LPS、抗CD40抗體用作陽性對照。在培養後，DC係用抗CD11b、CD11c、CD103、CD8a、CD40、CD80、CD83、CD86、MHCI及MHCII染色，及藉由流動式細胞測量術分析。相較於陰性對照在CD40、CD80、CD83及CD86中顯著增加的DC被視為由相關細菌pmEV組成物活化。該等實驗最少重複三次。

【0522】 為篩選經pmEV活化的上皮細胞刺激DC的能力，上述方案係以添加24小時上皮細胞pmEV共培養物且接著用DC培養進行。在用pmEV培養後，清洗上皮細胞及然後在缺乏pmEV的情況下與DC共培養24小時，然後如上文進行處理。上皮細胞系可包括Int407、HEL293、HT29、T84及CACO2。

【0523】 作為DC活化的另外量測，在用pmEV或經pmEV處理的上皮細胞將DC培養24小時後，自孔移除100 µl培養上清液並使用Luminex Magpix.多工套組（EMD密理博公司（EMD Millipore）,達姆施塔特市，德國）分析分泌的細胞介素、趨化因子及生長因子。簡而言之，該等孔用緩衝液預濕，並添加25 µl的1x經抗體塗覆的磁珠且2x 200 µl清洗緩衝液係在每個孔中使用磁珠進行。添加50 µl培養緩衝液、50 µl稀釋劑及50 µl樣本並經由在室溫下在黑暗中振盪2小時進行混合。然後，用200 µl清洗緩衝液清洗該等珠兩次。添加100 µl的1X生物素化檢測抗體並及黑暗中伴隨振盪培養懸浮液1小時。然後，用清洗緩衝液進行兩次200

μl清洗。將100 μl的1x SAV-RPE試劑添加至各孔並在室溫下在黑暗中培養30分鐘。進行三次200 μl清洗並添加125 μl清洗緩衝液及進行2至3分鐘振盪。然後，將該等孔呈遞至Luminex xMAP系統中用於分析。

【0524】 標準物容許細胞介素（包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B、IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12（p40/p70）、IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22 IL-23、IL-25、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF）的仔細定量。評估小鼠及人起源兩者的樣本中的這類細胞介素。經細菌處理的樣本中的這類細胞介素的增加指示宿主增強產生蛋白質及細胞介素。檢查特定細胞類型釋放細胞介素的能力的此分析的其他變化係經由藉由分選方法獲取這類細胞進行評估並為本領域中的一般技術者知曉。此外，亦評估細胞介素mRNA以解決反應於pmEV組成物的細胞介素釋放。

【0525】 此DC刺激方案可使用純化的pmEV及活細菌菌株的組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例18：當用腫瘤細胞培養時，體外篩選用於增強CD8+ T細胞殺死活化的pmEV

【0526】 本文描述用於篩選可活化CD8+ T細胞殺死腫瘤細胞的pmEV的體外方法。簡言之，使用本領域已知的技術從人PBMC或小鼠脾臟分離DC，並與單一菌株pmEV、pmEV的混合物和/或適當的對照在體外孵育。另外，CD8+ T細胞係使用本領域已知的技術，例如基於磁珠的小鼠CD8a+ T細胞分離套組及基於磁珠的人CD8+ T細胞分離套組（兩者均來自美天旎生物技術公司（Miltenyi Biotech），坎布裡奇，麻塞諸塞州）獲得自人PBMC或小鼠脾臟。在DC與pmEV孵育一段時間（例如，24小時）後，或DC與pmEV刺激的上皮細胞孵育後，用PBS洗滌從細胞培養物中去除pmEV，並向每個孔中添加100ul含有抗生素的新鮮培養基，並且向96孔板中的每個實驗孔中添加200,000個T細胞。抗CD3抗體係以

2 ug/ml的最終濃度添加。然後，容許在37°C下在正常氧條件下將共培養物培養96小時。

【0527】 例如，在共培養孵育大約72小時後，用本領域已知的技術將腫瘤細胞接種以用於測定。例如，以50,000個腫瘤細胞/孔接種於新96孔板中的各孔中。所用的小鼠腫瘤細胞系可包括B16.F10、SIY+ B16.F10等等。人腫瘤細胞系係與供體HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA細胞系。在96小時共培養完成後，將100 μl的CD8+ T細胞及DC混合物轉移至含有腫瘤細胞的孔。在37°C下在正常氧條件下將板培養24小時。星形孢菌素可以用作陰性對照以解釋細胞死亡。

【0528】 在此培養後，使用流動式細胞測量術以量測腫瘤細胞死亡及表徵免疫細胞表型。簡而言之，腫瘤細胞用活性染料染色。使用FACS分析以對腫瘤細胞特異性閘控並量測死（被殺死）腫瘤細胞的百分率。數據亦顯示為每孔死腫瘤細胞的絕對數量。細胞毒性CD8+ T細胞表型可藉由下列方法表徵：a) 上清液顆粒酶B、IFNγ及TNFa於培養上清液中的濃度，如下文描述；b) 活化標誌物（諸如DC69、CD25、CD154、PD-1、γ/δ TCR、Foxp3、T-bet、顆粒酶B）的CD8+ T細胞表面表現；c) IFNγ、顆粒酶B、TNFa於CD8+ T細胞中的胞內細胞介素染色。除上清液細胞介素濃度（包括INFγ、TNFa、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趨化因子等）外，亦可藉由胞內細胞介素染色評估CD4+ T細胞表型。

【0529】 作為CD8+ T細胞活化的額外測量，在用DC將T細胞培養96小時後，自孔移除100 μl培養上清液並使用Luminex Magpix.多工套組（EMD Millipore, Darmstadt, Germany）分析分泌的細胞介素、趨化因子及生長因子。簡而言之，該等孔用緩衝液預濕，並添加25 μl的1x經抗體塗覆的磁珠且2x 200 μl清洗緩衝液係在每個孔中使用磁珠進行。添加50 μl培養緩衝液、50 μl稀釋劑及50 μl樣本並經由在室溫下在黑暗中振盪2小時進行混合。然後，用200 μl清洗緩衝液清洗

該等珠兩次。添加100 μl的1X生物素化檢測抗體並及黑暗中伴隨振盪培養懸浮液1小時。然後，用清洗緩衝液進行兩次200 μl清洗。將100 μl的1x SAV-RPE試劑添加至各孔並在室溫下在黑暗中培養30分鐘。進行三次200 μl清洗並添加125 μl清洗緩衝液及進行2至3分鐘振盪。然後，將該等孔呈遞至Luminex xMAP系統中用於分析。

【0530】 標準物容許細胞介素(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12（p40/p70）、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF）的仔細定量。評估小鼠及人起源兩者的樣本中的這類細胞介素。經細菌處理的樣本中的這類細胞介素的增加指示宿主增強產生蛋白質及細胞介素。檢查特定細胞類型釋放細胞介素的能力的此分析的其他變化係經由藉由分選方法獲取這類細胞進行評估並為本領域中的一般技術者知曉。此外，亦評估細胞介素mRNA以解決反應於pmEV組成物的細胞介素釋放。宿主細胞中的這類變化刺激與癌症微環境中的體內反應類似的免疫反應。

【0531】 此CD8+ T刺激方案可使用經純化的pmEV及活細菌菌株的組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例19：藉由PBMC體外篩選用於增強腫瘤細胞殺死的pmEV

【0532】 各種方法可用於針對刺激PBMC的能力來篩選pmEV，PBMC反過來活化CD8+ T細胞以殺死腫瘤細胞。例如，PBMC係藉由用於小鼠或人血液的菲可-派克（ficoll-paque）梯度離心分離自來自健康人供體的肝素化靜脈血或用淋巴細胞分離培養基（Cedarlane實驗室（Cedarlane Labs），安大略，加拿大）分離自小鼠血液。PBMC與單一菌株pmEV、pmEV的混合物和適當的對照孵育。另外，CD8+ T細胞獲得自人PBMC或小鼠脾臟。在PBMC與pmEV孵育24小時後，使用PBS洗滌將pmEV從細胞中去除。向每個孔中添加100ul帶有抗生素的新

鮮培養基。在96孔板的每個實驗孔中添加適當數量的T細胞（例如200,000個T細胞）。抗CD3抗體係以2 ug/ml的最終濃度添加。然後，容許在37°C下在正常氧條件下將共培養物培養96小時。

【0533】 例如，進入共培養物培養72小時後，以50,000個腫瘤細胞/孔接種於新96孔板中的各孔中。所用的小鼠腫瘤細胞系包括B16.F10、SIY+ B16.F10等等。人腫瘤細胞系係與供體HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA細胞系。在96小時共培養完成後，將100 µl的CD8+ T細胞及PBMC混合物轉移至含有腫瘤細胞的孔。在37°C下在正常氧條件下將板培養24小時。星形孢菌素用作陰性對照以解釋細胞死亡。

【0534】 在此培養後，使用流動式細胞測量術以量測腫瘤細胞死亡及表徵免疫細胞表型。簡而言之，腫瘤細胞用活性染料染色。使用FACS分析以對腫瘤細胞特異性閘控並量測死（被殺死）腫瘤細胞的百分率。數據亦顯示為每孔死腫瘤細胞的絕對數量。細胞毒性CD8+ T細胞表型可藉由下列方法表徵：a) 上清液顆粒酶B、IFNγ及TNFa於培養上清液中的濃度，如下文描述；b) 活化標誌物（諸如DC69、CD25、CD154、PD-1、γ/δ TCR、Foxp3、T-bet、顆粒酶B）的CD8+ T細胞表面表現；c) IFNγ、顆粒酶B、TNFa於CD8+ T細胞中的胞內細胞介素染色。除上清液細胞介素濃度（包括INFγ、TNFa、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趨化因子等）外，亦可藉由胞內細胞介素染色評估CD4+ T細胞表型。

【0535】 作為CD8+ T細胞活化的額外測量，在用DC將T細胞培養96小時後，自孔移除100 µl培養上清液並使用Luminex Magpix.多工套組（EMD Millipore, Darmstadt, Germany）分析分泌的細胞介素、趨化因子及生長因子。簡而言之，該等孔用緩衝液預濕，並添加25 µl的1x經抗體塗覆的磁珠且2x 200 µl清洗緩衝液係在每個孔中使用磁珠進行。添加50 µl培養緩衝液、50 µl稀釋劑及50 µl樣本並經由在室溫下在黑暗中振盪2小時進行混合。然後，用200 µl清洗緩衝液清洗

該等珠兩次。添加100 μl的1X生物素化檢測抗體並及黑暗中伴隨振盪培養懸浮液1小時。然後，用清洗緩衝液進行兩次200 μl清洗。將100 μl的1x SAV-RPE試劑添加至各孔並在室溫下在黑暗中培養30分鐘。進行三次200 μl清洗並添加125 μl清洗緩衝液及進行2至3分鐘振盪。然後，將該等孔呈遞至Luminex xMAP系統中用於分析。

【0536】 標準物容許細胞介素(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12（p40/p70）、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF）的仔細定量。評估小鼠及人起源兩者的樣本中的這類細胞介素。經細菌處理的樣本中的這類細胞介素的增加指示宿主增強產生蛋白質及細胞介素。檢查特定細胞類型釋放細胞介素的能力的此分析的其他變化係經由藉由分選方法獲取這類細胞進行評估並為本領域中的一般技術者知曉。此外，亦評估細胞介素mRNA以解決反應於pmEV組成物的細胞介素釋放。宿主細胞中的這類變化刺激與癌症微環境中的體內反應類似的免疫反應。

【0537】 此PBMC刺激方案可使用純化的pmEV（具有或不具有活的，死的或滅活的/減弱的細菌菌株的組合）重複以最大化免疫刺激潛力。

實例20：體外檢測抗原呈遞細胞中的pmEV

【0538】 固有層中的樹突細胞藉由延伸它們的樹突穿過腸上皮以不斷地在腸腔中取樣活細菌、死細菌及微生物產物，這係由細菌在腸腔中產生的pmEV可直接刺激樹突細胞的一種方法。下列方法表示一種評估抗原呈遞細胞差異攝取pmEV之方法。視需要，這類方法可用以評估向患者投與的pmEV的免疫調節行為。

【0539】 樹突細胞（DC）係根據標準方法或套組方案（例如，Inaba K、Swiggard WJ、Steinman RM、Romani N、Schuler G，2001.Isolation of dendritic

cells.[樹突細胞的分離]Current Protocols in Immunology[當代免疫學實驗手冊]，第3章：單元3.7）。

【0540】 為評估pmEV進入和/或存在於DC中，將250,000個DC接種於圓形蓋玻片上的完全RPMI-1640培養基中及然後以不同比率與來自單一細菌菌株的pmEV或組合pmEV進行孵育。純化的pmEV可以用螢光色素或螢光蛋白標記。孵育不同時間點（例如1小時，2小時）後，用冰冷PBS洗滌細胞兩次，並用胰蛋白酶從板上分離細胞。使細胞保持完整或裂解。然後處理樣本以用於流動式細胞測量術。自裂解的樣本定量總內化pmEV，及藉由計數螢光細胞量測攝取pmEV的細胞的百分率。上文描述之方法亦可使用巨噬細胞或上皮細胞系（獲得自ATCC）代替DC以大體上相同方式進行。

實例21：體外篩選當與靶細胞孵育時具有活化NK細胞殺死的增強的能力的pmEV

【0541】 為了證明所選pmEV組成物引起對腫瘤細胞的有效NK細胞細胞毒性的能力，使用以下體外測定。簡而言之，自健康人供體獲得來自肝素化血液的單核細胞。視需要，如先前描述般進行增加NK細胞的數量的擴增步驟（例如，參見Somanschi等人，*J Vis Exp*.[視覺實驗雜誌] 2011;(48):2540）。可以將細胞調整至在含有5%人血清的RPMI-1640培養基中的細胞/ml濃度。然後，用適當的抗體標記PMNC細胞及藉由FACS將NK細胞分離為CD3-/CD56+細胞且準備用於後續的細胞毒性分析。可替代地，NK細胞係使用autoMACs儀器及NK細胞分離套組遵循製造商的使用說明（美天旎生物技術公司（Miltenyl Biotec））進行分離。

【0542】 將NK細胞進行計數並以96孔格式以20,000個或更多個細胞/孔接種，並與單一菌株pmEV（在添加或不添加以下各項的情況下：抗原呈遞細胞（例如衍生自同一供體的單核細胞）、來自細菌菌株混合物的pmEV和適當對照）孵

育。用pmEV培養NK細胞5至24小時後，用PBS清洗將pmEV自細胞移除，將NK細胞重新懸浮於具有抗生素的10 mL新鮮培養基中，並添加至含有20,000個靶腫瘤細胞/孔的96孔板。所用的小鼠腫瘤細胞系包括B16.F10、SIY+ B16.F10等等。人腫瘤細胞系係與供體HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA細胞系。在37°C下在正常氧條件下將板培養2-24小時。星形孢菌素用作陰性對照以解釋細胞死亡。

【0543】 在此孵育之後，使用本領域已知之方法使用流動式細胞測量術來測量腫瘤細胞死亡。簡而言之，腫瘤細胞用活性染料染色。使用FACS分析以對腫瘤細胞特異性閘控並量測死（被殺死）腫瘤細胞的百分率。數據亦顯示為每孔死腫瘤細胞的絕對數量。

【0544】 此NK刺激方案可使用純化的pmEV及活細菌菌株的組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例22：使用體外免疫活化測定以預測pmEV組成物的體內癌症免疫療法功效

【0545】 體外免疫活化測定鑒定可刺激樹突細胞（其進一步活化CD8+ T細胞殺死）的pmEV。因此，上文描述的體外分析係用作針對潛在免疫治療活性的大量候選pmEV的預測、篩選。優先選擇顯示增強刺激樹突細胞、增強刺激CD8+ T細胞殺死、增強刺激PBMC殺死和/或增強刺激NK細胞殺死的pmEV以供體內癌症免疫療法功效研究。

實例23：確定當經口遞送至小鼠時pmEV的生物分佈

【0546】 用受關注的pmEV組成物經口接種野生型小鼠（例如，C57BL/6或BALB/c）以確定經純化的pmEV的體內生物分佈譜。pmEV被標記以有助於下游分析。可替代地，可以研究荷瘤小鼠或患有某些免疫障礙（例如全身性紅斑狼瘡、實驗性自體免疫性腦脊髓炎、NASH）的小鼠在給定時間過程中pmEV的體內分佈。

【0547】 小鼠可在規定時間過程內接受單一劑量的pmEV（例如，25-100 μg）或數個劑量（25-100 μg）。可替代地，pmEV劑量可基於顆粒計數（例如，7e+08至6e+11個顆粒）投與。遵循經批准的方案將小鼠飼養在無特定病原體的條件下。可替代地，可將小鼠飼養並保持在消毒、無菌條件下。血液、大便和其他組織樣本可在適當的時間點下採集。

【0548】 在投與pmEV組成物後的各個時間點（即，小時至天）下將小鼠人道處死並在無菌條件下進行完全屍檢。遵循標準方案，獲取淋巴結、腎上腺、肝、結腸、小腸、盲腸、胃、脾臟、腎、膀胱、胰臟、心臟、皮膚、肺、腦及受關注的其他組織及直接使用或快速凍結用於進一步測試。遵循熟悉該項技術者已知的標準方案將該等組織樣本解剖並均質化以製備單細胞懸浮液。然後，藉由流動式細胞測量術定量在樣本中存在的pmEV數量。定量亦可在適當處理完整小鼠組織後利用螢光顯微術進行（Vankelecom H., Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization[固定和石蠟包埋的小鼠組織用於GFP視覺化], *Cold Spring Harb. Protoc.*[冷泉港實驗手冊], 2009）。可替代地，動物可使用活體成像根據pmEV標記技術進行分析。

【0549】 可在癌症小鼠模型（例如但不限於CT-26和B16（參見例如Kim等人, Nature Communications[自然通訊] 第8卷, 第626期 (2017)））或自體免疫小鼠模型（例如但不限於EAE和DTH（參見例如Turjeman等人, PLoS One[公共科學圖書館·綜合] 10(7): e0130442 (20105)））中進行生物分佈。

實例24：來自細菌的分泌型微生物胞外囊泡（smEV）的純化與製備

純化

【0550】 使用熟悉該項技術者已知之方法從細菌培養物（例如來自表1、表2和/或表3中的細菌）中純化和製備分泌型微生物胞外囊泡（smEV）（S. Bin Park,等人 PLoS ONE.[公共科學圖書館·綜合] 6(3):e17629 (2011)）。

【0551】 例如，細菌培養物在4°C或室溫下以10,000-15,500 x g離心10-40分鐘，使細菌沈澱。然後過濾培養上清液，以包括≤0.22 μm的物質（例如，經由0.22 μm或0.45 μm過濾器）並排除完整的細菌細胞。使用可包括（但不限於）硫酸銨沈澱、超離心或過濾之方法濃縮經過濾的上清液。簡而言之，就硫酸銨沈澱而言，將1.5至3 M硫酸銨緩慢添加至經過濾的上清液，同時在4°C下攪拌。在4°C下將沈澱培養8至48小時及然後在4°C下以11,000 x g離心20至40分鐘。沈澱含有smEV及其他碎片 。簡而言之，使用超離心，將經過濾的上清液在4°C下以100,000至200,000 x g離心1至16小時。此離心的沈澱含有smEV及其他碎片 。簡言之，使用過濾技術，使用Amicon超自旋過濾器或藉由切向流過濾，過濾上清液以便於保留分子量 > 50、100、300或500 kDa的物質。

【0552】 可替代地，smEV在生長期間（或在生長期間的在所選時間點下）連續獲得自細菌培養物，藉由根據製造商的說明書將生物反應器連接至交變切向流（ATF）系統（例如，來自Repligen的XCell ATF）。該ATF系統保留完整細胞（> 0.22 um）於生物反應器中，及容許較小組分（例如，smEV、游離蛋白質）通過過濾器以供收集。例如，該系統可經結構設計使得 < 0.22 um濾液然後通過100 kDa的第二過濾器，容許收集如在0.22 um與100 kDa之間的smEV的物質，並將小於100 kDa的物種泵送回生物反應器中。可替代地，該系統可經結構設計以容許生物反應器中的培養基在培養物的生長期間得到補充和/或修飾。藉由此方法收集的smEV可藉由如上文描述用於經過濾的上清液的超離心或過濾進行進一步純化和/或濃縮。

【0553】 藉由上文描述之方法獲得的smEV可藉由梯度超離心，使用可包括（但不限於）使用蔗糖梯度或Optiprep梯度之方法進行進一步純化。簡言之，在使用蔗糖梯度方法時，如果使用硫酸銨沈澱或超離心來濃縮經過濾上清液，將沈澱物重新懸浮於60%蔗糖、30 mM pH 8.0 Tris中。如果使用過濾來濃縮經過

濾上清液，則使用Amicon Ultra柱將濃縮物緩衝液交換至60%蔗糖、30 mM pH 8.0 Tris中。將樣本施加至35%-60%不連續蔗糖梯度中並在4°C下以200,000 × g離心持續3-24小時。簡言之，在使用Optiprep梯度方法時，如果使用硫酸銨沈澱或超離心來濃縮經過濾上清液，則將沈澱物懸浮於PBS中的45% Optiprep中。如果使用過濾以濃縮經過濾的上清液，則濃縮物藉由使用60% Optiprep稀釋至45% Optiprep的最終濃度。將樣本施加至0%-45%不連續蔗糖梯度中並在4°C下以200,000 × g離心持續3-24小時。可替代地，高解析度密度梯度分級可用於基於密度分離smEV顆粒。

製備

【0554】 為證實smEV製劑的無菌性及分離，將smEV連續稀釋至瓊脂培養基（其用於測試中的細菌的例行培養）上，並使用例行條件進行培養。使未經滅菌的製劑通過0.22 um過濾器以去除完整細胞。為進一步增加純度，分離的smEV可用DNA酶或蛋白酶K處理。

【0555】 可替代地，為製備用於體內注射的smEV，將純化的smEV如先前描述進行處理（G. Norheim等人, *PLoS ONE.* [公共科學圖書館·綜合]10(9): e0134353 (2015)）。簡而言之，在蔗糖梯度離心後，將含有smEV的帶於含有3%蔗糖的溶液中或熟悉該項技術者已知的適用於體內注射的其他溶液中重新懸浮至50 μg/mL的終濃度。此溶液還可含有濃度為0-0.5%（w/v）的佐劑（例如氫氧化鋁）。

【0556】 為製備與其他測試(例如用以在TEM成像或體外分析之前去除蔗糖)相容的樣本，使用以下將樣本進行緩衝液交換至PBS或30 mM pH 8.0 Tris中：過濾（例如Amicon Ultra柱），透析，或超離心（在用PBS稀釋15倍或以上之後，200,000 x g，1-3小時，4°C）並再懸浮於PBS中。

【0557】 對於所有該等研究，smEV可以在投與之前加熱、照射和/或凍乾（如實例49所述）。

實例25：藉由應激操作細菌以產生各種量的smEV和/或改變smEV的內容物

【0558】 應激及特別地包膜應激已顯示增加一些細菌菌株產生smEV（I. MacDonald, M. Kuehn. *J Bacteriol* [細菌學雜誌] 195(13): doi: 10/1128/JB.02267-12）。為改變細菌產生smEV，細菌係使用各種方法施加應激。

【0559】 細菌可經受單一應激源或應激源組合。不同應激源對不同細菌的影響係藉由改變應激條件及測定IC50值（抑制50%細胞生長所需的條件）來經驗性地確定。發生smEV純化、定量及表徵。smEV產生係 (1) 在細菌及smEV的複雜樣本中藉由奈米顆粒跟蹤分析（NTA）或透射電子顯微鏡（TEM）；或 (2) 在smEV純化後，藉由NTA、脂質定量或蛋白質定量進行定量。smEV內容物係純化後藉由上文描述之方法進行評估。

【0560】 *抗生素應激*

【0561】 細菌係在標準生長條件下以添加亞致死濃度的抗生素進行培養。這可包括0.1至1 μg/mL氯黴素，或0.1至0.3 μg/mL建它黴素，或類似濃度的其他抗生素（例如，安比西林、多黏菌素B）。宿主抗菌產物（諸如溶菌酶、防禦素及Reg蛋白）可代替抗生素使用。亦可使用由細菌產生的抗微生物肽（包括細菌素及小菌素）。

【0562】 *溫度應激*

【0563】 細菌係在標準生長條件下，但在比通常用於它們生長的溫度更高或更低的溫度下進行培養。可替代地，細菌係在標準條件下生長，及然後分別藉由在低溫或高溫下短期間培養而經受冷休克或熱休克。例如，在37°C下生長的細菌係在4°C至18°C下培養1小時用於冷休克或在42°C至50°C下培養1小時用於熱休克。

【0564】 *饑餓及營養物限制*

【0565】 為誘導營養應激，細菌係在其中一種或多種營養素受限的條件下培養。細菌可在整個生長期間經受營養應激或自富培養基轉移至貧培養基。受限的培養基組分的一些實例係碳、氮、鐵及硫。一項實例培養基係M9最小培養基（西格瑪奧德里奇公司（Sigma-Aldrich）），其含有低葡萄糖作為唯一碳源。特別對於普雷沃菌屬，鐵可用性係藉由改變培養基中氯化血紅素的濃度和/或藉由改變培養基中存在的卟啉或其他鐵載劑的類型改變，因為發現在低氯化血紅素條件中生長的細胞產生更多smEV（S. Stubbs等人，*Letters in Applied Microbiology*.[應用微生物學快報]29:31-36 (1999)。培養基組分亦藉由添加螯合劑（諸如EDTA及去鐵胺）進行操作。

【0566】 *飽和度*

【0567】 使細菌生長至飽和及在飽和點後培養各種時間週期。可替代地，使用條件培養基以在指數生長期間模擬飽和環境。條件培養基係藉由離心及過濾自飽和培養物移除完整細胞製備，及條件培養基可經進一步處理以濃縮或移除特定組分。

【0568】 *鹽應激*

【0569】 細菌係在含有NaCl、膽汁鹽或其他鹽的培養基中培養或短暫暴露於含有NaCl、膽汁鹽或其他鹽的培養基。

【0570】 *UV應激*

【0571】 UV應激係藉由在UV燈下培養細菌或藉由將細菌暴露於UV使用諸如Stratalinker （安捷倫公司（Agilent））的儀器達成。UV可在整個培養週期期間，在短爆發期內或生長後的單一定義週期內投與。

【0572】 *反應性氧應激*

【0573】 細菌係在亞致死濃度的過氧化氫（250至1,000 μM）的存在下培養以誘導反應性氧物質形式的應激。厭氧細菌係在對它們有毒的濃度的氧中培養或暴露於對它們有毒的濃度的氧。

【0574】 *洗滌劑應激*

【0575】 細菌係在洗滌劑中培養或暴露於洗滌劑，諸如月桂基硫酸鈉（SDS）或去氧膽酸鹽。

【0576】 *pH應激*

【0577】 細菌係在不同pH培養基中培養有限時間或暴露於不同pH培養基有限時間。

實例26：無smEV的細菌的製備

【0578】 製備含有最少量smEV的細菌樣本。smEV產生係 (1) 在細菌及胞外組分的複雜樣本中藉由NTA或TEM；或 (2) 在從細菌樣本純化smEV後，藉由NTA、脂質定量或蛋白質定量進行定量。

【0579】 a.離心及清洗：將細菌培養物在11,000 x g下離心以自上清液（包括游離蛋白質及囊泡）分離完整細胞。沈澱物用緩衝液（諸如PBS）清洗並以穩定方式儲存（例如，與甘油混合，快速冷凍並在-80°C下儲存）。

【0580】 b. ATF：藉由將生物反應器連接至ATF系統分離細菌及smEV。將不含smEV的細菌保留在生物反應器中且可藉由如上文所述之離心及洗滌進一步與殘餘smEV分離。

【0581】 c.使細菌在發現限制smEV的產生的條件下生長。可以變化的條件。

實例27：大腸直腸癌模型

【0582】 為了研究smEV在腫瘤模型中的功效，可以根據本領域已知的齧齒動物腫瘤模型使用許多癌細胞系中的一種。smEV可以從若干個細菌物種中的任何一種（例如小韋榮氏球菌或非典型韋榮氏球菌）產生。

【0583】 例如，從泰康利公司（Taconic）（日爾曼敦（Germantown），紐約州））或其他供應商獲得雌性6-8週齡Balb/c小鼠。將100,000個CT-26結直腸腫瘤細胞（ATCC CRL-2638）重新懸浮於無菌PBS中並在50%基質膠（Matrigel）存在下接種。將CT-26腫瘤細胞經皮下注射至每隻小鼠的一個後側腹中。當腫瘤體積達到平均100mm^{3}時（腫瘤細胞接種後約10-12天），將動物分配到各種治療組（例如，媒劑；韋榮氏球菌屬smEV，雙歧桿菌屬smEV，具有或不具有抗PD-1抗體）。起始自第1天，每隔四天將抗體以200 μg/小鼠（最終體積為100 μl）藉由腹膜內（i.p.）投與一次，共3次（Q4Dx3），並且smEV口服或靜脈內並且以不同劑量和時間投與。例如，起始自第1天，每隔三天將smEV（5 μg）靜脈內（i.v.）注射一次，共4次（Q3Dx4），並對小鼠進行腫瘤生長評估。一些小鼠可靜脈內注射10、15或20 ug smEV/小鼠的smEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 smEV顆粒/劑量。

【0584】 可替代地，在腫瘤體積平均達到100 mm^{3}時（在腫瘤細胞接種後大約10-12天），將動物分配至下列各組中：1) 媒劑；2) 分離自Bexsero®疫苗的腦膜炎奈瑟菌smEV；及3) 抗PD-1抗體。起始自第1天，每隔四天，以200 ug/小鼠（100 ul最終體積）腹膜內（i.p.）投與抗體，及起始自第1天直至研究結束，腹膜內（i.p.）每天投與腦膜炎奈瑟菌smEV。

【0585】 在腫瘤體積平均達到100 mm^{3}時（在腫瘤細胞接種後大約10-12天），將動物分配至下列各組中：1) 媒劑；2) 抗PD-1抗體；及3) smEV小韋榮氏球菌（7.0 e+10個顆粒計數）。起始自第1天，每隔四天，以200 μg/小鼠（100 μl最終體積）腹膜內（i.p.）投與抗體，並且起始自第1天直至研究結束，靜脈內（i.v.）

每天注射smEV並測量腫瘤生長。第11天，smEV小韋榮氏球菌組顯示出明顯優於抗PD-1組的腫瘤生長抑制（**圖16**）。針對處理組相比於媒劑組進行威爾奇（Welch）檢驗。在一項觀察從小韋榮氏球菌和非典型韋榮氏球菌純化的smEV的劑量-反應的研究中，最高劑量的smEV顯示出最大的功效（**圖17和18**），儘管在一項針對來自當別町韋榮氏球菌的smEV的研究中，更高的劑量並不一定對應更高的功效（圖19）。

實例28：投與smEV組成物治療小鼠腫瘤模型

【0586】 如實例27所述，癌症的小鼠模型係藉由皮下注射腫瘤細胞系或患者衍生的腫瘤樣本並容許將其移植至健康小鼠內而產生。本文提供之方法可以使用幾種不同的腫瘤細胞系中的一種進行，該腫瘤細胞系包括但不限於：B16-F10或B16-F10-SIY細胞（作為黑色素瘤的原位模型）、Panc02細胞（作為胰臟癌的原位模型）（Maletzki等人, 2008, Gut[腸道] 57:483-491）、LLC1細胞（作為肺癌的原位模型）、以及RM-1（作為前列腺癌的原位模型）。作為實例，而非限制，本文深入提供了用於研究B16-F10模型中smEV的功效之方法。

【0587】 使用具有極高轉移頻率的自發性黑色素瘤的同基因小鼠模型以測試細菌減少腫瘤生長及轉移的擴散的能力。經選擇用於此分析的smEV可為顯示增強活化免疫細胞亞群並刺激增強殺死體外腫瘤細胞的組成物。小鼠黑色素瘤細胞系B16-F10獲得自ATCC。將細胞作為單層在37°C及5% CO2/空氣的氣氛下體外培養於RPMI培養基中，該RPMI培養基用10%熱滅活的胎牛血清及1%青黴素/鏈黴素補充。指數生長的腫瘤細胞係藉由胰蛋白酶化獲取，用冷1x PBS清洗三次，並製備5E6個細胞/ml的懸浮液用於投與。此實驗使用雌性C57BL/6小鼠。該等小鼠係6至8週齡且重約16至20 g。就腫瘤發展而言，於各小鼠的脅腹內皮下注射100 µl的B16-F10細胞懸浮液。該等小鼠係在細胞移植之前藉由克他命（ketamine）及甲苯噻哄麻醉。實驗中使用的動物可經由自第2天至第5天滴注康

黴素（0.4 mg/ml）、建它黴素（0.035 mg/ml）、黏菌素（850 U/ml）、甲硝唑（0.215 mg/ml）及萬古黴素（0.045 mg/ml）於飲用水中的混合物，並在腫瘤注射後第7天腹膜內注射克林達黴素（10 mg/kg）而開始抗生素治療。

【0588】 原發性脅腹腫瘤的尺寸係用卡尺每隔2至3天量測及腫瘤體積係使用下式計算：腫瘤體積= 腫瘤寬度 × 腫瘤長度 × 0.5。在原發性腫瘤達到約100 mm3後，基於動物的體重將它們分選成陣列。然後，自各組隨機挑選小鼠並分配至治療組。如前所述製備smEV組成物。用大約7.0e+09 至3.0e+12 smEV顆粒強飼給小鼠口服接種。可替代地，靜脈內投與smEV。每天、每週、每兩週、每月、每兩個月或在整個治療週期的任何其他給藥時間表小鼠接受smEV。小鼠可以經IV於尾靜脈中注射smEV或直接注射於腫瘤內。小鼠可以注射smEV（具有或不具有活細菌）和/或smEV（具有或不具有滅活/減弱或被殺死的細菌）。小鼠可每週或每月一次注射或經口強飼。小鼠可接受純化的smEV及活細菌的組合以最大化腫瘤殺死潛力。所有小鼠係在無特定病原體的條件下遵循經批准的方案飼養。每隔3至4天監測腫瘤尺寸、小鼠體重及體溫並在B16-F10小鼠黑色素瘤細胞注射後6週內或當原發性腫瘤體積達到1000 mm3時人道處死該等小鼠。每週抽血並在方案終止時在無菌條件下進行完全屍檢。

【0589】 可在小鼠B16-F10黑色素瘤模型中輕易地觀測到癌細胞，因為其產生黑色素。遵循標準方案，收集來自淋巴結的組織樣本及來自頸部及胸部區域的器官且使用下列分類規則分析微轉移及巨轉移的存在。若在每個淋巴結或器官中發現至少兩個微轉移及一個巨轉移病變，則將器官歸類為轉移陽性。微轉移係藉由用蘇木精-曙紅遵循熟悉該項技術者已知的標準方案染色石蠟包埋的淋巴組織切片 進行檢測。轉移的總數量係與原發性腫瘤的體積相關且發現腫瘤體積與腫瘤生長時間及淋巴結及內臟器官中巨轉移及微轉移的數量及亦與所有可見轉移的總數顯著相關。如先前所述鑒別出二十五個不同轉移部位（Bobek V.

等人, Syngeneic lymph-node-targeting model of green fluorescent protein-expressing Lewis lung carcinoma[表現綠色螢光蛋白的Lewis肺癌的同基因淋巴結靶向模型], Clin. Exp. Metastasis[臨床與實驗轉移], 2004;21(8):705-8）。

【0590】 進一步分析腫瘤組織樣本的腫瘤浸潤性淋巴細胞。可藉由FACS分離CD8+細胞毒性T細胞，且可隨後使用定製p/MHC I類微陣列對該等細胞進行進一步分析以展現其抗原特異性（參見例如，Deviren G.等人, Detection of antigen-specific T cells on p/MHC microarrays[在p/MHC微陣列上檢測抗原特異性T細胞], J. Mol. Recognit.[分子識別雜誌], 2007年1月至2月;20(1):32-8）。CD4+ T細胞可使用定製p/MHC II類微陣列進行分析。

【0591】 在各種時間點下，將小鼠處死且可移除腫瘤、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體流動式細胞測量術分析。例如，使用Miltenyi腫瘤解離酶混合劑根據製造商說明書來解離腫瘤。記錄腫瘤重量且將腫瘤短切，然後置於含有酶混合劑的15 ml管中並置於冰上。然後將樣本置於37°C輕微振盪器上保持45分鐘並使用最多15 ml完整RPMI驟冷。經由70 μm過濾器將每一細胞懸浮液過濾至50 ml falcon管中並在1000 rpm下離心10分鐘。將細胞重新懸浮於FACS緩衝液中並洗滌以去除剩餘碎片。視需要，經由第二70 μm過濾器將樣本再次過濾至新管中。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌包含pan-免疫細胞標誌CD45、T細胞標誌（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Rorγt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/骨髓性標誌（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、

IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或在離體獲得的經純化的CD45+腫瘤-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對腫瘤切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0592】 對多發性肺黑色素瘤轉移的小鼠模型亦進行相同實驗。小鼠黑色素瘤細胞系B16-BL6獲得自ATCC且細胞係如上文描述體外培養。此實驗使用雌性C57BL/6小鼠。該等小鼠係6至8週齡且重約16至20 g。就腫瘤發展而言，將100 μl的2E6個細胞/ml B16-BL6細胞懸浮液注射於各小鼠的尾靜脈中。IV注射後植入的腫瘤細胞最終進入肺中。

【0593】 9天後將小鼠人道殺死。將肺稱重並分析肺表面上的肺結節的存在。經提取的肺係用費可特溶液（Fekete's solution）漂白，該溶液因為B16細胞中的黑色素而不漂白腫瘤結節，雖然一小部分結節係無黑色素的（即，白色）。仔細計數腫瘤結節的數量以確定小鼠中的腫瘤負荷。通常，在對照組小鼠（即，PBS強飼）的肺上發現200至250個肺結節。

【0594】 針對不同治療組計算腫瘤負荷百分比。將腫瘤負荷百分比定義為屬於治療組的小鼠的肺表面上的肺結節的平均數量除以對照組小鼠的肺表面上的肺結節的平均數量。

【0595】 藉由LCMS技術或本領域已知的其他方法提交腫瘤活檢和血液樣本用於代謝分析。測試組之間的胺基酸、糖、乳酸鹽及其他代謝物的不同濃度證實微生物組成物破壞腫瘤代謝狀態的能力。

RNA定序以確定作用機制

【0596】 樹突細胞純化自腫瘤、伊爾氏斑（Peyers patch）及腸系膜淋巴結。進行RNAseq分析並根據熟悉該項技術者已知的標準技術進行分析（Z. Hou. *Scientific Reports.[科技報告]* 5(9570):doi:10.1038/srep09570 (2015)）。在該分析

中，特別關注先天性發炎通路基因，它們包括TLR、CLR、NLR及STING、細胞介素、趨化因子、抗原處理及呈遞通路、交叉呈遞及T細胞共刺激。

【0597】 一些小鼠可未處死，而是使用注射至對側的側腹（或其他區域）中的腫瘤細胞再攻擊以測定免疫系統的記憶反應對腫瘤生長的影響。

實例29：投與smEV與PD-1或PD-L1抑制的組合以治療小鼠腫瘤模型

【0598】 為了確定smEV與PD-1或PD-L1抑制組合在腫瘤小鼠模型中的功效，可以如上所述使用小鼠腫瘤模型。

【0599】 針對小鼠腫瘤模型中單獨或與完整細菌細胞組合的smEV且在存在或不存在抗PD-1或抗PD-L1下的功效對其進行測試。在不同時間點且以不同劑量投與smEV、細菌細胞和/或抗PD-1或抗PD-L1。例如，在腫瘤注射之後第10天或腫瘤體積達至100 mm^3之後，用單獨或與抗PD-1或抗PD-L1組合的smEV處理小鼠。

【0600】 小鼠可以口服、靜脈內或瘤內投與smEV。例如，一些小鼠靜脈內注射7.0e+09至3.0e+12之間的smEV顆粒。雖然一些小鼠藉由i.v.注射接受smEV，但其他小鼠可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1(smEV : 細菌細胞)至1-1 x 10^{12} : 1(smEV : 細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0601】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^4至5 x 10^9個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等

細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0602】 一些組的小鼠亦可注射有效劑量的檢查點抑制劑。例如，小鼠接受於100 μl PBS中的100 μg抗PD-L1 mAB（殖株10f.9g2, 欣博盛公司（BioXCell））或另一抗PD-1或抗PD-L1 mAB，及一些小鼠接受媒劑和/或其他適當的對照（例如，對照抗體）。在初始注射後的第3、6及9天，對小鼠注射mAB。為評估檢查點抑制及smEV免疫療法是否具有額外的抗腫瘤效應，將接受抗PD-1或抗PD-L1 mAB的對照小鼠計入標準對照組。評估原發性（腫瘤尺寸）及繼發性（腫瘤浸潤性淋巴細胞及細胞介素分析）端點，及一些組的小鼠可為經後續腫瘤細胞接種再激發以評估治療對記憶反應的影響。

實例30：遲發型超敏反應（DTH）的小鼠模型中的smEV

【0603】 遲發型超敏反應（DTH）為異位性皮膚炎（或過敏性接觸性皮炎）的動物模式，如Petersen等人綜述（In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery.[牛皮癬和特應性皮炎的體內藥理疾病模型在藥物開發中的應用] Basic & Clinical Pharm & Toxicology.[基礎臨床藥理學和毒理學] 2006. 99(2): 104-115；還參見Irving C. Allen（編）Mouse models of Innate Immunity: Methods and Protocols[先天免疫的小鼠模型：方法和實驗室手冊], Methods in Molecular Biology[分子生物學方法], 2013.，第1031卷，DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13）。已使用DTH模型的幾種變化且它們為本領域中熟知（Irving C. Allen（編）. *Mouse models of Innate Immunity: Methods and Protocols*[先天免疫的小鼠模型：方法和實驗室手冊], Methods in Molecular Biology.[分子生物學方法]，第1031卷，DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13, Springer Science + Business Media, LLC [施普林格科學與商業媒體公司] 2013）。

【0604】 DTH可使用各種半抗原或抗原（例如，用佐劑乳化的抗原）在各種小鼠及大鼠品系中誘導。DTH的特徵在於敏化作用及抗原特異性T細胞介導的反應，其導致紅斑、浮腫及細胞浸潤®尤其抗原呈現細胞（APC）、嗜酸性粒細胞、經活化的CD4+ T細胞及表現細胞介素的Th2細胞的浸潤。

【0605】 通常，小鼠係用在佐劑（例如，完全弗氏佐劑）的情況下投與的抗原誘發以誘導藉由腫脹及抗原特異性抗體滴定度衡量的繼發（或記憶）免疫反應。

【0606】 地塞米松（皮質類固醇）係已知抗炎劑，其改善小鼠中的DTH反應，並充當陽性對照用於在此模型中抑制炎症（Taube及Carlsten, Action of dexamethasone in the suppression of delayed-type hypersensitivity in reconstituted SCID mice.[地塞米松在抑制SCID小鼠遲發型超敏反應中的作用] Inflamm Res.[炎症研究] 2000. 49(10) : 548-52）。就陽性對照組而言，在第0天藉由將6.8 mg地塞米松稀釋於400 μL 96%乙醇中製備17 mg/mL地塞米松的儲備溶液。就給藥的每天而言，藉由將儲備溶液100x稀釋於無菌PBS中以在隔膜小瓶中獲得0.17 mg/mL的最終濃度製備用於腹膜內給藥的工作溶液。經地塞米松治療的小鼠i.p.接受100 μL地塞米松（5 mL/kg的0.17 mg/mL溶液）。冷凍蔗糖充當陰性對照（媒劑）。在下面描述的研究中，每天給予媒劑、地塞米松（陽性對照）和smEV。

【0607】 測試smEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在DTH的小鼠模型中的效力。例如，6至8週齡C57Bl/6小鼠獲得自泰康利公司（日爾曼敦，紐約州）或其他供應商。對各組小鼠背部四個位置（上方及下方）四次皮下（s.c.）注射有效劑量（例如每個位置50 ul總體積）的抗原（例如，卵白蛋白（OVA）或匙孔血藍蛋白（KLH））。就DTH反應而言，在克他命/甲苯噻咁麻醉下（分別約50 mg/kg及5 mg/kg），對動物耳朵進行皮內（i.d.）注射。一些小鼠充當對照動物。第8天，一些組的小鼠以每隻耳朵10 ul（左耳媒

劑對照（0.01% DMSO於生理鹽水中）及右耳抗原（21.2 ug（12 nmol））激發。為量測耳炎，使用Mitutoyo千分尺量測人工限制的動物的耳厚度。耳厚度係在皮內激發之前作為各個別動物的基線水平進行量測。接著，耳厚度係在皮內激發後，在約24小時及48小時（即，第9天及第10天）時量測兩次。

【0608】 smEV治療係在一些時間點（在引發的時間附近或在DTH激發的時間附近）下開始。例如，smEV可在皮下注射（第0天）的同時投與，或可將它們在皮內注射之前或皮內注射後投與。smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg smEV//小鼠。其他小鼠可接受25、50或100 mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 smEV顆粒/劑量。

【0609】 雖然一些小鼠將藉由i.v.注射接受smEV，但另一些小鼠可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與、經口強飼、局部投與、皮內（i.d.）注射或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第0天）接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1(smEV : 細菌細胞)至1-1 x 10^{12} : 1(smEV : 細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0610】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0611】 就smEV而言，總蛋白質係使用遵循製造商的使用說明進行的伯樂公司測定（目錄號5000205）進行量測。

【0612】 匙孔血藍蛋白（KLH）及完全弗氏佐劑（CFA）的乳化液係在免疫當天（第0天）新鮮製備。為此，將8 mg KLH粉末稱重並完全重新懸浮於16 mL生理鹽水中。乳化液係藉由使用注射器及魯爾鎖連接器（luer lock connector）混合KLH/生理鹽水及等體積的CFA溶液（例如，10 mL KLH/生理鹽水+ 10 mL CFA溶液）進行製備。將KLH及CFA用力混合幾分鐘以形成白色乳化液以獲得最大穩定性。進行跌落試驗以檢查是否獲得均質乳化液。

【0613】 在第0天，C57Bl/6J雌性小鼠（約7週齡）係用含於CFA中的KLH抗原藉由皮下免疫（4個位置，每個位置50 μL）引發。棲組織普雷沃菌smEV和凍乾的棲組織普雷沃菌smEV藉由在低（6.0E+07）、中（6.0E+09）和高（6.0E+11）劑量下經口強飼進行測試。

【0614】 在第8天，用含於生理鹽水（以10 μL的體積）中的10 μg KLH皮內（i.d.）激發小鼠的左耳。耳廓厚度係在抗原激發後的24小時進行量測（**圖20**）。如藉由耳厚度確定的，棲組織普雷沃菌smEV以其非凍乾和凍乾形式都有效抑制炎症。

【0615】 對於進一步的炎症研究，一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用抗炎劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯劑）或其他治療），和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0616】 在各種時間點下，可以採集血清樣本。可以將其他組的小鼠處死且可移除淋巴結、脾臟、腸系膜淋巴結（MLN）、小腸、結腸及其他組織用以使用本領域中已知之方法進行組織學研究、離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。一些小鼠係在O2/CO2麻醉下自眼血管叢抽血並進行ELISA分析。

【0617】 組織可使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗

CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Rory-γ-t、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0618】 自經處死的小鼠移除耳朵並放置於冷無EDTA的蛋白酶抑制劑混合物(羅氏公司(Roche))中。使用珠破壞將耳朵均質化並藉由Lumine套組(EMD密理博公司（EMD Millipore））遵循製造商的使用說明分析上清液中的各種細胞介素。另外，頸部淋巴結係通過細胞過濾器解離，清洗，並針對FoxP3（PE-FJK-16s）及CD25（FITC-PC61.5）使用本領域中已知之方法進行染色。

【0619】 為了檢驗DTH保護的影響和壽命，一些小鼠可以在稍後用激發抗原再次激發而不是處死，並分析小鼠對DTH的敏感性和反應的嚴重程度。

實例31：實驗性自體免疫性腦脊髓炎（EAE）的小鼠模型中的smEV

【0620】 EAE係經充分研究的多發性硬化動物模型，如由Constantinescu等人評審（Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis（MS）.[實驗性自體免疫性腦脊髓炎（EAE）作為多發性硬化（MS）的模型] Br J Pharmacol.[英國藥理學雜誌] 2011年10月; 164(4): 1079-1106）。其可使用不同髓磷脂相關肽，藉由經活化的致腦炎T細胞的過繼轉移，或使用易受EAE影響的TCR轉基因小鼠在各種小鼠及大鼠品系中誘導，如

於Mangalam等人（Two discreet subsets of CD8+ T cells modulate PLP_{91-110} induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice[CD8 + T細胞的兩個離散亞群調節HLA-DR3轉基因小鼠中PLP_{91-110}誘導的實驗性自體免疫性腦脊髓炎]. J Autoimmun.[自體免疫性雜誌] 2012年6月; 38(4): 344-353）中討論。

【0621】 測試smEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在EAE的齧齒動物模型中之功效。此外，smEV可以口服投與或靜脈內投與。例如，雌性6至8週齡C57Bl/6小鼠獲得自Taconic（日爾曼敦，紐約州）。對各組小鼠的背部兩個位置（上方及下方）投與兩次皮下（s.c.）注射0.1 ml髓磷脂少突膠質細胞糖蛋白35-55（MOG35-55；每次注射100ug；每隻小鼠200ug（每隻小鼠總計0.2 ml））），其乳化於完全弗氏佐劑中（CFA；2-5 mg經殺滅的結核分枝桿菌H37Ra/ml乳劑）。在上文發生後約1至2小時，對小鼠腹膜內（i.p.）注射含於0.1 ml PBS（2ug/ml）中的200 ng百日咳毒素（PTx）。PTx的另外IP注射係在第2天投與。可替代地，使用適當量的代替髓磷脂肽（例如，蛋白脂質蛋白（PLP））以誘導EAE。一些動物充當未經治療的對照（naïve control）。評估EAE嚴重程度並自第4天開始根據本領域中已知之方法每天分配殘疾分數（Mangalam等人，2012）。

【0622】 smEV治療係在一些時間點（在免疫的時間附近或在EAE免疫之後）下開始。例如，smEV可在免疫（第1天）的同時投與，或可將它們在出現殘疾的第一跡象（例如，跛尾）後投與，或在嚴重的EAE期間投與。smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 smEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由i.v.注射接受smEV，但其他小鼠可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與、

經口強飼或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1(smEV : 細菌細胞)至1-1 x 10^{12} : 1(smEV : 細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0623】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0624】 一些組的小鼠可在各種時間點及有效劑量下，用額外抗炎劑或EAE治療劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯劑）、維生素D、類固醇、抗炎劑或其他一種或多種治療）和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0625】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0626】 在各種時間點下，將小鼠處死並可移除發炎的位置（例如，腦及脊髓）、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，組織係使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞

標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或在離體獲得的經純化的CD45+中樞神經系統（CNS）-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片 進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0627】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物（例如，經活化的致腦炎T細胞或EAE誘導肽的回注）再激發。分析小鼠在再激發後對疾病及EAE嚴重程度的易感性。

實例32：膠原誘導的關節炎（CIA）的小鼠模型中的smEV

【0628】 膠原誘導的關節炎（CIA）為研究類風濕性關節炎（RA）常用的動物模型，如Caplazi等人（Mouse models of rheumatoid arthritis.[類風濕關節炎的小鼠模型] Veterinary Pathology.[獸醫病理學] 2015年9月1日. 52(5): 819-826）所述（還參見Brand等人 Collagen-induced arthritis.[膠原誘導的關節炎] Nature Protocols.[自然實驗手冊] 2007. 2: 1269-1275； Pietrosimone等人 Collagen-induced arthritis: a model for murine autoimmune arthritis.[膠原誘導的關節炎：小鼠自體免疫性關節炎的模型] Bio Protoc.[生物實驗手冊] 2015年10月20日; 5(20): e1626）。

【0629】 在CIA齧齒動物模型的其他版本中，一種模型關於用小雞II型膠原使HLA-DQ8 Tg小鼠免疫，如由Taneja等人,（J. Immunology.[免疫學雜誌] 2007. 56: 69-78；亦參見Taneja等人, J. Immunology [免疫學雜誌] 2008. 181: 2869-2877；及Taneja等人, Arthritis Rheum.[關節炎與風濕病], 2007. 56: 69-78）描述。小雞CII

的純化已由Taneja等人,（Arthritis Rheum.[關節炎與風濕病], 2007. 56: 69-78）所述。監測小鼠在免疫後的CIA疾病發作及進展，及評估疾病的嚴重程度並如由Wooley, J. Exp. Med.[實驗醫學雜誌] 1981. 154: 688-700描述進行「評級」。

【0630】 針對CIA誘導使小鼠免疫並將小鼠分為各種治療組。測試smEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在CIA中之功效。

【0631】 smEV治療係在用膠原免疫的時間附近或在免疫之後開始。例如，在一些組中，smEV可在免疫（第1天）的同時投與，或smEV可在出現疾病的第一跡象後投與，或在嚴重症狀發作後投與。smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 smEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受smEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1（smEV : 細菌細胞）至1-1 x 10^{12} : 1（smEV : 細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0632】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0633】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外一種或多種抗炎劑或一種或多種CIA治療劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯

劑）、維生素D、一種或多種類固醇、一種或多種抗炎劑和/或其他治療），和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0634】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0635】 在各種時間點下，獲得血清樣本以使用標準ELISA評估抗小雞及抗小鼠CII IgG抗體的濃度（Batsalova等人，Comparative analysis of collagen type II-specific immune responses during development of collagen-induced arthritis in two B10 mouse strains.[兩種B10小鼠品系膠原誘導的關節炎發展過程中II型膠原特異性免疫反應的比較分析] Arthritis Res Ther.[關節炎研究與治療] 2012. 14(6): R237）。同樣地，將一些小鼠處死且可移除發炎的位置（例如，滑膜）、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。使用本領域中已知的技術分析滑膜及滑液中的漿細胞浸潤及抗體的存在。另外，使用解離酶根據製造商的使用說明解離組織以檢查細胞浸潤物譜。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組

織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+滑膜-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0636】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物（例如，CIA誘導的肽的活化回注）再激發。分析小鼠在再激發後對疾病及CIA嚴重程度的易感性。

實例33：結腸炎的小鼠模型中的smEV

【0637】 葡聚糖硫酸鈉（DSS）誘導的結腸炎係經充分研究的結腸炎動物模型，如由Randhawa等人綜述（A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents.[化學誘導的齧齒類動物炎性腸病模型綜述] Korean J Physiol Pharmacol.[韓國生理學和藥理學雜誌] 2014. 18(4): 279-288；還參見Chassaing等人，Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice.[硫酸葡聚糖鈉（DSS）誘導的小鼠結腸炎] Curr Protoc Immunol.[免疫學實驗指南] 2014年2月4日; 104: 15.25單元）。

【0638】 測試smEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎劑）在DSS誘導的結腸炎的小鼠模型中之功效。

【0639】 如本領域中已知，各組小鼠係用DSS處理以誘導結腸炎（Randhawa等人，2014；Chassaing等人，2014；還參見Kim等人，Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD.[在DSS誘導的IBD模型中調查腸道炎症] J Vis Exp.[可視實驗雜誌] 2012. 60: 3678）。例如，雄性6至8週齡C57Bl/6小鼠獲得自查理斯河實驗室（Charles River Labs），泰康利公司或其他供應商。結腸炎係藉由將3% DSS（pmEV生物化學公司（pmEV Biomedicals），目錄號0260110）添加至飲用水來誘導。一些小鼠不接受含於飲用水中的DSS且充當天然對照。一些小鼠接受水，歷時五（5）天。一些小鼠可接受DSS，歷時較

短的持續時間或長於五（5）天。監測小鼠並使用本領域中已知的殘疾活動指數基於重量損失進行評分（例如，無體重減輕（0分）；1%至5%體重減輕（1分）；5%至10%體重減輕（2分））；糞便稠度（例如，正常（0分）；大便稀溏（2分）；腹瀉（4分））及出血（例如，未出血（0分）、潛血陽性（1分）；潛血陽性及視神經沈澱出血（2分）；肛門周圍的血液，大出血（4分）。

【0640】 smEV治療係在一些時間點（在DSS投與的第1天，或在之後的某一時刻）下開始。例如，smEV可在DSS開始（第1天）時同時投與，或可將它們在出現疾病的第一跡象（例如，體重減輕或腹瀉）後投與，或在嚴重的結腸炎的整個階段期間投與。每天觀察小鼠的重量、發病率、存活、腹瀉和/或血便的存在。

【0641】 smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠接受7.0e+09和3.0e+12之間的smEV顆粒。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受smEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1（smEV : 細菌細胞）至$1\text{-}1 \times 10^{12}$: 1（smEV : 細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0642】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1×10^{4}至5×10^{9}個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0643】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外的抗炎劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯劑）或其他治療），和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0644】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些小鼠接受DSS而未預先接受抗生素。

【0645】 在各種時間點下，使用小動物內視鏡（卡爾史托斯公司（Karl Storz Endoskipe）德國）在異氟烷麻醉下使小鼠經歷視訊內視鏡檢查。記錄靜止影像及視訊以評估結腸炎的程度及對治療的反應。使用本領域中已知的標準對結腸炎進行評分。收集糞便材料用於研究。

【0646】 在各種時間點下，將小鼠處死並收集結腸、小腸、脾臟及淋巴結（例如，腸系膜淋巴結）。另外，將血液收集至血清分離管內。組織損傷係藉由組織學研究評估，該等組織學研究評估（但不限於）隱窩結構、發炎細胞浸潤程度及杯狀細胞消耗。

【0647】 可移除胃腸（GI）道、淋巴結和/或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，獲取組織且可使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不

限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+ GI道-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0648】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物再激發。分析小鼠在再激發後對結腸炎的易感性。

實例34：1型糖尿病（T1D）的小鼠模型中的smEV

【0649】 1型糖尿病（T1D）係一種自體免疫性疾病，其中免疫系統靶向胰臟的胰島，藉此破壞身體產生胰島素的能力。

【0650】 存在T1D的動物模型的不同模型，如Belle等人綜述（Mouse models for type 1 diabetes.[1型糖尿病的小鼠模型] Drug Discov Today Dis Models.[今日藥物發現：疾病模型] 2009; 6(2): 41-45；還參見Aileen JF King. The use of animal models in diabetes research.[動物模型在糖尿病研究中的應用] Br J Pharmacol.[英國藥理學雜誌] 2012年6月；166(3): 877-894。存在用於化學誘導的T1D、病原體誘導的T1D的模型及其中小鼠自發發展T1D的模型。

【0651】 測試smEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在T1D的小鼠模型中的效力。

【0652】 取決於T1D誘導之方法和/或T1D發展是否為自發性的，smEV治療係在一些時間點（在誘導的時間附近或在誘導後，或在自發出現T1D發作之前（或發作後））下開始。smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 smEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受smEV，但其他小鼠組可藉由腹膜

內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（smEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（smEV：細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0653】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0654】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外的治療和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0655】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0656】 血糖係在實驗開始前兩週一次進行監測。在此後的各種時間點下，量測非空腹血糖。在各種時間點下，將小鼠處死且可移除胰臟、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，組織係使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、

PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的組織-浸潤性免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。抗體產生亦可藉由ELISA進行評估。

【0657】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物再激發，或針對復發的易感性進行評估。分析小鼠在再激發（或自發出現復發）對糖尿病發作及嚴重程度的易感性。

實例35：原發性硬化性膽管炎（PSC）的小鼠模型中的smEV

【0658】 原發性硬化性膽管炎（PSC）係緩慢損害膽管並導致末期肝硬化的慢性肝疾病。它與炎性腸病（IBD）相關。

【0659】 存在用於PSC的各種動物模型，如由Fickert等人，（Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC).[原發性硬化性膽管炎(PSC)動物模型的表徵] J Hepatol.[肝病學雜誌] 2014年6月 60(6): 1290-1303；還參見Pollheimer及Fickert.Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis.[原發性膽汁性肝硬化和原發性硬化性膽管炎的動物模型]Clin Rev Allergy Immunol.[過敏與免疫學臨床評論] 2015年6月 48(2-3): 207-17）。PSC模型中疾病的誘導包括化學誘導（例如，3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氫可力丁（DDC）誘導的膽管炎）、病原體誘導（例如，小球隱孢子蟲）、實驗性膽管梗阻（例如，膽總管結紮術（CBDL））及抗原驅動的膽管損傷的轉基因小鼠模型（例如，Ova-Bil轉基因小鼠）。例如，膽管結紮術係如由Georgiev

等人，（Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation.[實驗性膽管結紮後與時間相關的變化] Br J Surg.[英國外科學雜誌] 2008. 95(5): 646-56）描述進行，或疾病係藉由DCC暴露如由Fickert等人，（A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis.[一種新的異種生物誘導的硬化性膽管炎和膽汁纖維化小鼠模型] Am J Path.[美國病理學雜誌]，第171(2)卷: 525-536描述誘導。

【0660】 測試smEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加一些其他治療劑）在PSC的小鼠模型中之功效。

DCC誘導的膽管炎

【0661】 例如，6至8週齡C57bl/6小鼠獲得自Taconic或其他供應商。給小鼠餵食0.1% DCC補充飲食，持續各種持續時間。一些組接受DCC補充食物，歷時1週，其他歷時4週，其他歷時8週。一些組的小鼠可在一段時間內接受DCC補充飲食及然後容許恢復，此後接受正常飲食。可研究這類小鼠自疾病恢復的能力和/或它們的一經後續暴露於DCC則復發的易感性。使用smEV的治療係在某一時間點（在DCC餵養的時間附近或在開始暴露於DCC之後）開始。例如，smEV可在第1天投與，或可將它們在此後的某一時刻投與。smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射smEV。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09和3.0e+12之間的smEV顆粒。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受smEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（smEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（smEV：細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0662】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^4至5 x 10^9個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0663】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用另外的藥劑和/或適當的對照（例如，媒劑或抗體）進行處理。

【0664】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。在各種時間點下，分析血清樣本中的ALT、AP、膽紅素及血清膽汁酸（BA）濃度。

【0665】 在各種時間點下，將小鼠處死，記錄體重及肝重量，且移除發炎的位置（例如，肝、小腸及大腸、脾臟）、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織形態學表徵、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析（參見，Fickert等人，Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis（PSC））.[原發性硬化性膽管炎（PSC）動物模型的表徵] J Hepatol.[肝病學雜誌] 2014. 60(6): 1290-1303）。例如，針對ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1的表現染色膽管。一些組織係經染色用於組織學檢查，而其他組織係使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌

物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80），及黏附分子表現（ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+膽管-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。

【0666】 製備肝組織以用於組織學分析，例如，使用天狼星紅染色，接著對纖維化區域定量。在治療結束時，收集血液用於肝酶（例如，AST或ALT）的血漿分析，及用以測定膽紅素濃度。羥脯胺酸的肝含量可使用預定方案量測。炎症及纖維化標誌物的肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證的引子進行。這類標誌物可包括但不限於MCP-1、α-SMA、Coll1a1及TIMP-。血漿、組織及糞便樣本中的代謝物量測可使用預定代謝組學方法進行。最後，對肝切片進行免疫組織化學以量測中性粒細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0667】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可稍後用DCC再激發。分析小鼠在再激發後對膽管炎及膽管炎嚴重程度的易感性。

BDL誘導的膽管炎

【0668】 可替代地，測試smEV在BDL誘導的膽管炎中之功效。例如，6至8週齡C57Bl/6J小鼠獲得自泰康利公司或其他供應商。在適應期後，使該等小鼠經受手術程序以進行膽管結紮術（BDL）。一些對照動物接受假手術。BDL程序在7至21天內導致肝損傷、炎症及纖維化。

【0669】 使用smEV的治療係在某一時間點（在手術的時間附近或在手術後的某一時刻）下開始。smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射smEV。其他小鼠可接受25、50或

100 mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 smEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受smEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受smEV。一些小鼠每天（例如，起始自第1天）接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（smEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（smEV：細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0670】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0671】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用另外的藥劑和/或適當的對照（例如，媒劑或抗體）進行處理。

【0672】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。在各種時間點下，分析血清樣本中的ALT、AP、膽紅素及血清膽汁酸（BA）濃度。

【0673】 在各種時間點下，將小鼠處死，記錄體重及肝重量，且移除發炎的位置（例如，肝、小腸及大腸、脾臟）、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織形態學表徵、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析（參見，Fickert等人，Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis

（PSC））.[原發性硬化性膽管炎（PSC）動物模型的表徵] J Hepatol.[肝病學雜誌] 2014. 60(6): 1290-1303）。例如，針對ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1的表現染色膽管。一些組織係經染色用於組織學檢查，而其他組織係使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80），及黏附分子表現（ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+膽管-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。

【0674】 製備肝組織以用於組織學分析，例如，使用天狼星紅染色，接著對纖維化區域定量。在治療結束時，收集血液用於肝酶（例如，AST或ALT）的血漿分析，及用以測定膽紅素濃度。羥脯胺酸的肝含量可使用預定方案量測。炎症及纖維化標誌物的肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證的引子進行。這類標誌物可包括但不限於MCP-1、α-SMA、Coll1a1及TIMP。血漿、組織及糞便樣本中的代謝物量測可使用預定代謝組學方法進行。最後，對肝切片進行免疫組織化學以量測中性粒細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0675】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可針對恢復進行分析。

實例36：非酒精性脂肪性肝炎（NASH）的小鼠模型中的smEV

【0676】 非酒精性脂肪性肝炎（NASH）係非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）的嚴重形式，其中肝脂肪（脂肪變性）及炎症的逐步發展導致肝損傷及肝細胞細胞死亡（鼓脹）。

【0677】 存在不同NASH動物模型，如Ibrahim等人綜述（Animal models of Nonalcoholic steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflame.[非酒精性脂肪性肝炎的動物模型：進食，刪除和發炎] Dig Dis Sci.[消化疾病與科學] 2016年5月. 61(5): 1325-1336；還參見Lau等人, Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances[非酒精性脂肪肝疾病的動物模型：當前觀點和最新進展] 2017年1月 241(1): 36-44）。

【0678】 測試smEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加另一治療劑）在NASH的小鼠模型中的效力。例如，將8至10週齡C57Bl/6J小鼠（獲得自Taconic（紐約州日爾曼敦（Germantown, NY））或其他供應商）放置於缺乏甲硫胺酸膽鹼（MCD）的飲食上，歷時4至8週的週期，在此期間NASH特徵發展，包括脂肪變性、炎症、鼓脹及纖維化。

【0679】 測試棲組織普雷沃菌衍生的smEV（單獨或彼此結合，以不同比例，添加或未添加另一治療劑）在NASH的小鼠模型中之功效。例如，使8週齡C57Bl/6J小鼠（獲得自查理斯河（Charles River）（法國）或其他供應商）適應5天的週期，基於體重隨機分為10隻小鼠的組，並放置於缺乏甲硫胺酸膽鹼（MCD）的飲食上，例如來自研究用飲食公司（Research Diets）（USA）的A02082002B，歷時4週的週期，在此期間NASH特徵發展，包括脂肪變性、炎症、鼓脹及纖維化。給對照食物小鼠餵養正常食物飲食，例如，來自SDS飲食公司（SDS Diets）（英國）的RM1 （E）801492。隨意提供對照食物、MCD飲食及水。

【0680】 使用自Kleiner等人,（Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.[非酒精性脂肪肝疾病組織學評分系統的設計和驗證] Hepatology.[肝臟病學] 2005年6月 41(6): 1313-1321）調適的NAS評分系統以確定脂肪變性的程度（0至3分）、小葉炎症（0至3分）、肝細胞鼓脹（0至3分）及纖維化（0至4分）。個別小鼠NAS分數係藉由針對脂肪變性、炎症、鼓脹及纖維化的分數（0至13分）求和進行計算。另外，血漿AST及ALT的濃度係使用來自堀場公司（Horiba ）（美國）的Pentra 400儀器，根據製造商的使用說明進行測定。肝總膽固醇、三酸甘油酯、脂肪酸、丙胺酸胺基轉移酶及天冬胺酸胺基轉移酶的濃度也是使用本領域中已知之方法進行測定。

【0681】 在其他研究中，炎症、纖維化、脂肪變性、ER應激或氧化應激標誌物的肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證的引子進行。這類標誌物可包括（但不限於）IL-1β、TNF-α、MCP-1、α-SMA、Coll1a1、CHOP及NRF2。

【0682】 smEV治療係在一些時間點（在飲食開始時，或在飲食開始後的某一時刻（例如，一週後））下開始。例如，smEV可在開始MCD飲食的同一天投與。smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 smEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受smEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第1天）接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1：1（smEV：細菌細胞）至1-1 x 10^{12}：1（smEV：細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0683】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^4至5 x 10^9個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0684】 一些組的小鼠可在各種時間點及有效劑量下，用一種或多種另外的NASH治療劑（例如，FXR促效劑、PPAR促效劑、CCR2/5拮抗劑或其他治療）和/或適當的對照進行處理。

【0685】 在各種時間點下和/或在治療結束時，將小鼠處死並可移除肝、腸、血液、排泄物或其他組織用於使用本領域中已知之方法進行離體組織學、生物化學、分子或細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，稱重並製備肝組織用於組織學分析，其可包含用H&E、天狼星紅染色，及測定NASH活動分數（NAS）。在各種時間點下，收集血液用於肝酶（例如，AST或ALT）的血漿分析，使用標準分析。另外，膽固醇、三酸甘油酯或脂肪酸的肝含量可使用預定方案進行量測。炎症、纖維化、脂肪變性、ER應激或氧化應激標誌物的肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證的引子進行。這類標誌物可包括但不限於IL-6、MCP-1、α-SMA、Coll1a1、CHOP及NRF2。血漿、組織及糞便樣本中的代謝物量測可使用預定的基於生物化學及質譜的代謝組學方法進行。可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+膽管-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對肝或腸切片進行免疫組織化學以量測中性粒細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0686】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可針對恢復進行分析。

實例37：牛皮癬的小鼠模型中的smEV

【0687】 牛皮癬係T細胞介導的慢性炎症皮膚疾病。所謂的「斑塊型」牛皮癬係牛皮癬的最常見形式且特徵係乾鱗、紅色斑塊、及皮膚因免疫細胞浸潤至真皮及表皮內而增厚。數種動物模型有助於瞭解此疾病，如由Gudjonsson等人，（Mouse models of psoriasis.[牛皮癬的小鼠模型] J Invest Derm.[皮膚病學研究雜誌] 2007. 127: 1292-1308；還參見van der Fits等人，Imiquimod-induced psoriasis -like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis.[咪喹莫特誘導的小鼠牛皮癬樣皮膚炎症係藉由IL-23/IL-17軸介導的] J. Immunol.[免疫學雜誌] 2009年5月1日. 182(9): 5836-45）。

【0688】 牛皮癬可於各種小鼠模型中誘導，包括那些使用轉基因、敲除或異種移植模型，並局部施用咪喹莫特（IMQ）（一種TLR7/8配位基）模型。

【0689】 測試smEV（單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療）在牛皮癬的小鼠模型中的效力。例如，6至8週齡C57Bl/6或Balb/c小鼠獲得自Taconic（日爾曼敦，紐約州）或其他供應商。將小鼠的背部及右耳剃光。各組小鼠接受每天62.5 mg局部劑量的市售IMQ乳膏（5%）（咪喹莫特（Aldara）；3M藥物公司（3M Pharmaceuticals））。將該劑量施用至經剃毛的區域，歷時連續5或6天。每隔一定時間，對小鼠的紅斑、結垢及增厚按自0至4的標度進行評分，如由der Fits等人，(2009)描述。使用Mitutoyo千分尺監測小鼠的耳厚度。

【0690】 使用smEV的治療係在某一時間點（在第一次施用IMQ的時間附近，或之後的某一時刻）開始。例如，smEV可在皮下注射（第0天）的同時投與，或可將它們在投與之前或在投與後投與。smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射smEV。其

他小鼠可接受25、50或100 mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 smEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由經口強飼或i.v.注射接受smEV，但其他小鼠組可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天（例如，起始自第0天）接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1（smEV : 細菌細胞）至1-1 x 10^{12} : 1（smEV : 細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0691】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0692】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用抗炎劑（例如，抗CD154（TNF家族的成員的阻滯劑）或其他治療），和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0693】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0694】 在各種時間點下，採集來自背部及耳朵皮膚的樣本用於使用本領域中已知之方法進行冰凍切片染色分析。將其他組的小鼠處死且可移除淋巴結、脾臟、腸系膜淋巴結（MLN）、小腸、結腸及其他組織用以使用本領域中已知之方法進行組織學研究、離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分

析。一些組織可使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。冰凍切片樣本、組織樣本或離體獲得的細胞係經染色用於藉由流動式細胞測量術使用本領域中已知的技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的CD45+皮膚-浸潤的免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。

【0695】 為檢查牛皮癬保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可經研究以評估恢復，或可將它們用IMQ再激發。分析經再激發的小鼠對牛皮癬及反應的嚴重程度的易感性。

實例38：肥胖症（DIO）的小鼠模型中的smEV

【0696】 存在多種DIO的動物模型，如Tschop等人（A guide to analysis of mouse energy metabolism[小鼠能量代謝分析指南]. Nat. Methods.[自然方法] 2012; 9(1):57-63）和Ayala等人（Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice[描述和執行小鼠葡萄糖體內穩態代謝測試的標準操作程序]. Disease Models and Mechanisms.[疾病模型和機制] 2010; 3:525-534）所綜述的並且由Physiogenex公司提供。

【0697】 測試smEV（單獨或與其他完整細菌細胞（活的、被殺死的、被照射的和/或滅活的等）組合，添加或未添加其他抗炎治療）在DIO的小鼠模型中的效力。

【0698】 取決於DIO誘導之方法和/或DIO發展是否為自發性的，smEV治療係在一些時間點（在誘導的時間附近或在誘導後，或在自發出現T1D發作之前（或發作後））下開始。smEV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以10、15或20 ug/小鼠靜脈內注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100 mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12 smEV顆粒/劑量。雖然一些小鼠藉由i.v.注射接受smEV，但其他小鼠可藉由腹膜內（i.p.）注射、皮下（s.c.）注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受smEV。一些小鼠可每天接受smEV，而其他小鼠可在交替時間間隔下（例如，每隔一天或每三天一次）接受smEV。可給小鼠組投與包含smEV和細菌細胞的混合物的本發明之藥物組成物。例如，該組成物可包含比例為1 : 1（smEV : 細菌細胞）至1-1 x 10^{12} : 1（smEV : 細菌細胞）的smEV顆粒和完整細菌。

【0699】 可替代地，一些組的小鼠可以與smEV投與分開或組合的投與接受1 x 10^{4}至5 x 10^{9}個細菌細胞。如與smEV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。該等細菌細胞可為活的、死的或減弱的。該等細菌細胞可新鮮（或冷凍）獲取，及投與，或可將它們在投與smEV之前經照射或熱滅活。

【0700】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外的治療和/或適當的對照（例如，媒劑或對照抗體）進行處理。

【0701】 另外，在治療之前使用抗生素治療一些小鼠。例如，將萬古黴素（0.5 g/L）、安比西林（1.0 g/L）、建它黴素（1.0 g/L）及兩性黴素B（0.2 g/L）

添加至飲用水中，且在治療時或在治療之前數天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0702】 血糖係在實驗開始前兩週一次進行監測。在此後的各種時間點下，量測非空腹血糖。在各種時間點下，將小鼠處死且可移除胰臟、淋巴結或其他組織以使用本領域中已知之方法進行離體組織學、細胞介素和/或流動式細胞測量術分析。例如，組織係使用解離酶根據製造商的使用說明進行解離。將細胞染色以藉由流動式細胞測量術使用本領域內已知技術進行分析。染色抗體可包含抗CD11c（樹突細胞）、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物（CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4）及巨噬細胞/髓樣標誌物（CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80）。除免疫表型分型外，還可以分析血清細胞介素，它們包括但不限於TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織的免疫細胞，和/或離體獲得的經純化的組織-浸潤性免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及檢查點分子蛋白表現。抗體產生亦可藉由ELISA進行評估。

【0703】 為檢查疾病保護的影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物再激發，或針對復發的易感性進行評估。分析小鼠在再激發（或自發出現復發）對糖尿病發作及嚴重程度的易感性。

實例39：標記細菌的smEV

【0704】 smEV可以被標記，以便跟蹤其在體內的生物分佈，並在各種製劑和用哺乳動物細胞進行的測定中定量和跟蹤細胞定位。例如，smEV可為放射

性標記的、與染料一起孵育、螢光標記的、發光標記的或用包含金屬和金屬同位素的軛合物標記的。

【0705】 例如，smEV可以與軛合至官能基（如NHS-酯、點擊化學基團、鏈黴親和素或生物素）的染料一起孵育。標記反應可以在多種溫度下進行數分鐘或數小時，並且可以進行或不進行攪拌或旋轉。然後可以根據方案藉由添加試劑（例如牛血清白蛋白（BSA）或類似試劑）來終止反應，並藉由超速離心、過濾、離心過濾、柱親和純化或透析除去游離或未結合的染料分子。可以採用包含洗滌緩衝液和渦旋或攪拌的另外洗滌步驟以確保完全去除游離染料分子，例如在Su Chul Jang等人, Small.11, 第4期, 456-461(2017)中所述。

【0706】 藉由共聚焦顯微鏡、奈米顆粒跟蹤分析、流式細胞儀、螢光激活細胞分選（FAC）或螢光成像系統（例如Odyssey CLx LICOR），在細胞或器官中，或在體外和/或離體樣本中檢測螢光標記的smEV（參見例如 Wiklander等人 2015. J. Extracellular Vesicles[胞外囊泡雜誌]. 4:10.3402/jev.v4.26316）。另外，使用儀器，諸如H-I. Choi等人 *Experimental & Molecular Medicine*[實驗與分子醫學]. 49: e330 (2017)中的IVIS光譜CT（珀金埃爾默公司（Perkin Elmer））或Pearl Imager在完整動物和/或經剝離的器官及組織中檢測經螢光標記的smEV。

【0707】 也可以使用上述方案用含有金屬和金屬同位素的軛合物標記smEV。金屬軛合的smEV可以體內給動物投與。然後可以在不同的時間點從器官中獲取細胞，並進行離體分析。可替代地，來源於動物、人或永生化細胞系的細胞可以用金屬標記的smEV在體外處理，並且細胞隨後用金屬軛合的抗體標記並使用飛行時間流動式細胞測量術（CyTOF）儀器（例如Helios CyTOF（富魯達公司））進行表型分析或使用成像質量細胞術儀器（例如Hyperion成像系統（富魯達公司））進行成像和分析。另外，smEV可以用放射性同位素標記以跟

蹤smEV的生物分佈（參見，例如，Miller等人, Nanoscale[奈米尺度].2014年5月7日; 6(9):4928-35)。

實例40：透射電子顯微鏡以使純化的細菌smEV視覺化

【0708】 smEV係從細菌分批培養中純化的。透射電子顯微鏡（TEM）可用於視覺化純化的細菌smEV(S. Bin Park等人 PLoS ONE[公共科學圖書館·綜合]. 6(3):e17629 (2011)）。將smEV載入於300-或400-目-尺寸碳塗覆銅網（電子顯微科學公司（Electron Microscopy Sciences），美國）上歷時2分鐘並用去離子水清洗。smEV使用2% （w/v）乙酸鈾醯負染色20秒至1分鐘。銅網用無菌水清洗並乾燥。影像使用透射電子顯微鏡以100至120 kV加速電壓獲取。經染色的smEV在直徑20 nm-600 nm之間出現且為電子緻密的。對各網篩選10至50個視野。

實例41：圖譜分析smEV組成及內容物

【0709】 smEV可藉由包括（但不限於）以下的各種方法中的任一者來表徵：NanoSight表徵、SDS-PAGE凝膠電泳、蛋白質印跡、ELISA、液相層析-質譜法及質譜、動態光散射、脂質水平、總蛋白、脂質與蛋白質比、核酸分析和/或ζ電位。

smEV的NanoSight表徵

【0710】 奈米顆粒跟蹤分析（NTA）用以表徵經純化的smEV的粒度分佈。於NanoSight機器（瑪律文儀器公司（Malvern Instruments））上運行純化的smEV製劑以評估smEV尺寸及濃度。

SDS-PAGE凝膠電泳

【0711】 為了鑒定純化的smEV的蛋白質組分，將樣本使用標準技術在凝膠上運行，例如Bolt Bis-Tris Plus 4-12%凝膠（賽默飛世爾科技公司（Thermo-Fisher Scientific））。將樣本於1x SDS樣本緩衝液中煮沸10分鐘，冷卻至4°C，及然後在16,000 x g下離心1分鐘。然後，將樣本於SDS-PAGE凝膠上

運行並使用幾種標準技術（例如，銀染色、考馬斯藍、凝膠代碼藍）中的任何一者進行染色以使條帶視覺化。

蛋白質印跡分析

【0712】 為鑒定及定量純化的smEV的特定蛋白質組分，smEV蛋白藉由如上文描述的SDS-PAGE分離及經受蛋白質印跡分析（Cvjetkovic等人，*Sci. Rep.*[科學報告]**6**, 36338 (2016)）並經由ELISA定量。

smEV蛋白質組學與液相層析-質譜法（*LC-MS/MS*）及質譜法（MS）

【0713】 存在於smEV中的蛋白質藉由質譜法技術鑒定及定量。可以使用標準技術製備smEV蛋白用於LC-MS/MS，該標準技術包括使用二硫蘇糖醇溶液（DTT）進行蛋白還原以及使用酶（例如LysC和胰蛋白酶）進行蛋白消化（如在Erickson等人, 2017（Molecular Cell[分子細胞], 第65卷, 第2期, 第361-370頁, 2017年1月19日）中所述）。另一方面，肽係如Liu等人.2010（JOURNAL OF BACTERIOLOGY[細菌學雜誌], 2010年6月, 第2852-2860頁 第192卷, 第11期），Kieselbach和Oscarsson 2017（Data Brief[數據摘要]. 2017年2月; 10: 426-431.），Vildhede等人,（Drug Metabolism and Disposition[藥物代謝與處置] 2018年2月8日）中所述製備。消化後，直接在液相層析和質譜儀上運行肽製劑，用於在單個樣本中鑒定蛋白質。為了相對定量樣本之間的蛋白質，使用iTRAQ試劑-8plex多重套組（應用生物系統公司（Applied Biosystems），福斯特城，加利福尼亞州）或TMT 10plex和11plex標記試劑（賽默飛世爾科技公司（Thermo Fischer Scientific），聖約瑟，加利福尼亞州，USA）將來源於不同樣本的肽消化物用同量異位元素標籤進行標記。每個肽消化物都用不同的同量異位元素標籤標記，然後將經標記的消化物合組合進入一個樣本混合物。藉由LC-MS/MS分析組合的肽混合物，以進行鑒定和定量。使用LC-MS/MS數據進行數據庫搜索，以鑒定經標記的肽和相應的蛋白質。在同量異位元素標記的情況下，附著標籤的片段產

生低分子量的報告離子，該離子用於獲得每個smEV中存在的肽和蛋白質的相對定量。

【0714】 另外，代謝內容物使用液體層析法與質譜法的組合進行確定。存在測定各種樣本的代謝內容物且為熟悉該項技術者已知的各種技術，該等技術關於溶劑萃取、層析分離及耦合至質量測定的各種電離技術（Roberts等人，2012 Targeted Metabolomics.[靶向代謝組學]Curr Protoc Mol Biol.[當代分子生物學方案] 30: 1-24；Dettmer等人，2007, Mass spectrometry-based metabolomics.[基於質譜的代謝組學]Mass Spectrom Rev.[質譜綜述] 26(1):51-78）。作為一項非限制性實例，LC-MS系統包括與1100系列泵（安捷倫公司（Agilent））及HTS PAL自動進樣器（Leap科技公司（Leap Technologies））組合的4000 QTRAP三重四級桿質譜儀（AB SCIEX）。培養基樣本或其他複雜代謝混合物（約10 μL）係使用九體積的含有穩定的同位素標記內標物（纈胺酸-d8，Isotec；及苯丙胺酸-d8，劍橋同位素實驗室（Cambridge Isotope Laboratories））的74.9 : 24.9 : 0.2（v/v/v）乙腈/甲醇/甲酸進行萃取。標準物可取決於受關注的代謝物進行調整或修飾。樣本係經離心（10分鐘，9,000g，4°C），及上清液（10 μL）係藉由將溶液注射於HILIC管柱（150 × 2.1 mm, 3 μm粒度）上而呈遞至LCMS。管柱藉由使5%流動相[10 mM甲酸銨，0.1%甲酸於水中]以250uL/分鐘的速率流動1分鐘，接著線性梯度歷時10分鐘至40%流動相的溶液[具有0.1%甲酸的乙腈]進行洗脫。將離子噴霧電壓設定至4.5 kV及源溫度係450°C。

【0715】 數據係使用市售軟體（諸如來自AB SCIEX的Multiquant 1.2）進行分析以用於質譜峰積分。受關注的峰應手動控制並與標準進行比較來證實該峰的同一性。用適當的標準物進行定量以確定在細菌調節（bacterial conditioning）後及在腫瘤細胞生長後，初始培養基中存在的代謝物的量。也可以使用代謝物數據庫（例如但不限於NIST數據庫）將非靶向代謝組學方法用於峰鑒定。

【0716】 *動態光散射（DLS）*

【0717】 DLS量測（包括不同尺寸的顆粒在不同smEV製劑中的分佈）係使用儀器諸如DynaPro NanoStar （懷雅特技術公司（Wyatt Technology））及Zetasizer Nano ZS （瑪律文儀器公司（Malvern Instruments））進行。

脂質水平

【0718】 脂質水平係使用FM4-64（生命科技公司（Life Technologies）），藉由類似於那些由A.J. McBroom等人，*J Bacteriol[細菌學雜誌]* 188:5385-5392. 及A. Frias等人，*Microb Ecol.*[微生物生態學] 59:476-486 (2010)描述者之方法進行定量。樣本係用FM4-64培養（3.3 μg/mL於PBS中，在37°C下在黑暗中培養10分鐘）。在515 nm下激發後，在635 nm下的發射係使用Spectramax M5平板閱讀器（分子儀器公司（Molecular Devices））量測。絕對濃度係藉由將未知樣本與已知濃度的標準物（諸如棕櫚醯油酸磷脂醯甘油（POPG）囊泡）進行比較而測定。脂質組學可用於鑒定smEV中存在的脂質。

總蛋白質

【0719】 蛋白質水平係藉由標準分析（諸如布拉德福德及BCA分析）定量。該等布拉德福德分析係使用Quick Start布拉德福德1x染料試劑（伯樂公司（Bio-Rad）），根據製造商的方案運行。BCA分析係使用Pierce BCA蛋白質分析套組（賽默飛世爾科技公司（Thermo-Fisher Scientific））運行。絕對濃度係藉由與產生自已知濃度的BSA的標準曲線進行比較而測定。可替代地，蛋白質濃度可以使用比爾-朗伯（Beer-Lambert）方程使用如在奈米滴分光光度計（賽默飛世爾科技公司）上測量的樣本在280nm（A280）處的吸光度來計算。此外，蛋白質組學可以用於鑒定樣本中的蛋白質。

脂質: 蛋白質比率

【0720】 脂質: 蛋白質比率係藉由脂質濃度除以蛋白質濃度產生。相較於各製劑中的游離蛋白質，這類提供囊泡的純度的量度。

核酸分析

【0721】 核酸提取自smEV並使用Qubit螢光計定量。粒度分佈係使用生物分析儀評估並將材料定序。

ζ電位

【0722】 不同製劑的ζ電位係使用諸如Zetasizer ZS （Malvern Instruments）的儀器量測。

實例42：體外篩選用於增強活化樹突細胞的smEV

【0723】 體外免疫反應被認為係模擬體內誘導免疫反應（例如對癌症微環境的反應）的機制。簡而言之，PBMC係藉由梯度離心使用淋巴細胞分離劑（奈科明公司（Nycomed），奧斯陸，挪威）分離自來自健康供體的肝素化靜脈血或使用基於磁珠的人血樹突細胞分離套組（美天旎生物技術公司（Miltenyi Biotech），坎布裡奇，麻塞諸塞州）分離自小鼠脾臟或骨髓。使用抗人CD14 mAb，單核細胞係藉由Moflo純化並在cRPMI中以5e5個細胞/ml的細胞密度於96孔板（科斯塔公司（Costar Corp））中在37°C下培養7天。就樹突細胞的成熟而言，培養物以0.2 ng/mL IL-4及1000 U/ml GM-CSF在37°C下刺激一週。可替代地，藉由與重組GM-CSF孵育一週或使用本領域已知的其他方法實現成熟。小鼠DC可使用珠富集直接獲取自脾臟或分化自造血幹細胞。簡而言之，骨髓可以獲得自小鼠的股骨。回收細胞並裂解紅血球。幹細胞在細胞培養基在20 ng/ml小鼠GMCSF中培養4天。添加含有20 ng/ml小鼠GM-CSF的另外培養基。在第6天，將培養基及非黏附細胞移除並用含有20 ng/ml GMCSF的新鮮細胞培養基置換。具有20 ng/ml GM-CSF的細胞培養基的最終添加係在第7天添加。在第10天，獲取非黏附細胞並接種於細胞培養板中過夜並視需要進行刺激。然後用不同劑量的

smEV（用或不用抗生素）處理樹突細胞。例如，25-75 ug/mL smEV與抗生素24小時。測試的smEV組成物可包括來自單一細菌物種或菌株的smEV，或來自一個或多個屬、1個或多個物種、或1個或多個菌株（例如，一個物種內的一個或多個菌株）的smEV的混合物。包括作為陰性對照的PBS並且來自雙歧桿菌屬物種的LPS、抗CD40抗體和/或smEV用作陽性對照。在培養後，DC係用抗CD11b、CD11c、CD103、CD8a、CD40、CD80、CD83、CD86、MHCI及MHCII染色，及藉由流動式細胞測量術分析。相較於陰性對照在CD40、CD80、CD83及CD86中顯著增加的DC被視為由相關細菌smEV組成物活化。該等實驗最少重複三次。

【0724】 為篩選經smEV活化的上皮細胞刺激DC的能力，上述方案係以添加24小時上皮細胞smEV共培養物且接著用DC培養進行。在用smEV培養後，清洗上皮細胞及然後在缺乏smEV的情況下與DC共培養24小時，然後如上文進行處理。上皮細胞系可包括Int407、HEL293、HT29、T84及CACO2。

【0725】 作為DC活化的另外量測，在用smEV或經smEV處理的上皮細胞將DC培養24小時後，自孔移除100 μl培養上清液並使用Luminex Magpix.多工套組（EMD密理博公司（EMD Millipore）,達姆施塔特市，德國）分析分泌的細胞介素、趨化因子及生長因子。簡而言之，該等孔用緩衝液預濕，並添加25 μl的1x經抗體塗覆的磁珠且2x 200 μl清洗緩衝液係在每個孔中使用磁珠進行。添加50 μl培養緩衝液、50 μl稀釋劑及50 μl樣本並經由在室溫下在黑暗中振盪2小時進行混合。然後，用200 μl清洗緩衝液清洗該等珠兩次。添加100 μl的1X生物素化檢測抗體並及黑暗中伴隨振盪培養懸浮液1小時。然後，用清洗緩衝液進行兩次200 μl清洗。將100 μl的1x SAV-RPE試劑添加至各孔並在室溫下在黑暗中培養30分鐘。進行三次200 μl清洗並添加125 μl清洗緩衝液及進行2至3分鐘振盪。然後，將該等孔呈遞至Luminex xMAP系統中用於分析。

【0726】 標準物容許細胞介素（包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B、IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12（p40/p70）、IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22 IL-23、IL-25、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF）的仔細定量。評估小鼠及人起源兩者的樣本中的這類細胞介素。經細菌處理的樣本中的這類細胞介素的增加指示宿主增強產生蛋白質及細胞介素。檢查特定細胞類型釋放細胞介素的能力的此分析的其他變化係經由藉由分選方法獲取這類細胞進行評估並為本領域中的一般技術者知曉。此外，亦評估細胞介素mRNA以解決反應於smEV組成物的細胞介素釋放。

【0727】 此DC刺激方案可使用純化的smEV及活細菌菌株的組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例43：當用腫瘤細胞培養時，體外篩選用於增強CD8+ T細胞殺死活化的smEV

【0728】 本文描述用於篩選可活化腫瘤細胞的CD8+ T細胞殺死的smEV的體外方法。簡言之，使用本領域已知的技術從人PBMC或小鼠脾臟分離DC，並與單一菌株smEV、smEV的混合物和/或適當的對照在體外孵育。另外，CD8+ T細胞係使用本領域已知的技術，例如基於磁珠的小鼠CD8a+ T細胞分離套組及基於磁珠的人CD8+ T細胞分離套組（兩者均來自美天旎生物技術公司（Miltenyi Biotech），坎布裡奇，麻塞諸塞州）獲得自人PBMC或小鼠脾臟。在DC與smEV孵育一段時間（例如，24小時）後，或DC與smEV刺激的上皮細胞孵育後，用PBS洗滌從細胞培養物中去除smEV，並向每個孔中添加100ul含有抗生素的新鮮培養基，並且向96孔板中的每個實驗孔中添加200,000個T細胞。抗CD3抗體係以2 ug/ml的最終濃度添加。然後，容許在37°C下在正常氧條件下將共培養物培養96小時。

【0729】 例如，在共培養孵育大約72小時後，用本領域已知的技術將腫瘤細胞接種以用於測定。例如，以50,000個腫瘤細胞/孔接種於新96孔板中的各孔

中。所用的小鼠腫瘤細胞系可包括B16.F10、SIY+ B16.F10等等。人腫瘤細胞系係與供體HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA細胞系。在96小時共培養完成後，將100 μl的CD8+ T細胞及DC混合物轉移至含有腫瘤細胞的孔。在37°C下在正常氧條件下將板培養24小時。星形孢菌素可以用作陰性對照以解釋細胞死亡。

【0730】 在此培養後，使用流動式細胞測量術以量測腫瘤細胞死亡及表徵免疫細胞表型。簡而言之，腫瘤細胞用活性染料染色。使用FACS分析以對腫瘤細胞特異性閘控並量測死（被殺死）腫瘤細胞的百分率。數據亦顯示為每孔死腫瘤細胞的絕對數量。細胞毒性CD8+ T細胞表型可藉由下列方法表徵：a) 上清液顆粒酶B、IFNγ及TNFa於培養上清液中的濃度，如下文描述；b) 活化標誌物（諸如DC69、CD25、CD154、PD-1、γ/δ TCR、Foxp3、T-bet、顆粒酶B）的CD8+ T細胞表面表現；c) IFNγ、顆粒酶B、TNFa於CD8+ T細胞中的胞內細胞介素染色。除上清液細胞介素濃度（包括INFγ、TNFa、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趨化因子等）外，亦可藉由胞內細胞介素染色評估CD4+ T細胞表型。

【0731】 作為CD8+ T細胞活化的額外測量，在用DC將T細胞培養96小時後，自孔移除100 μl培養上清液並使用Luminex Magpix.多工套組（EMD Millipore, Darmstadt, Germany）分析分泌的細胞介素、趨化因子及生長因子。簡而言之，該等孔用緩衝液預濕，並添加25 μl的1x經抗體塗覆的磁珠且2x 200 μl清洗緩衝液係在每個孔中使用磁珠進行。添加50 μl培養緩衝液、50 μl稀釋劑及50 μl樣本並經由在室溫下在黑暗中振盪2小時進行混合。然後，用200 μl清洗緩衝液清洗該等珠兩次。添加100 μl的1X生物素化檢測抗體並及黑暗中伴隨振盪培養懸浮液1小時。然後，用清洗緩衝液進行兩次200 μl清洗。將100 μl的1x SAV-RPE試劑添加至各孔並在室溫下在黑暗中培養30分鐘。進行三次200 μl清洗並添加125 μl

清洗緩衝液及進行2至3分鐘振盪。然後，將該等孔呈遞至Luminex xMAP系統中用於分析。

【0732】 標準物容許細胞介素(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12（p40/p70）、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF）的仔細定量。評估小鼠及人起源兩者的樣本中的這類細胞介素。經細菌處理的樣本中的這類細胞介素的增加指示宿主增強產生蛋白質及細胞介素。檢查特定細胞類型釋放細胞介素的能力的此分析的其他變化係經由藉由分選方法獲取這類細胞進行評估並為本領域中的一般技術者知曉。此外，亦評估細胞介素mRNA以解決反應於smEV組成物的細胞介素釋放。宿主細胞中的這類變化刺激與癌症微環境中的體內反應類似的免疫反應。

【0733】 此CD8+ T刺激方案可使用經純化的smEV及活細菌菌株的組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例44：藉由PBMC體外篩選用於增強腫瘤細胞殺死的smEV

【0734】 各種方法可用於針對刺激PBMC的能力來篩選smEV，PBMC反過來活化CD8+ T細胞以殺死腫瘤細胞。例如，PBMC係藉由用於小鼠或人血液的菲可-派克（ficoll-paque）梯度離心分離自來自健康人供體的肝素化靜脈血或用淋巴細胞分離培養基（Cedarlane實驗室（Cedarlane Labs），安大略，加拿大）分離自小鼠血液。PBMC與單一菌株smEV、smEV的混合物和適當的對照孵育。另外，CD8+ T細胞獲得自人PBMC或小鼠脾臟。在PBMC與smEV孵育24小時後，使用PBS洗滌將smEV從細胞中去除。向每個孔中添加100ul帶有抗生素的新鮮培養基。在96孔板的每個實驗孔中添加適當數量的T細胞（例如200,000個T細胞）。抗CD3抗體係以2 ug/ml的最終濃度添加。然後，容許在37°C下在正常氧條件下將共培養物培養96小時。

【0735】 例如，進入共培養物培養72小時後，以50,000個腫瘤細胞/孔接種於新96孔板中的各孔中。所用的小鼠腫瘤細胞系包括B16.F10、SIY+ B16.F10等等。人腫瘤細胞系係與供體HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA細胞系。在96小時共培養完成後，將100 μl的CD8+ T細胞及PBMC混合物轉移至含有腫瘤細胞的孔。在37°C下在正常氧條件下將板培養24小時。星形孢菌素用作陰性對照以解釋細胞死亡。

【0736】 在此培養後，使用流動式細胞測量術以量測腫瘤細胞死亡及表徵免疫細胞表型。簡而言之，腫瘤細胞用活性染料染色。使用FACS分析以對腫瘤細胞特異性閘控並量測死（被殺死）腫瘤細胞的百分率。數據亦顯示為每孔死腫瘤細胞的絕對數量。細胞毒性CD8+ T細胞表型可藉由下列方法表徵：a) 上清液顆粒酶B、IFNγ及TNFa於培養上清液中的濃度，如下文描述；b) 活化標誌物（諸如DC69、CD25、CD154、PD-1、γ/δ TCR、Foxp3、T-bet、顆粒酶B）的CD8+ T細胞表面表現；c) IFNγ、顆粒酶B、TNFa於CD8+ T細胞中的胞內細胞介素染色。除上清液細胞介素濃度（包括INFγ、TNFa、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趨化因子等）外，亦可藉由胞內細胞介素染色評估CD4+ T細胞表型。

【0737】 作為CD8+ T細胞活化的額外測量，在用DC將T細胞培養96小時後，自孔移除100 μl培養上清液並使用Luminex Magpix.多工套組（EMD Millipore, Darmstadt, Germany）分析分泌的細胞介素、趨化因子及生長因子。簡而言之，該等孔用緩衝液預濕，並添加25 μl的1x經抗體塗覆的磁珠且2x 200 μl清洗緩衝液係在每個孔中使用磁珠進行。添加50 μl培養緩衝液、50 μl稀釋劑及50 μl樣本並經由在室溫下在黑暗中振盪2小時進行混合。然後，用200 μl清洗緩衝液清洗該等珠兩次。添加100 μl的1X生物素化檢測抗體並及黑暗中伴隨振盪培養懸浮液1小時。然後，用清洗緩衝液進行兩次200 μl清洗。將100 μl的1x SAV-RPE試劑添加至各孔並在室溫下在黑暗中培養30分鐘。進行三次200 μl清洗並添加125 μl

清洗緩衝液及進行2至3分鐘振盪。然後，將該等孔呈遞至Luminex xMAP系統中用於分析。

【0738】 標準物容許細胞介素(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12（p40/p70）、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF）的仔細定量。評估小鼠及人起源兩者的樣本中的這類細胞介素。經細菌處理的樣本中的這類細胞介素的增加指示宿主增強產生蛋白質及細胞介素。檢查特定細胞類型釋放細胞介素的能力的此分析的其他變化係經由藉由分選方法獲取這類細胞進行評估並為本領域中的一般技術者知曉。此外，亦評估細胞介素mRNA以解決反應於smEV組成物的細胞介素釋放。宿主細胞中的這類變化刺激與癌症微環境中的體內反應類似的免疫反應。

【0739】 此PBMC刺激方案可使用純化的smEV（具有或不具有活的，死的或滅活的/減弱的細菌菌株的組合）重複以最大化免疫刺激潛力。

實例45：體外檢測抗原呈遞細胞中的smEV

【0740】 固有層中的樹突細胞藉由延伸它們的樹突穿過腸上皮以不斷地在腸腔中取樣活細菌、死細菌及微生物產物，這係由細菌在腸腔中產生的smEV可直接刺激樹突細胞的一種方法。下列方法表示一種評估抗原呈遞細胞差異攝取smEV之方法。視需要，這類方法可用以評估向患者投與的smEV的免疫調節行為。

【0741】 樹突細胞（DC）係根據標準方法或套組方案（例如，Inaba K、Swiggard WJ、Steinman RM、Romani N、Schuler G，2001.Isolation of dendritic cells.[樹突細胞的分離]Current Protocols in Immunology[當代免疫學實驗手冊]，第3章：單元3.7）。

【0742】 為評估smEV進入和/或存在於DC中，將250,000個DC接種於圓形蓋玻片上的完全RPMI-1640培養基中及然後以不同比率與來自單一細菌菌株的smEV或組合smEV進行孵育。純化的smEV可以用螢光色素或螢光蛋白標記。孵育不同時間點（例如1小時，2小時）後，用冰冷PBS洗滌細胞兩次，並用胰蛋白酶從板上分離細胞。使細胞保持完整或裂解。然後處理樣本以用於流動式細胞測量術。自裂解的樣本定量總內化smEV，及藉由計數螢光細胞量測攝取smEV的細胞的百分率。上文描述之方法亦可使用巨噬細胞或上皮細胞系（獲得自ATCC）代替DC以大體上相同方式進行。

實例46：體外篩選當與靶細胞孵育時具有活化NK細胞殺死的增強的能力的smEV

【0743】 為了證明所選smEV組成物引起對腫瘤細胞的有效NK細胞細胞毒性的能力，使用以下體外測定。簡而言之，自健康人供體獲得來自肝素化血液的單核細胞。視需要，如先前描述般進行增加NK細胞的數量的擴增步驟（例如，參見Somanschi等人，*J Vis Exp*.[視覺實驗雜誌] 2011;(48):2540）。可以將細胞調整至在含有5%人血清的RPMI-1640培養基中的細胞/ml濃度。然後，用適當的抗體標記PMNC細胞及藉由FACS將NK細胞分離為CD3-/CD56+細胞且準備用於後續的細胞毒性分析。可替代地，NK細胞係使用autoMACs儀器及NK細胞分離套組遵循製造商的使用說明（美天旎生物技術公司（Miltenyl Biotec））進行分離。

【0744】 將NK細胞進行計數並以96孔格式以20,000個或更多個細胞/孔接種，並與單一菌株smEV（在添加或不添加以下各項的情況下：抗原呈遞細胞（例如衍生自同一供體的單核細胞）、來自細菌菌株混合物的smEV和適當對照）孵育。用smEV培養NK細胞5至24小時後，用PBS清洗將smEV自細胞移除，將NK細胞重新懸浮於具有抗生素的10 mL新鮮培養基中，並添加至含有20,000個靶腫

瘤細胞/孔的96孔板。所用的小鼠腫瘤細胞系包括B16.F10、SIY+ B16.F10等等。人腫瘤細胞系係與供體HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA細胞系。在37°C下在正常氧條件下將板培養2-24小時。星形孢菌素用作陰性對照以解釋細胞死亡。

【0745】 在此孵育之後，使用本領域已知之方法使用流動式細胞測量術來測量腫瘤細胞死亡。簡而言之，腫瘤細胞用活性染料染色。使用FACS分析以對腫瘤細胞特異性閘控並量測死（被殺死）腫瘤細胞的百分率。數據亦顯示為每孔死腫瘤細胞的絕對數量。

【0746】 此NK刺激方案可使用純化的smEV及活細菌菌株的組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例47：使用體外免疫活化測定以預測smEV組成物的體內癌症免疫療法功效

【0747】 體外免疫活化測定鑒定可刺激樹突細胞（其進一步活化CD8+ T細胞殺死）的smEV。因此，上文描述的體外分析係用作針對潛在免疫治療活性的大量候選smEV的預測、篩選。優先選擇顯示增強刺激樹突細胞、增強刺激CD8+ T細胞殺死、增強刺激PBMC殺死和/或增強刺激NK細胞殺死的smEV以供體內癌症免疫療法功效研究。

實例48：確定當經口遞送至小鼠時smEV的生物分佈

【0748】 用受關注的smEV組成物經口接種野生型小鼠（例如，C57BL/6或BALB/c）以確定經純化的smEV的體內生物分佈譜。smEV被標記以有助於下游分析。可替代地，可以研究荷瘤小鼠或患有某些免疫障礙（例如全身性紅斑狼瘡、實驗性自體免疫性腦脊髓炎、NASH）的小鼠在給定時間過程中smEV的體內分佈。

【0749】 小鼠可在規定時間過程內接受單一劑量的smEV（例如，25-100 μg）或數個劑量（25-100 μg）。可替代地，smEV劑量可基於顆粒計數（例如，

7e+08至6e+11個顆粒）投與。遵循經批准的方案將小鼠飼養在無特定病原體的條件下。可替代地，可將小鼠飼養並保持在消毒、無菌條件下。血液、大便和其他組織樣本可在適當的時間點下採集。

【0750】 在投與smEV組成物後的各個時間點（即，小時至天）下將小鼠人道處死並在無菌條件下進行完全屍檢。遵循標準方案，獲取淋巴結、腎上腺、肝、結腸、小腸、盲腸、胃、脾臟、腎、膀胱、胰臟、心臟、皮膚、肺、腦及受關注的其他組織及直接使用或快速凍結用於進一步測試。遵循熟悉該項技術者已知的標準方案將該等組織樣本解剖並均質化以製備單細胞懸浮液。然後，藉由流動式細胞測量術定量在樣本中存在的smEV數量。定量亦可在適當處理完整小鼠組織後利用螢光顯微術進行（Vankelecom H., Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization[固定和石蠟包埋的小鼠組織用於GFP視覺化], *Cold Spring Harb. Protoc.*[冷泉港實驗手冊], 2009）。可替代地，動物可使用活體成像根據smEV標記技術進行分析。

【0751】 可在癌症小鼠模型（例如但不限於CT-26和B16（參見例如Kim等人, Nature Communications[自然通訊] 第8卷, 第626期 (2017)））或自體免疫小鼠模型（例如但不限於EAE和DTH（參見例如Turjeman等人, PLoS One[公共科學圖書館·綜合] 10(7): e0130442 (20105)））中進行生物分佈。

實例49：製造條件

【0752】 富集培養基用於生長和製備用於體外和體內使用、並最終用於pmEV和smEV製劑的細菌。例如，培養基可含有糖、酵母提取物、基於植物的蛋白胨、緩衝液、鹽、微量元素、表面活性劑、消泡劑及維生素。複雜組分（如酵母提取物及蛋白胨）的組成可未經定義或經部分定義（包括胺基酸、糖等的近似濃度）。微生物代謝可取決於資源（如碳及氮）的可用性。可測試各種糖或其他碳源。可替代地，可製備培養基並使所選細菌生長，如由Saarela等人, *J.*

Applied Microbiology.[應用微生物學雜誌] 2005. 99: 1330-1339顯示，其以引用的方式併入本文中。發酵時間、冷凍保護劑及細胞濃縮物的中和對冷凍乾燥存活、儲存穩定性及無基於牛奶的成分所產生的所選細菌的酸及膽汁暴露的影響。

【0753】 對培養基大規模滅菌。滅菌可以藉由超高溫（UHT）處理來完成。在極高溫下實施短時間段的UHT處理。UHT範圍可為135°C-180°C。例如，可在135°C下將培養基滅菌10至30秒。

【0754】 可在燒瓶或較小生物反應器中製備接種物且監測生長。例如，接種物大小可為總生物反應器體積的大約0.5%至3%。取決於應用及材料需要，生物反應器體積可為至少2 L、10 L、80 L、100 L、250 L、1000 L、2500 L、5000 L、10,000 L。

【0755】 在接種之前，生物反應器為使用培養基在所需的pH、溫度及氧濃度下進行製備。培養基的初始pH可不同於製程設定點。pH應激在低細胞濃度下可為不利的；初始pH可在pH 7.5與處理設定點之間。例如，pH可設定於4.5與8.0之間。在發酵期間，pH可藉由使用氫氧化鈉、氫氧化鉀或氫氧化銨進行控制。溫度可控制於25°C至45°C，例如在37°C下。藉由將培養液中的氧含量從約8 mg/L降低至0 mg/L來產生厭氧條件。例如，可使用氮或氣體混合物（N2、CO2及H2）來確立厭氧條件。可替代地，不使用氣體且藉由消耗來自培養基的剩餘氧的細胞來確立厭氧條件。取決於菌株及接種物大小，生物反應器發酵時間可有所變化。例如，發酵時間可從大約5小時至48小時有所變化。

【0756】 自冷凍狀態恢復微生物可需具體考慮。產生培養基可在解凍後對細胞產生應激；可能需要特定解凍培養基以自始至終地自經解凍的材料開始菌種培養。出於增加菌種體積或維持微生物生長狀態的目的，種材料至新鮮培養基的轉移或傳代的動力學可受微生物的當前狀態（例如，指數生長、靜止生長、無應激、受應激）影響。

【0757】 產生發酵器的接種可影響生長動力學及細胞活性。生物反應器系統的初始狀態必須經優化以促進成功且始終如一的產生。種培養物相對於總培養基的分率（例如，百分率）對生長動力學有顯著影響。範圍可為發酵器工作體積的1%至5%。培養基的初始pH可不同於處理設定點。pH應激在低細胞濃度下可為不利的；初始pH可在pH 7.5與處理設定點之間。在接種期間，攪動及氣體流入系統內可不同於處理設定點。在低細胞濃度下，物理及化學應激因兩個條件而可為不利的。

【0758】 處理條件及對照設定可影響微生物生長及細胞活性的動力學。處理條件的變化可改變膜組成、代謝物的產生、生長速率、細胞應激等。用於生長的優化溫度範圍可隨菌株改變。該範圍可為20°C至40°C。用於細胞生長及下游活性表現的最佳pH可隨菌株改變。該範圍可為pH 5至8。溶解於培養基中的氣體可被細胞用於代謝。可能需要在整個過程期間調節O2、CO2及N_2濃度。營養素的可用性可改變細胞生長。當可獲得過量的營養素時，微生物可具有替代動力學。

【0759】 微生物在發酵結束時及在獲取期間的狀態可影響細胞存活及活性。微生物可在獲取前不久進行預處理以更好地製備它們用於關於分離及下游處理的物理及化學應激。當自發酵器移除時，溫度的變化（通常減小至20°C至5°C）可減少細胞代謝、減緩生長（和/或死亡）及生理變化。離心濃度的有效性可受培養pH影響。pH上升1至2點可改善濃度的有效性但對細胞也可為不利的。微生物可藉由增加鹽和/或糖在培養基中的濃度而在獲取前不久即受應激。以此方式受應激的細胞可在下游期間更好地在冷凍及凍乾中存活。

【0760】 分離方法及技術可影響自培養基分離微生物的效率。固體可使用離心技術移除。離心濃度的有效性可受培養pH或由利用絮凝劑影響。pH上升1至2點可改善濃度的有效性但對細胞也可為不利的。微生物可藉由增加鹽和/或糖

在培養基中的濃度而在獲取前不久即受應激。以此方式受應激的細胞可在下游期間更好地在冷凍及凍乾中存活。另外，微生物也可經由過濾進行分離。若細胞需過量的g分鐘以成功離心，則就純化而言，過濾優於離心技術。可在分離之前之後添加賦形劑。可添加賦形劑以用於冷凍保護或用於凍乾期間的保護。賦形劑可包括但不限於蔗糖、海藻糖或乳糖，且可替代地該等賦形劑可與緩衝劑及抗氧化劑混合。在凍乾之前，將與賦形劑混合的細胞沈澱物液滴浸沒於液氮中。

【0761】 可藉由連續離心實施收穫。產品可用各種賦形劑重新懸浮至所需的最終濃度。可添加賦形劑以用於冷凍保護或用於凍乾期間的保護。賦形劑可包括但不限於蔗糖、海藻糖或乳糖，且可替代地該等賦形劑可與緩衝劑及抗氧化劑混合。在凍乾之前，將與賦形劑混合的細胞沈澱物液滴浸沒於液氮中。

【0762】 材料（包括活細菌、囊泡或其他細菌衍生物）的凍乾包括冷凍、一級乾燥和二級乾燥階段。凍乾從冷凍開始。在冷凍階段之前，產品材料可以與凍乾保護劑或穩定劑混合，也可以不與凍乾保護劑或穩定劑混合。產品可以在凍乾機裝載之前冷凍，或者在凍乾機的架上在受控的條件下冷凍。在下一階段，即一級乾燥階段，藉由昇華除去冰。這裡，產生真空，並向材料提供適量的熱量。冰將昇華，同時保持產物溫度低於冰點，並低於材料的臨界溫度（T_c）。裝載材料的架的溫度和腔室的真空度可以被操縱以達到所需的產物溫度。在二級乾燥期期間，去除結合產物的水分子。在此處，將溫度通常升至高於一級乾燥期以裂解已在水分子與產物材料之間形成的任何物理-化學相互作用物。在冷凍乾燥處理完成之後，可使用惰性氣體（例如氮）填充室。產物可以在乾燥條件下密封在冷凍乾燥器內，在玻璃瓶或其他類似容器中，以防止暴露於大氣水和污染物。

實例50：口服棲組織普雷沃菌和小韋榮氏球菌smEV和pmEV：DTH研究

【0763】 I.從泰康利生物科學公司購買了5週大的雌性C57BL/6小鼠，並在飼養箱中適應了一週。在第0天藉由皮下免疫用KLH和CFA（1：1）乳劑對小鼠進行初免。從第1-8天開始，小鼠每天用指定菌株的pmEV或完整微生物粉末經口強飼或以1 mg/kg劑量的地塞米松腹腔內給藥。在第8天給藥後，用異氟烷麻醉小鼠，用Fowler卡尺測量左耳的基礎測量值，並在左耳中用含KLH的生理鹽水（10 μl）皮內激發小鼠，並且在24小時測量耳厚度。

【0764】 24小時耳部測量結果顯示在**圖21**中。與相同劑量的凍乾活棲組織普雷沃菌pmEV和10 mg粉末（總細胞數3.13E＋09）相比，測試了三種劑量（高：6.0E＋11，中：6.0E＋09和低：6.0E＋07）的活棲組織普雷沃菌pmEV之功效。結果表明，高劑量的pmEV表現出與10 mg劑量的粉末相當之功效。棲組織普雷沃菌pmEV的功效不受凍乾的影響。

【0765】 II. 從泰康利生物科學公司購買了5週大的雌性C57BL/6小鼠，並在飼養箱中適應了一週。在第0天藉由皮下免疫用KLH和CFA（1：1）乳劑對小鼠進行初免。從第1-8天開始，小鼠每天用指定菌株的smEV、pmEV、γ照射（GI）的pmEV、或γ照射（GI）的粉末（完整微生物）經口強飼或以1 mg/kg劑量的地塞米松腹腔內給藥。在第8天給藥後，用異氟烷麻醉小鼠，用Fowler卡尺測量左耳的基礎測量值，並在左耳中用含KLH的生理鹽水（10 μl）皮內激發小鼠，並且在24小時測量耳厚度。

【0766】 24小時耳部測量結果顯示在**圖22**中。以三種劑量（高：3.0E＋11，中：3.0E＋09和低：3.0E＋07）頭對頭測試了小韋榮氏球菌smEV、pmEV和γ照射（GI）的pmEV之功效。每組的最高劑量之間沒有顯著差異。小韋榮氏球菌pmEV（γ照射的和非γ照射的）與smEV一樣有效。

實例51：smEV和pmEV製備

【0767】 對於實例50中所述之研究，smEV和pmEV的製備如下。

【0768】 *smEV*：生物反應器收穫後，立即開始了smEV的下游加工。以20,000 g離心以從液體培養基中除去細胞。使用0.22 μm過濾器澄清所得的上清液。將smEV濃縮，並使用切向流過濾（TFF）和具有100 kDa分子量截留值（MWCO）的平板式盒式超濾（UF）膜進行清洗。滲濾（DF）用於使用5個體積的磷酸鹽緩衝溶液（PBS）洗脫小分子和小蛋白。將來自TFF的滲餘物在超速離心機中以200,000 g離心1小時，以形成富含smEV的沈澱物，稱為高速沈澱物（HSP）。將沈澱物用最少的PBS重懸，並用optiprep™密度梯度培養基製備梯度，並以200,000 g超速離心16小時。在所得級分中，有2個中間條帶包含smEV。用15倍的PBS洗滌級分，並將smEV以200,000g離心1小時以產生分級的HSP或fHSP。隨後將其用最少的PBS重懸，合併，並分析顆粒數/mL和蛋白質含量。由顆粒數/mL計數製備劑量以達到所需濃度。使用瑪律文帕納科公司公司（Malvern Panalytical）的NanoSight NS300在532 nm雷射的散射模式下表徵smEV。

【0769】 *棲組織普雷沃菌pmEV*：

【0770】 從冰櫃中取出細胞沈澱物並放在冰上。記錄沈澱物重量。

【0771】 將冷的100 mM Tris-HCl pH 7.5添加到冷凍的沈澱物中，並將沈澱物在4°C下解凍旋轉。

【0772】 將10 mg/ml DNA酶儲備液添加到解凍的沈澱物中，使其最終濃度為1mg/mL。

【0773】 將沈澱物在RT（室溫）下在倒轉器上孵育40分鐘。

【0774】 在運行通過Emulsiflex之前，將樣本在70um細胞篩中過濾。

【0775】 使用Emulsiflex在22,000psi下以8個離散循環裂解樣本。

【0776】 為了從裂解的樣本中去除細胞碎片，以12,500 x g、15分鐘、4°C離心樣本。

【0777】 將樣本以12,500 x g、15分鐘、4°C再離心兩次，每次將上清液移至新的試管中。

【0778】 為沈澱膜蛋白，將樣本以120,000 x g、1小時、4°C離心。

【0779】 將沈澱物重懸於10 mL冰冷的0.1 M碳酸鈉pH 11中。將樣本在4°C的倒轉器上孵育1小時。

【0780】 將樣本以120,000 x g、1小時、4°C離心。

【0781】 將10 mL 100 mM Tris-HCl pH 7.5添加到沈澱物中，並在4°C下孵育O/N（過夜）。

【0782】 將沈澱物重新懸浮，並將樣本在4°C下以120,000xg離心1小時。

【0783】 棄去上清液，將沈澱重新懸浮在最小體積的PBS中。

【0784】 *小韋榮氏球菌pmEV：*

【0785】 實例50的研究中使用的小韋榮氏球菌pmEV來自三種不同的分離（分離1、2和3）。方案中有小的變化。

【0786】 從冰櫃中取出細胞沈澱物並放在冰上。記錄沈澱物重量。

【0787】 將冷的MP緩衝液（100 mM Tris-HCl pH 7.5）添加到冷凍的沈澱物中，並將沈澱物在RT下解凍旋轉。

【0788】 將10 mg/ml DNA酶儲備液添加到來自分離1和2的解凍的沈澱中，使其最終濃度為1mg/mL，並且進行孵育。將沈澱物在倒轉器上再孵育40'。

【0789】 使用Emulsiflex在20,000-30,000 psi下以8個離散循環裂解樣本。

【0790】 對於分離1和2，在運行通過Emulsiflex之前將樣本在70um細胞篩中過濾以除去團塊。

【0791】 對於分離3，在通過Emulsiflex之前立即添加1mM PMSF（苯甲基磺醯氟，西格瑪公司）和1mM芐脒（西格瑪公司），並且首先將樣本在15,000 psi下連續循環通過Emulsiflex 1.5分鐘，以破碎團塊。

【0792】 為了從細胞裂解物中去除細胞碎片，將樣本以12,500 x g、15分鐘、4°C離心。

【0793】 將來自分離3的上清液再離心一次，而將來自分離物1和2的上清液以12,500 x g、15分鐘、4°C再循環兩次。每次離心後，將上清液移至新管中。

【0794】 將最終的上清液以120,000 x g、1小時、4°C離心。

【0795】 將膜沈澱物重懸於10 mL冰冷的0.1 M碳酸鈉pH 11中。對於分離1和2，在高速旋轉之前，將樣本在碳酸鈉中孵育1小時。

【0796】 將樣本以120,000 x g、1小時、4°C旋轉。

【0797】 將10 mL 100 mM Tris-HCl pH 7.5添加到沈澱物中，並將沈澱物重新懸浮。

【0798】 將樣本在4°C下以120,000 x g離心1小時。

【0799】 棄去上清液，並且將沈澱物置於最小體積的PBS中（分離1和2）或含有250mM蔗糖的PBS中（分離3）。

【0800】 pmEV的劑量基於如根據製造商的說明使用NanoSight NS300（瑪律文帕納科公司）藉由奈米顆粒跟蹤分析（NTA）評估的顆粒計數。每個樣本的計數均基於至少三個每個持續30秒的視頻，每幀計數40-140個顆粒。

【0801】 *γ照射：*對於γ輻照，小韋榮氏球菌pmEV以冷凍形式製備，並以25kGy的照射劑量在乾冰上進行γ照射；在環境溫度下以17.5 kGy的照射劑量對小韋榮氏球菌完整微生物凍乾粉末進行γ照射。

【0802】 *凍乾：*將樣本置於凍乾設備中，並在-45°C冷凍。凍乾循環包括在-45°C下保持10分鐘的步驟。開始真空並將其設置為100 mTorr，並將樣本在-45°C下再保持10分鐘。一級乾燥開始於經300分鐘溫度斜升至-25°C，並在此溫度下保持4630分鐘。二級乾燥開始於經200分鐘溫度斜升至20°C，同時真空降至

20 mTorr。將其在該溫度和壓力下保持1200分鐘。最後一步將溫度從20°C升高到25°C，並在20 mTorr的真空下保持10分鐘。

實例52：smEV的分離和計數

【0803】 smEV分離中使用的設備包括帶有SLA-3000轉子的索維爾公司（Sorvall）RC-5C離心機；貝克曼庫爾特公司（Beckman-Coulter）45Ti轉子的Optima XE-90超速離心機；賽默飛世爾科技公司的Sorvall wX + Ultra系列離心機；和斐波利特公司（Fiberlite）F37L-8x100轉子。

微生物上清液收集與過濾

【0804】 為了回收smEV而不是微生物，必須將微生物沈澱並從上清液中過濾掉。

【0805】 藉由使用具有SLA-3000轉子的索維爾公司RC-5C離心機並且在至少7,000rpm的轉速下離心培養至少15min，生成沈澱微生物培養物。然後將上清液傾入新的無菌容器中。

【0806】 上清液通過0.2um過濾器過濾。對於過濾性較差的上清液（小於300ml的上清液通過過濾器），在0.2um真空過濾器之前附加0.45um膠囊過濾器。過濾的上清液保存在4°C。然後可以使用TFF濃縮過濾的上清液。

使用超速離心分離smEV

【0807】 濃縮的上清液在超速離心機中離心，使smEV沈澱，並從較小的生物分子中分離smEV。速度為200,000g，時間為1小時，溫度為4°C。當轉子停止時，從超速離心機中取出管，輕輕地倒出上清液。添加更多的上清液，再次離心管。所有濃縮的上清液離心後，生成的沈澱物稱為「粗」smEV沈澱物。將無菌1xPBS添加到放在容器中的沈澱物中。將容器置於轉速為70的搖床上，在4°C冰箱中過夜或更長時間。用另外的無菌1xPBS重新懸浮smEV沈澱物。重新懸浮的EV粗樣本保存在4°C或-80°C下。

使用密度梯度法純化smEV

【0808】 密度梯度用於smEV純化。在超速離心過程中，樣本中的顆粒將根據其「浮力」密度在梯度密度介質中移動和分離。藉由這種方式，smEV與樣本中的其他顆粒（如糖、脂質或其他蛋白質）分離。

【0809】 對於smEV純化，使用四種不同百分比的密度介質（60% Optiprep）：45%層、35%層、25%層和15%層。這將創建分級層。在頂部添加一個0%層，由無菌的1xPBS組成。45%梯度層應包含粗smEV樣本。將5ml樣本添加到15ml Optiprep中。如果粗smEV樣本少於5ml，則使用無菌1xPBS使其達到體積。

【0810】 使用血清學移液管，上下移液45%梯度混合物用以混合。然後將樣本移液進入經標記的清潔無菌的超速離心管中。接下來，用10ml血清學移液管緩慢添加13ml 35%梯度混合物。接著添加13ml 25%梯度混合物，接著添加13ml 15%混合物，最後添加6ml無菌1xPBS。超速離心管用無菌1xPBS平衡。梯度小心地放置在轉子中，並且超速離心機設置為200,000g和4°C。梯度離心至少16小時。

【0811】 使用清潔移液管除去一種或多種目的級分，將其加入15ml錐形管中。該等「純化」的smEV樣本保存在4°C。

【0812】 為了清潔和去除smEV中殘留的optiprep，向純化的smEV中加入10x體積的PBS。超速離心機設定為200,000g和4°C。離心並且旋轉1小時。管小心地從超速離心機中取出，並傾析上清液。洗滌純化的EV，直到所有樣本都被沈澱。將1xPBS添加到放在容器中的純化的沈澱物中。將容器置於轉速為70的搖床上，在4°C冰箱中過夜或更長時間。用另外的無菌1xPBS重新懸浮「純化的」smEV沈澱物。重新懸浮的純化的smEV樣本儲存在4°C或-80°C下。

實例53：KLH DTH研究

【0813】 從泰康利生物科學公司購買了5週大的雌性C57BL/6小鼠，並在飼養箱中適應了一週。在第0天藉由皮下免疫用KLH和CFA（1：1）乳劑對小鼠進行初免。從第1-8天開始，小鼠每天用smEV經口強飼或以1 mg/kg劑量的地塞米松腹腔內給藥。在第8天給藥後，用異氟烷麻醉小鼠，用Fowler卡尺測量左耳的基礎測量值，並在左耳中用含KLH的生理鹽水（10 µl）皮內激發小鼠，並且在24小時測量耳厚度。藉由NTA顆粒計數確定劑量。

【0814】 24小時耳部測量結果顯示在**圖23**中。從巨球型菌屬物種菌株A製備的smEV在兩個劑量2E+11和2E+07（基於顆粒/劑量）處進行比較。smEV係有效的，在激發後24小時顯示耳朵炎症減少。

【0815】 24小時耳部測量結果顯示在**圖24**中。從巨球型菌屬物種菌株B製備的smEV在兩個劑量2E+11和2E+07（基於顆粒/劑量）處進行比較。smEV係有效的，在激發後24小時顯示耳朵炎症減少。

【0816】 24小時耳部測量結果顯示在**圖25**中。從菲利克斯新月形單胞菌製備的smEV在兩個劑量2E+11和2E+07（基於顆粒/劑量）處進行比較。smEV係有效的，在激發後24小時顯示耳朵炎症減少。

實例54：smEV和γ照射的完整細菌U937測試方案

【0817】 細胞系製備：U937單核細胞系（ATCC）在添加FBS HEPES、丙酮酸鈉和抗生素的RPMI培養基中在37°C下在5% CO_2下增殖。用活/死染色的細胞計計數細胞以確定活力。接著，在RPMI培養基中用20 nM佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯（PMA）稀釋細胞至5 x 10^5個細胞/ml的濃度，以將單核細胞分化為巨噬細胞樣細胞。接著，將200微升細胞懸浮液體積到96孔板的每個孔中，並在37°C與5% CO_2孵育72小時。將貼壁、分化的細胞洗滌並在不含PMA的新鮮培養基中孵育24小時。

【0818】 實驗設置：smEV在不含抗生素的RPMI培養基中稀釋至適當濃度（典型為1 x 10^5-1 x 10^{10}）。還製備了未處理和TLR2和4促效劑對照樣本。用不含抗生素的新鮮培養基洗滌含有分化的U937細胞的96孔板，以去除殘留的抗生素。接下來，將smEV的懸浮液提交到經洗滌的板中。將板在37°C在5% CO_2孵育24小時。

【0819】 實驗終點：共孵育24小時後，將上清液從U937細胞中移至單獨的96孔板中。觀察細胞在孔中是否有明顯的裂解（斑塊）。兩個未處理孔不去除上清液，並且將裂解緩衝液添加到孔中並在37°C孵育30分鐘以裂解細胞（最大裂解對照）。將50微升的每個上清液或最大裂解對照添加到新的96孔板中，並根據製造商說明測定細胞裂解（CytoTox 96®非放射性細胞毒性測定，普洛麥格公司（Promega））。使用U-plex MSD板（中尺度發現公司（Meso Scale Discovery））按照製造商的說明從上清液中測量細胞介素。

【0820】 結果如**圖26**所示。來自巨型球菌屬物種菌株A的smEV誘導PMA分化的U937細胞產生細胞介素。用1 x 10^6-1 x 10^9濃度的smEV以及TLR2(FSL)和TLR4(LPS)促效劑對照處理U937細胞24小時，並且測量細胞介素的產生。「空白」表示培養基對照。

實例55：在CT26腫瘤研究中口服遞送巨型球菌屬物種smEV，第一代表性腫瘤學研究

【0821】 從泰康利生物科學公司獲得8週齡雌性BALB/c小鼠，並允許其在飼養箱中馴化3週。第0天，用異氟醚麻醉小鼠，並在左側皮下接種1.0e5 CT-26細胞（0.1 mL），該細胞在PBS和康寧公司（Corning）（GFR）無酚紅基質膠（Matrigel）（1：1）中製備。小鼠在CT-26接種後休息9天，以允許形成可觸及的腫瘤。在第9天，使用滑動數位卡尺測量腫瘤，收集長度和寬度量度（以毫米），以計算估計的腫瘤體積（(L x W x W)/2) = TVmm3)）。將小鼠隨機分為不同的

治療組，每組共9隻或10隻小鼠。進行隨機化以平衡所有治療組，允許每組以相似的平均腫瘤體積和標準差開始治療。第10天開始施用，並且第22天結束，連續施用13天。小鼠口服巨型球菌屬物種菌株A smEV（BID給藥），或腹膜內給予200ug抗小鼠PD-1抗體（Q4D）。體重和腫瘤測量按MWF（週一-週三-週五）時間表收集。藉由NTA顆粒計數確定smEV的劑量。來自巨型球菌屬物種smEV組的兩隻小鼠由於劑量傷害導致死亡而被排除在研究之外。

【0822】 結果顯示在**圖27A和27B**中。第22天腫瘤體積總結將巨型球菌屬物種smEV（2e11）與陰性對照（媒劑PBS）和陽性對照（抗PD-1）進行比較。巨型球菌屬物種*smEV（2e11）*與媒劑PBS相比顯示出統計學上顯著的功效，並且與抗PD-1無顯著差異。腫瘤體積曲線顯示出相似的生長趨勢巨型球菌屬物種smEV和抗PD-1，以及治療13天後的持續功效。

實例56：在CT26腫瘤研究中口服遞送巨型球菌屬物種smEV，第二代表性腫瘤學研究

【0823】 從泰康利生物科學公司獲得8週齡雌性BALB/c小鼠，並允許其在飼養箱中馴化1週。第0天，用異氟醚麻醉小鼠，並在左側皮下接種1.0e5 CT-26細胞（0.1 mL），該細胞在PBS和康寧公司（Corning）（GFR）無酚紅基質膠（Matrigel）（1：1）中製備。小鼠在CT-26接種後休息9天，以允許形成可觸及的腫瘤。在第9天，使用滑動數位卡尺測量腫瘤，收集長度和寬度量度（以毫米），以計算估計的腫瘤體積（(L x W x W)/2) = TVmm3)）。將小鼠隨機分為不同的治療組，每組共9隻小鼠。進行隨機化以平衡所有治療組，允許每組以相似的平均腫瘤體積和標準差開始治療。第10天開始施用，並且第23天結束，連續施用14天。小鼠口服巨型球菌屬物種菌株A smEV（BID和QD給藥），或腹膜內給予200ug抗小鼠PD-1抗體（Q4D）。體重和腫瘤測量按MWF時間表收集。藉由NTA顆粒計數確定smEV的劑量。

【0824】 結果顯示在**圖28A**和**28B**中。第23天腫瘤體積總結比較了3個劑量（2e11，2e9和2e7）BID的巨型球菌屬物種smEV，以及巨型球菌屬物種smEV（2e11）QD比陰性對照（媒劑PBS）和陽性對照（抗PD-1）。所有巨型球菌屬物種smEV治療組與媒劑PBS相比顯示出相比於媒劑（PBS）的統計學上顯著之功效。所測試的所有巨型球菌屬物種smEV劑量與抗PD-1沒有顯著差異。腫瘤生長曲線顯示巨型球菌屬物種smEV治療組在14天的治療中的類似於抗PD-1的持續功效。

實例57：從鶉雞腸球菌菌株分離pmEV

【0825】 從兩種鶉雞腸球菌菌株如下製備pmEV：將冷MP緩衝液（50 mM Tris-HCl pH 7.5，具有100 mM NaCl）添加到冷凍的細胞沈澱物中，並在RT（室溫）或4°C下旋轉解凍沈澱物。細胞在Emulsiflex上裂解。在24,000 psi下用4個離散的通道將樣本在Emulsiflex上裂解。緊接在裂解之前，將蛋白酶抑制劑、苯甲基磺醯氟（PMSF）和苯甲脒添加到樣本中，至最終濃度各為1mM。碎片和未裂解的細胞被沈澱：6,000 x g，30分鐘，40C。

【0826】 藉由FPLC從低速上清液（LSS）中分離純化pmEV：Captocore 700填充的大柱（GE XK 26/70）用以純化pmEV：70%乙醇用於滅菌；0.1X PBS用於運行緩衝液；Milli-Q水用於洗滌；20% EtOH（具有0.1 M NaOH）用於清潔和儲存。將Benzonase添加到LSS樣本中，並在RT下孵育30分鐘，同時旋轉（最終濃度為100 U/ml Benzonase和1 mM MgCl）。將來自細菌裂解的LSS保存在冰上和4C直到準備裝入超環（Superloop）中。

【0827】 進行FPLC純化：流速設定為5 ml/min，δ柱壓力設定為0.25 psi。在整個純化過程中，監測UV吸光度、壓力和流速。啟動運行，並手動載入樣本（超環）。當樣本在層析圖上變得可見時（約50mAU），級分收集器接合。收集整個樣本峰。

【0828】 將最終pmEV樣本濃縮：將最終pmEV級分添加到清潔超速離心管中並進行平衡。管在120,000 x g在40C下旋轉1小時。棄去上清液，並且重新懸浮於最小體積的無菌PBS中。

實例58：用pmEV產生的體內數據

【0829】 允許8週齡雌性BALB/c小鼠在飼養箱中馴化1週。第0天，用異氟醚麻醉小鼠，並在左側皮下接種1 x 10^5個CT-26細胞（0.1 mL），該細胞在PBS和康寧公司（GFR）無酚紅基質膠（1：1）中製備。小鼠在CT-26接種後休息9天，以允許形成可觸及的腫瘤。在第9天，使用滑動數位卡尺測量腫瘤，收集長度和寬度量度（以毫米），以計算估計的腫瘤體積（(L x W x W)/2) = TVmm3)）。將小鼠隨機分為不同的治療組，每組共(9) 隻小鼠。進行隨機化以平衡所有治療組，允許每組以相似的平均腫瘤體積和標準差開始治療。第10天開始施用，並且第23天結束，連續施用14天。小鼠每天口服一次鶉雞腸球菌pmEV，或Q4D腹膜內給予200 μg抗小鼠PD-1。體重和腫瘤測量按MWF時間表收集。

【0830】 從兩個鶉雞腸球菌菌株製備pmEV。一個菌株從JAX小鼠獲得；一個菌株從人來源獲得的。pmEV的劑量顆粒計數為2 x 10^{11}。藉由NTA顆粒計數確定劑量。

【0831】 **圖29**顯示了d10腫瘤用來自鶉雞腸球菌菌株A的pmEV每天給藥一次，持續14天後的腫瘤體積。

實例59：Negativicutes U937結果

【0832】 為了證明Negativicutes作為一個綱的治療效用，從表5中的每個科中選擇代表，並從培養上清液中收穫EV。將EV添加到PMA分化的U937細胞中，並且孵育24小時。藉由MSD ELISA測量細胞介素釋放。

【0833】 結果示出於**圖30-34**中。每個菌株的EV所表現出的廣泛的穩健刺激在菌株之間遵循相似的譜。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)促效劑作為對照。空白表示培養基對照。

[表5]

菌株名稱	**Negativicutes綱內的科**
巨型球菌屬物種菌株A	韋榮氏球菌科
巨型球菌屬物種菌株B	韋榮氏球菌科
菲利克斯新月形單胞菌	月形單孢菌科
腸胺基酸球菌	胺基酸球菌科 （Acidaminococcaceae）
Propionospora屬物種	Sporomusaceae

藉由引用併入

【0834】 在本文中提及的所有出版物、專利申請都藉由引用以其全文特此併入，如同各個單獨的出版物或專利申請被確切地並且單獨地指明為藉由引用併入。如果出現衝突，則以本申請（包含本文的任何定義）為准。

等效形式

【0835】 熟悉該項技術者僅使用常規實驗將認識到或能確定本文所述本發明之具體實施方式的許多等效形式。此類等效形式旨在為下列請求項所涵蓋。

【符號說明】

【0836】 無

【生物材料寄存】

【0837】 無

【補充序列表】

<110> 美商艾弗洛生物科技股份有限公司(EVELO BIOSCIENCES, INC.)

<120> 經加工的微生物胞外囊泡

<140> TW 109119717
<141> 2020-06-11

<150> 62/991,767
<151> 2020-03-19

<150> 62/979,545
<151> 2020-02-21

<150> 62/860,049
<151> 2019-06-11

<150> 62/860,029
<151> 2019-06-11

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1039
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 1
cagcgacgcc gcgtgagtga agaagtattt cggtatgtaa agctctatca gcagggaaga 60

aaatgacggt acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac 120

gtaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggtaaagcaa 180

gtctgaagtg aaagcccgcg gctcaactgc gggactgctt tggaaactgt ttaactggag 240

tgtcggagag gtaagtggaa ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa 300

caccagtggc gaaggcgact tactggacga taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg 360

agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttgg 420

ggagcaaagc tcttcggtgc cgtcgcaaac gcagtaagta ttccacctgg ggagtacgtt 480

cgcaagaatg aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt 540

taattcgaag caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcgatccgac gggggagtaa 600

cgtccccttc ccttcggggc ggagaagaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc 660

gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt attctaagta gccagcggtt 720

cggccgggaa ctcttgggag actgccaggg ataacctgga ggaaggtggg gatgacgtca 780

aatcatcatg ccccttatga tctgggctac acacgtgcta caatggcgta aacaaagaga 840

agcaagaccg cgaggtggag caaatctcaa aaataacgtc tcagttcgga ctgcaggctg 900

caactcgcct gcacgaagct ggaatcgcta gtaatcgcga atcagaatgt cgcggtgaat 960

acgttcccgg gtcttgtaca caccgcccgt cacaccatgg gagtcagtaa cgcccgaagt 1020

cagtgaccca accgcaagg 1039

<210> 2
<211> 1047
<212> DNA

<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 2
gatgcagcga cgccgcgtga gtgaagaagt atttcggtat gtaaagctct atcagcaggg 60

aagaaaatga cggtacctga ctaagaagcc ccggctaact acgtgccagc agccgcggta 120

atacgtaggg ggcaagcgtt atccggattt actgggtgta aagggagcgt agacggtaaa 180

gcaagtctga agtgaaagcc cgcggctcaa ctgcgggact gctttggaaa ctgtttaact 240

ggagtgtcgg agaggtaagt ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gatattagga 300

ggaacaccag tggcgaaggc gacttactgg acgataactg acgttgaggc tcgaaagcgt 360

ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga atactaggtg 420

ttggggagca aagctcttcg gtgccgtcgc aaacgcagta agtattccac ctggggagta 480

cgttcgcaag aatgaaactc aaaggaattg acggggaccc gcacaagcgg tggagcatgt 540

ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcgatc cgacggggga 600

gtaacgtccc cttcccttcg gggcggagaa gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg 660

tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattcta agtagccagc 720

ggttcggccg ggaactcttg ggagactgcc agggataacc tggaggaagg tggggatgac 780

gtcaaatcat catgcccctt atgatctggg ctacacacgt gctacaatgg cgtaaacaaa 840

gagaagcaag accgcgaggt ggagcaaatc tcaaaaataa cgtctcagtt cggactgcag 900

gctgcaactc gcctgcacga agctggaatc gctagtaatc gcgaatcaga atgtcgcggt 960

gaatacgttc ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtca gtaacgcccg 1020

aagtcagtga cccaaccgca aggaggg 1047

<210> 3
<211> 895
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 3
tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc 60

gttatccgga tttactgggt gtaaagggag cgtagacggt aaagcaagtc tgaagtgaaa 120

gcccgcggct caactgcggg actgctttgg aaactgttta actggagtgt cggagaggta 180

agtggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa 240

ggcgacttac tggacgataa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt 300

agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaatactag gtgttgggga gcaaagctct 360

tcggtgccgt cgcaaacgca gtaagtattc cacctgggga gtacgttcgc aagaatgaaa 420

ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa 480

cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcg atccgacggg ggagtaacgt ccccttccct 540

tcggggcgga gaagacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg 600

ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt ctaagtagcc agcggttcgg ccgggaactc 660

ttgggagact gccagggata acctggagga aggtggggat gacgtcaaat catcatgccc 720

cttatgatct gggctacaca cgtgctacaa tggcgtaaac aaagagaagc aagaccgcga 780

ggtggagcaa atctcaaaaa taacgtctca gttcggactg caggctgcaa ctcgcctgca 840

cgaagctgga atcgctagta atcgcgaatc agaatgtcgc ggtgaatacg ttccc 895

<210> 4
<211> 888
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 4
cgtattcacc gcgacattct gattcgcgat tactagcgat tccagcttcg tgcaggcgag 60

ttgcagcctg cagtccgaac tgagacgtta tttttgagat ttgctccacc tcgcggtctt 120

gcttctcttt gtttacgcca ttgtagcacg tgtgtagccc agatcataag gggcatgatg 180

atttgacgtc atccccacct tcctccaggt tatccctggc agtctcccaa gagttcccgg 240

ccgaaccgct ggctacttag aataagggtt gcgctcgttg cgggacttaa cccaacatct 300

cacgacacga gctgacgaca accatgcacc acctgtcttc tccgccccga agggaagggg 360

acgttactcc cccgtcggat cgatgtcaag acctggtaag gttcttcgcg ttgcttcgaa 420

ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg tccccgtcaa ttcctttgag tttcattctt 480

gcgaacgtac tccccaggtg gaatacttac tgcgtttgcg acggcaccga agagctttgc 540

tccccaacac ctagtattca tcgtttacgg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt 600

gctccccacg ctttcgagcc tcaacgtcag ttatcgtcca gtaagtcgcc ttcgccactg 660

gtgttcctcc taatatctac gcatttcacc gctacactag gaattccact tacctctccg 720

acactccagt taaacagttt ccaaagcagt cccgcagttg agccgcgggc tttcacttca 780

gacttgcttt accgtctacg ctccctttac acccagtaaa tccggataac gcttgccccc 840

tacgtattac cgcggctgct ggcacgtagt tagccggggc ttcttagt 888

<210> 5
<211> 893
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 5
actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gggcaagcgt 60

tatccggatt tactgggtgt aaagggagcg tagacggtaa agcaagtctg aagtgaaagc 120

ccgcggctca actgcgggac tgctttggaa actgtttaac tggagtgtcg gagaggtaag 180

tggaattcct agtgtagcgg tgaaatgcgt agatattagg aggaacacca gtggcgaagg 240

cgacttactg gacgataact gacgttgagg ctcgaaagcg tggggagcaa acaggattag 300

ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg aatactaggt gttggggagc aaagctcttc 360

ggtgccgtcg caaacgcagt aagtattcca cctggggagt acgttcgcaa gaatgaaact 420

caaaggaatt gacggggacc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg 480

cgaagaacct taccaggtct tgacatcgat ccgacggggg agtaacgtcc ccttcccttc 540

ggggcggaga agacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 600

aagtcccgca acgagcgcaa cccttattct aagtagccag cggttcggcc gggaactctt 660

gggagactgc cagggataac ctggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgcccct 720

tatgatctgg gctacacacg tgctacaatg gcgtaaacaa agagaagcaa gaccgcgagg 780

tggagcaaat ctcaaaaata acgtctcagt tcggactgca ggctgcaact cgcctgcacg 840

aagctggaat cgctagtaat cgcgaatcag aatgtcgcgg tgaatacgtt ccc 893

<210> 6
<211> 565
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 6
gaaaatgacg gtacctgact aagaagcccc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat 60

acgtaggggg caagcgttat ccggatttac tgggtgtaaa gggagcgtag acggtaaagc 120

aagtctgaag tgaaagcccg cggctcaact gcgggactgc tttggaaact gtttaactgg 180

agtgtcggag aggtaagtgg aattcctagt gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg 240

aacaccagtg gcgaaggcga cttactggac gataactgac gttgaggctc gaaagcgtgg 300

ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacgatgaat actaggtgtt 360

ggggagcaaa gctcttcggt gccgtcgcaa acgcagtaag tattccacct ggggagtacg 420

ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg 480

tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggtcttga catcgatccg acgggggagt 540

aacgtccccc tcccttcggg gcgga 565

<210> 7
<211> 890
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 7
gaacgtattc accgcgacat tctgattcgc gattactagc gattccagct tcgtgcaggc 60

gagttgcagc ctgcagtccg aactgagacg ttatttttga gatttgctcc acctcgcggt 120

cttgcttctc tttgtttacg ccattgtagc acgtgtgtag cccagatcat aaggggcatg 180

atgatttgac gtcatcccca ccttcctcca ggttatccct ggcagtctcc caagagttcc 240

cggccgaacc gctggctact tagaataagg gttgcgctcg ttgcgggact taacccaaca 300

tctcacgaca cgagctgacg acaaccatgc accacctgtc ttctccgccc cgaagggaag 360

gggacgttac tcccccgtcg gatcgatgtc aagacctggt aaggttcttc gcgttgcttc 420

gaattaaacc acatgctcca ccgcttgtgc gggtccccgt caattccttt gagtttcatt 480

cttgcgaacg tactccccag gtggaatact tactgcgttt gcgacggcac cgaagagctt 540

tgctccccaa cacctagtat tcatcgttta cggcgtggac taccagggta tctaatcctg 600

tttgctcccc acgctttcga gcctcaacgt cagttatcgt ccagtaagtc gccttcgcca 660

ctggtgttcc tcctaatatc tacgcatttc accgctacac taggaattcc acttacctct 720

ccgacactcc agttaaacag tttccaaagc agtcccgcag ttgagccgcg ggctttcact 780

tcagacttgc tttaccgtct acgctccctt tacacccagt aaatccggat aacgcttgcc 840

ccctacgtat taccgcggct gctggcacgt agttagccgg ggcttcttag 890

<210> 8
<211> 890
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 8
actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gggcaagcgt 60

tatccggatt tactgggtgt aaagggagcg tagacggtaa agcaagtctg aagtgaaagc 120

ccgcggctca actgcgggac tgctttggaa actgtttaac tggagtgtcg gagaggtaag 180

tggaattcct agtgtagcgg tgaaatgcgt agatattagg aggaacacca gtggcgaagg 240

cgacttactg gacgataact gacgttgagg ctcgaaagcg tggggagcaa acaggattag 300

ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg aatactaggt gttggggagc aaagctcttc 360

ggtgccgtcg caaacgcagt aagtattcca cctggggagt acgttcgcaa gaatgaaact 420

caaaggaatt gacggggacc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg 480

cgaagaacct taccaggtct tgacatcgat ccgacggggg agtaacgtcc ccttcccttc 540

ggggcggaga agacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 600

aagtcccgca acgagcgcaa cccttattct aagtagccag cggttcggcc gggaactctt 660

gggagactgc cagggataac ctggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccccc 720

tatgatctgg gctacacacg tgctacaatg gcgtaaacaa agagaagcaa gaccgcgagg 780

tggagcaaat ctcaaaaata acgtctcagt tcggactgca ggctgcaact cgcctgcacg 840

aagctggaat cgctagtaat cgcgaatcag aatgtcgcgg tgaatacgtt 890

<210> 9
<211> 696
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 9
atgacggtac ctgactaaga agccccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt 60

agggggcaag cgttatccgg atttactggg tgtaaaggga gcgtagacgg taaagcaagt 120

ctgaagtgaa agcccgcggc tcaactgcgg gactgctttg gaaactgttt aactggagtg 180

tcggagaggt aagtggaatt cctagtgtag cggtgaaatg cgtagatatt aggaggaaca 240

ccagtggcga aggcgactta ctggacgata actgacgttg aggctcgaaa gcgtggggag 300

caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgaatacta ggtgttgggg 360

agcaaagctc ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg 420

caagaatgaa actcaaagga attgacgggg acccgcacaa gcggtggagc atgtggttta 480

attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc gatccgacgg gggagtaacg 540

tcccccttccc ttcggggcgg agaagacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt 600

gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccttat tctaagtagc cagcggttcg 660

gccgggaact cttgggagac tgccagggat aacctg 696

<210> 10

<211> 680
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 10
gggaagaaaa tgacggtacc tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg 60

gtaatacgta gggggcaagc gttatccgga tttactgggt gtaaagggag cgtagacggt 120

aaagcaagtc tgaagtgaaa gcccgcggct caactgcggg actgctttgg aaactgttta 180

actggagtgt cggagaggta agtggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta 240

ggaggaacac cagtggcgaa ggcgacttac tggacgataa ctgacgttga ggctcgaaag 300

cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaatactag 360

gtgttgggga gcaaagctct tcggtgccgt cgcaaacgca gtaagtattc cacctgggga 420

gtacgttcgc aagaatgaaa ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cggtggagca 480

tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcg atccgacggg 540

ggagtaacgt ccccttccct tcggggcgga gaagacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc 600

tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aaccccttatt ctaagtagcc 660

agcggttcgg ccgggaactc 680

<210> 11
<211> 887
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 11
aagaagcccc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggg caagcgttat 60

ccggatttac tgggtgtaaa gggagcgtag acggtaaagc aagtctgaag tgaaagcccg 120

cggctcaact gcgggactgc tttggaaact gtttaactgg agtgtcggag aggtaagtgg 180

aattcctagt gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg aacaccagtg gcgaaggcga 240

cttactggac gataactgac gttgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 300

ccctggtagt ccacgccgta aacgatgaat actaggtgtt ggggagcaaa gctcttcggt 360

gccgtcgcaa acgcagtaag tattccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa 420

aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga 480

agaaccttac caggtcttga catcgatccg acgggggagt aacgtcccct tcccttcggg 540

gcggagaaga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 600

tcccgcaacg agcgcaaccc ttattctaag tagccagcgg ttcggccggg aactcttggg 660

agactgccag ggataacctg gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat 720

gatctgggct acacacgtgc tacaatggcg taaacaaaga gaagcaagac cgcgaggtgg 780

agcaaatctc aaaaataacg tctcagttcg gactgcaggc tgcaactcgc ctgcacgaag 840

ctggaatcgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgcggtga atacgtt 887

<210> 12
<211> 800
<212> DNA
<213> 梭菌屬物種(Clostridium sp.)

<400> 12
tgatgcagcg acgccgcgtg agtgaagaag tatttcggta tgtaaagctc tatcagcagg 60

gaagaaaatg acggtacctg actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagccgcggt 120

aatacgtagg gggcaagcgt tatccggatt tactgggtgt aaagggagcg tagacggtaa 180

agcaagtctg aagtgaaagc ccgcggctca actgcgggac tgctttggaa actgtttaac 240

tggagtgtcg gagaggtaag tggaattcct agtgtagcgg tgaaatgcgt agatattagg 300

aggaacacca gtggcgaagg cgacttactg gacgataact gacgttgagg ctcgaaagcg 360

tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg aatactaggt 420

gttggggagc aaagctcttc ggtgccgtcg caaacgcagt aagtattcca cctggggagt 480

acgttcgcaa gaatgaaact caaaggaatt gacggggacc cgcacaagcg gtggagcatg 540

tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcgat ccgacggggg 600

agtaacgtcc ccttcccttc ggggcggaga agacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc 660

gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttattct aagtagccag 720

cggttcggcc gggaactctt gggagactgc cagggataac ctggaggaag gtggggatga 780

cgtcaaatca tcatgccccc 800

<210> 13
<211> 714
<212> DNA
<213> 梭菌屬物種(Clostridium sp.)

<400> 13
gccgcgtgag tgaagaagta tttcggtatg taaagctcta tcagcaggga agaaaatgac 60

ggtacctgac taagaagccc cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggg 120

gcaagcgtta tccggattta ctgggtgtaa agggagcgta gacggtaaag caagtctgaa 180

gtgaaagccc gcggctcaac tgcgggactg ctttggaaac tgtttaactg gagtgtcgga 240

gaggtaagtg gaattcctag tgtagcggtg aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt 300

ggcgaaggcg acttactgga cgataactga cgttgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac 360

aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgaa tactaggtgt tggggagcaa 420

agctcttcgg tgccgtcgca aacgcagtaa gtattccacc tggggagtac gttcgcaaga 480

atgaaactca aaggaattga cggggacccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg 540

aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatcgatcc gacgggggag taacgtcccc 600

ttcccttcgg ggcggagaag acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat 660

gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cttattctaa gtagccagcg gttc 714

<210> 14
<211> 1056
<212> DNA
<213> 梭菌屬物種(Clostridium sp.)

<400> 14
gcctgatgca gcgacgccgc gtgagtgaag aagtatttcg gtatgtaaag ctctatcagc 60

agggaagaaa atgacggtac ctgactaaga agccccggct aactacgtgc cagcagccgc 120

ggtaatacgt aggggcaag cgttatccgg atttactggg tgtaaaggga gcgtagacgg 180
taaagcaagt ctgaagtgaa agcccgcggc tcaactgcgg gactgctttg gaaactgttt 240
aactggagtg tcggagaggt aagtggaatt cctagtgtag cggtgaaatg cgtagatatt 300
aggaggaaca ccagtggcga aggcgactta ctggacgata actgacgttg aggctcgaaa 360
gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgaatacta 420
ggtgttgggg agcaaagctc ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg 480
agtacgttcg caagaatgaa actcaaagga attgacgggg acccgcacaa gcggtggagc 540
atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc gatccgacgg 600
gggagtaacg tccccttccc ttcggggcgg agaagacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag 660
ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccttat tctaagtagc 720
cagcggttcg gccgggaact cttgggagac tgccagggat aacctggagg aaggtgggga 780
tgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgatc tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa 840
caaagagaag caagaccgcg aggtggagca aatctcaaaa ataacgtctc agttcggact 900
gcaggctgca actcgcctgc acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgaat cagaatgtcg 960
cggtgaatac gttcccgggt cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg 1020
cccgaagtca gtgacccaac cgcaaggagg gagctg 1056

<210> 15
<211> 1003
<212> DNA
<213> 梭菌屬物種(Clostridium sp.)

<400> 15
ttcggtatgt aaagctctat cagcagggaa gaaaatgacg gtacctgact aagaagcccc 60
ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggg caagcgttat ccggatttac 120
tgggtgtaaa gggagcgtag acggtaaagc aagtctgaag tgaaagcccg cggctcaact 180
gcgggactgc tttggaaact gtttaactgg agtgtcggag aggtaagtgg aattcctagt 240
gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg aacaccagtg gcgaaggcga cttactggac 300
gataactgac gttgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt 360
ccacgccgta aacgatgaat actaggtgtt ggggagcaaa gctcttcggt gccgtcgcaa 420
acgcagtaag tattccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac 480
ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac 540
caggtcttga catcgatccg acgggggagt aacgtccccc tcccttcggg gcggagaaga 600
caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg 660
agcgcaaccc ttattctaag tagccagcgg ttcggccggg aactcttggg agactgccag 720
ggataacctg gaggaaggtg ggggatgacg tcaaatcatc atgccccttа tgatctgggc 780
tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaaag agaagcaaga ccgcgaggtg gagcaaatct 840
caaaaataac gtctcagttc ggactgcagg ctgcaactcg cctgcacgaa gctggaatcg 900
ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc 960

cgtcacacca tgggagtcag taacgcccga agtcagtgac cca 1003

<210> 16
<211> 893
<212> DNA
<213> 共生梭菌(Clostridium symbiosum)

<400> 16
actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gggcaagcgt 60

tatccggatt tactgggtgt aaagggagcg tagacggtaa agcaagtctg aagtgaaagc 120

ccgcggctca actgcgggac tgctttggaa actgtttaac tggagtgtcg gagaggtaaa 180

gtggaattcc tagtgtagcg gtgaaatgcg tagatattag gaggaacacc agtggcgaag 240

gcgacttact ggacgataac tgacgttgag gctcgaaagc gtggggagca aacaggatta 300

gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gaatactagg tgttggggag caaagctctt 360

cggtgccgtc gcaaacgcag taagtattcc acctggggag tacgttcgca agaatgaaac 420

tcaaaggaat tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac 480

gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcga tccgacgggg gagtaacgtc cccttccctt 540

cggggcggag aagacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt 600

taagtcccgc aacgagcgca acccttattc taagtagcca gcggttcggc cgggaactct 660

tgggagactg ccagggataa cctggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc 720

ttatgatctg ggctacacac gtgctacaat ggcgtaaaca aagagaagca agaccgcgag 780

gtggagcaaa tctcaaaaat aacgtctcag ttcggactgc aggctgcaac tcgcctgcac 840

gaagctggaa tcgctagtaa tcgcgaatca gaatgtcgcg gtgaatacgt tcc 893

<210> 17
<211> 1060
<212> DNA
<213> 梭菌屬物種(Clostridium sp.)

<400> 17
ctgatgcagc gacgccgcgt gagtgaagaa gtagtttcgg tatgtaaagc tctatcagca 60

gggaagaaaa tgacggtacc tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg 120

gtaatacgta gggggcaagc gttatccgga tttactgggt gtaaagggag cgtagacggt 180

aaagcaagtc tgaagtgaaa gcccgcggct caactgcggg actgctttgg aaactgttta 240

actggagtgt cggagaggta agtggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta 300

ggaggaacac cagtggcgaa ggcgacttac tggacgataa ctgacgttga ggctcgaaag 360

cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaatactag 420

gtgttgggga gcaaagctct tcggtgccgt cgcaaacgca gtaagtattc cacctgggga 480

gtacgttcgc aagaatgaaa ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cggtggagca 540

tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcg atccgacggg 600

ggagtaacgt cccttccct tcggggcgga gaagacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc 660

tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt ctaagtagcc 720

agcggttcgg ccgggaactc ttgggagact gccagggata acctggagga aggtggggga 780

tgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgatc tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa 840

caaagagaag caagaccgcg aggtggagca aatctcaaaa ataacgtctc agttcggact 900

gcaggctgca actcgcctgc acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgaat cagaatgtcg 960

cggtgaatac gttcccgggt cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg 1020

cccgaagtca gtgacccaac cgcaaggagg gagctgccga 1060

<210> 18
<211> 561
<212> DNA
<213> Hungatella hathewayi

<400> 18
gaagtatttc ggtatgtaaa gctctatcag cagggaagaa aatgacggta cctgactaag 60

aagccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggggcaa gcgttatccg 120

gatttactgg gtgtaaaggg agcgtagacg gtttagcaag tctgaagtga aagcccgggg 180

ctcaaccccg gtactgcttt ggaaactgtt agacttgagt gcaggagagg taagtggaat 240

tcctagtgta gcggtgaaat gcgtagatat taggaggaac accagtggcg aaggcggctt 300

actggactgt aactgacgtt gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 360

tggtagtcca cgccgtaaac gatgaatact aggtgtcggg gggcaaagcc cttcggtgcc 420

gccgcaaacg caataagtat tccacctggg gagtacgttc gcaagaatga aactcaaagg 480

aattgacggg gacccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga 540

accttaccaa gtcttgacat c 561

<210> 19
<211> 557
<212> DNA
<213> Hungatella hathewayi

<400> 19
ttcggtatgt aaagctctat cagcagggaa gaaaatgacg gtacctgact aagaagcccc 60

ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggg caagcgttat ccggatttac 120

tgggtgtaaa gggagcgtag acggtttagc aagtctgaag tgaaagcccg gggctcaacc 180

ccggtactgc tttggaaact gttagacttg agtgcaggag aggtaagtgg aattcctagt 240

gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg aacaccagtg gcgaaggcgg cttactggac 300

tgtaactgac gttgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt 360

ccacgccgta aacgatgaat actaggtgtc gggggggcaaa gcccttcggt gccgccgcaa 420

acgcaataag tattccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac 480

ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac 540

caagtcttga catccca 557

<210> 20
<211> 596
<212> DNA
<213> Hungatella effluvii

<400> 20
gccgcgtgag tgaagaagta tttcggtatg taaagctcta tcagcaggga agaaaatgac 60

ggtacctgac taagaagccc cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggg 120

gcaagcgtta tccggattta ctgggtgtaa agggagcgta gacggttaag caagtctgaa 180

gtgaaagccc ggggctcaac cccggtactg ctttggaaac tgtttgactt gagtgcagga 240

gaggtaagtg gaattcctag tgtagcggtg aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt 300

ggcgaaggcg gcttactgga ctgtaactga cgttgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac 360

aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgaa tactaggtgt cgggggacaa 420

agtccttcgg tgccgccgct aacgcaataa gtattccacc tggggagtac gttcgcaaga 480

atgaaactca aaggaattga cggggacccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg 540

aagcaacgcg aagaacctta ccaagtcttg acatcccatt gaaaatcatt taaccg 596

<210> 21
<211> 585
<212> DNA
<213> Hungatella effluvii

<400> 21
gccgcgtgag tgaagaagta tttcggtatg taaagctcta tcagcaggga agaaaatgac 60

ggtacctgac taagaagccc cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggg 120

gcaagcgtta tccggattta ctgggtgtaa agggagcgta gacggttaag caagtctgaa 180

gtgaaagccc ggggctcaac cccggtactg ctttggaaac tgtttgactt gagtgcagga 240

gaggtaagtg gaattcctag tgtagcggtg aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt 300

ggcgaaggcg gcttactgga ctgtaactga cgttgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac 360

aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgaa tactaggtgt cgggggacaa 420

agtccttcgg tgccgccgct aacgcaataa gtattccacc tggggagtac gttcgcaaga 480

atgaaactca aaggaattga cggggacccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg 540

aagcaacgcg aagaacctta ccaagtcttg acatcccatt gaaaa 585

<210> 22
<211> 583
<212> DNA
<213> Hungatella effluvii

<400> 22
gccgcgtgag tgaagaagta tttcggtatg taaagctcta tcagcaggga agaaaatgac 60

ggtacctgac taagaagccc cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggg 120

gcaagcgtta tccggattta ctgggtgtaa agggagcgta gacggttaag caagtctgaa 180

gtgaaagccc ggggctcaac cccggtactg ctttggaaac tgtttgactt gagtgcagga 240

gaggtaagtg gaattcctag tgtagcggtg aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt 300

ggcgaaggcg gcttactgga ctgtaactga cgttgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac 360

aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgaa tactaggtgt cgggggacaa 420

agtccttcgg tgccgccgct aacgcaataa gtattccacc tggggagtac gttcgcaaga 480

atgaaactca aaggaattga cggggacccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg 540

aagcaacgcg aagaacctta ccaagtcttg acatcccatt gaa 583

<210> 23
<211> 360
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> source
<223> /備註="對未知的描述：
毛螺菌科物種(Lachnospiraceae sp)或奇特龍[梭菌] ([Clostridium] Citroniae) 39A7-1014"

<400> 23
gacggtacct gactaagaag ccccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag 60

ggggcaagcg ttatccggat ttactgggtg taaagggagc gtagacggcg aagcaagtct 120

ggagtgaaaa cccagggctc aaccctggga ctgctttgga aactgttttg ctagagtgtc 180

ggagaggtaa gtggaattcc tagtgtagcg gtgaaatgcg tagatattag gaggaacacc 240

agtggcgaag gcggcttact ggacgataac tgacgttgag gctcgaaagc gtggggagca 300

aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gaatgctagg tgttgggggg 360

<210> 24
<211> 360
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> source
<223> /備註="對未知的描述：
毛螺菌科物種或奇特龍[梭菌] 39A8-1014"

<400> 24
gacggtacct gactaagaag ccccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag 60

ggggcaagcg ttatccggat ttactgggtg taaagggagc gtagacggcg aagcaagtct 120

ggagtgaaaa cccagggctc aaccctggga ctgctttgga aactgttttg ctagagtgtc 180

ggagaggtaa gtggaattcc tagtgtagcg gtgaaatgcg tagatattag gaggaacacc 240

agtggcgaag gcggcttact ggacgataac tgacgttgag gctcgaaagc gtggggagca 300

aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gaatgctagg tgttgggggg 360

<210> 25
<211> 428
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> source
<223> /備註="對未知的描述：
毛螺菌科物種或奇特龍[梭菌] 36A6-1014"

<400> 25
gccgcgtgag tgaagaagta tttcggtatg taaagctcta tcagcaggga agaaactgac 60

ggtacctgac taagaagccc cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggg 120

gcaagcgtta tccggattta ctgggtgtaa agggagcgta gacggcgaag caagtctgga 180

gtgaaaaccc agggctcaac cctgggactg ctttggaaac tgttttgcta gagtgtcgga 240

gaggtaagtg gaattcctag tgtagcggtg aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt 300

ggcgaaggcg gcttactgga cgataactga cgttgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac 360

aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgaa tgctaggtgt tgggggggcaa 420

agcccttc 428

<210> 26
<211> 571
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<221> source
<223> /備註="對未知的描述：
毛螺菌科物種或[梭菌]屬物種36C9-1014"

<400> 26
gaagtatttc ggtatgtaaa cttctatcag cagggaagaa aatgacggta cctgactaag 60

aagccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggggcaa gcgttatccg 120

gatttactgg gtgtaaaggg agcgtagacg gcagtgcaag tctgaagtga aagcccgggg 180

ctcaaccccg ggactgcttt ggaaactgtg cagctagagt gtcggagagg caagcggaat 240

tcctagtgta gcggtgaaat gcgtagatat taggaggaac accagtggcg aaggcggctt 300

gctggacgat gactgacgtt gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 360

tggtagtcca cgccgtaaac gatgactact aggtgtcggg gagcaaagct cttcggtgcc 420

gcagccaacg caataagtag tccacctggg gagtacgttc gcaagaatga aactcaaagg 480

aattgacggg gacccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga 540

accttacctg ctcttgacat ccctctgacc g 571

<210> 27
<211> 1050
<212> DNA
<213> 鮑氏梭菌(Clostridium bolteae)

<400> 27
gatgcagcga cgccgcgtga gtgaagaagt atttcggtat gtaaagctct atcagcaggg 60

aagaaaatga cggtacctga ctaagaagcc ccggctaact acgtgccagc agccgcggta 120

atacgtaggg ggcaagcgtt atccggattt actgggtgta aagggagcgt agacggcgaa 180

gcaagtctga agtgaaaacc cagggctcaa ccctgggact gctttggaaa ctgttttgct 240

agagtgtcgg agaggtaagt ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gatattagga 300

ggaacaccag tggcgaaggc ggcttactgg acgataactg acgttgaggc tcgaaagcgt 360

ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga atgctaggtg 420

ttgggggggca aagcccttcg gtgccgtcgc aaacgcagta agcattccac ctggggagta 480

cgttcgcaag aatgaaactc aaaggaattg acggggaccc gcacaagcgg tggagcatgt 540

ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaagtctt gacatcctct tgaccggcgt 600

gtaacggcgc cttcccttcg gggcaggaga gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg 660

tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttatcctt agtagccagc 720

aggtaaagct gggcactcta gggagactgc cagggataac ctggaggaag gtggggatga 780

cgtcaaatca tcatgcccct tatgatttgg gctacacacg tgctacaatg gcgtaaacaa 840

agggaagcaa gacagtgatg tggagcaaat cccaaaaata acgtcccagt tcggactgta 900

gtctgcaacc cgactacacg aagctggaat cgctagtaat cgcgaatcag aatgtcgcgg 960

tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtc agcaacgccc 1020

gaagtcagtg acccaactcg caagagaggg 1050

<210> 28
<211> 827
<212> DNA
<213> 活潑瘤胃球菌(Ruminococcus gnavus)

<400> 28
ccttagcggt tgggtcactg acttcgggcg ttactgactc ccatggtgtg acgggcggtg 60

tgtacaagac ccgggaacgt attcaccgcg acattctgat tcgcgattac tagcgattcc 120

agcttcatgt agtcgagttg cagactacaa tccgaactga gacgttattt ttgggatttg 180

ctccccctcg cgggctcgct tcccttttgtt tacgccattg tagcacgtgt gtagccctgg 240

tcataagggg catgatgatt tgacgtcatc cccaccttcc tccaggttat ccctggcagt 300

ctctctagag tgcccatcct aaatgctggc tactaaagat aggggttgcg ctcgttgcgg 360

gacttaaccc aacatctcac gacacgagct gacgacaacc atgcaccacc tgtctcctct 420

gtcccgaagg aaagctccga ttaaagagcg gtcagaggga tgtcaagacc aggtaaggtt 480

cttcgcgttg cttcgaatta aaccacatgc tccaccgctt gtgcgggtcc ccgtcaattc 540

ctttgagttt cattcttgcg aacgtactcc ccaggtggaa tacttattgc gtttgctgcg 600

gcaccgaatg gctttgccac ccgacaccta gtattcatcg tttacggcgt ggactaccag 660

ggtatctaat cctgtttgct ccccacgctt tcgagcctca acgtcagtca tcgtccagaa 720

agccgccttc gccactggtg ttcctcctaa tatctacgca tttcaccgct acactaggaa 780

ttccgctttc ctctccgaca ctctagcctg acagttccaa atgcagt 827

<210> 29
<211> 903
<212> DNA
<213> 納西利斯泰澤菌(Tyzzerella nexilis)

<400> 29
ggctaaatac gtgccagcag ccgcggtaat acgtatggtg caagcgttat ccggatttac 60

tgggtgtaaa gggagcgtag acggttgtgt aagtctgatg tgaaagcccg gggctcaacc 120

ccgggactgc attggaaact atgtaactag agtgtcggag aggtaagcgg aattcctagt 180

gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg aacaccagtg gcgaaggcgg cttactggac 240

gatcactgac gttgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt 300

ccacgccgta aacgatgact actaggtgtc ggggagcaaa gctcttcggt gccgcagcaa 360

acgcaataag tagtccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac 420

ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac 480

ctggtcttga catccctctg accgctcttt aatcggagtt ttccttcggg acagaggaga 540

caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg 600

agcgcaaccc ctatcttcag tagccagcat ttaaggtggg cactctggag agactgccag 660

ggataacctg gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgcccttat gaccagggct 720

acacacgtgc tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaacc tgtgagggga agcaaatctc 780

aaaaataacg tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc 840

tagtaatcgc gaatcagcat gtcgcggtga atacgttccc gggtcttgta cacaccgccc 900

gtc 903

<210> 30
<211> 760
<212> DNA
<213> 當別町韋榮氏球菌(Veillonella tobetsuensis)

<400> 30
agcaacgccg cgtgagtgat gacggccttc gggttgtaaa gctctgttaa tcgggacgaa 60

aggccttctt gcgaatagtt agaaggattg acggtaccgg aatagaaagc cacggctaac 120

tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggaat tattgggcgt 180

aaagcgcgcg caggcggatc ggtcagtctg tcttaaaagt tcggggctta accccgtgag 240

gggatggaaa ctgctgatct agagtatcgg agaggaaagt ggaattccta gtgtagcggt 300

gaaatgcgta gatattagga agaacaccag tggcgaaggc gactttctgg acgaaaactg 360

acgctgaggc gcgaaagcca ggggagcgaa cgggattaga taccccggta gtcctggccg 420

taaacgatgg gtactaggtg taggaggtat cgacccttc tgtgccggag ttaacgcaat 480

aagtaccccg cctggggagt acgaccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacgggggcc 540

cgcacaagcg gtggagtatg tggtttaatt cgacgcaacg cgaagaacct taccaggtct 600

tgacattgat ggacagaact agagatagtt cctcttcttc ggaagccaga aaacaggtgg 660

tgcacggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa 720

cccctatctt atgttgccag cacttcgggt gggaactcat 760

<210> 31
<211> 1049
<212> DNA
<213> 小韋榮氏球菌(Veillonella parvula)

<400> 31
gagtgatgac ggccttcggg ttgtaaagct ctgttaatcg ggacgaaagg ccttcttgcg 60

aatagtgaga aggattgacg gtaccggaat agaaagccac ggctaactac gtgccagcag 120

ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttgt ccggaattat tgggcgtaaa gcgcgcgcag 180

gcggataggt cagtctgtct taaaagttcg gggcttaacc ccgtgatggg atggaaactg 240

ccaatctaga gtatcggaga ggaaagtgga attcctagtg tagcggtgaa atgcgtagat 300

attaggaaga acaccagtgg cgaaggcgac tttctggacg aaaactgacg ctgaggcgcg 360

aaagccaggg gagcgaacgg gattagatac cccggtagtc ctggccgtaa acgatgggta 420

ctaggtgtag gaggtatcga ccccttctgt gccggagtta acgcaataag taccccgcct 480

ggggagtacg accgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg 540

gagtatgtgg tttaattcga cgcaacgcga agaaccttac caggtcttga cattgatgga 600

cagaaccaga gatggttcct cttcttcgga agccagaaaa caggtggtgc acggttgtcg 660

tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ctatcttatg 720

ttgccagcac tttgggtggg gactcatgag agactgccgc agacaatgcg gaggaaggcg 780

gggatgacgt caaatcatca tgcccttat gacctgggct acacacgtac tacaatggga 840

gttaatagac ggaagcgaga tcgcgagatg gagcaaaccc gagaaacact ctctcagttc 900

ggatcgtagg ctgcaactcg cctacgtgaa gtcggaatcg ctagtaatcg caggtcagca 960

tactgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca cgaaagtcgg 1020

aagtgcccaa agccggtggg gtaaccttc 1049

<210> 32
<211> 1038
<212> DNA
<213> 小韋榮氏球菌(Veillonella parvula)

<400> 32
gagtgatgac ggccttcggg ttgtaaagct ctgttaatcg ggacgaaagg ccttcttgcg 60

aatagtgaga aggattgacg gtaccggaat agaaagccac ggctaactac gtgccagcag 120

ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttgt ccggaattat tgggcgtaaa gcgcgcgcag 180

gcggataggt cagtctgtct taaaagttcg gggcttaacc ccgtgatggg atggaaactg 240

ccaatctaga gtatcggaga ggaaagtgga attcctagtg tagcggtgaa atgcgtagat 300

attaggaaga acaccagtgg cgaaggcgac tttctggacg aaaactgacg ctgaggcgcg 360

aaagccaggg gagcgaacgg gattagatac cccggtagtc ctggccgtaa acgatgggta 420

ctaggtgtag gaggtatcga ccccttctgt gccggagtta acgcaataag taccccgcct 480

ggggagtacg accgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg 540

gagtatgtgg tttaattcga cgcaacgcga agaaccttac caggtcttga cattgatgga 600

cagaaccaga gatggttcct cttcttcgga agccagaaaa caggtggtgc acggttgtcg 660

tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ctatcttatg 720

ttgccagcac tttgggtggg gactcatgag agactgccgc agacaatgcg gaggaaggcg 780

gggatgacgt caaatcatca tgcccttat gacctgggct acacacgtac tacaatggga 840

gttaatagac ggaagcgaga tcgcgagatg gagcaaaccc gagaaacact ctctcagttc 900

ggatcgtagg ctgcaactcg cctacgtgaa gtcggaatcg ctagtaatcg caggtcagca 960

tactgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca cgaaagtcgg 1020

aagtgcccaa agccggtg 1038

<210> 33
<211> 1076
<212> DNA
<213> 唾液乳桿菌(Lactobacillus salivarius)

<400> 33
atggagcaac gccgcgtgag tgaagaaggt cttcggatcg taaaactctg ttgttagaga 60

agaacacgag tgagagtaac tgttcattcg atgacggtat ctaaccagca agtcacggct 120

aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgttgtccgg atttattggg 180

cgtaaaggga acgcaggcgg tcttttaagt ctgatgtgaa agccttcggc ttaaccggag 240

tagtgcattg gaaactggaa gacttgagtg cagaagagga gagtggaact ccatgtgtag 300

cggtgaaatg cgtagatata tggaagaaca ccagtggcga aagcggctct ctggtctgta 360

actgacgctg aggttcgaaa gcgtgggtag caaacaggat tagataccct ggtagtccac 420

gccgtaaacg atgaatgcta ggtgttggag ggtttccgcc cttcagtgcc gcagctaacg 480

caataagcat tccgcctggg gagtacgacc gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg 540

ggcccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga accttaccag 600

gtcttgacat cctttgacca cctaagagat taggctttcc cttcggggac aaagtgacag 660

gtggtgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc 720

gcaacccttg ttgtcagttg ccagcattaa gttgggcact ctggcgagac tgccggtgac 780

aaaccggagg aaggtgggga cgacgtcaag tcatcatgcc ccttatgacc tgggctacac 840

acgtgctaca atggacggta caacgagtcg cgagaccgcg aggtttagct aatctcttaa 900

agccgttctc agttcggatt gtaggctgca actcgcctac atgaagtcgg aatcgctagt 960

aatcgcgaat cagcatgtcg cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca 1020

caccatgaga gtttgtaaca cccaaagccg gtggggtaac cgcaaggagc cagccg 1076

<210> 34
<211> 1028
<212> DNA
<213> 阿加薩桿菌屬物種(Agathobaculum sp.)

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<400> 34
ccgcgtgatt gaagaaggcc tntcgggttg taaagatctt taattcggga cgaaaaatga 60

cggtaccgaa agaataagct ccggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg 120

agcaagcgtt atccggattt actgggtgta aagggcgcgc aggcgggctg gcaagttgga 180

agtgaaatct aggggcttaa cccctaaact gctttcaaaa ctgctggtct tgagtgatgg 240

agaggcaggc ggaattccgt gtgtagcggt gaaatgcgta gatatacgga ggaacaccag 300

tggcgaaggc ggcctgctgg acattaactg acgctgaggc gcgaaagcgt ggggagcaaa 360

caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatgg atactaggtg tgggaggtat 420

tgacccttc cgtgccgcag ttaacacaat aagtatccca cctggggagt acggccgcaa 480

ggttgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagca gtggagtatg tggtttaatt 540

cgaagcaacg cgaagaacct taccaggcct tgacatcccg atgaccggtc tagagataga 600

ccttctcttc ggagcatcgg tgacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag 660

atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttacggt tagttgatac gcaagatcac 720
tctagccgga ctgccgttga caaaacggag gaaggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc 780
cccttatggc ctgggctaca cacgtactac aatggcagtc atacagaggg aagcaaagct 840
gtgaggcgga gcaaatccct aaaagctgtc ccagttcaga ttgcaggctg caacccgcct 900
gcatgaagtc ggaattgcta gtaatcgcgg atcagcatgc cgcggtgaat acgttcccgg 960
gccttgtaca caccgcccgt cacaccatga gagccgtcaa tacccgaagt ccgtagccta 1020
accgcaag 1028

<210> 35
<211> 908
<212> DNA
<213> 解苯副梭菌(Paraclostridium benzoelyticum)

<400> 35
gaattactgg gcgtaaaggg tgcgtaggtg gtttttaag tcagaagtga aaggctacgg 60
ctcaaccgta gtaagctttt gaaactagag aacttgagtg caggagagga gagtagaatt 120
cctagtgtag cggtgaaatg cgtagatatt aggaggaata ccagtagcga aggcggctct 180
ctggactgta actgacactg aggcacgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct 240
ggtagtccac gccgtaaacg atgagtacta ggtgtcgggg gttacccccc tcggtgccgc 300
agctaacgca ttaagtactc cgcctgggaa gtacgctcgc aagagtgaaa ctcaaaggaa 360
ttgacgggga cccgcacaag tagcggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac 420
cttacctaag cttgacatcc cactgacctc tccctaatcg gagatttccc ttcggggaca 480
gtggtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc 540
cgcaacgagc gcaacccttg cctttagttg ccagcattaa gttgggcact ctagagggac 600
tgccgaggat aactcggagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgctt 660
agggctacac acgtgctaca atgggtggta cagagggttg ccaagccgcg aggtggagct 720
aatcccttaa agccattctc agttcggatt gtaggctgaa actcgcctac atgaagctgg 780
agttactagt aatcgcagat cagaatgctg cggtgaatgc gttcccgggt cttgtacaca 840
ccgcccgtca caccatggaa gttgggggcg cccgaagccg gttagctaac ctttaggaa 900
gcggccgt 908

<210> 36
<211> 912
<212> DNA
<213> Turicibacter sanguinis

<400> 36
atggctagag tgtgacggta ccttatgaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg 60
cggtaatacg taggtggcga gcgttatccg gaattattgg gcgtaaagag cgcgcaggtg 120
gttgattaag tctgatgtga aagcccacgg cttaaccgtg gagggtcatt ggaaactggt 180
caacttgagt gcagaagagg gaagtggaat tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagagat 240
atggaggaac accagtggcg aaggcggctt cctggtctgt aactgacact gaggcgcgaa 300

agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgagtgct 360

aagtgttggg ggtcgaacct cagtgctgaa gttaacgcat taagcactcc gcctggggag 420

tacggtcgca agactgaaac tcaaaggaat tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat 480

gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatacc agtgaccgtc 540

ctagagatag gattttccct tcggggacaa tggatacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag 600

ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccctgt cgttagttgc 660

cagcattcag ttggggactc taacgagact gccagtgaca aactggagga aggtggggat 720

gacgtcaaat catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggttggtac 780

aaagagaagc gaagcggtga cgtggagcaa acctcataaa gccaatctca gttcggattg 840

taggctgcaa ctcgcctaca tgaagttgga atcgctagta atcgcgaatc agcatgtcgc 900

ggtgaatacg tt 912

<210> 37
<211> 1470
<212> DNA
<213> 巨球型菌屬物種(Megasphaera sp.)

<400> 37
tatcaattcg agtggcaaac gggtgagtaa cgcgtaagca acctgccctt cagatgggga 60

caacagctgg aaacggctgc taataccgaa tacgttcttt ccgccgcatg acgggatgaa 120

gaaagggagg ccttcgggct ttcgctggag gaggggcttg cgtctgatta gctagttgga 180

ggggtaacgg cccaccaagg cgacgatcag tagccggtct gagaggatga acggccacat 240

tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaatc ttccgcaatg 300

gacgaaagtc tgacggagca acgccgcgtg aacgatgacg gccttcgggt tgtaaagttc 360

tgttatatgg gacgaacagg atagcggtca atacccgtta tccctgacgg taccgtaaga 420

gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttgtc 480

cggaattatt gggcgtaaag ggcgcgcagg cggcatcgca agtcggtctt aaaagtgcgg 540

ggcttaaccc cgtgagggga ccgaaactgt gaagctcgag tgtcggagag gaaagcggaa 600

ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaagcggct 660

ttctggacga caactgacgc tgaggcgcga aagccagggg agcaaacggg attagatacc 720

ccggtagtcc tggccgtaaa cgatggatac taggtgtagg aggtatcgac tccttctgtg 780

ccggagttaa cgcaataagt atcccgcctg gggagtacgg ccgcaaggct gaaactcaaa 840

ggaattgacg gggcccgca caagcggtgg agtatgtggt ttaattcgac gcaacgcgaa 900

gaaccttacc aagccttgac attgattgct acggaaagag atttccggtt cttcttcgga 960

agacaagaaa acaggtggtg cacggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1020

gtcccgcaac gagcgcaacc cctatcttct gttgccagca ctaagggtgg ggactcagaa 1080

gagactgccg cagacaatgc ggaggaaggc ggggatgacg tcaagtcatc atgccccttа 1140

tggcttgggc tacacacgta ctacaatggc tcttaataga gggaagcgaa ggagcgatcc 1200

ggagcaaacc ccaaaaacag agtcccagtt cggattgcag gctgcaactc gcctgcatga 1260

agcaggaatc gctagtaatc gcaggtcagc atactgcggt gaatacgttc ccgggccttg 1320

tacacaccgc ccgtcacacc acgaaagtca ttcacacccg aagccggtga ggcaaccgca 1380

aggaaccagc cgtcgaaggt gggggcgatg attggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1440

atcggaaggt gcggctggat cacctccttt 1470

<210> 38
<211> 1559
<212> DNA
<213> 巨球型菌屬物種(Megasphaera sp.)

<400> 38

atggagagtt tgatcctggc tcaggacgaa cgctggcggc gtgcttaaca catgcaagtc 60

gaacgagaag agatgagaag cttgcttctt atcaattcga gtggcaaacg ggtgagtaac 120

gcgtaagcaa cctgcccttc agatggggac aacagctgga aacggctgct aataccgaat 180

acgttctttc cgccgcatga cgggatgaag aaagggaggc cttcgggctt tcgctggagg 240

aggggcttgc gtctgattag ctagttggag gggtaacggc ccaccaaggc gacgatcagt 300

agccggtctg agaggatgaa cggccacatt gggactgaga cacggcccag actcctacgg 360

gaggcagcag tggggaatct tccgcaatgg acgaaagtct gacggagcaa cgccgcgtga 420

acgatgacgg ccttcgggtt gtaaagttct gttatatggg acgaacagga tagcggtcaa 480

tacccgttat ccctgacggt accgtaagag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc 540

gcggtaatac gtaggtggca agcgttgtcc ggaattattg ggcgtaaagg gcgcgcaggc 600

ggcatcgcaa gtcggtctta aaagtgcggg gcttaacccc gtgaggggac cgaaactgtg 660

aagctcgagt gtcggagagg aaagcggaat tcctagtgta gcggtgaaat gcgtagatat 720

taggaggaac accagtggcg aaagcggctt tctggacgac aactgacgct gaggcgcgaa 780

agccagggga gcaaacggga ttagataccc cggtagtcct ggccgtaaac gatggatact 840

aggtgtagga ggtatcgact ccttctgtgc cggagttaac gcaataagta tcccgcctgg 900

ggagtacggc cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga 960

gtatgtggtt taattcgacg caacgcgaag aaccttacca agccttgaca ttgattgcta 1020

cggaaagaga tttccggttc ttcttcggaa gacaagaaaa caggtggtgc acggctgtcg 1080

tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ctatcttctg 1140

ttgccagcac taagggtggg gactcagaag agactgccgc agacaatgcg gaggaaggcg 1200

gggatgacgt caagtcatca tgcccttat ggcttgggct acacacgtac tacaatggct 1260

cttaatagag ggaagcgaag gagcgatccg gagcaaaccc caaaaacaga gtcccagttc 1320

ggattgcagg ctgcaactcg cctgcatgaa gcaggaatcg ctagtaatcg caggtcagca 1380

tactgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca cgaaagtcat 1440

tcacacccga agccggtgag gcaaccgcaa ggaaccagcc gtcgaaggtg ggggcgatga 1500

ttggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgta tcggaaggtg cggctggatc acctccttt 1559

<210> 39
<211> 1277
<212> DNA

<213> 菲利克斯新月形單胞菌(Selenomonas felix)

<400> 39
gttggtgagg taacggctca ccaaggcgac gatcagtagc cggtctgaga ggatgaacgg 60

ccacattggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatcttcc 120

gcaatgggcg caagcctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaaggtct tcggatcgta 180

aagctctgtt gacggggacg aacgtgcgga gtgcgaatag cgctttgtaa tgacggtacc 240

tgtcgaggaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta ggtggcgagc 300

gttgtccgga atcattgggc gtaaagggag cgcaggcggg ccggtaagtc ttacttaaaa 360

gtgcggggct caaccccgtg atgggagaga aactatcggt cttgagtaca ggagaggaaa 420

gcggaattcc cagtgtagcg gtgaaatgcg tagatattgg gaagaacacc agtggcgaag 480

gcggctttct ggactgcaac tgacgctgag gctcgaaagc caggggagcg aacgggatta 540

gataccccgg tagtcctggc cgtaaacgat ggatactagg tgtgggaggt atcgaccct 600

accgtgccgg agttaacgca ataagtatcc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa 660

ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cggtggagta tgtggtttaa ttcgaagcaa 720

cgcgaagaac cttaccaggc cttgacattg actgaaagca ctagagatag tgccctctct 780

tcggagacag gaaaacaggt ggtgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg 840

ttaagtcccg caacgagcgc aacccctgtt ctttgttgcc atcaggtaaa gctgggcact 900

caaaggagac tgccgcggag aacgcggagg aaggcgggga tgacgtcaag tcatcatgcc 960

ccttatggcc tgggctacac acgtactaca atggaacgga cagagagcag cgaacccgcg 1020

agggcaagcg aacctcaaaa accgtttccc agttcggatt gcaggctgca acccgcctgc 1080

atgaagtcgg aatcgctagt aatcgcaggt cagcatactg cggtgaatac gttcccgggt 1140

cttgtacaca ccgcccgtca caccacggaa gtcattcaca cccgaagccg gcgcagccgt 1200

ctaaggtggg gaaggtgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtatc ggaaggtgcg 1260

gctggatcac ctccttt 1277

<210> 40
<211> 1067
<212> DNA
<213> 鶉雞腸球菌(Enterococcus gallinarum)

<400> 40
ctgaccgagc acgccgcgtg agtgaagaag gttttcggat cgtaaaactc tgttgttaga 60

gaagaacaag gatgagagta aaacgttcat cccttgacgg tatctaacca gaaagccacg 120

gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttgtc cggatttatt 180

gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttctta agtctgatgt gaaagccccc ggctcaaccg 240

gggagggtca ttggaaactg ggagacttga gtgcagaaga ggagagtgga attccatgtg 300

tagcggtgaa atgcgtagat atatggagga acaccagtgg cgaaggcggc tctctggtct 360

gtaactgacg ctgaggctcg aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc 420

cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgttg gagggtttcc gcccttcagt gctgcagcaa 480

acgcattaag cactccgcct ggggagtacg accgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac 540

ggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac 600

caggtcttga catcctttga ccactctaga gatagagctt ccccttcggg ggcaaagtga 660

caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg 720

agcgcaaccc ttattgttag ttgccatcat ttagttgggc actctagcga gactgccggt 780

gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gcccccttatg acctgggcta 840

cacacgtgct acaatgggaa gtacaacgag ttgcgaagtc gcgaggctaa gctaatctct 900

taaagcttct ctcagttcgg attgtaggct gcaactcgcc tacatgaagc cggaatcgct 960

agtaatcgcg gatcagcacg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtac acaccgcccg 1020

tcacaccacg agagtttgta acacccgaag tcggtgaggt aaccttt 1067

<210> 41
<211> 1067
<212> DNA
<213> 鶉雞腸球菌(Enterococcus gallinarum)

<220>
<221> modified_base
<222> (1055)..(1055)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<400> 41
cgcgtgagtg aagaaggttt tcggatcgta aaactctgtt gttagagaag aacaaggatg 60

agagtagaac gttcatccct tgacggtatc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc 120

agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc gttgtccgga tttattgggc gtaaagcgag 180

cgcaggcggt ttcttaagtc tgatgtgaaa gcccccggct caaccgggga gggtcattgg 240

aaactgggag acttgagtgc agaagaggag agtggaattc catgtgtagc ggtgaaatgc 300

gtagatatat ggaggaacac cagtggcgaa ggcggctctc tggtctgtaa ctgacgctga 360

ggctcgaaag cgtggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga 420

tgagtgctaa gtgttggagg gtttccgccc ttcagtgctg cagcaaacgc attaagcact 480

ccgcctgggg agtacgaccg caaggttgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa 540

gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc 600

ctttgaccac tctagagata gagcttcccc ttcgggggca aagtgacagg tggtgcatgg 660

ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccttat 720

tgttagttgc catcatttag ttgggcactc tagcgagact gccggtgaca aaccggagga 780

aggtggggat gacgtcaaat catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa 840

tgggaagtac aacgagttgc gaagtcgcga ggctaagcta atctcttaaa gcttctctca 900

gttcggattg taggctgcaa ctcgcctaca tgaagccgga atcgctagta atcgcggatc 960

agcacgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag 1020

tttgtaacac ccgaagtcgg tgaggtaacc ttttnggagc cagccgc 1067

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種藥物組成物，該藥物組成物包含分離的經加工的微生物胞外囊泡（pmEV）。

【請求項2】 如請求項1所述之藥物組成物，其中該藥物組成物的微生物衍生的含量的至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%係pmEV。

【請求項3】 如請求項1或2所述之藥物組成物，用於經由免疫抑制治療疾病。

【請求項4】 如請求項1或2所述之藥物組成物，用於經由免疫活化治療疾病。

【請求項5】 如請求項1或請求項2所述之藥物組成物，用於經由活化或增強受試者的一種或多種免疫反應來治療疾病。

【請求項6】 如請求項1或請求項2所述之藥物組成物，用於經由促進受試者的免疫抑制來治療疾病。

【請求項7】 如請求項2至6中任一項所述之藥物組成物，其中該疾病係癌症、自體免疫性疾病、炎性疾病或代謝性疾病。

【請求項8】 如請求項1至7中任一項所述之藥物組成物，該藥物組成物包含治療有效量的pmEV。

【請求項9】 如請求項1至8中任一項所述之藥物組成物，其中該組成物活化先天抗原呈遞細胞。

【請求項10】 如請求項1至9中任一項所述之藥物組成物，其中當口服投與時，該組成物在胃腸道外具有一種或多種有益的免疫效果。

【請求項11】 如請求項1至10中任一項所述之藥物組成物，其中當口服投與時，該組成物調節受試者的胃腸道外的免疫效應。

【請求項12】 如請求項1至11中任一項所述之藥物組成物，其中該組成物包含來自一種細菌菌株的pmEV。

【請求項13】 如請求項1至12中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV係凍乾的（例如，凍乾產物還包含藥學上可接受的賦形劑）。

【請求項14】 如請求項1至13中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV被γ照射。

【請求項15】 如請求項1至14中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV被UV照射。

【請求項16】 如請求項1至15中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV被熱滅活。

【請求項17】 如請求項16所述之藥物組成物，其中該pmEV在約50°C下熱滅活兩小時或在約90°C下熱滅活兩小時。

【請求項18】 如請求項1至17中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV被酸處理。

【請求項19】 如請求項1至18中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV被噴氧。

【請求項20】 如請求項19所述之藥物組成物，其中該pmEV被以約0.1 vvm噴氧至少兩小時。

【請求項21】 如請求項1至20中任一項所述之藥物組成物，其中pmEV的劑量為約2×10^6至約2×10^{16}個顆粒。

【請求項22】 如請求項1至21中任一項所述之藥物組成物，其中pmEV的劑量為約5 mg至約900 mg的總蛋白。

【請求項23】 如請求項1至22中任一項所述之藥物組成物，其中該藥物組成物係固體劑型。

【請求項24】 如請求項23所述之藥物組成物，其中該固體劑型包括片劑、微型片劑、膠囊、丸劑或粉末，或前述的組合。

【請求項25】 如請求項23或24所述之藥物組成物，其中該固體劑型還包含藥學上可接受的賦形劑。

【請求項26】 如請求項23至25中任一項所述之藥物組成物，其中該固體劑型包含腸溶包衣。

【請求項27】 如請求項23至26中任一項所述之藥物組成物，其中該固體劑型被配製成用於口服投與。

【請求項28】 如請求項1至22中任一項所述之藥物組成物，其中該藥物組成物呈懸浮液形式。

【請求項29】 如請求項28所述之藥物組成物，其中該懸浮液被配製成用於口服投與。

【請求項30】 如請求項29所述之藥物組成物，其中該懸浮液包含PBS，和視需要的蔗糖或葡萄糖。

【請求項31】 如請求項28所述之藥物組成物，其中該懸浮液被配製成用於靜脈內、腹膜內或瘤內投與。

【請求項32】 如請求項31所述之藥物組成物，其中該懸浮液包含PBS。

【請求項33】 如請求項28至32中任一項所述之藥物組成物，其中該懸浮液還包含藥學上可接受的賦形劑或緩衝液。

【請求項34】 如請求項1至33中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV來自革蘭氏陽性細菌。

【請求項35】 如請求項1至33中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV來自革蘭氏陰性細菌。

【請求項36】 如請求項35所述之藥物組成物，其中該革蘭氏陰性細菌屬於Negativicutes綱。

【請求項37】 如請求項1至36中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV來自需氧細菌、厭氧細菌、嗜酸細菌、嗜鹼細菌、嗜中性細菌、難養細菌、非難養細菌，或其組合。

【請求項38】 如請求項1至37中任一項所述之藥物組成物，其中該pmEV來自表1、表2或表3中列出的一種或多種細菌菌株。

【請求項39】 如請求項1至38中任一項所述之藥物組成物，其中該組成物還包含一種或多種另外的治療劑。

【請求項40】 如請求項1至39中任一項所述之藥物組成物在製備用於治療疾病的藥物中之用途。

【請求項41】 如請求項49所述之用途，其中該疾病係癌症、自體免疫性疾病、炎性疾病、菌群失調和/或代謝性疾病。

【請求項42】 一種治療受試者之方法，該方法包括向該受試者投與如請求項1至41中任一項所述之藥物組成物。

【請求項43】 如請求項42所述之方法，其中該pmEV來自已經被γ照射、UV照射、熱滅活、酸處理、噴氧、或其組合的細菌。

【請求項44】 如請求項42所述之方法，其中 該pmEV來自活細菌。

【請求項45】 如請求項42至44中任一項所述之方法，其中該組成物活化或增強該受試者的一種或多種免疫反應。

【請求項46】 如請求項45所述之方法，其中該一種或多種免疫反應包括全身免疫反應。

【請求項47】 如請求項42至44中任一項所述之方法，其中該組成物抑制該受試者的免疫反應。

【請求項48】 如請求項42至44中任一項所述之方法，其中該組成物促進該受試者的免疫活化。

【請求項49】 如請求項42至48中任一項所述之方法，其中包含該pmEV的該藥物組成物與包含來自從其產生該pmEV的同一細菌菌株的完整微生物的藥物組成物相比具有相當的效力或增加的效力）。

【請求項50】 如請求項42至48中任一項所述之方法，其中包含該pmEV的該藥物組成物與包含從其產生該pmEV的完整微生物的藥物組成物相比具有更具有治療活性的微生物材料。

【請求項51】 如請求項42至50中任一項所述之方法，其中該受試者需要治療癌症。

【請求項52】 如請求項42至50中任一項所述之方法，其中該受試者需要治療自體免疫性疾病和/或炎性疾病。

【請求項53】 如請求項42至50中任一項所述之方法，其中該受試者需要治療菌群失調。

【請求項54】 如請求項42至50中任一項所述之方法，其中該受試者需要治療代謝性疾病。

【請求項55】 如請求項42至50中任一項所述之方法，其中該藥物組成物與另外的治療劑組合投與。

【請求項56】 如請求項42至55中任一項所述之方法，其中該組成物包含來自一種細菌菌株的pmEV。

【請求項57】 如請求項42至56中任一項所述之方法，其中該pmEV被凍乾。

【請求項58】 如請求項42至57中任一項所述之方法，其中該藥物組成物係口服投與。

【請求項59】 如請求項42至57中任一項所述之方法，其中該藥物組成物係靜脈內投與。

【請求項60】 如請求項42至57中任一項所述之方法，其中該藥物組成物係瘤內投與。

【請求項61】 如請求項42至57中任一項所述之方法，其中該藥物組成物係瘤下投與。

【請求項62】 如請求項42至57中任一項所述之方法，其中該藥物組成物藉由注射投與。

【請求項63】 一種製備呈懸浮液的包含pmEV的藥物組成物之方法，該方法包括：將pmEV與藥學上可接受的緩衝液組合，從而製備該藥物組成物。

【請求項64】 如請求項63所述之方法，其中該藥學上可接受的緩衝液包含PBS。

【請求項65】 如請求項63或64所述之方法，其中該懸浮液還包含蔗糖或葡萄糖。

【請求項66】 如請求項63至65中任一項所述之方法，其中該pmEV包含約$2x10^6$至約$2x10^{16}$個pmEV顆粒。

【請求項67】 如請求項63至66中任一項所述之方法，其中該pmEV包含約5 mg至約900 mg的總蛋白。

【請求項68】 一種藉由如請求項62至67中任一項所述之方法製備的藥物組成物。

【請求項69】 一種製備包含呈固體劑型的pmEV（例如，其治療有效量）的藥物組成物固體劑型之方法，該方法包括：

a) 將pmEV與藥學上可接受的賦形劑組合；以及

b) 壓縮該組合的pmEV和藥學上可接受的賦形劑；從而製備藥物組成物固體劑型。

【請求項70】 如請求項69所述之方法，該方法還包括對該固體劑型進行腸溶包衣。

【請求項71】 如請求項69或70所述之方法，其中該固體劑型包括片劑或微型片劑。

【請求項72】 如請求項69至71中任一項所述之方法，其中該組成物包含來自一種細菌菌株的pmEV。

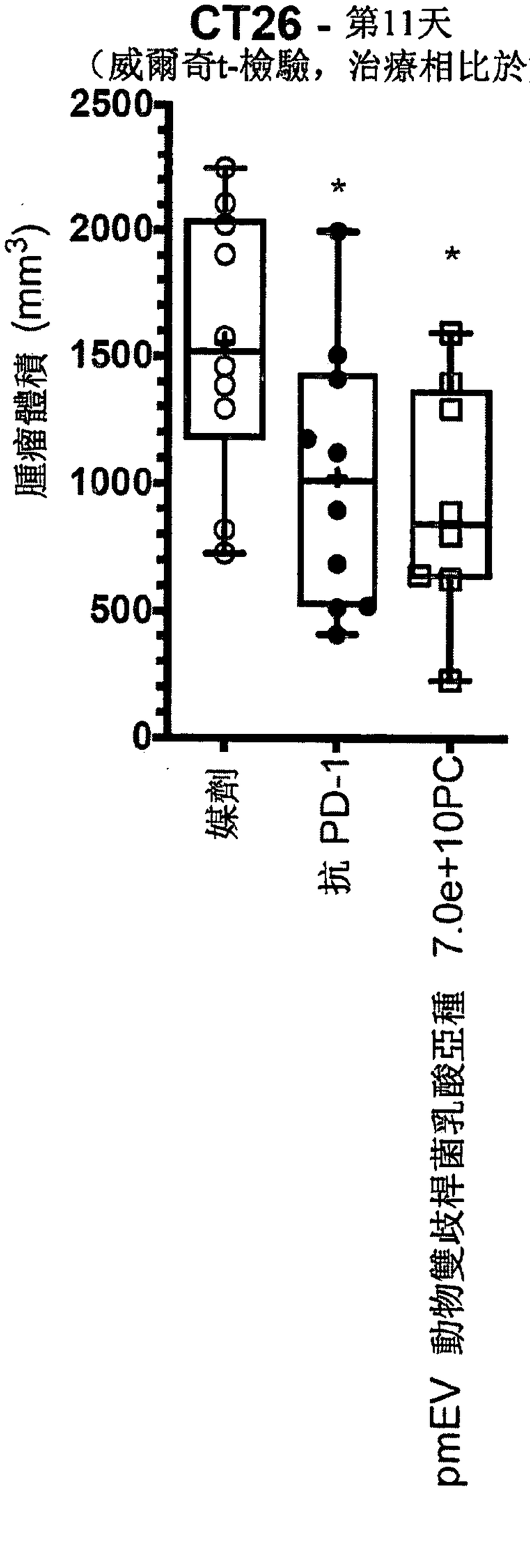
【請求項73】 如請求項69至72中任一項所述之方法，其中該pmEV被凍乾。

【請求項73】 如請求項69至72中任一項所述之方法，其中該pmEV包含約2 x 10^6至約2 x 10^{16}個顆粒。

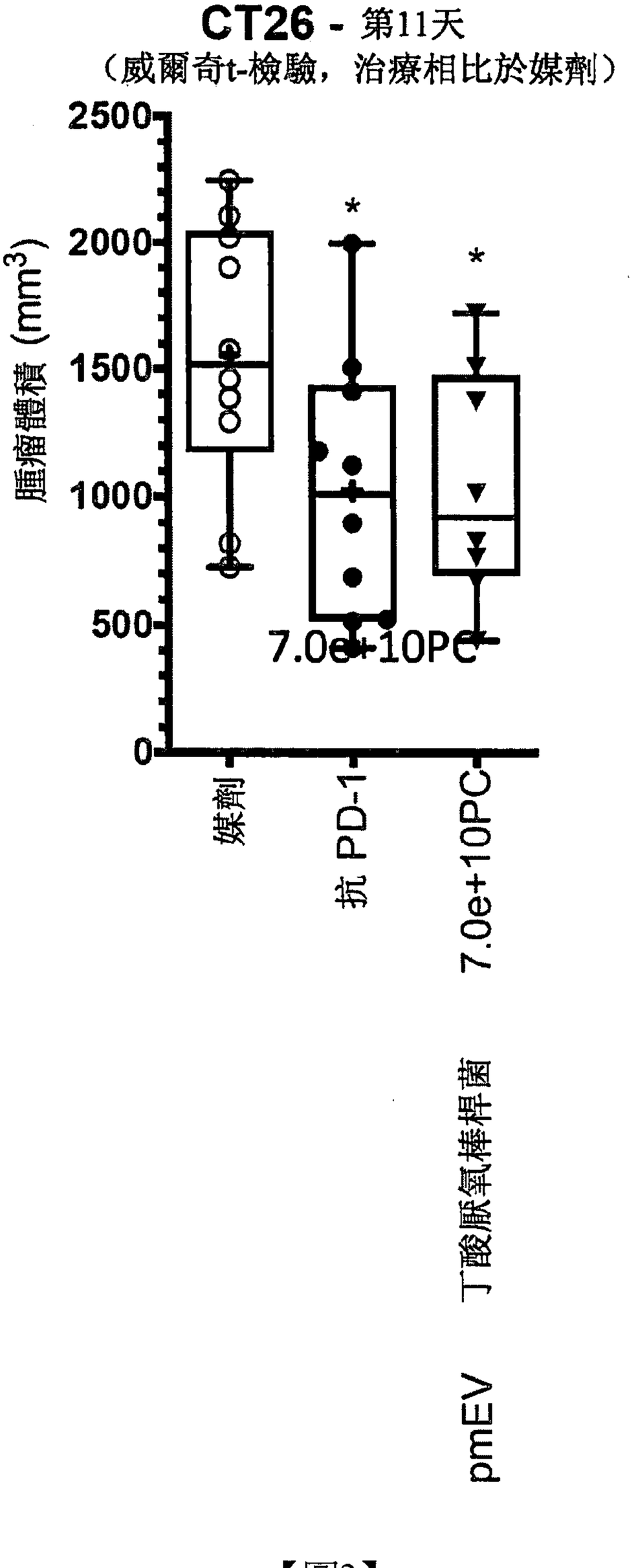
【請求項74】 如請求項69至73中任一項所述之方法，其中該pmEV包含約5 mg至約900 mg的總蛋白。

【請求項75】 一種藉由如請求項69至74中任一項所述之方法製備的藥物組成物。

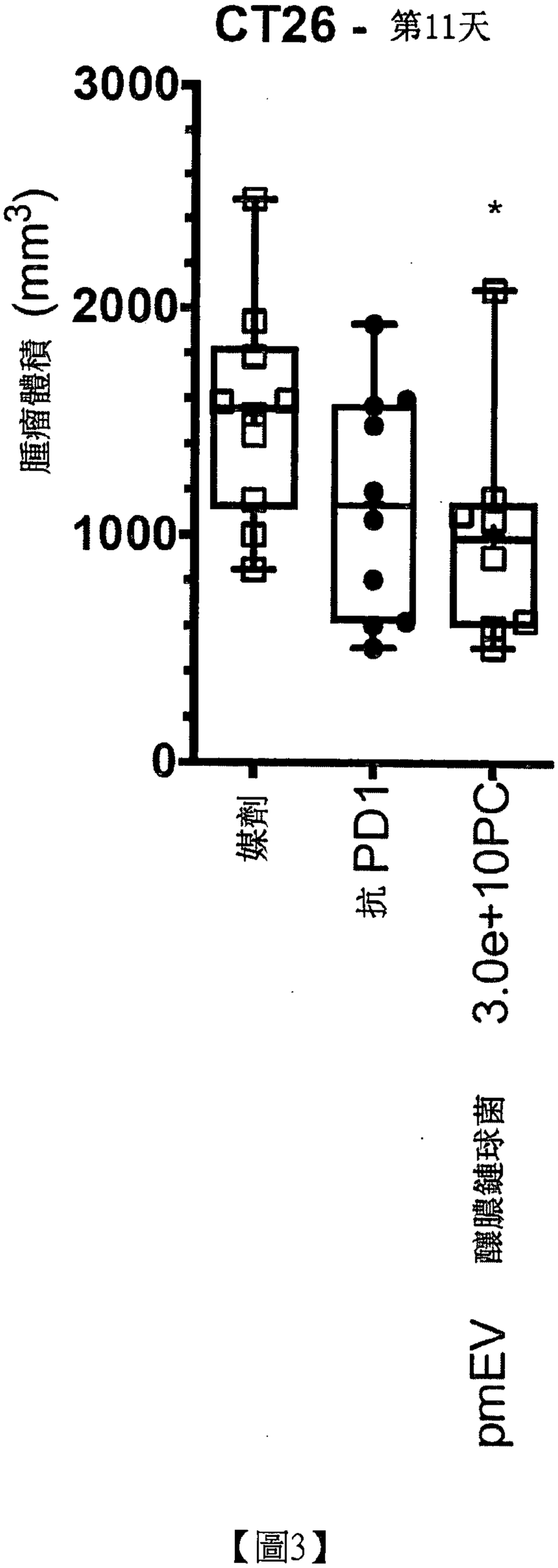
【發明圖式】


CT26 - 第11天
（威爾奇t-檢驗，治療相比於媒劑）
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
*
*
媒劑
抗 PD-1
e+10PC
pmEV 動物雙歧桿菌乳酸亞種 7.0

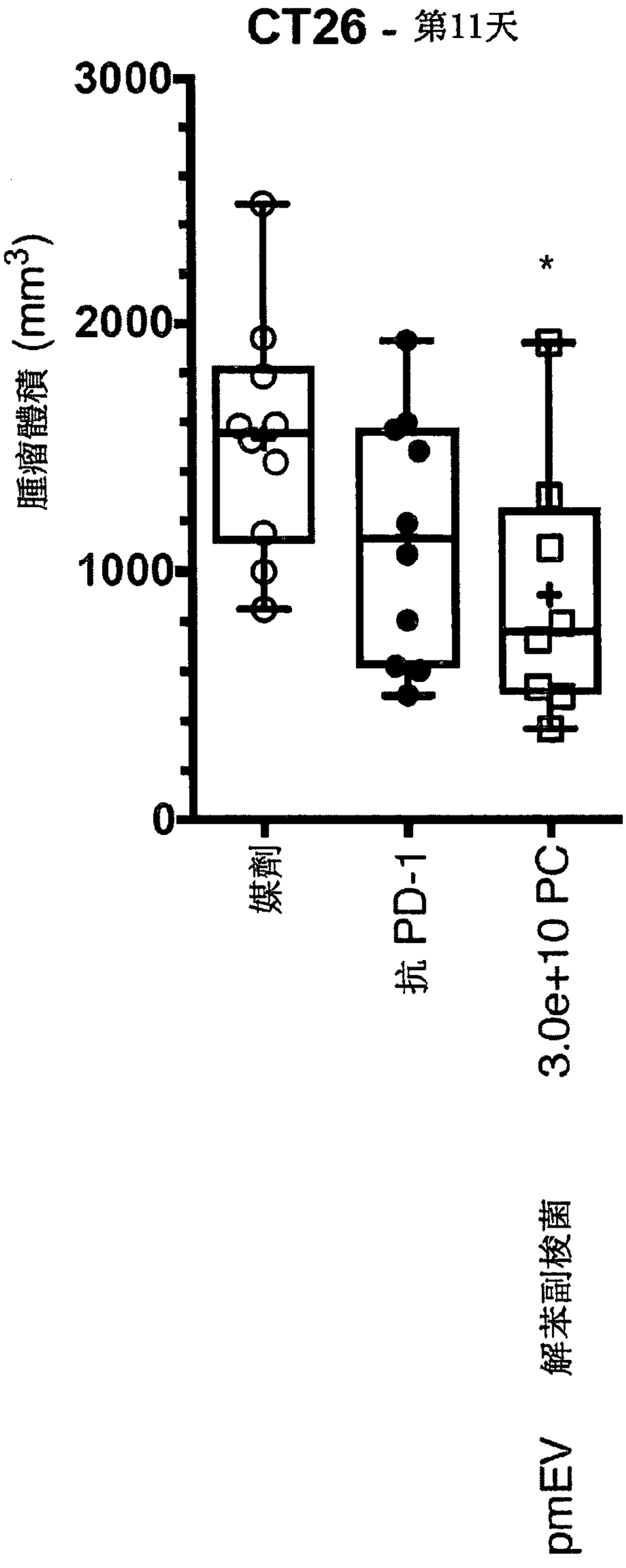
【圖1】


CT26 - 第11天
（威爾奇t-檢驗，治療相比於媒劑）
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
*
7.0e+10PC
媒劑
抗 PD-1
pmEV
丁酸厭氧棒桿菌
7.0e+10PC

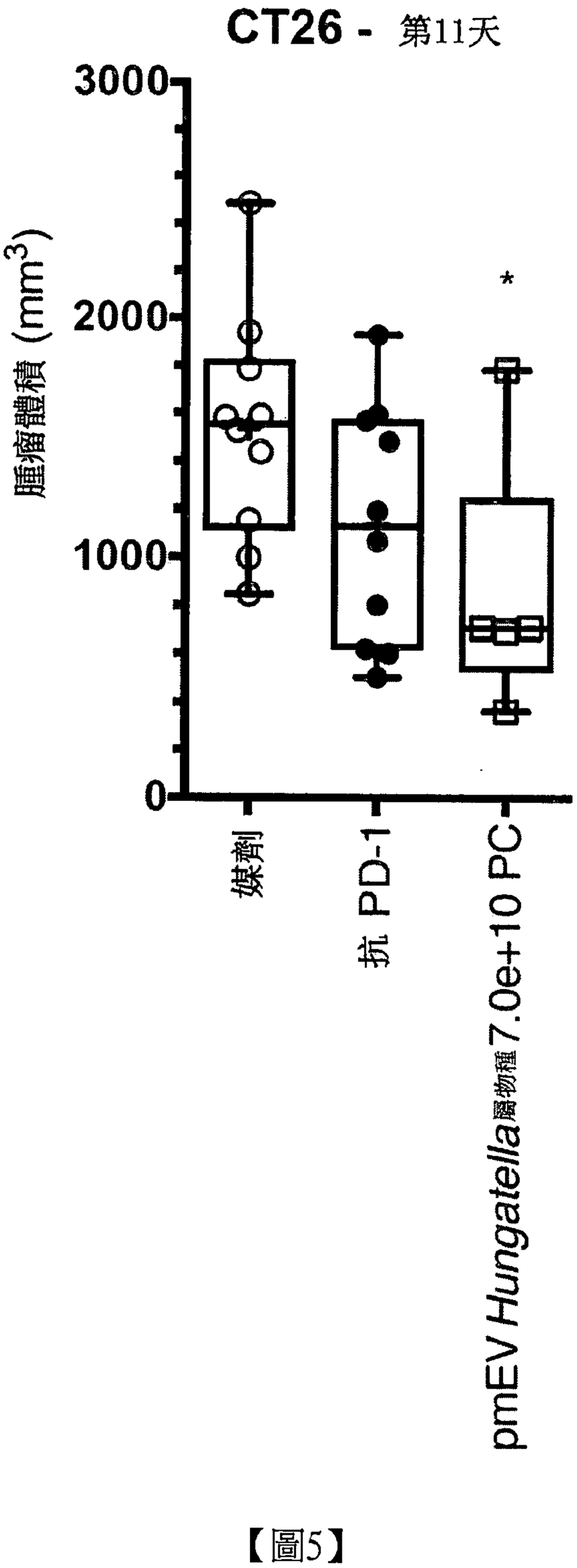
【圖2】


CT26 - 第11天
腫瘤體積 (mm3)
3000
2000
1000
0
媒劑
抗 PD1
+10PC
pmEV
釀膿鏈球菌
3.0e
*

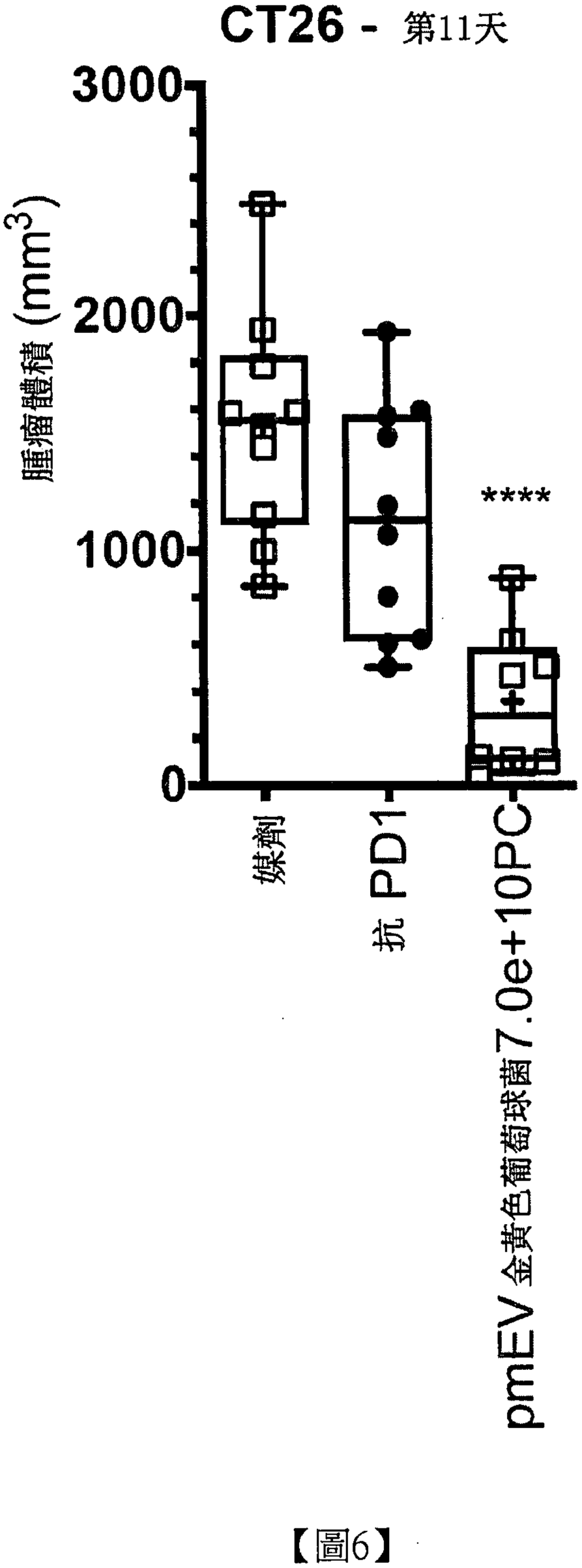
【圖3】



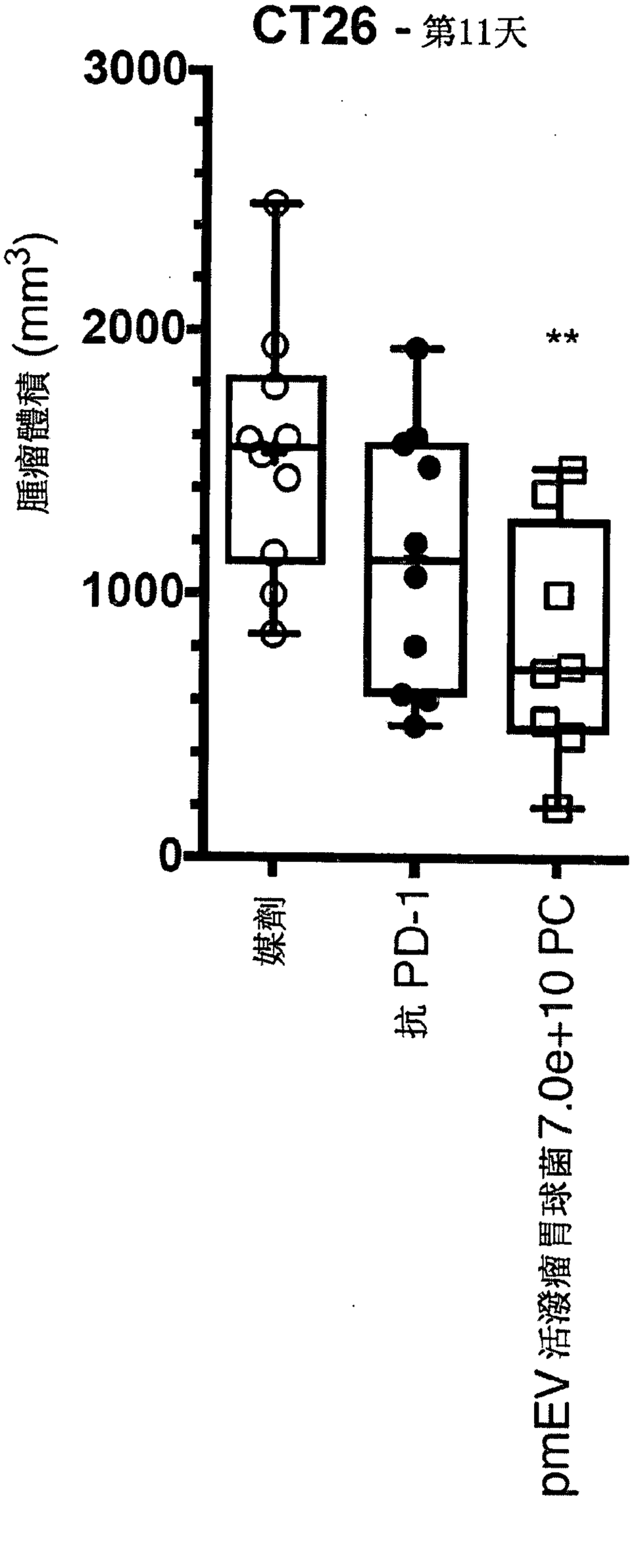
【圖4】


CT26 - 第11天
腫瘤體積 (mm3)
3000
2000
1000
0
*
媒劑
PD-1
0 PC
抗
pmEV Hungatella屬物種 7.0e+1

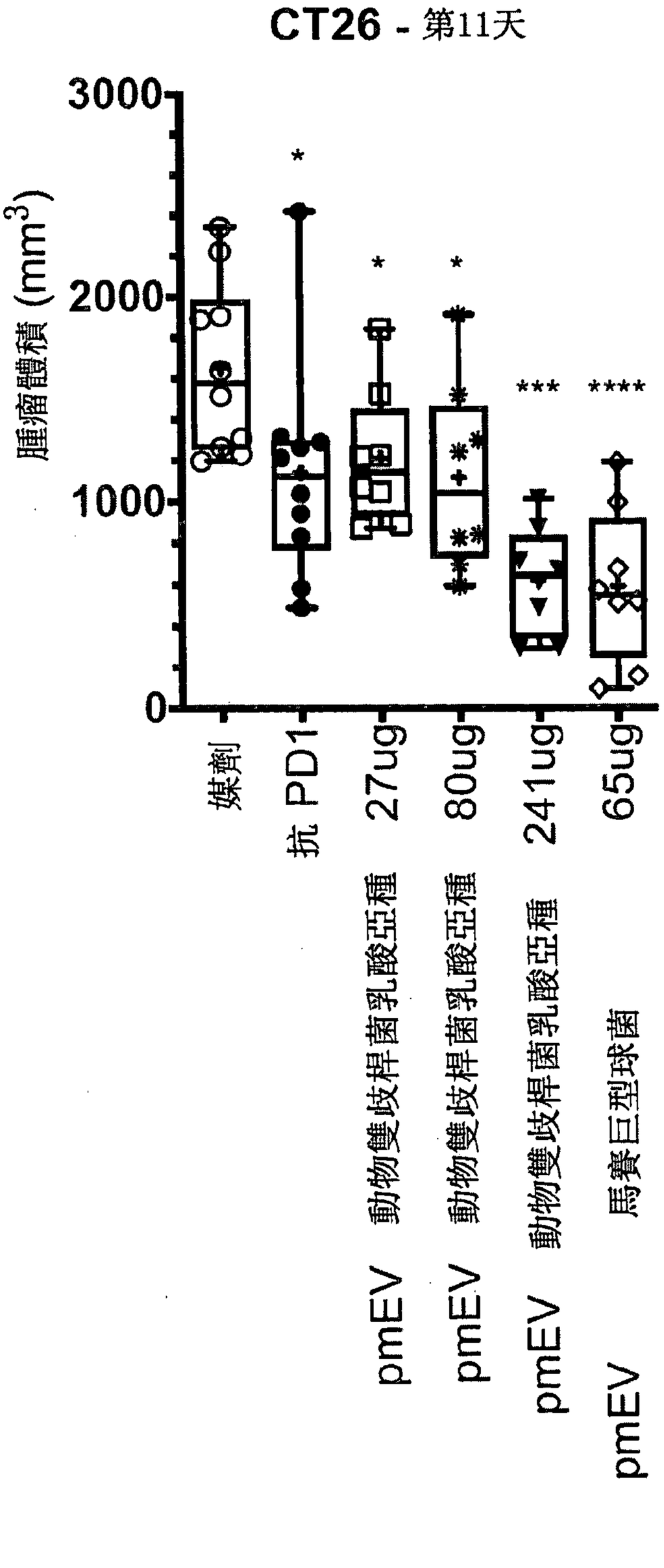
【圖5】


CT26 - 第11天
腫瘤體積 (mm3)
3000
2000
1000
0
****
媒劑
抗 PD1
pmEV 金黃色葡萄球菌 7.0e
+10PC

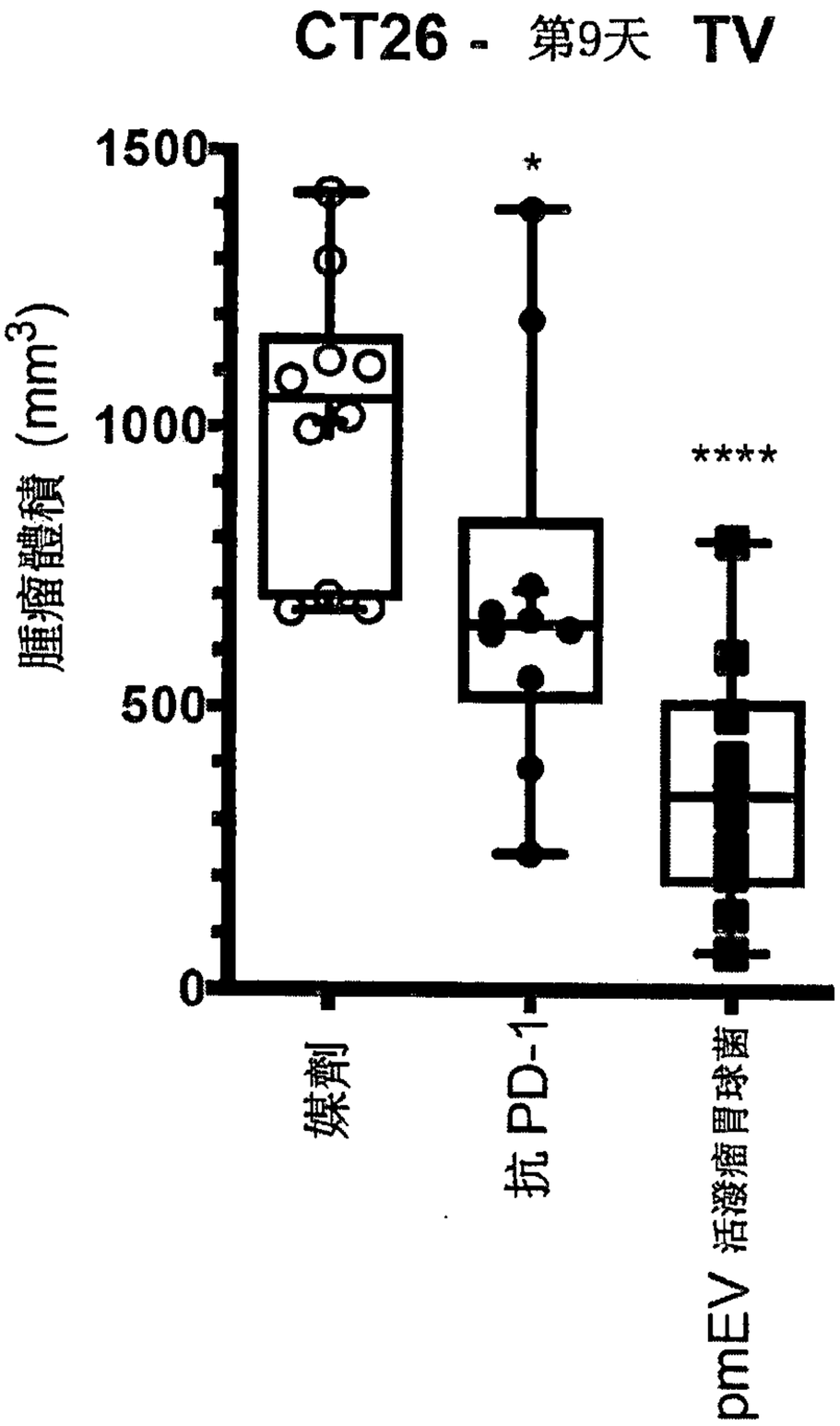
【圖6】


CT26 - 第11天
3000
2000
1000
0
腫瘤體積 (mm3)
**
媒劑
抗 PD-1
pmEV 活潑瘤胃球菌 7.0e+10 PC

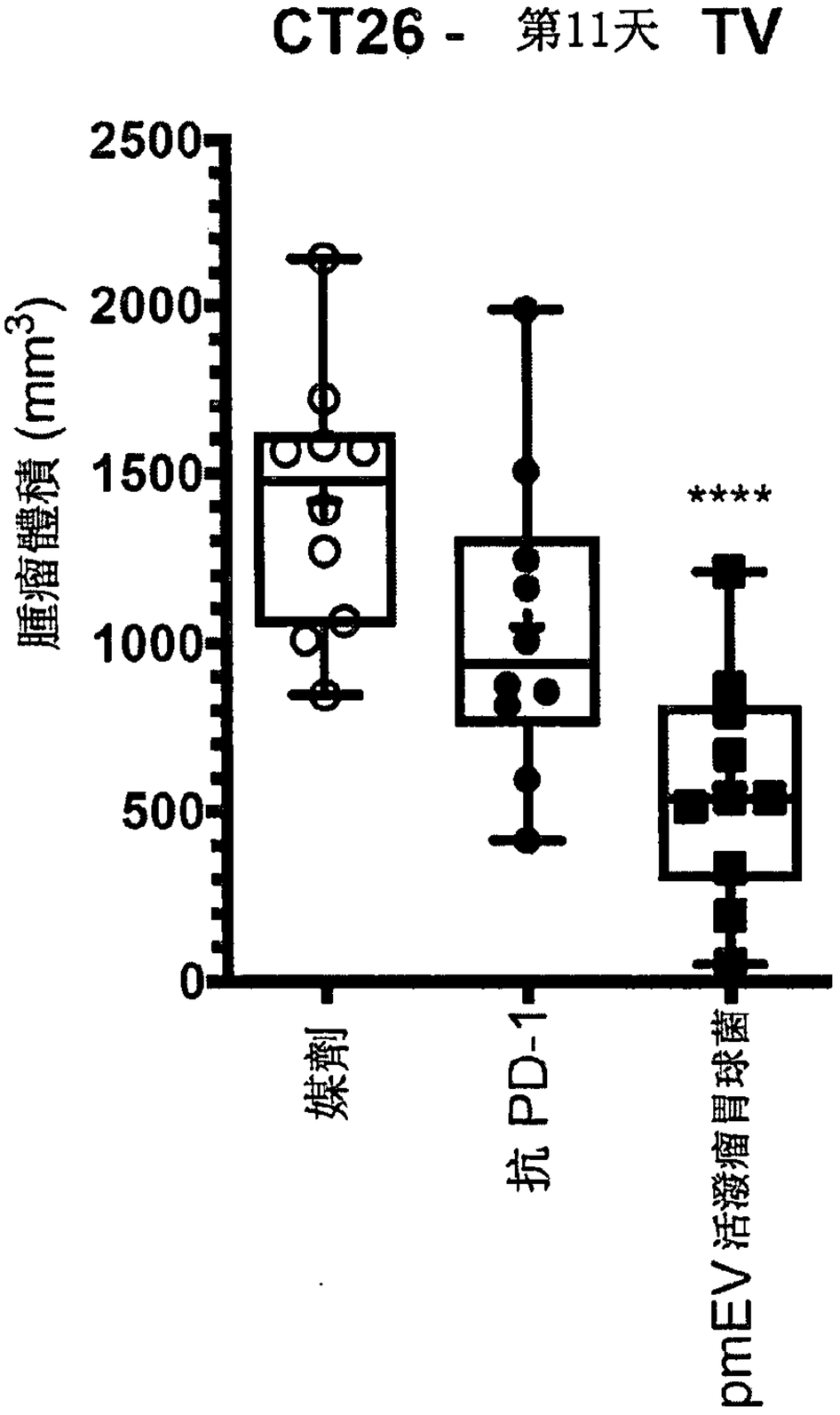
【圖7】


CT26 - 第11天
腫瘤體積 (mm3)
3000
2000
1000
0
媒劑
抗 PD1
27ug
80ug
241ug
65ug
pmEV 動物雙歧桿菌乳酸亞種
pmEV 動物雙歧桿菌乳酸亞種
pmEV 動物雙歧桿菌乳酸亞種
pmEV 馬賽巨型球菌

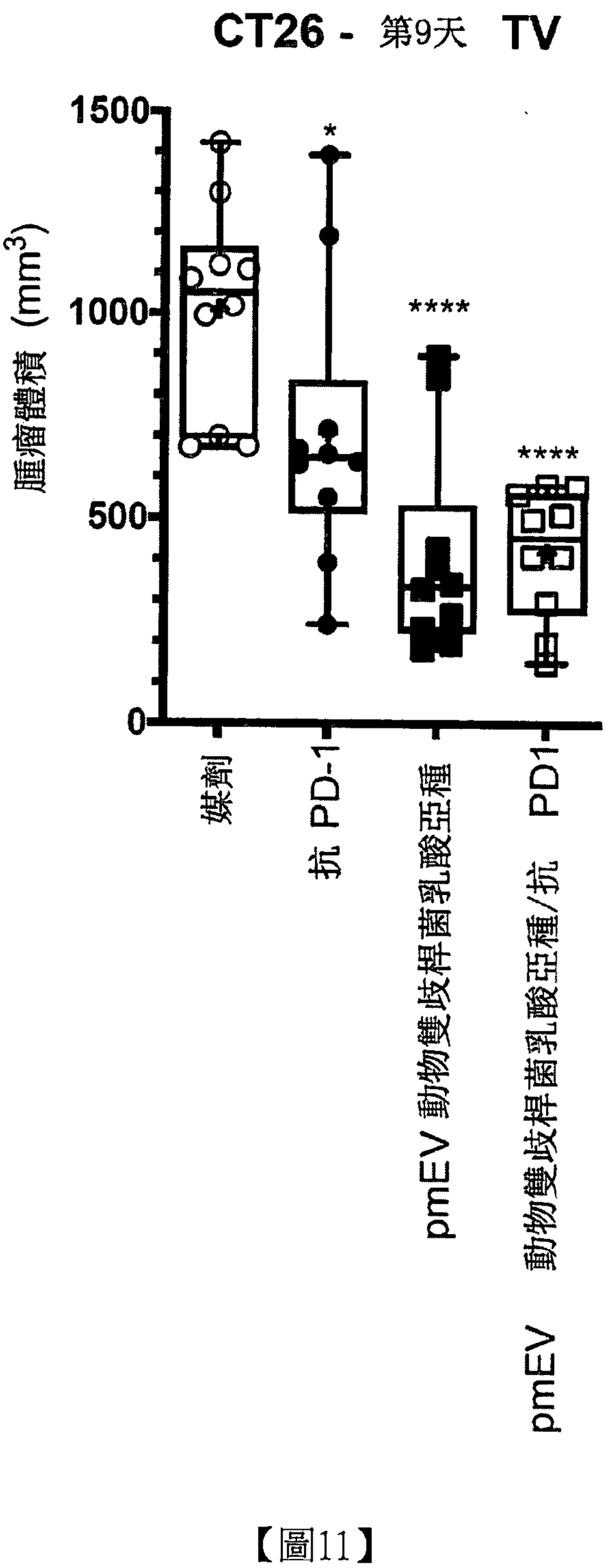
【圖8】



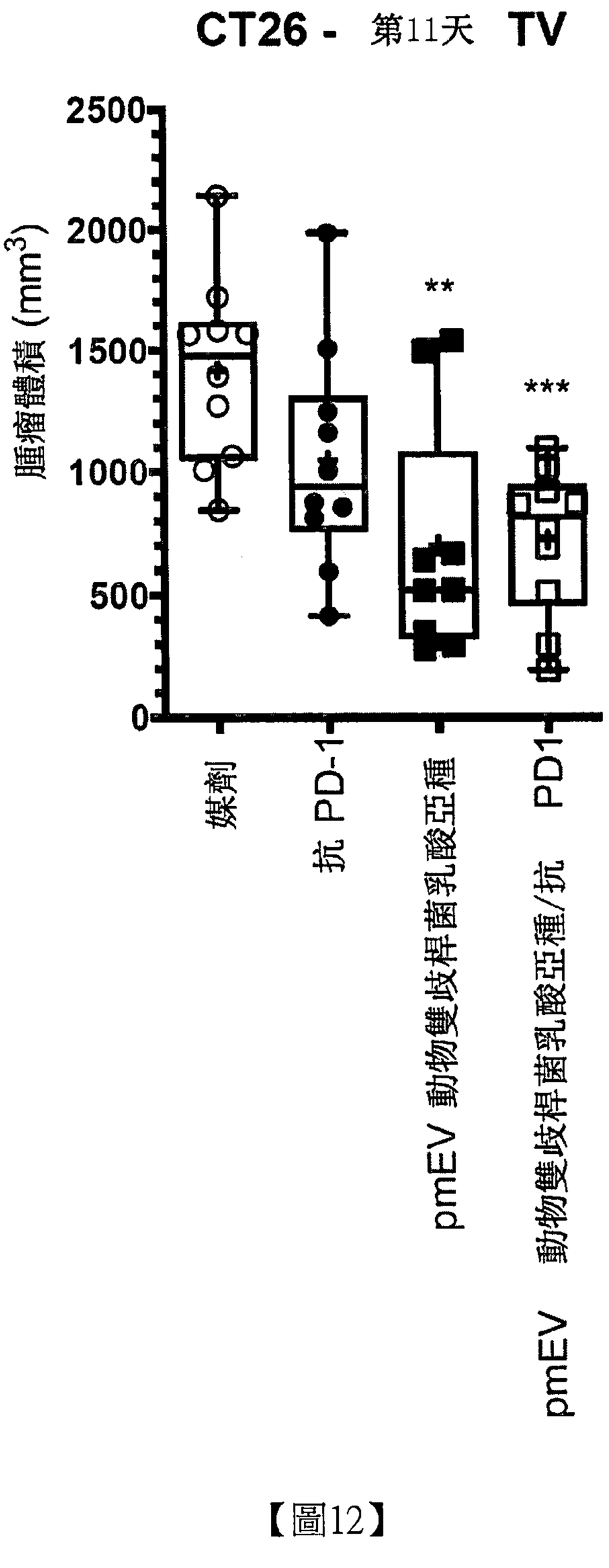
【圖9】


CT26 - 第11天 TV
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
****
媒劑
抗 PD-1
pmEV 活減瘤胃球菌

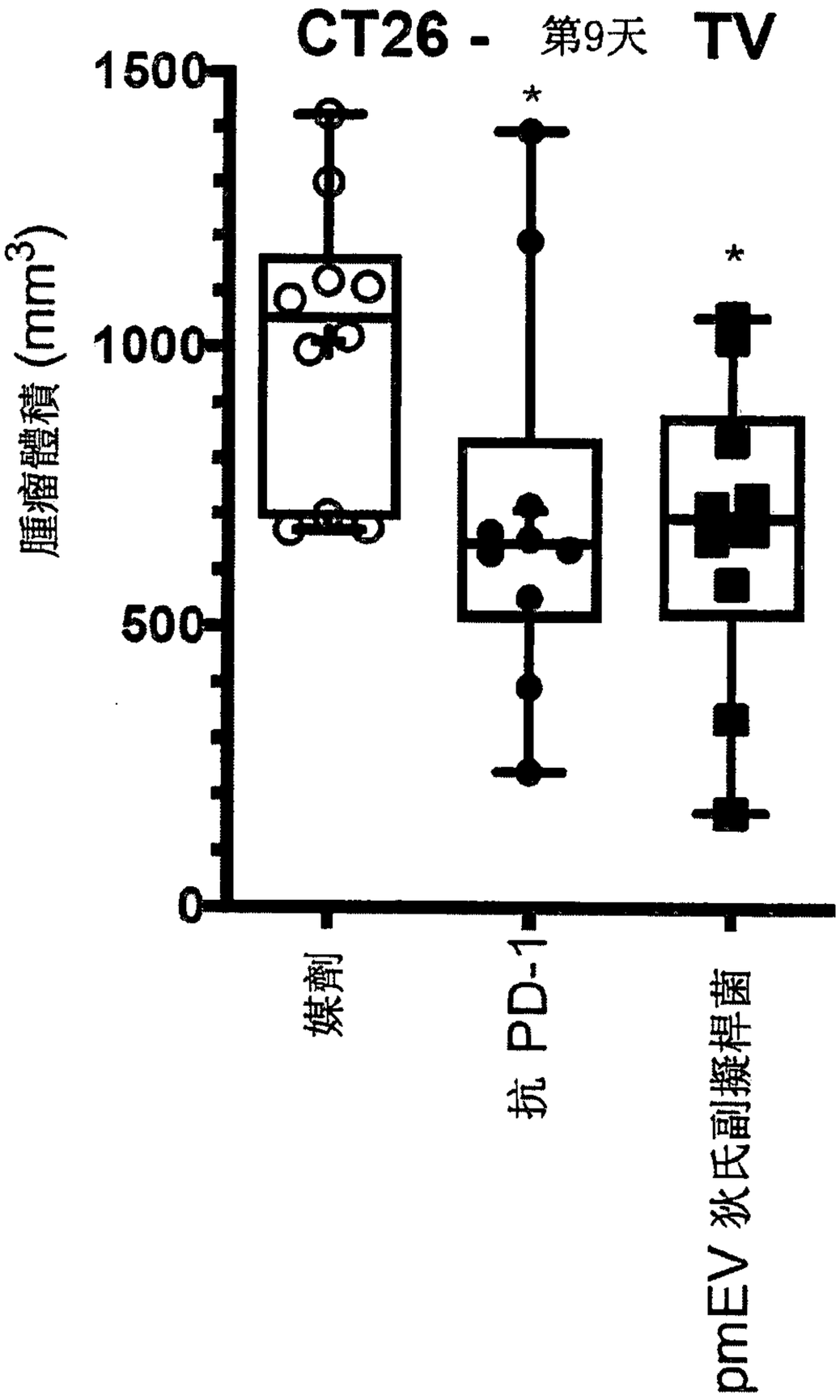
【圖10】


CT26 - 第9天 TV
腫瘤體積 (mm3)
1500
1000
500
0
*
****
****
媒劑
抗 PD-1
pmEV 動物雙歧桿菌乳酸亞種
pmEV 動物雙歧桿菌乳酸亞種/抗 PD1

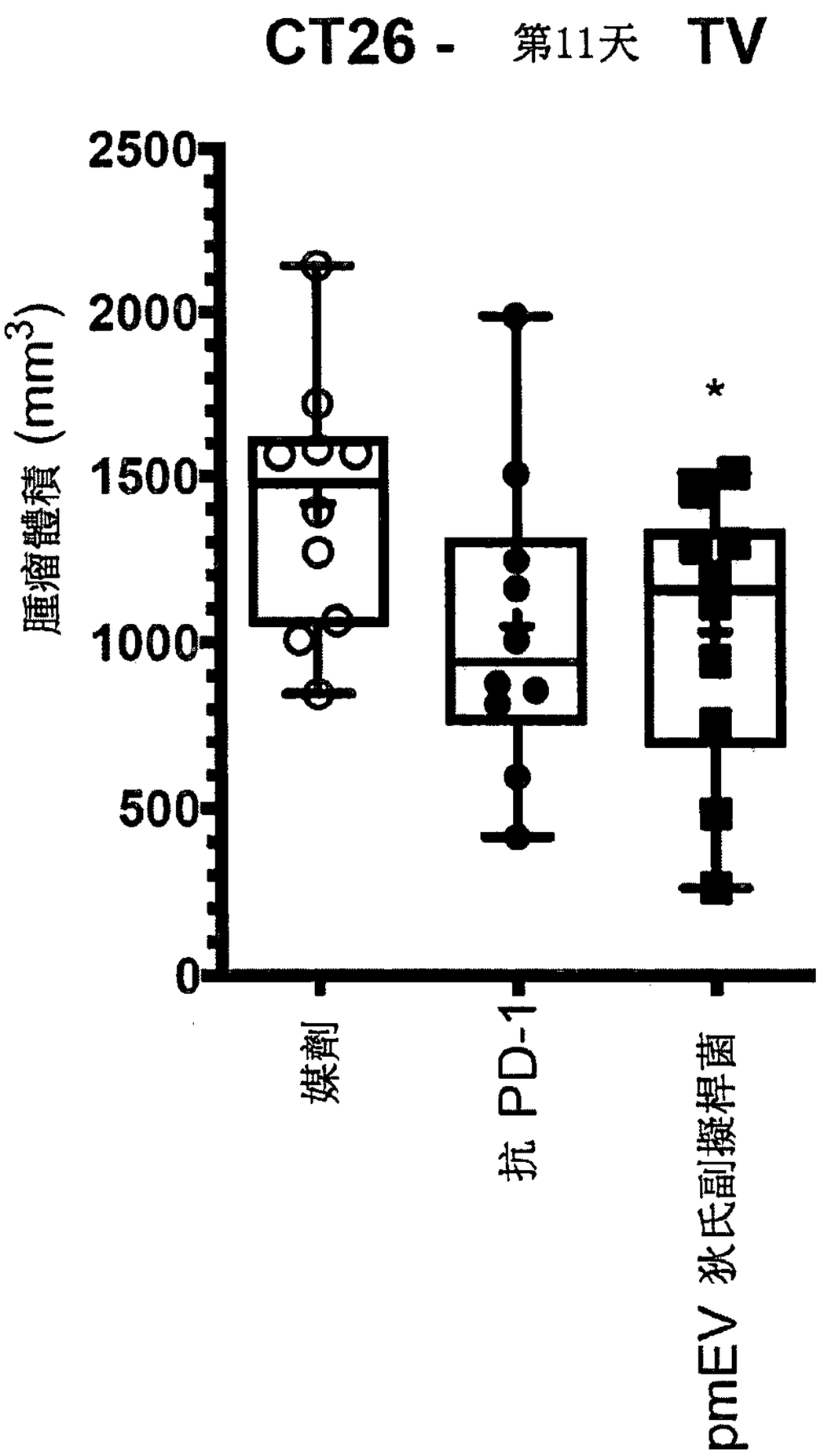
【圖11】


CT26 - 第11天 TV
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
**
***
媒劑
抗 PD-1
pmEV 動物雙歧桿菌乳酸亞種
pmEV 動物雙歧桿菌乳酸亞種/抗 PD1
pmEV

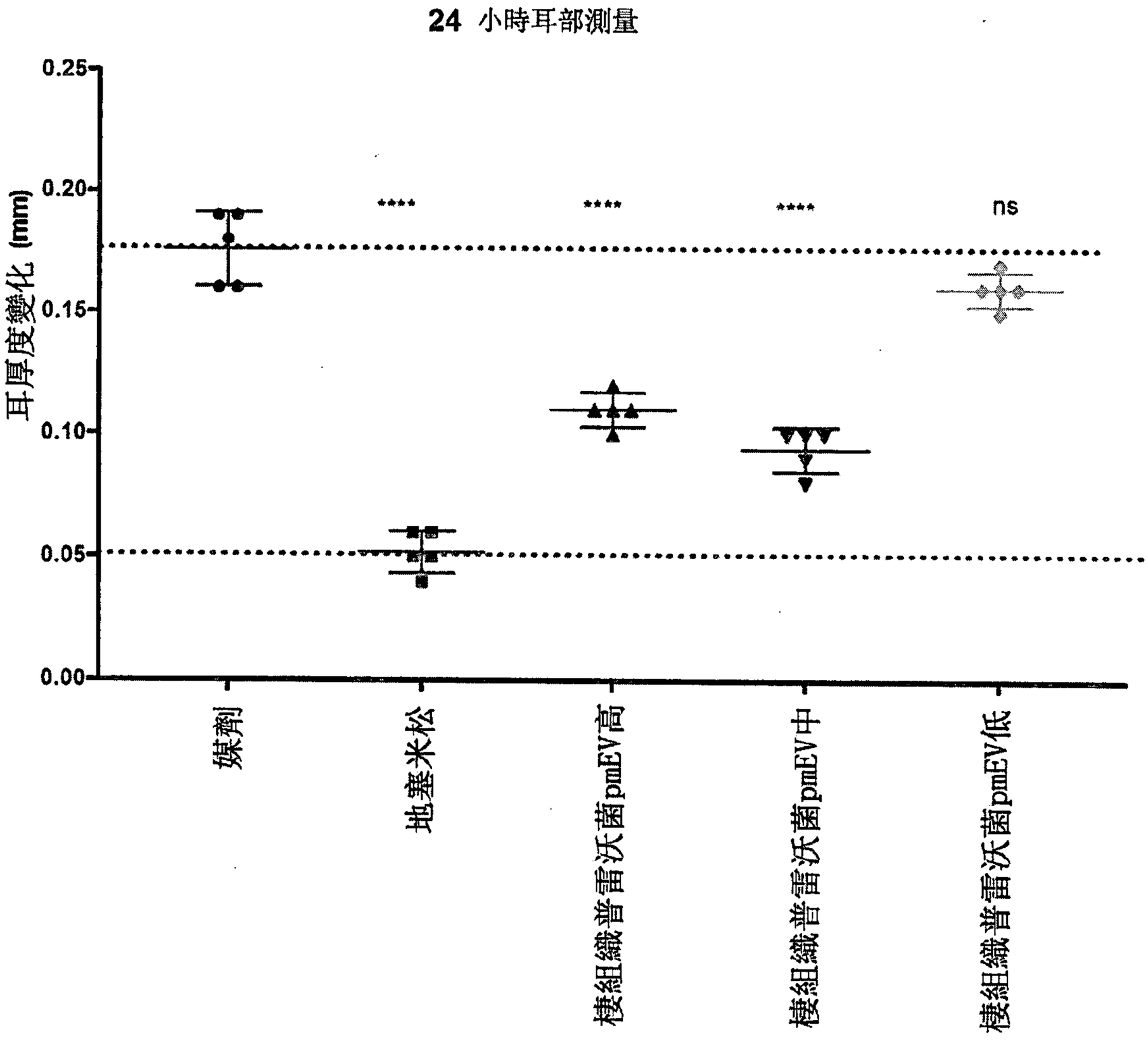
【圖12】



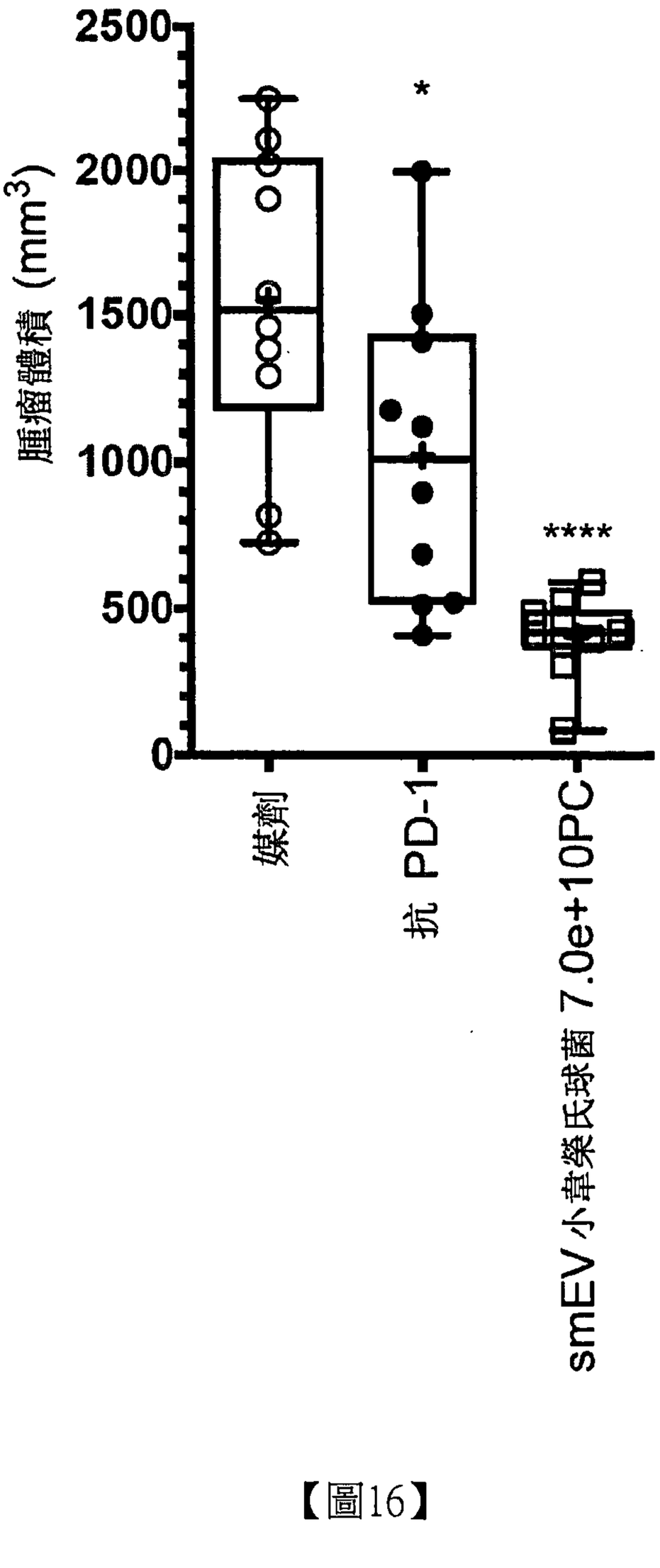
【圖13】


CT26 - 第11天 TV
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
媒劑
抗 PD-1
pmEV 狄氏副擬桿菌
*

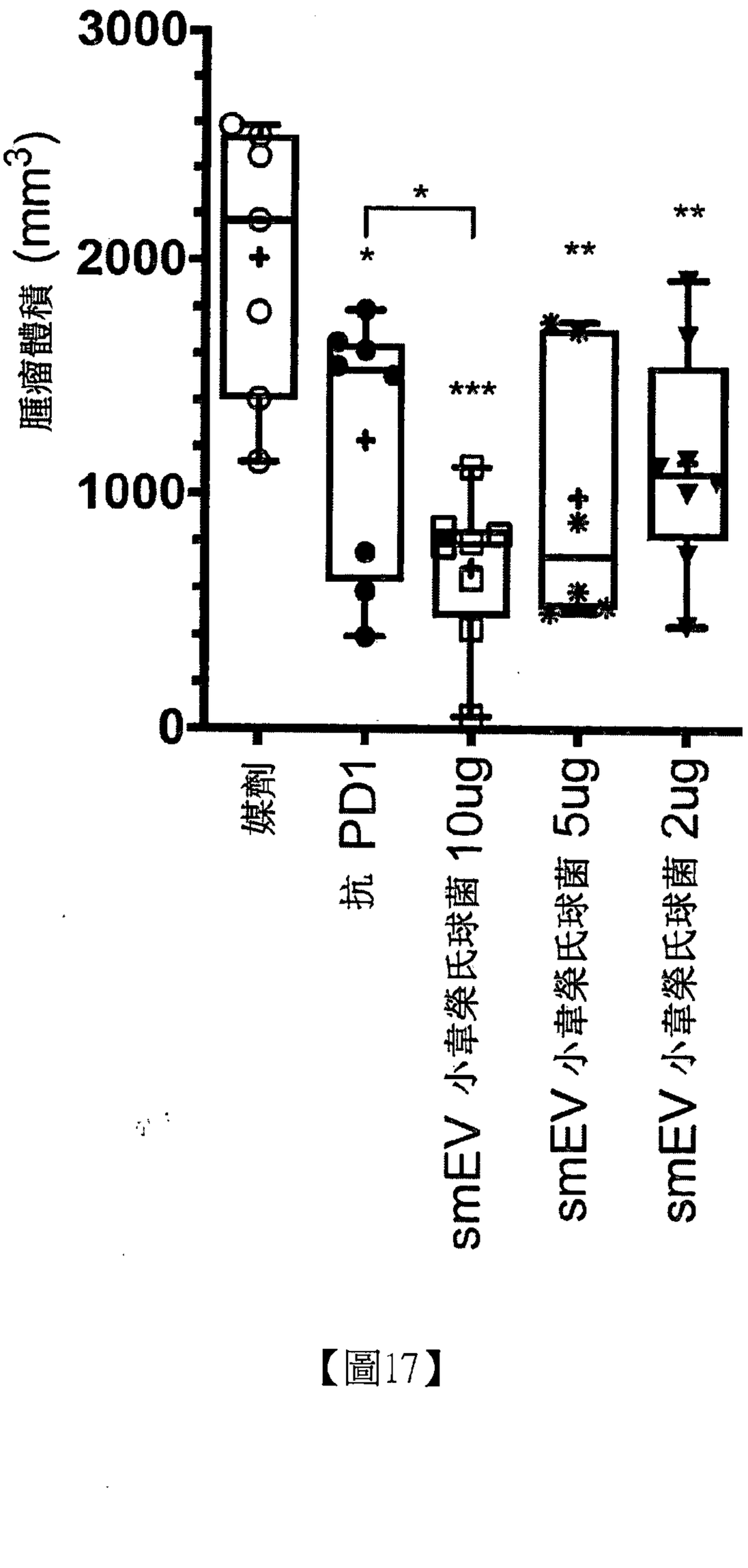
【圖14】


24 小時耳部測量
耳厚度變化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
****
ns
媒劑
地塞米松
棲組織普雷沃菌pmEV高
棲組織普雷沃菌pmEV中
棲組織普雷沃菌pmEV低

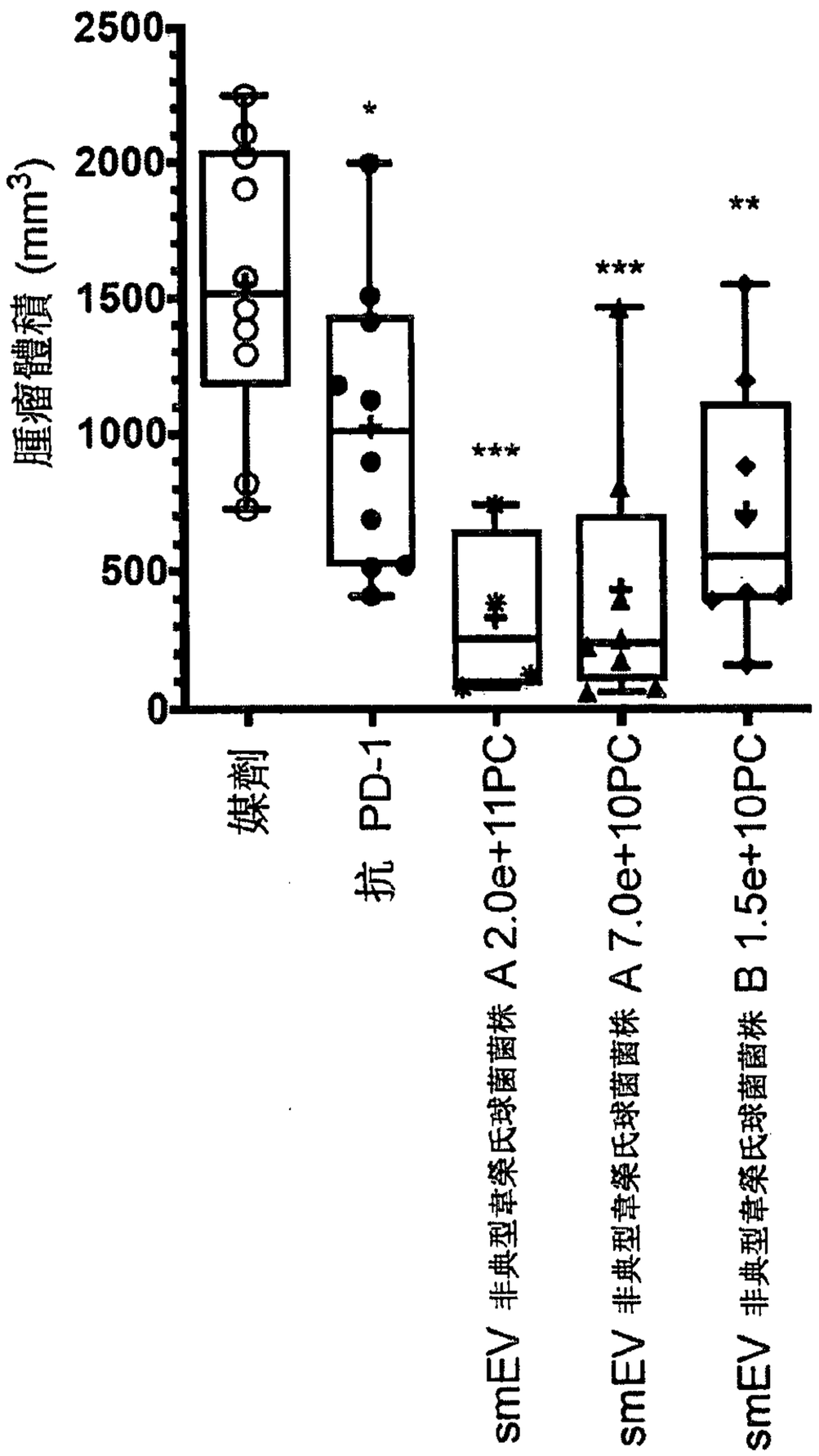
【圖15】


CT26 - 第11天
（威爾奇t-檢驗，治療相比於媒劑）
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
****
媒劑
抗-PD-1
smEV 小韋榮氏球菌 7.0e+10PC

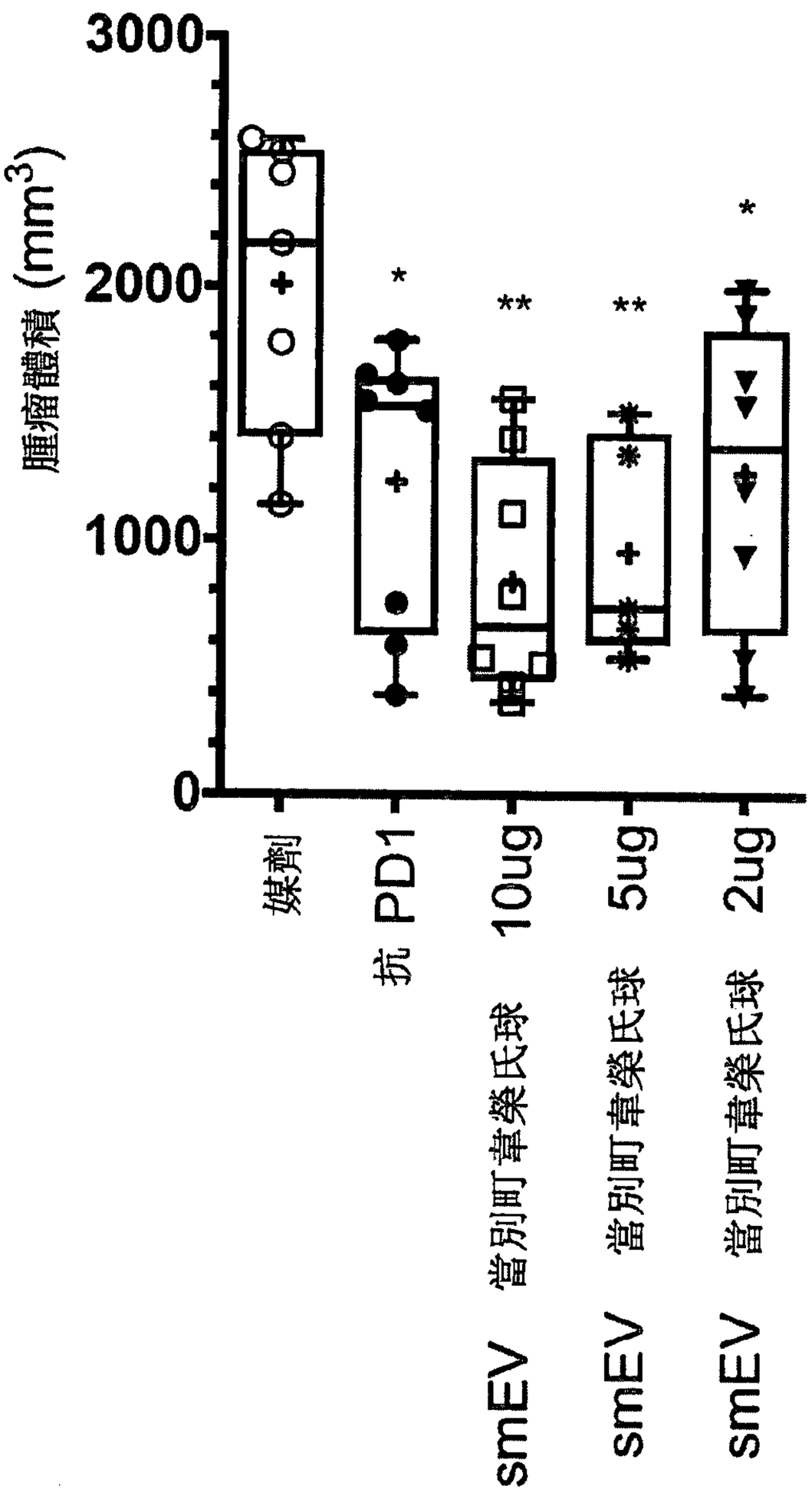
【圖16】


CT26 - 第11天
腫瘤體積 (mm3)
3000
2000
1000
0
*
**
***
媒劑
抗 PD1
smEV 小韋榮氏球菌 10ug
smEV 小韋榮氏球菌 5ug
smEV 小韋榮氏球菌 2ug

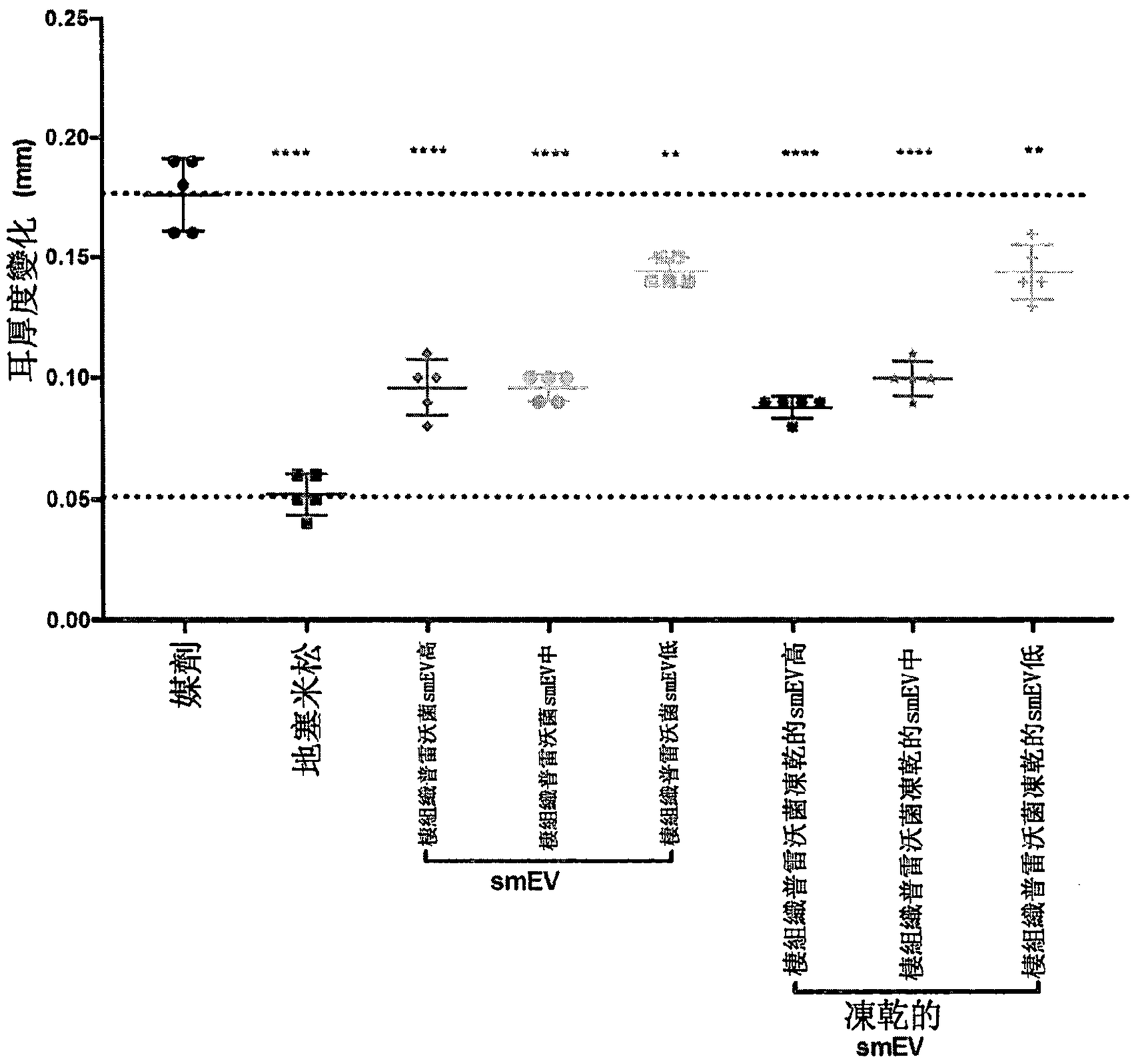
【圖17】


CT26 - 第11天
（威爾奇t-檢驗，治療相比於媒劑）
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
**
***
***
媒劑
抗 PD-1
A 2.0e+11PC
A 7.0e+10PC
B 1.5e+10PC
smEV 非典型韋榮氏球菌菌株
smEV 非典型韋榮氏球菌菌株
smEV 非典型韋榮氏球菌菌株

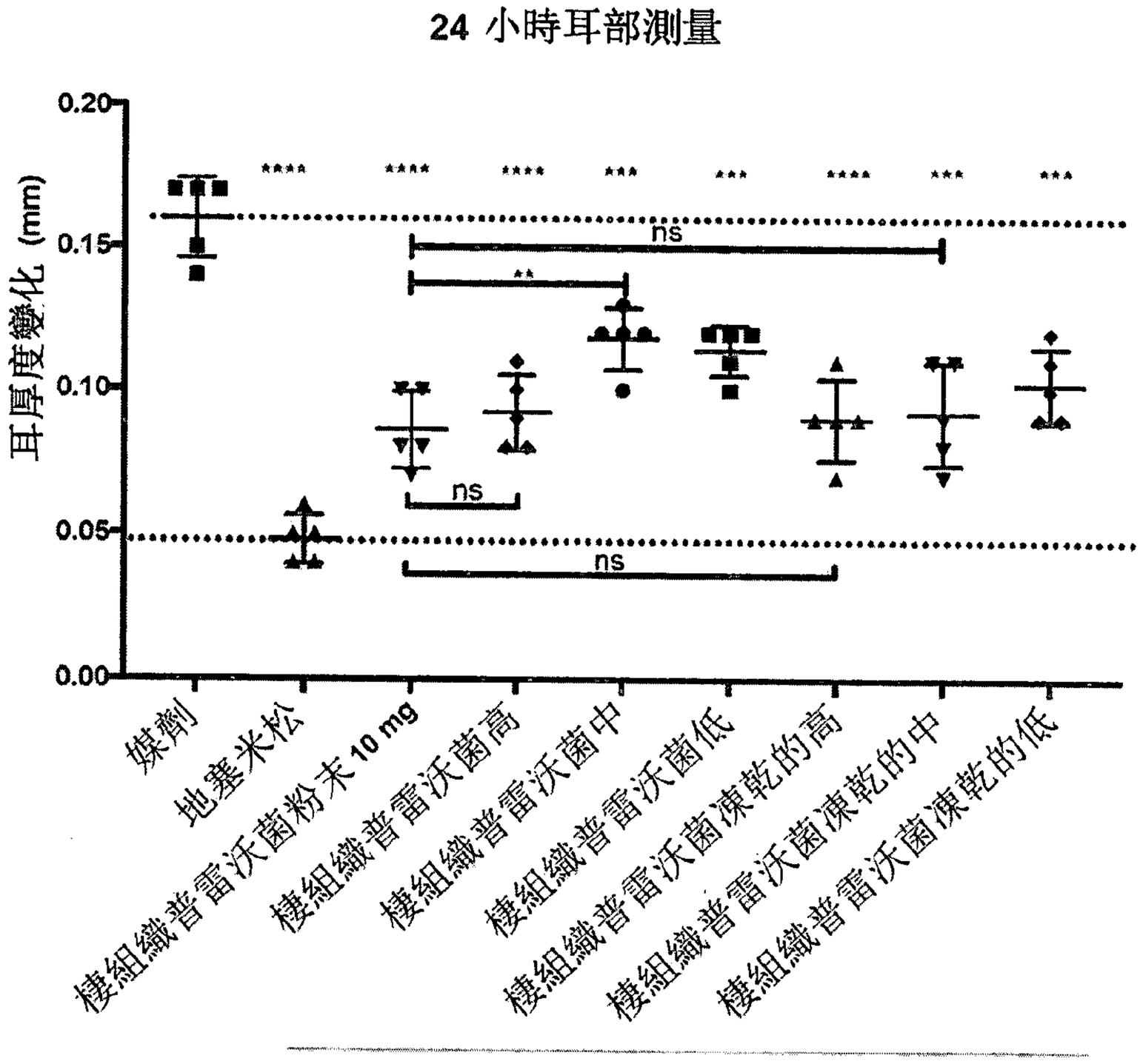
【圖18】


CT26 - 第11天
腫瘤體積 (mm3)
3000
2000
1000
0
媒劑
PD1
10ug
5ug
2ug
抗
smEV 當別町韋榮氏球
smEV 當別町韋榮氏球
smEV 當別町韋榮氏球
*
*
**
**
*

【圖19】

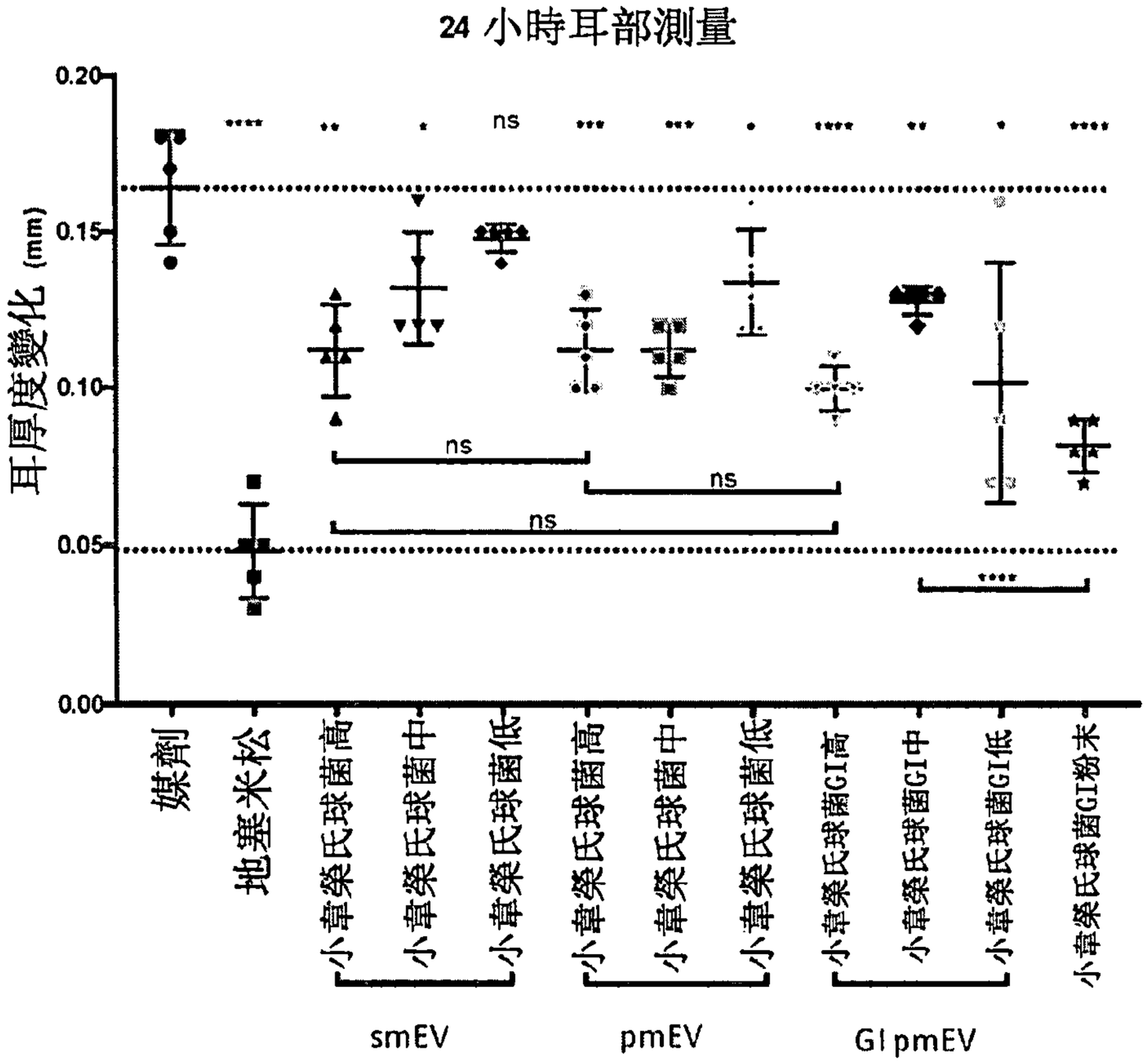

24 小時耳部測量
耳厚度變化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
****
**
****
****
**
媒劑
地塞米松
棲組織普雷沃菌smEV高
棲組織普雷沃菌 smEV中
棲組織普雷沃菌smEV低
smEV
棲組織普雷沃菌凍乾的smEV高
棲組織普雷沃菌凍乾的smEV中
棲組織普雷沃菌凍乾的smEV低
凍乾的
smEV

【圖20】

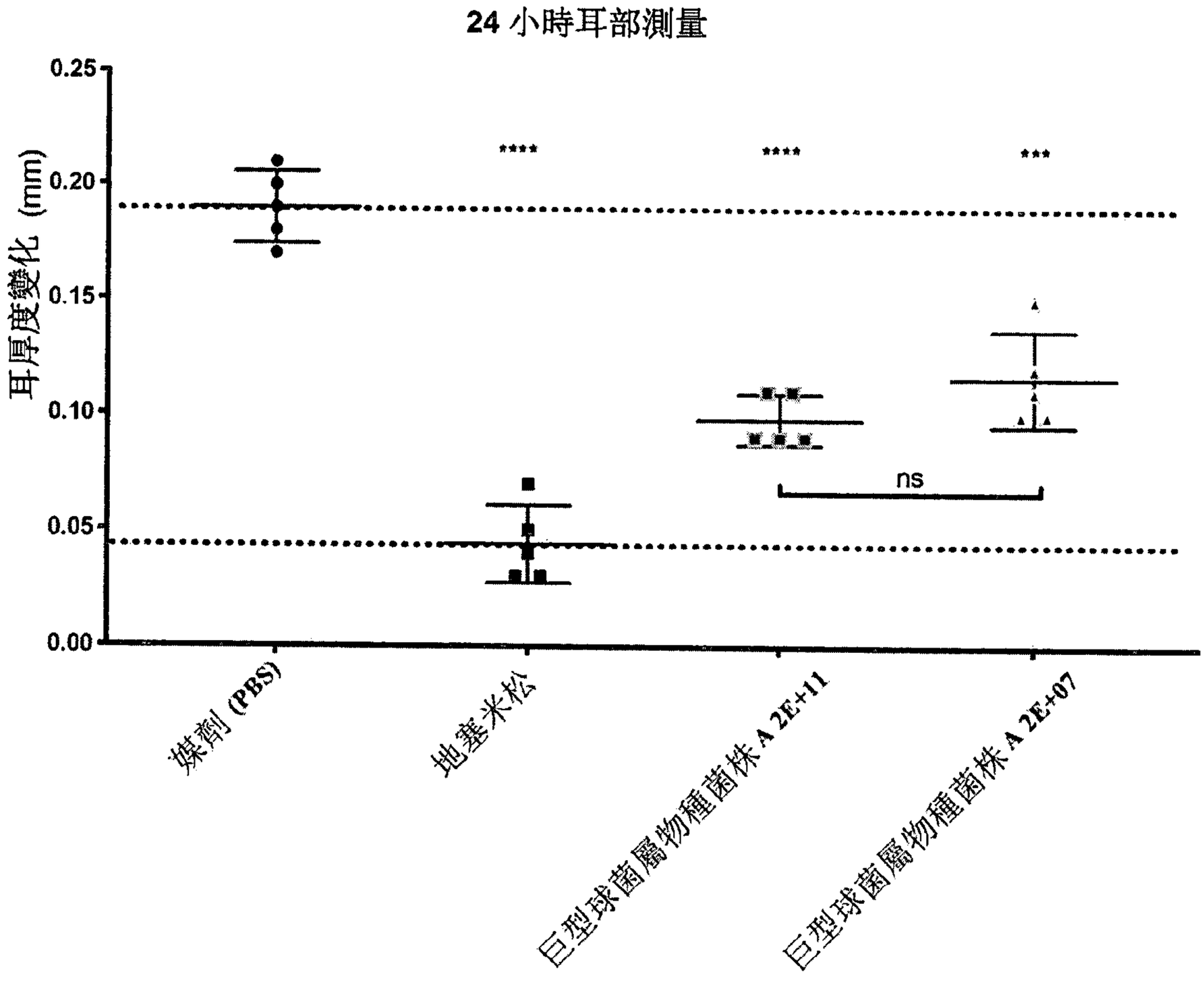

24 小時耳部測量
耳厚度變化 (mm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
****
***
***
****
***
***
ns
**
ns
ns
媒劑
地塞米松
樸組織普雷沃菌粉末 10 mg
樸組織普雷沃菌高
樸組織普雷沃菌中
樸組織普雷沃菌低
樸組織普雷沃菌凍乾的高
樸組織普雷沃菌凍乾的中
樸組織普雷沃菌凍乾的低

pmEV

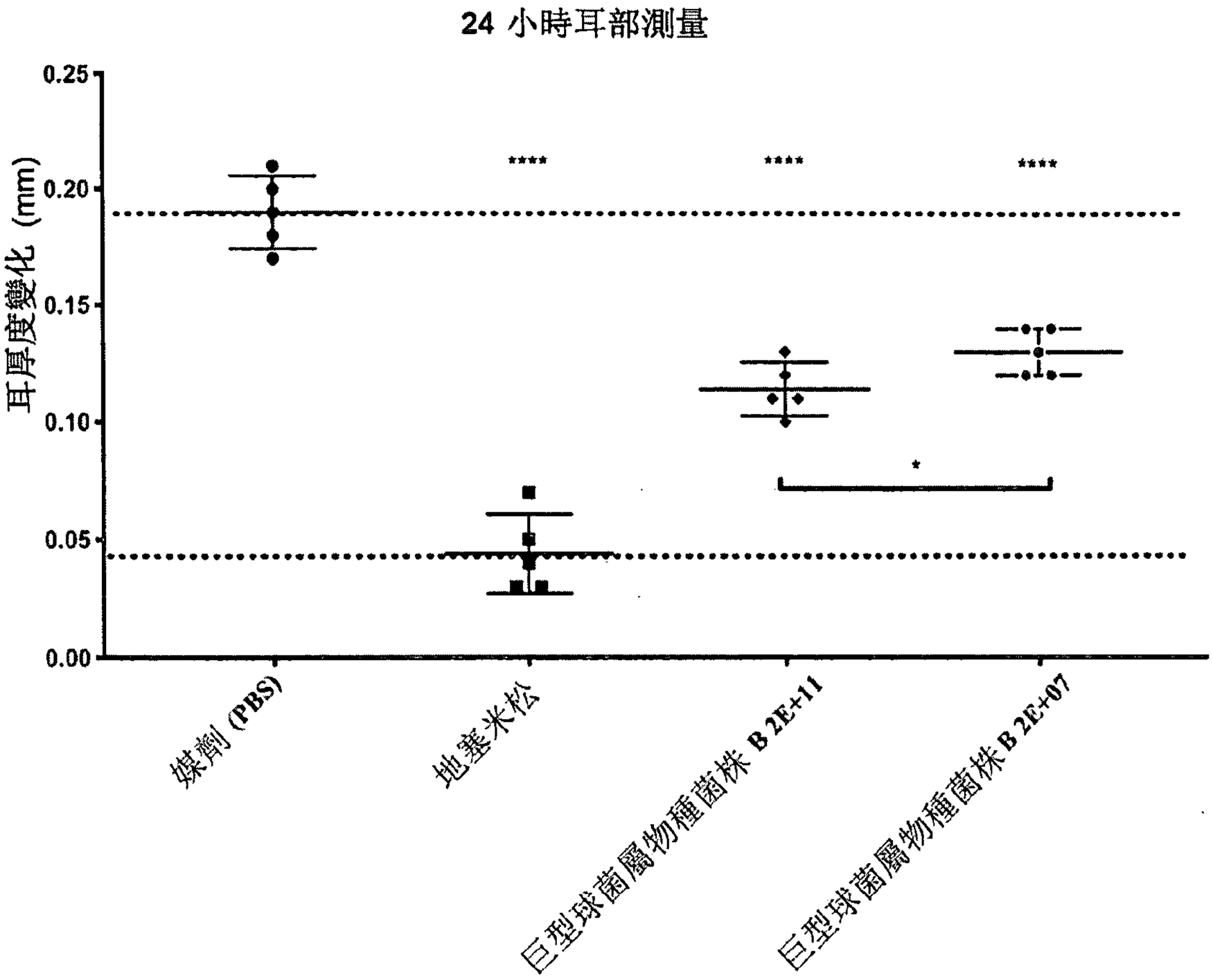
【圖21】


24 小時耳部測量
耳厚度變化 (mm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
**
*
ns
***
***
*
****
**
*
****
ns
ns
ns
ns
媒劑
地塞米松
小韋榮氏球菌高
小韋榮氏球菌中
小韋榮氏球菌低
小韋榮氏球菌高
小韋榮氏球菌中
小韋榮氏球菌低
小韋榮氏球菌GI高
小韋榮氏球菌GI中
小韋榮氏球菌GI低
小韋榮氏球菌GI粉末
smEV
pmEV
GI pmEV

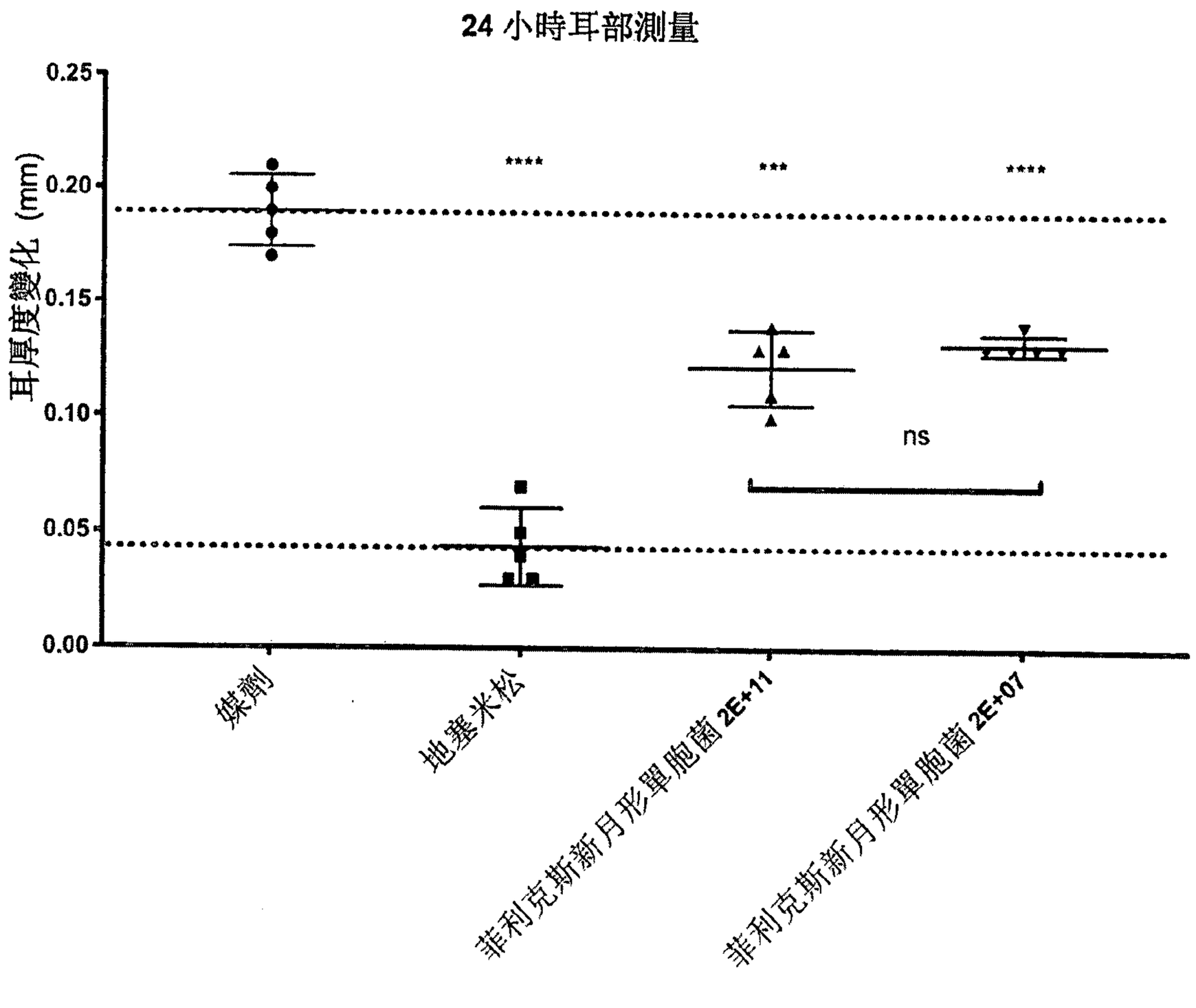
【圖22】


24 小時耳部測量
耳厚度變化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
***
ns
媒劑 (PBS)
地塞米松
巨型球菌屬物種菌株 A 2E+11
巨型球菌屬物種菌株 A 2E+07

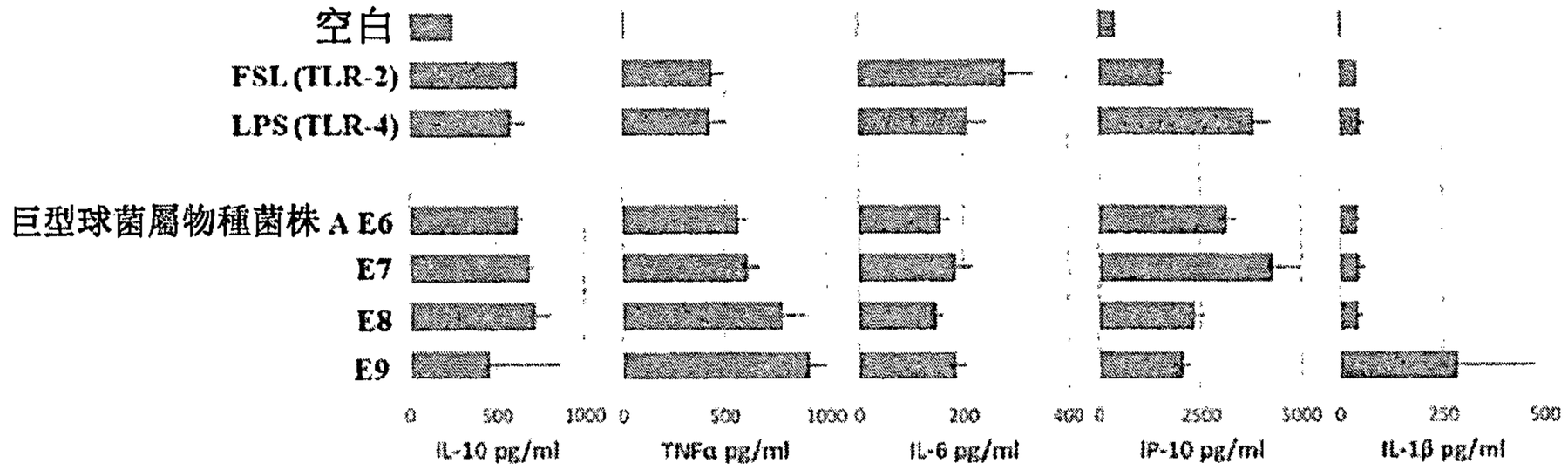
【圖23】


24 小時耳部測量
耳厚度變化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
****
*
媒劑 (PBS)
地塞米松
巨型球菌屬物種菌株 B 2E+11
巨型球菌屬物種菌株 B 2E+07

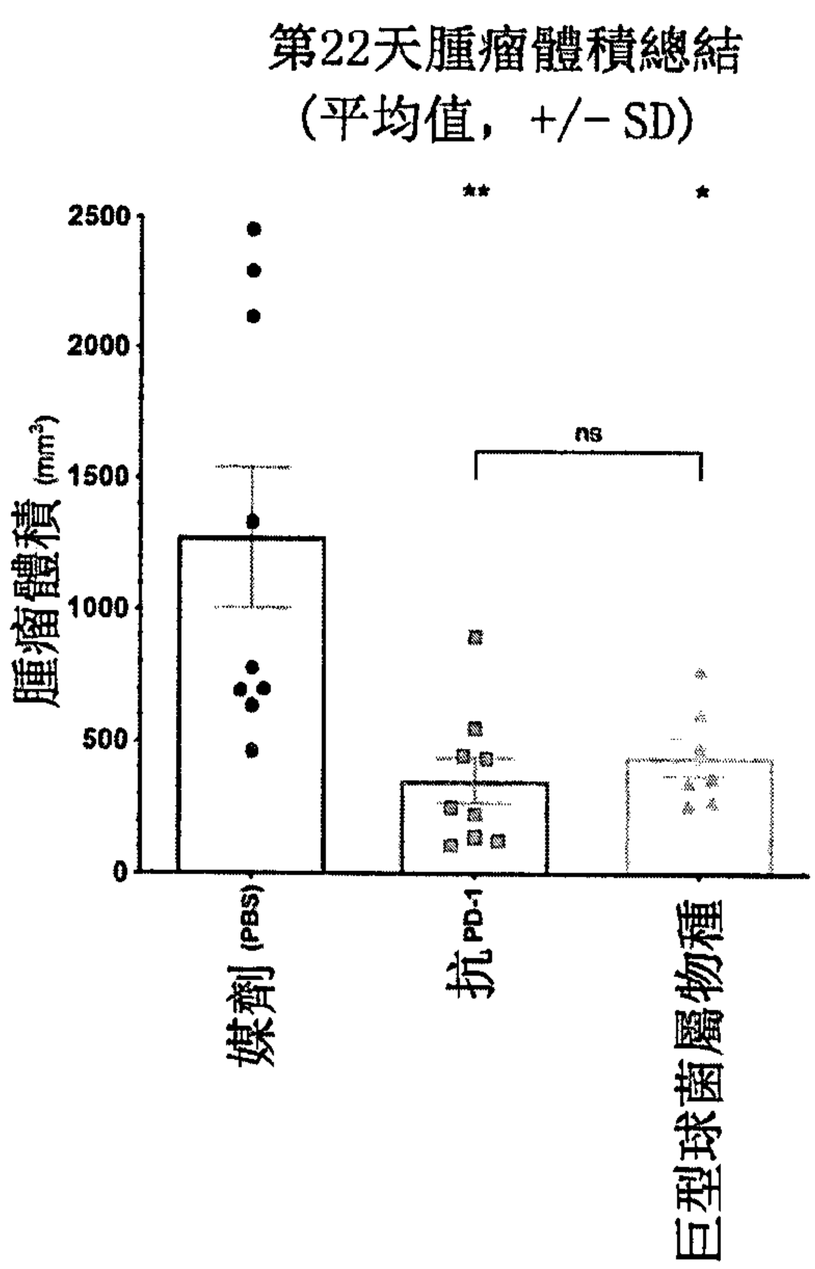
【圖24】


24 小時耳部測量
耳厚度變化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
***
****
ns
媒劑
地塞米松
菲利克斯新月形單胞菌 2E+11
菲利克斯新月形單胞菌 2E+07

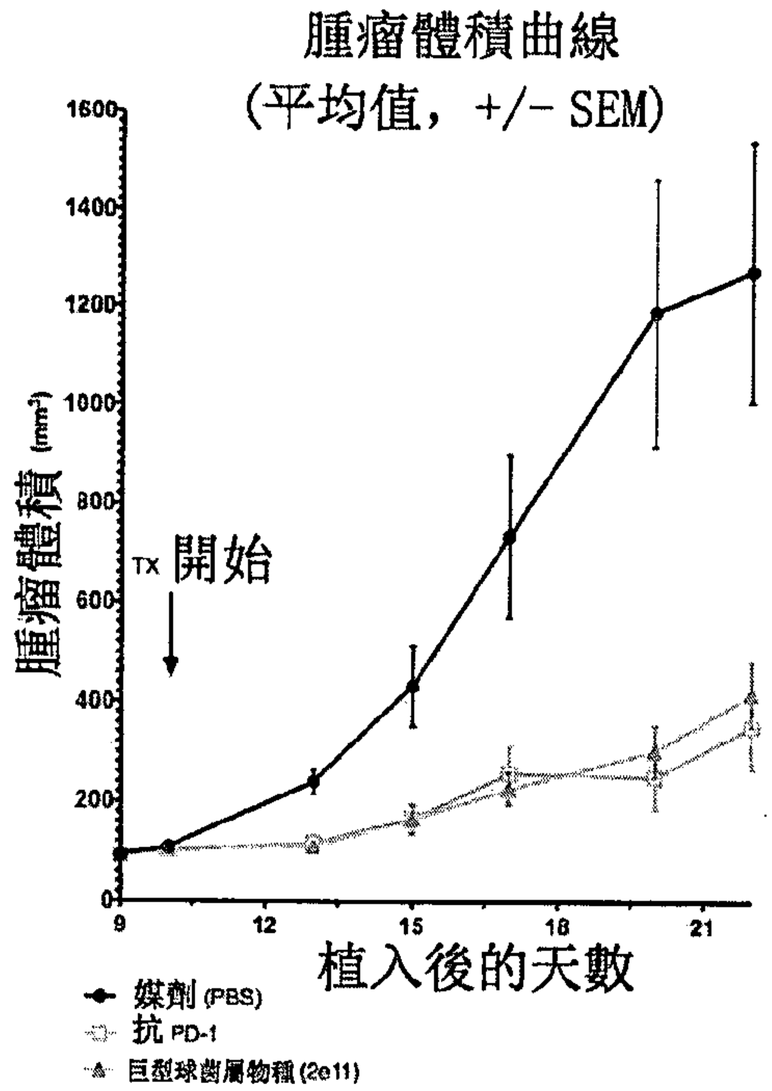
【圖25】


空白
FSL (TLR-2)
LPS (TLR-4)
巨型球菌屬物種菌株 A
E6
E7
E8
E9
0 500 1000
IL-10 pg/ml
0 500 1000
TNFα pg/ml
0 200 400
IL-6 pg/ml
0 2500 5000
IP-10 pg/ml
0 250 500
IL-1β pg/ml

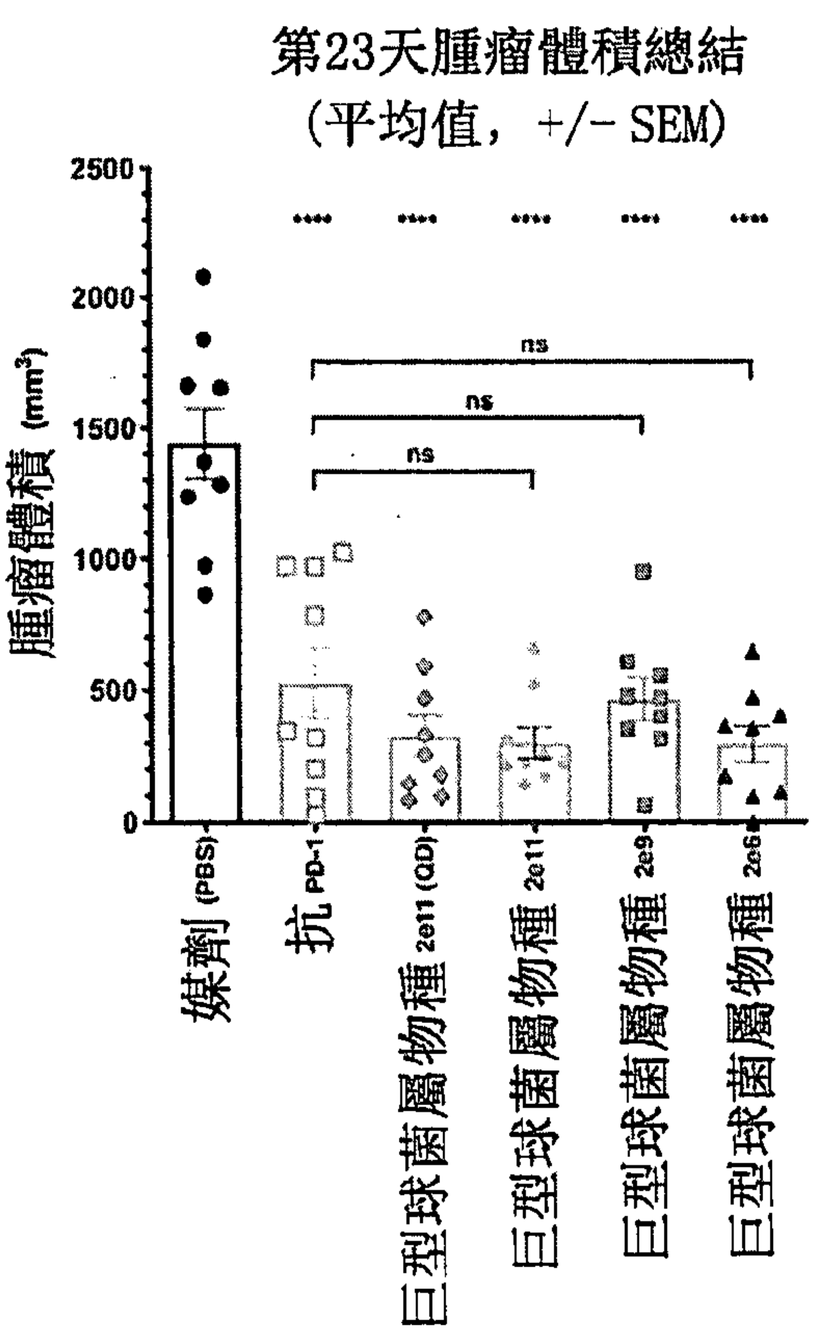
【圖26】


第22天腫瘤體積總結
(平均值，+/- SD)
**
*
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘤體積 (mm³)
ns
媒劑 (PBS)
抗 PD-1
巨型球菌屬物種

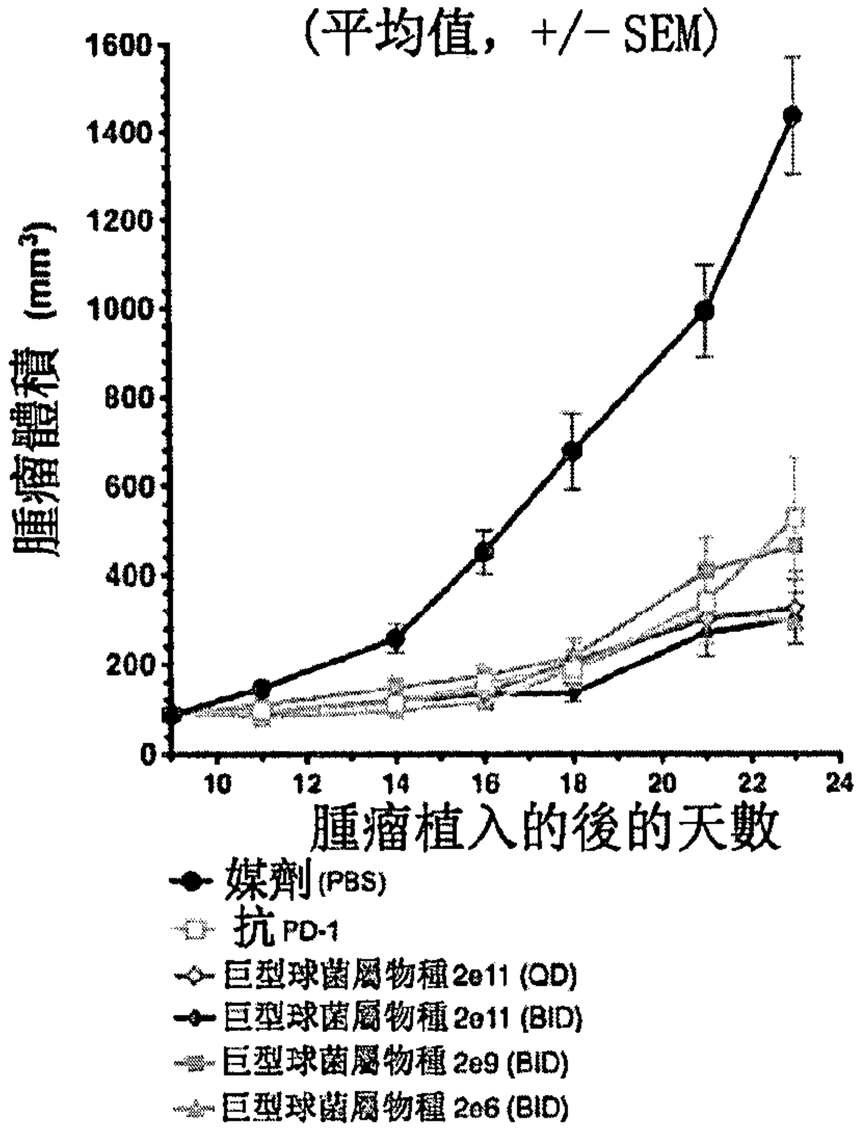
【圖27A】


腫瘤體積曲線
(平均值，+/- SEM)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
腫瘤體積 (mm³)
TX 開始
9
12
15
18
21
植入後的天數
媒劑 (PBS)
抗 PD-1
巨型球菌屬物種 (2e11)

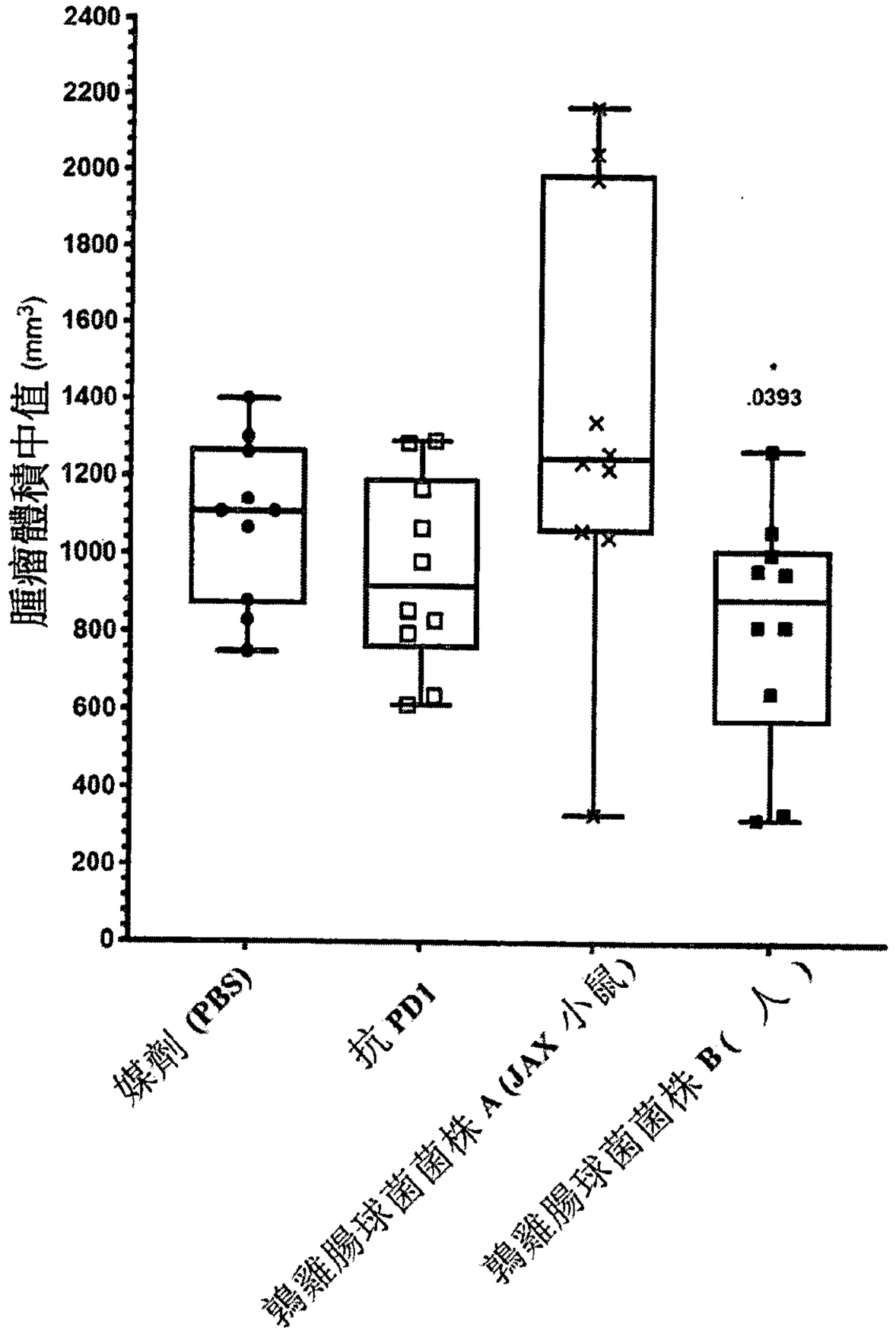
【圖27B】


第23天腫瘤體積總結
(平均值，+/- SEM)
腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
ns
ns
ns
媒劑 (PBS)
抗 PD-1
巨型球菌屬物種 2e11 (QD)
巨型球菌屬物種 2e11
巨型球菌屬物種 2e9
巨型球菌屬物種 2e6

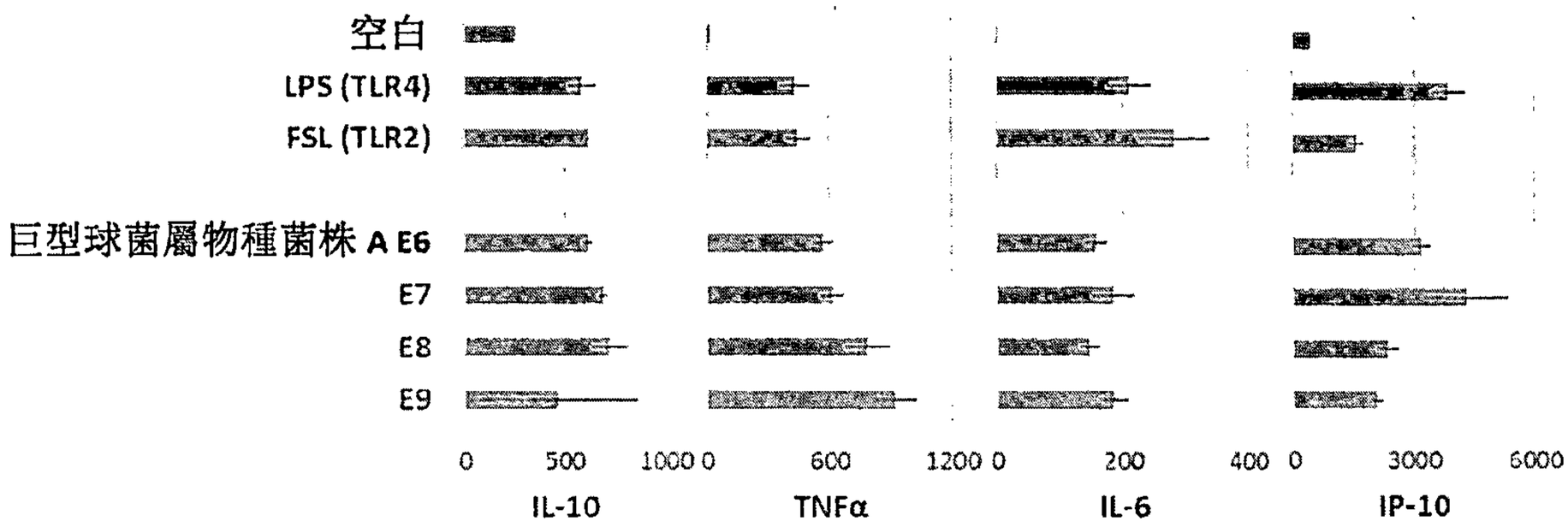
【圖28A】


腫瘤體積曲線
(平均值，+/- SEM)
腫瘤體積 (mm3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
12
14
16
18
20
22
24
腫瘤植入的後的天數
媒劑 (PBS)
抗 PD-1
巨型球菌屬物種 2e11 (QD)
巨型球菌屬物種 2e11 (BID)
巨型球菌屬物種 2e9 (BID)
巨型球菌屬物種 2e6 (BID)

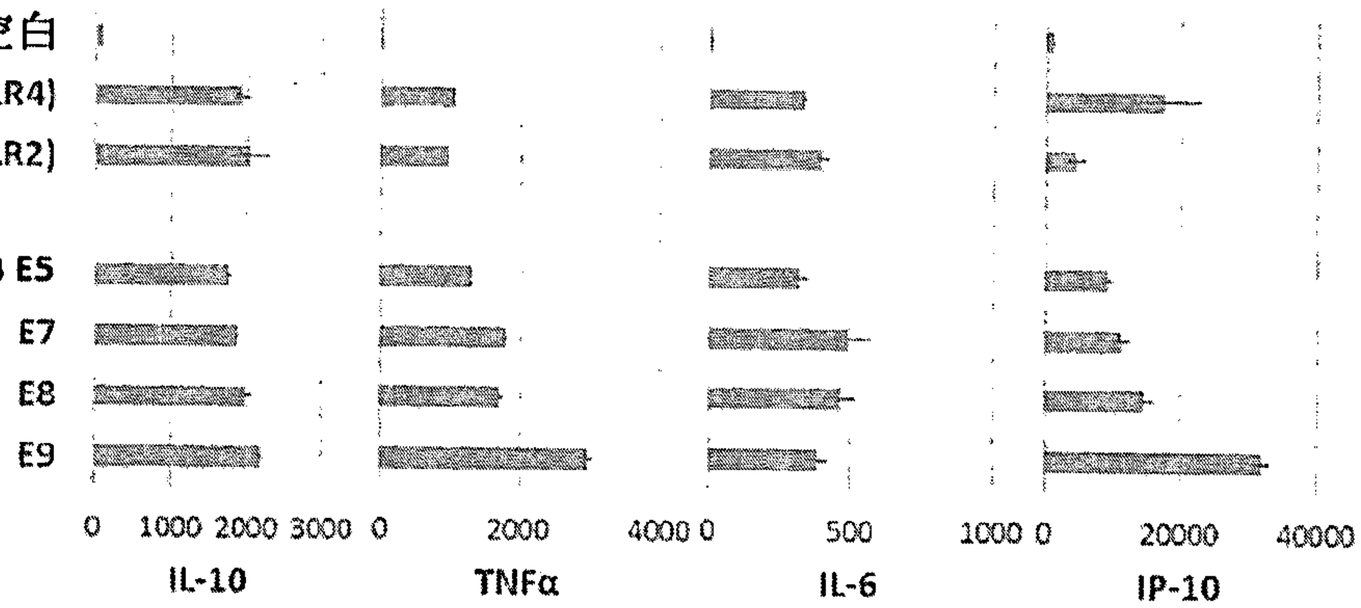
【圖28B】


腫瘤體積中值 (mm3)
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
.0393
媒劑 (PBS)
抗 PD1
鵪雞腸球菌菌株 A (JAX 小鼠)
鵪雞腸球菌菌株 B(人)

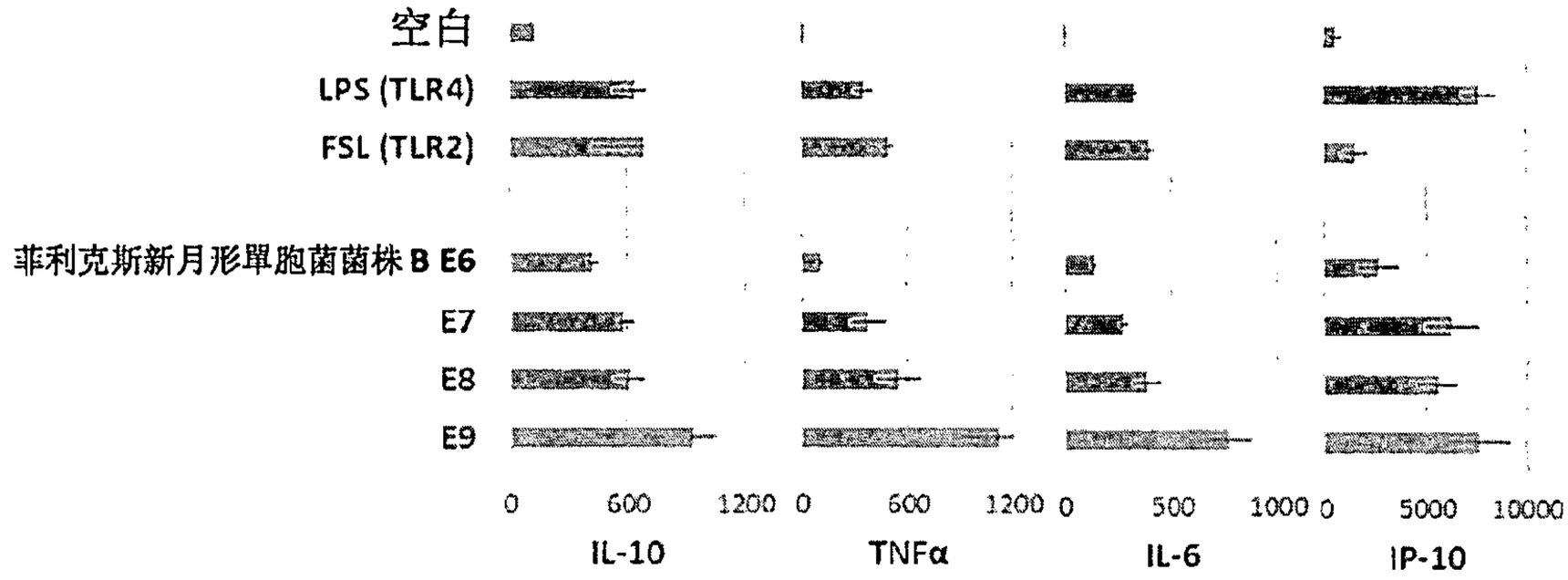
【圖29】


空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
巨型球菌屬物種菌株 A E6
E7
E8
E9
0
500
1000 0
600
1200 0
200
400 0
3000
6000
IL-10
TNFα
IL-6
IP-10

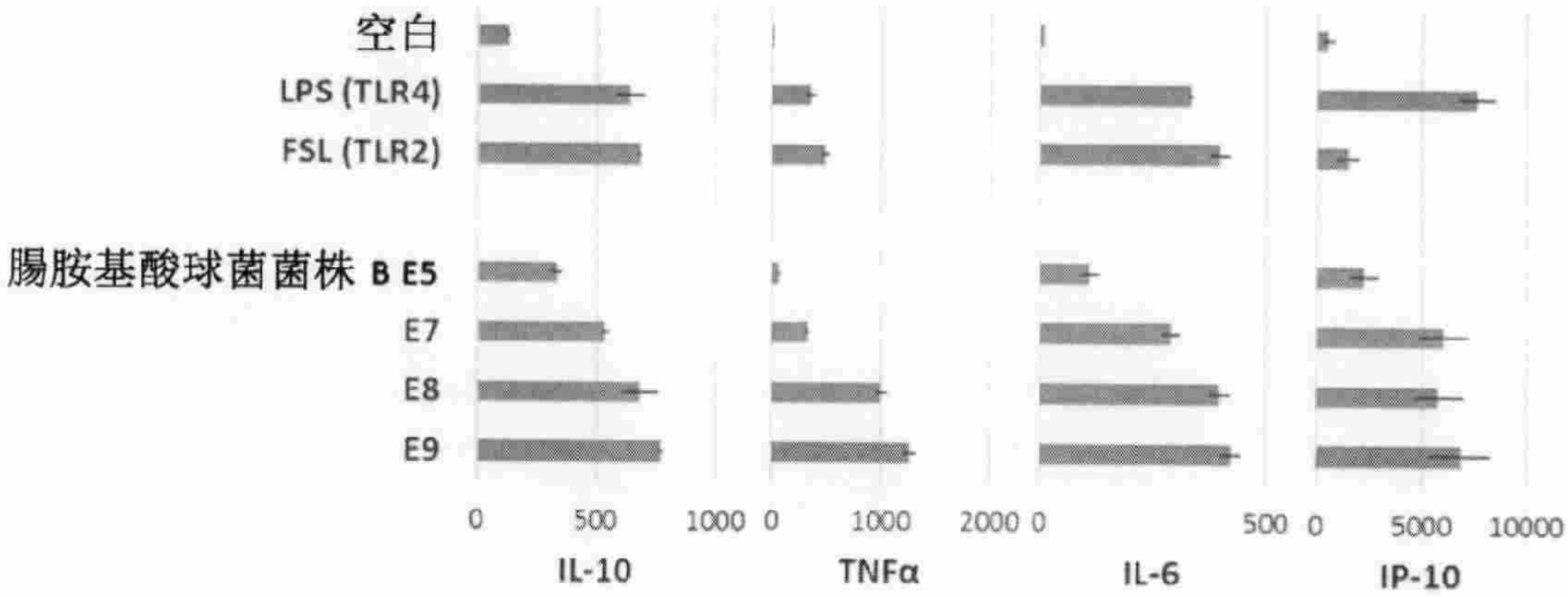
【圖30】


空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
巨型球菌屬物種菌株 B E5
E7
E8
E9
0 1000 2000 3000
IL-10
0 2000 4000
TNFα
0 500 1000
IL-6
0 20000 40000
IP-10

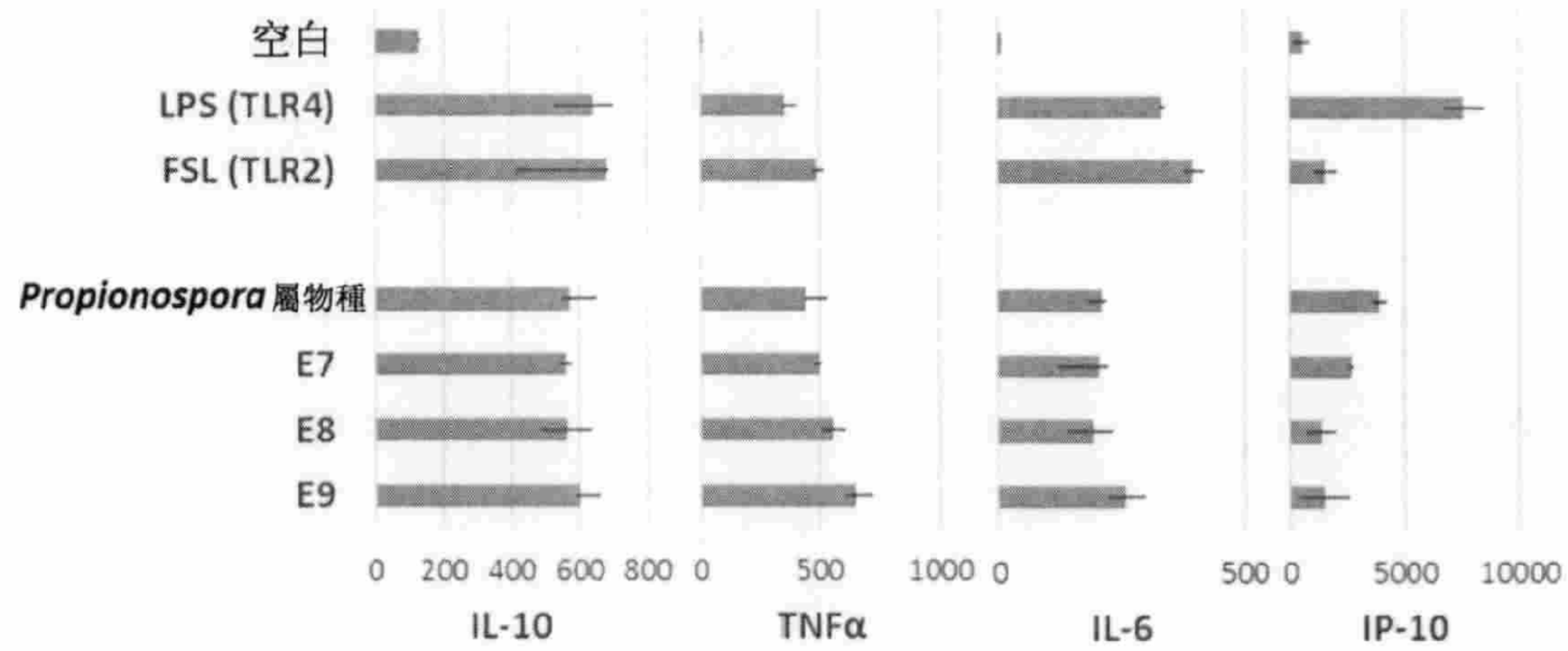
【圖31】


空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
菲利克斯新月形單胞菌菌株 B E6
E7
E8
E9
0
600
1200
0
600
1200
0
500
1000
0
5000
10000
IL-10
TNFα
IL-6
IP-10

【圖32】


空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
腸胺基酸球菌菌株 B E5
E7
E8
E9
0
500
1000
0
1000
2000
0
500
0
5000
10000
IL-10
TNFα
IL-6
IP-10

【圖33】


空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
Propionospora 屬物種
E7
E8
E9
0 200 400 600 800
IL-10
0 500 1000
TNFα
0
IL-6
500 0 5000 10000
IP-10

【圖34】