



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111246866 A

(43)申请公布日 2020.06.05

(21)申请号 201880055780.6

(71)申请人 4D制药研究有限公司

(22)申请日 2018.08.10

地址 英国阿伯丁郡

(30)优先权数据

18183642.0 2018.07.16 EP

(72)发明人 伊姆克·伊丽莎白·马尔德

1712857.0 2017.08.10 GB

肖恩·玛丽·麦克罗斯基

1800866.4 2018.01.19 GB

海琳·萨维尼雅克 伊恩·杰弗里

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

2020.02.27

代理人 王达佐 洪欣

(86)PCT国际申请的申请数据

(51)Int.Cl.

PCT/EP2018/071831 2018.08.10

A61K 35/744(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

A61P 29/00(2006.01)

W02019/030411 EN 2019.02.14

A61P 35/00(2006.01)

(83)生物保藏信息

A61P 37/00(2006.01)

NCIMB 42488 2015.11.16

A23L 33/135(2006.01)

NCIMB 42761 2017.05.22

A61P 1/12(2006.01)

权利要求书2页 说明书39页 附图14页

(54)发明名称

包含细菌菌株的组合物

(57)摘要

本发明提供了包含细菌菌株的组合物和所述组合物用于治疗疾病的用途。

1. 一种包含肠球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用于增加和/或稳定经诊断患有疾病的受试者中的微生物丛多样性。
2. 根据权利要求1所述的使用的组合物,其中所述微生物丛多样性的增加和/或稳定是在所述受试者的肠部或远端肠道中。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的组合物,其中所述疾病的特征为微生物组多样性减少。
4. 一种包含肠球菌属细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗选自由炎性肠病、体重减轻、溃疡性结肠炎和克罗恩氏病组成的组的疾病。
5. 一种组合,所述组合包含(a)环磷酰胺和(b)包含肠球菌属细菌菌株的组合物,所述组合用于治疗癌症、炎性病症或自身免疫性病症。
6. 根据权利要求5所述的使用的组合,其中所述肠球菌属不为海氏肠球菌。
7. 根据权利要求5或6所述的使用的组合,其中所述环磷酰胺以1000mg或更少、800mg或更少、500mg或更少或者200mg或更少的日剂量给予。
8. 根据权利要求5或6所述的使用的组合,其中所述环磷酰胺以10-500mg、50-250mg或80-150mg之间的日剂量给予。
9. 根据权利要求5-8中任一项所述的使用的组合,其中环磷酰胺经口施用。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的组合物或组合,其中
  - a) 所述细菌菌株属于鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌;和/或
  - b) 所述细菌菌株具有与鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌的细菌菌株的16S rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列;和/或
  - c) 所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:1、2或5至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列。
11. 根据任一前述权利要求所述的使用的组合物或如权利要求5-10中任一项所述的使用的组合,其中(a)所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:2至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列,或其中所述细菌菌株具有SEQ ID NO:2的16S rRNA序列;或(b)所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:5至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列,或其中所述细菌菌株具有SEQ ID NO:5的16S rRNA序列。
12. 根据任一前述权利要求所述的使用的组合物或如权利要求5-11中任一项所述的使用的组合,其中所述细菌菌株为
  - a) 以登记号NCIMB 42488保藏的鹑鸡肠球菌细菌;和/或
  - b) 以登记号NCIMB 42761保藏的鹑鸡肠球菌细菌;和/或
  - c) 铅黄肠球菌细菌。
13. 根据任一前述权利要求所述的使用的组合物或根据权利要求5-12中任一项所述的使用的组合,其中所述组合物
  - a) 降低梭状芽孢杆菌属物种的水平;和/或
  - b) 降低来自梭状芽孢杆菌属XIVa簇的生物体的水平;和/或
  - c) 升高毛螺菌科物种的生物体的水平;和/或
  - d) 升高罗斯氏菌属物种的生物体的水平;和/或
  - e) 升高人肠道巴恩斯氏菌物种的水平;和/或

f) 减少体内与戊糖磷酸途径有关的至少一种代谢物的形成。

14. 根据权利要求13 (f) 所述的使用的组合物或组合, 其中所述戊糖磷酸途径的所述代谢物选自由5-磷酸核糖、4-磷酸赤藓糖和7-磷酸景天庚酮糖组成的组。

15. 根据任一前述权利要求所述的使用的组合物或根据权利要求5-14中任一项所述的使用的组合, 其中所述组合物升高别样杆菌属、普雷沃菌属、副杆状菌属、霍氏菌属、厌氧杆菌属、拟杆菌属、黄杆菌属、梭状芽孢杆菌属X1Vb、吸血弧菌属、厌氧支原体属和/或巴恩斯氏菌属中的一种或多种的水平。

16. 根据任一前述权利要求所述的使用的组合物或根据权利要求5-15中任一项所述的使用的组合, 其中

- a) 所述组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体; 和/或
- b) 所述细菌菌株为冻干的; 和/或
- c) 所述细菌菌株能存活; 和/或
- d) 所述细菌菌株能够部分或完全定殖肠部。

17. 根据任一前述权利要求所述的使用的组合物或根据权利要求5-16中任一项所述的使用的组合, 所述组合物或组合包含肠球菌属单一菌株。

18. 根据任一前述权利要求所述的使用的组合物或根据权利要求5-17中任一项所述的使用的组合, 其中所述组合物包含肠球菌属且不包含来自任何其它种属的细菌或仅仅包含最低限度量的所述其它细菌。

19. 根据任一前述权利要求所述的使用的组合物或根据权利要求5-18中任一项所述的使用的组合, 其中所述组合物包含鹑鸡肠球菌且不包含来自任何其它物种的细菌或仅仅包含最低限度量的所述其它细菌。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的组合物或根据权利要求5-19中任一项所述的使用的组合, 所述组合物或组合包含肠球菌属作为微生物菌群的一部分。

21. 一种包含如前述权利要求中任一项所述的组合物的食品或疫苗, 所述食品或疫苗供前述权利要求中任一项使用。

22. 一种增加受试者中的肠微生物丛多样性的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用包含肠球菌属细菌菌株的组合物, 其中任选地所述肠球菌属为鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌。

23. 一种治疗炎性肠病、体重减轻、溃疡性结肠炎或克罗恩氏病的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用包含肠球菌属细菌菌株的组合物, 其中任选地所述肠球菌属为鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌。

24. 一种治疗癌症、炎性病症或自身免疫性疾病的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用(a)环磷酰胺与(b)包含肠球菌属细菌菌株的组合物的组合, 其中任选地所述肠球菌属为鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌。

## 包含细菌菌株的组合物

### 技术领域

[0001] 本发明属于包含细菌菌株的组合物和所述组合物用于治疗疾病的用途的领域。

### 背景技术

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

[0003] 已经在例如炎性肠病 (IBD) 的胃肠道病症中证明微生物丛组成的显著变化。举例来说,在IBD患者中梭状芽孢杆菌属 (Clostridium) XIVa簇细菌的水平降低,而大肠杆菌的数目增加,这表明在肠内共生体与病原性共生体的平衡发生变化[6-9]。有趣的是,与IBD炎性状态相关的所述微生物改变的特征在于效应T细胞群体的不平衡。

[0004] 与微生物丛改变有关的许多人类疾病的标志是微生物丛多样性的损失,这与所谓的菌群失调不同,菌群失调仅仅是与健康受试者中的典型聚集微生物丛相比,微生物丛组成有所改变。肠微生物丛的多样性的变化已经引起了显现癌症的风险的调节[10]。重建健康微生物丛是困难的,因为肠道中的细菌抵抗定殖。这在设法通过增加微生物丛的多样性来治疗不健康受试者的微生物丛时提出挑战[11]。但是,尚未充分了解微生物丛多样性与癌症之间的联系。

[0005] 本领域中需要治疗疾病的新方法,所述新方法得益于微生物丛多样性的增加和/或微生物丛多样性的稳定性的增加。

### 发明内容

[0006] 本发明人已经研发出通过增加和/或稳定受试者中的肠微生物丛多样性来治疗和/或预防疾病的新疗法。具体地说,本发明人已经发现来自肠球菌属 (Enterococcus) 的细菌菌株可以有效地增加和/或稳定受试者的远端肠道中的肠微生物丛多样性。本发明人已经确定选自由鹌鹑肠球菌 (Enterococcus gallinarum) 和铅黄肠球菌 (Enterococcus caseiiflavus) 组成的清单的物种的细菌菌株能够尤其有效地增加和/或稳定受试者,尤其是经诊断患有疾病的受试者中的微生物丛多样性。

[0007] 本发明提供了一种包含肠球菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于增加和/或稳定受试者中的微生物丛多样性的方法中。类似地,本发明还提供了一种增加和/或稳定受试者中的微生物丛多样性的方法,其中所述方法包括向受试者施用包含肠球菌属的细菌

菌株的组合物的步骤。优选地，肠球菌属为鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌物种的细菌菌株。

[0008] 表述“增加微生物丛多样性”在本文中用于意指增加受试者的微生物丛中的不同细菌类型的数目和/或不同细菌类型的均衡。微生物丛多样性可以通过受试者中的细菌的不同种属、物种或菌株的数目增加来测量。此微生物丛多样性的增加可以在受试者的肠部或受试者的远端肠道中。增加或均衡可以相对于在施用根据本发明的组合物前受试者中的多样性/均衡来测量。在用本发明的组合物治疗后微生物丛中的不同细菌类型的相对丰度变得更加均衡。

[0009] “稳定微生物丛多样性”意指微生物丛中的不同种属的相对数目保持稳定(例如在两次测量之间相对数目波动至多70%、80%、90%、95%或99%)。微生物丛多样性的稳定可以在受试者的肠部或受试者的远端肠道中。相对稳定性可以相对于在施用根据本发明的组合物前的稳定性评定。

[0010] 受试者微生物丛的稳定性可以通过比较两个不同时间点的来自受试者的微生物组来评定。两个不同时间点可以相隔至少三天或更多天,例如相隔至少1周、2周、1个月、3个月、6个月、1年或2年。两个不同时间点可以相隔3-7天、相隔1-2周、相隔2-4周、相隔4-8周、相隔8-24周、相隔24-40周、相隔40-52周或相隔超过52周。可以使用超过两个不同时间点,例如三个、四个、五个或超过五个时间点。在例如如以上所陈述的多个时间点之间选择合适的时间间隔。

[0011] 微生物丛多样性的增加或稳定可以通过测量样品中典型地用16S rRNA扩增子测序法测定的基于序列的细菌分类或操作分类单位(OTU)的数目来定量。多样性的增加可以通过香农多样性指数(Shannon Diversity Index)或超指数(Chao index)的增加来测量[12]。

[0012] 本发明人也已经研发出用于治疗和预防疾病的新疗法,所述方法通过增加受试者中的微生物丛多样性和/或稳定微生物丛多样性来治疗和预防疾病。举例来说,本发明提供了包含肠球菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于增加经诊断患有癌症的受试者中的微生物丛多样性和/或稳定微生物丛多样性的方法中。如本领域的技术人员将认识到,作为疾病和/或其治疗的作用的结果,癌症患者可能经历其微生物组的多样性的减少,微生物组的多样性的减少可能引起继发性疾病的显现或恶化。

[0013] 微生物组的多样性的减少已经与递增数目的疾病的显现和/或恶化有关。这些疾病包括神经病状,例如阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)[13]、帕金森氏病(Parkinson's disease)[14]、自闭症[15]和多发性硬化[16,17];胃肠道病症,例如肠易激综合症[18]和炎性肠病[19,20,21];肌骨骼病症,例如类风湿性关节炎[22]和牛皮癣性关节炎[23];代谢病症,包括I型糖尿病[24];和消瘦/疲劳病状,包括肌肉减少症[25]和肌痛性脑脊髓炎[26]。

[0014] 因此,需要可以稳定或改善受试者(包括癌症患者)的微生物组多样性并因此治疗或预防特征为微生物组多样性减少的疾病的本发明的组合物。

[0015] 本发明提供了一种包含肠球菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于增加受试者中的微生物丛多样性和/或稳定微生物丛多样性的方法中。来自肠球菌属的细菌可以通过使用生物化学关键因素来鉴别[27]。组合物的细菌菌株可以具有与鹑鸡肠球菌的细菌菌株的16S rRNA序列至少95%同一的16S rRNA序列。因此,本发明提供了一种包含细菌菌株

的组合物,所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:1、2或5(在序列的100%上)至少95%同一的16S rRNA序列,所述组合物用于增加受试者中的微生物丛多样性和/或微生物丛的稳定性的方法中。

[0016] 组合物中的细菌菌株可能属于鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌。还可以使用密切相关的菌株,例如具有与鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌的细菌菌株的16S rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列的细菌菌株。优选地,细菌菌株具有与SEQ ID NO:1、2或5至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:1、2或5表示的16S rRNA序列。这是优选的,因为本发明人已经发现这类菌株尤其较好地增加微生物丛多样性。

[0017] 细菌菌株可以是以登记号NCIMB 42488保藏的鹑鸡肠球菌菌株。细菌菌株可以是以登记号NCIMB 42761保藏的鹑鸡肠球菌菌株。细菌菌株可以是铅黄肠球菌。

[0018] 本发明的组合物可以适于经口施用。经口施用组合物的菌株可以有效地增加受试者中的微生物丛多样性。此外,经口施用便于患者和开业医师并且允许传递至肠和/或部分或全部定殖肠部。

[0019] 本发明的组合物可以包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。本发明的组合物可以包含已经冻干的细菌菌株。冻干是一项用于制备允许传递细菌的稳定组合物的有效而便利的技术。

[0020] 本发明提供了一种包含如上所述的组合物的食品。本发明提供了一种包含如上所述的组合物的疫苗组合物。

[0021] 本发明还提供了包含肠球菌属的细菌菌株的组合物(优选鹑鸡肠球菌物种)与环磷酰胺的组合在疗法中的用途。

[0022] 另外,本发明提供了一种增加受试者中的微生物丛多样性的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含鹑鸡肠球菌物种的细菌菌株的组合物。

## 附图说明

[0023] 图1a:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用MRX518处理后观察到的多样性。

[0024] 图1b:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用MRX518处理后的香农多样性。

[0025] 图1c:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用MRX0554处理后观察到的多样性。

[0026] 图1d:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用MRX0554处理后的香农多样性。

[0027] 图1e:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用MRX0858处理后观察到的多样性。

[0028] 图1f:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用MRX0858处理后的香农多样性。

[0029] 图1g:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用REF 10处理后观察到的多样性。

[0030] 图1h:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用REF 10处理后的香农多样性。

[0031] 图1i:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用抗CTLA4处理后观察到的多样性。

[0032] 图1j:在EMT6小鼠中在时间点第-14天、第0天和第22天在用抗CTLA4处理后的香农多样性。

[0033] 图2:在LLC小鼠中在第18天在用细菌菌株MRX518 (G2)、MRX0554 (G3)、MRX0858 (G4)、REF10-DSM100110 (G5)、抗CTLA4 (G6) 处理后和未经处理 (G1) 下的香农多样性。

[0034] 图3: (a) 基于布雷-柯蒂斯相异性(Bray-Curtis dissimilarities)的微生物丛概况的PCoA排序图。数据根据时间点分组并包括所有处理组 (p-值=0.001)。总N=210; 每个时间点n=70; (b) 基于布雷-柯蒂斯相异性的微生物丛概况的PCoA排序图。数据根据时间点第-15天的处理分组 (p-值=0.077)。总N=70; 每个处理n=10。 (c) 基于布雷-柯蒂斯相异性的微生物丛概况的PCoA排序图。数据根据时间点第22天的处理分组 (p-值=0.001)。总N=70; 每个处理n=10。

## 具体实施方式

[0035] 细菌菌株

[0036] 根据本发明的供使用的组合物包含肠球菌属细菌菌株。实施例证明此种属细菌适用于增加和/或稳定受试者中的微生物丛多样性。所述种属的优选细菌物种为鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌。以登记号NCIMB 42488和NCIMB 42761保藏的鹑鸡肠球菌的细菌菌株为优选的, 因为本发明人已经在这些菌株下看到优良结果。细菌菌株优选不为海氏肠球菌(*Enterococcus hirae*)。

[0037] 肠球菌属某些种可以通过多态DNA分析的随机扩增(RAPD)来鉴别。RAPD分析不需要有关靶生物体的DNA序列的任何特定知识。RAPD标志物是通过利用任意核苷酸序列的单一引物对基因组DNA的随机区段进行PCR扩增所产生的DNA片段并且能够区分基因不同的个体[28]。

[0038] 鹌鸡肠球菌形成球状细胞, 大部分成对或呈短链。其不动并且在血琼脂或营养琼脂上的菌落为圆形和光滑的。鹑鸡肠球菌与兰氏分型(Lancefield group) D抗血清反应。鹑鸡肠球菌的模式菌株为F87/276=PB21=ATCC 49573=CCUG 18658=CIP 103013=JCM 8728=LMG13129=NBR 100675=NCIMB 702313(以前为NCDO 2313)=NCTC 12359[29]。鹑鸡肠球菌的16S rRNA基因序列的GenBank登记号为AF039900(本文中公开为SEQ ID NO:1)。一种示例性鹑鸡肠球菌菌株描述于[29]中。

[0039] 以登记号NCIMB 42488保藏的鹑鸡肠球菌菌株在实施例中进行测试并且在本文中又称为菌株MRX518。测试的MRX518菌株的16S rRNA序列在SEQ ID NO:2中提供。菌株MRX518由4D药物研究有限公司(4D Pharma Research Ltd.) (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) 以“肠球菌属(*Enterococcus sp*)”在2015年11月16日保藏在国际保藏局NCIMB有限公司(Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) 并分配登记号NCIMB 42488。

[0040] 以登记号NCIMB 42761保藏的鹑鸡肠球菌细菌在实施例中进行测试并且在本文中

又称为菌株MRX554。对MRX554和MRx0554的提及可互换使用。菌株MRX554由4D药物研究有限公司 (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) 以“肠球菌属 (Enterococcus sp)”在2017年5月22日保藏在国际保藏局NCIMB有限公司 (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) 并且分配登记号NCIMB 42761。

[0041] 鸽鸡肠球菌菌株MRX518的基因组包含染色体和质粒。菌株MRX518的染色体序列提供于SEQ ID NO:3。菌株MRX518的质粒序列提供于SEQ ID NO:4。使用PacBio RS II平台产生这些序列。

[0042] 还预期与实施例中测试的菌株紧密相关的细菌菌株有效地增加和/或稳定受试者中的微生物多样性。因此,根据本发明的组合物可以包含相对于在施用组合物前受试者中的微生物多样性的水平或稳定性,可增加和/或稳定受试者中的微生物多样性的菌株。

[0043] 用于本发明的细菌菌株可以具有与鸽鸡肠球菌或铅黄肠球菌的细菌菌株的16S rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一、优选99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列。用于本发明的细菌菌株可以具有与SEQ ID NO:1、2或5至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:1、2或5表示的16S rRNA序列。

[0044] 还预期作为以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌的生物型的细菌菌株有效地增加和/或稳定受试者中的微生物多样性。生物型是具有相同或极类似的生理和生物化学特性的密切相关菌株,例如相对于在施用组合物前受试者中的微生物多样性,它可以增加和/或稳定受试者中的微生物多样性至与以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌相同或类似的水平(例如x±20%、x±10%、x±5%或x±1%)。

[0045] 作为以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌的生物型并且适合用于本发明中的菌株可以通过对以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌的其它核苷酸序列进行测序来鉴别。举例来说,基本上全基因组可以进行测序,并且用于本发明的生物型菌株可以在其全基因组的至少80%上(例如在至少85%、90%、95%或99%上或在其全基因组上)具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性。举例来说,生物型菌株可以在其基因组的至少98%上具有至少98%序列同一性或在其基因组的99%上具有至少99%序列同一性。用于鉴别生物型菌株的其它合适序列可以包括hsp60或重复序列,例如BOX、ERIC、(GTG)<sub>5</sub>或REP[30]。

[0046] 生物型菌株可以具有与以登记号NCIMB 42488保藏的细菌的对应16S rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一的16S rRNA序列。生物型菌株可以具有与以NCIMB 42488保藏的菌株MRX518的对应16S rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一的16S rRNA序列并且包含与SEQ ID NO:2至少99%同一(例如至少99.5%或至少99.9%同一)的16S rRNA序列。生物型菌株可以具有与以NCIMB 42488保藏的菌株MRX518的对应16S rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一的16S rRNA序列并且具有SEQ ID NO:2的16S rRNA序列。优选地,生物型菌株具有与以NCIMB 42488保藏的菌株MRX518的对应序列至少99%同一(例如至少99.5%同一或至少99.9%同一)的16S rRNA序列。

[0047] 生物型菌株可以具有与以登记号NCIMB 42761保藏的细菌的对应全基因组序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一的全基因组序列。生物型菌株可

以具有与以NCIMB 42761保藏的菌株MRX554的对应全基因组序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一的全基因组序列并且还包含与SEQ ID N0:5至少99%同一(例如至少99.5%或至少99.9%同一)的16S rRNA序列。生物型菌株可以具有与以NCIMB 42488保藏的菌株MRX518的对应序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一的全基因组序列并且具有SEQ ID N0:5的16S rRNA序列。优选地,生物型菌株具有与以NCIMB 42761保藏的菌株MRX554的对应序列至少99%同一(例如至少99.5%同一或至少99.9%同一)的全基因组序列。

[0048] 本发明的生物型将具有与鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌类似的如上所定义的增加和/或稳定受试者中的肠微生物丛多样性的功效。因此,与如上所定义的鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌菌株的细菌所实现的增加相比,生物型将实现达到所述增加的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的增加。可替代地或另外,本发明的生物型可以使微生物丛多样性稳定在与如上所定义的鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌类似的水平,即,它可以维持受试者的微生物丛中不同细菌类型的数目达到如上所定义的由鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌稳定的不同细菌类型的数目的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%。微生物多样性可以通过考虑不同细菌类型的数目来评定。

[0049] 用于本发明的细菌菌株可以具有与SEQ ID NO:3具有序列同一性的染色体。用于本发明的细菌菌株可以具有在SEQ ID NO:3的至少60% (例如至少65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 上与SEQ ID NO:3至少90%序列同一 (例如至少92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一) 的染色体。举例来说,用于本发明的细菌菌株可以具有在SEQ ID NO:3的70%上与SEQ ID NO:3至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:3的80%上与SEQ ID NO:3至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:3的90%上与SEQ ID NO:3至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:3的100%上与SEQ ID NO:3至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:3的70%上与SEQ ID NO:3至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:3的80%上与SEQ ID NO:3至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:3的90%上与SEQ ID NO:3至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:3的100%上与SEQ ID NO:3至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:3的70%上与SEQ ID NO:3至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:3的80%上与SEQ ID NO:3至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:3的90%上与SEQ ID NO:3至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:3的95%上与SEQ ID NO:3至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:3的100%上与SEQ ID NO:3至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:3的90%上与SEQ ID NO:3至少99.5%序列同一,或在SEQ ID NO:3的95%上与SEQ ID NO:3至少99.5%序列同一,或在SEQ ID NO:3的98%上与SEQ ID NO:3至少99.5%序列同一,或在SEQ ID NO:3的100%上与SEQ ID NO:3至少99.5%序列同一的染色体。

[0050] 用于本发明的细菌菌株可以是与SEQ ID NO:4具有序列同一性的质粒。用于本发明的细菌菌株可以具有在SEQ ID NO:4的至少60% (例如至少65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 上与SEQ ID NO:4至少90%序列同一 (例如至少92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一) 的质粒。举例来说,用于本发明的细菌菌株可以具有在SEQ ID NO:4的70%上与SEQ ID NO:4至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:4的80%上与SEQ ID NO:4至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:4的90%上与SEQ ID NO:4至少90%序列同一,或在SEQ ID NO:4的100%上与SEQ ID NO:4至少90%序列同一,或在SEQ

ID NO:4的70%上与SEQ ID NO:4至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:4的80%上与SEQ ID NO:4至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:4的90%上与SEQ ID NO:4至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:4的100%上与SEQ ID NO:4至少95%序列同一,或在SEQ ID NO:4的70%上与SEQ ID NO:4至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:4的80%上与SEQ ID NO:4至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:4的90%上与SEQ ID NO:4至少98%序列同一,或在SEQ ID NO:4的100%上与SEQ ID NO:4至少98%序列同一的质粒。

[0051] 用于本发明的细菌菌株可以具有与SEQ ID NO:3具有序列同一性的染色体,例如如上所述,和与SEQ ID NO:1或2中的任一个具有序列同一性的16S rRNA序列,例如如上所述,优选具有与SEQ ID NO:2至少99%同一的16S rRNA序列,更优选包含SEQ ID NO:2的16S rRNA序列,并且任选地包含与SEQ ID NO:4具有序列同一性的质粒,如上所述。

[0052] 用于本发明的细菌菌株可以具有与SEQ ID NO:3具有序列同一性的染色体,例如如上所述,并且任选地包含与SEQ ID NO:4具有序列同一性的质粒,如上所述,并且有效地增加受试者中的微生物丛多样性。

[0053] 用于本发明的细菌菌株可以具有与SEQ ID NO:3具有序列同一性的染色体,例如如上所述,和与SEQ ID NO:1或2中的任一个具有序列同一性的16S rRNA序列,例如如上所述,并且任选地包含与SEQ ID NO:4具有序列同一性的质粒,如上所述,并且有效地增加受试者中的微生物丛多样性。

[0054] 用于本发明的细菌菌株可以具有与由SEQ ID NO:2表示的16S rRNA序列至少99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列(例如其包含SEQ ID NO:2的16S rRNA序列),和在SEQ ID NO:3的至少90%上与SEQ ID NO:3至少95%序列同一的染色体,并且任选地包含与SEQ ID NO:4具有序列同一性的质粒,如上所述,并且有效地增加受试者中的微生物丛多样性。

[0055] 用于本发明的细菌菌株可以具有与由SEQ ID NO:2表示的16S rRNA序列至少99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列(例如其包含SEQ ID NO:2的16S rRNA序列),和在SEQ ID NO:3的至少98%上(例如在至少99%或至少99.5%上)与SEQ ID NO:3至少98%序列同一(例如至少99%或至少99.5%序列同一)的染色体,并且任选地包含与SEQ ID NO:4具有序列同一性的质粒,如上所述,并且有效地增加受试者中的微生物丛多样性。

[0056] 用于本发明的细菌菌株可以是鹑鸡肠球菌,且可以具有与由SEQ ID NO:2表示的16S rRNA序列至少99%、99.5%或99.9%同一的16S rRNA序列(例如其包含SEQ ID NO:2的16S rRNA序列),和在SEQ ID NO:3的至少98%上(例如在至少99%或至少99.5%上)与SEQ ID NO:3至少98%序列同一(例如至少99%或至少99.5%序列同一)的染色体,并且任选地包含与SEQ ID NO:4具有序列同一性的质粒,如上所述,并且有效地增加受试者中的微生物丛多样性。

[0057] 提及两种核苷酸序列之间的序列同一性百分比是指在比较两种序列过程中在进行比对时相同的核苷酸的百分比。此比对和同源性或序列同一性百分比可以使用本领域中已知的软件程序,例如参考文献[31]的部分7.7.18中描述的软件程序确定。优选的比对是通过Smith-Waterman同源性搜索算法使用仿射空位搜索,使用开放空位罚分12和空位延伸罚分2、BLOSUM矩阵62来确定。Smith-Waterman同源性搜索算法在参考文献[32]中公开。

[0058] 其它可能计算机程序为BLAST或FASTA,其中对两个序列进行比对,以最佳匹配其

相应残基(沿着一个或两个序列的全长或沿着一个或两个序列的预定部分)。所述程序提供默认开放罚分和默认空位罚分,且例如PAM 250[33]的评分矩阵可以结合所述计算机程序使用。举例来说,同一性百分比则可以计算为:相同匹配的总数乘以100,接着除以匹配跨距内较长序列的长度与引入较短序列中以比对两个序列的空位的数目的总和。

[0059] 可替代地,作为以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌的生物型并且适用于本发明中的菌株可以通过使用登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏物和限制片段分析和/或PCR分析,例如通过使用荧光增强的片段长度多态现象 (fluorescent amplified fragment length polymorphism,FAFLP) 和重复DNA组件 (rep)-PCR指纹或蛋白质概况剖析或部分16S或23s rDNA测序来鉴别。这些技术可以用于鉴别其它鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌菌株。

[0060] 作为以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌的生物型并且适用于本发明中的菌株可以是当通过增强的核糖体DNA限制分析 (amplified ribosomal DNA restriction analysis,ARDRA) 分析时,例如当使用Sau3AI限制酶(关于示例性方法和指导参见例如参考文献34)时提供与以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌相同模式的菌株。可替代地,生物型菌株可以被确定为具有与以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌相同的碳水化合物发酵模式的菌株。可以使用API 50CHL小组 (bioMérieux) 测定碳水化合物发酵模式。优选地,如通过API 50CHL分析 (优选使用来自bioMérieux的API 50CHL小组) 测定,用于本发明的细菌菌株可以:

[0061] (i) 对以下中的至少一种(例如至少2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种或全部)的发酵呈阳性:L-阿拉伯糖、D-核糖、D-木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、扁桃昔、熊果昔、水杨昔、D-纤维二糖、D-麦芽糖、D-海藻糖、龙胆二糖和D-塔格糖;和/或

[0062] (ii) 对以下中的至少一种(例如至少2种、3种、4种或全部)的发酵呈中间阳性:D-甘露糖醇、甲基- $\alpha$ D-吡喃葡萄糖昔、D-乳糖、淀粉和。

[0063] 优选地如通过API 50CHL分析 (优选使用来自bioMérieux的API50CHL小组) 测定,优选地适用于本发明的生物型菌株为具有以下碳水化合物发酵模式的菌株:

[0064] (i) 对以下的发酵呈阳性:L-阿拉伯糖、D-核糖、D-木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、扁桃昔、熊果昔、七叶昔、水杨昔、D-纤维二糖、D-麦芽糖、D-海藻糖、龙胆二糖和D-塔格糖;和/或

[0065] (ii) 对以下的发酵呈中间阳性:D-甘露糖醇、甲基- $\alpha$ D-吡喃葡萄糖昔、淀粉和。

[0066] 优选地如通过API 50CHL分析 (优选使用来自bioMérieux的API50CHL小组) 测定,优选地适用于本发明的生物型菌株为具有以下碳水化合物发酵模式的菌株:

[0067] (i) 对以下的发酵呈阳性:L-阿拉伯糖、D-木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、扁桃昔、熊果昔、七叶昔、水杨昔、D-纤维二糖、D-麦芽糖、D-乳糖、D-蔗糖(蔗糖)、D-海藻糖和龙胆二糖;和/或

[0068] (ii) 对以下的发酵呈中间阳性:甲基- $\alpha$ D-吡喃葡萄糖昔和蜜二糖。

[0069] 适用于本发明的组合物和方法的其它菌株,例如以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌的生物型,可以使用任何适当方法或策略,包括实施例中描述的分析鉴别。举例来说,用于本发明的菌株可以通过在厌氧YCFA中培养和/或将细菌施用于II型胶原

蛋白诱发的关节炎小鼠模型且接着评估细胞因子水平来鉴别。具体地说，具有与以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的细菌类似的生长模式、代谢类型和/或表面抗原的细菌菌株可用于本发明。适用菌株将具有与NCIMB 42488菌株相当的免疫调节活性。

[0070] 优选地如通过碳水化合物、氨基酸和硝酸盐代谢的分析和任选地碱性磷酸酶活性的分析测定，更优选地如通过Rapid ID 32A分析测定（优选使用来自bioMérieux的Rapid ID 32A系统），用于本发明的细菌菌株可：

[0071] (i) 对以下中的至少一种（例如至少2种、3种、4种、5种、6种、7种或全部）呈阳性：甘露糖发酵、谷氨酸脱羧酶、精氨酸芳基酰胺酶、苯丙氨酸芳基酰胺酶、焦谷氨酸芳基酰胺酶、酪氨酸芳基酰胺酶、组氨酸芳基酰胺酶和丝氨酸芳基酰胺酶；和/或

[0072] (ii) 对以下中的至少一种（例如至少2种或全部）呈中间阳性： $\beta$ -半乳糖苷酶-6-磷酸酯、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和N-乙酰基- $\beta$ -氨基葡萄糖苷酶；和/或

[0073] (iii) 对以下中的至少一种（例如至少2种、3种、4种、5种、6种或全部）呈阴性：棉子糖发酵、脯氨酸芳基酰胺酶、亮氨酸酰甘氨酸芳基酰胺酶、亮氨酸芳基酰胺酶、丙氨酸芳基酰胺酶、甘氨酸芳基酰胺酶和谷氨酰基谷氨酸芳基酰胺酶。

[0074] 用于本发明的细菌菌株可：

[0075] (i) 例如如通过碳水化合物、氨基酸和硝酸盐代谢的分析测定，优选如通过Rapid ID 32A分析测定（优选使用来自bioMérieux的Rapid ID 32A系统），对甘氨酸芳基酰胺酶、棉子糖发酵、脯氨酸芳基酰胺酶和亮氨酸芳基酰胺酶中的至少一种（例如至少2种、3种或全部4种）呈阴性；和/或

[0076] (ii) 优选地如通过API 50CHL分析（优选使用来自bioMérieux的API 50CHL小组）测定，对L-岩藻糖的发酵呈中间阳性。

[0077] 用于本发明的细菌菌株为细胞外ATP产生器，如使用ATP分析试剂盒（Sigma-Aldrich, MAK190）所测量，例如产生6-6.7ng/ $\mu$ l（例如6.1-6.6ng/ $\mu$ l或6.2-6.5ng/ $\mu$ l或6.33±0.10ng/ $\mu$ l）ATP。细菌的细胞外ATP可以具有多向性效应，包括活化T细胞受体介导的信号传导[35]，促进肠Th17细胞分化[36]和通过活化NLRP3炎性体诱发促炎性介体IL-1 $\beta$ 分泌[37]。因此，作为细胞外ATP产生器的细菌菌株可用于增加和/或稳定受试者中的微生物从多样性。

[0078] 用于本发明的细菌菌株可以包含以下三个基因中的一个或多个：可动元件蛋白；木糖ABC转运蛋白通透酶组分；和FIG00632333：假设蛋白。举例来说，用于本发明的细菌菌株包含编码以下的基因：可动元件蛋白和木糖ABC转运蛋白通透酶组分；可动元件蛋白和FIG00632333：假设蛋白；木糖ABC转运蛋白通透酶组分和FIG00632333：假设蛋白；或可动元件蛋白、木糖ABC转运蛋白通透酶组分和FIG00632333：假设蛋白。

[0079] 如以上所讨论，用于本发明的鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌菌株可以是具有与以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的菌株相同的安全性和治疗功效特征的菌株。因此，组合物可以包含不为以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的菌株，但具有与以登记号NCIMB 42488或NCIMB 42761保藏的菌株相同的安全性和治疗功效特征的鹑鸡肠球菌菌株。菌株的安全性特征可以例如通过测试菌株对抗生素的抗性，例如区分内在与可传播的抗生素抗性来确定。菌株的安全性特征还可以通过评估体外菌株的致病性，例如毒素产生水平来确定。其它安全性测试包括在大鼠和小鼠模型中测试细菌菌株的急性或慢性毒性。菌株

的治疗功效可以通过在体外和体内使用相关模型对细菌菌株进行功能表征来确定。

[0080] 在优选实施方案中,本发明组合物中的细菌菌株能存活并且能够部分或全部定殖肠部。

[0081] 治疗用途

[0082] 本发明的组合物用于增加和/或稳定经诊断患有疾病的受试者中的微生物丛多样性的方法中。所述实施例证明本发明的组合物的施用可以增加微生物丛多样性。所述实施例进一步说明本发明的组合物可以增加受试者中的微生物丛多样性的稳定性。

[0083] 因此,待使用本发明的组合物治疗或预防的疾病优选为与微生物丛多样性的水平相对于健康受试者的微生物丛多样性降低相关的疾病和/或与微生物丛的稳定性降低相关的疾病。

[0084] 组合物用于展现或预期展现例如与健康受试者或一群健康受试者相比微生物丛多样性的水平降低的受试者中。举例来说,组合物可以用于治疗微生物丛中具有少于101个不同细菌物种(例如少于100个、99个、98个、97个、96个、95个、93个、90个、85个、80个、75个或70个细菌物种)和/或少于195个不同菌株(例如少于193个、190个、187个、185个、183个、180个、175个、170个、165个、160个、150个、140个细菌菌株)的受试者。举例来说,组合物可以用于治疗肠微生物丛中细菌种属与健康受试者相比或与一群健康受试者相比少至少一个(例如至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个细菌种属)的受试者。治疗或预防可以包括将受试者诊断为具有降低的微生物丛多样性水平的步骤,且接着如果发现存在降低的微生物丛多样性水平,那么用根据本发明的组合物治疗受试者。

[0085] 降低的微生物丛多样性与许多病理性疾病相关,并且实施例证明本发明的组合物可以有效地增加和/或稳定受试者中的微生物丛多样性。技术人员容易通过评定患者中的微生物丛多样性和/或稳定性并将其与健康受试者的微生物丛多样性和/或稳定性相比较来鉴别将受益于由本发明的组合物实现的微生物丛多样性/稳定性增加的合适疾病。

[0086] 疾病的发病机理会影响肠部。但是,在其它情况下,疾病的发病机理不影响肠部或不局限于肠部。疾病的治疗或预防可以发生在肠部,或者其可以发生在远端部位。所治疗的疾病可以是全身性的。

[0087] 可以使用本发明的组合物治疗的特征为微生物丛多样性降低的疾病的实例包括神经病状,例如阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、自闭症和多发性硬化;胃肠道病症,例如肠易激综合症和炎性肠病;肌骨骼病症,例如类风湿性关节炎和牛皮癣性关节炎;代谢病症,包括I型糖尿病;和消瘦/疲劳病状,包括肌肉减少症和肌痛性脑脊髓炎。

[0088] 所述实施例说明用本发明的组合物治疗可增加微生物丛多样性和/或微生物丛的稳定性。因此,如上所述的组合物可用于增加和/或稳定受试者中的微生物丛多样性的方法中。如以上所解释,相当大数目的疾病与微生物组多样性降低有关。微生物组多样性降低可能由某些疾病(例如癌症)或用于治疗那些疾病的疗法引起和/或加重。

[0089] 本发明的组合物可以用于增加和/或稳定经诊断患有癌症的受试者中的微生物丛多样性。先前已经表明肠微生物组与多种癌症之间的联系。举例来说,来自结肠直肠癌患者的粪便样品的分类学分析显示与健康患者相比微生物丛的多样性下降。因此,增加微生物丛的多样性不仅可以预防或治疗特征为微生物组多样性降低的疾病,而且还有利地帮助预防或治疗例如结肠直肠癌的癌症。

[0090] 组合物用于展现或预期展现例如与健康受试者或一群健康受试者相比微生物从多样性的稳定性降低的受试者中。治疗或预防可以包括将受试者诊断为具有降低的微生物从稳定性的步骤,且接着如果发现存在降低的稳定性,那么用根据本发明的组合物治疗受试者。

[0091] 如本文所定义的包含肠球菌属细菌菌株的组合物还可以与环磷酰胺组合用于治疗癌症、炎性病症或自身免疫性疾病。

[0092] 可以使用标准技术,例如实施例中使用的qPCR技术,在来自受试者的粪便中检测微生物丛中的细菌。

[0093] 受试者可以是婴儿(0-1岁之间的受试者)、儿童(1-18岁之间的受试者)或成年人(年龄超过18岁的受试者)。受试者可以是健康受试者,其中组合物可以用于预防疾病,任选地健康受试者可以是被确定为处于显现特征为微生物丛多样性降低的疾病风险下的受试者。

[0094] 受试者可以先前已经接受、正接受或将接受抗生素治疗(例如施用根据本发明的组合物的一周或一个月内)。治疗可以包括在抗生素治疗后、与抗生素治疗一起或在抗生素治疗前施用本发明的组合物。本发明的组合物和一种或多种抗生素可以分开、同时或相继施用。

[0095] 本发明的组合物可以用于增加和/或稳定呼吸中氢水平相对于健康受试者增加的受试者中的微生物丛多样性的方法中。本发明的组合物可以用于降低展现或预期展现微生物丛多样性的水平和/或微生物丛稳定性降低的受试者的呼吸中的氢水平。受试者可以是被诊断为患有癌症的受试者。用本发明的组合物治疗降低在氢呼吸测试中检测到的氢水平。因此,优选使用氢呼吸测试评定氢水平。氢呼吸测试为本领域中众所周知的,因此技术人员将知道如何进行此类测试并且可以包括向受试者施用乳果糖。

[0096] 氢呼吸测试也是一种适用于监测在使用本发明的组合物或组合疗法治疗后增加或稳定微生物丛多样性的效力或可能效力的工具。举例来说,在用本发明的组合物或组合疗法治疗后在受试者呼吸中检测到的氢水平的降低可以指示治疗正增加受试者中的微生物丛多样性。因此,本发明的方法和用途进一步包括在用本发明的组合物治疗期间和/或用本发明的组合物治疗后监测受试者呼吸中的氢水平,从而评定增加受试者中的微生物丛多样性的效力或可能效力。举例来说,可以根据需要在一个或多个(例如1个、2个、3个、4个或超过4个)时间,包括治疗前、治疗开始时、治疗期间、治疗结束时和/或治疗后,监测氢水平。在给药期(在此期间向受试者施用组合物)结束时和/或给药期后受试者呼吸中的氢水平与给药期开始时和/或给药期前的水平相比,且水平降低指示增加受试者中的微生物丛多样性的效力或可能效力。可以在多个时间测量受试者呼吸中的氢水平。举例来说,如果给药期为16天,那么可能需要在第1天和第16天,或例如在第1天、第2天、第15天和第16天测量。可以进行多次测量,且获得那些测量的平均值(例如第1天与第2天的平均值和第15天与第16天的平均值)。氢水平C<sub>max</sub>降低至少40ppm表明组合物有效或可能有效地增加受试者中的微生物丛多样性。氢呼吸测试为一种标准分析,因此本领域中已知预定水平。

[0097] 本发明人已经展示在施用如本文定义的包含肠球菌属的细菌菌株的组合物后人肠道巴恩斯氏菌的丰度增加,如本说明书的实施例所证明。生物体已经显示具有免疫刺激作用。更具体地说,生物体已经显示通过产生IFN的T细胞渗入癌症病变中,促进环磷酰胺诱

导的治疗性免疫调节作用。此外,人肠道巴恩斯氏菌的特定记忆Th1细胞免疫响应选择性地预测用化学免疫疗法治疗的晚期肺癌和卵巢癌患者中的无进展存活期更长[38]。通过使用包含肠球菌属的细菌菌株的组合物,因此本发明升高人肠道巴恩斯氏菌的水平且因此促进环磷酰胺功效。因此,本发明的组合疗法尤其可用于治疗已知受益于环磷酰胺治疗的疾病,因为所述组合将提高治疗功效。可以用环磷酰胺治疗的已知疾病包括癌症、炎性病症和自身免疫性病症。

[0098] 通过施用本发明的组合物,不仅稳定微生物组多样性(如果未增加),还增加人肠道巴恩斯氏菌的丰度。因此,本发明的组合物尤其可用于稳定或改善癌症患者中的微生物组多样性。

[0099] 因此,本发明的组合物可以升高人肠道巴恩斯氏菌物种的水平。技术人员将了解此升高是相对于在施用组合物前人肠道巴恩斯氏菌物种的水平。

[0100] 已经报导人肠道巴恩斯氏菌提高环磷酰胺的免疫调节作用[38]。因此,实施例中的数据证实包含鹑鸡肠球菌物种的细菌菌株的组合物与环磷酰胺的组合尤其有用。因此,根据本发明的一方面,提供包含肠球菌属种属的细菌菌株的组合物与环磷酰胺的组合在疗法中的用途。优选地,细菌菌株属于鹑鸡肠球菌物种。

[0101] 在此类实施方案中,可以施用包含肠球菌属的细菌菌株的组合物以升高患者胃肠道中人肠道巴恩斯氏菌的水平,从而提高环磷酰胺的免疫调节作用。

[0102] 在本发明的此方面的实施方案中,包含肠球菌属的细菌菌株的组合物与环磷酰胺的组合可以用于治疗癌症。举例来说,组合可以用于在癌症治疗中减小肿瘤尺寸、减少肿瘤生长或减少血管生成。

[0103] 在某些实施方案中,组合用于治疗或预防结肠直肠癌,例如结肠癌,优选结肠直肠腺癌。在一些实施方案中,癌症在肠部。在其它实施方案中,组合用于治疗或预防肺癌、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、卵巢癌、乳腺癌(尤其癌瘤)、小细胞肺癌、神经母细胞瘤、肉瘤、视网膜母细胞瘤、腺癌(尤其卵巢腺癌)或肝癌。在其它实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防癌瘤。

[0104] 在实施方案中,包含肠球菌属的细菌菌株的组合物与环磷酰胺的组合可用于治疗自身免疫性或炎性疾病。可以用所述组合治疗的疾病(已知对用环磷酰胺治疗起反应)的实例包括在器官移植后和在准备骨髓移植中的肾病综合征、全身性红斑狼疮、伴多血管炎的肉芽肿病、再生障碍性贫血、显微镜下多血管炎、多发性结节性动脉炎、伴多血管炎的嗜酸性球性肉芽肿病(查格-施特劳斯综合征(Churg-Strauss syndrome))、白塞氏综合征(Behçet syndrome)、中枢神经系统的原发性脉管炎、孤立性血管炎性神经病。一般地,本发明的组合物与环磷酰胺的组合将用于如下疾病,其中预期罹患所述疾病的受试者中的微生物从多样性的增加和/或稳定为有益的。

[0105] 除对人肠道巴恩斯氏菌的水平具有积极作用(和改善微生物组多样性)外,还在实施例中有利地证明所述组合物升高许多产生短链脂肪酸的细菌,包括来自毛螺菌科和罗斯氏菌种属的细菌的水平。属于那些种属的生物体已经与包括炎性肠病(在生物体属于罗斯氏菌种属的情况下[39])和重量减轻(在毛螺菌科种属的成员的情况下)的若干疾病的治疗有关。

[0106] 因此本发明的组合物可以升高毛螺菌科和/或罗斯氏菌属物种的水平。技术人员

将了解此升高是相对于在施用组合物前毛螺菌科和/或罗斯氏菌属物种(相应地)的水平。

[0107] 所述实施例证明所述组合物可以增加来自毛螺菌科种属的细菌的丰度。人类微生物丛中来自毛螺菌科种属的细菌的水平的降低与例如炎性肠病( IBD)、溃疡性结肠炎和克罗恩氏病(Crohn's disease)的胃肠道疾病有关[40]。已经显示环磷酰胺治疗降低包括来自毛螺菌科种属的细菌物种的许多细菌物种的水平[41]。

[0108] 因此,在一些实施方案中,包含肠球菌属的细菌菌株的组合物与环磷酰胺的组合可以用于升高胃肠道中毛螺菌科种属的水平。施用环磷酰胺与肠球菌属的细菌菌株的组合预防与环磷酰胺治疗有关的毛螺菌科细菌种属的相关下降。升高毛螺菌科种属的水平可以预防或治疗胃肠道疾病,例如炎性肠病、溃疡性结肠炎和克罗恩氏病。

[0109] 本发明的组合物进一步显示影响梭状芽孢杆菌属物种的水平。这些生物体已经与免疫系统的调节和预防和治疗自身免疫性、感染性和过敏性疾病的功效有关。

[0110] 所述实施例亦显示本发明的组合物可以升高来自别样杆菌属(Alistipes)的细菌的水平。罹患IBD的患者的微生物丛多样性下降。与健康对照物相比显著消耗的分类群包括来自别样杆菌属和巴恩斯氏菌种属的细菌[42]。因此,本发明的组合物可用于治疗或预防胃肠道疾病,例如炎性肠病、溃疡性结肠炎和克罗恩氏病。本发明的组合物可以通过升高来自别样杆菌属和/或巴恩斯氏菌种属的细菌的水平来治疗胃肠道疾病,例如炎性肠病、溃疡性结肠炎和克罗恩氏病。

[0111] 已经在所述实施例中证明本发明的组合物对戊糖磷酸途径发挥有限作用,如包括5-磷酸核糖、4-磷酸赤藓糖和7-磷酸景天庚酮糖的代谢物的形成减少所表征。

[0112] 再次,本发明的组合物的此特性是有利的,因为已经暗示此途径具有帮助糖酵解性癌细胞处理氧化应激的保护作用,因此可以对肿瘤细胞提供保护。文献已进一步显示6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏可防止癌症、尤其乳腺癌、结肠直肠癌等,且戊糖磷酸途径的成员增加与癌症患者中的不良结果有关[43, 44]。因此,当本发明的组合物用于促进将受益于戊糖磷酸途径减少的受试者(例如癌症患者)中微生物组的多样性时,其可另外发挥此作用。

[0113] 因此,根据本发明的其它方面,提供一种包含肠球菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于减少需要此类治疗,例如处于患有由磷酸戊糖的功能正常或升高引起或加重的疾病的风险下或经诊断患有所述疾病的受试者中与戊糖磷酸途径有关的至少一种代谢物在体内的形成。举例来说,代谢物可以是5-磷酸核糖、4-磷酸赤藓糖和7-磷酸景天庚酮糖。

[0114] 本发明的组合物可以用于改善和/或稳定先前已接受化学疗法的患者中的微生物丛多样性。本发明的组合物可以用于改善和/或稳定对化学疗法治疗已不耐受的患者中的微生物丛多样性。

[0115] 本发明的组合物还可以用于增加和/或稳定经诊断患有以下疾病的患者中的微生物丛多样性:急性淋巴母细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)、急性骨髓性白血病、肾上腺皮质癌、基细胞癌瘤、胆管癌、膀胱癌、骨肿瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、类癌瘤肿瘤、子宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性脊髓增生病、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌肿瘤、胃

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

[0116] 本发明的组合物可以用于增加和/或稳定用其它治疗剂治疗的患者中的微生物从多样性。本发明的组合物可以与抗癌剂组合。优选地，本发明提供了一种组合物，所述组合物包含鹑鸡肠球菌物种的细菌菌株和抗癌剂。优选地，抗癌剂为免疫检查点抑制剂、靶向抗体免疫疗法、CAR-T细胞疗法、溶瘤病毒或抑制细胞生长药物。在优选实施方案中，组合物包含选自由以下组成的组的抗癌剂：Yervoy (易普利单抗 (ipilimumab) , BMS) ; Keytruda (派姆单抗 (pembrolizumab) , Merck) ; Opdivo (纳武单抗 (nivolumab) , BMS) ; MEDI4736 (AZ/MedImmune) ; MPDL3280A (Roche/Genentech) ; 曲美替单抗 (Tremelimumab) (AZ/MedImmune) ; CT-011 (皮利珠单抗 (pidilizumab) , CureTech) ; BMS-986015 (利鲁单抗 (lirilumab) , BMS) ; MEDI0680 (AZ/MedImmune) ; MSB-0010718C (Merck) ; PF-05082566 (Pfizer) ; MEDI6469 (AZ/MedImmune) ; BMS-986016 (BMS) ; BMS-663513 (优瑞路单抗 (uracilumab) , BMS) ; IMP321 (Prima Biomed) ; LAG525 (Novartis) ; AR GX-110 (arGEN-X) ; PF-05082466 (Pfizer) ; CDX-1127 (瓦利路单抗 (valilumab) , CellDex Therapeutics) ; TRX-518 (GITR公司) ; MK-4166 (Merck) ; JTX-2011 (Jounce Therapeutics) ; ARGX-115 (arGEN-X) ; NLG-9189 (英多莫德 (indoximod) , NewLink Genetics) ; INCB024360 (Incyte) ; IPH2201 (Innate Immunotherapeutics/AZ) ; NLG-919 (NewLink Genetics) ; 抗VISTA (JnJ) ; 依帕斯塔特 (Epacadostat) (INCB24360, Incyte) ; F001287 (Flexus/BMS) ; CP 870893 (University of Pennsylvania) ; MGA271 (MacroGenix) ; 依玛珠单抗 (Emactuzumab) (Roche/Genentech) ; 加尼斯替 (Galunisertib) (Eli Lilly) ; 优库路单抗 (Ulocumab) (BMS) ; BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics) ; 巴维昔单抗 (Bavituximab) (Peregrine Pharmaceuticals) ; CC 90002 (Celgene) ; 852A (Pfizer) ; VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals) ; IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals) ; LY2157299 (Eli Lilly) ; EW-7197 (Ewha Women's University, Korea) ; 威罗菲尼 (Vemurafenib) (Plexxikon) ; 达拉菲尼 (Dabrafenib) (Genentech/GSK) ; BMS-777607 (BMS) ; LZ945 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre) ; Unituxin (地佐昔单抗 (dinutuximab) , United Therapeutics Corporation) ; Blincyto (布林莫单抗 (blinatumomab) , Amgen) ; Cyramza (雷莫芦单抗 (ramucirumab) , Eli Lilly) ; Gazyva (欧努珠单抗 (obinutuzumab) , Roche/Biogen) ; Kadlecra (阿多曲妥珠单抗恩他新 (ado-trastuzumab emtansine) , Roche/Genentech) ; Perjeta (帕妥珠单抗 (pertuzumab) , Roche/Genentech) ; Adcetris (布瑞西单抗维多新 (brentuximab vedotin) , Takeda/Millennium) ; Arzerra (奥法木单抗 (ofatumumab) , GSK) ; Vectibix (帕尼单抗 (panitumumab) , Amgen) ; Avastin (贝伐单抗 (bevacizumab) , Roche/Genentech) ; Erbitux (西妥昔单抗 (cetuximab) , BMS/Merck) ; Bexxar (托西莫单抗 (tositumomab) -I131, GSK) ; Zevalin (替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan) , Biogen) ; Campath (阿仑单抗 (alemtuzumab) , Bayer) ; Mylotarg (吉妥珠单抗奥唑米星 (gemtuzumab ozogamicin) , Pfizer) ; Herceptin (曲妥珠单抗 (trastuzumab) , Roche/Genentech) ; Rituxan (利妥昔单抗 (rituximab) ,

Genentech/Biogen) ; 伏洛昔单抗 (volociximab) (Abbvie) ; 艾那维单抗 (Enavatuzumab) (Abbvie) ; ABT-414 (Abbvie) ; 埃罗妥珠单抗 (Elotuzumab) (Abbvie/BMS) ; ALX-0141 (Ablynx) ; 奥扎利单抗 (Ozaralizumab) (Ablynx) ; 埃替单抗 (Actimab)-C (Actinium) ; 埃替单抗-P (Actinium) ; 米拉珠单抗-多柔比星 (Milatuzumab-dox) (Actinium) ; Emab-SN-38 (Actinium) ; 伊土莫单抗 (Naptumonmab estafena tox) (Active Biotech) ; AFM13 (Affimed) ; AFM11 (Affimed) ; AGS-16C3F (Agensys) ; AGS-16M8F (Agensys) ; AGS-22ME (Agensys) ; AGS-15ME (Agensys) ; GS-67E (Agensys) ; ALXN6000 (萨玛利单抗 (samalizumab) , Alexion) ; ALT-836 (Altor Bioscience) ; ALT-801 (Altor Bioscience) ; ALT-803 (Altor Bioscience) ; AMG780 (Amgen) ; AMG228 (Amgen) ; AMG820 (Amgen) ; AMG172 (Amgen) ; AMG595 (Amgen) ; AMG110 (Amgen) ; AMG232 (阿达木单抗 (adecatumumab) , Amgen) ; AMG211 (Amgen/MedImmune) ; BAY20-10112 (Amgen/Bayer) ; 瑞洛土单抗 (Rilotumumab) (Amgen) ; 戴诺素单抗 (Denosumab) (Amgen) ; AMP-514 (Amgen) ; MEDI575 (AZ/MedImmune) ; MEDI3617 (AZ/MedImmune) ; MEDI6383 (AZ/MedImmune) ; MEDI551 (AZ/MedImmune) ; 帕莫西单抗 (Moxetumomab pasudotox) (AZ/MedImmune) ; MEDI565 (AZ/MedImmune) ; MEDI0639 (AZ/MedImmune) ; MEDI0680 (AZ/MedImmune) ; MEDI562 (AZ/MedImmune) ; AV-380 (AVEO) ; AV203 (AVEO) ; AV299 (AVEO) ; BAY79-4620 (Bayer) ; 拉安土单抗 (Anetumab ravtansine) (Bayer) ; 万替珠单抗 (vanti ctumab) (Bayer) ; BAY94-9343 (Bayer) ; 西罗珠单抗 (Sibrotuzumab) (Boehringer Ingelheim) ; BI-836845 (Boehringer Ingelheim) ; B-701 (Bionostics) ; BIIB015 (Biogen) ; 欧努珠单抗 (Biogen/Genentech) ; BI-505 (Bionvent) ; BI-1206 (Bioinvent) ; TB-403 (Bioinvent) ; BT-062 (Biotech) ; BIL-010t (Biosceptre) ; MDX-1203 (BMS) ; MDX-1204 (BMS) ; 奈西莫单抗 (Necitumumab) (BMS) ; CAN-4 (Cantargia AB) ; CDX-011 (Celldex) ; CDX1401 (Celldex) ; CDX301 (Celldex) ; U3-1565 (Daiichi Sankyo) ; 帕曲土单抗 (patritumab) (Daiichi Sankyo) ; 替加土单抗 (tagatuzumab) (Daiichi Sankyo) ; 尼妥珠单抗 (nimotuzumab) (Daiichi Sankyo) ; DS-8895 (Daiichi Sankyo) ; DS-8873 (Daiichi Sankyo) ; DS-5573 (Daiichi Sankyo) ; MORab-004 (Eisai) ; MORab-009 (Eisai) ; MORab-003 (Eisai) ; MORab-066 (Eisai) ; LY3012207 (Eli Lilly) ; LY2875358 (Eli Lilly) ; LY2812176 (Eli Lilly) ; LY3012217 (Eli Lilly) ; LY2495655 (Eli Lilly) ; LY3012212 (Eli Lilly) ; LY3012211 (Eli Lilly) ; LY3009806 (Eli Lilly) ; 西妥木单抗 (cixutumumab) (Eli Lilly) ; 法拉维单抗 (Flavotumab) (Eli Lilly) ; IMC-TR1 (Eli Lilly) ; 雷莫芦单抗 (Eli Lilly) ; 塔巴木单抗 (Tabalumab) (Eli Lilly) ; 扎诺利单抗 (Zanolimumab) (Emergent Biosolution) ; FG-3019 (FibroGen) ; FPA008 (Five Prime Therapeutics) ; FP-1039 (Five Prime Therapeutics) ; FPA144 (Five Prime Therapeutics) ; 卡妥索单抗 (catumaxomab) (Fresenius Biotech) ; IMAB362 (Ganymed) ; IMAB027 (Ganymed) ; HuMax-CD74 (Genmab) ; HuMax-TFADC (Genmab) ; GS-5745 (Gilead) ; GS-6624 (Gilead) ; OMP-21M18 (登西珠单抗 (demcizumab) , GSK) ; 马帕木单抗 (mapatumumab) (GSK) ; IMGN289 (ImmunoGen) ; IMGN901 (ImmunoGen) ; IMGN853 (ImmunoGen) ; IMGN529 (ImmunoGen) ; IMMU-130 (Immunomedics) ; 米拉珠单抗-多柔比星 (Immunomedics) ; IMMU-115 (Immunomedics) ; IMMU-132 (Immunomedics) ; IMMU-106 (Immunomedics) ; IMMU-102 (Immunomedics) ; 依帕珠单抗 (Epratuzumab) (Immunomedics) ; 克利瓦单抗 (Clivatuzumab) (Immunomedics) ; IPH41

(Innate Immunotherapeutics) ; 达拉单抗 (Daratumumab) (Janssen/Genmab) ; CNT0-95 (Intetumumab, Janssen) ; CNT0-328 (西妥昔单抗 (siltuximab), Janssen) ; KB004 (KaloBios) ; 莫加利单抗 (mogamulizumab) (Kyowa Hakko Kirrin) ; KW-2871 (依美昔单抗 (ecromeximab), Life Science) ; 索奈珠单抗 (Sonepcizumab) (Lpath) ; 马士西单抗 (Margetuximab) (Macrogenics) ; 恩利珠单抗 (Enoblituzumab) (Macrogenics) ; MGD006 (Macrogenics) ; MGF007 (Macrogenics) ; MK-0646 (达洛珠单抗 (dalotuzumab), Merck) ; MK-3475 (Merck) ; Sym004 (Sympogen/Merck Serono) ; DI17E6 (Merck Serono) ; MOR208 (Morphosys) ; MOR202 (Morphosys) ; Xmab5574 (Morphosys) ; BPC-1C (恩斯土单抗 (ensituximab), Precision Biologics) ; TAS266 (Novartis) ; LFA102 (Novartis) ; BHQ880 (Novartis/Morphosys) ; QGE031 (Novartis) ; HCD122 (卢卡木单抗 (lucatumumab), Novartis) ; LJM716 (Novartis) ; AT355 (Novartis) ; OMP-21M18 (登西珠单抗, OncoMed) ; OMP52M51 (Oncomed/GSK) ; OMP-59R5 (Oncomed/GSK) ; 万替珠单抗 (Oncomed/Bayer) ; CMC-544 (奥英妥珠单抗 (inotuzumab ozogamicin), Pfizer) ; PF-03446962 (Pfizer) ; PF-04856884 (Pfizer) ; PSMA-ADC (Progenics) ; REGN1400 (Regeneron) ; REGN910 (奈瓦库单抗 (nesvacumab), Regeneron/Sanofi) ; REGN421 (恩替库单抗 (enotumab), Regeneron/Sanofi) ; RG7221、RG7356、RG7155、RG7444、RG7116、RG7458、RG7598、RG7599、RG7600、RG7636、RG7450、RG7593、RG7596、DCDS3410A、RG7414 (帕萨珠单抗 (parsatuzumab)) ; RG7160 (伊佳珠单抗 (imgatuzumab)) ; RG7159 (欧宾珠单抗 (obintuzumab)) ; RG7686、RG3638 (欧奈珠单抗 (onartuzumab)) ; RG7597 (Roche/Genentech) ; SAR307746 (Sanofi) ; SAR566658 (Sanofi) ; SAR650984 (Sanofi) ; SAR153192 (Sanofi) ; SAR3419 (Sanofi) ; SAR256212 (Sanofi) ; SGN-LIV1A (林妥珠单抗 (lintuzumab), Seattle Genetics) ; SGN-CD33A (Seattle Genetics) ; SGN-75 (马维珠单抗 (vorsetuzumab mafodotin), Seattle Genetics) ; SGN-19A (Seattle Genetics) ; SGN-CD70A (Seattle Genetics) ; SEA-CD40 (Seattle Genetics) ; 替伊莫单抗 (Sipuleucel-T) ; MLN0264 (Takeda) ; 加尼妥单抗 (ganitumab) (Takeda/Amgen) ; CEP-37250 (Teva) ; TB-403 (Thrombogenic) ; VB4-845 (Viventia) ; Ximab2512 (Xencor) ; Xmab5574 (Xencor) ; 尼妥珠单抗 (YM Biosciences) ; 卡路单抗 (Carlumab) (Janssen) ; NY-ESO TCR (Adaptimmune) ; MAGE-A-10TCR (Adaptimmune) ; CTL019 (Novartis) ; JCAR015 (Juno Therapeutics) ; KTE-C19 CAR (Kite Pharma) ; UCART19 (Cellceutis) ; BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals) ; BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals) ; ATTCK20 (Unum Therapeutics) ; CAR-NKG2D (Celyad) ; Onyx-015 (Onyx Pharmaceuticals) ; H101 (Shanghai Sunwaybio) ; DNX-2401 (DNAtrix) ; VCN-01 (VCN Biosciences) ; Colo-Ad1 (PsiOxus Therapeutics) ; ProstAtak (Advantagene) ; Oncos-102 (Oncos Therapeutics) ; CG0070 (Cold Genesys) ; Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics) ; GL-0NC1 (Genelux) ; T-VEC (Amgen) ; G207 (Medigene) ; HF10 (Takara Bio) ; SEP-REHVIR (HSV1716, Virttu Biologics) ; OrienX010 (OrienGene Biotechnology) ; Reolysin (Oncolytics Biotech) ; SVV-001 (Neotropix) ; Cacatak (CVA21, Viralytics) ; Alimta (Eli Lilly) 、顺铂 (cisplatin) 、奥沙利铂 (oxaliplatin) 、伊立替康 (irinotecan) 、亚叶酸 (folinic acid) 、甲氨蝶呤 (methotrexate) 、环磷酰胺 (cyclophosphamide) 、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) 、Zykadia (Novartis) 、Tafinlar (GSK) 、Xalkori (Pfizer) 、Iressa (AZ) 、Gilotrif (Boehringer

Ingel heim)、Tarcevea (Astellas Pharma)、Halaven (Eisai Pharma)、Veliparib (Abbvie)、AZD9291 (AZ)、阿雷替尼 (Alectinib) (Chugai)、LDK378 (Novartis)、盖纳特皮 (Genetespib) (Synta Pharma)、Tergenpumatuce 1-L (NewLink Genetics)、GV1001 (Kael-GemVax)、替瓦替尼 (Tivantinib) (ArQuile)；Cytoxan (BMS)；Oncovin (Eli Lilly)；阿霉素 (Adriamycin) (Pfizer)；Gemzar (Eli Lilly)；Xeloda (Roche)；Ixempra (BMS)；Abraxane (Celgene)；Trelstar (Debiopharm)；Taxotere (Sanofi)；Nexavar (Bayer)；IMMU-132 (Immunomedics)；E7449 (Eisai)；Thermodox (Celsion)；Cometriq (Exelixis)；Lonsurf (Taiho Pharmaceuticals)；Camptosar (Pfizer)；UFT (Taiho Pharmaceuticals)；和TS-1 (Taiho Pharmaceuticals)。

[0117] 施用模式

[0118] 优选地，本发明的组合物待施用胃肠道，以能够传递至肠和/或使本发明的细菌菌株部分或全部定殖肠部。一般地，虽然本发明的组合物经口施用，但其可以经直肠、经鼻内或经由颊或舌下途径施用。

[0119] 本发明的组合物可以呈泡沫、喷雾或凝胶形式施用。本发明的组合物可以呈栓剂，例如直肠栓剂，例如呈可可豆油(可可脂)、合成硬脂(例如suppocire、witepsol)、甘油基-明胶、聚乙二醇或肥皂甘油组合物的形式施用。

[0120] 本发明的组合物可以经由管，例如鼻饲管、口胃管、胃管、空肠造口管(J型管)、经皮内窥镜胃造口术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG)或端口，例如通向胃、空肠和其它合适进入埠的胸壁端口施用至胃肠道。

[0121] 本发明的组合物还可以被调配用于静脉内、经直肠、经舌下、经皮下或经鼻施用。

[0122] 本发明的组合物可以施用一次，或其可以作为治疗方案的一部分相继施用。举例来说，本发明的组合物可以每日施用。

[0123] 有时根据本发明的治疗可以伴随有患者肠微生物丛的评估。如果本发明的菌株传递和/或部分或全部定殖未实现，使得功效未观察到，那么可以重复治疗，或者如果传递和/或部分或全部定殖成功且观察到功效，那么可以停止治疗。

[0124] 本发明的组合物可以施用于怀孕动物，例如哺乳动物，例如人类，以促进后代出生后微生物丛多样性的增加和/或微生物丛的稳定性。

[0125] 本发明的组合物可以施用于已经被鉴别为具有异常肠微生物丛的患者。举例来说，患者可以具有减少或缺乏的鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌的定殖。

[0126] 本发明的组合物可以作为食品，例如营养增补剂施用。

[0127] 优选地，本发明的组合物用于治疗人类，不过其可以用于治疗动物，包括单胃哺乳动物，例如家禽、猪、猫、犬、马或兔。本发明的组合物可用于增强动物的生长和效能。如果施用于动物，那么可以使用经口管饲法。

[0128] 在其中包含鹑鸡肠球菌物种的细菌菌株的组合物与环磷酰胺组合用于疗法中的本发明的实施方案中，环磷酰胺可以作为组合物的一部分施用或其可以分开施用。在环磷酰胺分开施用的情况下，其可以同时(例如在医护专业人员同一次问诊期间)或相继给予。其还可以经由与本发明的组合物相同的途径给予，或其可以不同方式施用。

[0129] 优选地，环磷酰胺经口或静脉内(任选地经由注射或输注)施用。在经口施用环磷酰胺的情况下，其可以在1000mg或更少、800mg或更少、500mg或更少或者200mg或更少的日

剂量下给予。日剂量可以介于10–500mg、50–250mg或80–150mg之间。在静脉内施用环磷酰胺的情况下,其可以在500至2000mg的日剂量下给予。

[0130] 组合物

[0131] 一般地,本发明的组合物包含细菌。组合物可以呈冻干形式调配。举例来说,本发明的组合物可以包含含有如上所述的细菌菌株的颗粒或明胶胶囊,例如硬明胶胶囊。

[0132] 可替代地,本发明的组合物可以包含活的活性细菌培养物。因此,本发明组合物中的细菌菌株尚未灭活,尚未杀死,和/或例如尚未热减毒。本发明组合物中的细菌菌株能存活,和/或能够部分或完全定殖肠部。组合物可以包含活细菌菌株与已经杀死的细菌菌株的混合物。

[0133] 本发明的组合物可以进行囊封以能够传递细菌菌株至肠。囊封保护组合物免于降解,直至通过例如用化学或物理刺激,例如压力、酶活性或物理性崩解(其可以通过pH值改变而触发)进行破裂而在目标位置传递。可以使用任何适当的囊封法。示例性囊封技术包括截留在多孔基质内、附着或吸附在固体载体表面上、通过絮凝或利用交联剂而自我凝聚以及机械容纳在微孔膜或微胶囊后。关于可用于制备本发明的组合物的囊封的指导可以在例如参考文献[45]和[46]中获得。

[0134] 组合物可以经口施用并且可以呈片剂、胶囊或粉剂形式。囊封产品为优选的,因为鹑鸡肠球菌为厌氧菌。其它成分(例如维生素C)可以作为除氧剂和益生基质包括以改善体内传递和/或部分或全部定殖和存活。可替代地,本发明的益生组合物可以作为食品或营养产品,例如基于牛奶或乳清的发酵乳制品,或作为药品经口施用。

[0135] 组合物可被调配为益生菌。

[0136] 本发明的组合物包括治疗有效量的本发明的细菌菌株。治疗有效量的细菌菌株足以对患者发挥有益作用。治疗有效量的细菌菌株可以足够传递至患者肠和/或部分或全部定殖患者肠部。细菌菌株的治疗有效量可以通过与未经处理的对照物相比,比较所关注的细菌菌株在如先前描述的体外或体内模型中发挥显著相关治疗作用的能力来确定。

[0137] 例如适合于成年人的细菌日剂量可以是约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 菌落形成单位(colony forming unit,CFU);例如约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU;在另一实例中,约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU。组合物可以含有相对于组合物的重量,约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{11}$ CFU/g,例如约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{10}$ CFU/g的量的细菌菌株。剂量可以是例如1g、3g、5g和10g。

[0138] 典型地,益生菌,例如本发明的组合物,任选地与至少一种合适的益生化合物组合。益生化合物通常为不易消化的碳水化合物,例如寡糖或多糖,或糖醇,其在上部消化道中不降解或吸收。已知的益生菌包括商业产品,例如菊糖和反式半乳寡糖。

[0139] 本发明的益生组合物可以包括相对于组合物总重量,约1重量%至约30重量%(例如5重量%至20重量%)的量的益生化合物。碳水化合物可以选自由以下组成的组:果寡糖(或FOS)、短链果寡糖、菊糖、异麦芽寡糖、果胶、木寡糖(或XOS)、几丁寡糖(或COS)、 $\beta$ -葡聚糖、阿拉伯胶改性和抗性淀粉、聚葡萄糖、D-塔格糖、阿拉伯胶纤维、角豆树、燕麦和柑桔纤维。在一个方面,益生菌为短链果寡糖(下文中简单起见展示为FOSs-c.c);所述FOSs-c.c为不可消化的碳水化合物,一般由甜菜糖转变获得并且包括三个葡萄糖分子键结的蔗糖分子。

[0140] 本发明的组合物可以包含药学上可接受的赋形剂或载体。此类合适赋形剂的实例

可见于参考文献[47]中。用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂是医药领域中众所周知的并描述于例如参考文献[48]中。合适载体的实例包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇、山梨糖醇等等。合适稀释剂的实例包括乙醇、甘油和水。医药载体、赋形剂或稀释剂的选择可以针对预期施用途径和标准医药实践来选择。药物组合物可以包含任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂作为载体、赋形剂或稀释剂或除载体、赋形剂或稀释剂的外可以包含所述物质。合适粘合剂的实例包括淀粉、明胶、天然糖(例如葡萄糖、无水乳糖、自由流动的乳糖、 $\beta$ -乳糖、玉米甜味剂)、天然和合成树胶(例如阿拉伯胶、黄蓍胶)或海藻酸钠、羧甲基纤维素和聚乙二醇。合适润滑剂的实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等等。防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂可以提供于药物组合物中。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。还可以使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0141] 本发明的组合物可以被调配为食品。举例来说,除本发明的治疗作用以外,食品可以提供营养益处,例如在营养增补剂中。类似地,食品可以被调配用于增强本发明组合物的口味,或通过使其更类似于常见食品而非药物组合物,使得组合物食用起来更具吸引力。本发明的组合物被调配为基于牛奶的产品。术语“基于牛奶的产品”意指具有变化脂肪含量的任何基于牛奶或乳清的液体或半固体产品。基于牛奶的产品可以是例如奶牛奶、山羊奶、绵羊奶、脱脂乳、全乳、无任何加工下奶粉与乳清重组的牛奶或加工产品,例如酸奶酪、凝乳、凝块、酸牛奶、酸全乳、酪乳和其它酸牛奶产品。另一重要组包括乳制饮料,例如乳清饮料、发酵牛奶、炼乳、婴儿或婴孩牛奶;增香乳、冰淇淋;含牛奶的食品,例如甜食。

[0142] 本发明的组合物可以含有单一细菌菌株或物种并且可以不含任何其它细菌菌株或物种。所述组合物可以仅仅包含最低限度量或生物学上不相干量的其它细菌菌株或物种。所述组合物可以是基本上不含其它生物体物种的培养物。本发明可以提供一种包含来自鹑鸡肠球菌物种的一个或多个细菌菌株的组合物,所述组合物不含来自任何其它物种的细菌或仅仅包含最低限度量或生物学上不相干量的来自另一物种的细菌,用于疗法中。

[0143] 本发明的组合物可以包含超过一个细菌菌株或物种。举例来说,本发明的组合物包含超过一个来自相同物种的菌株(例如超过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个或45个菌株)并且任选地不含来自任何其它物种的细菌。本发明的组合物可以包含少于50个来自相同物种的菌株(例如少于45个、40个、35个、30个、25个、20个、15个、12个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个或3个菌株)并且任选地不含来自任何其它物种的细菌。本发明的组合物可以包含1-40个、1-30个、1-20个、1-19个、1-18个、1-15个、1-10个、1-9个、1-8个、1-7个、1-6个、1-5个、1-4个、1-3个、1-2个、2-50个、2-40个、2-30个、2-20个、2-15个、2-10个、2-5个、6-30个、6-15个、16-25个或31-50个来自相同物种的菌株并且任选地不含来自任何其它物种的细菌。本发明的组合物可以包含超过一个来自相同种属的物种(例如超过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、12个、15个、17个、20个、23个、25个、30个、35个或40个物种)并且任选地不含来自任何其它种属的细菌。本发明的组合物可以包含少于50个来自相同种属的物种(例如少于50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个、15个、12个、10个、8个、7个、6个、5个、4个或3个物种)并且任选地不含来自任何其它种属的细菌。本发明的组合物包含1-50个、1-40个、1-30个、1-20个、1-15个、1-10个、1-9个、1-8个、1-7个、1-6个、1-5个、1-4个、1-3个、1-2个、2-50个、2-40个、2-30个、2-20个、2-15个、2-10个、2-5个、6-30个、6-15个、16-25个或31-50个来自相同物种的菌株并且任选地不含来自任何其它物种的细菌。

个、2-15个、2-10个、2-5个、6-30个、6-15个、16-25个或31-50个来自相同种属的物种并且任选地不含来自任何其它种属的细菌。本发明可以包含上述细菌的任何组合。

[0144] 组合物可以包含微生物菌群。举例来说,组合物包含具有与SEQ ID N0:2至少95%同一的16S rRNA序列,例如为鹑鸡肠球菌的细菌菌株作为微生物菌群的一部分。举例来说,所述细菌菌株与一个或多个(例如至少2个、3个、4个、5个、10个、15个或20个)来自其可以一起在体内共生在肠中的其它种属的其它细菌菌株组合存在。举例来说,组合物包含具有与SEQ ID N0:2至少95%同一的16S rRNA序列,例如为鹑鸡肠球菌的细菌菌株,与来自不同种属的细菌菌株组合。微生物菌群可以包含两个或更多个从例如人的单一生物体的粪便样品获得的细菌菌株。在自然界中可能未发现组合物中的微生物菌群在一起。举例来说,微生物菌群可以包含从可来自于相同物种,例如两个不同人,例如两个不同人类婴儿或人类婴儿和成年人的至少两个不同生物体的粪便样品获得的细菌菌株。两个生物体还可以来自不同物种,例如两个生物体为人和非人哺乳动物。

[0145] 如果本发明的组合物包含超过一个细菌菌株、物种或种属,那么个别细菌菌株、物种或种属可以分开、同时或相继施用。举例来说,超过一个细菌菌株、物种或种属分开存储,但是在使用前混合在一起。

[0146] 可以从人类婴儿、青少年或成人粪便获得用于本发明的细菌菌株。如果本发明的组合物包含超过一个细菌菌株,那么可以从人类婴儿、青少年或成人粪便获得所有细菌菌株。细菌可以在从人类婴儿粪便获得并用于本发明的组合物后进行培养。

[0147] 根据本发明使用的组合物可能需要或可能不需要销售批准。

[0148] 优选地,本发明的组合物包含冻干细菌。细菌冻干是一种广为接受的程序并且相关指导可在例如参考文献[49-51]中获得。本发明提供了以上药物组合物,其中所述细菌菌株可以喷雾干燥。优选地,本发明提供以上药物组合物,其中细菌菌株为冻干的或喷雾干燥且其中细菌为活的,能存活和/或能够部分或完全定殖肠部。

[0149] 在一些情况下,冻干或喷雾干燥的细菌菌株在施用前复原。在一些情况下,复原通过使用本文中描述的稀释剂进行。

[0150] 本发明的组合物可以包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0151] 根据本发明的组合物可以包含:如本发明中使用的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中细菌菌株在施用于有需要的受试者时量足够增加受试者中的微生物丛多样性。

[0152] 本发明可以提供一种药物组合物,所述药物组合物包含:如本发明中使用的细菌菌株;和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中细菌菌株在施用于有需要的受试者时量足够治疗病症;并且其中病症为经诊断患有脑癌、乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌或结肠癌的受试者中微生物丛多样性和/或微生物丛稳定性减少。

[0153] 组合物中的细菌菌株的量可以是相对于组合物的重量每公克约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 菌落形成单位。

[0154] 组合物可以在1g、3g、5g或10g的剂量下施用。

[0155] 组合物可以通过选自由口腔、直肠、皮下、经鼻、经颊和舌下组成的组的方法施用。

[0156] 组合物可以包含选自由乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇和山梨糖醇组成的组的载体。

[0157] 组合物可以包含选自由乙醇、甘油和水组成的组的稀释剂。

[0158] 组合物可以包含选自由以下组成的组的赋形剂：淀粉、明胶、葡萄糖、无水乳糖、自由流动的乳糖、 $\beta$ -乳糖、玉米甜味剂、阿拉伯胶、黄蓍胶、海藻酸钠、羧甲基纤维素、聚乙二醇、油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠和氯化钠。

[0159] 组合物还可以包含防腐剂、抗氧化剂和稳定剂中的至少一种。防腐剂可以选自由苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯组成的组。

[0160] 组合物可以存储在密封容器中约4°C或约25°C下。容器可以置于具有50%相对湿度的氛围中，在至少约1个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年时期后如以菌落形成单位所测量，至少80%细菌菌株残留。密封容器可以是小袋或瓶子。如本文所述的本发明的组合物还可以提供于注射器中。

[0161] 组合物可以呈药物制剂提供。举例来说，组合物可以呈片剂或胶囊提供，其中胶囊任选地为明胶胶囊（“明胶胶囊”）。

[0162] 本发明的组合物可以经口施用。经口施用可能涉及吞咽，以便化合物进入胃肠道，和/或经颊、经舌或舌下施用，藉此，化合物直接自口腔进入血流。适合于经口施用的药物制剂包括固体塞、固体微粒、半固体和液体（包括多相或分散系统），例如片剂；含有微米粒子或纳米粒子的软胶囊或硬胶囊、液体（例如水溶液）、乳液或粉剂；糖锭（包括填充液体）；咀嚼片；凝胶；快速分散的剂型；薄膜；卵形囊剂；喷雾；和经颊/粘膜粘着贴片。

[0163] 药物制剂可以是肠溶制剂，即适合于通过经口施用传递本发明的组合物至肠的抗胃性制剂（例如对胃pH值有抗性）。当细菌或组合物的另一组分对酸敏感，例如在胃条件下倾向于降解时，肠溶制剂可能特别有用。肠溶制剂包含肠衣，并且可以是肠衣剂型。举例来说，制剂可以是肠衣片剂或肠衣胶囊等等。肠衣可以是常规肠衣，例如用于片剂、胶囊等等进行经口传递的常规包衣。制剂可以包含膜衣，例如肠溶聚合物、例如酸不溶性聚合物的薄膜层。

[0164] 肠溶制剂本质上可以是肠溶性的，例如对胃具有抗性，无需肠衣。因此，制剂为不包含肠衣的肠溶制剂，并且胶囊的制剂可以由热胶凝材料制成。热胶凝材料可以是纤维素材料，例如甲基纤维素、羟甲基纤维素或羟丙基甲基纤维素（HPMC）。胶囊还可以包含不含任何成膜聚合物的壳。壳可以包含羟丙基甲基纤维素并且不包含任何成膜聚合物（例如参见[52]）。制剂可以是本质上肠溶胶囊（例如来自Capsugel的Vcaps®）。

[0165] 制剂可以是软胶囊。软胶囊为由于添加例如丙三醇、山梨糖醇、麦芽糖醇和聚乙二醇等在胶囊壳中存在的软化剂而具有一定弹性和柔软度的胶囊。软胶囊可以例如基于明胶或淀粉产生。基于明胶的软胶囊可以从多个供应商购得。取决于施用方法，例如经口或经直肠，软胶囊可以具有多种形状，它们可以是例如圆形、卵形、长方形或鱼雷形状。软胶囊可以通过常规方法产生，例如通过谢勒法（Scherer process）、阿可法（Accogel process）或液滴或吹制法产生。

[0166] 培养方法

[0167] 用于本发明的细菌菌株可以使用如例如参考文献[53-55]中详述的标准微生物学技术培养。

[0168] 用于培养的固体或液体培养基可以是YCFA琼脂或YCFA培养基。YCFA培养基可以包括（每100ml，近似值）：酪胨（1.0g）、酵母提取物（0.25g）、NaHCO<sub>3</sub>（0.4g）、半胱氨酸（0.1g）、

K<sub>2</sub>HPo<sub>4</sub> (0.045g)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.045g)、NaCl (0.09g)、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.09g)、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.009g)、CaCl<sub>2</sub> (0.009g)、刃天青 (0.1mg)、氯化血红素 (1mg)、生物素 (1μg)、钴胺素 (1μg)、对氨基苯甲酸 (3μg)、叶酸 (5μg) 和吡哆胺 (15μg)。

[0169] 用于疫苗组合物中的细菌菌株

[0170] 本发明人已经确定本发明的细菌菌株可用于增加和/或稳定受试者中的微生物从多样性。这可能是本发明的细菌菌株作用于宿主免疫系统的结果。因此,当作为疫苗组合物施用时,本发明的组合物除维持和/或改善受试者的微生物从多样性外,还可以有利地具有治疗或预防癌症的作用。本发明的细菌菌株能存活,和/或能够部分或完全定殖肠部。本发明的细菌菌株还可以是杀死、灭活或减毒的。用于疫苗中的组合物可以包含疫苗佐剂,并且可以经由注射,例如经由皮下注射施用。

[0171] 通则

[0172] 除非另外指明,否则本发明的实施将采用在本领域技能内的常规化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药理学方法。此类技术在文献中充分解释。参见例如参考文献[56]和[57-63]等。

[0173] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由……组成”,例如“包含”X的组合物可以仅仅由X组成,或可以包括其它某物,例如X+Y。

[0174] 关于数值x的术语“约”是任选地选用的且意指例如x±10%。

[0175] 词语“基本上”不排除“完全”,例如“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时,本发明的定义中可以省略词语“基本上”。

[0176] 除非特别陈述,否则包括多个步骤的工艺或方法可以在方法开始或结束时包括其它步骤,或可以包括其它插入步骤。此外,适当时步骤可以组合,省去或以替代次序进行。

[0177] 本文中描述本发明的多个实施方案。应了解各实施方案中说明的特征都可以与其它所说明的特征组合以提供其它实施方案。具体地说,本文中强调为合适、典型或优选的实施方案可以彼此组合(除非其互斥时)。

[0178] 用于进行本发明的模式

[0179] 方法

[0180] 细菌菌株

[0181] MRX518-鹑鸡肠球菌菌株,NCIMB 42488

[0182] MRX0554-鹑鸡肠球菌菌株,NCIMB 42761

[0183] MRX0858-铅黄肠球菌菌株

[0184] REF 10-鹑鸡肠球菌菌株,DSM100110

[0185] 16S扩增子测序

[0186] 按照制造商的说明书,使用Qiagen DNeasy血液与组织试剂盒,以在第-14天、第0天和第22天从来自经过处理的EMT6-小鼠的0.2g冷冻粪便样品提取微生物DNA。

[0187] 使用Illumina (San Diego, California, USA) 研发的16S测序文库制备Nextera方案制备16S rRNA基因扩增子和进行测序。使用PCR和靶向16S rRNA基因的V3/V4可变区的引物扩增各50ng的DNA粪便提取物。将产物纯化并且通过第二轮接头PCR连接正向和反向条型码。将所得PCR产物纯化,定量,然后汇集等摩尔量的每一种扩增子,接着送去商业供应商GATC有限公司在MiSeq (2×250bp化学) 或HiSeq (2×300bp化学) 平台上测序。

[0188] 微生物组组成数据分析(测序后)

[0189] 将原始序列数据合并且使用快速方法修整。此从读段对产生单一读段并且滤出低品质读段。使用USEARCH管道方法(8.1.1861\_i86\_linux64版)鉴别仅仅由一个读段表示的单元素序列并从OTU(操作分类单位)产生步骤隐藏所述序列。这样做的原因在于这些读段可能不表示真实生物变异,而是由技术变化引起。接着使用UPARSE算法将序列在97%相似性下聚集至OTU。这产生一系列反映数据集内序列变化的代表性序列。使用RDP分级器,针对门至科水平,将这些代表性序列分配至分类学水平,并且APC相关的SPINGO分级器用于种属和物种水平。

[0190] 嵌合序列是来源于两种或更多种生物学上不同的转录物的序列。当由于共享高水平相似性的16S序列退火而使两个序列组合产生新序列时,即使这些序列的来源来自于系统发生学不同的来源,仍然出现嵌合序列。使用UCHIME嵌合体去除算法,利用Chimeraslayer参考数据库(下载:2016年9月9日)去除这些嵌合序列。接着使用USEARCH全域比对算法定位所有读段,包括剩余OTU序列上的单元素,这些单元素现反映初始样品的真实分类学变化。个别序列分组至OTU,得到微生物组组成信息(丰度和多样性)。这些步骤允许估计各样品中的各分类群的丰度。

[0191] 高级数据分析

[0192] 使用以下来研究小生境多样性:1)香农多样性指数,所述指数表示各样品内的分类群数目(丰富度)和其相对丰度(均衡);和2)使用phyloseq文库,每个样品观察到的物种的数目(丰富度)。

[0193] 为了确定组间整体微生物组概况是否存在显著差异,使用R中的Adonis函数,在相异性矩阵上进行置换MANOVA。使用R统计软件中的条形图和boxplot函数绘制箱形图。

[0194] 负二项统计方法(DESeq2方法)用于鉴别在所选比较内丰度显著不同的分类学变数。使用本杰明尼/霍赫伯格方法(Benjamini/Hochberg methodology),针对多重检验调整所产生的原始P值。

[0195] 实施例1-在鹑鸡肠球菌处理后的微生物丛的变化

[0196] 概述

[0197] 在小鼠模型中测试鹑鸡肠球菌和铅黄肠球菌对微生物丛的多样性和稳定性的作用。

[0198] 研究设计

[0199] 将来自乳腺癌模型(EMT6)的小鼠(n=40)用以下处理:细菌菌株MRX518、MRX0554、MRX0858或REF 10,浓度为 $2 \times 10^8$ ;抗CTLA4,浓度为10mL/kg。在第-14天将小鼠用相应细菌菌株处理,在第0天用肿瘤细胞接种。在研究第13天施用抗CTLA4。在研究期间的三个时间点,第-14天、第0天和第22天(研究结束),收集粪便样品。在整个研究中,收集120个粪便样品。

[0200] 在9个样品上未返回数据,因为其无法在测序前进行扩增,或者从测序返回的读段数目过低而无法用于分析。总计n=111个样品返回数据。表1概述了在每个时间点,每个处理组成功返回的样品数目。

处理	MRX518	MRX0554	MRX0858	REF 10	抗 CTLA4
第-14 天(细菌处理)	n=8	n=8	n=8	n=8	n=7
第 0 天 (肿瘤细胞接种)	n=8	n=5	n=7	n=7	n=8
第 22 天 (研究结束)	n=7	n=8	n=6	n=8	n=8

[0201] [0202] 表1:返回数据的每个处理组和时间点的样品数目。

[0203] 结果

[0204] 微生物丛多样性的变化

[0205] 可以在图1a-j中看到第-14天、第0天和第22天处理对微生物丛多样性的作用。这些图与在用鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌细菌菌株处理后观察到的多样性增加一致。举例来说,图1a-d和图1g-h展示用鹑鸡肠球菌细菌菌株处理的小鼠中微生物组多样性增加。图1e-f展示用铅黄肠球菌处理也可以增加小鼠中的微生物组多样性。

[0206] 在整个研究中维持此多样性增加,这与这些细菌菌株能够维持微生物组的稳定性一致。举例来说,图1a-d和图1e-f中第22天的微生物组多样性类似于在第0天观察到的微生物组多样性。这说明鹑鸡肠球菌细菌菌株能够维持微生物组的稳定性。

[0207] 分类群变化

[0208] 重新分析GB1712857.0中公开的数据。与对照组相比时,在处理组中所有三个时间点(第-14天、第0天和第22天),观察到显著不同丰度的分类群,如下表2中所示( $p$ 值<0.05)。 $\uparrow$ 指示处理组中分类群显著增加,并且 $\downarrow$ 指示处理组中分类群显著减少。所引用的图反映了丰度变化(log<sub>2</sub>变化倍数)。表3中概述在每个处理组中每个时间点发现的不同丰度的分类群的数目。

[0209]

	MRX518	MRX554	MRX858	REF 10	抗 CTLA4
第-14 天	细长真杆菌 ( <i>Eubacterium dolichum</i> ) (↑, 3.565)	梭状芽孢杆菌属 XIVa (↓, -4.599)	0	0	粪罗斯氏菌 ( <i>Roseburia faecis</i> ) (↓, -3.98) 解多糖梭状芽孢杆菌( <i>Clostridium polysaccharolyticum</i> ) (↓, -5.131) 梭状芽孢杆菌属 XIVa (↓4.806)
第 0 天	人肠道巴恩斯氏菌 (↓, -3.666) 古氏颤螺菌 ( <i>Oscillospira</i> )	梭状芽孢杆菌属 XIVa (↓, -4.396)	罗斯氏菌属 (↑, 2.554) 梭状芽孢杆菌属 XIVa (↓, -2.227) 毛螺菌科	0	0

	guillermo ndii) (↑, 2.024) 内脏拟杆 菌 ( <i>Odoribac ter splanchni cus</i> ) (↓, -3.094)		(↑, 3.392) 梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↑, 4.676)		
[0210]	第 22 天 毛螺菌科 (↑, 3.483) 梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↓, -3.035) 厚壁门菌 (↑, 4.253) 毛螺菌科 (↑, 3.137) 梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↓, -6.038) 真杆菌属 (↓, -2.373) 梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↓, -4.003) 生酸拟杆 菌 ( <i>Bacteroi des acidifacie ns</i> ) (↑, 2.880) 人肠道巴 恩斯氏菌 (↓, -3.062)	梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↓, -6.731) 梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↓, -3.035) 厚壁门菌 (↑, 4.253) 毛螺菌科 (↑, 3.137) 梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↓, -6.038) 真杆菌属 (↓, -2.373) 梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↓, -4.003) 生酸拟杆 菌 ( <i>Bacteroi des acidifacie ns</i> ) (↑, 2.880) 人肠道巴 恩斯氏菌 (↓, -3.062)	梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↑, 3.594) 梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↓, -5.858) 梭状芽孢 杆菌属 XIVa (↓, -6.077) 解糖梭状 芽孢杆菌 ( <i>Clostridiu m saccharoly ticum</i> ) (↓, -4.884)	梭状芽 孢杆菌 属 XIVa 梭状芽 孢杆菌 属 XIVa 真杆菌 属(↓, -4.999) 梭状芽 孢杆菌 属 XIVa 梭状芽 孢杆菌 属 XIVa 毛螺菌 科(↓, -4.157) 毛螺菌 科(↑, 3.246) 梭状芽 孢杆菌 属 XIVa (↓, -4.213)	梭状芽孢杆菌属 XIVa (↓, -6.145) 毛螺菌科(↑, 3.556) 梭状芽孢杆菌属 XIVa (↓, -6.333) 解糖梭状芽孢杆菌 (↓, -4.576)

[0211] 表2:在EMT6小鼠中,与媒介物对照物相比时,在时间点第-14天、第0天和第22天,在每个处理组中发现的不同丰度的分类群。

	第-14 天→第 0 天	第 0 天→第 22 天	第-14 天→第 22 天
[0212]	<b>MRX518</b> 13	13	17
	<b>MRX0554</b> 2	0	2
	<b>MRX0858</b> 13	0	11
	<b>REF10</b> 11	7	14
	<b>抗 CTLA4</b> 1	9	31

[0213] 表3:在研究时间点之间在每个处理组中发现的不同丰度的分类群的数目。

[0214] 在用细菌菌株鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌处理后,微生物丛的多样性增加并且此增加包括毛螺菌科和罗斯氏菌属的丰度增加。丰度下降的一组生物体为梭状芽孢杆菌属XIVa某些种。

[0215] 数据与鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌的处理一致,产生更稳定的微生物组。

[0216] 实施例2-在鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌处理后的微生物丛多样性的变化

#### 概述

[0218] 测试鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌对微生物丛的多样性或稳定性的作用。

#### 研究设计

[0220] 将来自肺癌模型(LLC)的小鼠(n=48)用以下处理:细菌菌株MRX518、MRX0554、MRX0858或REF 10,浓度为 $2 \times 10^8$ ;抗CTLA4,浓度为10mL/kg;或者未经处理。如果相关抗CTLA4在研究第13天施用,那么在第-14天将小鼠用相应细菌菌株处理,在第0天用肿瘤细胞接种。在第18天研究结束时收集粪便样品。

[0221] 11个样品未返回数据,因为小鼠在收集日期前已经死亡,或者样品无法在测序前进行扩增。总计n=37个样品返回数据。表4概述在每个时间点,每个处理组成功返回的样品数目。

	未经处理	MRX518	MRX0554	MRX0858	REF10	抗 CTLA4
[0222]	第 18 天 (处理结束)	n=5	n=5	n=7	n=7	n=6

[0223] 表4:返回数据的每个处理组和时间点的样品数目。

#### 结果

#### 微生物丛多样性的变化

[0226] 在图2中可以看到第18天处理对微生物丛多样性的变化的作用。与未经处理的对照相比,在用MRX518和MRX0858处理后,香农多样性指数增加,这与鹑鸡肠球菌或铅黄肠球菌细菌菌株能够增加微生物丛的多样性一致。在用MRX554处理后观察到多样性下降。但是,此数据可能是由实验误差产生,因为图1c-d展示此细菌菌株能够增加微生物组多样性。

#### 分类群变化

[0228] 重新分析GB1712857.0中公开的数据。当与对照组相比时,DESeq2分析揭露处理组中不同丰度的分类群,如下表5中所示。↑指示处理组中分类群显著增加,且↓指示处理组中分类群显著减少。所引用的图反映丰度变化(log2变化倍数)。

[0229]

MRX518	MRX554	MRX858	REF 10	抗 CTLA4
双孢梭状芽孢杆菌 ( <i>Clostridium disporicum</i> ) (↓, -3.853) 乳杆菌属 ( <i>Lactobacillus</i> ) (↑, 2.356) 灰色拟普雷沃菌 ( <i>Alloprevotella rava</i> ) (↑, 2.397)	梭状芽孢杆菌属 XIVa (↑, 5.162) 人肠道巴恩斯氏菌(↑, 4.180) 位置未定的毛螺菌属	马西里别样杆菌(Alistipes massiliensis) (↓, -6.215) 马西里别样杆菌 (↓, -7.733)	帕梅戈登氏杆菌	梭状芽孢杆菌属 XIVa (↓, -4.845) 瘤胃菌科 ( <i>Ruminococcaceae</i> ) (↓, -3.044) 双孢梭状芽孢杆菌(↓, -6.256) 瘤胃球菌属 ( <i>Ruminococcus</i> ) (↑, 3.049) 微小产醋菌 ( <i>Acetatifactor muris</i> ) (↑, 3.439)

[0230]

人肠道巴恩斯氏菌(↑, 7.134) 真杆菌属 (↑, 3.548) 肠道罗斯氏菌 ( <i>Roseburia intestinalis</i> ) (↓, -2.911) 细枝真杆菌 ( <i>Eubacterium ramulus</i> ) (↓, -2.430) 人肠道巴恩斯氏菌(↑, 3.392) 人肠道巴恩斯氏菌(↑, 3.716) 人肠道巴恩斯氏菌(↑, 3.157) 人肠道巴恩斯氏菌(↑, 2.298) 帕梅戈登氏杆菌 ( <i>Gordonibacter pamelaeae</i> ) (↑, 4.528) 嗜黏蛋白艾克曼菌 ( <i>Akkermansia muciniphila</i> ) (↑, 5.431)	( <i>Lachnospiracea Incertae sedis</i> ) (↑, 4.303) 人肠道巴恩斯氏菌(↑, 5.978) 绿色梭状芽孢杆菌( <i>Clostridium viride</i> ) (↓, -3.939) 帕梅戈登氏杆菌(↑, 4.095)	人肠道巴恩斯氏菌(↑, 6.473) 血根草苏黎世杆菌 ( <i>Turicibacter sanguinis</i> ) (↑, 3.081) 帕梅戈登氏杆菌(↑, 5.246) 别样杆菌属(↓, -4.532)	(↑, 4.265)	肠道罗斯氏菌(↓, -5.368) 细枝真杆菌(↓, -2.571) 粪罗斯氏菌(↑, 3.251) 毛螺菌科(↓, -2.699) 拉微梭状芽孢杆菌( <i>Clostridium lavalense</i> ) (↓, -1.747) 梭状芽孢杆菌属 XIVa (↓, -4.036) 绿色梭状芽孢杆菌(↓, -3.991) 绳尾真杆菌 ( <i>Eubacterium plexiclaudatum</i> ) (↓, -3.199) 人肠道巴恩斯氏菌(↑, 2.443) 绳尾真杆菌(↓, -2.976) 梭状芽孢杆菌属 XIVa (↑, 4.097) 血根草苏黎世杆菌(↑, 3.371) 丰富欧氏菌 ( <i>Olsenella profusa</i> ) (↑, 3.197) 梭状芽孢杆菌属 XIVa (↓, -3.626) 惰性真杆菌 ( <i>Eubacterium siraeum</i> ) (↑, 3.341)
---	--	---	------------	--

- [0231] 表5:在第18天,与媒介物对照物相比时,每个处理组的不同丰度的分类群数目。
- [0232] 用细菌菌株鶲鸡肠球菌或铅黄肠球菌处理可以增加微生物丛的多样性,尤其毛螺菌科和罗斯氏菌属的比例 (PMID:26416813)。
- [0233] 在用细菌菌株鶲鸡肠球菌或铅黄肠球菌处理后梭状芽孢杆菌属XIVa簇某些种减少。
- [0234] 处理进一步引起人肠道巴恩斯氏菌的选择性富集。此菌株先前已经显示增加肿瘤中产生IFN- $\gamma$ 的 $\gamma$ δT细胞,并且诱导特定记忆Th1细胞免疫响应,因此提供免疫刺激的额外机制[38]。因此,当向受试者施用时,本发明的组合物不仅用于稳定和/或改善那些受试者的微生物丛多样性,而且还促进生物体的生长,这体现在具有抗癌作用,如果那些受试者为癌症患者或受试者被确定为处于癌症风险下,那么这尤其有利。
- [0235] 实施例3-稳定性测试
- [0236] 含有至少一种本文所述细菌菌株的本文所述组合物存储在密封容器中25°C或4°C下并且容器置于具有30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或95%相对湿度的氛围中。1个月、2个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年后,至少50%、60%、70%、80%或90%的细菌菌株应残留,如以通过标准规方案测定的菌落形成单位所测量。
- [0237] 实施例4-代谢组学分析
- [0238] 概述
- [0239] 研究鶲鸡肠球菌对小鼠中微生物丛的代谢组学概况的作用。
- [0240] 研究设计
- [0241] 将来自乳腺癌模型 (EMT6) 的小鼠用200 $\mu$ l的 $2 \times 10^8$ 浓度的MRX518 (n=9)、MRx0518 (n=8)、MRx0554 (n=8)、MRx0858 (n=8) 或REF10-DSM100110 (n=8) 处理;或接受10mL/kg浓度的抗CTLA4 (n=8)。在第-14天开始给予细菌物种。在第0天小鼠植入肿瘤细胞。当肿瘤达到50-70mm<sup>3</sup>的体积时,开始用抗CTLA-4抗体 (10mg/kg, IP) 处理。每3-4天测量肿瘤体积。
- [0242] 从速冻盲肠分离盲肠内含物,并且从粪便浆液分开提取短链脂肪酸、极性和脂质代谢物。通过GC-MS (短链脂肪酸) 和LC-MS分析,使用HILIC (极性代谢物) 和UPLC (脂质代谢物) 分析提取物。通过统计t检验,利用本杰明尼/霍赫伯格校正,在10%的错误发现率下分析数据,以比较未经处理的组与所有其它组。如果p值小于针对各化合物计算的本杰明尼/霍赫伯格临界值 (i/m) Q,那么代谢物为统计上显著的。
- [0243] 用MRX518处理的小鼠的代谢物概况具有显著差异 (表6)。相比之下,抗CTLA-4处理不引起代谢物产生的任何变化。此外,在MRx0518和MRx0554处理期间沿着整个戊糖磷酸途径的代谢物减少。
- [0244] 用MRx0518和MRx0554处理的小鼠也显示戊糖磷酸途径的成员减少,包括5-磷酸核糖、4-磷酸赤藓糖和7-磷酸景天庚酮糖。如以上所讨论,这是有利的,因为此途径的成员的高表达水平与癌症患者中的不良结果有关,因此当施用本发明的组合物以稳定和/或增强此类患者的微生物丛稳定性时,那些组合物将额外有助于预防或治疗癌症。

[0245]

	第3组 (MRx0518)	第4组 (MRx0554)	第5组 (MRx0858)	第6组 (REF10)	第7组(抗 CTLA4)
极性代 谢物(正 电离)	Neu5AC ↑↑ 谷氨酰胺 ↑ 丝氨酸 ↑ 加 12 种未 鉴别的代谢 物	ManNAc ↑ 胞嘧啶核苷 ↑ 丝氨酸 ↑ 甜菜碱 ↑ Neu5AC ↑ 谷氨酰胺 ↑ (异)亮氨酸 ↑ 组氨酸 ↑ 脯氨酸 ↑ 天冬氨酸 ↑ 瓜氨酸 ↑ 加 11 种未 鉴别的代谢 物	ManNAc ↑ 胞嘧啶核苷 ↑	ManNAc ↑ 胞嘧啶核 苷 ↑ 谷氨酰胺 ↑ 丝氨酸 ↑ Neu5AC ↑ 组氨酸 ↑ 加 6 种未 鉴别的代 谢物	无

[0246]

极性代 谢物(负 电离)	1-磷酸葡萄 糖 ↓ 7-磷酸景天 庚酮糖 ↓ 6-磷酸葡萄 糖 ↓ 5-磷酸核糖 ↓ 4-磷酸赤藓 糖 ↓ 加 145 种未 鉴别的代谢 物	1-磷酸葡萄 糖 ↓ 7-磷酸景天 庚酮糖 ↓ 6-磷酸葡萄 糖 ↓ 5-磷酸核糖 ↓ 4-磷酸赤藓 糖 ↓ 泛酸 ↑ 加 23 种未 鉴别的代谢 物	无	无	无
短链脂 肪酸代 谢物	丁酸盐 ↓	丁酸盐 ↓	无	无	无
脂质代 谢物(正 电离)	3 种未鉴别 的代谢物	无	2 种脂质	无	无
脂质代 谢物(负 电离)	68 种脂质	6 种脂质	2 种脂质	无	无

[0247] 表6与未经处理的对照组相比,在MRx0518组或抗CTLA-4组之间显著不同的极性、SCFA和脂质代谢物。

[0248] 实施例5-在鹑鸡肠球菌处理后的微生物丛的变化

[0249] 研究设计

[0250] 从CHARLES RIVER (L'Arbresles) 获得5-7周龄的健康雌性Balb/C (BALB/cByJ) 小鼠 (n=210), 并且注射EMT-6肿瘤细胞以建立乳腺癌模型。所述研究由7个处理组组成, 每个组中10只小鼠, 在3个时间点(第-15天、第-1天和第22天)取样。处理组为:

组	处理
[0251] G1	未经处理
G2	YCFA
G3	MRx0518
[0252] G4	抗 PD1
G5	抗 PD1 + MRx0518
G6	抗 CTLA4
G7	抗 CTLA4 + MRx0518

[0253] 在第-15天, 经由经口管饲法用 $2 \times 10^8$ MRX518处理小鼠。在第-1天(D-1), 通过皮下注射含 $1 \times 10^6$ 个EMT-6细胞的200 $\mu$ L RPMI 1640至右侧腰窝中, 小鼠植入EMT-6肿瘤细胞。在研究第13天, 通过以针对小鼠的最近个别体重调整的10ml/kg的体积, 注射至小鼠腹膜腔中来施用抗CTLA4 (BE0131, Bioxcell) 和PD-1。在研究期间的三个时间点, 第-15天、第-1天和第22天(研究结束), 收集粪便样品。

[0254] 产生微生物组组成数据-16S扩增子测序

[0255] 使用内部管道的修改, 实现数据的预处理。从测序返回的读段品质较差, 这意味着增添严格品质过滤步骤。Trimmomatic工具(0.36版)用于修整和品质过滤。分别从正向和反向读段去除开始16个和20个碱基对, 以去除引物序列。此后, 修整Phred品质分数低于25的前导或拖尾碱基对。接着, 滑动窗口4应用于数据, 并且如果窗口中的读段低于平均Phred分数22, 那么去除读段末端。如果在先前品质修整步骤后读段对中的一个或两个低于180个碱基对, 那么去除所述读段对。在品质过滤后, 下一步为使用FLASH工具(1.2.11版)合并读段。这从读段对产生单一读段, 同时滤出未组合的读段对。

[0256] 微生物组组成数据分析(测序后)

[0257] 使用QIIME (1.9.1版) 和SPINGO (1.3版) 进行代表性OTU序列的系统分类。通过参考RDP 11.2数据库, 使用QIIME assign\_taxonomy.py脚本将分类分配至种属水平。使用SPINGO工具分配物种水平分类。自举信赖度低于0.8的任何分类分配为标签“未分类”。

[0258]	样品数目	210
	每个样品的读段深度	17871 (6884.056)
[0259]	(平均值(标准偏差))	
	所产生的 OTU 数目	4181

[0260] 表7:数据集统计数据。

[0261] 1个样品89794\_D\_15具有1,086的极低序列深度。因此, 自多样性计算去除动物

89794的所有样品。

[0262] 高级数据分析

[0263] 使用R 3.4.3版统计软件进行分析。使用布雷-柯蒂斯相异性度量研究数据集的组成相异性。布雷-柯蒂斯度量是使用来自vegan程序包的vegdist函数在比例标准化的数据上计算。建立主坐标分析 (PCoA) 排序图以使不同处理对分类群组成的作用直观化。使用made4和ggplot2程序包建立PCoA图。使用来自vegan程序包的adonis函数,对布雷-柯蒂斯相异性进行置换MANOVA统计检验。

[0264] 结果

[0265] 使用R程序包DESeq2测试分类群的不同丰度。以将处理作用与YCFA对照物相比的方式,来模拟完整数据集。在OTU水平和5个系统分类水平中的每一个下进行测试:门、纲、目、科和属。认为在调整过的p值小于0.05下分类群为显著的。仅仅log变化倍数超过0.5的分类群视为可靠的。这在每个时间点进行重复。在第-15天,无显著分类群。表8和表9中分别显示第-1天和第22天的显著分类群。正log变化倍数指示与媒介物相比,处理组中分类群增加。

水平	处理	分类群	分类水平	分类	Log2 变化倍数			标准误差	调整过的p值
					Log2 变化倍数	标准误差	p 值		
[0266]	属	抗 CTLA4	厌氧杆菌属 (Anaerotruncus)	NA	NA	-1.290	0.38	0.028	
	OTU_表	MRx0518	OTU_50	科	毛螺菌科	4.780	1.13	0.043	
	OTU_表	MRx0518	OTU_121	属	巴恩斯氏菌属	2.120	0.44	0.004	
	OTU_表	抗 PD1	OTU_121	属	巴恩斯氏菌属	2.237	0.48	0.014	
[0267]	OTU_表	抗 PD1	OTU_354	科	毛螺菌科	5.245	1.17	0.014	
	OTU_表	抗 CTLA4	OTU_77	科	毛螺菌科	-24.844	3.91	8.21E-07	
	OTU_表	抗 CTLA4	OTU_79	纲	梭状芽孢杆菌纲	-1.398	0.32	0.014	
	OTU_表	抗 CTLA4	OTU_121	属	巴恩斯氏菌属	2.382	0.48	0.002	
	OTU_表	抗 CTLA4	OTU_186	科	毛螺菌科	4.196	0.98	0.017	

[0268] 表8:在第-1天,当与YCFA (媒介物) 相比时,在每个处理组中观察到的不同丰度的分类群。

水平	处理	分类群	分类水平	分类	Log2 变化倍数	标准误差	调整过的 p 值
[0269]	门	抗 PD1	脱铁杆菌门 (Deferrribacteres)	NA	NA	1.556	0.559 0.048
	门	抗 CTLA4	脱铁杆菌门	NA	NA	1.470	0.559 0.039
	门	抗 CTLA4	柔膜菌门 (Tenericutes)	NA	NA	-2.587	0.741 0.004
	纲	抗 PD1	脱铁杆菌门	NA	NA	1.526	0.559 0.044
	纲	抗 PD1	未分类	NA	NA	-1.004	0.313 0.019
	纲	抗 CTLA4	柔膜细菌目 (Mollicutes)	NA	NA	-2.583	0.761 0.010
	纲	抗 CTLA4	未分类	NA	NA	-0.954	0.313 0.016
	目	抗 PD1	厌氧原体目 (Anaeroplasmatales)	NA	NA	-2.182	0.774 0.041
	目	抗 PD1	未分类	NA	NA	-1.198	0.365 0.017
	目	抗 CTLA4	厌氧原体目	NA	NA	-2.997	0.775 0.002
	目	抗 CTLA4	未分类	NA	NA	-1.286	0.365 0.004
	科	抗 PD1	厌氧支原体科 (Anaeroplasmatacea e)	NA	NA	-2.232	0.764 0.043
	科	抗 PD1	未分类	NA	NA	-1.185	0.407 0.043
	科	抗 CTLA4	厌氧支原体科	NA	NA	-2.981	0.764 0.002
	科	抗 CTLA4	脱硫弧菌科 (Desulfovibrionacea e)	NA	NA	0.972	0.348 0.042
	科	抗 CTLA4	未分类	NA	NA	-1.200	0.407 0.039
	属	抗 CTLA4	厌氧支原体属 (Anaeroplasma)	NA	NA	-3.042	0.774 0.004
	OTU	MRx0518 _表	OTU_125	科	毛螺 菌科	8.098	1.825 0.012
	OTU	MRx0518 _表	OTU_2853	属	别样 杆菌 属	2.062	0.469 0.012
	OTU	抗 CTLA4 _表	OTU_125	科	毛螺 菌科	9.871	2.022 0.002

[0270] 表9:在第22天,当与YFCA(媒介物)相比时,在每个处理组中观察到的不同丰度的分类群。

[0271] 图3(c)展示与MRx0518处理相关的分类群趋势。用MRx0518处理的小鼠聚集在坐标图的顶部并具有正的PC2值,而其它处理聚集在坐标图的底部并具有负的PC2值。这还展示在图3(a)中。图3(b)展示在处理前的分类群。很明显,此聚集只在用MRx0518处理后出现。

[0272] 进行补充分析以鉴别与MRx0518反应相关的分类群,如在图3中排序图中第二轴上所目测。所述分析表明与在第22天观察到的MRx0518反应相关的分类群的差异。

[0273] 所述分析由如在R中使用cor.test函数进行的斯皮尔曼相关分析(spearman correlation analysis)组成。仅仅展示具有指示这些分类群与所述趋势有关的正 $\rho$ 及指示这些分类群反相关的负 $\rho$ 的显著分类群。

[0274] 表6展示在第22天时间点相比于媒介物对照物(YFCA)显著不同的分类群。这些数据证实用MRx0518处理可以增加巴恩斯氏菌属物种的丰度。本发明的组合物能够增加已经与环磷酰胺功效相关的巴恩斯氏菌属物种的水平。

	p 值	$\rho$
别样杆菌属	1.77E-05	-0.571
普雷沃菌属	0.000332	0.491
副杆状菌属	0.00183	0.441
霍氏菌属	0.00553	0.404
厌氧杆菌属	0.0126	0.375
拟杆菌属	0.0136	0.366
黄杆菌属	0.045	0.318
梭状芽孢杆菌	0.0451	0.308
吸血弧菌属	0.0451	0.313
厌氧支原体	0.0487	0.301
巴恩斯氏菌	0.0487	0.297

[0276] 表10:在第22天观察到的与MRx0518处理相关的分类群

[0277] 序列

[0278] SEQ ID NO:1 (鹌鹑肠球菌16S rRNA基因-AF039900)

1 taatacatgc aagtcaacg cttttctt caccggagct tgctccaccg aaagaaaaag  
61 agtggcgaac gggtagtaa cacgtggta acctgcccac cagaaggaa taacacttgg  
121 aaacaggtgc taataccgtt taacactt ttccgcattt aagaaagttt aaaggcgctt  
181 ttgcgtcaact gatggatgg cccgcggcattt attagctatg tggtgaggta acggctcacc  
241 aaggccacga tgcatacccg acctgagagg gtgatcgcc acactggac tgagacacgg  
301 cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa achtgcacc  
361 agcaacgcgg cgtgagtgaa gaaggttttc ggatcgtaaa actctgttgt tagagaagaa  
421 caaggatgg agtagaacgt tcatccctt acggtatcta accagaaagc cacggctaaac  
481 tacgtgccag cagccgcgg aatacgttagg tggcaagcgt tgcggatt tattgggctg  
541 aaagcgagcg caggcggttt cttaagtctg atgtgaaagc ccccgctca accggggagg  
601 gtcattggaa actgggagac ttgagtgcaag aagaggagag tggatttcca tgcgttagcgg  
661 tgaaatgcgt agatataatgg aggaacacca gtggcgaagg cggctctctg gtctgttaact  
721 gacgctgagg ctcgaaacgc tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgc  
781 gtaaacgtatg agtgctaagt gttggagggt ttccgcctt cagtctgcga gaaacgcatt  
841 taagcactcc gcctggggag tacgaccgc aagttgaaac tcaaaggaat tgacgggggg  
901 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcaagaacc ttaccaggc  
961 ttgacatcc ttgaccactc tagagataga gcttccctt cggggcaaa gtgacaggg  
1021 gtgcattgggtt gtcgtcagct cgtgtcgta gatgttgggt taagtccgc aacgagcga  
1081 acccttattt ttagttgcca tcatttagtt gggcactcta gcgagactgc cggtgacaaa  
1141 ccggaggaag gtggggatga cgtcaatca tcatgcctt tatgacctgg gctacacacg  
1201 tgctacaatg ggaagtacaa cgagttcgta agtgcgcagg ctaagctaattt ctctaaagc  
1261 ttctctcaatg tcggattgtt ggctgcaact cgcctacatg aagccgaaat cgcttagtaat  
1321 cgcggatcaac cacggccgg tgaatacgtt cccggccctt gtacacaccc cccgtcacaac  
1381 cacgagagtt tgtaacaccc gaagtcgggtt aggttaaccc tttggagcca gccccttaag  
1441 gtgggataga tgattgggtt gaagtcgtttaa caaggttagcc gtatcggaag gtgcggctgg  
1501 atcacc

[0280] SEQ ID NO:2 (鸡鸡肠球菌菌株MRX518的共同16S rRNA序列)

- TGCTATACATGCAGTCGAACGTTTCTTCACCGGAGCTGCTCCACCGAAAGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTGA  
 GTAACACGTGGTAACCTGCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACACTATTTTC  
 CGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCCTTGCCTGACTGATGGATGGACCCGCGGTGATTAGCTAGTTGGTAGGTA  
 ACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTAGCGGACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC  
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAACTTCGCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTAGGTGAAGAAG  
 [0281] GTTTCGGATCGTAAAAACTCTGTTAGAGAAGAACAGGTAGAGTAGAACGTTCATCCCTGACGGTATCTAA  
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTGCTCCGGATTATTGGC  
 GTAAAGCGAGCGCAGGCCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGG  
 GAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCCATGTGTAGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGT  
 GCGAAGGCGGCTCTCTGGCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGG  
 TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCA  
 CTCGCCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGGAGCATGTG  
 GTTTAATTGAAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAGGTCTGACATCCTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTCCCTT  
 CGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTCATGGTGTGTCAGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGC  
 GCAACCCCTATTGTTAGTGTGCCATTTAGTGGGACTCTAGCGAGACTGCCGGTACAATGGGAACTACAACGAGTTGCGAA  
 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAACTACAACGAGTTGCGAA  
 GTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTAAAGCTCTCAGTTCGATTGAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGA  
 ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGGTGAATACGTTCCGGGCTTGTACACACCGCCGTACACCCACGA  
 GAGTTGTAACACCGAAGTCGGTAGGGTAAACCTTTGGAGGCCAGCGCCCTAAGGT
- [0283] SEQ ID NO:3 (菌株MRX518染色体序列) -参见电子序列表。  
 [0284] SEQ ID NO:4 (菌株MRX518质粒序列) -参见电子序列表。  
 [0285] SEQ ID NO:5 (鹑鸡肠球菌菌株MRx0554的共同16S rRNA序列)  
 TTCACCGCGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTCATGTAGGCCAGTTGCAACCTACA  
 ATCCGAACCTGAGAGAACGTTAACAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTCGCAACTCGTTGACTTCCCAT  
 TGTCACGTGTGTAGCCCAGGTCTAACAGGGCATGATGATTGACGTCACTCCCACTTCCCTCCGGTT  
 TGTCACCGGGCAGTCTCGCTAGAGTCCAAACTAAATGATGGCAACTAACATAAGGGTTGCGCTCGTT  
 GCGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAACCACCTGTCACCTTCC  
 CGAAGGGAAAGCTCTAGCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGTAAGGTTCTCGCTTGCT  
 TCGAATTAAACCACATGTCACCCGGCTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTGAGTTCAACCTTGC  
 TCGTACTCCCCAGGCGAGTGTAAATGCGTTGCTGCAGCACTGAAGGGCGAAACCTCCAACACT  
 TAGCACTCATGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAACCTGTTGCTCCACGCTTCGAGCC  
 TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCACTGGTGTCCATATCTACGCATTAC  
 CGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTCCAATGACCCCTCCCGGT  
 TGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAATCCGGA  
 CAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTAGATAC  
 CGTCAAGGGATGAACGTTACTCTCATCCTGTTCTCTAACACAGAGTTACGATCCGAAAC  
 CTTCTTCACTCACGCCGCGTGTGCTGGTCAGACTTCTGCAATTGCCAAGATTCCACTGCTGC  
 CCGTAGGAGTCTGGCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATACCCCTCTCAGGGCGTATGCA  
 GGCCTTGGTGAAGCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCAACGCCGGCCATCCATCA  
 GCGCCTTCAACTTCTCCATGCGGAAATAGTGTATACGGTATTAGCACCTGTTCAAGTGT  
 CCCCTCTGATGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCGCTCGCCACTCTT
- [0287] 参考文献  
 [0288] [1] Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol. 9 (4) :279-90.  
 [0289] [2] Eckburg et al. (2005) Science. 10;308 (5728) :1635-8.  
 [0290] [3] Macpherson et al. (2001) Microbes Infect. 3 (12) :1021-35  
 [0291] [4] Macpherson et al. (2002) Cell Mol Life Sci. 59 (12) :2088-96.  
 [0292] [5] Mamanian et al. (2005) Cell 15;122 (1) :107-18.  
 [0293] [6] Frank et al. (2007) PNAS 104 (34) :13780-5.

- [0294] [7] Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol.* 44 (11) :3980–8.
- [0295] [8] Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16 (12) :2034–42.
- [0296] [9] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63 (8) :1275–83.
- [0297] [10] Sheflin et al (2014) *Curr Oncol Rep.* 16 (10) :406.
- [0298] [11] Lozupone (2012) *Nature.* 2012 September 13;489 (7415) :220–230
- [0299] [12] DeSantis et al (2007) *Microbial Ecology.* 53, 3, 371–383.
- [0300] [13] Vogt et al. (2017) *Scientific Reports* 7 (1) :13537 doi:10.1038/s41598-017-13601-y
- [0301] [14] Keshavarzian et al. (2015) *Movement Disorders*, 30, pp.1351–1360 doi: 10.1002/mds.26307
- [0302] [15] Kang et al. (2013) *PLoS ONE* 8 (7) e68322 doi:10.1371/journal.pone.0068322
- [0303] [16] Jangi et al. (2015) *Nature Communications*, 7, 12015 doi:10.1038/ncomms12015
- [0304] [17] Chen et al. (2016) *Sci. Rep.* 6, 28484 doi:10.1038/srep28484
- [0305] [18] Pozuelo et al. (2015) *Scientific Reports*. 5:12693. doi:10.1038/srep12693
- [0306] [19] Ott et al. (2004) *Gut* 53:685–693 doi:10.1136/gut.2003.025403
- [0307] [20] Frank et al. (2007) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 13780–13785 doi:
- [0308] [21] Michail et al. (2012) *Inflammatory Bowel Diseases* 18 (10) pp1799–1808. doi:10.1002/ibd.22860
- [0309] [22] Chen et al. (2016) *Genome Med.* 8:43 doi:10.1186/s13073-016-0299-7
- [0310] [23] Scher et al. (2015) *Arthritis Rheumatol.* 67, 128–139 doi:10.1002/art.38892.
- [0311] [24] Giongo et al. (2011) *ISME J.* , 5 pp. 82–91 doi:10.1038/ismej.2010.92
- [0312] [25] Claesson et al. (2012) *Nature* 488, 178–184. doi:10.1038/nature1319
- [0313] [26] Giloteaux et al. (2016) *Microbiome*, 4 (30) doi:10.1186/s40168-016-0171-4
- [0314] [27] Manero et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* , 65, 104425–4430.
- [0315] [28] Williams et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:6531–6535.
- [0316] [29] Collins et al. (1984) *Int J Syst Evol Microbiol.* 34:220–223.
- [0317] [30] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557–563.
- [0318] [31] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M, Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- [0319] [32] Smith&Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482–489.
- [0320] [33] Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol.5, supp.3
- [0321] [34] Srutková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87 (1) :10–6.
- [0322] [35] Schenk et al (2011) *Sic Signal*, 4, 162

- [0323] [36]Atarashi et al (2008) *Nature*,455,7214,808–812
- [0324] [37]Karmakar et al (2015) *Nature Communications* 7,10555
- [0325] [38]Daillère et al (2016) *Immunity*.18;45 (4) :931–943
- [0326] [39]W02013/050792
- [0327] [40]McIlroy et al. (2018) *Aliment Pharmacol Ther*.47:26–42.
- [0328] [41]Viaud et al. (2013) *Science* 342 (6161) :971–976.
- [0329] [42]Moustafa et al. (2018) *Clinical and Translational Gastroenterology*, 9,e132
- [0330] [43]Cocco J (1987) *Epidemiol Community Health.*;41 (2) :89–93.
- [0331] [44]Benito et al. (2017) *Oncotarget.*;8 (63) :106693–106706
- [0332] [45]Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [0333] [46]Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol*.3 (2) :39–48.
- [0334] [47]Handbook of Pharmaceutical Excipients,2nd Edition, (1994) ,Edited by A Wade and PJ Weller
- [0335] [48]Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R.Gennaro edit.1985)
- [0336] [49]Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J.Gen.Appl.Microbiol.*,54,9–24.
- [0337] [50]Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols,ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [0338] [51]Leslie et al. (1995) *Appl.Environ.Microbiol*.61,3592–3597.
- [0339] [52]US 2016/0067188
- [0340] [53]Handbook of Microbiological Media,Fourth Edition (2010) Ronald Atlas.CRC Press.
- [0341] [54]Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C.Hunter-Cevera, Academic Press
- [0342] [55]Strobel (2009) *Methods Mol Biol*.581:247–61.
- [0343] [56]Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy.20th edition, ISBN:0683306472.
- [0344] [57]Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al.,eds.,1998, Academic Press) .
- [0345] [58]Methods In Enzymology (S.Colowick and N.Kaplan,eds., Academic Press, Inc.)
- [0346] [59]Handbook of Experimental Immunology, Vols.I-IV (D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds,1986, Blackwell Scientific Publications)
- [0347] [60]Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press) .
- [0348] [61]Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S.ed., CRC Press,1997)
- [0349] [62]Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th

edition (Current Protocols) .

[0350] [63]PCR (Introduction to Biotechniques Series) ,2nd ed. (Newton&Graham eds., 1997, Springer Verlag)

**PCT**

打印 (电子版原件)  
(此页不是也不算为国际申请的页)

0-1	表 PCT/RO/134 关于微生物保藏或其它生物材料的说明 (PCT 细则 13 之二)	
0-1-1	准备使用	PCT 在线提交 版本 3.5.000.256 e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
0-2	国际申请号	
0-3	申请人或代理人档案号	P071027WO

1	对下述说明书中所述的已保藏的微生物或其它生物材料的说明:	
1-1	页数	6
1-2	行数	8 - 13
1-3	保藏证明	
1-3-1	保藏单位名称	NCIMB 国家工业、食品和海洋细菌保藏中心 (NCIMB)
1-3-2	保藏单位地址	NCIMB 有限公司, 弗格森大厦, 克莱伯斯通庄园, 巴克斯伯恩, 亚伯丁, AB21 9YA, 英国
[0351]	1-3-3 保藏日期	2015 年 11 月 16 日 (16.11.2015)
	1-3-4 保藏号	NCIMB 42488
	1-5 为哪个指定国而作	所有指定国
2	对下述说明书中所述的已保藏的微生物或其它生物材料的说明:	
2-1	页数	6
2-2	行数	14 - 19
2-3	保藏证明	
2-3-1	保藏单位名称	NCIMB 国家工业、食品和海洋细菌保藏中心 (NCIMB)
2-3-2	保藏单位地址	NCIMB 有限公司, 弗格森大厦, 克莱伯斯通庄园, 巴克斯伯恩, 亚伯丁, AB21 9YA, 英国
	2-3-3 保藏日期	2017 年 5 月 22 日 (22.05.2017)
	2-3-4 保藏号	NCIMB 42761
	2-5 为哪个指定国而作	所有指定国

由受理局填写

0-4	本表已经和国际申请一起收到: (是或否)	是
0-4-1	授权官员	Kuiper-Cristina, Nathalie

**PCT**

打印 (电子版原件)  
(此页不是也不算为国际申请的页)

[0352]

由国际局填写

0-5	国际局收到本表日期:	
0-5-1	授权官员	

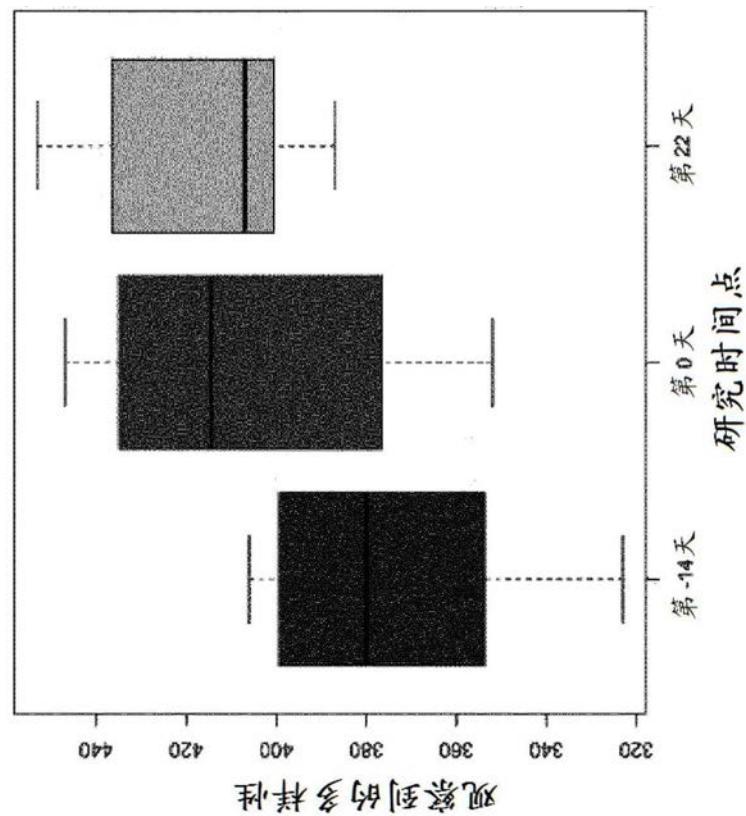


图1a

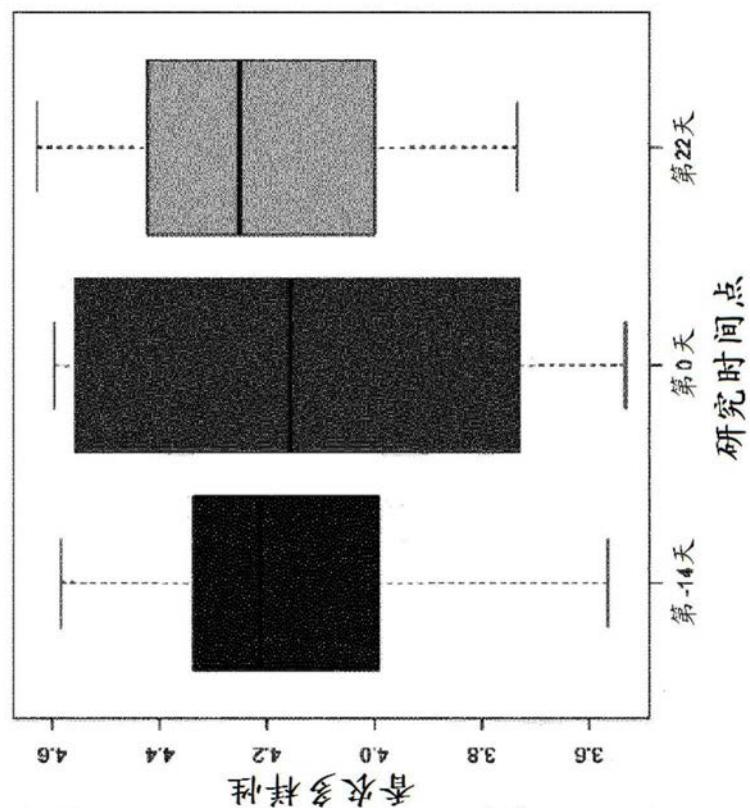


图1b

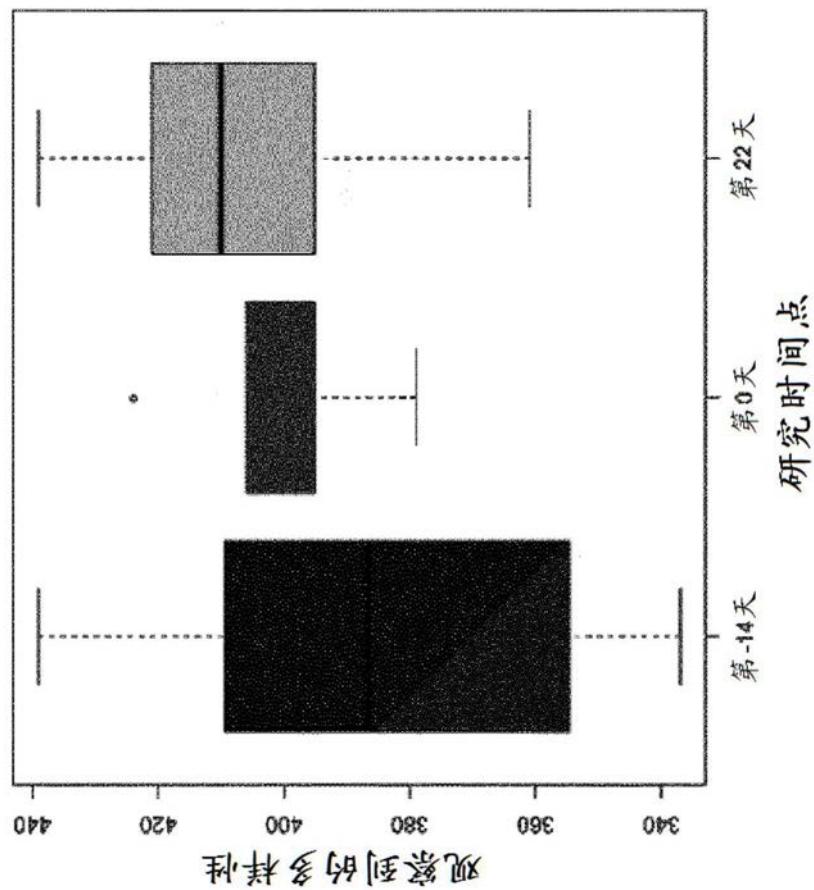


图1c

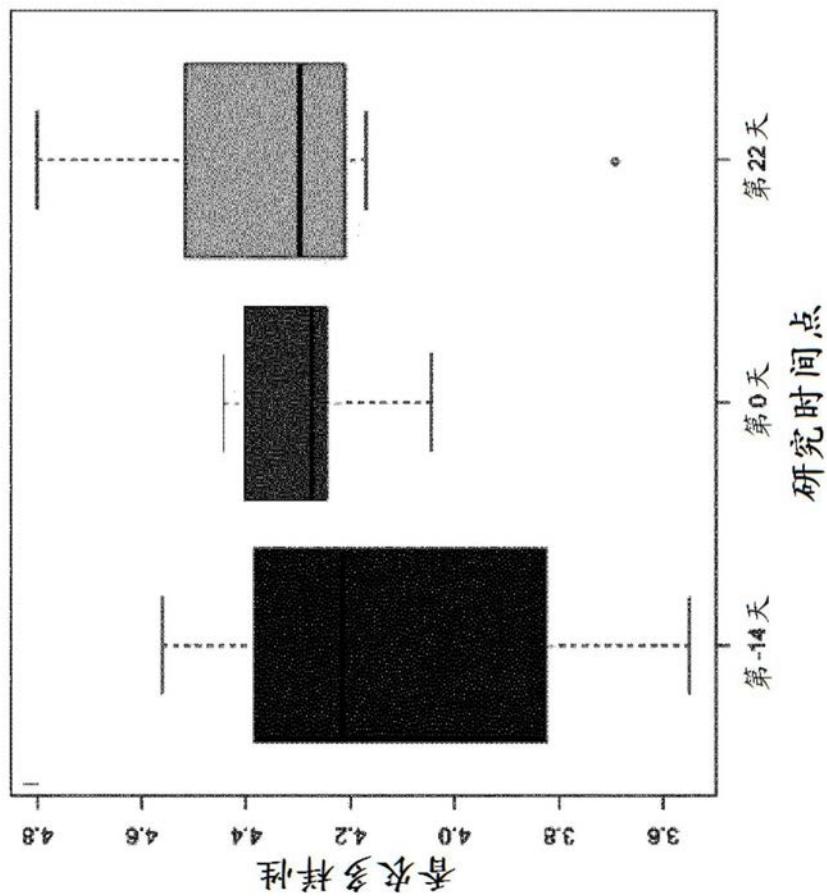


图1d

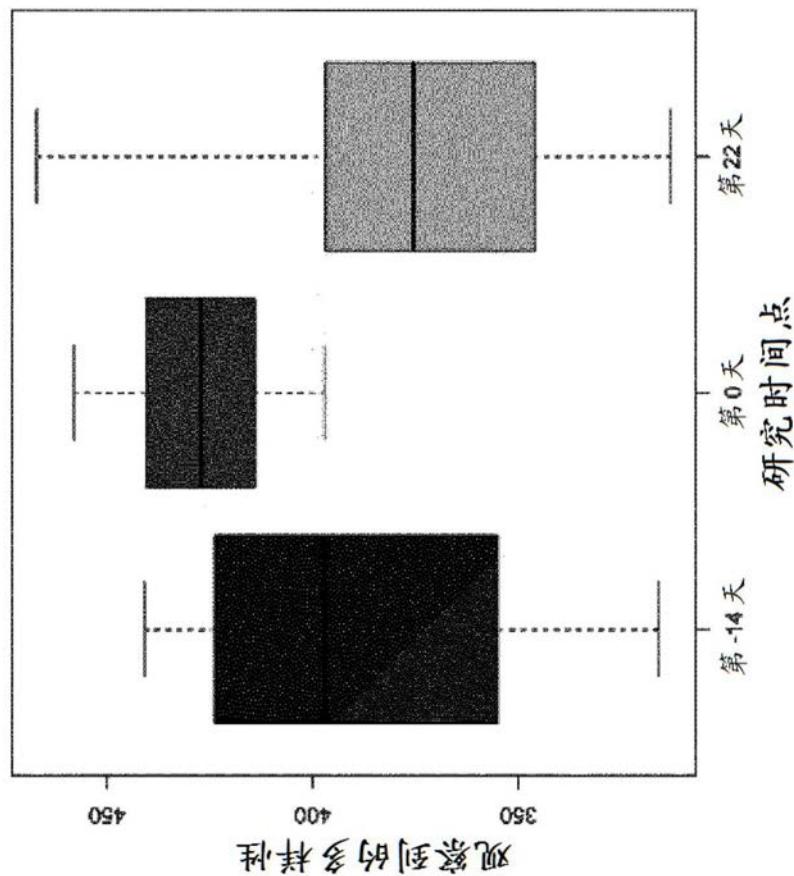


图1e

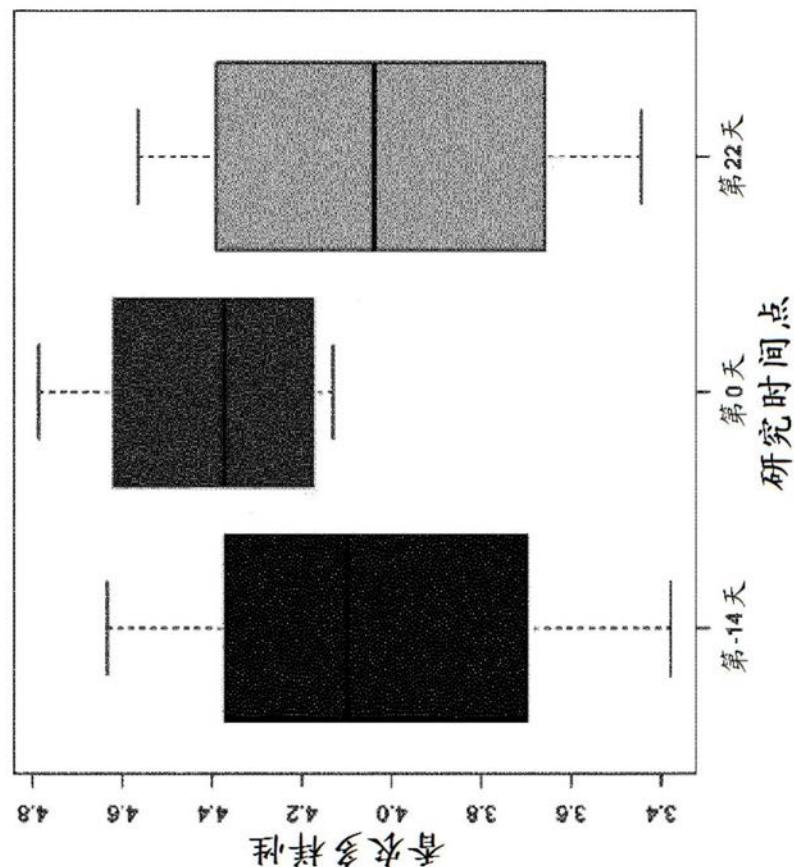


图1f

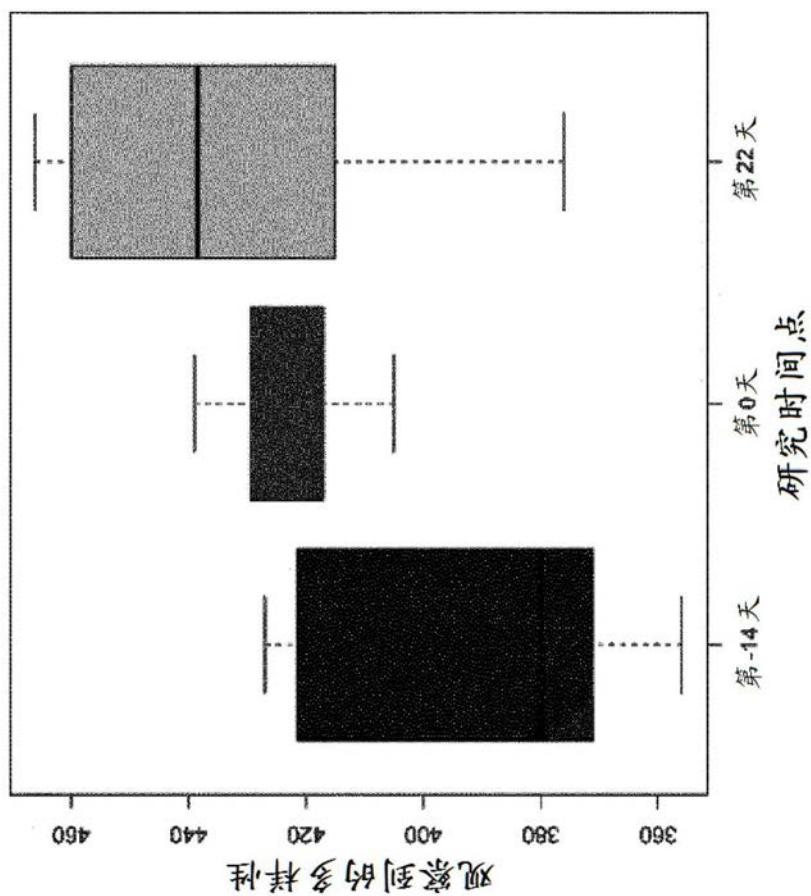


图1g

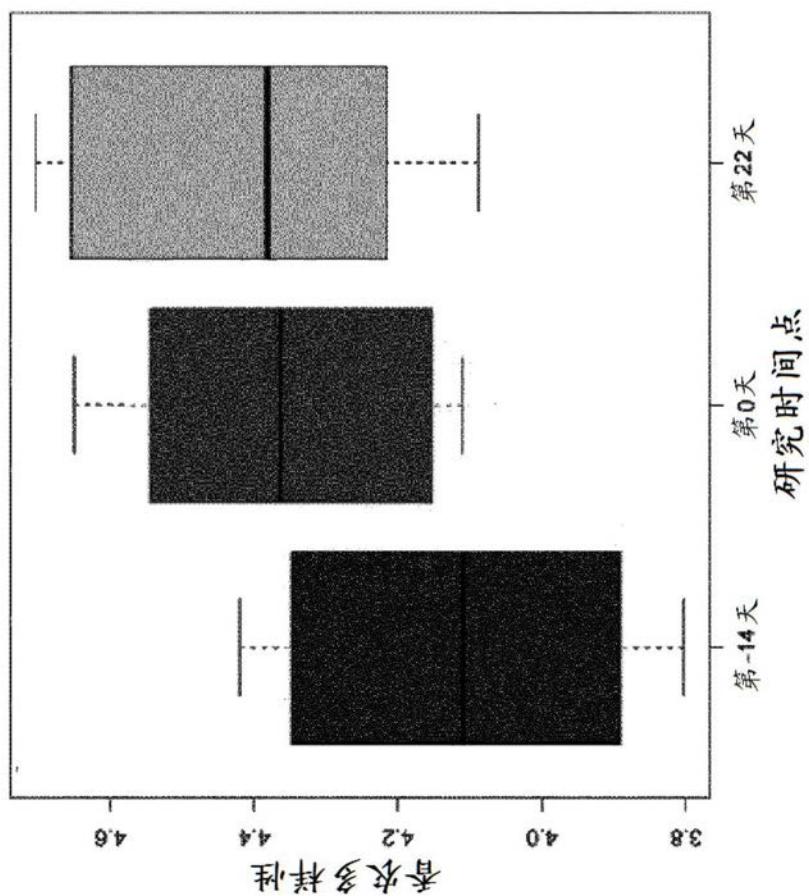


图1h

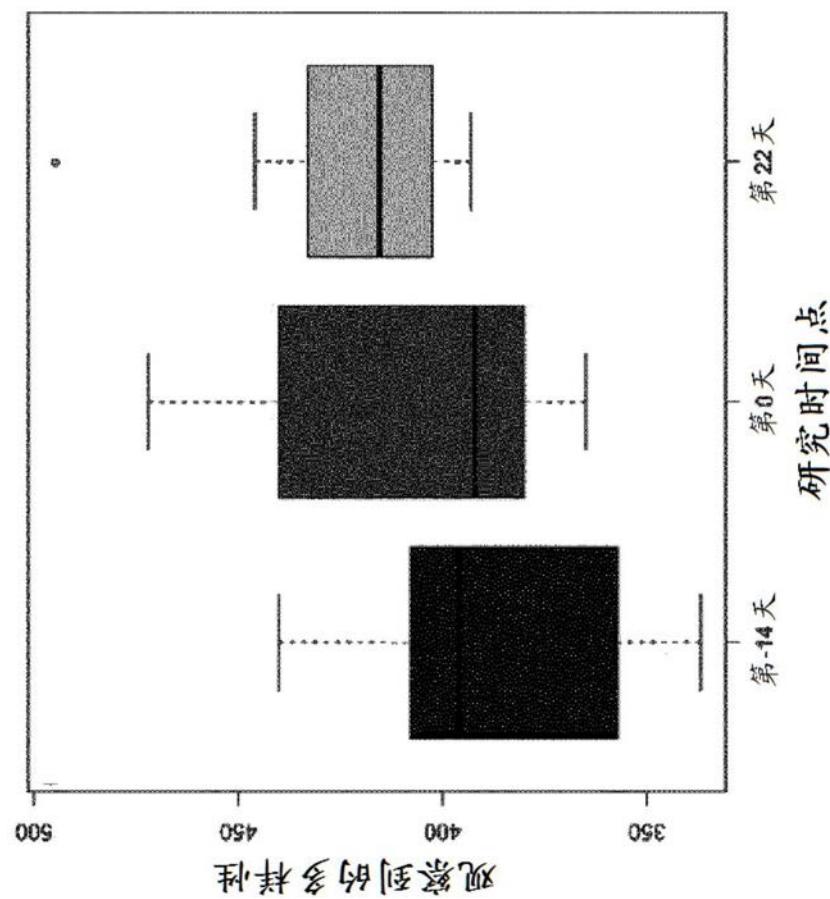


图1i

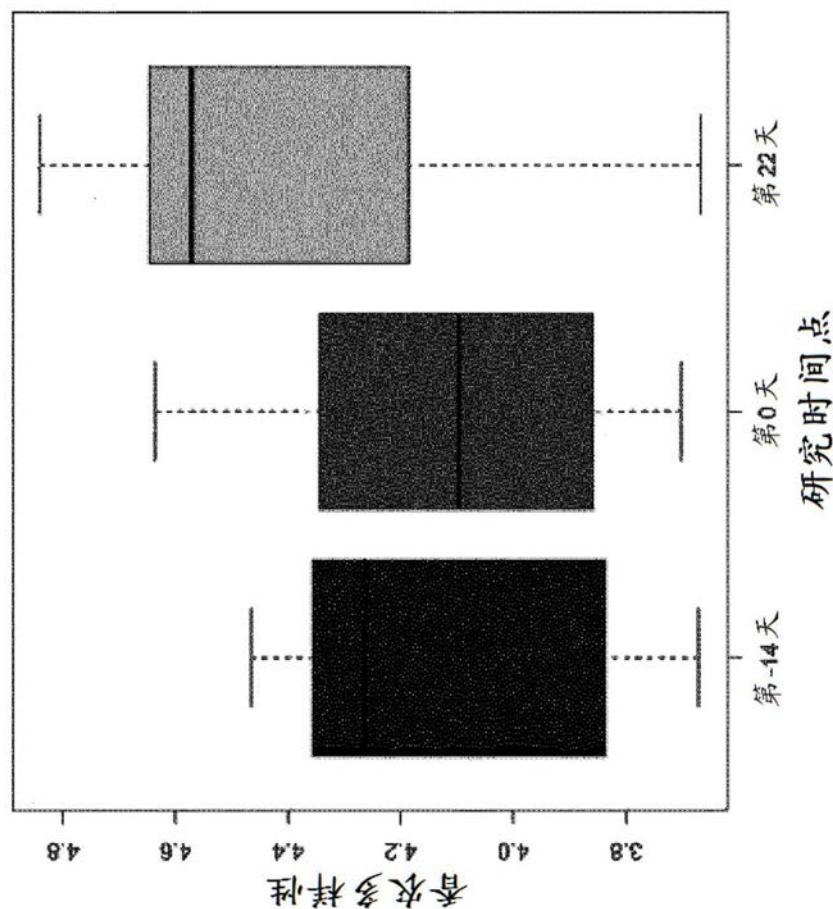


图1j

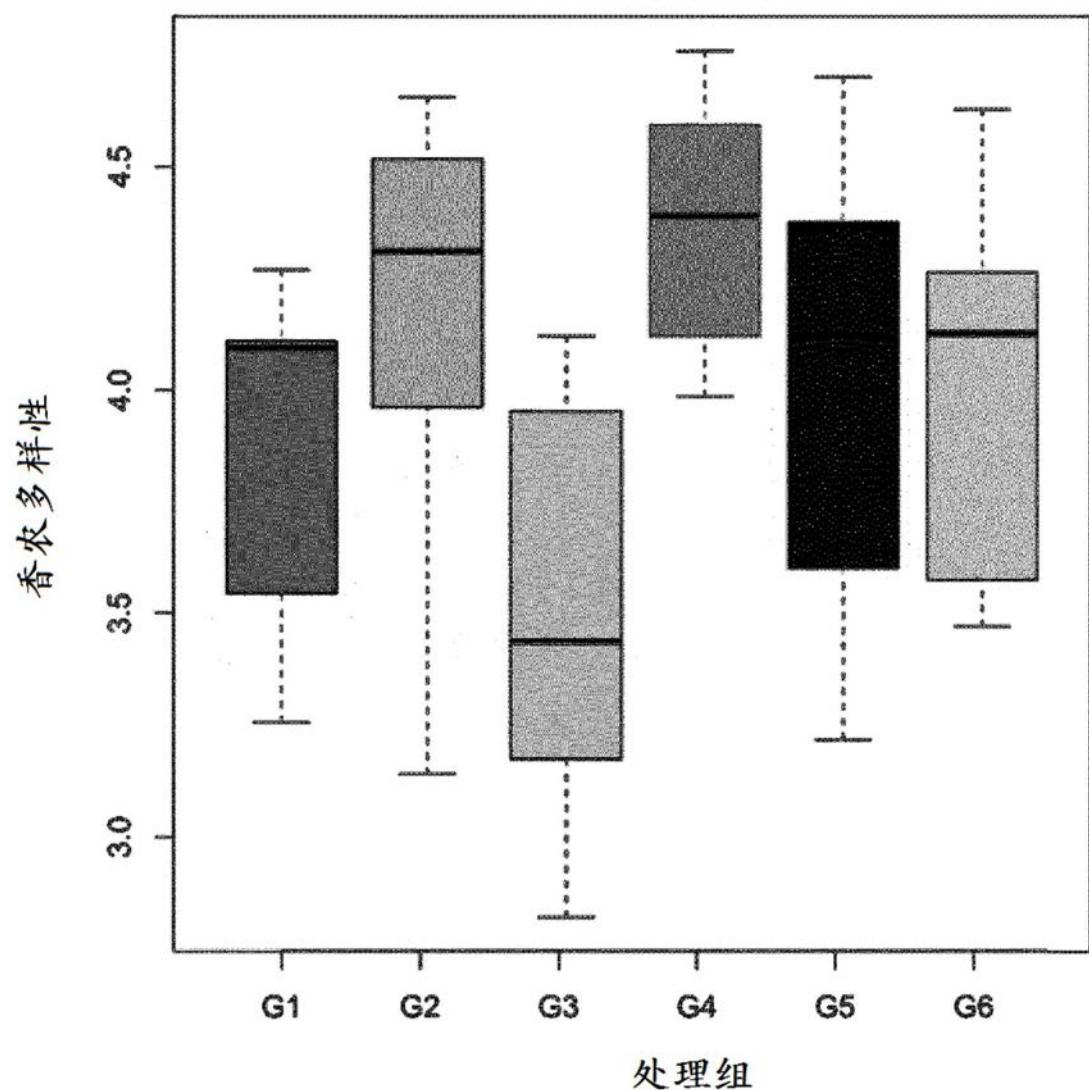


图2

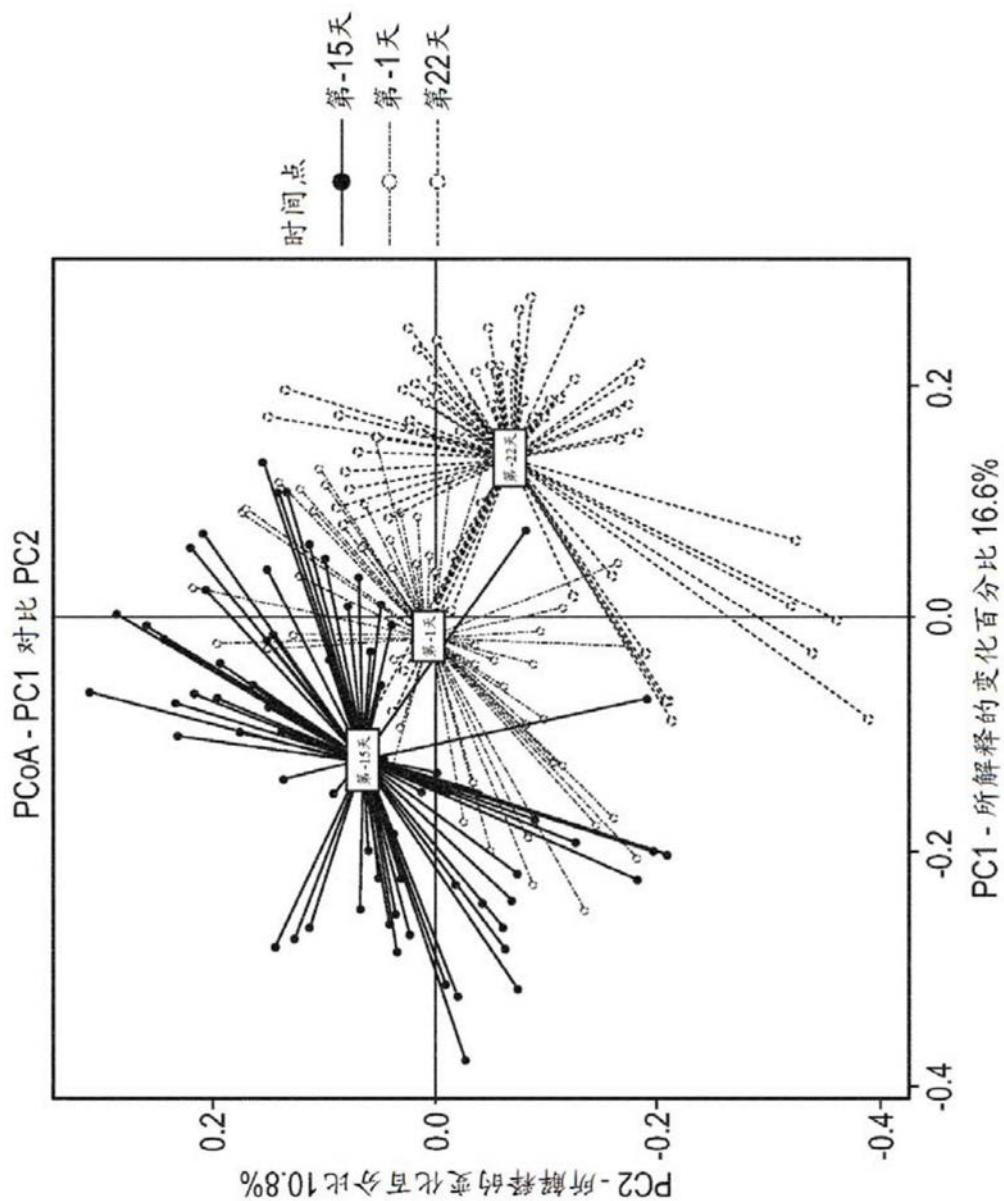


图3a

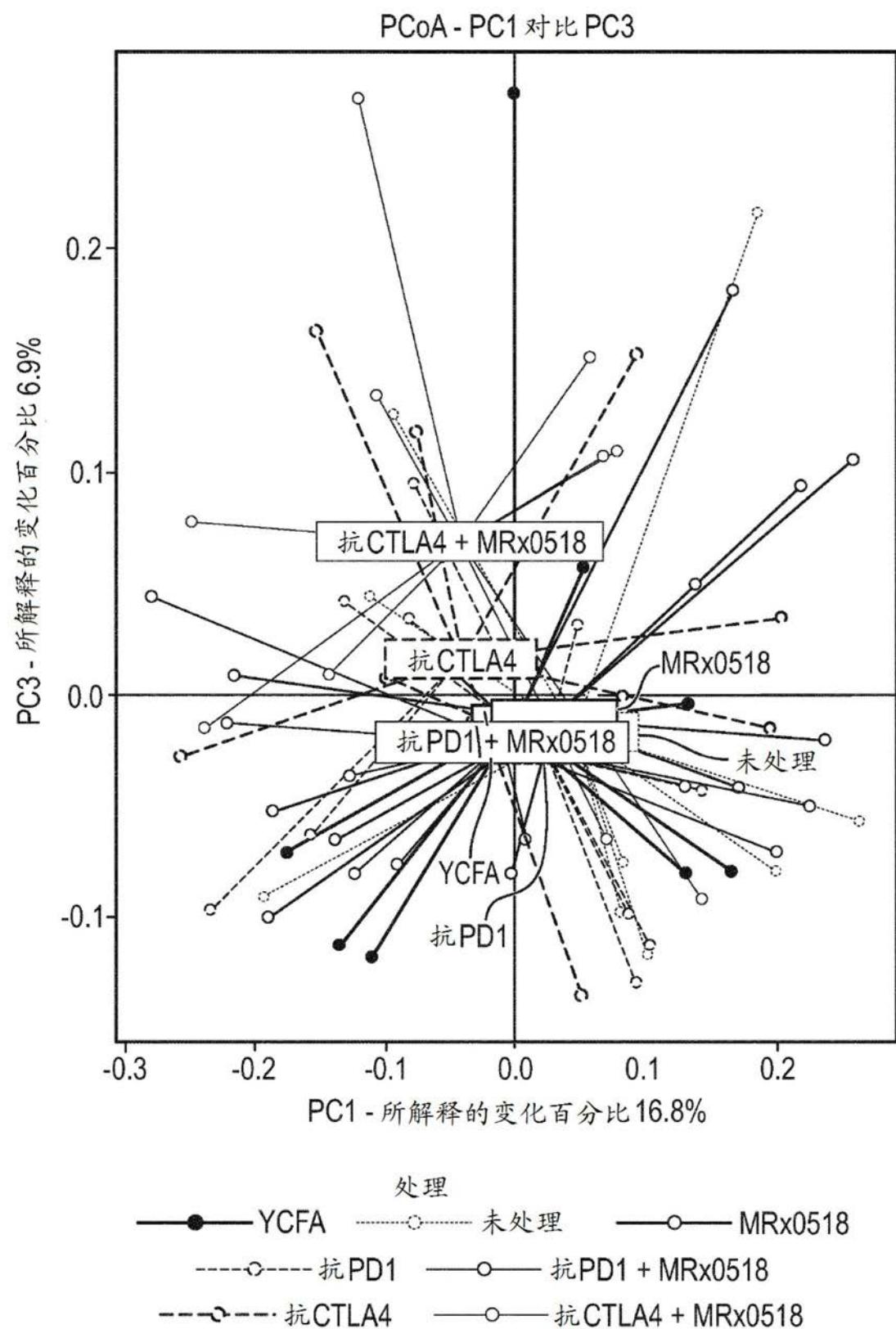


图3b

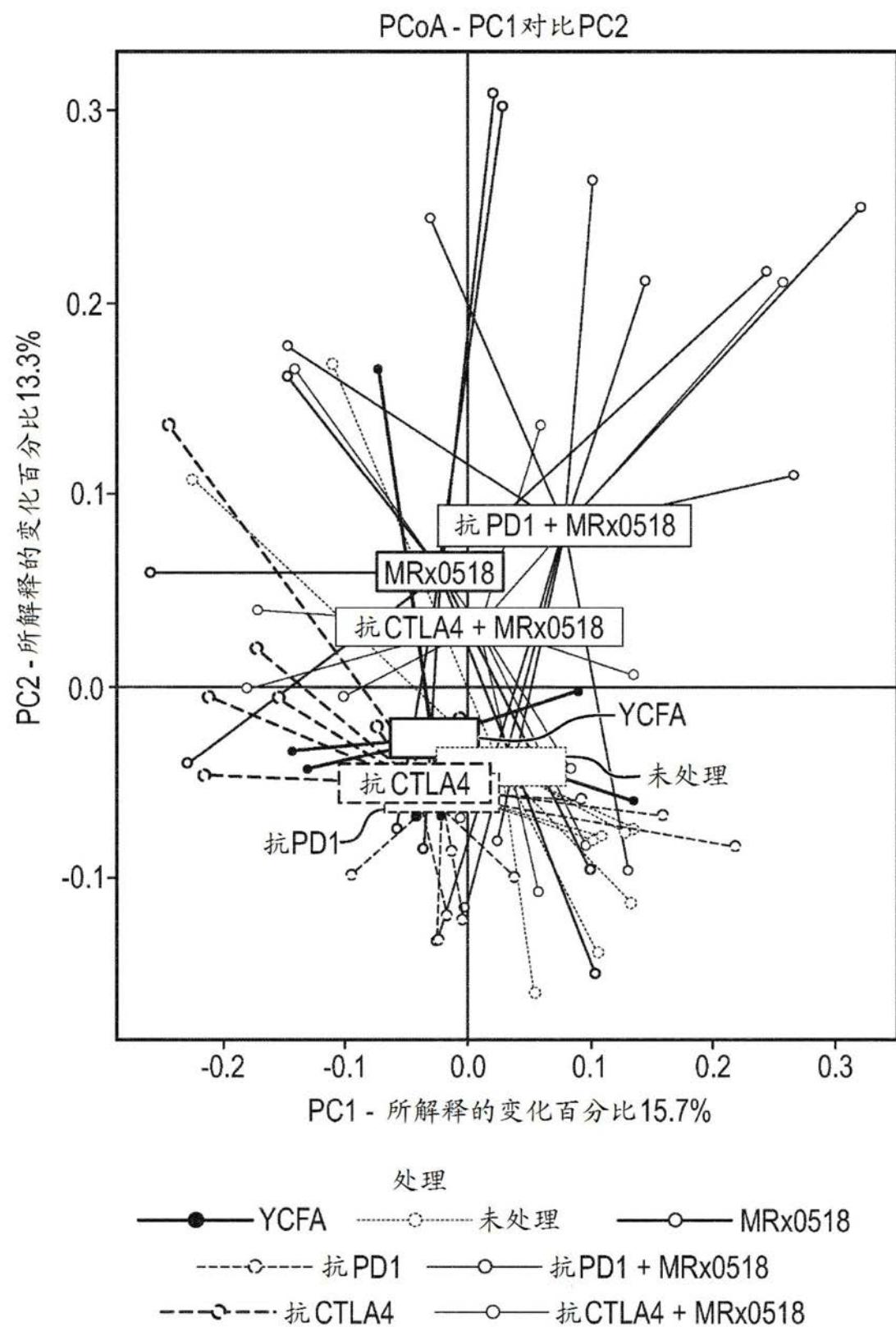


图3c